

Universitat Autònoma de Barcelona
Facultat de Medicina
Departament de Cirurgia

**EFFECTE DEL PRECONDICIONAMENT ISQUÈMIC
SOBRE LA REGENERACIÓ HEPÀTICA
DESPRÉS D'UNA RESECCIÓ HEPÀTICA MASSIVA**

Tesi presentada per la doctoranda Núria Peláez Serra per optar al grau de Doctora en Medicina i Cirurgia sota la direcció dels Doctors Luis Grande Posa i Juli Busquets Barenys.



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

Luis GRANDE POSA, Professor Titular del Departament de Cirurgia de la Facultat de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona

MANIFIESTA

Que el treball titulat "Efecte del Precondicionament isquèmic sobre la regeneració hepàtica després d'una resecció hepàtica massiva", del que és autora la Sra. Núria Pelàez Serra, s'ha fet sota la meva direcció i és adequat per ser presentat per la seva avaluació com a Tesi Doctoral al Tribunal Qualificador, per l'obtenció del grau de doctor

I perquè en prengueu coneixement i tingui els efectes que corresponguin, signo el present document a Barcelona el dia deu d'octubre de l'any dos mil vuit.

Luis Grande Posa
Professor Titular de Cirurgia
Departament de Cirurgia

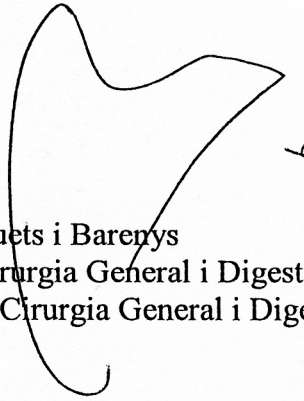
Juli Busquets i Barenys, Metge Adjunt del Servei de Cirurgia General i Digestiva

MANIFESTA

Que el treball titulat "EFECTE DEL PRECONDICIONAMENT ISQUÈMIC SOBRE LA REGENERACIÓ HEPÀTICA DESPRÉS D'UNA RESECCIÓ HEPÀTICA MASSIVA", del que és autora la Sra. Núria Pelàez i Serra, s ha fet sota la meva direcció i és adequat per ser presentat per la seva avaluació com a Tesi Doctoral al Tribunal Qualificador, per l obtenció del grau de doctor

I perquè en prengueu coneixement i tingui els efectes que corresponguin, signo el present document a Barcelona el dia deu d'octubre de l'any dos mil vuit.

Atentament,



Juli Busquets i Barenys
Adjunt Cirurgia General i Digestiva
Servei de Cirurgia General i Digestiva

L'Hospitalet de Llobregat, 29 de febrer de 2008

A la memòria del meu pare.

“Més s’estima allò que amb treball es guanya”

Aristòtil

Els meus agraïments a tothom que d'alguna manera o altre m'han ajudat a la realització d'aquesta tesi i a formar-me com a cirurgiana.

En primer lloc agrair-li al Dr. Grande cap de Servei de Cirurgia General de l'Hospital Universitari del Mar per la direcció d'aquesta tesi i la seva capacitat per inculcar-me l'esperit investigador.

Al Dr. Busquets director d'aquesta tesi, sense la teva ajuda aquesta tesi no hagués estat possible. Gràcies per tantes coses, per ensenyar-me molt del que sé, per aconsellar-me sempre i per ajudar-me en els moments difícils. Espero poder seguir aprenent de tú, és realment encoratjador treballar al costat d'una persona amb tantes inquietuds.

Al Dr. Navarro, professor, tutor i amic, gràcies per la nostra relació i gràcies per la ensenyança en l'art de la cirurgia, ha estat un veritable plaer treballar al teu costat i poder aprendre d'una persona a qui li apassiona tant ensenyar.

A tots els membres del Servei de Cirurgia de l'Hospital del Mar per formar-me com a cirurgiana però també com a persona, gràcies per tots els anys. Als companys de residència per tots els moments viscuts i per totes les experiències compartides.

Al tot el personal de l'estabulari de l'IMIM i del Parc Taulí per la seva col·laboració

durant hores i hores a l'estabulari, per fer-me més agradables els moments d'aïllament amb les rates.

Al Dr. Rosselló-Catafau, a la Rosa Franco i a l'Ismail per ajudar-me a l'inici de l'estudi experimental i en el processament de les mostres, per la seva disponibilitat i col·laboració.

Al Dr. Fabregat i a la resta de integrants de la Unitat de Cirurgia Hepatobiliopancreàtica de l'Hospital de Bellvitge per haver-me permès formar-ne part i per fer-me sentir una més a la Unitat.

A la resta de companys de l'Hospital de Bellvitge per haver-me acollit, per fer-me fàcil la arribada al seu servei i per ajudar-me sempre que ho he necessitat.

Al Servei de Cirurgia del Parc Taulí per fer-me més fàcil la meva incorporació al món real, el pas de resident a adjunt gens fàcil sovint, però que gràcies a molts de vosaltres va ser-ho més.

I sobretot, als meus pares, pel seu gran sacrifici sense el qual no hagués arribat mai a ser el que sóc i pel seu suport incondicional per recolzar-me sempre en tot allò que he volgut fer, pel seu amor, sens dubte aquesta tesi també és en part obra seva.

Al meu germà per ser-hi sempre, en els bons i mals moments, per ser la persona a la qual sempre he pogut recórrer.

A en Xavi perquè amb el seu amor ha estat capaç de suportar tots els moments durs d'aquesta llarga cursa, al seu costat tot ha estat més fàcil.

Al Lluís, Juan Carlos, les Annes, la Mon, la Baldo, al Micky, al Echarte, al Manolo, al Jenaro, la Jana, al Jose Hidalgo i al Espi, la Judith, la Sandra, l'Alexis, la Maialen, l'Òscar, al Sanchez, a tots ells gràcies pels seus bon consells sempre savis, gràcies per fer-me els moments durs de la professió més fàcils. Tots heu estat realment importants en la meva formació.

A tothom que d'alguna manera o altre m'han ajudat a que avui sigui aquí, moltes gràcies.

1. INTRODUCCIÓ	1
1.1. Generalitats	19
1.1.1. Organització del fetge	19
1.1.2. Vascularització hepàtica	20
1.1.3. Cèl.lules hepàtiques	21
1.1.3.1. Hepatòcits	21
1.1.3.2. Cèl.lules endotelials	21
1.1.3.3. Cèl.lules de Kupffer	21
1.1.3.4. Cèl.lules estrellades	22
1.2. Cirurgia hepàtica	22
1.2.1. Cirurgia hepàtica i risc hemorràgic	22
1.2.2. Oclusió vascular i cirurgia	23
1.2.2.1. Oclusió vascular al flux d'entrada	25
1.2.2.2. Oclusió vascular del flux d'entrada i sortida	27
1.2.3. Cirurgia hepàtica i insuficiència hepàtica postoperatòria	27
1.3. Lesió per isquèmia/reperfusió	28
1.3.1. Fisiopatologia de la lesió per isquèmia/reperfusió	28
1.4. Regeneració hepàtica	31
Teories de la regeneració hepàtica	32
1.4.1. Regeneració hepàtica i lesió per I/R	33
1.5. Precondicionament isquèmic	34
1.5.1. Precondicionament isquèmic i pràctica clínica	37
2. HIPÒTESI I OBJECTIUS	39
3. MATERIAL I MÈTODES	43
3.1. Animals d' experimentació	45
3.2. Procediment quirúrgic	45
3.3. Grups experimentals	47
3.3.1. Grup Resecció hepàtica sense oclusió hiliar (RH)	47
3.3.2. Grup resecció hepàtica amb oclusió hiliar (RHPR)	47
3.3.3. Grup Precondicionament isquèmic (PI)	47
3.3.4. Grup isquèmia curta (IC)	48
3.4. Recollida i processament de mostres	48
3.4.1. Mostres durant la cirurgia	48
3.4.2. Mostres durant el sacrifici	48
3.4.3. Mostres de sang	48
3.5. Determinacions bioquímiques	49
3.5.1. Transaminases	49
3.5.2. Paràmetres bioquímics d'estres oxidatiu	49
3.5.3. Paràmetres bioquímics de reserva energètica	50
3.5.4. Citosines pro i antiinflamatòries	50
3.5.5. Paràmetres de regeneració hepàtica	51
3.6. Tècniques histològiques	51
3.7. Estudi estadístic	53

4. RESULTATS	55
A. Efecte del PI sobre la funció hepàtica en un model de resecció hepàtica del 70 % enfront el grup RH i RHPR	57
4.1. Efecte del PI sobre la lesió hepàtica	57
4.2. Efecte del PI sobre l'estrès oxidatiu	58
4.3. Efecte del PI sobre la reserva energètica	58
4.4. Efecte del PI sobre l'alliberament de citosines	60
4.5. Efecte del PI sobre la regeneració hepàtica	62
B. Efecte del PI sobre la funció hepàtica en un model de resecció hepàtica del 70 % enfront el grup isquèmia curta	66
4.6. Efecte del PI sobre la lesió hepàtica enfront el grup IC	66
4.7. Efecte del PI sobre l'estrès oxidatiu enfront el grup IC	67
4.8. Efecte del PI sobre la reserva energètica enfront el grup IC	67
4.9. Efecte del PI sobre l'alliberament de citosines enfront el grup IC	67
4.10. Efecte del PI sobre la regeneració hepàtica enfront el grup IC	70
5. DISCUSSIÓ	75
6. CONCLUSIONS	83
7. BIBLIOGRAFIA	87

ABREVIATURES

ADN	Àcid desoxiribonucleic	MDA	Malondialdehid
ADP	Adenosin difosfat	MPO	Mieloperoxidasa
ALT	Alanino amino transferasa	NADPH	Nicotinamida-adenina dinucleòtid fosfat
AMP	Adenosin monofosfat	NFkB	Factor de transcripció nuclear kappa B
AP-1	Factor de transcripció AP-1	nONs	Òxid nítric sintetasa neuronal
AST	Aspartat amino transferasa	O₂⁻	Anió superòxid
ATP	Adenosin trifosfat	ON	Òxid nítric
CE	Càrrega energètica	PCNA	Antigen nuclear de proliferació cel·lular
cONs	Òxid nítric sintetasa constitutiva	PI	Precondicionament isquèmic
DMSO	Dimetilsulfòxid	PKC	Proteinquinases
eONs	Òxid nítric sintetasa endotelial	PMN	Polimorfonuclears
HGF	Factor de creixement hepatocitari	PMSF	Fluorur de fenilmetilsulfòxid
HO⁻	Radical hidroxil	PVC	Pressió venosa central
H₂O₂	Peròxid d'hidrogen	RH	Resecció hepàtica
HPLC	Cromatografia líquida d'alta resolució	RH+PR	Resecció hepàtica + oclusió hiliar
HSP	Proteïnes del xoc tèrmic	RLO	Radicals lliures d'Oxigen
HTAB	Bromur d'hexadeciltrimetilamoni	SOD	Superòxid dismutases
IC	Isquèmia curta	STAT 3	Activador de la transcripció 3
IL-1-β	Interleucina 1β	TBA	Àcid tiobarbitúric
IL-6	Interleucina 6	TMB	Tetrametilbenzidina
IL-8	Interleucina 8	TGF-α	Factor de creixement transformant α
IL-10	Interleucina 10	TGF-β	Factor de creixement transformant β
iONs	Òxid nítric sintetasa induïble	TNF-α	Factor de necrosis tumoral α
I/R	Isquèmia/reperfusió	XOD	Xantina oxidasa
MAPK	Proteinquinases mitògen activades	XDH	Xantina deshidrogenasa

1. INTRODUCCIÓ

1.1.GENERALITATS

El fetge és el major òrgan del cos, constituint aproximadament del 2 al 5 % del pes corporal de l'adult i és el responsable del manteniment de la homeòstasi metabòlica de l'organisme ⁽¹⁾.

Entre les funcions del fetge destaquen les següents:

1. Síntesi i secreció de bilis.
2. Síntesi de proteïnes, lipoproteïnes plasmàtiques i factors de coagulació.
3. Detoxicar fàrmacs i toxines.
4. Síntesi de glicogen.
5. Emmagatzement de glicogen, vitamines i lípids.

1.1.1.ORGANITZACIÓ DEL FETGE

La unitat funcional bàsica del fetge és el lobulec *(figura 1)*. És una estructura organitzada al voltant de la vena central que

desemboca a la vena hepàtica, a partir de la qual sorgeixen columnes d'hepatòcits distribuïts en forma de cordons. Entre les columnes de hepatòcits estan els sinusoides, capil·lars venosos que reben sang de la vena porta i de l'artèria hepàtica, i drenen cap a la vena central del lobulec ⁽²⁾.

Els sinusoides hepàtics es troben revestits per dos tipus de cèl·lules, les cèl·lules endotelials i les cèl·lules de Kupffer. L'espai que existeix entre els cordons de hepatòcits i la paret del sinusoides es denomina espai de Disse, i conté un sistema de fibres de col·lagen amb funcions de suport *(figura 2)*.

A l'interior dels cordons d'hepatòcits existeix una xarxa de conductes biliars, a on es secretada la bilis produïda per les cèl·lules hepàtiques, que desemboca en

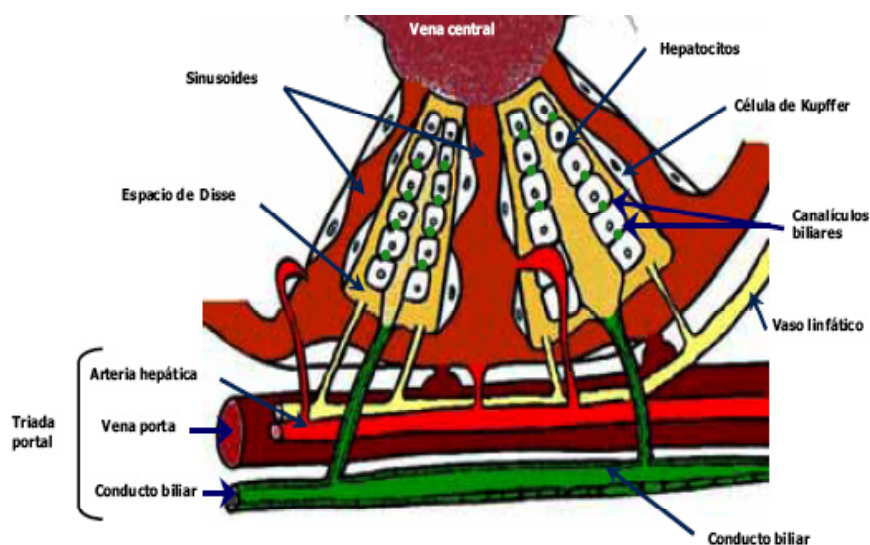


Figura 1. Lobulec hepàtic
(www.fundacionfit.org/agenda/)

conductes biliars majors. En cada lobulellet hepàtic ens trobem una triada portal, denominada així perquè en ella hi ha 3 estructures: una branca de l'artèria hepàtica, una branca de la vena porta i un conducte biliar ^(1,3).

1.1.2. VASCULARITZACIÓ HEPÀTICA

A diferència de qualsevol altre òrgan, el fetge rep sang per dos vies diferents:

A. A través de l'artèria hepàtica arriba sang ben oxigenada de la circulació general, que representa aproximadament el 25% de l'aport.

B. A través de la vena porta que recull la sang del territori esplàncnic, poc oxigenada, que representa el 75% restant. Ambdues arriben al sinusoides hepàtic, que és a on té lloc l'intercanvi entre la sang i els hepatòcits. La sang dels sinusoides flueix de la branca de la vena porta a la

entrada dels sinusoides fins la vena central del lobulellet hepàtic, que desemboca a les venes hepàtiques i finalment a la vena cava inferior ^(2,4).

Des de un punt de vista funcional, el fetge es pot dividir seguint un criteri funcional. A l'arribar al fetge, tant l'artèria hepàtica com la vena porta, es divideixen en dos branques, dreta i esquerra, que delimiten dos grans lòbuls. L'estructura que els defineix és la triada portal formada per una artèria, una vena i el conducte biliar, que està envoltada de una veïna de teixit connectiu, prolongació de la càpsula de Glisson que envolta el fetge. D'aquí la denominació de pedicle glissonià.

La triada portal dreta es bifurca en una branca anterior i una altra posterior (sectors anterior i posterior drets), cadascuna de les quals, alhora, es bifurca en una

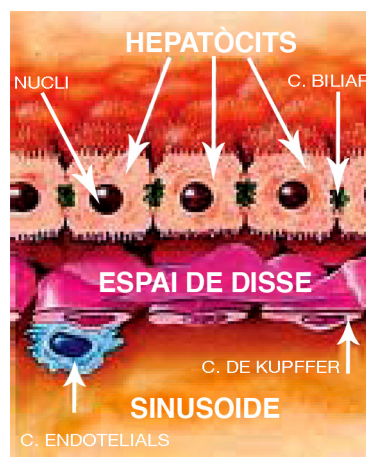


Figura 2. Relació entre els hepatòcits, espai de Disse i el sinusoides
(www.fundacionfit.org/agenda/)

branca superior i una altre inferior delimitant els segments 8,5,6 i 7 (figura 3). El pedicle esquerra es divideix en 3 branques, una posterior i dos anteriors pels segments 2,3,4 (figura 3). El segment 1 es troba per darrera de l'hili hepàtic entre la vena porta i la cava inferior i rep vascularització tant del fetge dret com del esquerre ⁽¹⁻³⁾. Aquesta segmentació facilita les reseccions hepàtiques.

1.1.3. CÈL·LULES HEPÀTIQUES

1.1.3.1. Hepatòcits

Formen el parènquima hepàtic i representen aproximadament el 90% de la massa hepàtica total (figures 1-2) i la seva funció més important és la obtenció, emmagatzematge i alliberació a la circulació sanguínia de nutrients. També porten a terme la detoxicació de productes tòxics

per l'organisme ⁽¹⁾. Aquestes cèl·lules es situen en cordons entre els sinusoides hepàtics ⁽¹⁾.

1.1.3.2. Cèl·lules endotelials

Formen la paret dels sinusoides hepàtics, i estan separades dels hepatòcits per l'espai de Disse. Entre les cèl·lules endotelials hi ha grans fenestracions que permeten l'intercanvi de fluids entre els sinusoides i l'espai de Disse (figura 2).

La seva funció principal és l'alliberament a la circulació sistèmica de mediadors inflamatoris com les interleucines i l'òxid nítric ^(1,3) enfront de determinats estímuls.

1.1.3.3. Cèl·lules de Kupffer

Les cèl·lules de Kupffer són els macròfags del fetge i estan situades a la superfície de les cèl·lules endotelials. La funció principal d'aquestes cèl·lules és la fagocitosi i

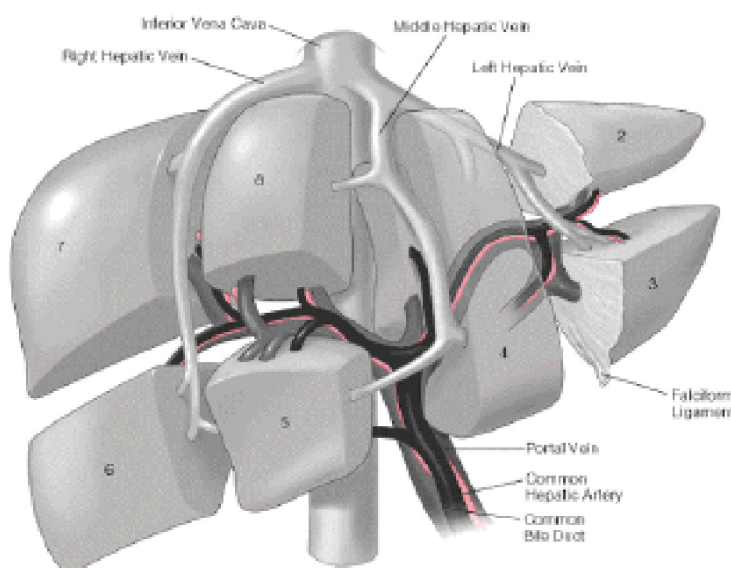


Figura 3. Esquema de la segmentació hepàtica amb el trajecte de les v. hepàtiques. (www.cpmc.org)

l'aclariment de patògens.

La seva activació porta a la generació de mediadors citotòxics, com ara algunes interleucines, els radicals lliures d'oxigen (RLO) i les proteases ⁽³⁾.

1.1.3.4. Cèl·lules estrellades

També conegudes com a cèl·lules d'Ito, estan localitzades a l'espai de Disse, en contacte estret amb les cèl·lules endotelials, i constitueixen el principal magatzem de vitamina A de l'organisme.

A més també sintetitzen proteïnes de la matriu extracel·lular, són mediadors de processos de reparació del teixit hepàtic i posseeixen capacitat per promoure i amplificar la resposta inflamatòria ⁽³⁾.

1.2. CIRURGIA HEPÀTICA

La resecció hepàtica és el tractament d'elecció de diverses afeccions, tant benignes com neoplàsiques. Durant un llarg període de temps la cirurgia hepàtica va estar associada a un gran nombre de complicacions i només era realitzada per un petit nombre d'especialistes. En els últims anys, gràcies al millor coneixement de l'anatomia quirúrgica del fetge, i al desenvolupament de diferents tècniques per disminuir les pèrdues hemàtiques, s'ha aconseguit disminuir el número de complicacions.

Les raons més importants per explicar aquests resultats són:

1. El coneixement de l'anatomia de segmentació hepàtica descrita per Couinaud i el de seves variants anatòmiques ⁽⁵⁾ (figura 3).

2. La utilització de les tècniques d'oclusió vascular, que permeten disminuir les pèrdues hemàtiques durant la cirurgia, factor clau per reduir la morbiditat ^(6,7).

3. L'ús del dissector d'ultrasons, que facilita la identificació i dissecció dels pedicels i de les venes intrahepàtiques.

4. La possibilitat d'induir una hipertrofia en el futur remanent hepàtic mitjançant la embolització portal preoperatòria del hemifetge tumoral per disminuir el risc d'insuficiència hepàtica en el postoperatori de reseccions hepàtiques majors ⁽⁸⁾.

Els progressos en les tècniques de resecció hepàtica i les millores en el maneig perioperatori han portat com a conseqüència una reducció de la mortalitat postoperatòria fins a valors de 0-5% ^(9,10).

1.2.1. CIRURGIA HEPÀTICA I RISC HEMORRÀGIC

Els pacients sotmesos a una resecció hepàtica estan exposats a un risc elevat d'hemorràgia ⁽¹¹⁾. De fet, un 50% de pacients sotmesos a cirurgia hepàtica seran transfosos segons algunes sèries ⁽¹²⁾. En opinió d'alguns autors, la incidència de complicacions d'aquest procediment quirúrgic guarda una relació directa amb les necessitats transfusionals perioperatòries ⁽¹²⁾. Entre els mecanismes involucrats destaca la immunosupressió induïda per la administració de sang homòloga, que facilitaria les infeccions postoperatòries ⁽¹³⁾ o l'augment de la recidiva tumoral, dismi-

nuint així la supervivència lliure de malaltia dels pacients ^(12,14).

Per tal de reduir la transfusió sanguínia s'han emprat varis mètodes, sent però d'una importància cabdal el coneixement de la anatomia hepàtica per tal de realitzar la secció parenquimatosa pel pla més adequat ⁽¹⁵⁾, ja que s'ha vist que les reseccions anatòmiques comporten una menor pèrdua sanguínia ⁽¹⁶⁾.

Les tècniques d'oclusió vascular, han disminuït també de forma espectacular la necessitat de transfusió perioperatòria ⁽¹⁷⁾. Per això, un dels mètodes més utilitzats durant la cirurgia hepàtica per disminuir les necessitats transfusionals, és el pinçament hilar profilàctic ⁽¹⁷⁾.

1.2.2. OCLUSIÓ VASCULAR I CIRURGIA

La oclusió vascular va ser descrita per primera vegada per Pringle l'any 1908, motiu pel qual aquest mètode es coneix com maniobra de Pringle o oclusió de la triada portal ⁽¹⁸⁾. Consisteix en la compressió del lligament hepatoduodenal, per tal d'eliminar el flux sanguini arterial i portal, minimitzant així, la hemorràgia del parènquima seccionat. La maniobra de Pringle és la tècnica més antiga i simple per controlar la hemorràgia intraoperatòria. Pringle va utilitzar aquesta maniobra per primera vegada en pacients traumàtics cloent la triada portal amb el dit i posteriorment va comprovar la eficàcia d'aquest mètode en conills.

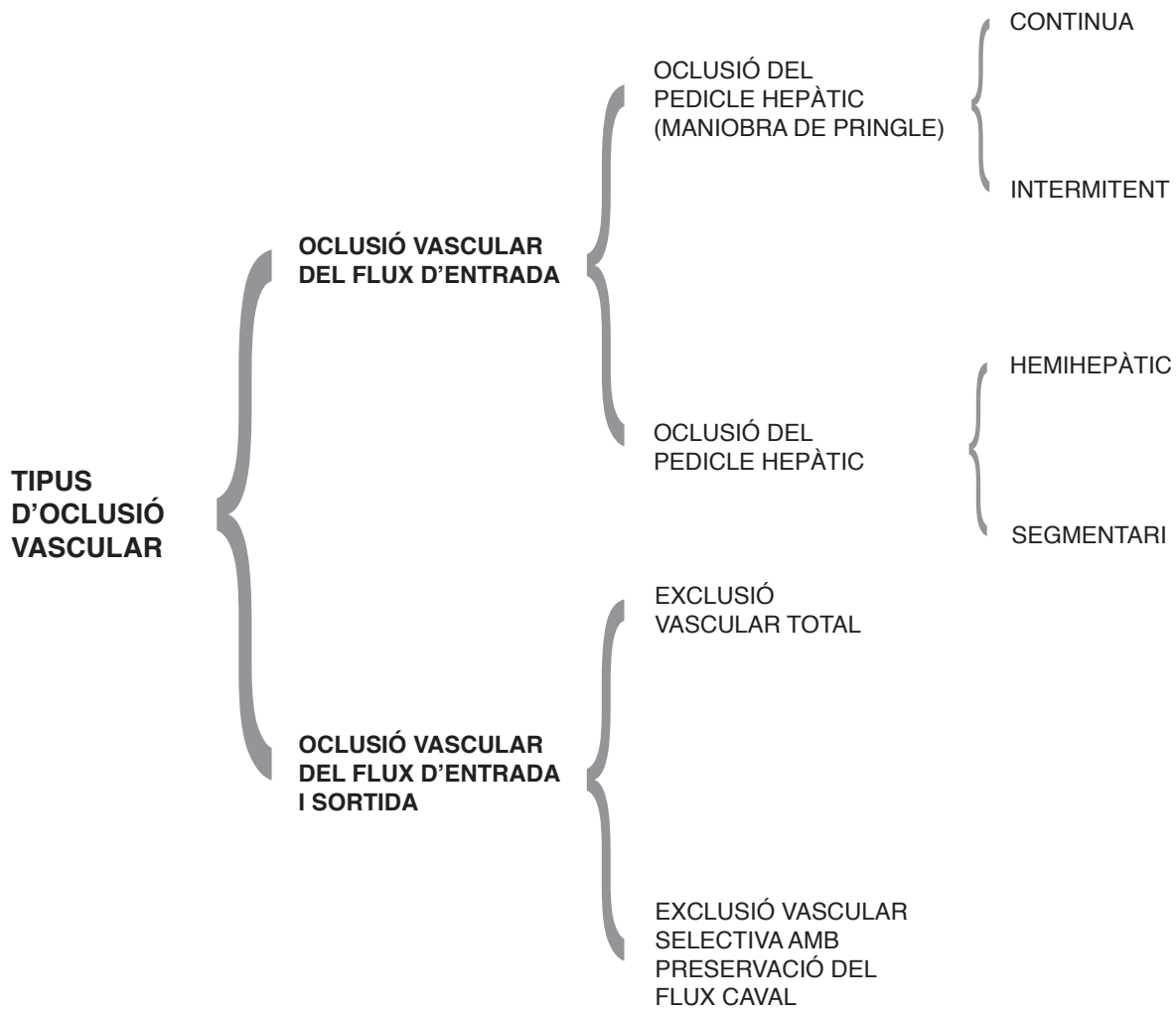
Als anys 50 aquesta maniobra va ser utilit-

zada com a gest profilàctic per disminuir el consum d'hemoderivats a la cirurgia electiva de la resecció hepàtica. La maniobra de Pringle però no està exempta de complicacions, per un costat provoca canvis hemodinàmics ⁽¹⁹⁾ i per altra, dóna lloc a una lesió per isquèmia ⁽²⁰⁾. És per aquest motiu, que avui dia existeix una tendència a realitzar les hepatectomies sense cap tipus de control vascular amb uns resultats igualment favorables en grups quirúrgics amb molta experiència ⁽²¹⁾.

