

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CIRUGIA**

**POSIBLE EFECTO PROTECTOR DE
LA S-ADENOSIL-L-METIONINA EN UN
MODELO DE ISQUEMIA-
REPERFUSION HEPATICA**

Directores:

Prof. Dr. J.L. Balibrea Cantero

Prof. Dr. J. Arias Díaz

Tesis Doctoral

María del Carmen García Carreras

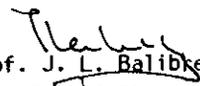
1996

INFORME DEL DIRECTOR DE LA TESIS

La Tesis Doctoral "POSIBLE EFECTO PROTECTOR DE LA S-ADENOSIL-L-METIONINA EN UN MODELO DE ISQUEMIA -REPERFUSION HEPATICA", realizada por D^a M^a del Carmen García Carreras, reúne las condiciones de contenido y forma para ser presentada ante el Tribunal Calificador.

V^o B^o
EL TUTOR (2)

El Director de la Tesis


Prof. J. L. Balibrea DNI 2.011.048
CATEDRÁTICO DPTO. CIRUGIA

Fdo.: _____
(Fecha y firma)

DNI

Fdo.:  _____
(Fecha y firma) 12-4-96

DNI 24.154.107

INFORME DEL CONSEJO DE DEPARTAMENTO

La Tesis Doctoral "POSIBLE EFECTO PROTECTOR DE LA S-ADENOSIL-L-METIONINA EN UN MODELO DE ISQUEMIA REPERFUSION HEPATICA", realizada por D^a M^a del Carmen García Carreras, ha sido considerada por el Consejo de Departamento apta para ser presentada ante el Tribunal Calificador.

Fecha reunión
Consejo Departamento

15-4-96



Fdo. Prof. J. L. Balibrea
(Fecha y firma) 25-6-96

AGRADECIMIENTOS

Al Profesor José Luis Balibrea Cantero, Catedrático del Departamento de Cirugía de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, cuya calidad humana, docente y profesional hacen de él un modelo a imitar por todos los que nos consideramos discípulos suyos.

Al Doctor Javier Arias Díaz, Profesor Asociado del Departamento de Cirugía de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, ejemplo perfecto de las aptitudes que debe reunir el cirujano moderno: infatigable espíritu de trabajo, rigor científico y capacidad de innovación; es un honor poder trabajar bajo su férrea dirección.

A la Doctora Elena Vara Ameigeiras, Profesora Titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, sin cuya intervención a todos los niveles este trabajo no hubiera podido realizarse. Gracias por tener siempre tiempo para mí, paciencia con mis limitados conocimientos bioquímicos y confianza en mis posibilidades. Y gracias, sobre todo, por darme la oportunidad de volver a la Investigación Básica, sin la cual no sería posible el avance en la Terapéutica Médico-Quirúrgica.

A la Doctora Cruz García Martín, Profesora Titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, por la inagotable paciencia y buen humor demostrados durante la realización de esta Tesis y, especialmente por guiarme en el intrincado mundo del Laboratorio de Bioquímica.

A Nati, por estar siempre dispuesta a compartir sus conocimientos y habilidades, sin perder nunca la sonrisa, y por su gran capacidad para el trabajo en equipo.

A mis compañeros residentes del Servicio de Cirugía II del Hospital Universitario "San Carlos", de manera muy especial a Jorge, Angel, Antonio, Joaquín, Juan y José Manuel, por su sincera amistad y por su inquebrantable apoyo en los momentos difíciles.

Al resto de los miembros del Servicio de Cirugía II, en especial al Doctor Antonio José Torres García, tutor de residentes, y como tal permanentemente preocupado por la calidad de nuestra formación; y al Doctor Manuel Sanz López, magnífico cirujano y estudioso incansable de cuantas mejoras puedan aportarse al cuidado de los pacientes.

A María Jesús Sacristán, mi querida profesora de Biología del Bachillerato, que logró contagiarme su entusiasmo por la Bioquímica.

A mis padres, por sus sacrificios, por su ejemplo y por su apoyo. A mis hermanas, por su cariño.

