



Universidad Zaragoza

Departamento de Farmacología y Fisiología

TRABAJO FIN DE GRADO

MEDICINA 2014-2015

**EFECTO DE LA ISQUEMIA
REPERFUSIÓN HEPÁTICA EN LAS
MEMBRANAS BIOLÓGICAS**

Autor:

Violeta Pibernat Serrano

Directores:

José Joaquín García García

Laura López Pingarrón

ÍNDICE

1. Resumen/ Palabras clave.....	2
1.1. Abstract/ Key words.....	3
2. Introducción.....	4
2.1. Las membranas celulares.....	4
2.2. Efecto de la isquemia reperfusión en el hígado.....	8
3. Objetivos.....	12
4. Material y métodos.....	13
4.1. Animales.....	13
4.2. Materiales de laboratorio.....	13
4.3. Reactivos químicos.....	14
4.4. Diseño experimental.....	14
4.4.1. Grupos de estudio.....	14
4.4.2. Anestesia y preparación.....	14
4.4.3. Anatomía hepática de la rata.....	15
4.4.4. Técnica quirúrgica.....	16
4.4.5. Procesamiento de las muestras.....	17
4.5. Métodos analíticos.....	17
4.5.1. Aislamiento de membranas.....	17
4.5.2. Valoración de la fluidez de la membrana.....	19
4.5.3. Determinación de la concentración de proteínas.....	20
4.6. Método estadístico.....	21
5. Resultados.....	22
6. Discusión.....	23
7. Conclusiones.....	25
8. Bibliografía.....	26

1. RESUMEN

Una de las causas más importantes de lesión hepática en situaciones como el trasplante hepático, la cirugía de resección hepática y los estados de shock es el fenómeno de isquemia-reperfusión. En la fase temprana de la reperfusión ocurren cambios en la microvascularización que implican la muerte de los hepatocitos, tras lo cual diversas células, como los polimorfonucleares o los propios hepatocitos, liberan factores quimiotácticos e inflamatorios que perpetúan la lesión. Uno de los hechos más destacables de todo el proceso es la producción de radicales libres del oxígeno por parte del sistema xantina-oxidasa (XO) y las mitocondrias, estimulada principalmente por la depleción de adenosín trifosfato (ATP) celular en la fase hipóxica. Los radicales libres alteran la función y la estructura de las células hepáticas por medio del proceso de peroxidación lipídica, cuyo resultado es la disminución de la fluidez de la membrana celular y la consiguiente lesión irreversible del hígado.

Nuestro objetivo fue valorar los niveles de fluidez en membranas celulares y mitocondriales de tres grupos de 4 ratas: 1) Controles sin isquemia; 2) 15 minutos de isquemia; 3) Isquemia seguida de 30 minutos de reperfusión vascular. La isquemia hepática se realizó por oclusión temporal de los dos elementos vasculares del pedículo hepático: arteria hepática y vena porta. La fluidez se determinó por espectroscopio de fluorescencia utilizando el 1-(4-trimetilamoniofenil) 6-fenil-1,3,5-hexatrieno-*p*-tolueno sulfonato (TMA-DPH) como marcador.

Nuestros resultados demuestran que la fluidez disminuyó tanto en las membranas celulares como mitocondriales, si bien los cambios solo fueron significativos en las membranas celulares. Dado que la reperfusión de un órgano causa exacerbación del estrés oxidativo y que la exposición a radicales libres produce rigidez en las membranas biológicas, nuestros datos apoyan la hipótesis de que las alteraciones funcionales de las membranas celulares pueden desempeñar un papel clave en la lesión producida durante los fenómenos de isquemia reperfusión.

Palabras clave: isquemia hepática, isquemia-reperfusión hepática, radicales libres, peroxidación lipídica.

1.1. Abstract

One of the most important causes of the hepatic injury in situations such as liver transplantation, liver resection surgery and shock states is the phenomenon of ischemia-reperfusion. In the early phase of the reperfusion, several changes happen in the microvasculature. These imply hepatocyte death, after which diverse cells such as polymorphonuclear leukocytes or the own hepatocytes release chemotactic and inflammatory factors that perpetuate the injury. One of the most prominent facts of the whole process is the production of oxygen free radicals by the xanthine-oxidase system and mitochondria, mainly stimulated by ATP depletion in hypoxic cell phase. Free radicals disrupt the structure and function of liver cells by the lipid peroxidation process, which results is the decrease of membrane fluidity and subsequent irreversible liver damage. Our objective was to assess the fluency levels in cellular and mitochondrial membranes of three groups of 4 rats each: 1) control without ischemia; 2) 15 minutes of ischemia; 3) ischemia followed by 30 minutes of vascular reperfusion. Hepatic ischemia was performed by temporary occlusion of the three elements of the hepatic pedicle (hepatic artery, portal vein and bile duct). The fluency was determined by fluorescence spectroscopy using 1-(4- Trimethylammoniumphenyl)- 6- Phenyl-1,3,5-Hexatriene *p*-Toluenesulfonate (TMA-DPH) as a marker.

Our results demonstrate that fluency decreased as much in cell membranes as in mitochondria membranes, although the changes were only significant for cell membranes. Since organ reperfusion causes exacerbations of oxidative stress and the consequent exposure to free radicals produces rigidity in biological membranes, our results support the hypothesis that functional alterations of the cellular membranes may play a key role in injuries produced during ischemia reperfusion phenomena.

Key words: hepatic ischemia, hepatic ischemia-reperfusion, free radicals, lipidic peroxidation.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Las membranas celulares

La membrana plasmática es una estructura elástica, fina y flexible que actúa como una barrera de permeabilidad gracias a que está compuesta por proteínas (55%), lípidos (25% de fosfolípidos, 13% de colesterol, 4% de otros lípidos), e hidratos de carbono (3%). El modelo sobre la estructura de las membranas hasta ahora más satisfactorio es el llamado “mosaico fluido” (Singer SJ y Nicolson GL, 1972), que sostiene que los fosfolípidos de la membrana celular están ordenados en una bicapa formando una matriz fluida. La estructura básica de la membrana celular consiste en una película fina de doble capa de fosfolípidos cuyas porciones hidrófobas se atraen mutuamente entre sí y tienen tendencia natural a unirse en la zona media de la membrana. Los extremos polares constituyen las dos superficies de la membrana celular completa, que están en contacto con el agua intracelular y extracelular (Figura 1). Esta bicapa es responsable de determinadas propiedades de permeabilidad pasiva de las membranas biológicas, de forma que las sustancias hidrosolubles las atraviesan muy lentamente mientras que los compuestos no polares, solubles, las cruzan con mayor rapidez. Los fosfolípidos más abundantes son los que contienen colina: las lecitinas (fosfatidilcolinas) y las esfingomielinas. Los siguientes en abundancia son los aminofosfolípidos: fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina. Existen además determinados fosfolípidos en pequeñas proporciones, pero que desempeñan un papel vital en los procesos de transducción de señales a nivel celular, como es el bifosfato de fosfatidilinositol (Kutchai HC, 2006). Las moléculas de colesterol se encuentran dispersas en la bicapa de la membrana. Su núcleo esteroideo se dispone paralelo a las cadenas de ácidos grasos de los fosfolípidos de membrana.

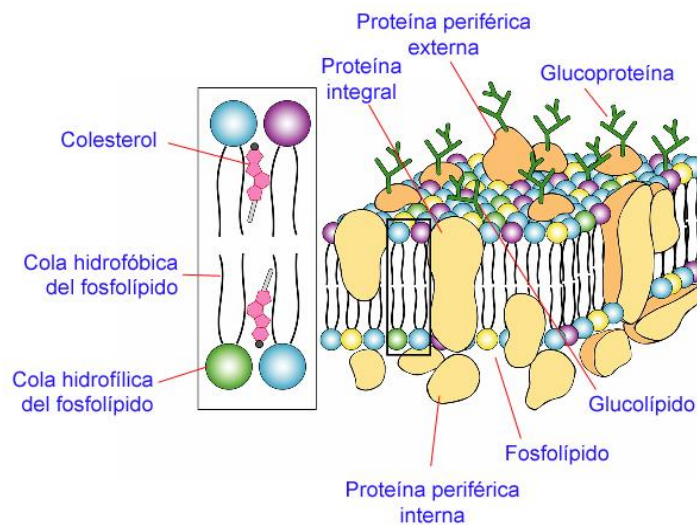


Figura 1. Estructura de la membrana celular.

La fluidez es la facilidad de movimiento en un líquido isotrópico. Es contrario al concepto de viscosidad, que expresa la resistencia al movimiento (Van der Meer W, 1984; Zimmer G y cols., 1993). Las membranas mantienen un estado líquido que permite a los lípidos moverse según la existencia o ausencia de desplazamiento neto de una molécula desde una posición inicial a otra final en la bicapa. El movimiento de flexión-extensión de las colas respecto a las cabezas y el de rotación del fosfolípido sobre un eje teórico cabeza-cola no suponen un desplazamiento neto del fosfolípido en la bicapa lipídica, mientras que la difusión lateral de una molécula en los dos ejes del plano de la bicapa y los saltos de fosfolípidos de una hemicapa a la otra sí que presentan. Hay moléculas hidrofílicas de la membrana que no tienen la propiedad de difundir de forma lateral ni migrar de un lado a otro de la membrana ya que deben ser arrastrados al interior apolar de la bicapa (Figura 2).