En el primer estudi prospectiu realitzat comparant la realització de hepatectomies realitzades amb maniobra de Pringle o sense cap tipus de control vascular, es va veure que les pèrdues sanguínies i el temps de transecció varen ser menors en el grup que es realitzava oclusió enfront els que no realitzaven cap tipus de control vascular ⁽²²⁾. Encara així, estudis posteriors no han trobat diferències significatives ⁽²¹⁾.

Per tal de reduir l'impacte de la maniobra de Pringle s'han desenvolupat varies estratègies de protecció, fonamentalment limitades pel temps, el volum de fetge que es sotmet a isquèmia o el tipus de oclusió ⁽²³⁾.

Els mètodes de oclusió vascular, poden ser categoritzats segons si només és clou el flux d'entrada al fetge o si es clouen els dos fluxos, el d'entrada i el de sortida ⁽²³⁾ (taula 1).



Taula 1. Tipus d'oclusió vascular.

TIPUS D'OCLUSIÓ VASCULAR

1.2.2.1. Oclusió vascular del flux d'entrada

· **Oclusió del pedicle hepàtic (Maniobra de Pringle) continua**

La maniobra de Pringle (*figura 4*) continua és generalment ben tolerada, donat que el flux de la cava no s'interromp i per tant, no és requereix un maneig anestèsic específic ⁽²⁴⁾. Hannoun i col·laboradors van reportar que la maniobra de Pringle continua en condicions de normotèrmia durant la cirurgia major hepàtica és una maniobra que es pot realitzar en fetges sans i patològics durant 60 minuts ^(25,26). Altres han allargat aquest període a 90 minuts tant en fetges sans com patològics sense incrementar la morbimortalitat ⁽²⁷⁾.

La oclusió vascular del pedicle hepàtic continu no prevé la hemorràgia de les venes hepàtiques, però aquesta hemorràgia pot ser minimitzada si durant la cirurgia s'aconsegueix una PVC (pressió venosa central) baixa i es desvacuïtza de forma complerta el segment que s'ha de ressecar prèviament a la aplicació de la oclusió vascular ^(21,28).

· **Oclusió del pedicle hepàtic (Maniobra de Pringle) intermitent**

La maniobra de Pringle intermitent consisteix en períodes d'oclusió vascular de 15-20 minuts seguits de períodes de 5 minuts de desoclusió ^(22,29). Estudis prospectius han mostrat l'efecte hepatoprotector de l'oclusió vascular intermitent enfront la oclusió continua ^(22,29,30). La oclusió vascular intermitent pot ser aplicada

sense perill durant 120 minuts en fetges normals ^(29,31).

La oclusió vascular intermitent és fàcilment aplicable amb un risc inherent d'hemorràgia durant els períodes de reperfusió. Però, aquest tipus d'oclusió vascular està associada a una disminució del dany hepàtic, evidenciat per un menor augment dels enzims hepàtics i dels nivells de bilirubina, encara que pot comportar un augment de les pèrdues sanguínies durant la reperfusió i també, allargar el temps quirúrgic ⁽²⁴⁾.

· **Oclusió vascular hemihepàtica**

La oclusió vascular hemihepàtica (*figura 5*) va ser descrita per Makuuchi (1986) ⁽³²⁾. Consisteix en interrompre selectivament el flux portal i arterial d'entrada a la part del fetge (dret o esquerra) ipsolateral a la lesió que volem ressecar. Això pot ser combinat amb la oclusió simultània de les venes hepàtiques ipsolaterals.

Té com a avantatge que no produeix isquèmia del fetge remanent, manté la circulació esplàncnica evitant la congestió d'aquest territori i la estabilitat hemodinàmica durant la transecció hepàtica ^(7,32).

El desavantatge d'aquest mètode és l'hemorràgia del fetge residual (no clos) durant la transecció. Aquesta oclusió vascular selectiva també comporta una reducció de la lesió hepàtica associada a la I/R ⁽³³⁻³⁴⁾.

· **Oclusió vascular segmentària**

Consisteix en la oclusió de la branca de la artèria hepàtica del segment que es vol ressecar conjuntament amb la oclu-

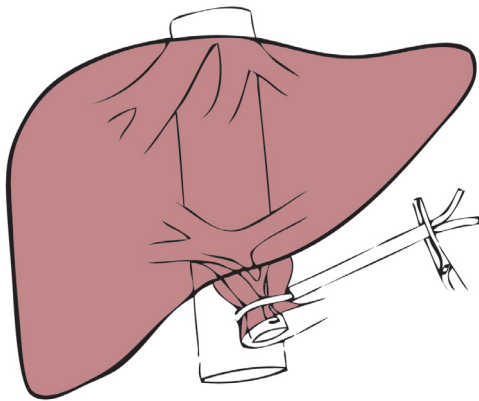


Figura 4. Maniobra de Pringle.

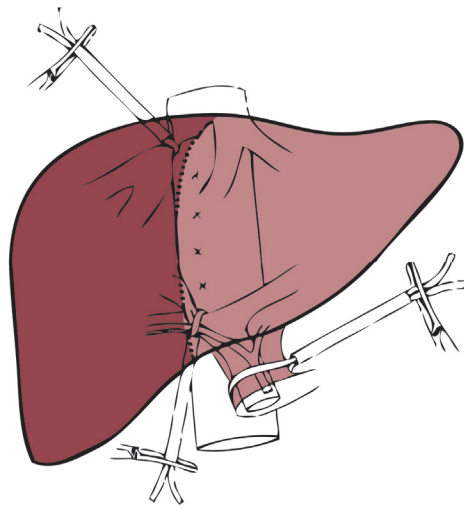


Figura 5. Oclusió vascular hemi hepàtica.

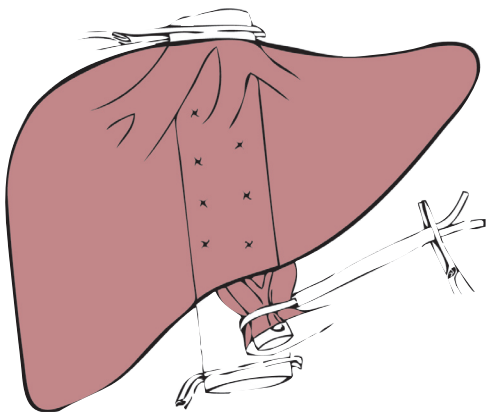


Figura 6. Exclusió vascular total.

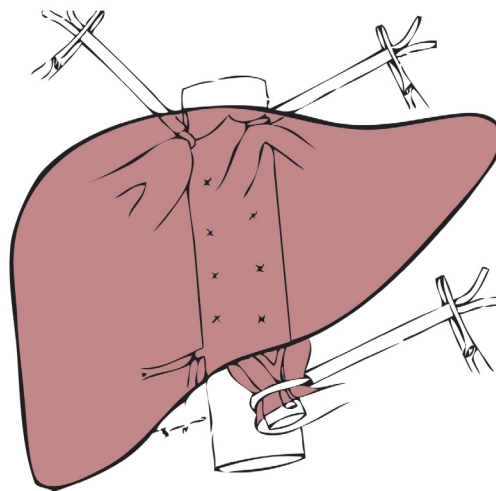


Figura 7. Exclusió vascular total amb preservació del flux caval.

(Figura 4-7. Abdalla E. Hepatic vascular occlusion which technique? Surgical Clinics of North America 2004)

sió portal. Per aconseguir-ho s'introdueix per punció guiada per ecografia un catèter amb baló que clourà la branca de dit segment ⁽³⁵⁾. Aquesta tècnica requereix un gran coneixement de la ecografia intraoperatòria i perícia per puncionar les branques vasculares, per la qual cosa no és una tècnica molt difosa.

1.2.2.2. Oclusió vascular del flux d'entrada i sortida

• **Exclusió vascular total**

Combina l'oclusió vascular a la entrada i la sortida del fetge (*figura 6*). Va ser descrita per Heaney l'any 1966 i popularitzada per Huguet al 1975 ⁽³⁶⁾. Es realitza la maniobra de Pringle, després es col·loca un clamp a la vena cava infrahepàtica per sobre de les venes renals i de la vena adrenal dreta, i finalment un altre clamp a la vena cava suprahepàtica per sobre de l'òstium de les venes hepàtiques ^(24,36). Una vegada realitzada la transecció i la hemostàsia del parènquima hepàtic, els clamps són retirats en l'ordre invers al qual s'han col·locat. La durada de la exclusió vascular no hauria de superar els 45 minuts en fetge sa i els 30 minuts en fetges cirròtics, donat que aquesta tècnica provoca alteracions hemodinàmiques importants i alguns pacients no toleren aquest tipus d'oclusió vascular ^(24,37), per la qual cosa només s'utilitza en les lesions que infiltren la unió de la cava i les suprahepàtiques o quan es requereix una reconstrucció de la vena cava.

Aquesta mateixa tècnica es pot utilitzar sense cloure la cava, és a dir, col·locant un clamp a les venes hepàtiques imme-

diatament abans de la seva desembocadura a la vena cava. Es coneix amb el nom d'exclusió vascular hepàtica amb preservació de la cava (*figura 7*) ⁽²³⁾. És més ben tolerada que la exclusió vascular total ja que no produeix els trastorns hemodinàmics associats a l'anterior.

1.2.3. CIRURGIA HEPÀTICA I INSUFICIÈNCIA HEPÀTICA POSTOPERATORIA

Les reseccions hepàtiques poden classificar-se en anatòmiques o limitades. S'entén per resecció hepàtica anatòmica, la resecció d'una part del parènquima que segueix una o més cissures anatòmiques, mentre que s'entén per hepatectomia limitada, la resecció d'una part del parènquima hepàtic que no correspon a una porció anatòmica del fetge i en conseqüència, el pla de secció no passa per una cissura anatòmica. Encara que la situació ideal és la resecció hepàtica anatòmica, algunes situacions obliguen a la resecció limitada; per exemple en pacients amb hepatopatia crònica o quan es necessita preservar el màxim parènquima possible.

Un tema important alhora de planejar una cirurgia hepàtica resectiva, es que no s'ha d'oblidar l'aspecte funcional del fetge, fet de vital importància si aquesta cirurgia es practica en un pacient cirròtic. Un pacient amb un fetge sa és capaç de tolerar una resecció del 75% del parènquima, mentre que aquesta proporció es redueix al 30% si és cirròtic amb una bona reserva hepàtica (Child-Pugh A).

La embolització portal pot ajudar a pal·liar el grau d'insuficiència hepàtica en cas de pacients tributaris d'una resecció amb un parènquima inicialment escàs perquè s'aconseguirà una hipertrofia del remanent després d'una embolització i es podrà dur a terme la resecció ⁽⁸⁾.

1.3. LESIÓ PER ISQUÈMIA/ REPERFUSIÓ

La lesió per I/R és un procés complex que s'inicia quan un òrgan es veu privat temporalment de l'aport sanguini (isquèmia) i finalitza quan, es restableix el flux (reperfusió) moment en el qual es fa evident la lesió ⁽³⁸⁾. El resultat és una agressió tissular secundària a la anòxia, a la privació de nutrients i a l'acúmul de substàncies de desfet del metabolisme, que condueix a una alteració de la funció cel·lular, a un edema intersticial i a la mort de la cèl·lula.

La lesió per I/R hepàtica té lloc durant les reseccions hepàtiques realitzades sota oclusió vascular, maniobra que com ja hem comentat anteriorment, s'ha in-

troduït per reduir les pèrdues hemàtiques intraoperatòries durant la resecció. Aquesta lesió és també evident durant l'emmagatzement i l'implant del fetge en el transplantament ^(39,40).

1.3.1. FISIOPATOLOGIA DE LA LESIÓ PER ISQUÈMIA/REPERFUSIÓ

La isquèmia perllongada i sostinguda condueix a la mort cel·lular i tissular. En principi, es pensava que una ràpida reperfusió del teixit isquèmic podia prevenir el dany del teixit. Però darrerament, s'ha demostrat que una part significativa de la lesió no té lloc durant el període d'isquèmia sinó durant el període de reperfusió, provocada per la síntesi de diferents mediadors inflamatoris ⁽⁴¹⁻⁴⁴⁾.

Durant la isquèmia, s'interromp l'aport d'oxigen a l'òrgan i es posa en marxa un circuit metabòlic que deté la cadena respiratòria mitocondrial produint una depleció dels nivells d'ATP ^(41,45) (figura 8).

La depleció d'ATP durant la isquèmia induïx a la cèl·lula a obtenir energia per metabolisme anaeròbic (via glucòlisi i

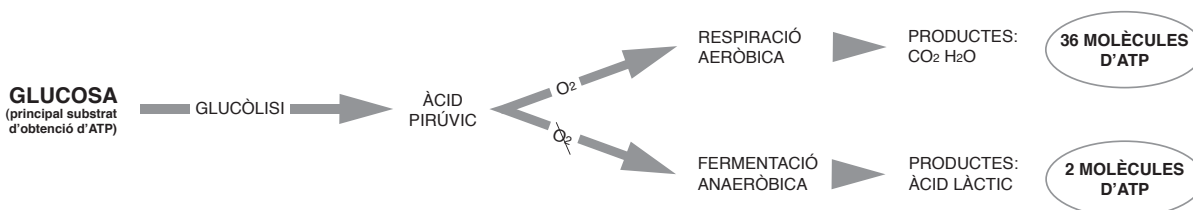


Figura 8. Mecanismes d'obtenció d'energia.



Figura 9. Depleció de l'ATP

fermentació làctica), amb un rendiment energètic menor que en condicions aeròbiques i donant lloc a un augment de l'àcid làctic (figura9) ^(41,45). Per altra banda, l'ATP s'hidrolitza a ADP i AMP ⁽⁴⁶⁾. L'AMP posteriorment és hidrolitzat a hipoxantina, sent aquesta última molt important en la fisiopatologia de la lesió durant la reperfusió, ja que és la font de radicals

lliures d'oxigen (RLO) a través del sistema xantina oxidasa (XOD) ^(40,47) (figura 9).

L'acidosis resultant d'aquesta via metabòlica altera la cinètica enzimàtica i les cèl·lules es veuen privades de la energia necessària per mantenir l'homeòstasi.

La depleció d'ATP també altera les bom-

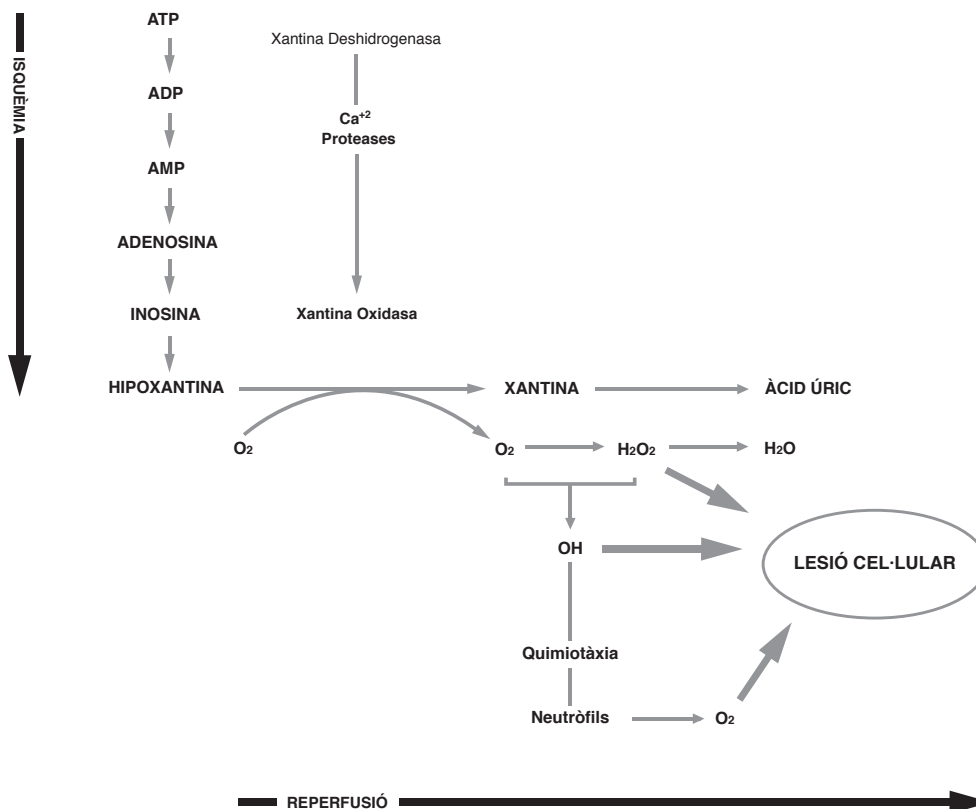


Figura 10. Fenòmens durant l'isquèmia-reperfusió

bes de sodi/potassi i calci, perdent-se el gradient a través de les membranes cel·lulars i induint alteracions en els òrgans citoplasmàtics i en la membrana cel·lular ⁽⁴⁸⁾ que poden desencadenar la activació de proteases i la mort cel·lular ⁽⁴¹⁾. Resumint, podríem dir que la isquèmia condueix a un estat proinflamatori que augmenta la vulnerabilitat del teixit durant la reperfusió, i porta a la mort per necrosi cel·lular o per apoptosi ⁽⁴⁹⁾ (figura 10).

Des d'un punt de vista cronològic, la lesió hepàtica produïda durant la reperfusió té lloc en dos fases consecutives ⁽⁵⁰⁻⁵²⁾ (figura 11):

Una primera que s'inicia immediatament després de la reperfusió, té una durada aproximada de 4-6 h. i es coneix com la fase inicial o aguda. I l'altra, la tardana, que comença en acabar la inicial i s'allarga 18-24 h. aproximadament.

Durant el període de isquèmia les cèl·lules de Kupffer sinusoidals pateixen un seguit d'alteracions que deriven en la seva activació a l'inici de la reperfusió.

Els fets més destacats a la fase aguda, són l'activació de les cèl·lules de Kupffer i la pèrdua de funció de les cèl·lules endotelials ⁽⁵¹⁾. Això porta per una part l'alliberament de RLO i de nombroses citosines a la circulació sistèmica, com ara el TNF- α i la IL-1 β , que són les més implicades en la I/R hepàtica ^(51,53). Per altra banda, la vasoconstricció ^(40,54) resultant d'un desequilibri entre substàncies vasodilatadores i vasoconstrictores alliberades, juntament amb l'edema de les cèl·lules endotelials i l'acúmulo de neutròfils causa un deteriorament de la microcirculació hepàtica ⁽⁵⁵⁻⁵⁷⁾.

La segona fase es caracteritza sobretot per una infiltració massiva de neutròfils en el teixit hepàtic i l'alliberació de mediadors citotòxics ^(47,58). L'acumulació de neutròfils activats al parènquima hepàtic induïx nombroses respostes proinflamatòries, com l'alliberació de quemoquinaes per part de les cèl·lules endotelials i hepatòcits, l'activació de macròfags i neutròfils, la producció de citosines pro-

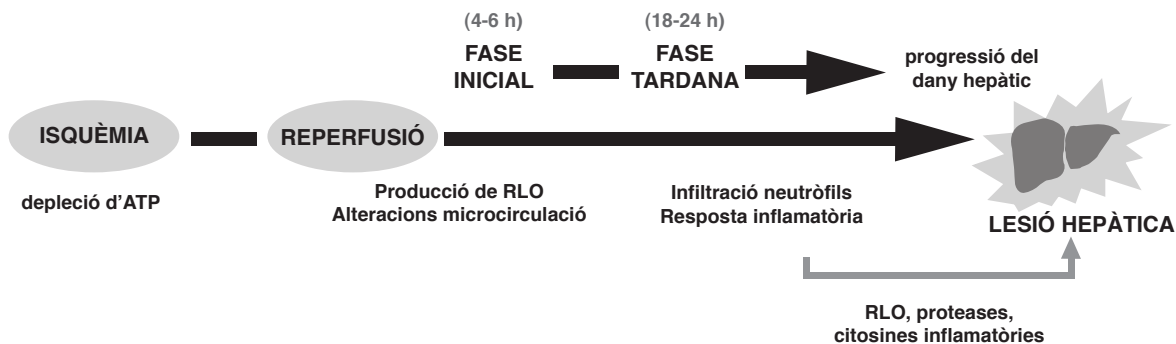


Figura 11. Mecanismes durant la I/R a nivell hepàtic.

inflamatòries a partir de les cèl·lules de Kupffer i l'augment de la expressió de les cèl·lules d'adhesió. Durant aquesta fase, els neutròfils i les cèl·lules de Kupffer, alliberen proteases, sobretot la catepsina i la elastasa, que són les responsables de la necrosi dels hepatòcits; per altra banda els RLO, contribueixen a la producció del dany irreversible en el teixit, que comprèn la congestió sinusoïdal amb la conseqüent fallida microcirculatoria així com, una necrosi extensa del teixit ^(53,55,59-60). La NADPH oxidasa intervé en la generació dels RLO per part dels neutròfils ⁽⁶¹⁾. L'enzim activat, oxida el NADPH produint l'anió superòxid (O_2^-). Posteriorment l'anió superòxid es redueix produint peròxid d'hidrogen (H_2O_2) que pot ser transformat en un radical hidroxil (HO^\cdot) o en àcid hipoclorós (HOCl) per acció de la mieloperoxidasa (MPO) present a l'interior dels grànuls citoplasmàtics dels neutròfils ⁽⁶⁰⁾. Aquests RLO contribueixen encara més, ha agreujar la lesió hepàtica.

La isquèmia/reperfusió hepàtica té com a conseqüència final la mort dels hepatòcits i de les cèl·lules endotelials sinusoïdals ⁽⁴⁵⁾.

1.4. REGENERACIÓ HEPÀTICA

Un aspecte fascinant del fetge és la seva capacitat de regenerar-se després d'una agressió. El procés pel qual el fetge aconsegueix aquest objectiu depèn del mecanisme de la lesió. El fetge és un dels pocs òrgans en repòs en situació normal, que és capaç de regular el seu creixement i la mida per a recuperar la seva massa ori-

ginal després d'una pèrdua tissular tant sigui funcional (insult infecció, tòxic, isquèmic) com físic (hepatectomia parcial). La regeneració hepàtica és la capacitat del fetge de restaurar el teixit, en quant a massa i funció, després d'una lesió o d'una resecció parcial ⁽⁶²⁾.

Els primers estudis de regeneració hepàtica després d'una hepatectomia parcial van ser duts a terme per Higgins i Anderson fa uns 70 anys en rosegadors, als quals es resecava 2/3 del fetge ⁽⁶³⁾. En aquests animals els lòbuls residuals augmenten de mida fins a assolir la mateixa massa que ocupaven els lòbuls resecats. Aquest procés s'assolia en 5-7 dies ⁽⁶³⁾.

En circumstàncies normals els hepatòcits són els primers en proliferar, però tots els tipus cel·lulars hepàtics es divideixen, des de les cèl·lules epitelials biliars passant per les cèl·lules endotelials fins les cèl·lules de Kupffer ⁽⁶⁴⁾. Els hepatòcits periportals són els primers en iniciar la seva replicació donat que és a on existeix una major irrigació sanguínia i s'estén cap a les àrees pericentrals dels lòbuls. La proliferació d'aquest conjunt de cèl·lules és necessària per a la recuperació de tot el teixit hepàtic perdut.

Els hepatòcits, en condicions normals en humans adults i en animals rarament s'estan dividint. En un fetge adult només una de cada 1000 cèl·lules està en la fase de mitosi simultàniament ⁽⁶⁵⁾. Una lesió hepàtica o una resecció quirúrgica implica una proliferació massiva dels hepatòcits

supervivents que finalitza quan la massa hepàtica arriba a representar una fracció determinada del pes de l'individu, que varia amb la edat i amb la espècie ⁽⁶⁶⁾.

Després d'una hepatectomia parcial, els hepatòcits entren en una "fase pre-replicativa" que dura 12-14 hores en rates. Durant aquesta fase el nivell de replicació d'ADN a l'hepatòcit no és molt diferent dels animals control (sense resecció), però s'acaba produint un pic de síntesi d'ADN a les 24 hores ⁽⁶⁴⁾. La capacitat regenerativa del fetge és il·limitada, com s'ha demostrat en rates realitzant re-hepatectomies ⁽⁶²⁾.

La regeneració hepàtica ha estat estudiada en models animals i in vitro. In vitro, existeixen múltiples diferències en quant a la regeneració respecte al procés in vivo, donat que la interacció entre els hepatòcits i les cèl·lules no parenquimatoses juga un paper molt important a la regeneració in vivo ⁽⁶⁷⁾.

En humans, en condicions normals, el fetge aconsegueix arribar a la mida original aproximadament als 6 mesos ⁽⁶⁸⁾, tot i que, existeixen estudis que diuen que la regeneració completa s'aconsegueix als 3 mesos ⁽⁶⁹⁾. S'ha de dir però que la funcionalitat hepàtica s'assoleix abans de arribar aconseguir el volum hepàtic inicial, i això acostuma a donar-se a les 2-3 setmanes de la resecció hepàtica ⁽⁶⁹⁾.

TEORIES DE LA REGENERACIÓ HEPÀTICA

Per la major part d'autors en la regeneració hepàtica es poden diferenciar 3 fases principals ⁽⁶²⁾:

Les cèl·lules en condicions normals estan en la fase de repòs o G0. Després d'una hepatectomia parcial les cèl·lules de forma simultània entren al cicle cel·lular o fase G1, i progressen a través del cicle amb la síntesi d'ADN (fase S) 12-15 h després de la resecció i la fase M (Mitosi) es produeix 6-8 h després de la síntesi de ADN com una culminació de tot el procés. Entre la síntesi d'ADN i la mitosi hi ha un interval conegut com a fase G2 ⁽⁶⁴⁾.

Quan el fetge assoleix la relació massa/volum original, els hepatòcits tornen a la fase quiescent G0, i el procés de regeneració hepàtica és deté abruptament ⁽⁶⁴⁾ no perquè els hepatòcits hagin esgotat la seva capacitat replicativa sinó perquè hi ha un control estricte en tot el procés tant pel que fa als seus senyals iniciadors com de finalització que n'eviten una proliferació incontrolada.

Per altres autors, com Fausto, la regeneració hepàtica és un procés que es pot dividir en dues etapes ⁽⁷⁰⁾:

1. La sortida del hepatòcit de la fase quiescent per entrar en el cicle cel·lular (iniciació) i

2. la progressió pel punt de restricció per la fase G1 del cicle (progressió). Aquest autor proposa que aquestes etapes tenen

un control independent (figura 12). En la iniciació intervindrien les citosines, el factor de necrosi tumoral- α (TNF- α) i la interleucina-6 (IL-6), mentre que, en la progressió intervindrien els factors de creixement; el factor de creixement hepatocitari (HGF) i el factor de creixement transformant α (TGF- α).

1.4.1. REGENERACIÓ HEPÀTICA I LESIÓ PER ISQUÈMIA / REPERFUSIÓ

El pinçament hiliar és un mecanisme ben establert per reduir les pèrdues sanguínies intraoperatòries durant la hepatectomia com s'ha comentat anteriorment però aquest, comporta un grau de lesió d'I/R sobre el fetge, que podrà afectar negativament la regeneració hepàtica. Els mecanismes pels quals la I/R disminueix la regeneració hepàtica no estan clarament

establerts, però tot fa pensar que la depleció d'ATP que succeeix durant d'isquèmia, així com la síntesi de mediadors inflamatoris durant la etapa de reperfusió i la síntesi de interleucina 6 (IL-6) jugarien un paper clau en aquest procés. La depleció d'ATP que succeeix durant la isquèmia té efectes adversos sobre la regeneració hepàtica, ja que l'ATP és necessari per la síntesi d'ADN (figura 13). Resultats obtinguts a partir d'un model d'hepatectomia parcial mostren que existeix una relació estreta entre els nivells d'ATP en el fetge remanent i la regeneració hepàtica del mateix ⁽⁷¹⁾. I s'ha demostrat que la isquèmia hepàtica inhibeix la síntesi d'ADN en un model d'hepatectomia parcial ⁽⁷²⁾.