A Marian, Ana Isabel y Celso, por su generosidad y por estar siempre conmigo.

A Celso

Índice

INTRODUCCION	1
HIPOTESIS	45
OBJETIVOS CONCRETOS	47
MATERIAL Y METODOS	49
RESULTADOS	62
DISCUSION	108
CONCLUSIONES	125
BIBLIOGRAFIA	127

INTRODUCCION

Actualmente, el trasplante hepático es el tratamiento de elección en diversas patologías del hígado (1), si bien dicha intervención no está exenta de complicaciones, y la frecuencia de disfunción primaria del injerto oscila entre el 5 y el 15% (2). Recientemente se ha establecido que existe relación entre el grado de lesión precoz sobre el injerto, y la incidencia de rechazo desde el punto de vista clínico (3).

Los mecanismos implicados en el daño hepatocelular son complejos, y tienen lugar tanto en la fase de isquemia como en la fase de reperfusión del tejido hepático, aunque últimamente se ha demostrado una mayor importancia del daño reperfusional tras el período de isquemia fría en el trasplante (4).

En el esclarecimiento de las causas de estas lesiones, se han implicado numerosos mecanismos, incluyendo la migración y activación de leucocitos (5), lesión de células endoteliales (6), activación del sistema de la coagulación (7), liberación de mediadores por las células de Kupffer activadas (8-11) y la formación de radicales libres (12).

El glutathion es un tripéptido presente en prácticamente todas las células. Una de sus funciones mejor conocidas es la de participar como cosustrato de la glutathion-peroxidasa, que cataliza la reducción de los peróxidos generados intracelularmente (13). El sistema de la glutathion-peroxidasa, junto con la catalasa, la superóxidodismutasa y los

antioxidantes solubles de carácter lipídico, suponen un mecanismo de defensa enormemente eficaz frente a los radicales libres del oxígeno. A nivel hepático, este potente sistema confiere a los hepatocitos una gran resistencia a la lesión por dichos mediadores. Además, el glutatión podría disminuir la producción de radicales libres (14), frenar el mecanismo de amplificación de la peroxidación lipídica (15), e incluso sería capaz de “detoxificar” los mediadores liberados por las células inflamatorias en el espacio extracelular del hígado (16).

En estudios experimentales, se ha observado que la depleción *in vivo* de glutatión podría prevenirse por la administración de su precursor, S-adenosil-metionina, que en estudios farmacológicos ha demostrado tener propiedades citoprotectoras a nivel hepático, tanto frente a la acción de tóxicos diversos como de citoquinas (17-21).

ISQUEMIA-REPERFUSION

Podría definirse la isquemia como la disminución del aporte sanguíneo a un determinado territorio. La alteración resultante derivaría de la reducción de la oferta de oxígeno y nutrientes a los tejidos. A partir de un tiempo determinado, (variable en los diversos órganos y tejidos), supone la muerte celular.

Los órganos y tejidos sometidos a temperaturas bajas, soportan mejor la isquemia que los que están en condiciones normotérmicas, debido

a la reducción de las necesidades metabólicas que la hipotermia provoca; de aquí los conceptos, claves en la cirugía de trasplantes, de isquemia fría o caliente.

Llama la atención la poca trascendencia del daño isquémico en los aspectos morfológico y estructural. Por ejemplo, las imágenes que los tratados de Histología presentan como “normales”, corresponden a tejidos que han estado sometidos a isquemia durante prolongados períodos de tiempo (22). En Microscopía Electrónica, las alteraciones se detectan más precozmente. Sin embargo, el daño funcional secundario a la isquemia es muy acusado. Es más, a primera vista podría decirse que es desproporcionado. Esto es así porque los seres vivos necesitan energía no solo para realizar sus funciones, sino también para mantener su integridad en reposo. Es decir, “la anoxia no solamente detiene la máquina, sino que también deteriora la maquinaria”. Además, en los organismos muy evolucionados, la reperfusión tras la isquemia (más específicamente, la reoxigenación), es potencialmente más dañina *per se*. Se ha denominado también a este fenómeno como “la paradoja del oxígeno” (23), y esta expresión traduce el daño provocado por el mismo a través de las alteraciones sufridas por los sistemas metabólicos durante la isquemia.