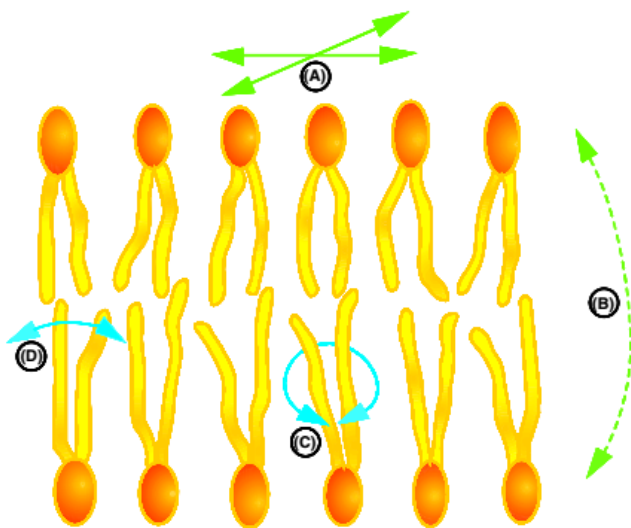


Figura 2. Tipos de movimiento de los fosfolípidos en la bicapa lipídica: A) difusión lateral en el plano de la membrana; B) flip-flop o migración de un lado a otro de la bicapa; C) rotación de los lípidos sobre su propio eje; D) flexión-extensión de las cadenas hidrocarbonadas.

El colesterol controla la fluidez de la membrana, actuando como un amortiguador. Este concepto es importante porque permite que las proteínas difundan con rapidez en el plano de la bicapa, que interactúen entre sí, que se acoplen y desacoplen, fenómenos imprescindibles en la señalización celular. Por otro lado, confiere flexibilidad e integridad, permite que los lípidos difundan desde el interior de la bicapa después de su síntesis hacia otras regiones de las células. El colesterol y los fosfolípidos se han utilizado como indicadores con el nivel de fluidez de la membrana (Shinitzky M, 1984).

En los lípidos se encuentran intercaladas grandes moléculas proteicas globulares, glucoproteínas en su mayoría. Interactúan con las del citoesqueleto y de la matriz extracelular, permitiendo la transducción de señales. Las proteínas de membrana son de dos clases, la primera incluye las proteínas integrales o intrínsecas, fuertemente incrustadas en la doble capa de fosfolípidos, y que incluyen un gran número de

proteínas funcionales que participan como transportadores, canales, receptores o ligandos, en la segunda, las proteínas periféricas o extrínsecas, situadas en la superficie de la membrana, interactúan con ésta a través de su interacción por cargas eléctricas con las proteínas integrales.

Toda la superficie externa de la célula contiene un recubrimiento débil de hidratos de carbono conocido como glucocáliz (Guyton AC, Hall JE, 2006). Los hidratos de carbono se presentan combinados con proteínas o lípidos formando glucoproteínas y glucolípidos. Las porciones hidrocarbonadas de estas moléculas se encuentran orientadas hacia el exterior de la célula. Entre sus funciones destaca que aportan carácter inmunógeno y que proporcionan a las células una carga negativa que repele a otros compuestos negativos.

Las funciones de la membrana biológica requieren un estado fluido de la misma, que es consecuencia de su estructura y propiedades físicas. Así, la fluidez modula procesos celulares tales como los que acontecen gracias al tráfico de moléculas a través de la membrana plasmática, ya sea directamente a través de la bicapa lipídica o a través de proteínas. El tráfico se produce mediante uno de dos procesos: difusión o transporte activo (Figura 3). Excepto las moléculas liposolubles y las moléculas pequeñas sin carga, que atraviesan directamente la bicapa lipídica, casi todas las moléculas orgánicas necesitan de proteínas transportadoras. Corresponden a proteínas intrínsecas de la membrana plasmática, en términos generales muy selectivas y que a menudo transportan un solo tipo de molécula. Este proceso se conoce como transporte mediado por proteínas, e incluye procesos de transporte facilitado y de transporte activo. La difusión facilitada se realiza a favor del gradiente químico o electroquímico a ambos lados de la membrana, empleando la energía del movimiento cinético normal de la materia. El transporte activo ayuda al paso de las moléculas o de los iones contra un gradiente químico o electroquímico entre ambos lados de la membrana celular, requiriendo energía adicional, además de la energía cinética, y lo hace a través de la proteína transportadora. Los transportadores se unen a los sustratos que han de ser transportados situados a uno de los lados de la membrana y a continuación deben sufrir un cambio de conformación antes de liberarlo en el otro lado de la misma. Ya que dichos cambios de conformación son relativamente lentos, los transportadores presentan las tasas más lentas de transporte de sustratos.

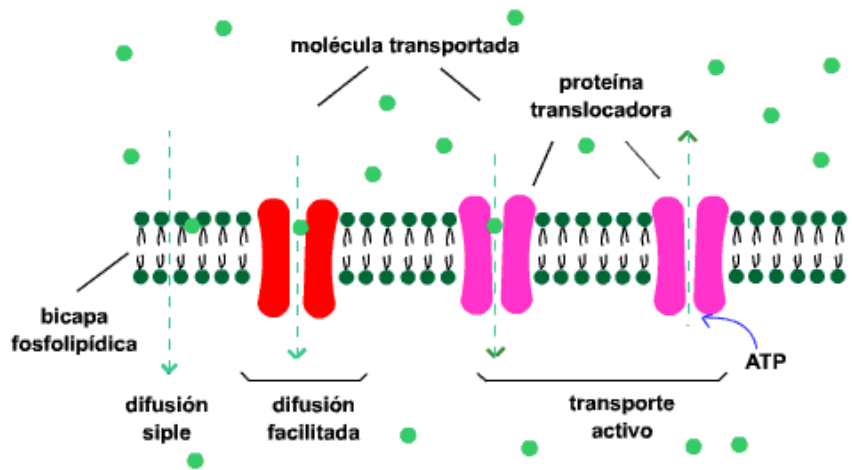


Figura 3: Procesos de difusión simple, difusión facilitada y transporte

Las bicapas lipídicas son muy impermeables a todos los iones y moléculas cargadas, independientemente de su tamaño. La carga de las moléculas y la fuerte atracción eléctrica que ejercen sobre las moléculas de agua impiden que ingresen en la fase hidrocarbonada de la bicapa (Kutchai HC, 2006). Los iones se transportan a través de las membranas por canales iónicos de naturaleza proteica y suelen estar regulados por un mecanismo de compuerta, según el cual el canal alterna entre un estado abierto (de conducción rápida) y cerrado (de conducción lenta).

El mecanismo de transporte activo que regula las diferencias de concentración de sodio y potasio a través de la membrana celular y que establece un voltaje eléctrico negativo en el interior de las células es la bomba sodio-potasio ($\text{Na}^+\text{-K}^+$). Bombea iones sodio hacia fuera y al mismo tiempo bombea iones potasio desde el exterior hacia el interior. La proteína transportadora es un complejo formado por dos proteínas globulares distintas. Al unirse dos iones potasio al exterior de la proteína y tres iones sodio al interior, se activa la función ATPasa de la proteína, que escinde la molécula de ATP, dividiéndola en adenosín difosfato (ADP) y liberando un enlace de energía de fosfato de alta energía. La energía liberada produce un cambio conformacional en la molécula proteica, transportando los tres iones sodio hacia el exterior y los dos iones potasio hacia el interior. Una de las funciones de esta bomba es controlar el volumen de todas las células, y lo hace de la siguiente manera: el interior de la célula contiene grandes cantidades de proteínas y otras moléculas orgánicas con carga negativa, que atraen grandes cantidades de potasio, sodio y otros iones positivos.

Todas ellas producen ósmosis de agua hacia el interior de la célula. El mecanismo por el que se detiene el ingreso de estos iones es la bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+$, que provoca la pérdida neta de iones hacia el exterior e inicia la ósmosis de agua hacia el exterior de la célula.

La ósmosis se define como el flujo de agua a través de una membrana semipermeable desde un compartimiento en el que la concentración de solutos es más baja hacia otro compartimiento con mayor concentración. La membrana semipermeable es aquella permeable al agua pero impermeable a los solutos. Las membranas plasmáticas son de tipo semipermeable. El proceso de ósmosis tiene lugar porque la presencia de soluto reduce el potencial químico del agua. Cuando la presión osmótica del líquido extracelular aumenta, el agua sale de la célula por ósmosis y la célula se retrae hasta que las presiones intra y extracelulares se igualan. Si la presión osmótica del líquido extracelular desciende, el agua entra en la célula, que continúa hinchándose hasta que las presiones se igualan.

2.2. Efecto de la isquemia reperfusión en el hígado

El proceso de isquemia-reperfusión conlleva una serie de eventos complejos que ocurren durante el bloqueo transitorio del flujo de sangre y oxígeno, así como restablecer el flujo. Se produce en situaciones clínicas como la cirugía del trauma, la resección, el shock y el trasplante. Representa uno de los principales factores que dificulta el trasplante de órganos, único tratamiento posible de diversas patologías en estadios terminales. Dicho proceso genera una cadena de acontecimientos celulares y vasculares que llevan al fracaso del injerto. Las poblaciones celulares hepáticas tienen distinta sensibilidad a la isquemia. Durante el trasplante el hígado puede sufrir dos tipos de isquemia: isquemia fría, que se relaciona con la conservación del órgano en frío, un hecho intencionado, cuyo objetivo es reducir su actividad metabólica hasta el momento de la implantación en el receptor. Afecta especialmente a las células no parenquimatosas, células endoteliales sinusoidales y células de Kupffer. La otra modalidad de isquemia es la isquemia caliente, característica de la cirugía del trauma, la resección hepática con clampeo del pedículo, el shock hipovolémico, la manipulación del hígado y la confección de las anastomosis vasculares pre-reperfusión en el trasplante. Ésta es pobremente tolerada por los hepatocitos que durante la etapa temprana de la reperfusión sufren apoptosis debido a una serie de mecanismos entre los que destaca la liberación de radicales libres (Clavien PA y cols., 1992).