Els RLO, que com s'ha comentat també són productes resultants de la lesió per I/R, danyen les proteïnes i l'ADN fet que

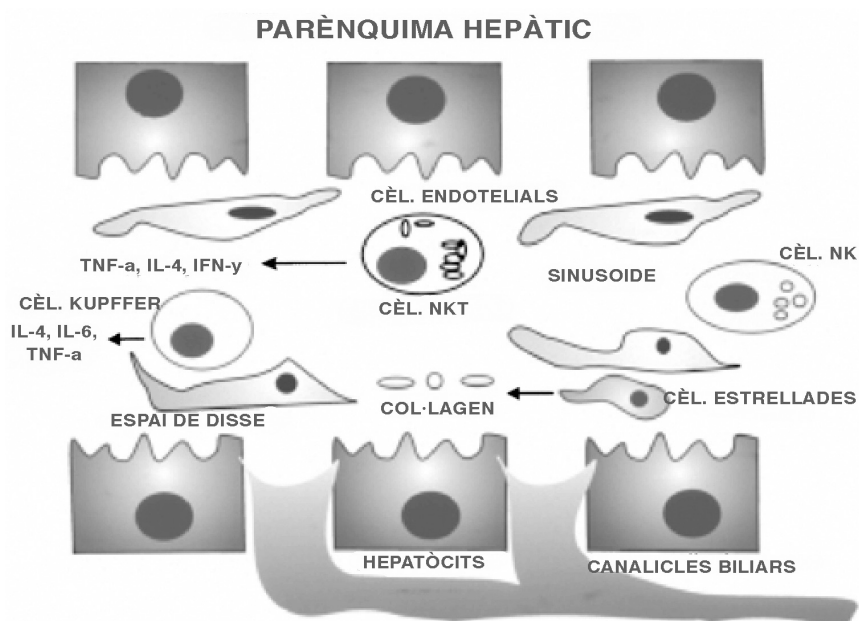


Figura 12. Interaccions entre els hepatòcits i les cèl·lules parenquimatoses durant la regeneració hepàtica. (Gastroenterology, WB Saunders and Co.)

també té una influència negativa sobre la divisió cel·lular ⁽⁷³⁾.

Pel que fa a les citosines, el TNF- α és un dels responsables d'iniciar la proliferació hepatocitària en la primera fase de la regeneració hepàtica i prepara a les cèl·lules per respondre posteriorment als factors de creixement ⁽⁷³⁾. Contràriament, la IL-1 β produeix una disminució de la regeneració hepàtica ⁽⁷⁴⁾.

L'òxid nítric també implicat en la lesió per I/R, té influència sobre la regeneració hepàtica. De fet, s'ha vist que l'ON és necessari per la viabilitat dels hepatòcits ⁽⁷⁵⁾ i que juga un paper important en la població hepatocitària del fetge ⁽⁶⁶⁾. Més específicament, la cONS i la iONS semblen jugar un paper molt important en la regeneració hepàtica després d'una hepatectomia parcial. El fetge remanent després d'una hepatectomia rep el flux sanguini que rebia el fetge sencer i això implica una major producció de ON per part de les cèl·lules endotelials. Aquest augment

de ON és essencial perquè les cèl·lules del parènquima hepàtic entrin en la fase G1 i comenci la regeneració hepàtica ⁽⁷³⁾. Donat que la lesió per I/R comporta un augment de la morbiditat en la cirurgia hepàtica, s'han proposat moltes estratègies per tal de disminuir-la. Aquestes estratègies poden ser classificades en diferents grups: quirúrgiques, farmacològiques i de teràpia gènica ^(76,77).

Aquesta tesi es centra en una estratègia quirúrgica, el preconditionament isquèmic en la que es basa la nostra hipòtesi de treball.

1.5. PRECONDICIONAMENT ISQUÈMIC

Concepte: El preconditionament isquèmic (PI) és una estratègia quirúrgica que protegeix alguns teixits enfront al dany per I/R. Va ser descrit per primera vegada al miocardi per Murry al 1986 ⁽⁷⁸⁾. Posteriorment s'ha vist que és un mecanisme eficaç per protegir del fenomen d'I/R a diferents òrgans com el budell ⁽⁷⁹⁾, el cervell ⁽⁸⁰⁾,



Figura 13. Efecte de la isquèmia sobre la regeneració hepàtica.

múscul ⁽⁸¹⁾. Alguns investigadors han estudiat els efectes del PI sobre el fetge ^(55,82,83).

Descripció de la tècnica: El PI consisteix en l'aplicació de períodes breus d'isquèmia i de reperfusió abans de que l'òrgan sigui sotmès a una I/R perllongada ⁽⁸²⁾. Per aconseguir els efectes protectors, l'aplicació del PI difereix en els diferents òrgans, de forma que en cada òrgan s'aconsegueix amb l'aplicació de diferents cicles d'isquèmia/reperfusió. De la mateixa forma també són diferents els temps d'isquèmia i reperfusió utilitzats per realitzar el PI isquèmic en els diferents òrgans i en els diferents models experimentals.

En el fetge, el PI s'aconsegueix mitjançant l'aplicació d'un únic cicle d'isquèmia-reperfusió, sense que l'adició de nous períodes d'isquèmia/reperfusió proporcionin més protecció ⁽⁸⁴⁾. Els efectes beneficiosos del PI en el fetge enfront l'I/R van ser descrits per primera vegada en rates per Lloris-Carsi ⁽⁸³⁾.

Efectes del PI "in vitro": Estudis in vitro amb hepatòcits aïllats, han demostrat que el preconditionament augmenta la resistència de les cèl·lules a la mort durant la incubació hipòxica ⁽⁸⁵⁾.

Efectes del PI sobre la lesió per isquèmia-reperfusió: Durant el PI, com ja s'ha comentat anteriorment té lloc la degradació d'ATP el que comporta un augment d'adenosina que s'allibera a l'espai extracel·lular i es produeix l'activació dels

receptors d'adenosina A2 acoblats a la proteïna G ⁽⁸⁵⁻⁸⁷⁾. Aquests alhora, activen la fosfolipasa de membrana que genera inositol trifosfat, el qual indueix l'alliberació de calci i de diasilglicerol, activant les proteïnes quinases (PKC) ⁽⁸⁸⁻⁹⁰⁾. Les PKC tenen un paper molt important en la protecció cel·lular, regulen alguns processos biològics tals com el metabolisme, el transport d'ions i la expressió de determinats gens.

Diversos estudis postulen que les PKC són responsables d'alguns dels efectes beneficiosos del PI en el fetge. L'activació de les PKC produeix la fosforilació de diferents molècules efectores com les tirosinquinases ⁽⁸⁹⁾ i les MAPK ^(85,91), implicant un augment de la tolerància dels hepatòcits i de les cèl·lules endotelials enfront la lesió per I/R ⁽⁹²⁾. Per altra banda, també provoquen la entrada d'aquestes cèl·lules en el cicle cel·lular, promovent la regeneració hepàtica ⁽⁹³⁾ (figura 13 bis).

Efectes del PI sobre la regeneració hepàtica: Les PKC, a més, poden induir també la activació de diversos factors de transcripció, com el NF-kB, que són els principals responsables de l'efecte protector del PI a llarg termini ^(91,94).

Aquests factors de transcripció, modulen la expressió de determinats gens i donen lloc a la síntesi de proteïnes com les superòxid dismutases (SOD) o les proteïnes del xoc tèrmic (HSPs) que també s'han proposat com a efectores dels efectes beneficiosos del PI ^(95,96). La inducció de les

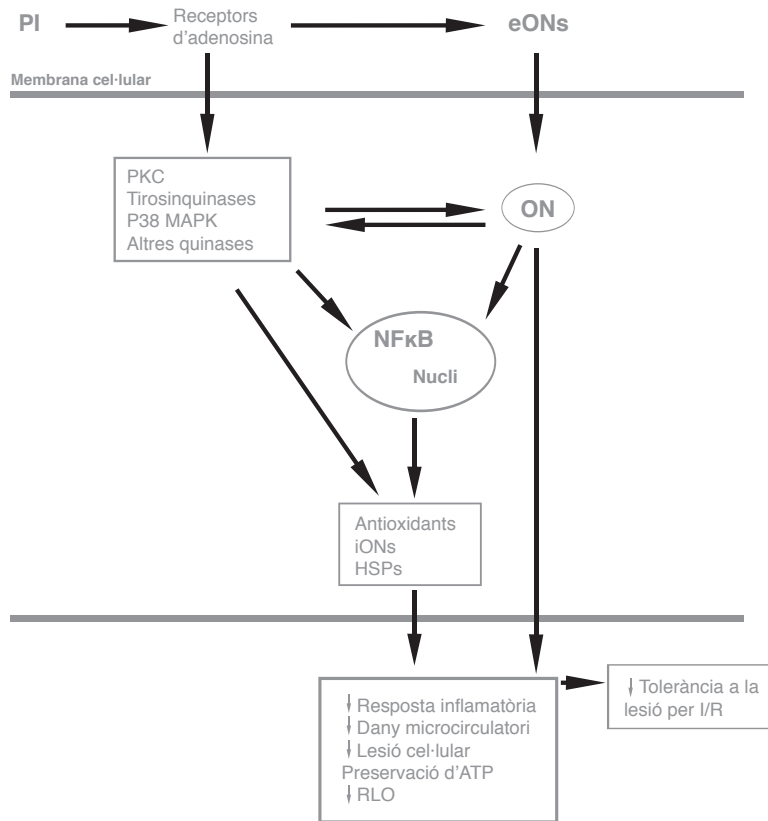


Figura 13 bis. Mecanismes implicats en el preconditionament isquèmic.

HSP redueix la unió nuclear de factors de transcripció proinflamatoris i augmenta la capacitat antioxidant de les cèl·lules^(94,97). Ambdós efectes poden contribuir a la disminució de la formació de TNF- α i a la disminució de la resposta inflamatòria en els fetges preconditionats⁽⁹⁵⁾. El PI també pot disminuir la transcripció de gens com, c-fos i c-jun, implicats en el desenvolupament de la lesió per I/R hepàtica, juntament amb la activació de NF- κ B podria induir la activació de transductor de senyals i l'activador de la transcripció 3 (STAT-3) implicats en la hepatoprotecció i en la proliferació cel·lular^(91,98,99).

tesa de mediadors vasoactius com el ON^(100,101). El ON inhibeix l'adhesió de neutròfils a l'endoteli sinusoïdal, inhibeix l'efecte vasoconstrictor de les endotelines i actua com a segrestador dels RLO⁽¹⁰²⁻¹⁰⁴⁾ (figura 14).

Des d'aquest punt de vista, els efectes protectors del PI en el fetge venen determinats per dos factors: una concentració d'adenosina suficientment elevada com per induir la generació de ON⁽¹⁰⁵⁾ mitjançant l'activació dels receptors d'adenosina A2, juntament amb una baixa concentració de xantina que n'eviti els efectes perjudicials^(82,101).

S'ha suggerit que els efectes beneficiosos del PI podrien ser mediatos per la sín-

En resum doncs, els mecanismes més importants implicats en l'efecte protector

del PI són els següents ⁽¹⁰⁵⁾:

- Preservació de l'endoteli sinusoïdal i del parènquima hepàtic ⁽¹⁰⁶⁾.
- Preservació dels nivells d'ATP ⁽⁴⁶⁾.
- Reducció de l'activació de neutròfils, cèl·lules de Kupffer i de la producció de citosines ⁽⁵¹⁾.
- Inhibició del fenomen de “no reflux”, caracteritzat per la impossibilitat de la reperfusió de l'òrgan degut a la obstrucció progressiva a la microcirculació ⁽⁴⁴⁾.
- Reducció de la producció de RLO i de la depleció d'antioxidants ⁽¹⁰⁷⁾.

- Reducció de la mort cel·lular per apoptosi i necrosi ⁽⁴⁹⁾.

1.5.1. PRECONDICIONAMENT ISQUÈMIC I PRÀCTICA CLÍNICA

El preconditionament isquèmic ha sorgit com una estratègia quirúrgica per tal de reduir l'impacte de la lesió per isquèmia-reperfusió. El primer estudi realitzat utilitzant el PI en la pràctica clínica es va duu a terme en cirurgia cardíaca. Es realitzava el PI abans de realitzar un bypass de l'artèria coronària i van demostrar que això comportava una disminució de la lesió miocàrdica ⁽¹⁰⁸⁾.

En cirurgia hepàtica, el PI hepàtic ha mostrat un paper protector en resecions hepàtiques en humans ⁽¹⁰⁹⁻¹¹¹⁾. Clavien i

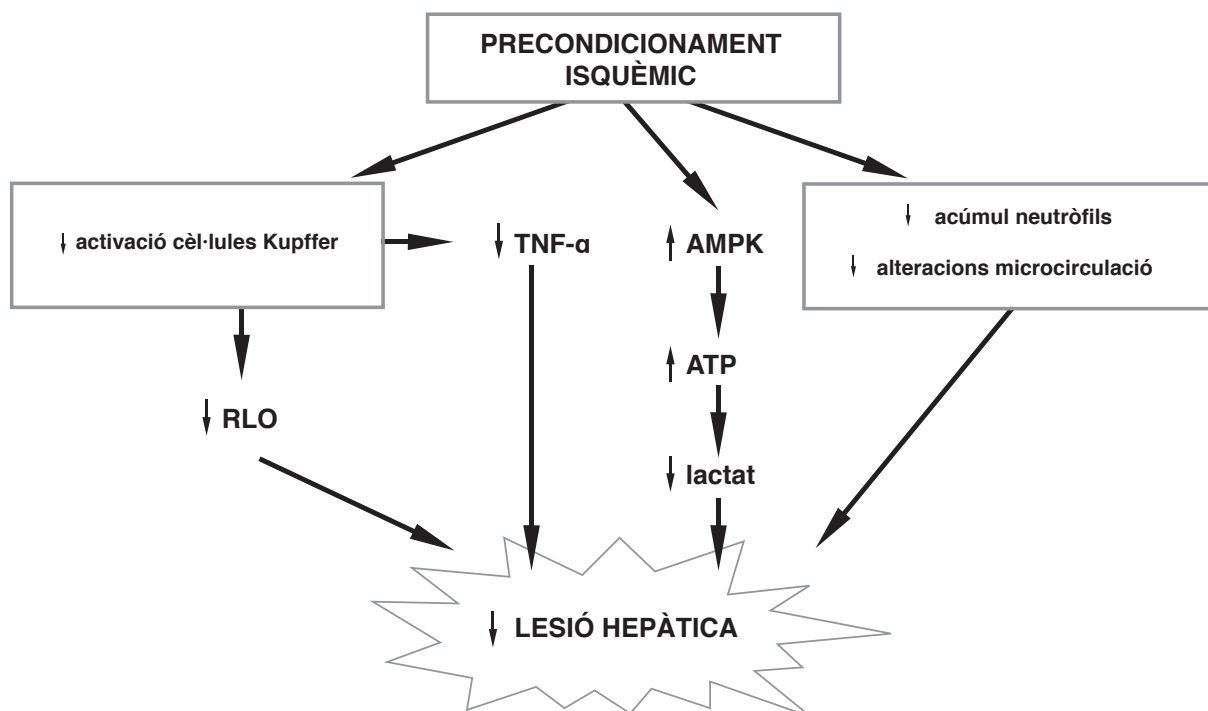


Figura 14. Mecanismes d'acció del preconditionament isquèmic.

col·laboradors van observar en els pacients que se'ls hi aplicava el PI (10 min d'isquèmia seguits de 10 min de reperfusió) abans de la oclusió hepàtica, mostren una reducció significativa dels nivells plasmàtics d' ALT i AST en comparar-los amb el grup no preconditionat ⁽¹¹¹⁾. A més es va observar una disminució de la mort cel·lular per apoptosi en les cèl·lules endotelials hepàtiques. Aquest mateix grup de treball, 3 anys més tard, va dur a terme un estudi randomitzat més extens, que va confirmar que la protecció induïda pel PI va ser major en pacients menors de 60 anys i en fetges que presentaven més d'un 25 % d'esteatosi. No van observar diferències en quant a morbimortalitat entre el grup sotmès a PI respecte al grup control ⁽¹⁰⁹⁾.

Un estudi similar dut a terme per Nuzzo i col·laboradors en 42 pacients, va observar que existia una relació entre la durada de la isquèmia i els valors de les transaminases, sent però inferiors aquestes en els grups preconditionats ⁽¹¹⁰⁾.

Un altre estudi randomitzat comparant un grup al que s'aplicava PI amb oclusió continua vs oclusió intermitent va concloure que ambdós eren igualment efectius però que el PI és preferible en pacients de menys de 65 anys amb un temps de oclusió vascular inferior a 75 minuts i amb presència d'esteatosi lleu ⁽¹¹²⁾.

Pel que fa referència al PI i la regeneració hepàtica, els resultats són contradictoris, mentre que alguns treballs indiquen

l'efecte beneficiós ⁽¹¹³⁾ del PI sobre la regeneració hepàtica d'altres no hi estan d'acord ⁽¹¹⁴⁾. El que si és conegut i ho demostren varis treballs és que la lesió per isquèmia-reperfusió disminueix la síntesi d'ADN i la capacitat de recuperar el pes de l'òrgan després d'una hepatectomia ⁽¹¹⁵⁾.

2.HIPÒTESI I OBJECTIUS

HIPÒTESI

Una vegada palesa la utilitat del preconditionament isquèmic com estratègia quirúrgica per disminuir la lesió hepàtica es planteja la següent hipòtesi: El preconditionament isquèmic ¿té cap influència sobre la regeneració hepàtica?

OBJECTIUS

Per respondre aquesta pregunta s'ha fet un disseny experimental amb els següents objectius:

- 1.** Avaluar, al fetge normal, l'efecte del preconditionament isquèmic sobre la seqüència lesió per isquèmia-reperfusió-regeneració.
- 2.** Investigar si el preconditionament isquèmic, a l'inhibir els efectes nocius de la isquèmia/reperfusió, és capaç d'afavorir la regeneració hepàtica.
- 3.** Avaluar si la "isquèmia curta hepàtica" és capaç d'oferir els mateixos beneficis que el preconditionament isquèmic enfront de la lesió per isquèmia-reperfusió i la regeneració hepàtica.

3. MATERIAL I MÈTODES

3.1. ANIMALS D'EXPERIMENTACIÓ

Els animals d'experimentació utilitzats en aquesta tesi varen ser rates mascle de la soca Sprague-Dawley (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Germany) de 250-300 g. de pes, mantingudes a l'estabulari del Institut Municipal d'Investigació Mèdica-Hospital del Mar (Barcelona) un mínim d'una setmana sencera abans de la intervenció quirúrgica. Les condicions ambientals s'han mantingut constants, temperatura 21 ± 2 °C graus, humitat relativa del 70 %, cicles de llum-fosc de 12 h. Els animals han estat alimentats amb pinso i aigua de la xarxa de Barcelona ad libitum. L'estudi va ser aprovat pel Comitè d'Experimentació Animal i va complir les normes d'ètica reguladores de la Unió Europea per models d'experimentació animal (Directiva 86/609/ECC). Aquest estudi ha estat finançat per una beca FIS.

3.2. PROCEDIMENT QUIRÚRGIC

Tots els procediments quirúrgics es van dur a terme sota anestèsia inhalatòria amb isoflorane. La inducció anestèsica es va realitzar amb isoflorane al 4-5 % amb un flux d'oxigen de 2-2,5 l/min. Durant la intervenció quirúrgica el flux d'isoflorane es va mantenir entre 0,4-4 % pel manteniment amb un flux d'oxigen constant.

El camp quirúrgic es va rentar amb povidona iodada i es va realitzar una laparotomia transversa 1 cm per sota de l'apèndix xifoides. Es va seccionar el lligament rodó (figura 15) després es va realitzar una hepatectomia parcial del 70 % d'acord amb el procediment realitzat per Higgins i Anderson ⁽⁶³⁾ (figures 16,17,18), ressecant el segment lateral esquerra i medial.



Figura 15.
Camp quirúrgic.

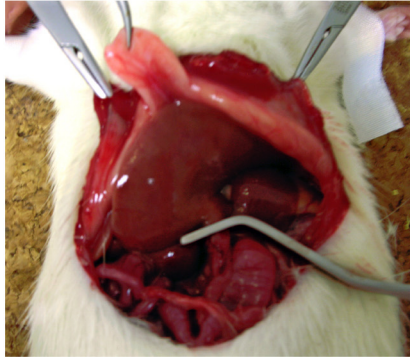


Figura 16.
Oclusió de l'hili hepàtic.

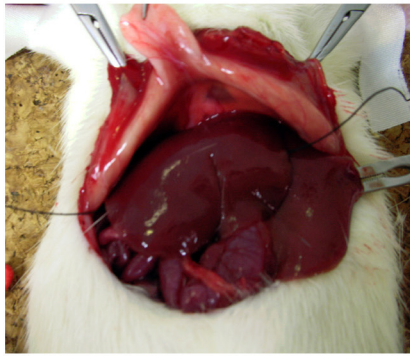
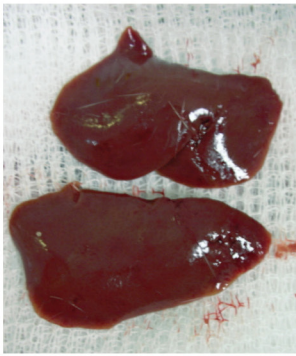


Figura 17.
Visió de la hepatectomia.

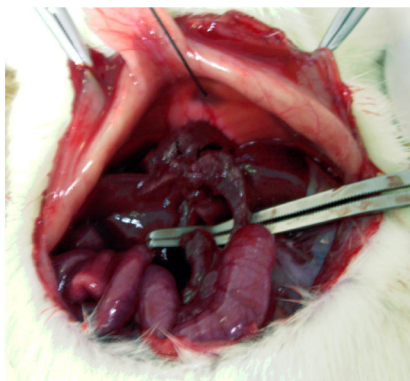


Figura 18.
Visió del camp quirúrgic post-resecció.

3.3. GRUPS EXPERIMENTALS

Per tal d'avaluar la efectivitat del preconditionament isquèmic en aquest model de resecció hepàtica del 70% es van realitzar els següents grups experimentals (figura 19):

3.3.1. GRUP RESECCIÓ HEPÀTICA SENSE OCLUSIÓ HILIAR (RH, n=32; 4 grups de 8 animals)

Una vegada realitzada la laparotomia, es mobilitza el fetge seccionant els seus lligaments. Posteriorment, es realitza la hepatectomia dels segments lateral esquerra i medial amb pinçament previ dels seus pedicles vasculars (figura 17).

3.3.2. GRUP RESECCIÓ HEPÀTICA AMB OCLUSIÓ HILIAR (RHPR, n=32; 4 grups de 8 animals)

La resecció hepàtica dels segments lateral esquerra i medial es realitza sota oclusió vascular total de l'hili hepàtic. La durada de la oclusió fou sempre de 15 minuts encara que la resecció fos realitzada en menys temps. Un cop passats els 15 minuts es desclou l'hili hepàtic, i es dona per finalitzat el procediment.

3.3.3. GRUP PRECONDICIONAMENT ISQUÈMIC (PI, n= 32; 4 grups de 8 animals)

Prèviament a la resecció hepàtica es realitza el preconditionament isquèmic (10



Figura 19. Grups experimentals.

min d'isquèmia seguits de 10 min de reperfusió) (Figura 16). En acabar els 10 min de reperfusió es clou l'hili hepàtic durant 15 min per realitzar la hepatectomia dels segments lateral esquerra i medial.

3.3.4. GRUP ISQUEMIA CURTA (IC,n=32; 4 grups de 8 animals)

Prèviament a la resecció hepàtica es realitza el que hem anomenat isquèmia curta que són 10 min d'oclusió vascular seguit de 10 min de reperfusió. Es clou el flux sanguini mitjançant un clamp vascular a nivell de l'hili durant 10 minuts (fase d'isquèmia). Posteriorment es desclou durant 10 minuts (fase de reperfusió), un cop passats els 10 minuts s'inicia la hepatectomia.

En cada grup, es consideren 4 subgrups atenent al moment del sacrifici de l'animal 6h, 24h, 3 dies i 7 dies.

3.4. RECOLLIDA I PROCESAMENT DE LES MOSTRES

Tots els animals varen ser sacrificats al finalitzar l'experiment amb anestèsia inhalatòria. En tots els grups experimentals, es van recollir mostres en diferents moments amb l'animal anestesiats.

3.4.1. MOSTRES DURANT LA CIRURGIA

El teixit hepàtic extret durant la cirurgia resectiva, una part es va fixar amb formol tamponat al 10% per realitzar posteriorment la seva inclusió en parafina i obtenir talls histològics per la realització de l'anàlisi histològic i immunohistoquímic.

L'altra part del teixit hepàtic es va congelar immediatament després de la seva obtenció amb nitrogen líquid i es va mantenir a -80°C fins el seu posterior processament.

3.4.2. MOSTRES DURANT EL SACRIFICI

En el moment del sacrifici es reseca tot el remanent hepàtic i part del teixit hepàtic es va fixar en formol tamponat i part es va congelar amb nitrogen líquid i es va mantenir a -80°C fins el seu processament de la mateixa forma que s'ha explicat anteriorment.

En teixit es van realitzar les següents determinacions:

- Activitat de Malondialdehid (MDA) i mieloperoxidasa (MPO) com a paràmetres d'estrès oxidatiu.
- ATP i càrrega energètica (CE) com a marcadors de reserva energètica.
- IL-6, IL-10 i TNF- α entre les diferents citosines.
- Factor de creixement transformant β (TGF- β) i Factor de creixement hepatocitari (HGF) com a paràmetres bioquímics de regeneració.
- PCNA com a paràmetre histològic de regeneració.

3.4.3. MOSTRES DE SANG

En el moment del sacrifici, es va extreure sang de la vena cava inferior infrahepàtica. Es varen afegir unes gotes d'heparina a la mostra i es va centrifugar durant 10 min a 3000 rpm a 4°C . El plasma es va congelar a -80°C fins al moment de fer

les corresponents determinacions analítiques.

En plasma es van fer realitzar les següents determinacions:

- Alanino amino transferasa (ALT) i aspartat amino transferasa (AST) com a paràmetres de lesió hepàtica.

3.5. DETERMINACIONS BIOQUIMIQUES

3.5.1. TRANSAMINASES

Las transaminases aspartat amino transferasa, (AST) i alanina amino transferasa, (ALT) són uns enzims molt abundants en el fetge. En condicions normals, estan al citoplasma. Al patir una lesió hepàtica són alliberats al plasma i és per això que s'utilitzen com a paràmetre de la lesió hepàtica. La avaluació del dany hepatocitari va ser duta a terme amb les determinacions d'aquestes transaminases (AST i ALT) en plasma utilitzant kits comercials (Boehringer Mannheim, Munich, Alemanya). L'assaig enzimàtic mesura la desaparició de NADH mitjançant espectrofotometria a una longitud d'ona $\lambda=365\text{nm}$.

3.5.2. PARAMETRES BIOQUIMICS D'ESTRÈS OXIDATIU

Malondialdehid. MDA

La peroxidació lipídica ha estat usada com una mesura indirecta del dany oxidatiu induïda pels radicals lliures d'oxigen (RLO). La determinació del lipoperòxid es va realitzar seguint el mètode de determinació de malondialdehid (MDA:1,1,3,3-tetraoxipropà) amb àcid tiobarbitúric

(TBA). El MDA és un dels productes finals de la degradació de la peroxidació lipídica. Per a la determinació de lipoperòxids, les mostres de teixit congelat es van homogeneïtzar en 2 ml tampó Tris. A 250 μl d'aquest homogenat se li van afegir 250 μl de tricloracètic al 40 % per tal de precipitar les proteïnes. Després d'agitar i centrifugar a 3000 rpm durant 15 minuts a 4°C, es va recuperar el sobrenedant, i se li van afegir 250 μl d'àcid tiobarbitúric al 0,67%. Tot seguit, es va fer bullir a 100°C durant 15 minuts, després es va deixar refredar i posteriorment, es va mesurar l'absorbància a una longitud d'ona de $\lambda=530\text{nm}$ i es va determinar mitjançant espectrofotometria ⁽¹¹⁶⁾.

Mieloperoxidasa. MPO

La MPO és un enzim que es troba a l'interior dels grànuls dels neutròfils polimorfonuclears, i la seva determinació es va utilitzar com a paràmetre de infiltració i activitat dels neutròfils en el teixit.

Aquest enzim catalitza el pas de peròxid d'hidrogen a àcid hipoclorós. L'àcid hipoclorós és un potent oxidant amb una gran capacitat citotòxica, que destrueix els microorganismes fagocitats pels neutròfils i que alliberat al medi extracel·lular contribueix a la lesió del teixit inflammat ⁽¹¹⁷⁾.