El primer mecanismo por el que se produce la lesión hepática durante la isquemia-reperfusión lo constituyen los cambios en la microvascularización (Caldwell-Kenkel JC y cols., 1991; Cywes R y cols., 1993; Scheinichen D y cols., 2003; Kukan M y cols., 2001; Maathuis MH y cols., 2006). Se explican por alteraciones en las células sinusoidales hepáticas, que pierden sus características morfológicas y funcionales. Así, las células se hinchan y se desprenden al lumen sinusoidal. Una vez comenzada la reperfusión mueren generando la disrupción de la pared endotelial.

En las primeras 3 - 6 horas tras la reperfusión del injerto, los linfocitos T CD4+ activan las células de Kupffer, que producen especies reactivas del oxígeno (ERO), activan el complemento que induce la opsonización de las células dañadas gracias a la fagocitosis, y sus productos (anafilotoxinas y sistema de ataque a membranas) también activan polimorfonucleares, que producen vasoconstricción y aumento de la permeabilidad vascular.

La reducción de la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial de los hepatocitos y las células endoteliales sinusoidales promueve la liberación de ERO (Cutrin JC y cols., 2002). Desde las 6 horas hasta un máximo de 18 - 24 horas, los neutrófilos se acumulan de forma masiva en el hígado, liberando ERO y proteasas que favorecen la activación endotelial y su adherencia a polimorfonucleares, agravando el daño hepático generado en la fase precoz (Bast A y cols., 1991; Nordmann R, 1994; Yamada T, Grishman MB, 1991; Casini A y cols., 1997; Jaeschke H, 2000). La acumulación de polimorfonucleares es consecuencia de una serie de hechos: tanto el endotelio y los hepatocitos como los polimorfonucleares activados liberan factores quimiotácticos (Galaris D y cols., 2006; Taniguchi M y cols., 2007) y los hepatocitos producen mediadores inflamatorios tales como TNF-alfa, IL-1 y el factor activador plaquetario (Colleti LM y cols., 1900; Schwabe RF y cols., 2006; Suzuki S y cols., 1994; Zhou W y cols., 1992; Husted TL y Lentsch AB, 2006). Y por último, la lesión del lecho microvascular atrapa polimorfonucleares y prolonga la situación de isquemia. (Koo A, 1992).

La hipoxia genera cambios en la estructura y funcionalidad de las células hepáticas, alterando el metabolismo energético intracelular y la función enzimática, lo que provoca apoptosis de las mismas (Sindram D y cols., 1999; Natori y cols., 2003; Zhu J y cols., 2007; Song SW y cols., 2009). La reducción de enzimas mitocondriales y la alteración de la función de la cadena respiratoria mitocondrial comprometen la fosforilación oxidativa disminuyendo así la síntesis de ATP. Se reduce el potencial de membrana mitocondrial y se afecta la integridad de la misma, liberándose proteínas

pro-apoptóticas contenidas en el espacio intermembrana (Malhi H y Gores GJ, 2008; Green DR, Kroemer G, 2004). La reducción de la síntesis de ATP celular causa disfunción de las bombas necesarias para una adecuada regulación iónica intracelular aumentando la concentración de Ca^{++} citosólico debido a su paso a través de la membrana plasmática y a la liberación desde mitocondrias y retículos endoplasmáticos (Belous A y cols., 2003). La concentración elevada de Ca^{++} intracelular produce consecuencias muy adversas que pueden inducir la muerte celular (Blankensteijn JD, Terpstra OT, 1991; Boudjema K y cols., 1990). Por un lado, activa fosfolipasas de la membrana celular que degradan los fosfolípidos de la membrana. Por otro lado, activa enzimas con efectos celulares nocivos: proteasas, implicadas en la escisión de proteínas citoesqueléticas y de membrana; ATPasas, que aceleran el proceso de depleción de ATP; y endonucleasas, que se asocian a la fragmentación de la cromatina. El Ca^{++} accede a la mitocondria a través del transportador de Ca^{2+} mitocondrial, donde activa factores pro-apoptóticos (Knox CD y cols., 2006). Además, el aumento de calcio desempeña un importante papel en la producción de radicales libres de oxígeno consecutivos a la reperfusión, mediante la activación de la xantina óxidoreductasa.

La elevada concentración de proteínas intracelulares de los hepatocitos conlleva una elevada presión osmótica. La acción de la bomba $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPasa equilibra dicha presión, ya que reduce las concentraciones intracelulares de sodio. La falta de ATP reduce la actividad de la $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPasa, lo que hace que se acumule Na^+ en el interior de la célula. El aumento de osmolaridad intracelular generado es contrarrestado con el ingreso de agua, con la aparición de edema celular, que provoca la pérdida de la elasticidad de la membrana e incluso de su integridad.

Otro causante del daño tisular post-reperfusión tras la isquemia lo producen los radicales libres del oxígeno. El estrés oxidativo se ha definido como la exposición de la materia viva a diversas fuentes que producen una ruptura del equilibrio que debe existir entre las sustancias o factores prooxidantes (radicales libres, altamente reactivos) y los mecanismos antioxidantes encargados de eliminar las especies químicas. Puede ser debido a un déficit de estas defensas antioxidantes o por un incremento de la producción de especies reactivas del oxígeno. Como consecuencia del estrés oxidativo se producen cambios fisiológicos y bioquímicos que conducen a la alteración de la relación estructura-función en cualquier tejido y provocan deterioro y muerte celular. Tanto es así, que se reconoce como mecanismo general de daño celular, asociado con la fisiopatología primaria o la evolución de un número creciente

de entidades y síndromes de interés médico-social. El oxígeno es un elemento esencial para la vida, pero también, por su función como aceptor de electrones durante la respiración celular, genera las ERO. Son sustancias inestables y que pueden reaccionar con otras moléculas del organismo, entregando o recibiendo un electrón, y generando daño celular. Las ERO son elaboradas continuamente como un subproducto del metabolismo normal de cada célula. Las ERO con más importancia biológica son el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el radical hidroxilo ($\cdot OH$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Las principales fuentes de producción de ERO en el hígado en situaciones de isquemia son: la mitocondria, las células de Kupffer, la xantino-oxidasa (XO) citosólica, los polimorfonucleares y los peroxisomas (Jaeschke H, 1991). Bajo condiciones de estrés oxidativo, la mitocondria es el principal lugar de producción de grandes cantidades de superóxido, que junto con el incremento de Ca^{++} mitocondrial, provocan la rotura de la membrana mitocondrial y la muerte celular (Nieminen AL, y cols., 1997).

Otra fuente de ERO por isquemia-reperfusión es el sistema XO. Durante la fase hipóxica y debido a la depleción de ATP se acumula hipoxantina. De forma paralela, la hipoxia activa las enzimas proteolíticas que convierten a la xantina-deshidrogenasa en XO (Saugstad OD y Aasen AO, 1980; Saugstad OD, 1969). Con el restablecimiento del flujo sanguíneo los altos niveles de XO oxidan la hipoxantina a urato, reacción en la cual el oxígeno se transforma en $O_2^{\cdot-}$. Por otro lado, la activación de polimorfonucleares en el parénquima hepático activa la Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa (NADPH oxidasa), que en condiciones normales se encuentra inactiva en su membrana celular y citoplasma. Ésta oxida el NADPH y el electrón liberado reduce el oxígeno molecular, con la consiguiente formación de $O_2^{\cdot-}$ (Lentsch AB y cols., 2000). Los radicales libres formados durante la reperfusión producen activación de células fagocitarias, liberación de moléculas de adhesión y activación del sistema de complemento, además de generar daño en las proteínas, los ácidos nucleicos, el citoesqueleto y las membranas celulares, lo cual resulta en una alteración de la función celular, tanto de hepatocitos como de células endoteliales sinusoidales (Fan C y cols., 1999).

El fenómeno de peroxidación lipídica se produce como consecuencia del ataque de radicales libres a los fosfolípidos de la bicapa, y acarrea una disminución de la fluidez de la membrana. Consiste en una reacción en cadena que se propaga a los fosfolípidos próximos que conlleva la formación de lipoperóxidos, endoperóxidos e hidroperóxidos (Ghosh C, y cols., 1993; Curtis MT y cols., 1984). Los radicales libres

modifican la composición lipídica ya que disminuyen la concentración de fosfolípidos, aumentando la concentración relativa de colesterol con el consiguiente incremento de la rigidez de la membrana. Forman nuevos productos aldehídicos que reaccionan entre sí y con otras moléculas de la membrana. La peroxidación lipídica tiene lugar en tres fases sucesivas: iniciación, propagación y terminación. La iniciación tiene lugar a través de la abstracción de un átomo de hidrógeno de un ácido graso poliinsaturado, generando un radical alquilo. Éste reacciona con el oxígeno, soluble en el núcleo de las bicapas lipídicas, dando lugar a un radical peroxilo. La propagación implica la abstracción de un átomo de hidrógeno de un ácido graso próximo, formándose un hidroperóxido lipídico y un nuevo radical alquilo. Por último, la terminación de la peroxidación lipídica tiene lugar con la interacción de dos radicales libres, resultando una especie no radical, finalizando así la reacción (Halliwell B y Gutteridge JMC, 1999) (Figura 4).

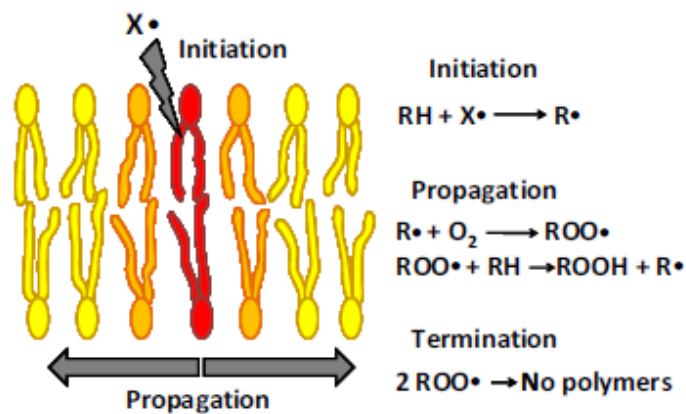


Figura 4. Proceso de peroxidación lipídica en las membranas biológicas

3. OBJETIVOS

Primero: Estudiar los efectos in vivo de la isquemia hepática por oclusión de la arteria hepática y la vena porta, y de su posterior reperfusión en la fluidez de las membranas celulares de los hepatocitos.