El mètode es basa en la reacció de la tetrametilbenzidina catalitzada per la MPO. És important aconseguir una bona extracció del enzim. Per això, les mostres es van homogeneïtzar en tampó fosfat (KH_2PO_4 0,05M, pH=6; amb bromur d'hexadecirtrimetilamoni (HTAB) 0,5%) i posteriorment es van sonicar i van passar

per 3 cicles de congelació/descongelació en neu carbònica. Després, les mostres es van incubar a 60°C durant 2 h per tal d'eliminar els inhibidors de la MPO que poden afectar a la determinació. Després de la incubació, es van centrifugar a 3000-4000 g durant 12 minuts a 4°C i es va recuperar el sobrenedant ⁽¹¹⁸⁾. A 5 µl d'aquest sobrenedant se li van afegir 10 µl de reactiu de tetrametilbenzidina 5mg/ml dissolt en dimetilsulfòxid (DMSO).

Al temps zero (t=0) se li van afegir 70 µl de tampó fosfat (KH₂PO₄ 8mM, pH=5,4) que contenia peròxid d'hidrogen 0,05% i es va determinar la cinètica de la MPO, llegint la absorbància durant 3 minuts cada 15 segons a una longitud d'ona λ= 630 nm.

3.5.3. PARAMETRES BIOQUIMICS DE RESERVA ENERGÈTICA

ATP i càrrega energètica (CE)

La determinació en teixit hepàtic d'ATP, ADP i AMP, es va utilitzar com a paràmetre de funcionalitat hepàtica ⁽¹¹⁹⁾. La quantificació d'aquests nucleòtids es va dur a terme per cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC). Les mostres de fetge varen ser homogeneïtzades en 10 volums de HClO₄ al 3,6% i mantingudes a 0.5°C durant 30 minuts. Després d'aquest temps les mostres varen ser centrifugades a 850 g durant 15 minuts. Els sobrenedants es van ajustar a pH=6 i després centrifugats a 14000 rpm. Els perfils de nucleòtids i productes de degradació es van obtenir utilitzant una columna de fase inversa Spherisob ODS (C18, 5 µm de mesura de partícula, 15x0.4 cm, Teknokroma, Sant

Cugat, Espanya) acoblat a un cromatògraf líquid 600 (Waters, Milford, MA). Les separacions dels diferents nucleòtids i productes de degradació es van realitzar a λ=254nm.

La CE va ser calculada segons la concentració de nucleòtids de l'adenina seguint la fórmula d'Atkinson: $CE = (ATP + 0.5 \times ADP) / (ATP + ADP + AMP)$ ⁽¹²⁰⁾.

3.5.4. CITOQUINES PRO I ANTIINFLAMATÒRIES

Interleucina 6 (IL-6)

Per la determinació de la IL-6 es va homogeneïtzar el teixit hepàtic en 2 ml de tampó Tris HCl 50mM, NaCl 150mM, tritò-X100 i un cocktail d'inhibidors de proteases (Complete mini, Roche, Suïssa). Els homogenats es van centrifugar a 3000 g durant 15 minuts a 4°C, i els sobrenedants es van decantar i es van guardar a -80°C fins a ser utilitzats per la determinació de IL-6 ⁽¹²¹⁾. La detecció de IL-6 es va realitzar mitjançant un kit comercial de ELISA (rat IL-6 ELISA kit, Biosource, Camarillo, CA).

Interleucina 10 (IL-10)

Per la determinació de la IL-10 es va homogeneïtzar el teixit hepàtic en 2 mL de tampó fosfat a 50 mM a pH=6 que conté PMSF 2mM, antipaina 1mg/mL, leupeptina 1mg/mL i pepstatina A 1 mg/mL. Els homogenats es van centrifugar 100000 g durant 1 hora a 15°C, i el sobrenedant es van decantar i es van guardar a -80°C fins a ser utilitzats per la determinació de IL-10.

Es van utilitzar uns kits de ELISA (Amer-

sham Life Science, UK) que utilitzen anticossos de rata contra IL-10 unit al fons d'un pouet, anticòs biotinat contra IL-10, un conjugat d'estreptavidina amb peroxidasa i TMB, amb la posterior lectura de la absorbància a 450 nm.

Factor de necrosi tumoral α (TNF- α)

El TNF- α és una de les citosines implicades en la isquèmia-reperfusió hepàtica, com ja s'ha comentat anteriorment. Es una molècula proinflamatòria que un cop alliberada al torrent circulatori indueix la síntesi d'altres citosines i quemoquines, i regula la expressió de molècules d'adhesió afavorint l'acúmulo de neutròfils a l'espai vascular i la seva posterior interacció amb les cèl·lules de l'endoteli vascular.

El TNF- α lliure es va determinar en plasma mitjançant un kit de ELISA (Biosource, CA USA) seguint les instruccions del fabricant.

El TNF- α total, lliure i unit a proteïnes es va determinar mitjançant un kit d'immunoassaig competitiu (Chemicon International, Temecula, CA).

3.5.5. PARAMETRES DE REGENERACIÓ HEPÀTICA

Factor de creixement transformador β (TGF- β)

Per a la determinació del TGF- β en fetge es va homogeneïtzar el teixit hepàtic en 1,5 mL de tampó fosfat (50 mM a pH=7,4) que contenia PMSF 2mM i pepstatina A 1mg/ml a 4°C.

Els homogenats es van centrifugar a

10000 g durant 10 minuts a 4°C, i els sobrenedants es van decantar i es van guardar a -80°C fins a ser utilitzats per la determinació del TGF- β actiu. Per mesurar el TGF- β total (actiu i latent) les mostres es van acidificar amb HCl 1M i després es van neutralitzar amb NaOH 1 M. Es va utilitzar un kit comercial de ELISA (R&D systems, Minneapolis, USA)^(122,123).

Factor de creixement hepatocitari (HGF)

Per la determinació de HGF les mostres de fetge es van homogeneïtzar en un tampó que contenia Tris (hidroximetil) aminometà-HCl 20 mM, NaCl 2M, Fluorur de fenilmetilsulfòxid (PMSF) 1 mM, àcid etilendiaminotetraacètic 1 mM i polioxietilensorbità mono-oleat al 0.1%. El homogenat es va centrifugar a 20000 g durant 1 hora a 4° C. El sobrenedant es va guardar a -80° C. En les mostres de plasma i homogenat es va determinar la concentració de HGF mitjançant un kit de ELISA comercial distribuït pel Institut d'Immunologia de Tokio (Japó)⁽¹²⁴⁾ seguint les indicacions d'investigadors d'aquella institució.

3.6. TÈCNiques HISTOLÒGIQUES

Immunohistoquímica de PCNA (Antigen nuclear de proliferació cel·lular)

L'antigen nuclear de proliferació cel·lular (PCNA) és una proteïna multifuncional de 32 KDa que s'expressa en grans quantitats al final de la fase G1 i al principi de la fase S del cicle cel·lular i és essencial per la progressió a través del cicle cel·lular.

Aquesta proteïna forma part de la maquinària que s'ocupa de la replicació del ADN i funciona com proteïna accessòria de la ADN polimerasa δ (implicada a la replicació del ADN cromosomal) i de la ADN polimerasa ϵ (implicada a la recombinació i reparació del ADN).

La determinació d'aquesta proteïna dóna una idea de la proporció de cèl·lules que s'estan dividint. Les mostres de teixit hepàtic es varen fixar en paraformaldehid tamponat al 4% i passades 24 hores es varen incloure en parafina. A l'ultramicrotòtom es varen realitzar tall histològics de 3 μm de gruix. Els talls es varen desparafinar amb xilol i es van hidratar amb solucions d'etanol a concentracions decreixents.

La immunohistoquímica es va realitzar mitjançant un kit comercial (DAKO Envision+System, peroxidasa (DAB);

Dako, Alemanya) seguint les instruccions del fabricant. En primer lloc es va bloquejar la peroxidasa interna de la mostra. Es va incubar amb l'anticòs primari anti PCNA (clone PC10; dilució 1:20; Dako, Alemanya). Després d'incubar amb l'anticòs secundari, les mostres varen ser tractades amb DAB i el substrat cromogen que donaria un precipitat marró a las cèl·lules en divisió (figura 20). Es tenyeixen els talls amb hematoxilina per donar una tinció de contrast i es munten el portaobjectes.

L'índex de marcatge de PCNA es va determinar mitjançant el comptatge de nuclis tenyits en 30 camps de gran augment. Els valors es van expressar en percentatge de cèl·lules tenyides respecte al número total de hepatòcits ⁽¹²⁵⁾.

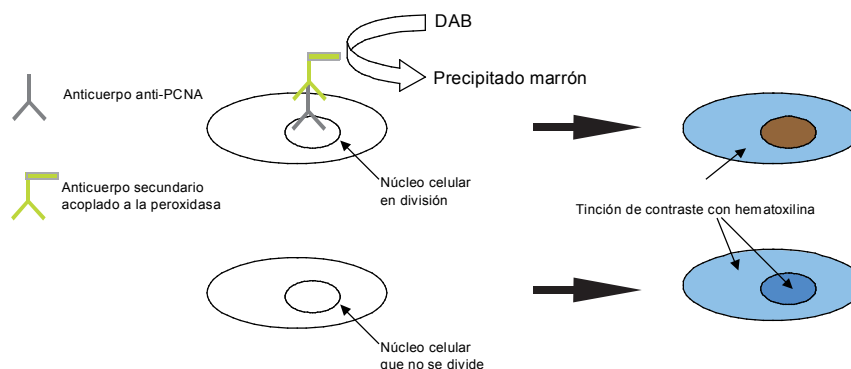


Figura 20. Immunohistoquímica de PCNA.

3.7. ESTUDI ESTADÍSTIC

Per a l'anàlisi estadístic s'ha usat el programa SPSS versió 13.0.

Per a determinar si existeixen diferències estadísticament significatives en les variables analitzades segons el grup experimental, s'ha realitzat un model d'anàlisi de la variança per a dades no balancejades (Unbalanced ANOVA). El model usat consta de les variables referents al grup experimental, a la data de sacrifici i a la interacció entre ambdues. Els contrastos realitzats mitjançant LS-Means que s'han realitzar han estat tant pels efectes principals com per a les interaccions.

4.RESULTATS

Per tal de facilitar la comprensió dels resultats, aquest capítol s'ha dividit en 2 grans parts.

En una **primera part** varem comparar l'efecte del PI enfront els grups RH i RHPR per valorar les conseqüències del PI sobre la funció i regeneració hepàtica. En una **segona part** varem comparar el grup PI amb un nou grup anomenat isquèmia curta (IC) amb els mateixos objectius. S'ha preparat un desplegable amb una síntesi dels resultats a la tapa posterior d'aquesta tesi per facilitar al lector la visualització i comprensió dels mateixos.

4.1. EFECTE DEL PI SOBRE LA LESIÓ HEPÀTICA.

Per valorar la lesió hepàtica es van ana-

litzar l'aspartat amino transferasa (AST) i l'alanino amino transferasa (ALT), en el moment del sacrifici, a les 6h, 24h, 3 d i 7 dies.

4.1.1. ASPARTAT AMINO TRANSFERASA (AST)

L'estudi evolutiu d'AST en els quatre moments estudiats va mostrar una elevació inicial molt significativa a les 24 hores en els grups RH i RHPR. Després d'aquest aixecament inicial queda palesa una disminució progressiva de tots els grups, encara que als 3 dies és més patent als grups RH i RHPR.

És a dir, en el grup PI la lesió va ser significativament menor en tots els moments estudiats menys al 7è dia en que varen ser similars (figura 21).

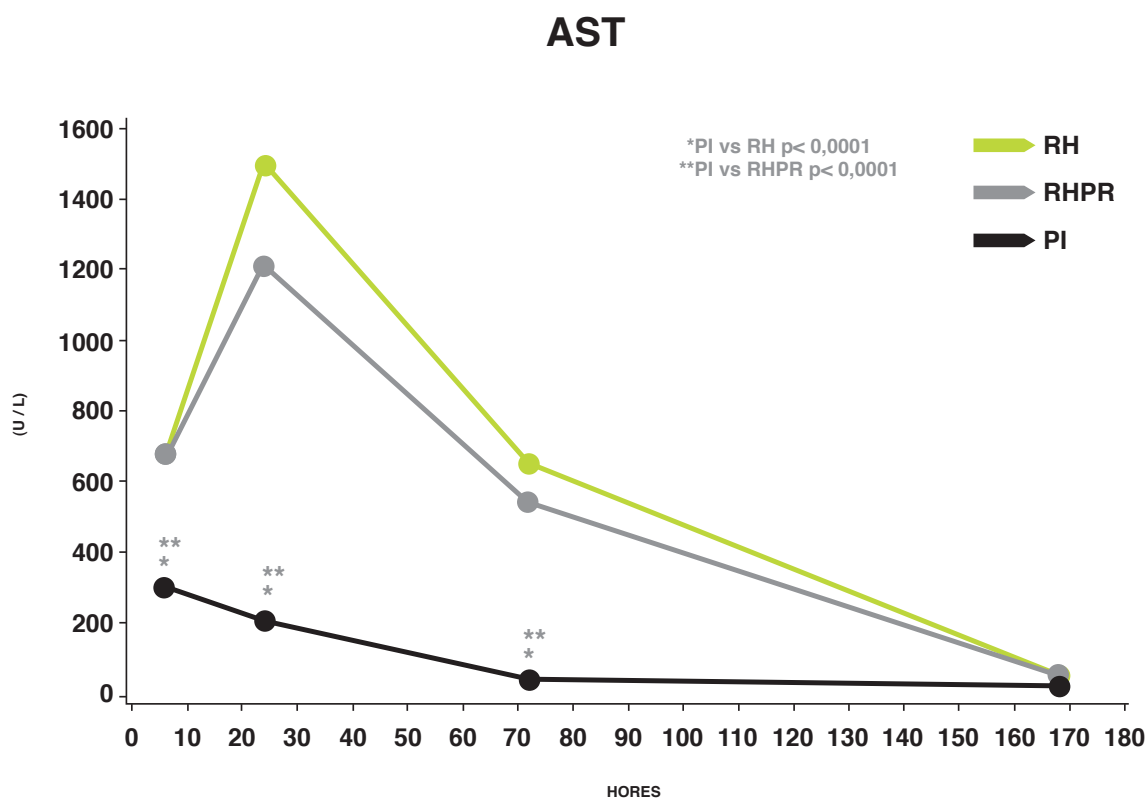


Figura 21. Evolució en el temps d'AST segons el grup experimental i el moment del sacrifici.

4.1.2. ALANINO AMINO TRASFERASA (ALT)

També com a paràmetre de lesió hepàtica varem analitzar l'alanino amino transferasa (ALT). El comportament d'aquesta transaminasa guarda moltes similituds amb AST. Una elevació inicial a les 6 h amb un pic màxim en tots els grups a les 24 hores, però que en el cas dels grups RH i RHPR són estadísticament significatives si es compara amb el grup PI. A partir d'aquest moment, la davallada és molt clara en tots els grups fins al 7è dia sense diferències entre grups (figura 22).

4.2. EFECTE DEL PRECONDICIONAMENT ISQUÈMIC SOBRE L'ESTRÈS OXIDATIU

Posteriorment es va estudiar l'efecte del

precondicionament isquèmic sobre la peroxidació lipídica i la infiltració de neutròfils mitjançant les determinacions de l'àcid malondialdehid (MDA) i l'activitat de la mieloperoxidasa (MPO), respectivament. En cap dels moments de l'estudi, 6h, 24 h, 3 dies i 7 dies no es van trobar diferències significatives del grup preconditionat enfront els grups d'animals no preconditionats (grup RH i grup RHPR) ni pel que fa a MDA ni a MPO (figura 23 i 24).

4.3. EFECTE DEL PRECONDICIONAMENT ISQUÈMIC SOBRE LA RESERVA ENERGÈTICA

Per tal d'avaluar la reserva energètica, també com a paràmetre de funcionalitat hepàtica, es van analitzar els nivells de l'

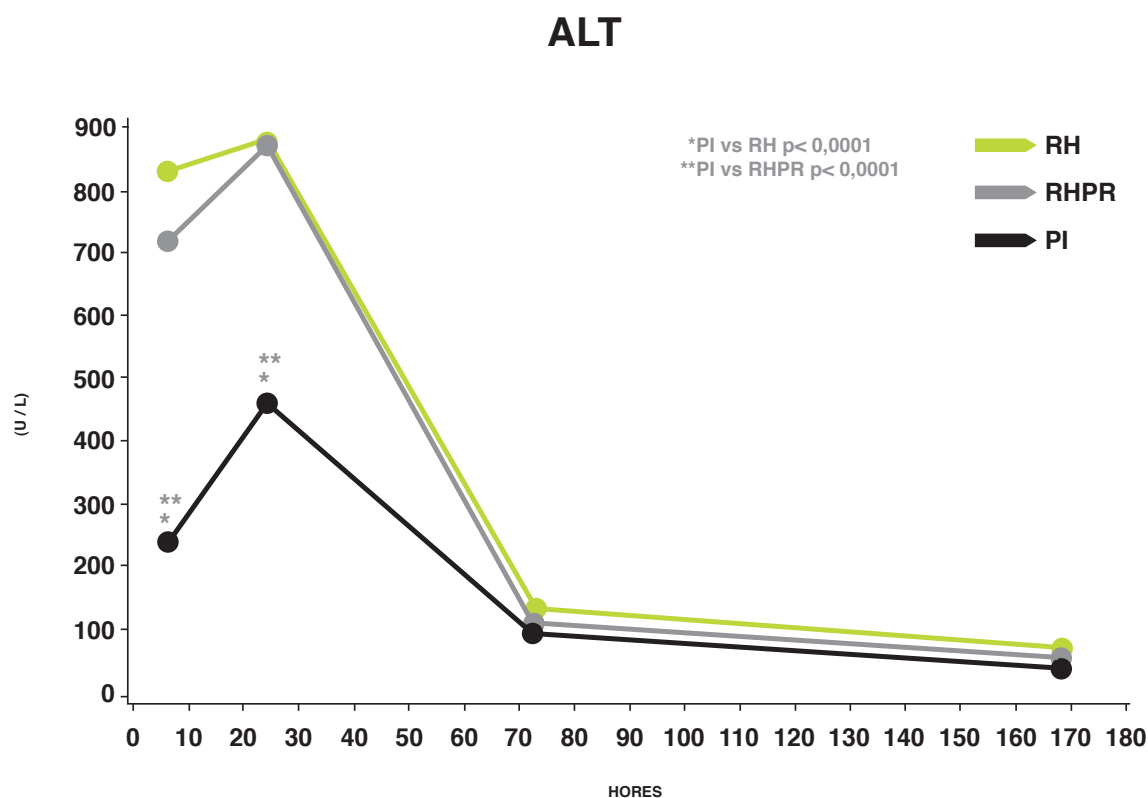


Figura 22. Evolució en el temps d' ALT segons el grup experimental i el moment del sacrifici.

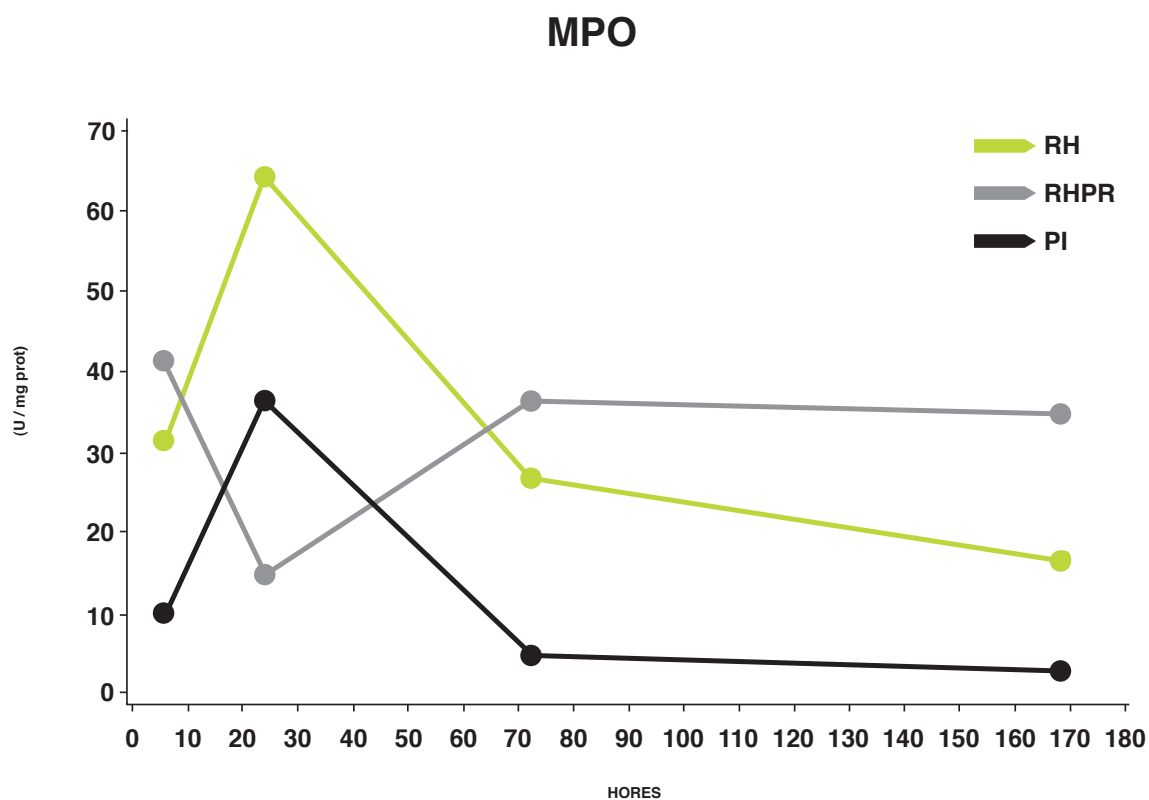
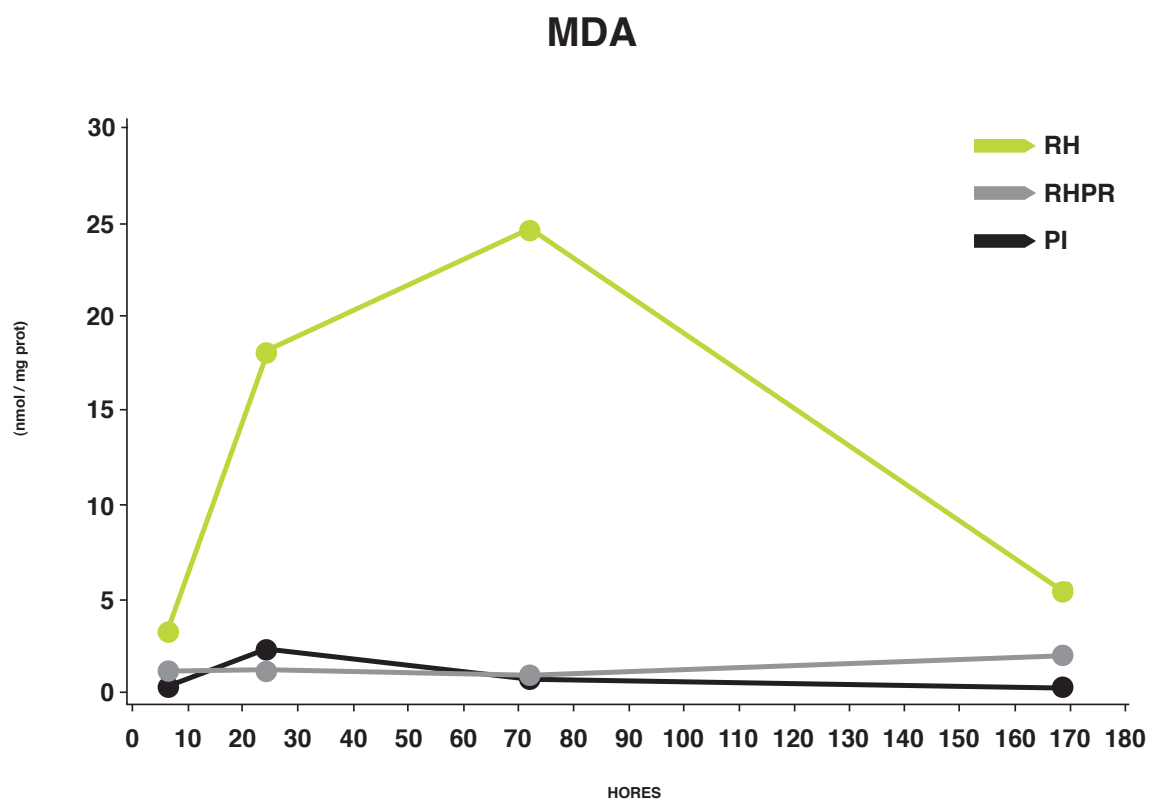


Figura 23 i 24. Evolució en el temps de MDA i MPO segons el grup experimental i el moment del sacrifici.

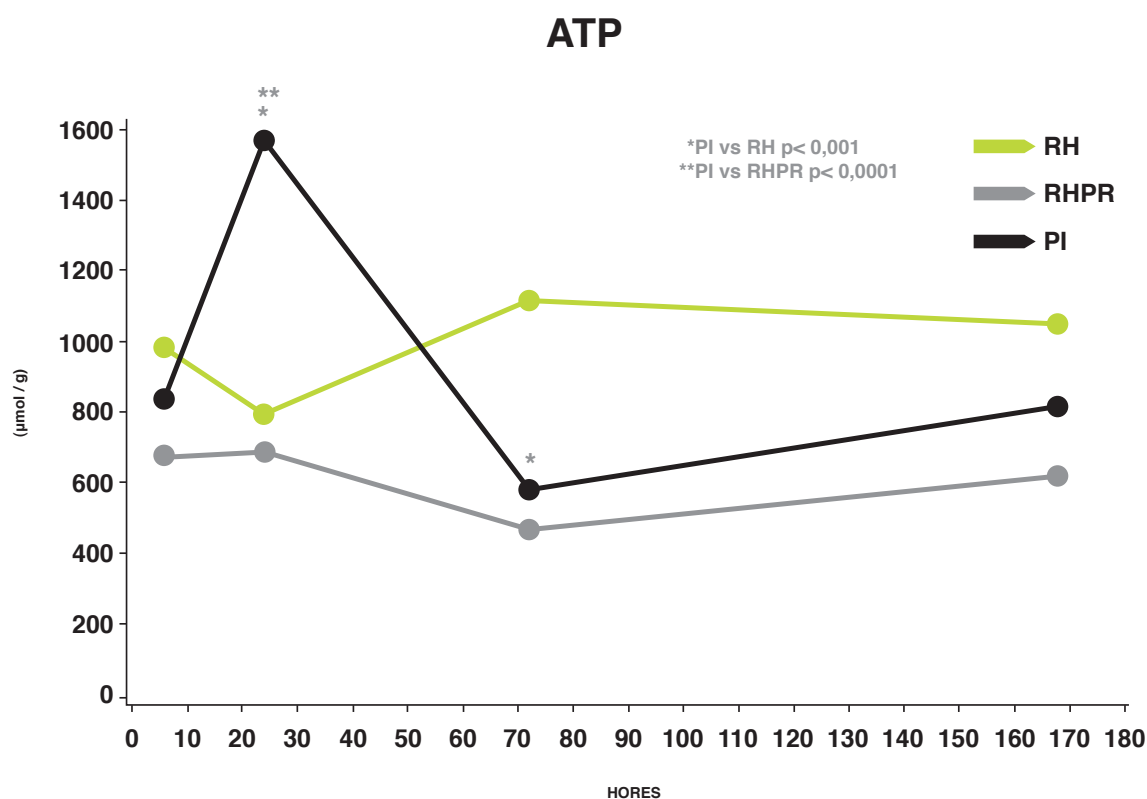


Figura 25. Evolució en el temps d'ATP segons el grup experimental i el moment del sacrifici.

ATP i de la càrrega energètica (CE). Pel que fa referència a l'ATP, el grup RH era el que mostrava uns nivells més alts en tots els moments de l'estudi menys a les 24 h en que era el grup PI el que presentava uns nivells significativament més alts (figura 25).

Pel que fa a la CE aquesta també era més alta en el grup PI a les 24h, mentre que als 3 dies tornava a ser el grup RH el que presentava uns nivells més alts sense arribar a la significació. Als 7 dies, els valors als 3 grups varen ser similars (figura 26).