Segundo: Determinar la fluidez en las membranas mitocondriales en el modelo de isquemia-reperfusión del objetivo anterior. Comparar y discutir los resultados obtenidos en las mitocondrias con los de las membranas celulares.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Animales

Se emplearon de 12 ratas de la raza Sprague-Dawley en Harlan-Ibérica (Barcelona, España) de tres meses de edad, con un peso medio de 200 ± 25 gramos. Sólo se incluyeron ratas macho para evitar distorsiones causadas por el ciclo ovárico. Permanecieron en las instalaciones del Servicio de Apoyo a la Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza, a razón de dos animales en cada jaula. Las condiciones ambientales fueron: temperatura de 22 ± 1 °C, y un ciclo de luz-oscuridad de 12:12 horas, comenzando la fase de luz a las 8:00 h y la fase oscura a las 20:00 h. Los roedores se alimentaron e hidrataron ad libitum, con disponibilidad total de comida y bebida.

El procedimiento experimental se llevó a cabo cumpliendo la normativa vigente europea (Directiva 86/609/CEE), española (Real Decreto 1201/2005) y autonómica (Ley 11/2003).

4.2. Material de Laboratorio

Para llevar a cabo la investigación se emplearon los siguientes utensilios:

1. Agitadores: vórtex Velp Scientifica[®] Zx³ y vórtex Heidolph[®] REAX 2000.
2. Balanzas de precisión Cobos[®] CBH-300J y A-220 CB.
3. Baño termostatzado con agitación Bunsen[®] BTG-1.
4. Dos centrifugas Beckman[®] Avanti 30[™], refrigeradas y equipadas con dos rotores: F1010 para 10 tubos de 10 mL, y F3602 para 36 tubos Eppendorf de 1.5 y 2 mL.
5. Espectrofotómetro Beckman-Coulter[®] DU800, con dos tipos de cubetas: desechables de plástico para medir en el rango visible, y de cuarzo para medir en el rango ultravioleta (UV).
6. Homogeneizador de teflón acoplado a un rotor Heidolph[®] RZR 2020.
7. Homogeneizador Ultra-Turrax Janke & Kunkel[®] T25.
8. pHmetro Criston[®] micro pH 2001, equipado con sonda de temperatura.
9. Pipetas de precisión, dos juegos: Gilson[®] (P-20, P-200, P-1000 y P-5000) y Eppendorf[®] (0.5-10, 10-100 y 100-1000 µL).
10. Pipeta multidispensadora BibbyStep[®] con puntas Eppendorf[®] de 2.5, 5 y 50 mL.

11. Sistemas de agua de Millipore[®]: destilada MilliRX y ultrapura MilliQ.
12. Frigorífico con nevera (4 °C) y congelador (-20 °C) Liebherr[®] Premium.
13. Ultracongelador (-80 °C) Sanyo[®] MDF-U5386S.
14. Máquina automática pica-hielo Bar Line[®]
15. Material quirúrgico diverso para la extracción de tejidos: guantes, bisturí, tijeras, pinzas.
16. Otros materiales de tipo fungible, viales, papel de filtro, etc.

4.3. Reactivos químicos

Se emplearon reactivos químicos de la mayor pureza posible, conservándose según las condiciones indicadas por el fabricante.

- Preparación tisular:
 - Panreac[®]: suero fisiológico, salino al 0.9 % (NaCl, ref. 121659).
 - Sigma-Aldrich[®]: ácido 4-(2-hidroxietil)-piperazina-1-etanosulfónico (HEPES, ref. H 3375); tris (hidroximetil) aminometano (TRIS, ref. T-1503).
- Valoración de fluidez de membrana:
 - Molecular Probes[®]: 1-(4- trimetilamoniofenil)6-fenil-1,3,5- hexatrieno- *p*-tolueno sulfonato (TMA-DPH, ref. T-204).
 - Sigma-Aldrich[®]: albúmina sérica bovina (BSA, ref. A. 7848); TRIS (ref. T-1503).

4.4. Diseño experimental

4.4.1. Grupos de estudio

Se establecieron tres grupos de trabajo (n = 4 ratas / grupo):

- Control: grupo 1
- Isquemia durante 15 minutos: grupo 2.
- Isquemia durante 15 minutos con reperfusión posterior de 30 minutos: grupo 3.

4.4.2. Anestesia y preparación

Con el fin de evitar posibles complicaciones tromboembólicas, se administró heparina sódica el día anterior a la intervención (200 UI/Kg, vía intraperitoneal), administrando

otra dosis similar previa a la intervención. La anestesia empleada resultó de una combinación de ketamina (30 mg/Kg de peso) y tiopentato de sodio (60 mg/Kg de peso) que se administraron de forma intraperitoneal. Una vez rasurada la superficie abdominal, se colocó a la rata en decúbito dorsal sobre una tablilla operatoria, con manta térmica.

4.4.3. Anatomía hepática de la rata

El hígado de la rata lo conforman cinco lóbulos: el lóbulo medial o cístico, que representa el 70% de la masa hepática total. Está subdividido en los sublóbulos centrales derecho e izquierdo por la cisura mediana. Por otro lado, el lóbulo caudado o de Spiegel, que se encuentra interpuesto entre el esófago y el estómago, rodeando al esófago. Los lóbulos lateral derecho y triangular proceden de una base común. Así, el lóbulo triangular se encuentra alrededor de la circunferencia formada por la vena cava inferior en su trayecto infrahepático, y cubre el polo superior del riñón derecho. Por detrás de la vena porta, el lóbulo triangular se une con el caudado. El hígado se fija gracias al ligamento falciforme, el ligamento lateral izquierdo, las adherencias con el peritoneo y los pedículos vasculares.

En cuanto a su circulación, cabe destacar su doble sistema circulatorio (Figura 5). Por un lado, recibe sangre rica en oxígeno a través de la arteria hepática, y por otro, sangre venosa procede de la región esplácnica a través de la vena porta. La arteria hepática discurre de forma paralela a la vena porta, y finalmente se divide en las arterias lobares. De la vena porta nacen dos ramas. La rama derecha se encarga del drenaje de los lóbulos medial y lateral derecho, triangular y caudado. La rama izquierda se encarga del retorno sanguíneo de los lóbulos medial y lateral izquierdo.

La sangre venosa procedente del hígado lo hace desde las venas centrales de los lobulillos hepáticos, a las venas hepáticas, que llegan a converger en la vena cava inferior suprahepática. Por su parte, la vena cava inferior infrahepática sigue su recorrido por la cara posterior del hígado, recogiendo la sangre de las venas suprarrenales derechas. En su trayecto hepático las venas tributarias hepáticas drenan su sangre a la vena cava infrahepática.

El conducto biliar común es el resultado de la convergencia de los conductos biliares de cada lóbulo hepático. Sigue su camino en el hilio sobre la vena porta, cubriendo a la arteria hepática en el borde libre del ligamento hepatoduodenal. En su trayectoria, el conducto biliar común se une al pancreático un centímetro por debajo del hígado. La carencia de vesícula biliar en la rata hace que sea el tono del esfínter de Oddi el que

regule el almacenamiento de la bilis, de forma que genera un flujo continuo de la misma hacia la primera porción del duodeno.

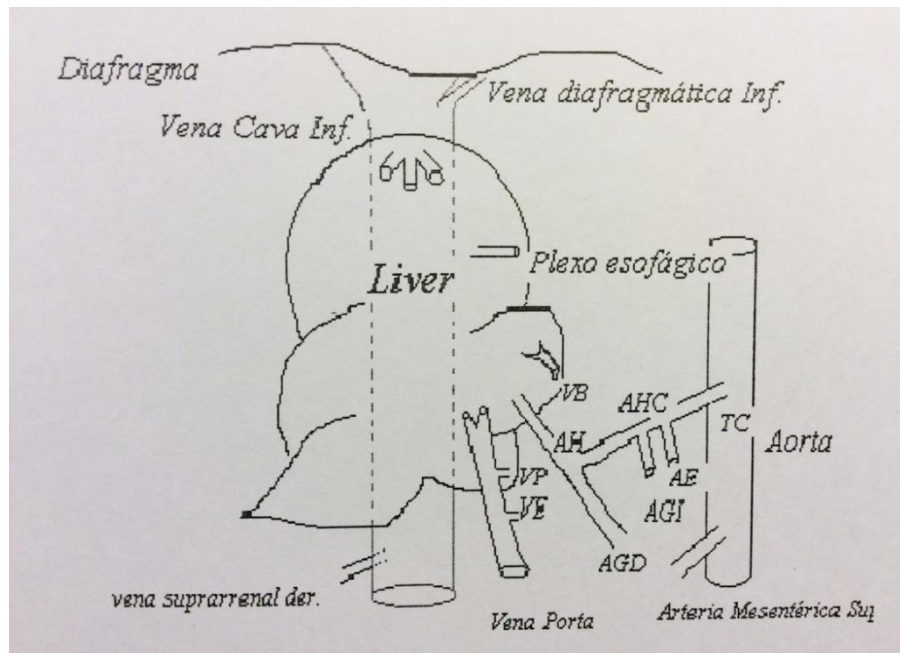


Figura 5: Anatomía hepática de la ratona. VP: vena porta; VE: vena esplénica; VB: vía biliar; AH: arteria hepática; AHC: arteria hepática común; AGD: arteria gástrica derecha; AGI: arteria gástrica izquierda; AE: arteria esplénica; TC: tronco común.