4.4. EFECTE DEL PRECONDICIONAMENT ISQUÈMIC SOBRE L'ALLIBERAMENT DE CITOQUINES PRO I ANTIINFLAMATÒRIES

Interleucina 6 (IL-6)

Els nivells de IL-6 a les 6 hores, eren superiors als animals del grup sotmès a preconditionament isquèmic respecte al grup RH i RHPR. A les 24 h, només es mantenien les diferències entre el grup PI i el grup RH. A la resta de moments, als 3 i 7 dies, no existien diferències entre cap dels grups d'estudi (figura 27).

Interleucina 10 (IL-10)

Contràriament a IL-6, els nivells de IL-

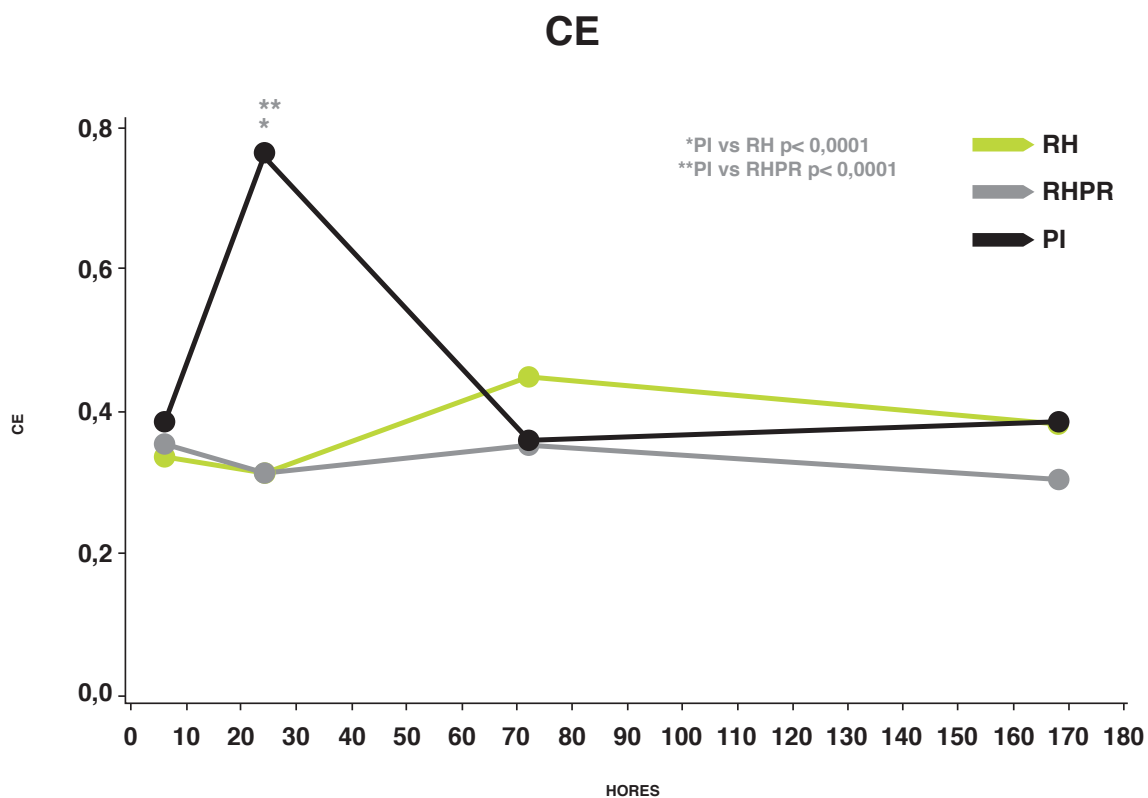


Figura 26. Evolució en el temps de la CE segons el grup experimental i el moment del sacrifici.

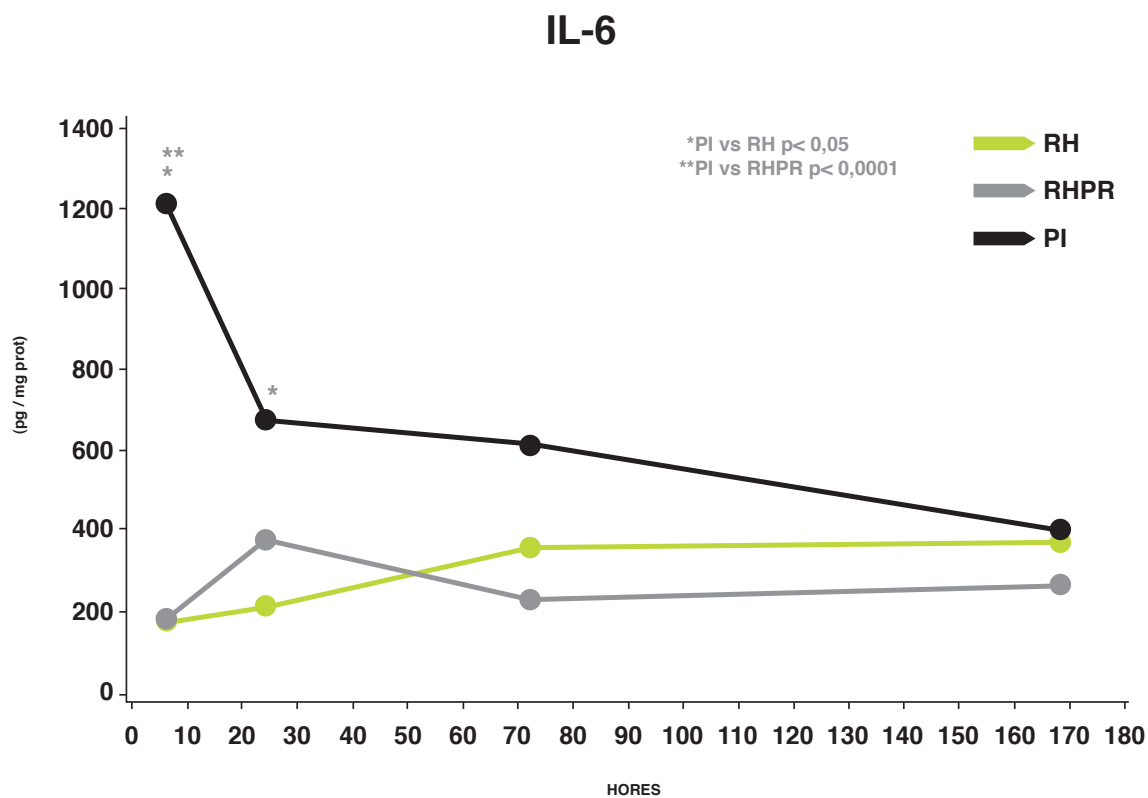


Figura 27. Evolució en el temps de la IL-6 segons el grup experimental i el moment del sacrifici.

IL-10

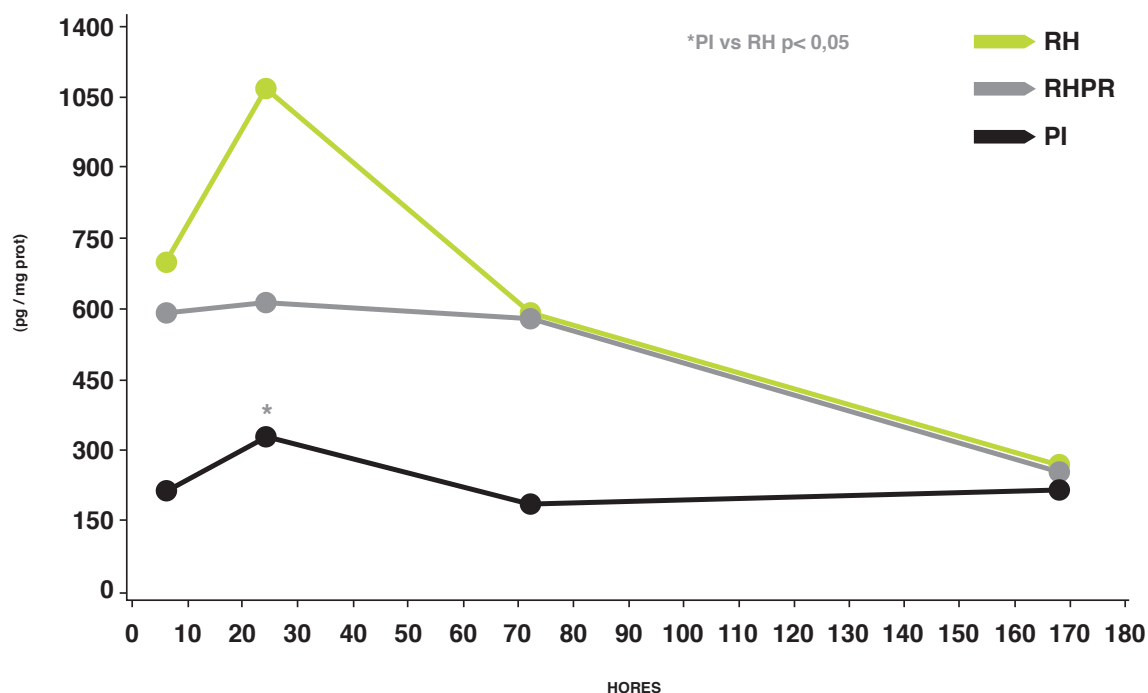


Figura 28. Evolució en el temps de la IL-10 en el grup experimental i el moment del sacrifici.

IL-10 són inferiors en el grup PI enfront els altres dos grups en tots els moments de l'estudi, sent però aquestes diferències només significatives entre el grup PI i el grup RH a les 24h (figura 28).

Factor de necrosi tumoral- α (TNF- α)

Els nivells de factor de necrosi tumoral- α (TNF- α) a les 6 hores mostraven uns valors inferiors en el grup PI enfront el grup RH i RHPR. A les 24 hores, només es mantenen les diferències del grup PI enfront RHPR. Als 3 dies, no existeixen diferències en els nivells de TNF- α entre cap dels grups d'estudi. Contràriament, als 7 dies, tornaven a aparèixer diferències entre el grup PI i el grup RH (figura 29).

4.5. EFECTE DEL PRECONDICIONAMENT ISQUÈMIC SOBRE LA REGENERACIÓ HEPÀTICA

Per tal d'avaluar la regeneració hepàtica es van determinar dos factors de creixement (TGF- β i HGF) i un índex de proliferació cel·lular (PCNA).

Factor de creixement transformant- β (TGF- β)

Els nivells tissulars del primer factor de creixement mesurat, el factor de creixement transformador β (TGF- β), varen ser significativament inferiors al grup PI al compararlo amb el grup RHPR a les 6 hores. A les 24 hores, no existien diferències en els nivells de TGF- β entre cap dels grups. Als 3 dies, tornen a posar-se

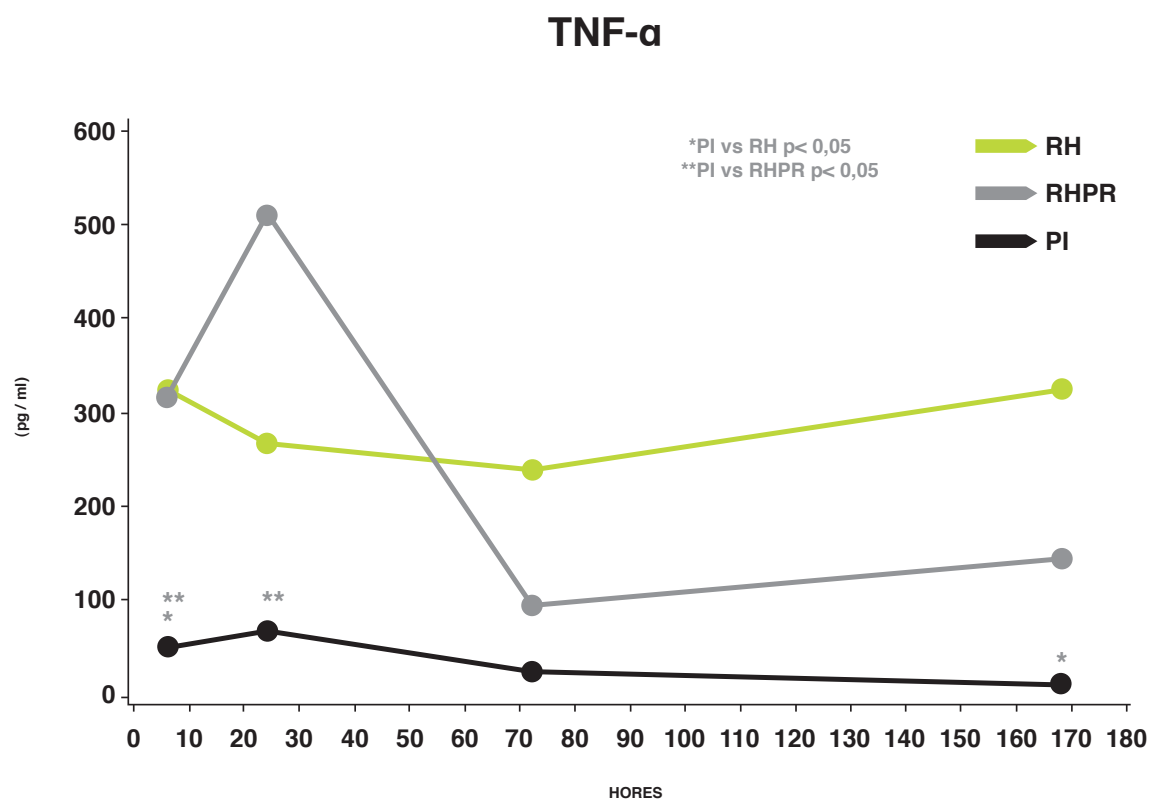


Figura 29. Evolució en el temps de TNF- α segons el grup experimental i el moment del sacrifici.

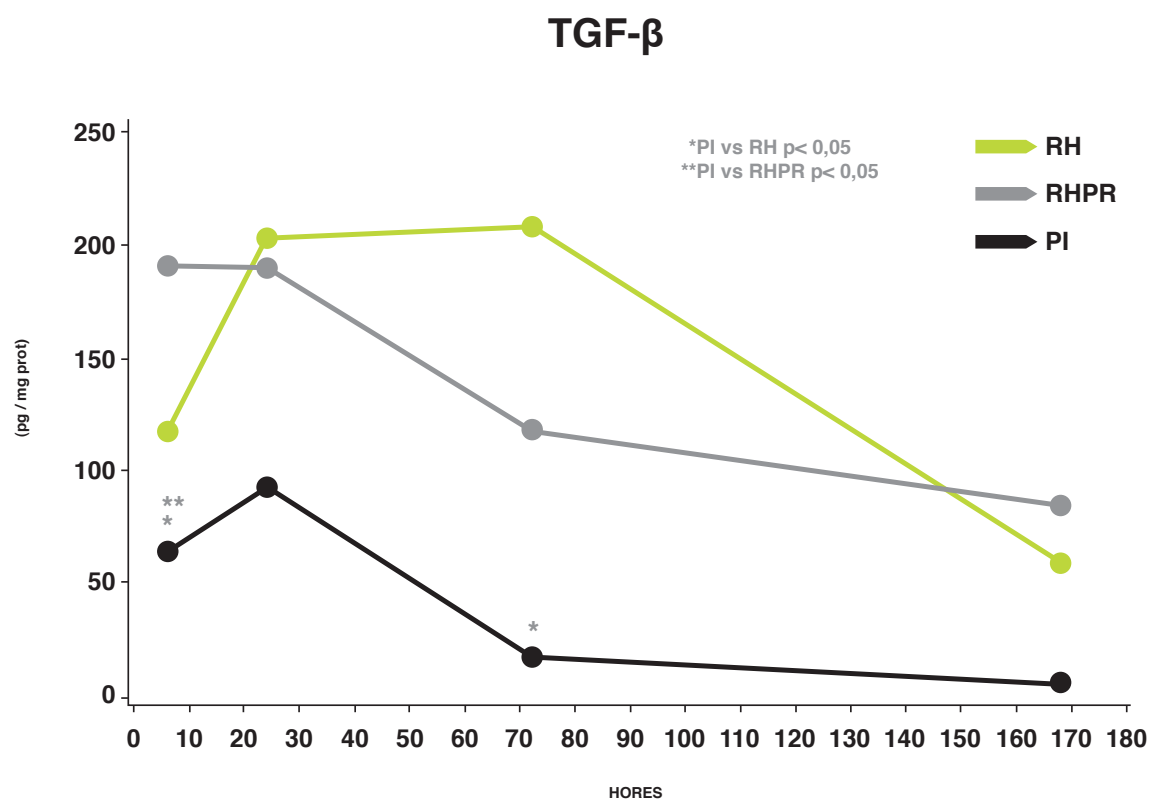


Figura 30. Evolució en el temps de TGF- β segons el grup experimental i el moment del sacrifici.

en evidència diferències, ara entre el grup PI i el grup RH. Als 7 dies no existien diferències entre cap dels grups (figura 30).

Factor de creixement hepatocitari (HGF)

L'estudi evolutiu del HGF en els quatre moments estudiats va evidenciar una elevació inicial molt important d'aquest factor de creixement en el grup d'animals precondicionats mostrant posteriorment un descens molt significatiu a partir de les 24 h. Els altres dos grups mostren una petita elevació als nivells de HGF a les 24 h (figura 31).

Antigen de proliferació cel·lular (PCNA)

El percentatge de cèl·lules en proliferació

només es va mesurar a les 24 h, 3 dies i 7 dies de la intervenció quirúrgica.

Pel que fa a l'estudi evolutiu del PCNA, tots els grups mostren una elevació inicial a les 24 h, mostrant un pic als 3 dies el grup PI mentre que els altres dos grups RH i RHPR ja mostren un descens a partir de les 24h (figura 32).

A la figura 33 es mostren talls seleccionats de l'activitat de l'antigen de proliferació cel·lular (PCNA) en els grups no precondicionats (A) i precondicionats (B) als 3 dies i 7 dies, respectivament. Queda palès el major percentatge de cèl·lules tenyides.

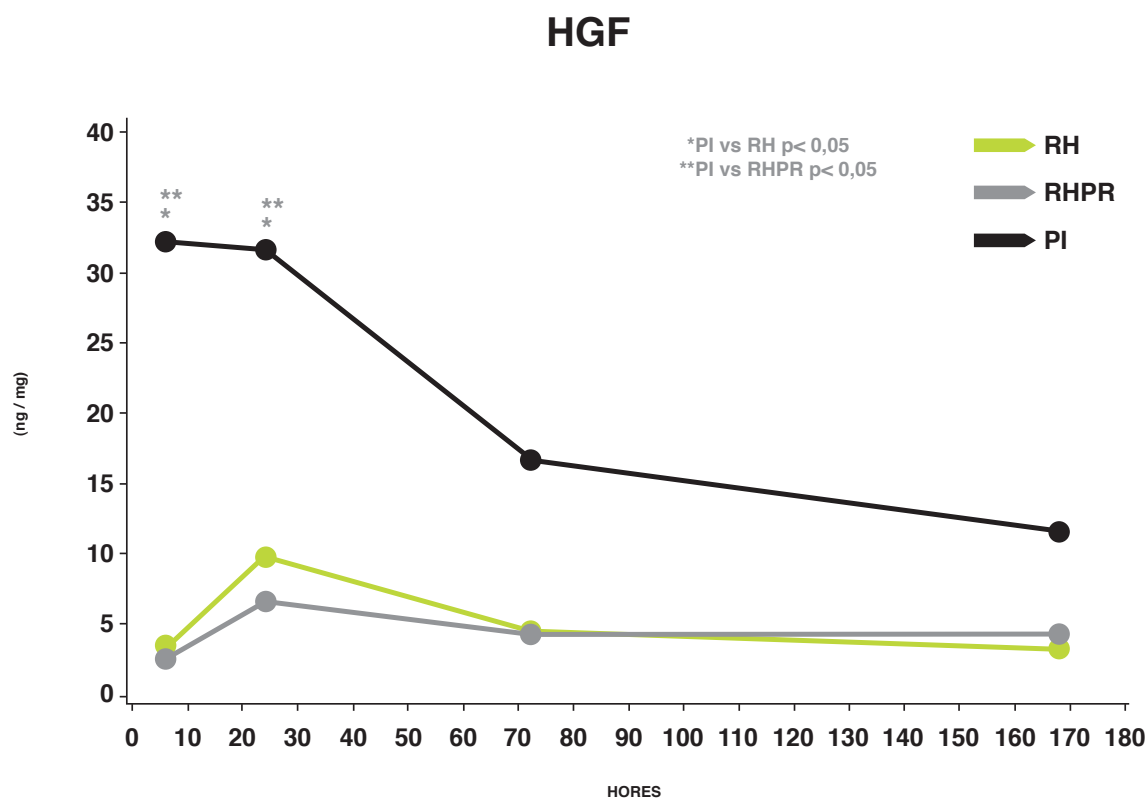


Figura 31. Evolució en el temps de HGF segons el grup experimental i el moment del sacrifici.

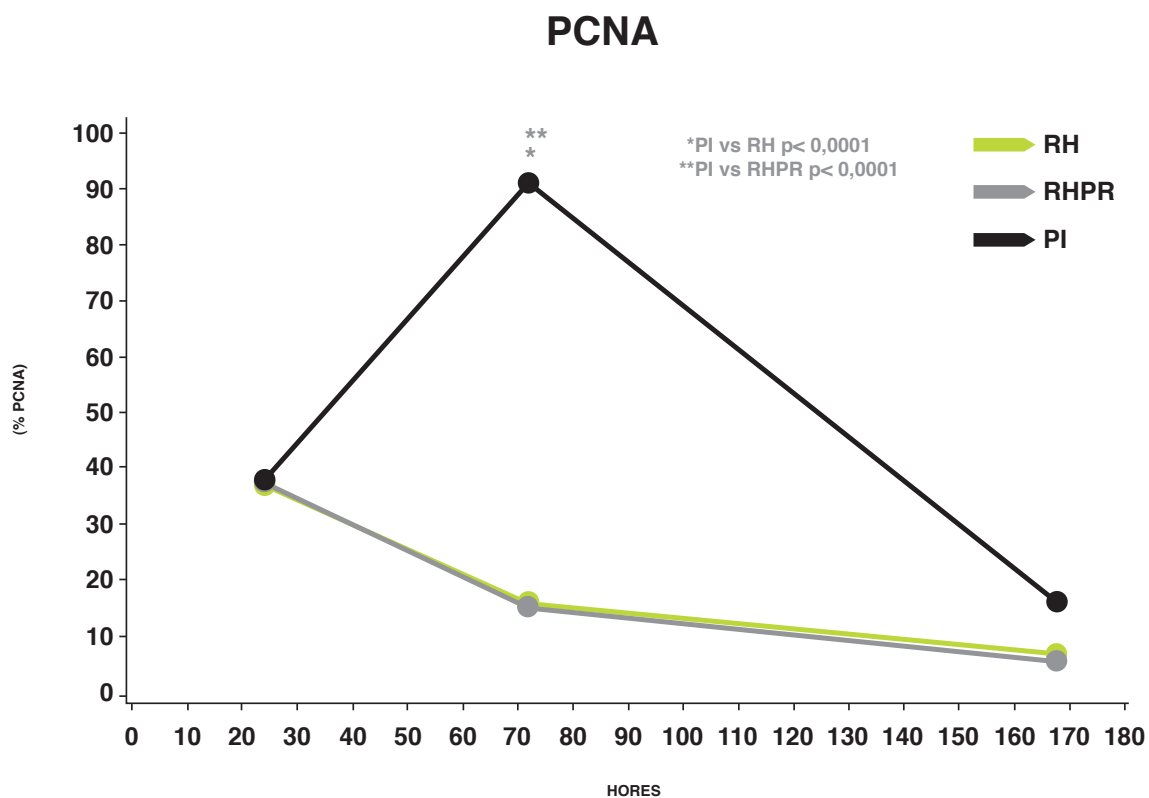


Figura 32. Evolució en el temps de PCNA segons el grup experimental i el moment del sacrifici.

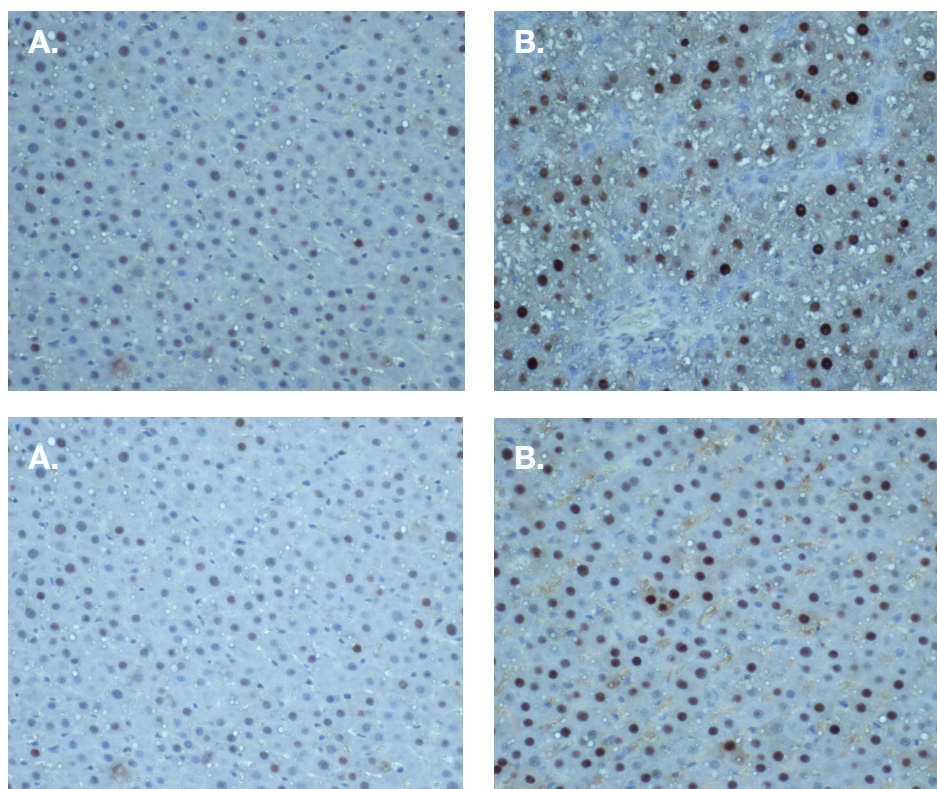


Figura 33. Activitat de l'antigen de proliferació cel·lular (PCNA) als grups no preconditionats (A) i preconditionat (B) als 3 dies (superior) i als 7 dies (inferior) del procediment quirúrgic.

Segona part: Estudi comparatiu entre el grup PI i el grup IC.

Donades les troballes en el primer estudi, en què existien diferències estadísticament significatives entre el grup PI i RHPR, i que els canvis en la cirurgia experimental entre els dos grups era l'aplicació prèvia de 10 min d'isquèmia seguits de 10 min de reperfusió abans de l'aplicació de la maniobra de Pringle durant la resecció, varem decidir realitzar un grup al que varem anomenar isquèmia curta (grup IC) en el qual només varem aplicar els 10 min d'isquèmia i posteriorment els 10 minuts de reperfusió. Al finalitzar aquest temps varem realitzar la resecció sense cloure l'hili hepàtic.

4.6. EFECTE DEL PI SOBRE LA LESIÓ HEPÀTICA ENFRONT EL GRUP IC

4.6.1. ASPARTAT AMINO TRANSFERASA (AST)

Pel que fa a l'estudi evolutiu d'AST, el grup PI mostra una menor elevació d'aquest enzim respecte al grup IC a les 6 i 24 h, amb una disminució progressiva d'ambdós grups a partir del 3er dia (figura 34).

4.6.2. ALANINO AMINO TRANSFERASA (ALT)

Pel que fa a l'estudi evolutiu d'ALT, el grup PI va mostrar uns valors lleugerament inferiors al grup IC a les 6 i 24 hores, amb una disminució en ambdós grups a partir de les 24 h (figura 35).

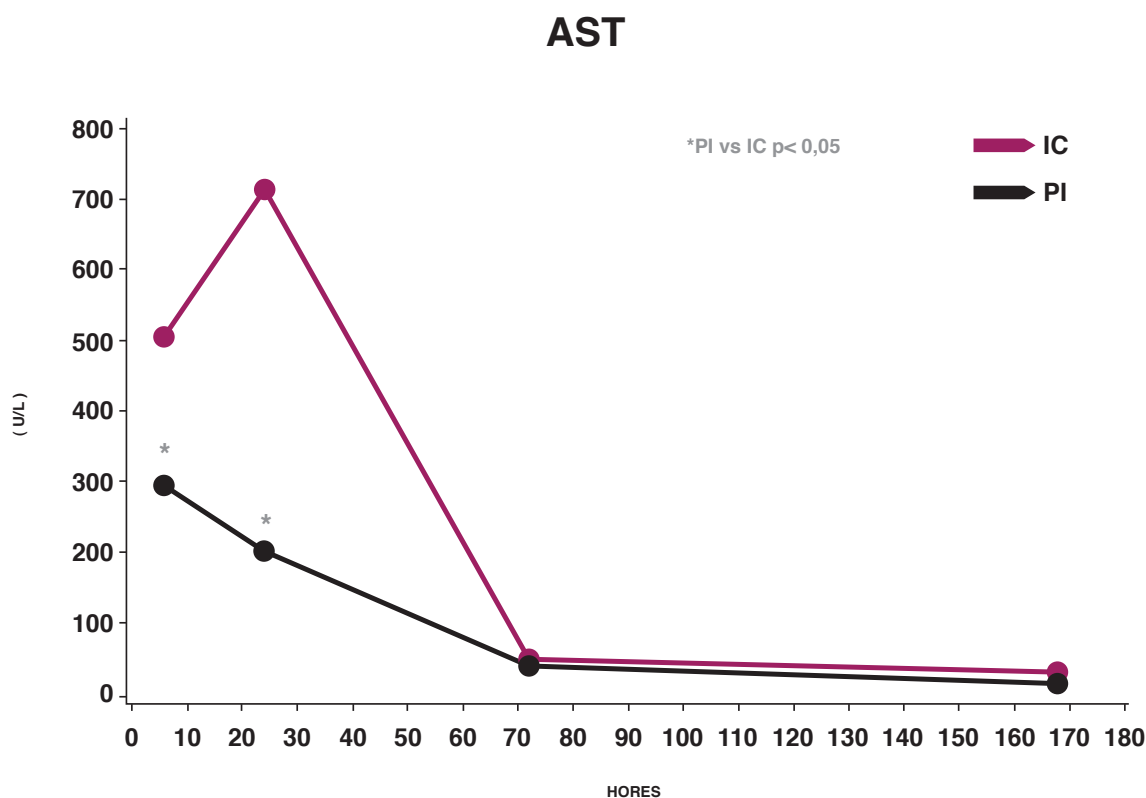


Figura 34. . Evolució en el temps d'AST segons el grup experimental i el moment del sacrifici.

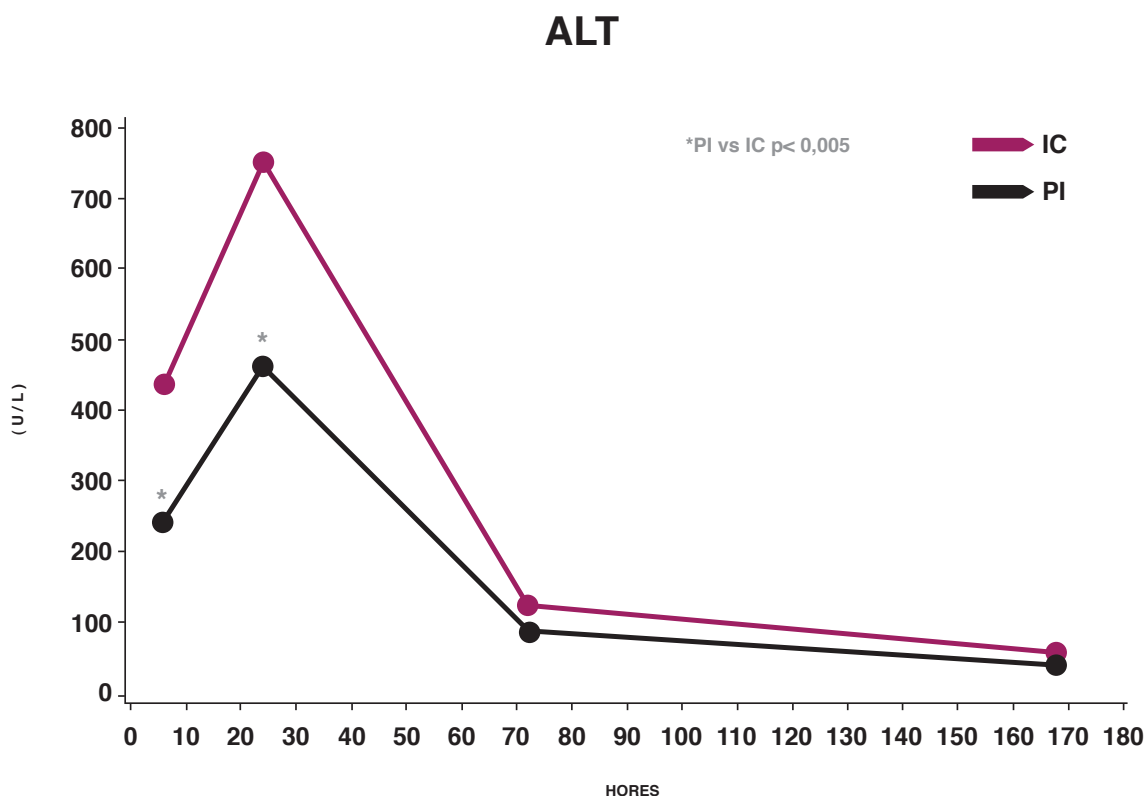


Figura 35. Evolució en el temps d'ALT segons el grup experimental i el moment del sacrifici.

4.7. EFECTE DEL PRECONDICIONAMENT ISQUÈMIC SOBRE L'ESTRÈS OXIDATIU ENFRONT EL GRUP IC

En cap moment de l'estudi van existir diferències significatives pel que fa referència a la MDA i a la MPO, entre el grup PI i el grup IC (figura 36 i 37).

4.8 EFECTE DEL PRECONDICIONAMENT ISQUÈMIC SOBRE LA RESERVA ENERGÈTICA ENFRONT EL GRUP IC

Pel que fa referència a l'ATP, a les 6 hores no existien diferències significatives entre el dos grups. En canvi a les 24 hores, el grup PI mostrava uns valors significativament superiors al grup IC. Contràriament, als 3 dies el nivells d'ATP eren estadís-

ticament superiors al grup IC enfront el grup PI. Als 7 dies, no existien diferències significatives entre els dos grups (figura 38).

Pel que fa referència a la càrrega energètica només a les 24 h el grup PI mostrava uns valors significativament superiors al grup IC (figura 39).

4.9. EFECTE DEL PRECONDICIONAMENT ISQUÈMIC SOBRE L'ALLIBERAMENT DE CITOQUINES PRO I ANTIINFLAMATÒRIES ENFRONT IC

Interleucina 6 (IL-6)

El grup PI mostrava uns valors estadísticament superiors al grup IC en tots els moments de l'estudi menys al setè dia (figura 40).

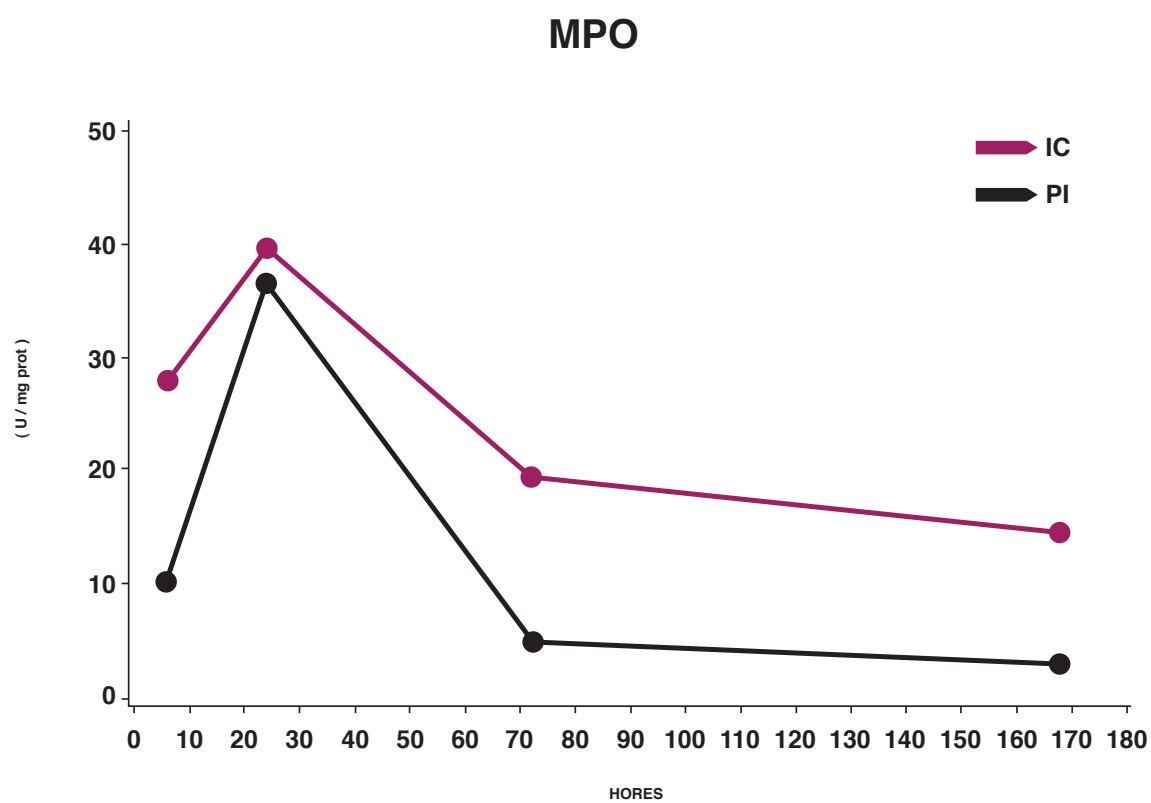
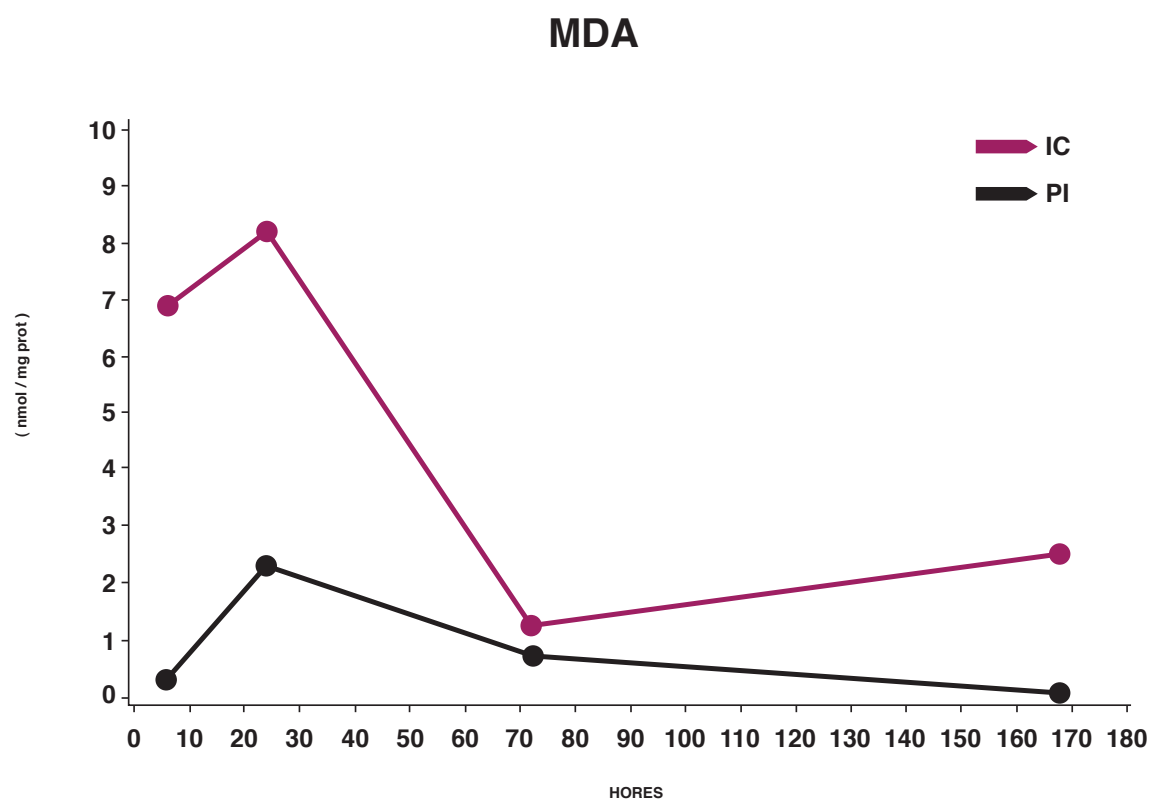


Figura 36 i 37. Evolució en el temps de MDA i MPO segons el grup experimental i el moment del sacrifici.

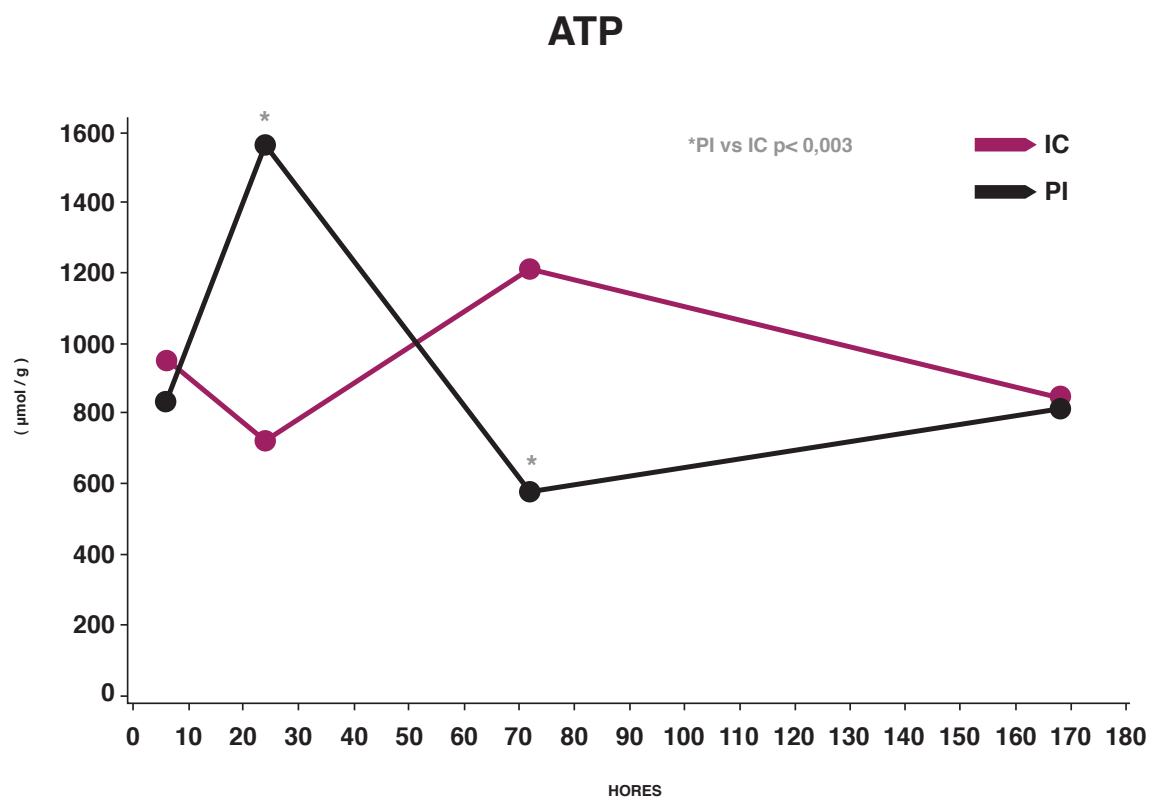


Figura 38. Evolució en el temps d'ATP segons el grup experimental i el moment del sacrifici.

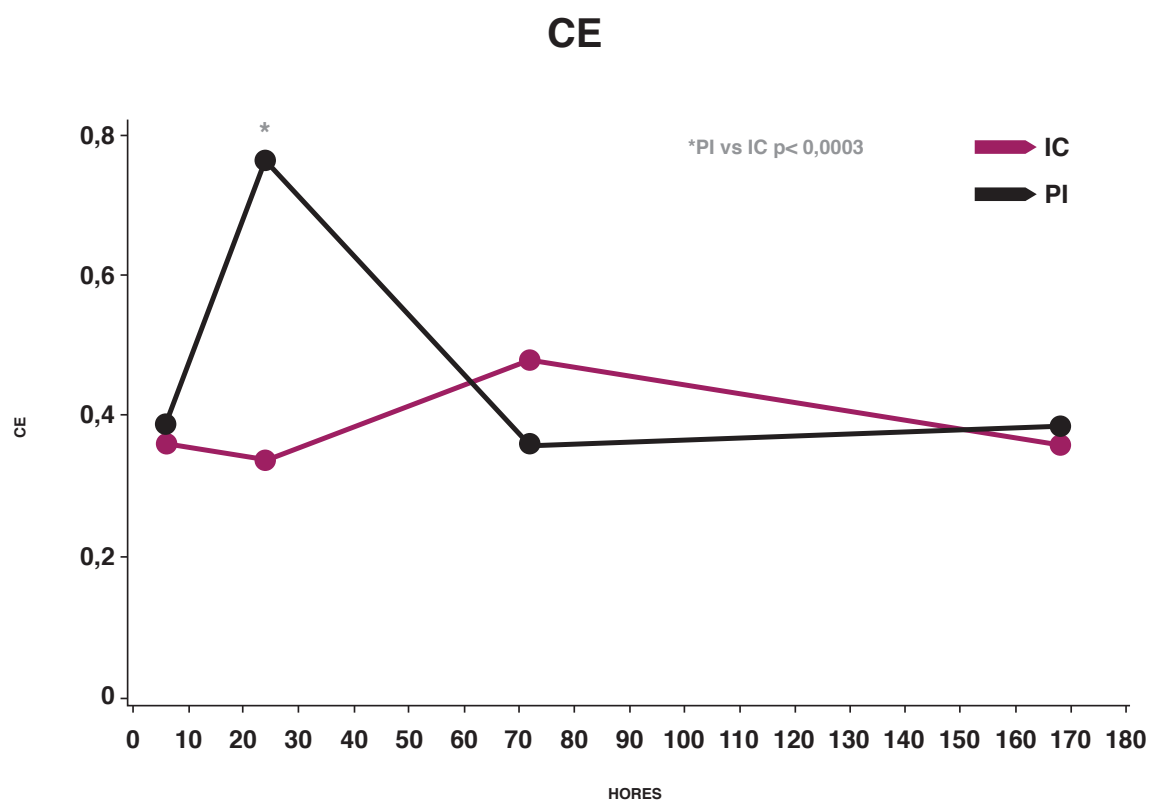


Figura 39. Evolució en el temps de la CE segons el grup experimental i el moment del sacrifici.

IL-6

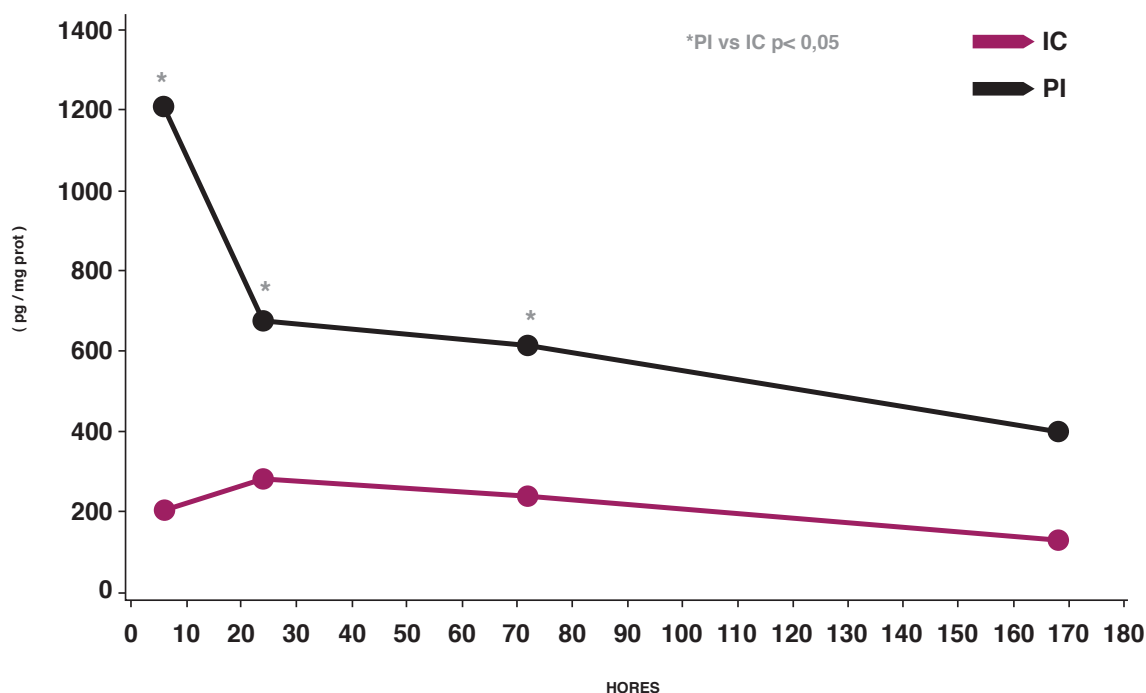


Figura 40. Evolució en el temps d'IL-6 segons el grup experimental i el moment del sacrifici.

Interleucina 10 (IL-10)

Pel que fa referència a la IL-10 els valors eren estadísticament inferiors al grup PI enfront el grup IC a les 6 i 24 h, sent similars a la resta de moments (figura 41).

Factor de necrosi tumoral α (TNF- α).

Només als 3 dies existien diferències significatives entre el grup PI i el grup IC, sent similars a la resta de moments estudiats (figura 42).

4.10. EFECTE DEL PRECONDICIONAMENT ISQUÈMIC SOBRE LA REGENERACIÓ HEPÀTICA ENFRONT IC

Factor de creixement transformant- β (TGF- β)

Als 3 dies, existien diferències significatives del grup PI enfront el grup IC, sent similars a la resta de moments estudiats (figura 43).

Factor de creixement hepatocitari (HGF)

L'estudi evolutiu d'HGF va evidenciar uns valors superiors en el grup PI amb un descens progressiu en ambdós grups a partir de les 24 hores (figura 44).

Índex de proliferació cel·lular (PCNA)

En l'estudi evolutiu del PCNA es va evidenciar, en el grup PI un pic de PCNA a les 24 h amb un descens posterior mentre que el grup IC el mostrava als 3 dies el pic màxim amb un descens progressiu posterior (figura 45).

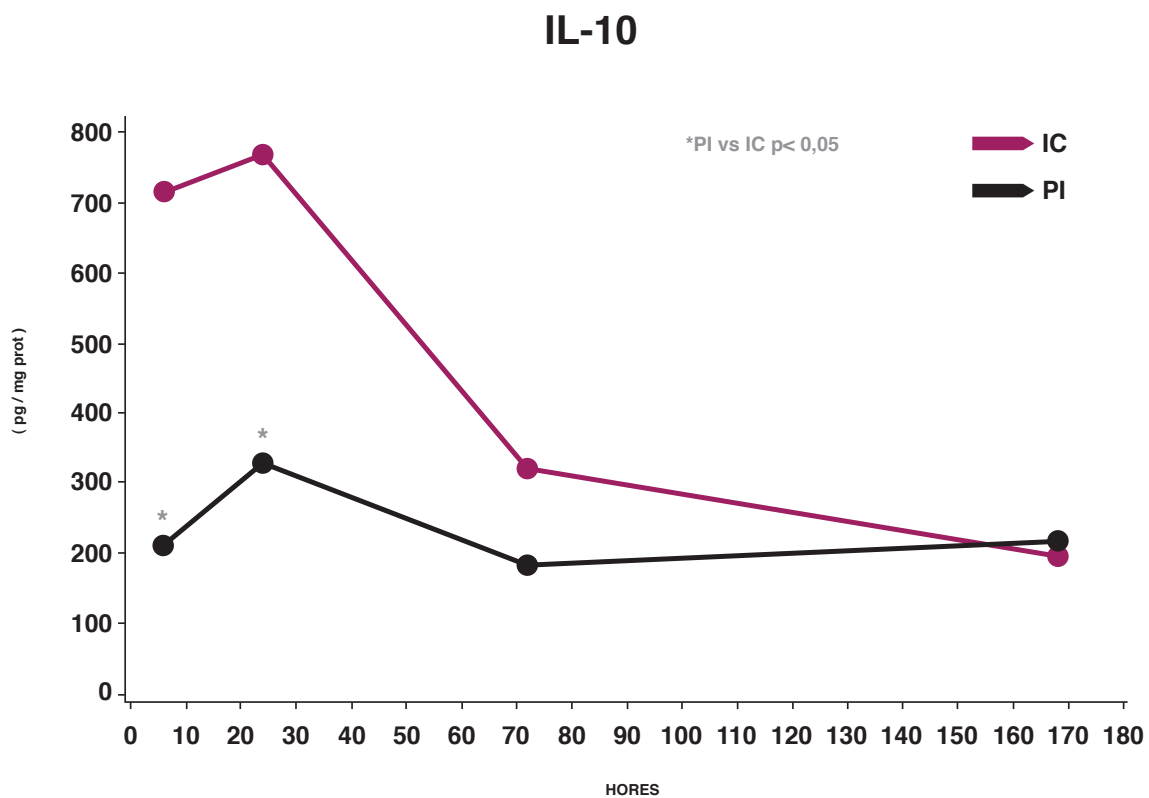


Figura 41. Evolució en el temps d' IL-10 segons el grup experimental i el moment del sacrifici.

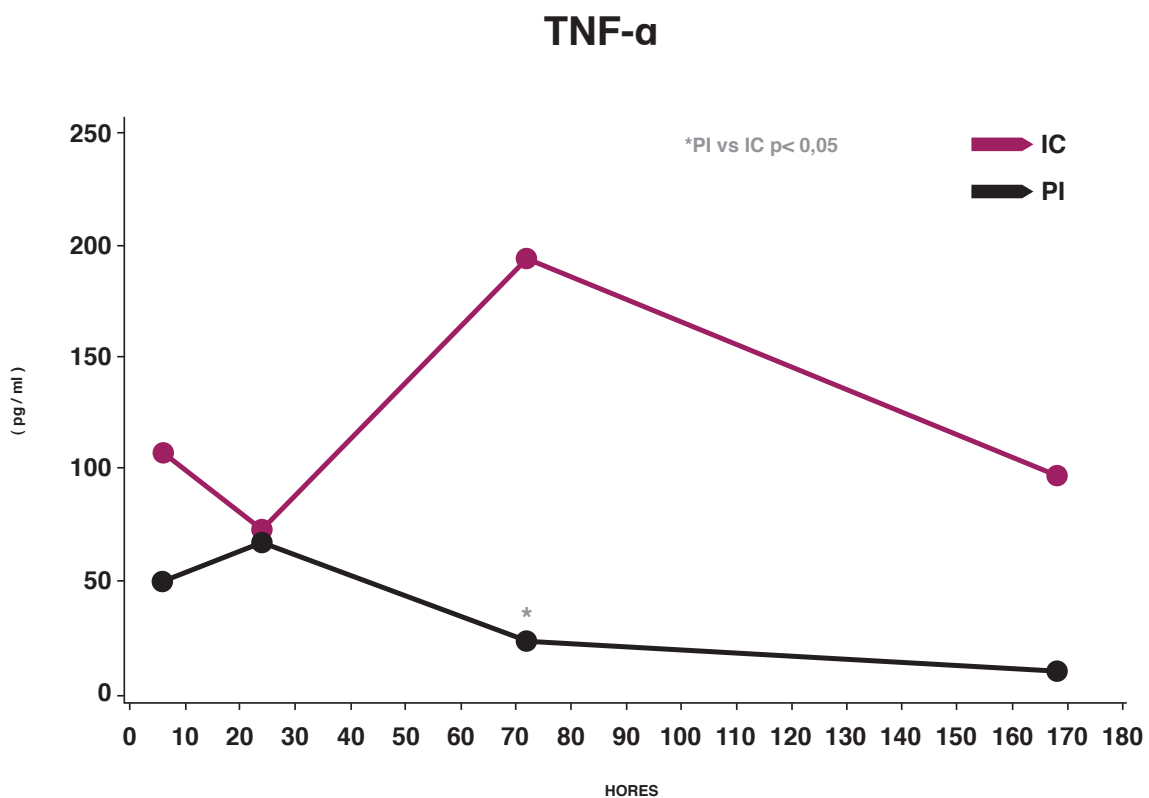


Figura 42. Evolució en el temps de TNF- α segons el grup experimental i el moment del sacrifici.