4.4.4. Técnica quirúrgica

El abordaje se realizó mediante laparotomía, consistente en una incisión bisubcostal a 2 cm aproximados del reborde costal. Se retrajo el cartílago xifoides con una pinza hemostática. Se aislaron las asas intestinales hacia la izquierda, cubriéndolas con gasas húmedas a modo de protección, con solución fisiológica a 38 °C. Finalmente se seccionó el ligamento falciforme. Una vez descubierto el hígado, se procedió a la preparación del pedículo hepático. Para exponerlo se elevaron los lóbulos derecho y central. Con el fin de identificar estructuras como el conducto biliar, la vena porta y la arteria hepática, se seccionó el ligamento gastrohepático. En todo momento, la técnica quirúrgica se realizó minimizando el daño tisular con ayuda de hisopos húmedos con solución fisiológica. En cuanto a la hidratación, se administraron 1.5 mL de solución fisiológica a 37 °C de forma subcutánea para reponer los fluidos perdidos durante la intervención.

La maniobra de Pringle fue el procedimiento que se siguió para producir la isquemia. Se empleó un miniclamp tipo Bulldog para impedir la circulación de los dos elementos

vasculares (arteria hepática y vena porta). La isquemia se mantuvo durante 15 minutos.

La repermeabilización se llevó a cabo una vez transcurrido el tiempo de isquemia estipulado. Se retiró el miniclamp y se produjo la reperusión hepática con una duración de 30 minutos. El cierre de la laparotomía se realizó con grapas, una vez recolocadas las vísceras de la cavidad abdominal.

4.4.5. Procesamiento de muestras

Todas las extracciones tisulares se realizaron entre las 10 y las 12 horas de la mañana, de forma que la influencia del ritmo circadiano sobre el estrés oxidativo fuese mínima. Las muestras obtenidas se lavaron con suero fisiológico a 40 °C y posteriormente se secaron en papel de filtro para eliminar el suero de las mismas. Finalmente se almacenaron a una temperatura de -80 °C hasta el día del análisis.

4.5. MÉTODOS ANALÍTICOS

4.5.1. Aislamiento de membranas

En primer lugar se aislaron las membranas celulares y mitocondriales siguiendo la metodología descrita por Graham (Graham JM, 1997), que se basa en realizar sucesivas centrifugaciones a distintas velocidades y tiempos (Figura 6).

Se colocó 1g de muestra hepática sobre una placa de Petri situada en hielo, y se homogeneizó con tampón HEPES 20 mM - KCl 140 mM (pH 7.4) y se homogeneizaron a 300 rpm.

Posteriormente, el homogeneizado se centrifugó a 1000 xg durante 10 minutos a 4 °C con el fin de eliminar restos de tejido sólidos y los núcleos celulares. El resultado se centrifugó a 50000 xg durante 20 minutos a 4 °C. El precipitado resultante, que contenía las membranas, se resuspendió en HEPES, se homogeneizó y se volvió a centrifugar a 10000 xg durante 10 minutos a 4 °C. Finalmente:

- a) El sobrenadante y el buffy coat se resuspendieron y centrifugaron a 50000 xg durante 20 minutos a 4 °C para obtener membranas plasmáticas.
- b) El precipitado se resuspendió en HEPES y se centrifugó a 10000 xg durante 10 minutos a 4 °C para obtener mitocondrias.

Ambos precipitados finales, membranas celulares y mitocondrias, se resuspendieron en TRIS 50 mM (pH 7.4), se distribuyeron en alícuotas y se almacenaron a -80 °C hasta la realización de los ensayos de fluidez.

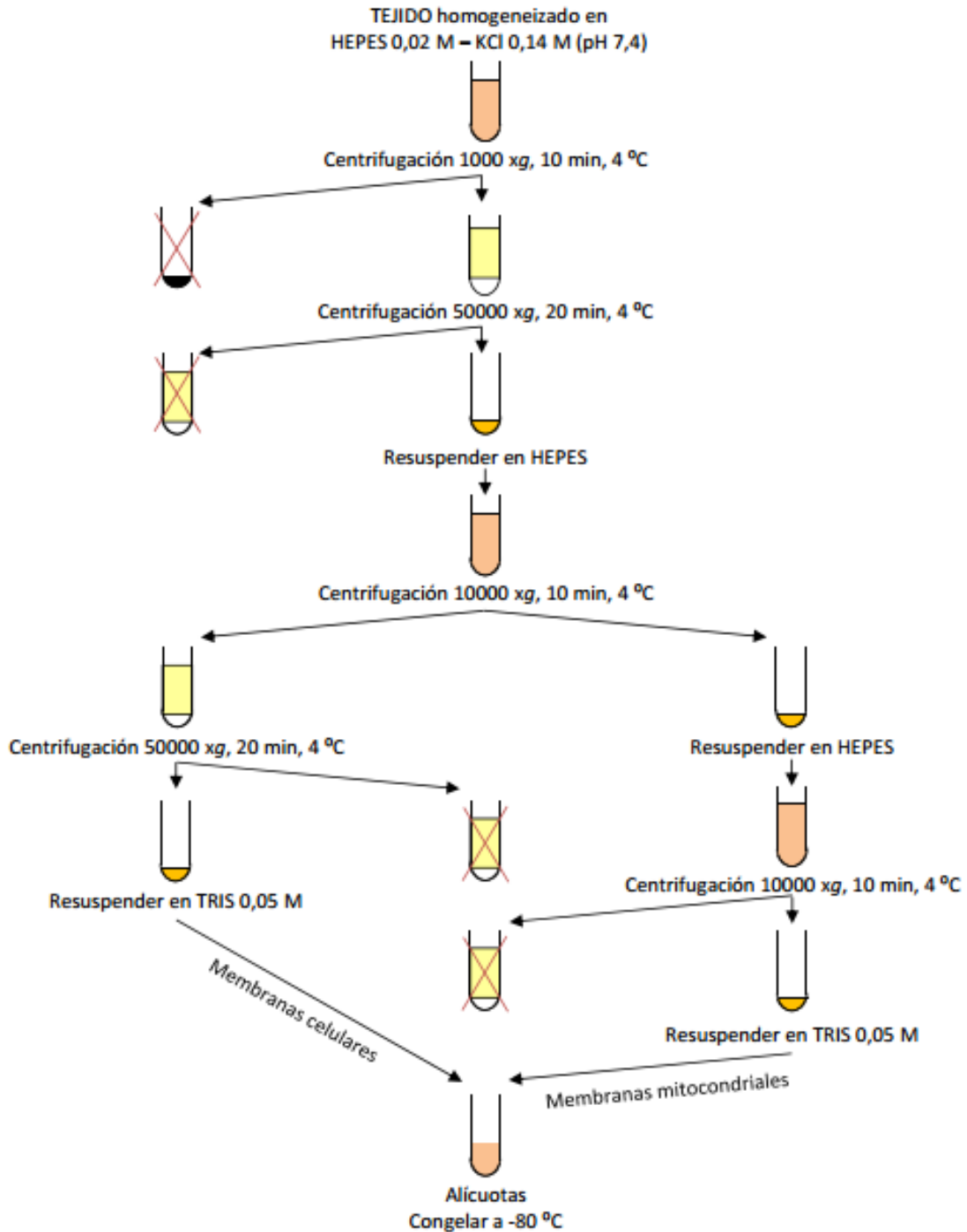


Figura 6: Protocolo de aislamiento de membranas.

4.5.2. Valoración de la fluidez de membrana

Se valoró según la técnica de la espectroscopia de fluorescencia, empleando TMA-DPH como marcador fluorescente (Yu BP y cols., 1992). Este marcador se incluye en las membranas, se intercala entre los fosfolípidos de la bicapa lipídica de forma que, cuando es iluminado, emite una señal fluorescente: de esta manera es posible reflejar la dinámica lipídica (Figura 7).

Protocolo:

- En un tubo se dispensaron 0.5 mg/mL de proteínas de membranas, calculados por el método de Bradford, descrito más adelante.
- Se añadieron 8 μ L de TMA-DPH 25 μ M.
- Se añadió un tampón TRIS 50 μ M hasta completar 3 mL/tubo.
- Incubar durante 30 minutos a 37 °C con agitación.
- Se agita para resuspender las membranas.
- Se lee en el espectroscopio de fluorescencia a 360 nm de excitación y 430 nm de emisión.
- Se calcula la polarización (P) según la siguiente ecuación:

$$P = \frac{IV_V - GIV_H}{IV_V + GIV_H}$$

Donde I es la intensidad de emisión de la luz polarizada verticalmente, medida por un detector orientado en paralelo (IV_V) o perpendicular (IV_H) al plano de excitación, y G es un factor de corrección para el sistema óptico.

El resultado se calculó por la media aritmética de 30 mediciones independientes y la fluidez de las membranas se expresó como el inverso de la polarización (1/P) (Yu BP y cols., 1992).

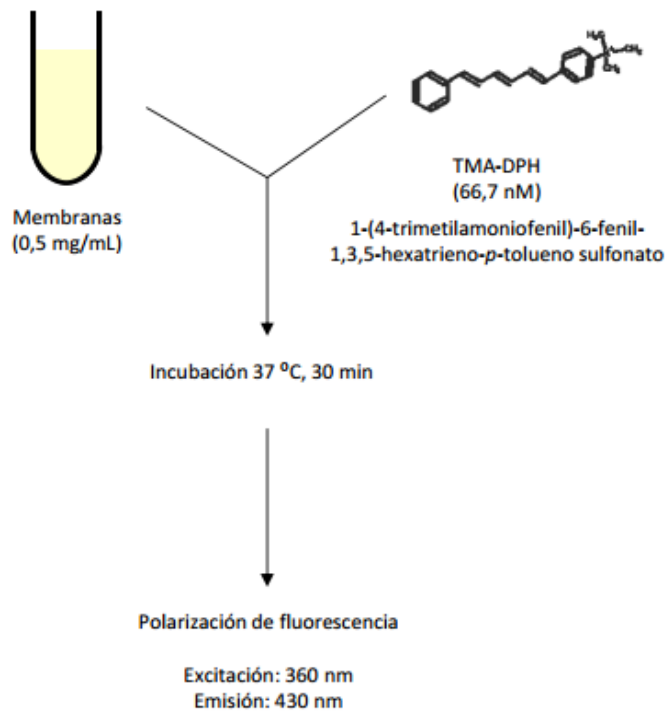


Figura 7. Protocolo de medición de la polarización en las membranas.

4.5.3. Determinación de la concentración de proteínas

Se utilizó el método de M. Bradford (1976). Consiste en la reacción que se crea entre el azul de Coomassie y los aminoácidos básicos (arginina, lisina e histidina) (Figura 8). Los cambios que se producen en la absorbancia gracias a esta reacción, a 595 nm, son directamente proporcionales a la concentración total de proteínas. La concentración de la muestra se obtuvo interpolando su valor de absorbancia en una curva patrón de albúmina. Los valores de concentración de proteínas se expresaron en mg/mL. El programa utilizado fue Assay 4.0 (Biosoft®).

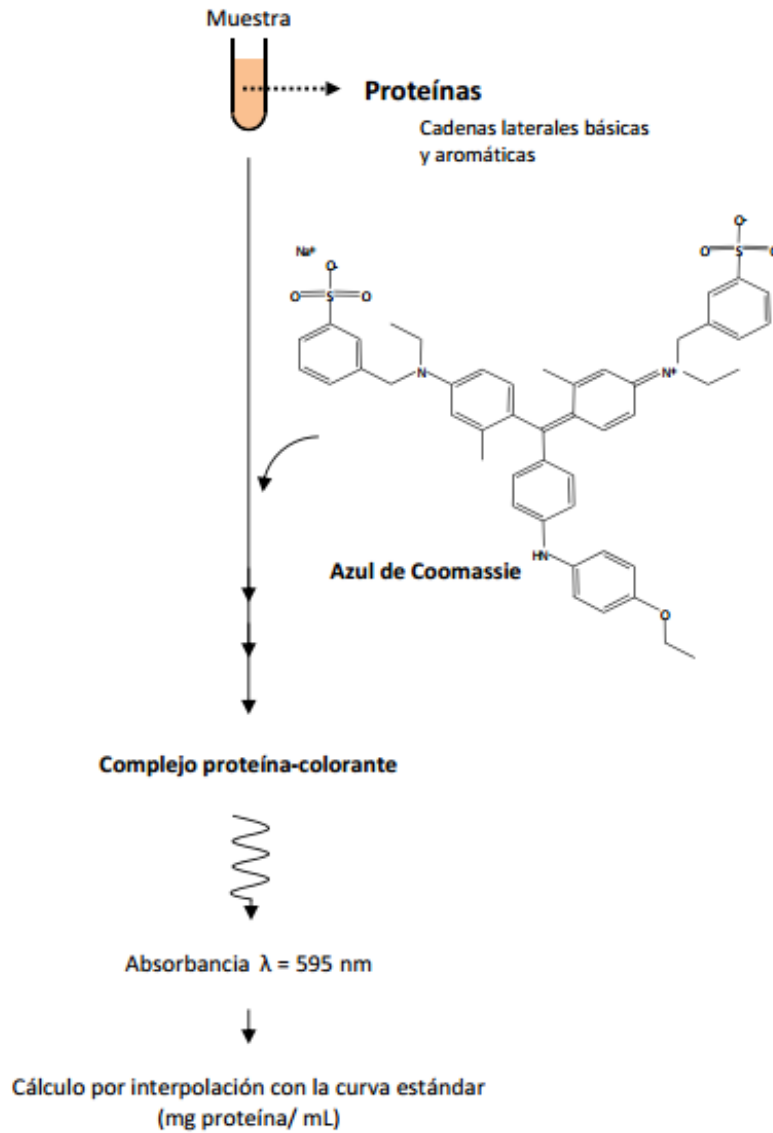


Figura 8: Protocolo de cuantificación de proteínas.

4.6. Método estadístico

Se realizó un estudio estadístico descriptivo que consistió en calcular la media aritmética y la dispersión calculada mediante el error estándar. Las diferencias estadísticas entre los tres grupos estudiados se valoraron aplicando el test de la t de Student para datos no pareados. El valor de significación aceptado fue $\alpha = 0.05$.

5. RESULTADOS

Fluidez en la membrana celular

Los niveles de fluidez en las membranas celulares de los hepatocitos de las ratas control fueron 3.01 ± 0.05 . En el grupo de ratas sometidas a isquemia 3.12 ± 0.14 y en el de la reperfusión 2.92 ± 0.04 . El estudio inferencial demostró que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos control e isquemia. Los niveles más bajos de fluidez en la membrana celular se obtuvieron en el grupo de 30 minutos de reperfusión. Estos resultados fueron estadísticamente significativos respecto a los grupos control e isquemia (Figura 9).

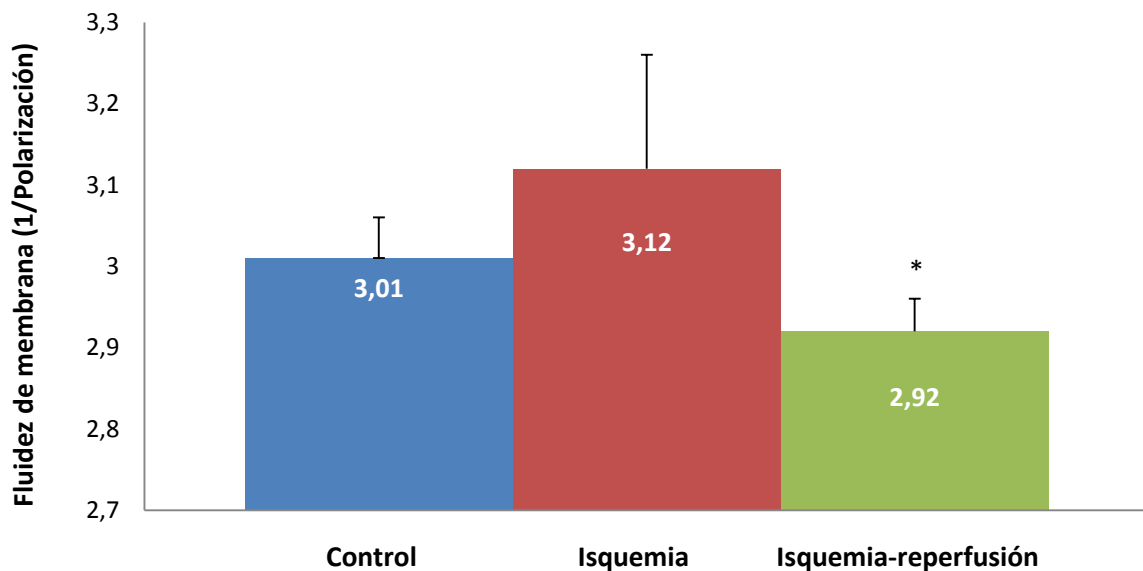


Figura 9: Fluidez en la membrana celular del tejido hepático. $n = 4$ / grupo. $p \leq 0.05$ vs control e isquemia.

Fluidez en la mitocondria.

En las mitocondrias obtenidas de la muestra de hígado no se obtuvieron cambios estadísticamente significativos. Sin embargo, el nivel de fluidez de la mitocondria fue más bajo en el grupo de isquemia-reperfusión. Los resultados para cada grupo fueron: Control: 2.98 ± 0.06 ; Isquemia: 3.05 ± 0.07 ; Isquemia-reperfusión: 2.92 ± 0.03 . La fluidez de la membrana mitocondrial no se modificó significativamente con 15 minutos de isquemia o con 30 minutos de reperfusión tras la isquemia (Figura 10).

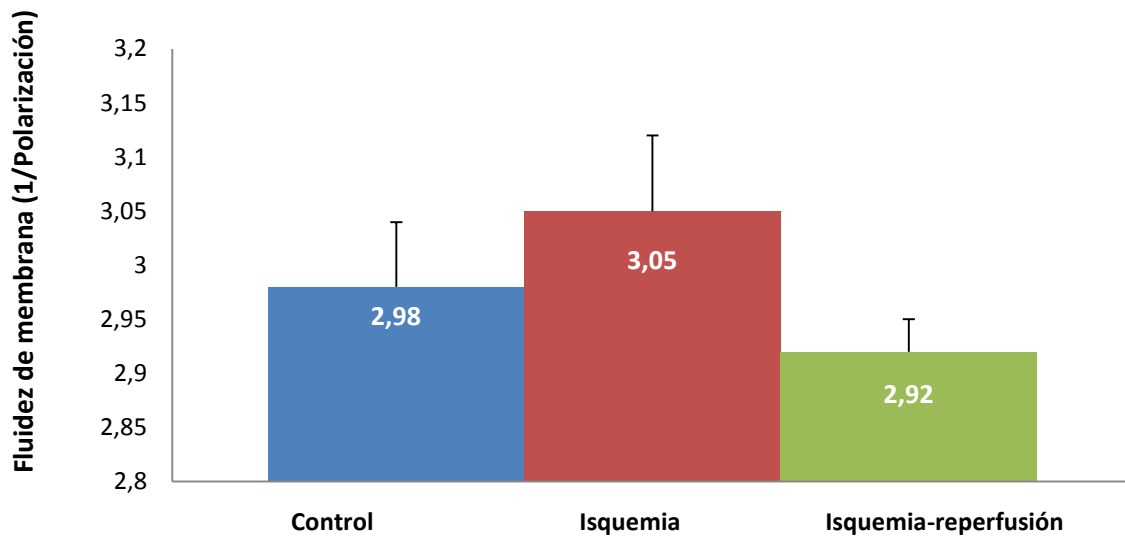


Figura 10: Fluidez en la membrana mitocondrial. n = 4 / grupo.