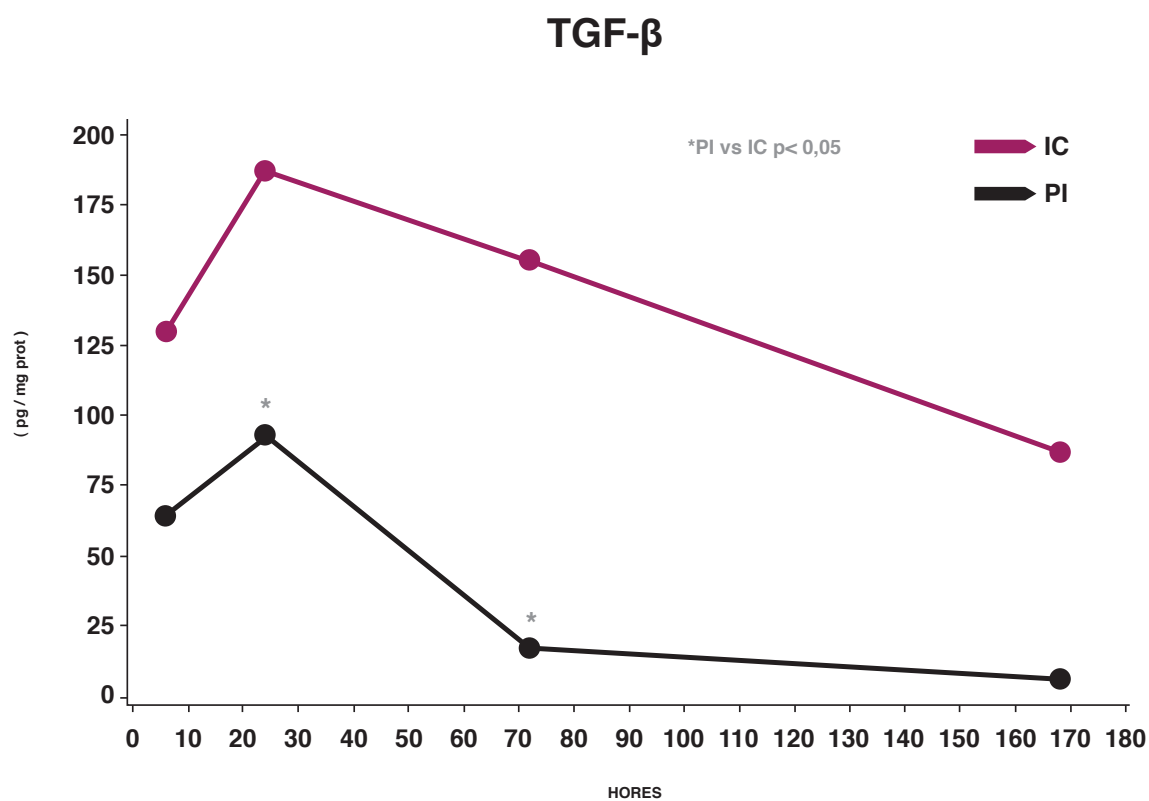
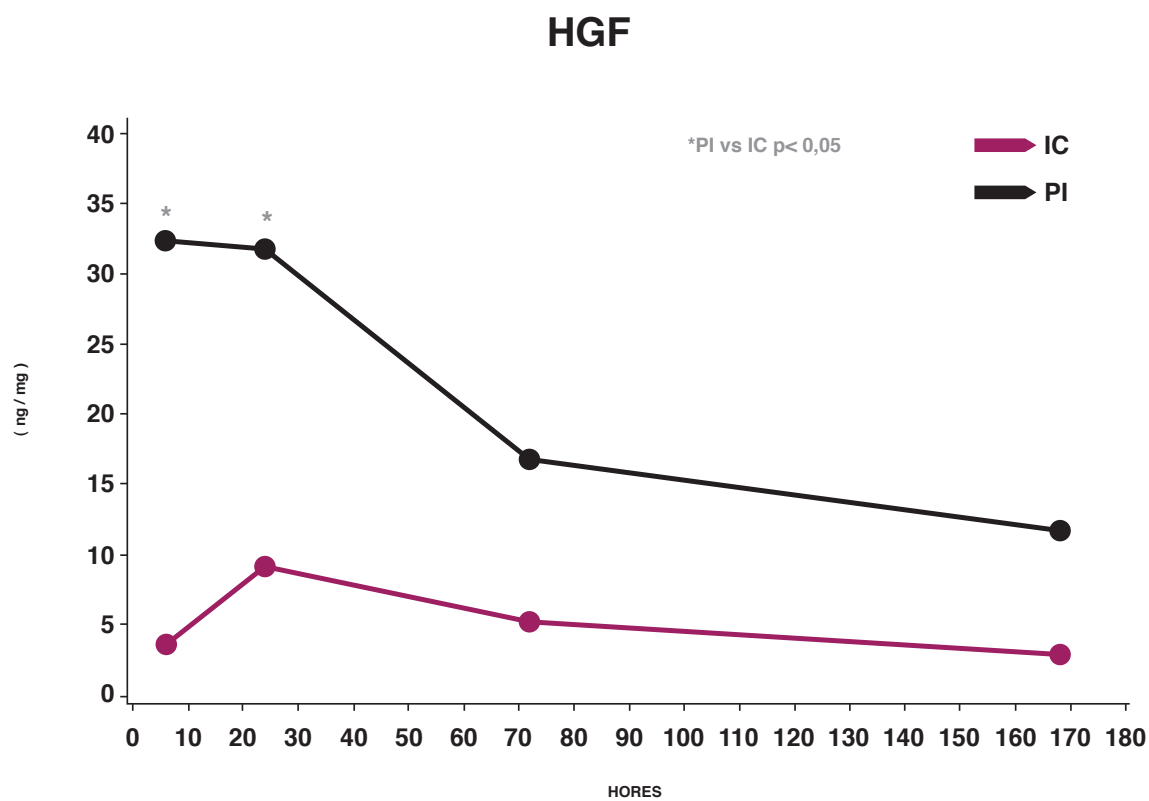
Figura 43. Evolució en el temps de TGF- β segons el grup experimental i el moment del sacrifici.

Figura 44. Evolució en el temps del HGF segons el grup experimental i el moment del sacrifici.

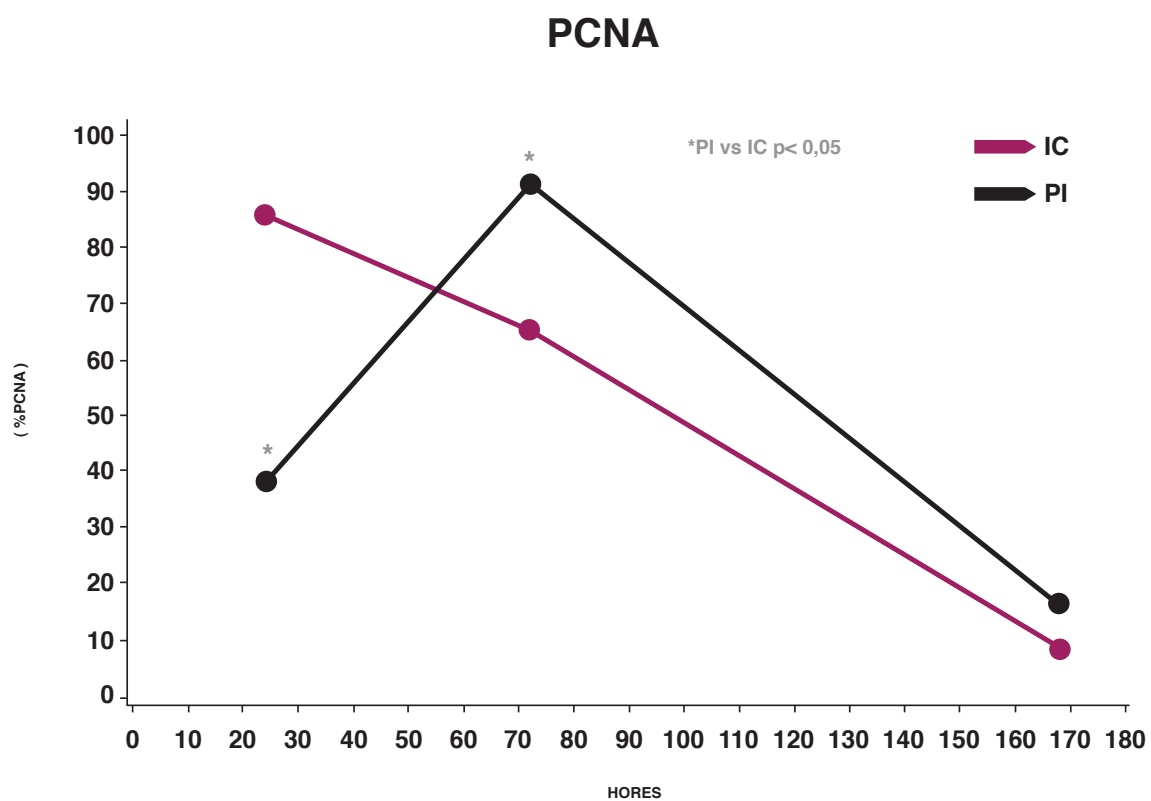


Figura 45. Evolució en el temps del HGF segons el grup experimental i el moment del sacrifici.

5.DISCUSSIÓ

5.1. EFECTE DEL PRECONDICIONAMENT ISQUEMIC SOBRE LA LESIÓ HEPÀTICA

En el nostre estudi, el preconditionament isquèmic demostra la seva capacitat per disminuir la lesió hepatocitària mesurada pels nivells de transaminases -AST i ALT, fet que referma la validesa del model utilitzat i és consistent amb les troballes d'altres estudis experimentals que apliquen diferents períodes d'isquèmia ^(104,113).

Pel que fa als treballs publicats en rosegadors que estudien l'efecte del PI sobre la lesió hepàtica, la majoria apliquen també 10 minuts d'isquèmia seguits de 10 minuts de reperfusió però posteriorment apliquen uns temps d'isquèmia superiors als nostres ^(126,127). Encara que, en la major part dels estudis la isquèmia és parcial i realitzen les determinacions als 90 minuts de reperfusió ^(87,107). Això és degut a que aquests estudis pretenen forçar el model amb la intenció de poder descriure els mecanismes pel quals el PI ofereix l'efecte protector sobre la lesió hepàtica. El nostre model, molt més proper a les condicions clíniques, també obté resultats en el mateix sentit, pel que fa a la lesió hepàtica, fet del que es podria deduir que els mecanismes pels quals s'assoleix l'efecte beneficiós deuen ser similars. Pel que fa al període de PI a aplicar, alguns autors defensen que existeixen períodes de preconditionament específics segons el percentatge de parènquima clos i la durada de la isquèmia hepàtica ⁽¹²⁸⁾.

L'efecte que el PI comporta ha estat àmpliament estudiat. Darrerament, s'han tro-

bat diferències en quant a la protecció depenent de l'edat de l'animal. Selzner i col·laboradors ⁽¹²⁶⁾ en un model experimental d'isquèmia parcial (70%) durant 60 minuts, troben diferències en la protecció sobre la lesió hepàtica que ofereix el preconditionament isquèmic, tal i com nosaltres l'apliquem, en funció de la edat de l'animal. Atribueixen aquestes diferències a una disminució dels nivells d'ATP i del glicogen en les rates adultes, i conclouen que en els animals joves el PI els protegeix, fet que queda demostrat al disminuir les transaminases.

En un estudi dut a terme per Peralta i col·laboradors ⁽⁸⁷⁾ utilitzant un model similar al nostre, en el grup al que s'aplicava un temps d'isquèmia de 15 minuts després d'aplicar el PI, no troben diferències en els valors de transaminases respecte als animals en que no s'aplicava el PI. En aquest cas, les determinacions dels enzims hepàtics es van fer als 90 minuts de reperfusió, i potser aquest termini és massa curt per posar en evidència la lesió hepàtica en forma de nivells sèrics de d'ALT o AST. En el nostre estudi queda ben clar, que a les 6 hores els nivells sèrics de transaminases són significativament més baixos al grup d'animals sotmesos a PI.

Aprofundint en els nostres resultats, veiem que el pic màxim d'AST en el fetge isquèmic és entre les 6-24 h de reperfusió presentant un descens progressiu fins arribar a valors normals entre el 3er. i el 7è. dia, resultats similars han trobat Yamada i col·laboradors ⁽¹²⁷⁾ quan apliquen

40 minuts d'isquèmia després del PI. Ells troben relació entre el temps d'isquèmia aplicada, el pic màxim d' ALT i el temps de retorn al seu valor basal . S'ha de dir però que quan apliquen major temps d'isquèmia, és a dir, per sobre de 60 minuts, el PI no va mostrar protecció enfront la lesió hepàtica.

En humans, Clavien i col·laboradors van ser els primers que van mostrar que el PI disminueix la lesió per I/R després d'una resecció hepàtica⁽¹⁰⁹⁾. Posteriorment s'han publicat altres estudis randomitzats sobre PI en humans. Entre els més destacables en trobem 6 que apliquen PI en hepatectomies i 5 en trasplantament hepàtic. Respecte a la resecció hepàtica, diversos estudis constaten la efectivitat del PI (10 minuts d'isquèmia seguits de 10 minuts de reperfusió) enfront la lesió per I/R hepàtica utilitzant uns temps d'isquèmia similars als nostres i obtenint uns resultats similars^(19, 109-111,129).

Existeixen, però dos estudis randomitzats en que els nivells d'AST van ser discretament superiors en els fetges precondicionats respecte als no precondicionats, sense que aquestes diferències fossin significatives^(112,130). Un dels estudis compara el grup PI enfront l'oclusió intermitent⁽¹¹²⁾ mentre que l'altre ho fa contra un grup sotmès a exclusió vascular total⁽¹³⁰⁾. En l'estudi de Petrowsky i col·laboradors⁽¹¹²⁾ el fet d'aplicar el PI va comportar una menor pèrdua sanguínia i un temps de transecció de parènquima més curt. D'altra banda, existeix un estudi clínic en

que l'aplicació del PI enfront l' oclusió intermitent mostra uns resultats similars quan s'aplica una isquèmia curta però, l'oclusió intermitent va mostrar una major protecció si la isquèmia aplicada posteriorment superava els 40 minuts⁽¹³¹⁾.

Pel que fa referència al camp del trasplantament hepàtic, tot i que, resultats preliminars experimentals han suggerit beneficis del PI en el trasplantament hepàtic, l'aplicació clínica han mostrat resultats controvertits. Existeixen varis estudis clínics, alguns d'ells mostren que el PI millora la funció hepàtica mesurada amb els nivells de transaminases^(120,132-134), altres creuen que tot i que, millora la tolerància a la isquèmia, empitjora la funció primària de l'empelt⁽¹³⁴⁾. I per últim, altres creuen que el PI no comporta cap milloria i els nivells de transaminases són més alts en el grup precondicionat⁽¹³⁵⁾ sense que això esdevingui conseqüències clíniques adverses.

5.2. EFECTE DEL PRECONDICIONAMENT ISQUÈMIC SOBRE L'ESTRÈS OXIDATIU

No s'ha pogut demostrar cap efecte del PI sobre l'estrès oxidatiu, mesurat per l'activitat malondialdehid o l'activitat mieloperoxidasa. Altres estudis han demostrat variacions a aquest nivells amb grup d'animals sotmesos a precondicionament isquèmic^(107,136), el nostre disseny té diferències substancials que podrien explicar aquestes troballes. Ara bé, aquests estudis s'han fet en el camp del trasplantament d'òrgans, on els temps

d'isquèmia són molt més llargs –en molts casos arribant a les 24 hores-. Pel contrari, en el nostre disseny experimental el temps d'isquèmia es molt curt, pràcticament inexistent, motiu pel qual pensem que el preconditionament isquèmic ha estat incapaç de modificar els paràmetres d'estrès oxidatiu.

5.3. EFECTE DEL PRECONDICIONAMENT ISQUÈMIC SOBRE LA RESERVA ENERGÈTICA

L'aplicació del PI va mostrar una petita millora sobre els paràmetres de reserva energètica (ATP i CE) igual que d'altres estudis que apliquen majors temps d'isquèmia ^(120,137). Contràriament, Peralta i col·laboradors van trobar que als animals als que s'aplicava el PI presentaven nivells molt més alts d'ATP que els animals controls encara que les determinacions es realitzaven a una fase de reperfusió precoç ⁽¹³⁸⁾ mentre que nosaltres la primera determinació es realitza a les 6 hores.

Els mecanismes pels qual el preconditionament isquèmic dóna lloc a la preservació d'ATP no estan ben establerts. Nivells baixos d'ATP i CE indiquen una lesió isquèmica greu i poden predisposar a uns pobres resultats funcionals o bé, a un curs postoperatori complicat ⁽¹³⁹⁾. El PI durant la isquèmia sostinguda és capaç de reduir la degradació d'ATP i la glucòlisi, així com, disminuir la formació d'àcid làctic. De fet alguns autors creuen que la preservació d'ATP resulta de la disminució de l'ús, suggerint que el precondi-

cionament podria promoure mecanismes d'estalvi d'energia ⁽¹³⁹⁾.

En el nostre estudi hem trobat que el grup RH mostra uns valors d'ATP estadísticament superiors respecte als altres dos grups (PI i RHPR), excepte a les 24 h on el grup PI mostra uns valors superiors d'ATP respecte a RH, RHPR i a IC, resultats similars als trobats a un estudi de Ofluoglu i col·laboradors ⁽¹⁴⁰⁾ que només estudien els valors d'ATP i CE a les 24 hores de reperfusió.

Pel que fa a la CE, el grup PI mostra uns valors superiors respecte al grup RH, RHPR i al grup IC només 24 hores. És a dir, en els moments més propers a l'aplicació de la isquèmia, de forma similar a altres estudis ⁽¹³⁸⁾. Així doncs, només trobem diferències pel que fa a la reserva energètica en les primeres 24 h de la reperfusió. El que hem pogut observar és que segons els canvis en les concentracions d'ATP en el teixit hepàtic, la càrrega energètica en el fetge mostra una millor recuperació en el grup al que se li aplica el preconditionament isquèmic.

Resultats similars als nostres ha trobat Franco-Gou i col·laboradors ⁽¹³⁷⁾. Ells no van trobar diferències en el metabolisme energètic (ATP, nucleòtids de l'adenina, ATP/ADP i càrrega energètica) en els animals preconditionats enfront els no preconditionats, i això podria ésser degut als diferents models experimentals utilitzats en els diferents estudis.

Una possible explicació d'aquesta diferència de resultats amb altres autors pot ser degut a que els grups que presenten una major regeneració hepàtica consumeixen més ATP, tot i que inicialment els nivells són més elevats tant de CE com d'ATP al animals sotmesos a PI, a la part final de l'estudi disminueixen molt respecte al grup RH i RHPR.

5.4. EFECTE DEL PRECONDICIONAMENT ISQUÈMIC SOBRE LES CITOSINES

Encara que no s'han detectat diferències en l'estrès oxidatiu, sí que s'han detectat diferències a alguns marcadors d'activitat inflamatòria, e indirectament de regeneració, com poden ser les interleucines 6 i 10 i el factor de necrosi tumoral- α .

Pel que fa referència a la IL-6 els nivells tissulars a les 6 h són significativament superiors en el grup d'animals sotmesos a preconditionament enfront el grup RH i RHPR, mentre que a les 24 h només es mantenen aquestes diferències enfront el grup RH. Són resultats similars als trobats per d'altres autors^(139,140) que ja havien suggerit que IL-6 atenua la lesió hepàtica en rosegadors⁽¹⁴¹⁾. La IL-6 té propietats antiinflamatòries probablement relacionades amb una reducció de l'alliberació de TNF- α ⁽¹²⁵⁾ però també és un important mediador de proliferació hepatocitària^(113,125). Existeixen estudis en models d'hepatectomia parcial que han demostrat que l'inici de la resposta regenerativa depèn d'una activació precoç dels factors de transcripció IL-6 i TNF- α ^(142,143).

Crida l'atenció que tots els grups menys el grup RH tenen el pic màxim de IL-6 a les 24 hores per anar disminuint posteriorment, mentre que el grup RH que té el pic màxim als 7 dies. Una possible hipòtesi que explicaria aquest fet, és que donat que la regeneració hepàtica depèn d'una activació de l'IL-6, els grups que presenten una regeneració hepàtica major inicial, són els que també tenen una elevació més precoç d'aquesta interleucina. Contràriament, el grup RH que té una elevació de la IL-6 més tardana també presenta la regeneració hepàtica més tardanament.

Pel que fa referència a IL-10, els nostres resultats no són consistents amb els trobats per d'altres autors⁽¹⁴³⁾ que apliquen majors temps d'isquèmia. En el nostre cas, els nivells d'IL-10 són significativament més baixos al grup PI quan es comparen amb els obtinguts a la resta de grups (RH,RHPR,IC), sent aquestes diferències significatives amb tots els grups a les 24h.

La IL-10 és una citosina antiinflamatòria important per la supervivència dels animals⁽¹⁴⁴⁾ però només existeix un estudi experimental que tracta de l'efecte de l'IL-10 endògena sobre la lesió per I/R⁽¹⁴⁵⁾. Una de les funcions d'aquesta citosina és la inhibició del factor de transcripció NF- κ B mentre que el PI a llarg termini activa aquest factor de transcripció. Podria ser doncs, que el PI activés NF- κ B mitjançant la inhibició de IL-10.

En el cas de TNF- α , si bé està ben establert el seu paper perjudicial en la lesió per I/R hepàtica, tan local com sistèmica. S'ha observat que aquest mediador és vital en processos de regeneració hepàtica⁽¹¹⁶⁾. Després d'un període d'I/R es produeix un augment d'aquesta citosina a les 6 i 24 h⁽¹⁴⁶⁾.

Els animals sotmesos a PI en el nostre estudi mostren una disminució dels nivells d'aquesta citosina gairebé en tots els moments de l'estudi, igual que han trobat altres autors^(140,141). De fet estudis duts a terme en models d'isquèmia normotèrmica hepàtica indiquen que el PI, redueix la lesió hepàtica i pulmonar associada a la I/R⁽¹¹⁶⁾.

Per altra banda, la restauració de la massa hepàtica després d'una hepatectomia parcial del 70% esta controlada per una complexa interrelació de citosines, factors de creixement i de l'estat metabòlic. Dos reguladors d'aquest escenari de regeneració hepàtica reconeguts són les citosines IL-6 i TNF- α ^(113,147).

Clavien i col·laboradors en un dels seus estudis reconeixien que nivells alts de IL-6 després d'una resecció hepàtica en humans es correlacionaven amb uns nivells de transaminases més baixos i uns resultats beneficiosos⁽¹⁴⁸⁾. Alguns estudis mostren que IL-6 és necessària per la inducció de la regeneració hepàtica in vivo, i aquest efecte és depenent de TNF- α que actua com a mediador.

La IL-6 actua directament en els hepatòcits induint la senyal transductora i acti-

vadora de transcripció-3 (STAT-3) al nucli causant una activació genètica primerenca i la mitosi⁽¹⁴⁹⁾. L'activació d'STAT-3 per IL-6 inicia una cascada d'esdeveniments que porten a la progressió a través del cicle cel·lular culminant en la síntesi de ADN i posterior mitosi cel·lular⁽¹²⁵⁾.

Per tant, es fa evident que el preconditionament millora la resposta inflamatòria, i que d'aquesta forma s'afavoreix la regeneració hepàtica.

5.5. EFECTE DEL PRECONDICIONAMENT ISQUÈMIC SOBRE LA REGENERACIÓ HEPÀTICA

Una troballa sorprenent del nostre estudi ha estat el diferent comportament del dos factors de creixement analitzats, TGF- β i HGF. Per una banda, el PI sembla disminuir la presència de factor de creixement transformador- β (TGF- β), encara que el factor de creixement hepàtic (HGF), té un comportament diametralment oposat. Nombrosos estudis han demostrat que el HGF promou la regeneració hepàtica^(150,151). Yamada et al⁽¹²⁷⁾ van ser els primers que van mostrar que el PI té la capacitat d'augmentar la regeneració hepàtica del fetge.

El que és ben evident és que els nivells de factor de creixement hepàtic, un factor de creixement molt més específic són sempre superiors en el grup d'animals preconditionats i aquesta dada es manté al llarg de tot l'estudi.

Potser la troballa més sòlida d'aquest estudi es la notable diferència en el percentatge d'activitat de l'antigen de proliferació cel·lular en els grups estudiats. De forma molt homogènia, en tots els animals sotmesos a preconditionament isquèmic el percentatge d'activitat de l'antigen de proliferació cel·lular és significativament superior als 3 i 7 dies, que el trobat en els animals no preconditionats. Resultats similars són trobats a altres estudis en que es van aplicar temps d'isquèmia més llargs ^(152,153). Contràriament als nostres resultats, existeix un estudi experimental en el camp del transplantament hepàtic que mostra uns resultats totalment oposats als nostres, donat que l'aplicació del PI va comportar una menor regeneració hepàtica i una menor activitat en el PCNA ⁽¹⁵⁴⁾.

Sabem, que l'estat energètic de la cèl·lula és un factor que influeix en la capacitat regenerativa del fetge, donat que resultats obtinguts en un model d'hepatectomia parcial van mostrar que la regeneració hepàtica estava fortament lligada als nivells d'ATP del fetge remanent. Però al nostre model les diferències amb els nivells d'ATP i de la CE són mínimes, pel que, segurament existeixen altres vies que afavoreixen la regeneració hepàtica, com han suggerit Franco-Gou i cols ⁽¹³⁷⁾.

El TGF- β és un inhibidor de la síntesi de ADN hepatocitari i antagonitza els efectes estimuladors del HGF durant la regeneració hepàtica in vitro i en models experimentals d'hepatectomia parcial ^(122,155).

També s'ha de dir, que alguns estudis han demostrat que l'administració intravenosa de TGF- β inhibeix la fase precoç de la regeneració hepàtica després d'una hepatectomia en rosegadors.

Hi ha autors però, que han trobat un efecte negatiu del PI sobre la regeneració hepàtica després d'una hepatectomia parcial del 70% amb un temps d'isquèmia total de 30 minuts ⁽¹¹⁴⁾. Aquests resultats s'han volgut explicar per la congestió esplàncnica que comporta l'oclusió total del pedicle portal, hipòtesi que no podem corroborar amb el nostre estudi donades les nostres troballes.

Així doncs, una dada que s'obté del nostre estudi és que el preconditionament isquèmic podria induir la regeneració hepàtica, mesurada per la activitat del factor de creixement hepàtic i per l'activitat de l'antigen de proliferació nuclear (PCNA). Encara que aquestes troballes són evidents, queden per aclarir quins són els mecanismes pels quals es produeix aquest efecte.