6. DISCUSIÓN

El objetivo del presente trabajo es analizar los efectos celulares que se inducen en el hígado como consecuencia de la isquemia y la reperfusión cuando éste es revascularizado, haciendo hincapié en los mecanismos que modifican la fluidez de las membranas biológicas, tanto celulares como mitocondriales y que llevan al deterioro de la función del órgano.

Los resultados obtenidos demuestran un descenso de la fluidez de la membrana celular en el grupo de isquemia-reperfusión en comparación con el grupo control. No ocurre lo mismo respecto a la fluidez de la membrana mitocondrial, cuyo descenso no resulta estadísticamente significativo. De los resultados se deduce que la característica fundamental del daño tisular tras la isquemia-reperfusión es la disminución de la fluidez de la membrana celular, cuyo factor productor es el estrés oxidativo que tiene lugar durante la fase de revascularización. El hecho de que la diferencia de fluidez en la membrana mitocondrial no resulte estadísticamente significativa se debe, por un lado, a que el tamaño muestral es pequeño. Un aumento en el número de casos por grupo reduciría el error estándar del estudio. Por otro lado, en estudios realizados en hígados de rata se demostró que la mayoría de las moléculas de anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) formados en la mitocondria son neutralizadas por la enzima mitocondrial superóxido dismutasa mitocondrial (Mn-SOD), principal

mecanismo antioxidante que reduce el daño oxidativo. Este hecho protege la membrana mitocondrial de los efectos adversos del anión superóxido.

La isquemia-reperfusión conduce a la lesión hepática a través de una serie de eventos celulares y moleculares cuya severidad es tiempo dependiente, y en la que además influye el funcionamiento basal del hígado. En la fase de isquemia se produce la reducción de la función mitocondrial. La hipoxia persistente induce un fallo energético de la bomba Na^+K^+ -ATPasa de membrana con entrada de sodio y de calcio en la célula, aumento de la presión osmótica y edema intracelular. El calcio intracelular activa la fosfolipasa A_2 (Borowitz SM y cols., 1989), relacionada con la degradación de fosfolípidos asociados a la membrana (Pompella A y cols., 1987; Rodriguez AA y cols., 1991) y produce un aumento de ácidos grasos libres. Por otro lado, la hipoxia inhibe el recambio de fosfolípidos en el proceso de acilación-desacilación, dependiente de energía, por lo que la síntesis de fosfolípidos queda reducida (Ferrero ME y cols., 1990). Este último hecho deteriora la membrana y genera acúmulo de un precursor de los fosfolípidos de membrana, el ácido araquidónico (Halliwell B y cols., 1984). El ácido araquidónico favorece la formación de endoperóxidos, como leucotrienos, que inducen reacciones inflamatorias y la agregación plaquetaria.

Tras la hipoxia, el endotelio lesionado constituye la fuente principal de ERO, hecho que se relaciona directamente con la disminución de la fluidez de las membranas biológicas. Durante las primeras etapas de la reperfusión, la isquemia induce un incremento significativo de la susceptibilidad al estrés oxidativo por parte del tejido hepático (Sies H, 1985; Slater TF, 1990). En último término, la situación de estrés oxidativo se caracteriza por la destrucción peroxidativa de los lípidos que forman parte de las membranas celulares (Von Ruecker AA y cols., 1989; Bisby RH, 1990). Las condiciones de anoxia y el incremento de calcio intracelular inducen la transformación de la xantina deshidrogenasa en xantina oxidasa, que cataliza la conversión de hipoxantina en xantina durante el catabolismo del ATP. Ésta enzima, durante la reperfusión, transforma el oxígeno molecular en anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) que inicia reacciones mediadas por radicales libres, produciendo la peroxidación de los lípidos de la membrana (Fariss MW, 1985). La rigidez aumenta a medida que los radicales libres cambian la composición química de la membrana, produciéndose una reducción de la relación de ácidos grasos poliinsaturados versus saturados.

Además de las alteraciones bioquímicas, y como consecuencia de éstas, es importante estudiar los cambios morfológicos celulares que tienen lugar durante la isquemia y que determinarán la funcionalidad de las células tras el proceso (Ohkohchi

N y cols., 1991). En primer lugar se afecta el endotelio del sinusoides, cuyas lesiones aparecen en un orden cronológico que depende de la severidad y duración del daño isquémico (Myagkaya GL y cols., 1984; Carey D y cols., 1991). Las lesiones en los hepatocitos alteran la membrana citoplasmática y los orgánulos celulares, de forma que en primer lugar se observa edema de las estructuras celulares, que progresa hasta que se producen alteraciones de la membrana nuclear y ruptura lisosomal con vertido de enzimas proteolíticas (Frederiks WM, 1983). Tras la revascularización del órgano se produce desestructuración del lobulillo hepático y necrosis hepatocitaria (Subirats Bayego E, 1982; Lemaster JJ y Thurman RG, 1985). Tal y como se ha descrito en la literatura con anterioridad, cuanto más prolongada es la isquemia sufrida por el hígado, mayores son los fenómenos post-reperfusión (Mora N y cols., 1986), propiciada por la importante alteración en la permeabilidad vascular por la vasoconstricción inducida por agentes vasoactivos (Lai CS y Piette LH, 1977; Ueda Y y cols., 1987; Anderson BD y cols., 1991), así como por la acumulación de neutrófilos polimorfonucleares en el endotelio vascular, que ocluyen capilares impidiendo la circulación, con la consiguiente necrosis de la masa hepática circundante (Starke PE y Farber JL, 1985; Carey D y cols., 1991).

7. CONCLUSIONES

Primera: Tras un periodo de isquemia de 15 minutos, las membranas celulares y mitocondriales no modifican sus niveles de fluidez.

Segunda: La reperfusión del tejido hepático isquémico produjo rigidez en las membranas celulares y mitocondriales, si bien los cambios solo fueron significativos en las membranas celulares.

Tercera: Dado que en los fenómenos de la isquemia – reperfusión el estrés oxidativo se produce sólo durante la reperfusión, y que éste induce rigidez en las membranas biológicas, los resultados obtenidos en este estudio apoyan la hipótesis de que el estrés oxidativo es un factor clave en la etiopatogenia de las lesiones por isquemia – reperfusión.

8. BIBLIOGRAFÍA

Anderson BD, Bensard DD, Harken AH. The role of Platelet Activating Factor and its antagonist in shock, sepsis and multiple organ failure. *Surg.Gynecol. & Obstetr* 1991; 172: 415-424.

Bast A, Haenen GR, Doelman CJ. Oxidants and antioxidants: state of the art. *Am. J. Med.* 1991; 91(suppl. 3C); 2S–13S.

Belous A, Knox C, Nicoud IB, y cols. Altered ATP-dependent mitochondrial Ca^{2+} uptake in cold ischemia is attenuated by ruthenium red. *J Surg Res* 2003; 111(2): 284-9.

Bisby RH. Interactions of vitamine E with free radicals and membranes. *Free Rad. Res. Commun.* 1990; 8: 299-306.

Blankensteijn JD, Terpstra OT. Liver preservation: the past and the future. *Hepatology* 1991; 13 (6): 1235-50.

Borowitz SM., Montgomery C. The role of phospholipase A2 in microsomal lipid peroxidation induced with t-Butyl Hidroperoxide. *Biochim and Biophys.* 1989; 158: 1021-1028.

Boudjema K, Lindell SL, Southard JG, Belzer FO. The effects of fasting on the quality of liver preservation by simple cold storage. *Transplantation* 1990; 50(6): 943-8.

Caldwell-Kenkel JC, Currin RT, Tanaka Y, y cols. Kupffer cell activation and endothelial cell damage after storage of rat livers: effects of reperfusion. *Hepatology* 1991; 13(1): 83-95.

Carey D, Wu J, Sohiyama H, Wu T. Validation of the morphologic end point necrosis in rat hepatocytes subjected to oxyradical damage. *Biochem. Cell. Biol.* 1991; 69: 689—694.

Carey D, Wu J, Sohiyama H, Wu T. Validation of the morphologic end point necrosis in rat hepatocytes subjected to oxyradical damage. *Biochemistry and Cell Biology* 1991; 69: 689-694.

Casini A, Ceni E, Salzano R, Biondi P, Parola M, Galli A, Foschi M, Caligiuri A, Pinzani M, Surrenti C. Neutrophil-derived superoxide anion induces lipid peroxidation and

stimulates collagen synthesis in human hepatic stellate cells: role of nitric oxide, *Hepatology* 1997; 25: 361–367.

Clavien PA, Harvey PR, Strasberg SM. Preservation and reperfusion injuries in liver allografts. An overview and synthesis of current studies. *Transplantation*. 1992; 53:957-978.

Colletti LM, Remick DG, Burtch GD, Kunkel SL, Strieter RM, Campbell Jr DA. Role of tumor necrosis factor-alpha in the pathophysiologic alterations after hepatic ischemia/reperfusion injury in the rat. *The Journal of Clinical Investigation*. 1990; 85: 1936–43.

Curtis MT, Gilfor D, Farber JL. Lipid peroxidation increases the molecular order of microsomal membranes. *Arch Biochem Biophys* 1984; 235: 644-649.

Cutrin JC, Perrelli MG, Cavalieri B, Peralta C, Catafau JR, Poli G, Microvascular dysfunction induced by reperfusion injury and protective effect of ischemic preconditioning, *Free Radic. Biol. Med.* 2002; 33: 1200–1208.

Cywes R, Packham MA, Tietze L., y cols. Role of platelets in hepatic allograft preservation injury in the rat. *Hepatology* 1993; 18(3): 635-47.

Fan C, Zwacka RM, Engelhardt JF. Therapeutic approaches for ischemia/reperfusion injury in the liver. *Journal of Molecular Medicine* 1999; 77: 577–92.

Fariss MW. Vitamine E reversal of the effect of extracellular calcium on chemically induced toxicity in hepatocytes. *Science* 1985; 227: 751 –754.

Ferrero ME, Marni A, Gaja G. Prevention of impaired liver metabolism due to ischemia in rats. Efficacy of defibrotide administration. *Journal of hepatology*. 1990; 10: 223-227.

Frederiks WM. The value of enzyme leakage for the prediction of necrosis in liver ischemia: *Histochemistry* 1983; 78: 459-466.

Galaris D, Barbouti A, Korantzopoulos P. Oxidative stress in hepatic ischemia-reperfusion injury: The role of antioxidants and iron chelating compounds. *Current Pharmaceutical Design* 2006; 12: 2875–90.

Ghosh C, Dick RM, Ali SF. Iron/ascorbate-induced lipid peroxidation changes membrane fluidity and muscarinic cholinergic receptor binding in rat frontal cortex. *Neurochem Int* 1993; 23: 479-483.

Graham JM. Homogenization of tissues and cells. *Suncellular fractionation: A practical approach* 1997: 1-29.

Green DR, Kroemer G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 2004; 305 (5684): 626-9.

Guyton AC, Hall JE. *Tratado de fisiología médica*. 11 ed. Barcelona: Elsevier: 2006; 11-26.

Halliwell B, Gutteridge JMC. Oxidative stress: adaptation, damage, repair and death. *Free Radicals in Biology and Medicine* 1999; 246–350.

Halliwell B, Gutteridge JMC. Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage and antioxidant therapy. *The Lancet* 1984; 1: 1396-1397.

Husted TL, Lentsch AB. The role of cytokines in pharmacological modulation of hepatic ischemia/reperfusion injury. *Current Pharmaceutical Design* 2006; 12: 2867–73.

Jaeschke H, Bautista AP, Spolarics Z, Spitzer JJ. Superoxide generation by Kupffer cells and priming of neutrophils during reperfusion after hepatic ischemia. *Free Radic. Res. Commun* 1991; 15: 277–284.

Jaeschke H. Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury. *Journal of Gastroenterology & Hepatology*. 2000; 15: 718–24.

Knox CD, Pierce JM, Nicoud IB, y cols. Inhibition of phospholipase C attenuates liver mitochondrial calcium overload following cold ischemia. *Transplantation* 2006; 81(4): 567-72.

Koo A, Komatsu H, y cols. Contribution of no-reflow phenomenon to hepatic injury after ischemia-reperfusion: Evidence for a role for superoxide anion. *Hepatology*. 1992; 15:507–14.

Kukan M, Haddad PS. Role of hepatocytes and bile duct cells in preservation-reperfusion injury of liver grafts. *Liver Transpl* 2001; 7(5): 381-400.

Kutchai HC. Fisiología celular. Levy MN, Koeppen BM, Stanton BA. Berne y Levy Fisiología. 4ª ed. Madrid: Elsevier; 2006; 3-20.

Lai CS, Piette LH. Hydroxyl radical production involved in lipid peroxidation of rat liver microsomes. *Biochem. Biophys.* 1977; 78: 51-59.

Lemaster JJ, Thurman RG. Centrilobular injury following hypoxia in isolated perfused rat liver. *Science* 1985; 213: 661-662.

Lentsch AB, Kato A, Yoshidome H, McMasters KM, Edwards MJ. Inflammatory mechanisms and therapeutic strategies for warm hepatic ischemia/reperfusion injury. *Hepatology.* 2000; 32: 169–73.

Maathuis MH, De Groot M, Ploeg RJ, Leuvenink HG. Deterioration of endothelial and smooth muscle cell function in DCD kidneys after static cold storage in IGL-1 or UW. *J Surg Res* 2006; 152(2): 231-7.

Malhi H, Gores GJ. Cellular and molecular mechanisms of liver injury. *Gastroenterology* 2008; 134 (6): 1641-54.

Mora N, Cienfuegos JA, Castillo-Olivares JL, Figuera Aymerich D. Preservación hepática: Situación actual y perspectivas. *Revista Española de enfermedades del aparato digestivo* 1986; 69: 177-184.

Myagkaya GL, Van Veen H, James J. Ultrastructural changes in rat liver sinusoids during prolonged normothermic and hypothermic ischemia in vitro. *Virchow Arch.* 1984; 47: 361-369.

Natori S, Higuchi H, Contreras P, Gores GJ. The caspase inhibitor IDN-6556 prevents caspase activation and apoptosis in sinusoidal endothelial cells during liver preservation injury. *Liver Transpl.* 2003; 9(3): 278-84.

Nieminen AL, Byrne AM, Herman B, Lemasters JJ. Mitochondrial permeability transition in hepatocytes induced by t-BuOOH: NAD(P)H and reactive oxygen species. *The American Journal of Physiology* 1997; 272: C1286–94.

Nordmann R. Alcohol and antioxidant systems. *Alcohol* 1994; 29: 513–522.

Ohkohchi N, Sakurada M. Role of free radicals and energy synthesis on primary graft nonfunction in liver transplantation. *Transp. Proc.* 1991; 23: 2416-2419.

Pompella A, Maellaro E, Casini AF. Histochemical detection of lipid peroxidation in the liver of Bromobenzene-poisoned mice. *Am. J. of Pathology*, 1987; 129: 295-301.

Rodriguez AA., Lattore WW., Haurahan LM. Y cols. Liver viability after ischemia reperfusion. *Arch Surgery* 1991; 126: 767-772.

Saugstad OD, Aasen AO. Plasma hypoxanthine concentrations in pigs. A prognostic aid in hypoxia. *European Surgical Research. Europäische Chirurgische Forschung*. 1980; 12: 123-9.

Saugstad OD. Role of xanthine oxidase and its inhibitor in hypoxia: Reoxygenation injury. *Pediatrics* 1996; 98: 103-7.

Scheinichen D, Zu Vilsendorf AM, Weissig A, y cols. Reduced P-selectin expression on circulating platelets after prolonged cold preservation in renal transplantation. *Clin Transplant* 2003; 17(5): 444-50.

Schwabe RF, Brenner DA. Mechanisms of liver injury. I. TNF-alpha-induced liver injury: Role of IKK, JNK, and ROS pathways. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal & Liver Physiology*. 2006; 290: G583-9.

Shinitzky M. Membrane fluidity and cellular function. *Physiology of membrane fluidity*, 1984; 1: 1-51.

Sies H. *Oxidative stress*. Academic Press 1985: 507.

Slater TF, Cheesman KH, Benedetto O, Collins M y cols. Studies on the Hyperplasia ("regeneration") of the rat liver following partial hepatectomy. *Biochem J*. 1990; 265: 51-59.

Sindram D, Kohli V, Madden JF, Clavien PA. Calpain inhibition prevents sinusoidal endothelial cell apoptosis in the cold ischemic rat liver. *Transplantation* 1999; 68(1): 136-40.

Singer SJ, Nicolson GL. The fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes. *Science, New Series* 1972; 175: 720-731.

Song SW, Guo KJ, Shi R, y cols. Pretreatment with calcitonin gene-related peptide attenuates hepatic ischemia/reperfusion injury in rats. *Transplant Proc* 2009; 41 (5): 1493-8.

Starke PE, Farber JL. Ferric iron and superoxide ions are required for the killing of cultured hepatocytes by hydrogen peroxide. *The Journal of Biological Chemistry* 1985; 260: 10099-10104.

Stirpe F, Della Corte E. The regulation of rat liver xanthine oxidase. Conversion in vitro of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) to oxidase (type O). *The Journal of Biological Chemistry*. 1969; 244: 3855–63.

Subirats Bayego E. Cambios histológicos en el hígado hipóxico. Estudio experimental. *Revista Clínica Española* 1982; 166: 145-151.

Suzuki S, Toledo-Pereyra LH. Interleukin 1 and tumor necrosis factor production as the initial stimulants of liver ischemia and reperfusion injury. *The Journal of Surgical Research* 1994; 57: 253–8.

Taniguchi M, Uchinami M, y cols. Edaravone reduces ischemia-reperfusion injury mediators in rat liver. *Journal of Surgical Research*. 2007; 137: 69–74.

Ueda Y, Matsuo K, Kamei T. y col. Prostaglandin E1 but not E2 is cytoprotective of energy metabolism and reticuloendothelial in the ischemic canine liver. *Transplantation Proc.* 1987; 19: 1329-1330.

Van Der Meer W. Physical aspects of membrane fluidity. *Physiology of membrane fluidity*, 1984; 1: 53-71.

Von Ruecker AA, Ham-Jeon BG, Wild M, Bidlingmaier F. Protein kinase c involvement in lipid peroxidation and cell membrane damage induced by oxygen based radicals in hepatocytes. *Biochim. and Biophys.* 1989; 163: 836-842.

Yamada T. Grisham M.B., Role of neutrophil-derived oxidants in the pathogenesis of intestinal inflammation, *Klin. Wochenschr* 1991; 69: 988–994.

Yu BP., Suescun EA y cols. Effect of age-related lipid peroxidation on membrane fluidity and phospholipase A2: modulation by dietary restriction. *Mecg Ageing* 1992; 65(1): 17-33.

Zhou W, McCollum MO, Levine BA, Olson MS. Inflammation and platelet-activating factor production during hepatic ischemia/reperfusion. *Hepatology* 1992; 16: 1236–40.

Zhu J, Wang S, Bie P, y cols. Apoptosis and regeneration of sinusoidal endothelial cells after extended cold preservation and transplantation of rat liver. *Transplantation* 2007; 84(11): 1483-91.

Zimmer G, Thürich T, Scheer B. Membrane fluidity and vitamin E. *Vitamin E in health and disease*, 1993: 207-213.