6. CONCLUSIONS

Les conclusions de la present tesi són que en un model experimental de resecció hepàtica del 70 % el preconditionament isquèmic:

- 1.** Protegeix enfront la lesió per I/R hepàtica.
- 2.** Modula la resposta inflamatòria al llarg de tot l'estudi.
- 3.** Afavoreix la regeneració hepàtica activant el factor de creixement hepàtic i accelerant la proliferació cel·lular.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Zakim, Boyer. Hepatology. A textbook of liver disease, 4th ed. Philadelphia: Saunders Ed, 2003.
2. Sherlock S, Dooley J. Diseases of the liver and biliary system. Blackwell Publishing 11th ed, 1998.
3. Fawcett DW. Tratado de Histología, 12^a ed. Ed. McGraw-Hill Interamericana, Madrid, 1997.
4. Arias, Boyer, Fausto, Jakoby Schaeter Shafritz. The liver biology and pathobiology, 3 ed. Raven Press Ed. 1994.
5. Couinaud C. Lobes et segments hépatiques notes sur architecture anatomique et chirurgicale du foie. Presse Med 1954;62:709.
6. Cunningham JD, Fong Y, Shriver C, Melendez J, Marx WL, Blumgart LH. One hundred consecutive hepatic resections. Arch Surg 1994;129:1050-56.
7. Figueras J, Lladó L, Ruiz D et al. Complete versus selective portal triad clamping for minor liver resections: a prospective randomized trial. Ann Surg 2005;241:582-590.
8. Azoulay D, Castaing D, Smail A et al. Resection of nonresectable liver metastases from colorectal cancer after percutaneous portal vein embolization. Ann Surg 2000; 231:480-486.
9. Nordlinger B, Guiguet M, Vaillant JC et al. Surgical resection of colorectal carcinoma metastases to the liver. A prognostic scoring system to improve case selection, based on 1568 patients. Association Francaise de Chirurgie. Cancer 1996;77:1254-1262.
10. Jarnagin W, Gonen M, Fong Y et al. Improvement in perioperative outcome after hepatic resection. Analysis of 1803 consecutive cases over the past decade. Ann Surg 2002;236:397-407.
11. Makuuchi M, Takayama T, Gunven P, Kosuge T, Yamazaki S, Hasegawa H. Restrictive versus liberal blood transfusion policy for hepatectomies in cirrhotic patients. World J Surg 1989;13:644-648.
12. Kooby DA, Stockman J, Ben-Porat L et al. Influence of transfusions on perioperative and long-term outcome in patients following hepatic resection for colorectal metastases. Ann Surg 2003; 237:860-870.
13. Gascon P, Zoumbos NC, Young NS. Immunological abnormalities in patients receiving multiple blood transfusions. Ann Intern Med 1984;100:173-177.
14. Asahara T, Katayama K, Itamoto T et al. Perioperative blood transfusion as a prognostic indicator in patients with hepatocellular carcinoma. World J Surg 1999;23:676-680.
15. Figueras J, Perea MT, Ramos E et al. ¿Es posible realizar las resecciones hepá-

- ticassintransfusión? *Cir Esp* 1998;64:429-432.
16. DeMatteo RP, Palese C, Jarnagin WR, Sun R, Blumgart L, Fong Y. Anatomic segmental hepatic resection is superior to wedge resection as an oncologic operation for colorectal liver metastases. *J Gastrointest Surg* 2000; 4:178-184.
17. Malassagne B, Cherqui D, Alon R, Bruneti F, Humeres R, Fagniez PL. Safety of selective vascular clamping for major hepatectomies. *J Am Coll* 1998;187: 482-486.
18. Pringle JH. Notes on the arrest of hepatic hyemorrhage due to trauma. *Ann Surg* 1908;48:540-541.
19. Choukèr A, Schachtner T, Schauer R et al. Effects of Pringle manoeuvre and ischemic preconditioning on haemodynamic stability in patients undergoing elective hepatectomy: a randomized trial. *British Journal of Anaesthesia* 2004;93:204-211.
20. Jaeschke H. Molecular mechanism of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;284:G15-G26.
21. Capussotti L, Muratore A, Ferrero A, Massuco P. Randomized clinical trial of liver resection with and without hepatic pedicle clamping. *Br J Surg* 2006;96:685-689.
22. Kwan M, Sheung-Tat Fan, Irene OL et al. Prospective evaluation of Pringle maneuver in hepatectomy for liver tumors by a randomized study. *Ann Surg* 1997; 226:704-713.
23. Smyrniotis V, Farantos Ch, Kostopanagiotou G, Arkadopoulos N. Vascular control during hepatectomy: Review of methods and results. *World J Surg* 2005;29:1384-1396.
24. Belghiti J, Noun R, Zante E, Ballet T and Sauvanet A. Portal triad clamping or hepatic vascular exclusion for major liver resection: a controlled study. *Ann Surg* 1996;224:155-161.
25. Hannoun L, Borie D, Delva E et al. Liver resection with normothermic ischaemia exceeding 1h. *Br J Surg* 1993;80:1161-1165.
26. Huguet C, Gavelli A, Addario Chieco A et al. Liver ischemia for hepatic resection: where is the limit? *Surgery* 1992;111:251-259.
27. Delva E, Camus Y, Nordlinger B et al. Vascular occlusions for liver resections. Operative management and tolerance to hepatic isquèmia: 142 cases. *Ann Surg* 1989;209:211-218.
28. Arnoletti JP, Brodsky J. Reduction of transfusion requirements during major hepatic resections for metastatic disease. *Surgery* 1999;125:166-171.
29. Belghiti J, Noun R, Malafosse R et al. Continuous versus intermittent portal triad

- clamping for liver resection: A controlled study. *Ann Surg* 1999;229:984-992.
30. Rüdiger MD, Kang MD, Sindram D, Riehle H, Clavien PA. Comparison of Ischemic Preconditioning and intermittent and continuous inflow occlusion in the murine liver. *Ann Surg* 2002; 235:400-407.
31. Elias F, Desruennes E, Lasser P. Prolonged intermittent clamping of the portal triad during hepatectomy. *Br J Surg* 1991;78:42-44.
32. Makuchii M, Mori T, Gunven P, Yamazaki S, Hasegawa H. Safety of hemihepatic vascular occlusion during resection of the liver. *Surg Gynecol Obstet* 1987; 164:155-158.
33. Katsuhiko Y, Takashi N, Mitsuo S, Keizo S. Alternate hemihepatic vascular control technique for hepatic resection. *Am J Surg* 1993;365-366.
34. Nishizaki T, Matsumata T, Yanaga K et al. Management of hepatic duct injury during hemihepatic vascular occlusion. *Br J Surg* 1996; 83:185.
35. Castaing D, Garden OJ, Bismuth H. Segmental liver resection using ultrasound-guided selective portal venous occlusion. *Ann Surg* 1989;210:20-23.
36. Huguet C, Addario-Chieco P, Gaveilli A, Arrigo E, Harb J, Clement RR. Technique of hepatic vascular exclusion for extensive liver resection. *Am J Surg* 1992;163:602-605.
37. Smyrniotis V, Kostopanagiotou G, Gamaletsos E et al. Total versus selective hepatic vascular exclusion in major liver resections. *Am J Surg* 2002;183:173-178.
38. Lentsch AB, Kato A, Yoshidome H, McMasters KM, Edwards MJ. Inflammatory mechanisms and therapeutic strategies for warm hepatic ischemic/reperfusion injury. *Hepatology* 2000;32:169-173.
39. Lemasters JJ, Thurman RG. Reperfusion injury after liver preservation for transplantation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1997;37:327-33.
40. Teoh N, Farrell G. Hepatic ischemia reperfusion injury: Pathogenic mechanisms and basis for hepatoprotection. *J Gastroenterol and Hepatol* 2003;18:891-902.
41. Grace PA. Ischaemia-reperfusion injury. *Br J Surg* 1994;81:637-647.
42. Massip-Salcedo M, Rosselló-Catafau J, Prieto J, Avila MA and Peralta C. The response of the hepatocyte to ischemia. *Liver Int* 2007;27 :6-16.
43. Parks DA, Granger DN. Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation. *Am J Physiol* 1986;250:G749-753.
44. Menger MD, Steiner D, Messmer K.

- Microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle: significance of "no reflow". *Am J Physiol* 1992;263:H1892-H1900.
45. Kerrigan CL, Scotland MA. Ischemia reperfusion injury: a review. *Microsurgery* 1993;14:165-75.
46. Harvey PR, Iu S, McKeown CM, Petrunka CN, Ilson RG and Strasberg SM. Adenine nucleotide tissue concentrations and liver allograft viability after cold preservation and warm ischemia. *Transplantation* 1988;45:1016-20.
47. Serracino-Inglott F, Habib NA, Mathie RT. Hepatic ischemia-reperfusion injury. *Am J Surg* 2001;181:160-166.
48. Jennische E. Possible influence of glutathione on post-ischemic liver injury. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand* 1984;92:55-64.
49. Grande L, Rosselló-Catafau J, Peralta C. El preacondicionamiento isquémico del hígado: de las bases moleculares a la aplicación clínica. *Cir Esp* 2006;80:275-82.
50. Gonzalez-Flecha B, Cutrin JC, Boveris A. Time course and mechanism of oxidative stress and tissue damage in rat liver subjected to in vivo ischemia-reperfusion. *J Clin Invest* 1993; 91:456-464.
51. Jaeschke H, Farhood A. Neutrophil and Kupffer cell-induced oxidant stress and ischemia-reperfusion injury rat liver. *Am J Physiol* 1991;260:G355-362.
52. Cutrin JC, Boveris A, Zingaro B, Corvetti G and Poli G. In situ determination by surface chemiluminescence of temporal relationships between evolving warm ischemia reperfusion injury in rat liver and phagocyte activation and recruitment. *Hepatology* 2000;31:622-632.
53. Bilzer M, Lauterburg BH. Oxidant stress and potentiation of ischemia/reperfusion injury to the perfused rat liver by human polymorphonuclear leukocytes. *J Hepatol* 1994;20:473-477.
54. Vollmar B, Richter S, Menger MD. Leukocyte stasis in hepatic sinusoids. *Am J Physiol* 1996;270:G798-803.
55. Colletti LM, Kunkel SL, Walz A et al. The role of cytokine networks in the local liver injury following hepatic ischemia/reperfusion in the rat. *Hepatology* 1996;23:506-514.
56. Lee HT. Mechanisms of ischemic preconditioning and clinical implications for multiorgan ischemic-reperfusion injury. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 1999;13;78-91.
57. Jaeschke H. Reactive oxygen and ischemia/reperfusion injury on the liver. *Chem Biol Interact* 1991;79:115-136.
58. Welbourn CRB, Goldman G, Paterson IS, Valeri CR, Shepro D and Hechtman HB. Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury central role of neutrophil. *Br*

- J Surg 1991;78:651-655.
59. Yamada S, Idia T, Tabata T et al. Alcoholic fatty liver differentially induces a neutrophil-chemokine and hepatic necrosis after ischemia-reperfusion in rat. *Hepatology* 2000;32:278-288.
60. Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *J Pathol* 2000;190:255-266.
61. Metzger J, Dore SP, Lauterburg BH. Oxidant stress during reperfusion of ischemic liver: no evidence for a role of xantine oxidase. *Hepatology* 1988;8:580-584.
62. Court FG, Wemyss-Holden SA, Dennison AR, Maddern GJ. The mystery of liver regeneration. *Br J Surg* 2002;89:1089-95.
63. Higgins GM, Anderson RM. Experimental pathology of the liver. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch Pathol* 1931;12:186-202.
64. Michalopoulos GK, DeFrances MC. Liver regeneration. *Science* 1997;276:60-66.
65. Diehl AM, Rai R. Review: regulation of liver regeneration by proinflammatory cytokines. *J Gastroenterol Hepatol* 1996;11:466-470.
66. Koniaris LG, McKillop IH, Schwartz SI, Zimmers TA. Liver regeneration. *J Am Coll Surg* 2003;197:634-659.
67. LaBrecque D. Liver regeneration: a picture emerges from the puzzle. *Am J Gastroenterol* 1994;89:S86-96.
68. Gove CD, Hughes RD. Liver regeneration in relationship to acute liver failure. *Gut* 1991;Suppl:92-96.
69. Nagasue N, Yukaya H, Ogawa Y, Kohno H, Nakamura T. Human liver regeneration after major hepatic resection. A study of normal liver and livers with chronic hepatitis and cirrhosis. *Ann Surg* 1987;206:30-39.
70. Fausto N. Hepatic regeneration. Zakim D, Boyer TD. *Hepatology. A Textbook of liver disease*. Vol.1. 2nd ed. Philadelphia, Pennsylvania: WB Saunders, 1990:49-65.
71. Maruyama H, Harada A, Kurokawa T et al. Duration of liver ischemia and hepatic regeneration after hepatectomy in rats. *J Surg Res* 1995;58(3):290-294.
72. Portugal V, Garcia Alonso I, Barceló P, Mendez J. Effect of allopurinol, folic acid, SOD and cyclosporine A on ischemic liver regeneration. *Eur Surg Res* 1995;27:69-76.
73. Fausto N. Liver regeneration. *J Hepatol* 2000;32 (1 Suppl):19-31.
74. Boulton R, Woodman A, Calnan D, Selden C, Tam F and Hodgson H. Nonparenchymal cells from regenerating rat liver generate interleukin-1 alpha and 1 Beta: a mechanism of negative regulation

- of hepatocyte proliferation. *Hepatology* 1997;26(1):49-58.
75. Rai RM, Lee FY, Rosen A et al. Impaired liver regeneration in inducible nitric oxide synthase-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95:13829-834.
76. Selzner N, Rudiger H, Graf R and Clavien PA. Protective strategies against ischemic injury of the liver. *Gastroenterology* 2003;125:917-936.
77. Clavien P, Emond J, Vauthey JN, Belghiti J, Chari R and Strasberg S. Protection of the liver during hepatic surgery. *J Gastrointest Surg* 2004;8:313-327.
78. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986;74:1124-1136.
79. Hotter G, Closa D, Prados M et al. Intestinal preconditioning is mediated by transient increase in nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;222:27-34.
80. Glazer SS, O'Rourke DM, Graham DI and Welsh FA. Induction of ischemic tolerance following brief focal ischemia in rat brain. *J Cereb Blood Flow Metabol* 1994;14:545-553.
81. Pang CY, Yang RZ, Zhong A, Xu N, Boyd B and Forrest C. Acute ischaemic preconditioning protects against skeletal muscle infarction in the pig. *Cardiovasc Res* 1995;29:782-789.
82. Peralta C, Hotter G, Closa D, Gelpi E, Bulbena O, Rosselló-Catafau J. Protective effect of preconditioning on the injury associated to hepatic ischemia-reperfusion in the rat: role of nitric oxide and adenosine. *Hepatology* 1997;25:934-937.
83. Lloris-Carsi JM, Cejalvo D, Toledo-Pereyra Lh, Calvo MA and Suzuki S. Preconditioning: Effect upon lesion modulation in warm liver ischemia. *Transplant Proc* 1993;25:3303-3304.
84. Pasupathy S, Homer-Vanniasinkam S. Surgical implications of ischemic preconditioning. *Arch Surg* 2005;140:405-409.
85. Carini R, Cesaris MG, Splendore R et al. Signal pathway involved in the development of hypoxic preconditioning in rat hepatocytes. *Hepatology* 2001;33:131-139.
86. Nakano A, Cohen MV, Downey JM. Ischemic preconditioning. From basic mechanism to clinical applications. *Pharmacol Ther* 2000;86:263-275.
87. Peralta C, Hotter G, Closa D et al. The protective role of adenosine in inducing nitric oxide synthesis in rat liver ischemia preconditioning is mediated by activation of adenosine A2 receptors. *Hepatology* 1999;29(1):126-132.
88. Ishida T, Yarimizu K, Gute DC, Korthis RJ. Mechanisms of ischemic preconditioning. *Shock* 1997;8:86-94.

89. Ricciardi R, Schaffer BK, Kim RD et al. Protective effects of ischemic preconditioning on the cold-preserved liver are tyrosine kinase dependent. *Transplantation* 2001;72:406-412.
90. Nakayama H, Yamamoto Y, Kume M et al. Pharmacologic stimulation of adenosine A2 receptor supplants ischemic preconditioning in providing ischemic tolerance in rat livers. *Surgery* 1999;126(5):945.
91. Carini R, De Cesaris MG, Splendore R, Albano E. Stimulation of p38 MAP kinase reduces acidosis and Na(+) overload in preconditioned hepatocytes. *FEBS Lett* 2001;491:180-183.
92. Koepfel TA, Thies JC, Schemmer P et al. Inhibition of nitric oxide synthesis in ischemia/reperfusion of the rat liver is followed by impairment of hepatic microvascular blood flow. *J Hepatol* 1997;27:163-102.
93. Teoh N, Dela Pena, Farrell G. Hepatic ischemic preconditioning in mice associated with activation of NF-kappaB, p38 kinase, and cell cycle entry. *Hepatology* 2002;36:94-102.
94. Ricciardi R, Shah SA, Wheeler SM et al. Regulation of NFkappaB in hepatic ischemic preconditioning. *J Am Coll Surg* 2002;195:319-326.
95. Uchinami H, Yamamoto Y, Kume M et al. Effect of heat shock preconditioning on NF-kappaB/I-kappaB pathway during I/R injury of the rat liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002;282:G962-G971.
96. Kume M, Yamamoto Y, Saad S et al. Ischemic preconditioning of the liver in rats: implications of heat shock protein induction to increase tolerance of ischemia-reperfusion injury. *J Lab Clin Med* 1996;128:251-258.
97. Bauer M, Bauer I. Heme oxygenase-1:redox regulation and role in the hepatic response to oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 2002;4:749-752.
98. Arai M, Thurman RG, Lemasters JJ. Ischemic preconditioning of rats livers against cold storage-reperfusion injury: role of nonparenchymal cells and the phenomenon of heterologous preconditioning. *Liver Transpl* 2001;7:292-298.
99. Saito T, Ishii S, Abe T et al. Effect of preconditioning in the liver against ischemia/reperfusion injury, protection of sinusoidal cells and alterations of gene transcription. *Transplant Proc* 2001;33:849-855.
100. Cottart CH, Do L, Blanc MC et al. Hepatoprotective effect of endogenous nitric oxide during ischemia-reperfusion in the rat. *Hepatology* 1999;29:809-813.
101. Jenkins DP, Baxter GF, Yellon DM: The pathophysiology of ischaemic preconditioning. *Pharmacol Res* 1995; 31:219-223.

102. Gong JP, Tu B, Wang W, Peng Y, Li SB and Yan LN. Protective effect of nitric oxide induced by ischemic preconditioning on reperfusion injury of rat liver graft. *World J Gastroenterol* 2004;10:73-76.
103. Yin DP, Sankary HN, Chong AS et al. Protective effect of ischemic preconditioning on liver preservation-reperfusion injury in rats. *Transplantation* 1998;66:152-157.
104. Peralta C, Closa D, Hotter G, Gelpí E, Prats N and Roselló-Catafau J. Liver ischemic preconditioning is mediated by the inhibitory action of nitric oxide on endothelin. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;229:264-268.
105. Peralta C, Closa D, Xaus C, Gelpí E et al. Hepatic preconditioning in rats is defined by a balance of adenosine and xanthine. *Hepatology* 1998;28:768-
106. Uhlmann D, Scommotau S, Witzigmann H, Spiegel HU. Exogenous L-arginine protects liver microcirculation from ischemia reperfusion injury. *Eur Surg Res* 1998;30:175-184.
107. Peralta C, Bulbena O, Xaus C et al. Ischemic preconditioning: A defense mechanism against the reactive oxygen species generated after hepatic ischemia reperfusion. *Transplantation* 2002;73:1203-1211.
108. Yellon DM, Alkhulaifi AM, Pugsley WB. Preconditioning the human myocardium. *Lancet* 1993;342:276-277.
109. Clavien PA, Selzner M, Rüdiger HA et al. A prospective randomized study in 100 consecutive patients undergoing major liver resections with versus without ischemic preconditioning. *Ann Surg* 2003;238:843-852.
110. Nuzzo G, Giuliani F, Vellone M et al. Pedicle clamping with ischemic preconditioning in liver resection. *Liver Transpl* 2004;10:553-557.
111. Clavien PA, Yadav S, Sindram D, Bentley RC. Protective effects of ischemic preconditioning for liver resection performed under inflow occlusion in humans. *Ann Surg* 2000;232:155-162.
112. Petrowsky H, McCormack L, Trujillo M, Selzner M, Jochum W and Clavien PA. A prospective, randomized, controlled trial comparing intermittent portal triad clamping versus ischemic preconditioning with continuous clamping for major liver resection. *Ann Surg* 2006;244:928-930.
113. Bedirli A, Kerem M, Pasaoglu H, Erdem O, Ofluoglu E and Sakrak O. Effects of ischemic preconditioning on regenerative capacity of the hepatocyte in the ischemically damaged rat livers. *J Surg Res* 2005;125:42-48.
114. Eipel C, Glanemann M, Nuessler AK, Menger MD, Neuhaus P and Vollmar B. Ischemic preconditioning impairs liver regeneration in extended reduced-size livers. *Ann Surg* 2005;241:477-484.

115. Foschi D, Castoldi D, Lesma A, Musazzi M, Benevento A and Trabucchi E. Effects of ischemia and reperfusion on liver regeneration in rats. *Eur J Surg* 1993;159:393-398.
116. Peralta C, Prats N. Protective effect of liver ischemic preconditioning on liver and lung injury induced by hepatic ischemia-reperfusion in the rat. *Hepatology* 1999;30(6): 1481-9.
117. Schmekel B, Karlsson SE, Linden M, Sundstrom C, Tegner H and Venge P. Myeloperoxidase in human lung lavage. A marker of local neutrophil activity. *Inflammation* 1990;14:447-454.
118. Peralta C, Fernández L, Panes J et al. Preconditioning protects against systemic disorders associated with hepatic ischemia-reperfusion through blockade of tumor necrosis factor-induced P-selectin up-regulation in the rat. *Hepatology* 2001;33:100-113.
119. Baikal A, Kaynaroglu V, Demirpence E, Kilinc K, Sayek I and Sanaç Y. Experimental study of the effect of adrenaline tolerance on intestinal ischemia-reperfusion. *Br J Surg* 1998;85:947-950.
120. Amador A, Grande L, Martí J et al. Ischemic pre-conditioning in deceased donor liver transplantation: A prospective randomized clinical trial. *Am J Transpl* 2007;7:2180-2189.
121. Selzner N, Selzner M, Odermatt B, Tian Y, Van Rooijen N and Clavien PA. ICAM-1 triggers liver regeneration through leukocyte recruitment and Kupffer cell-dependent release of TNF-alpha/IL-6 in mice. *Gastroenterology* 2003;124:692-700.
122. Fausto N, Mead JE, Gruppuso PA, Castilla A, Jakowlew SB. *Ciba Found. Symp.* 1991;157:165.
123. Roth-Eichhorn S, Kuhl K, Gressner AM. Subcellular localization of latent transforming growth factor beta and the latent TGF-beta binding protein in rat hepatocytes and hepatic stellate cells. *Hepatology* 1998;28:1588-1596.
124. Yamada A, Matsumoto K, Sekiguchi K et al. Rapid and sensitive enzyme-linked-immunosorbent assay for measurement of HGF in rat and human tissues. *Biomed Res* 1995;16:105-114.
125. Selzner M, Camargo C and Clavien P. Ischemia impairs liver regeneration following major tissue loss in the rodents: Protective effects of interleukin-6. *Hepatology* 1999;30:469-475.
126. Selzer M, Selzner N, Jochum W, Graf R and Clavien PA. Increased ischemic injury in old mouse liver: An ATP-dependent mechanism. *Liv Transpl* 2007;13:382-390.
127. Yamada F, Saito T, Abe T et al. Ischemic preconditioning enhances regenerative capacity of hepatocytes in long-term ischemically damaged rat livers. *Hepatol*

2007;22:1971-1977.

128. Serafín A, Rosselló-Catafau J, Prats N, Xaus C, Gelpí E and Peralta C. Ischemic preconditioning increases the tolerance of fatty liver to hepatic ischemia-reperfusion injury in the rat. *Am J Pathol* 2002;161:587-601.

129. Heizmann O, Loehe F, Volk A and Schauer RJ. *Eur J Med Res* 2008;13:79-86.

130. Azoulay D, Lucidi V, Andreani P et al. Ischemic preconditioning for major liver resection under vascular exclusion of the liver preserving the caval flow: A randomized prospective study. *J Am Coll Surg* 2002;202:203-211.

131. Smyrniotis V, Theodoraki K, Arkadopoulos N et al. Ischemic preconditioning versus intermittent vascular occlusion in liver resections performed under selective vascular exclusion: a prospective randomized study. *Am J Surg* 2006;192:669-674.

132. Cescon M, Grazi GL, Grassi A et al. Effect of ischemic preconditioning in whole liver transplantation from deceased donors. A pilot study. *Liv Transpl* 2006;12:628-635.

133. Jassem W, Fuggle SV, Cerundolo L, Heaton ND and Rela M. *Transplantation* 2006; 81:169-174.

134. Azoulay D, Del Gaudio M, Andreani P et al. Effects of 10 minutes of ischemic preconditioning of the cadave-

ric liver on the graft's preservation and function: the ying and the yang. *Ann Surg* 2005;242:133-139.

135. Koneru B, Shareef A, Dikdan G et al. The ischemic preconditioning paradox in deceased donor liver transplantation –evidence from a prospective randomized single blind clinical trial. *Am J Transpl* 2007;7:2788-2796.

136. Peralta C, Bulbena O, Bargallo R, Prats N, Gelpi E, Rosselló-Catafau J. Strategies to modulate the deleterious effects of endothelin in hepatic ischemia-reperfusion. *Transplantation* 2000; 70:1761-1770.

137. Franco-Gou R, Peralta C, Masiip-Salcedo M, Xaus C, Serafín A and Roselló-Catafau J. Protection of reduced-size liver for transplantation. *Am J Transpl* 2004;4:1408-1420.

138. Peralta C, Bartrons R, Riera L et al. Hepatic preconditioning preserves energy metabolism during sustained ischemia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000;279:163-171.

139. Peralta C, Bartrons R, Serafín A et al. Adenosine monophosphate-activated protein kinase mediates the protective effects of ischemic preconditioning on hepatic ischemia-reperfusion injury in the rat. *Hepatology* 2001;34:1164-1173.

140. Ofluoglu E, Kerem M, Pasaoglu H et al. Delayed energy protection of ische-

- mic preconditioning on hepatic ischemia/reperfusion injury in rats. *Eur Surg Res* 2006;38:114-121.
141. Tacchini L, Cairo G, De Ponti C, Massip M, Roselló-Catafau J and Peralta C. Up regulation of IL-6 by ischemic preconditioning in normal and fatty rat livers: Association with reduction of oxidative stress. *Free Rad Res* 2006;40:1206-1217.
142. Fausto N. Liver regeneration and repair. *Hepatology* 2004;39:1477-1483.
143. Serafín A, Roselló-Catafau J, Prats N, Gelpí E, Rodés J and Peralta C. Ischemic preconditioning affects interleukin release in fatty livers of rats undergoing ischemia/reperfusion. *Hepatology* 2004;39:688-698.
144. Yoshidome H, Kato A, Edwards MJ, Lentsch AB. Interleukin-10 suppresses hepatic ischemia/reperfusion injury in mice: implications of a central role for nuclear factor kappaB. *Hepatology* 1999;30:203-208.
145. Kato A, Okaya T, Lentsch AB. Endogenous IL-13 protects hepatocytes and vascular endothelial cells during ischemia-reperfusion injury. *Hepatology* 2003;37:304-312.
146. Yoshizumi T, Yanaga K, Soejima Y et al. Amelioration of liver injury by ischemic preconditioning. *Br J Surg* 1998;85:1636-1641.
147. Camargo C, Madden J, Gao W, Selvan R and Clavien PA. Interleukin-6 protects liver against warm ischemia/reperfusion injury and promotes hepatocyte proliferation in the rodent. *Hepatology* 1997;26:1513-1520.
148. Clavien PA, Camargo CA, Gorczynski R et al. Acute reactant cytokines and neutrophil adhesion after warm ischemia in cirrhotic and noncirrhotic human livers. *Hepatology* 1996;23:1456-1463.
149. Teoh N, Leclercq I, Pena AD, Farrell G. Low-dose TFN-alpha protects against hepatic ischemia-reperfusion injury in mice: Implications for preconditioning. *Hepatology* 2003;37:118-128.
150. Masson S, Daveau M, Hiron M et al. Differential regenerative response and expression of growth factors following hepatectomy of variable extent in rats. *Liver* 1999;19:312-317.
151. Okamoto K, Suzuki S, Kurachi K et al. Beneficial effect of deletion variant of hepatocyte growth factor for impaired hepatic regeneration in the ischemically damaged liver. *World J Surg* 2002;26:1260-1266.
152. Gomez D, Homer-Vanniasinkam S, Graham AM, Prasad KR. Role of ischemic preconditioning in liver regeneration following major liver resection and transplantation. *World J Gastroenterol* 2007;13:657-670.
153. Kerem M, Bedirli A, Ofluoglu E et al. Ischemic preconditioning improves liver regeneration by sustaining energy meta-

bolism after partial hepatectomy under ischemia in rats. *Liv Inter* 2006;26:994-999

154. Yao A, Li X, Pu L et al. Impaired hepatic regeneration by ischemic preconditioning in a rat model of small-for-size liver transplantation. *Transpl Immunol* 2007;18:37-43.

155. Bissell DM, Wang SS, Jarnagin WR, Roll FJ. Cell specific expression of transforming growth factor-beta in rat liver. Evidence for autocrine regulation of hepatocyte proliferation. *J Clin Invest* 1995;96:447-455.