La falta de aporte de oxígeno determina, a nivel celular, una depleción de ATP, cuya síntesis disminuye por la inhibición del ciclo de

Krebs, y cuya degradación a hipoxantina, (previa conversión en AMP, adenosina e inosina), será responsable, en parte, de la formación del radical superóxido en la fase de reperfusión. Si la isquemia no es muy prolongada, el *pool* de ATP se regenera; si no, se producirá la muerte celular.

La concentración extracelular de calcio es 10.000 veces mayor que la intracelular, merced a un proceso de transporte activo, con intervención de una ATPasa. La caída del nivel de energía impide el correcto funcionamiento de esta bomba enzimática, con lo que el calcio penetra en la célula y se eleva su concentración citosólica. Además, gran parte del calcio intracelular está, en condiciones normales, secuestrado en las mitocondrias y en el retículo endoplasmático, siendo debida esta distribución intracelular a un sistema activo, (motor de protones), situado en la cara interna de la mitocondria, y acoplado a la fosforilación oxidativa (24). Es decir, que la distribución del calcio está regulada por un complejo mecanismo, que implica a varios mediadores, receptores y enzimas (25).

Secundariamente a la caída energética, por tanto, se elevará el calcio citosólico por dos vías: una, la entrada masiva desde el espacio extracelular; la otra, la liberación del calcio almacenado en las organelas intracelulares (mitocondrias, retículo endoplásmico). Esta elevación se produce ya en la fase de isquemia, pero posteriormente, en la reperfusión,

y como consecuencia de la formación de radicales libres, se movilizará el calcio extracelular.

El aumento de la concentración intracelular de calcio provoca la activación de proteasas citosólicas calcio-dependientes, responsables de la rotura del citoesqueleto, con el consiguiente "abollonamiento" (*blebbing*) de la superficie celular, y, en segundo lugar, a través de la activación de la fosfolipasa A₂, la activación de la cascada de ácido araquidónico, previa liberación de éste de los fosfolípidos de membrana (26,27), siendo los metabolitos finales las prostaglandinas (por la vía de la ciclooxigenasa), y los leucotrienos (por la acción de la lipooxigenasa). Entre estos mediadores destacan el leucotrieno B₄ y el tromboxano A₂, que tienen un potente efecto quimiotáctico sobre los polimorfonucleares neutrófilos, a los que, además, estimulan para que liberen peróxido de hidrógeno y elastasa, con el consiguiente aumento de la permeabilidad endotelial. Tras la isquemia-reperfusión, se produce un desequilibrio entre la producción de prostaciclina (PGI₂) y tromboxano A₂, a favor de éste último, lo cual provocará vasoconstricción marcada (26).

En 1978, Haglund y Lundgren (28), observaron, en un modelo experimental en intestino delgado, que la perfusión provocaba mayor permeabilidad capilar que la isquemia. Parks y Granger, en 1986, demostraron, también en intestino delgado, que el daño mucoso era

significativamente mayor tras tres horas de isquemia y una de reperfusión, que tras cuatro horas de isquemia (29), y observaron que cuando la reperfusión se realizaba con sustancias deoxigenadas, el daño era menor que cuando se practicaba con sangre oxigenada. Así, se vuelve de nuevo al concepto de *reoxigenation injury* (22), y a la implicación de los radicales libres del oxígeno en las lesiones por isquemia-revascularización.

MODELOS EXPERIMENTALES

Para producir un daño significativo, es preciso que la isquemia hepática sea total. O'Donohue (30) demostró que la interrupción exclusiva de la arteria hepática apenas provoca lesiones, y que éstas son reversibles en poco tiempo. Así mismo, hay modelos experimentales que estudian los efectos de la isquemia completa pero sectorial, siendo bien tolerada.

En estudios experimentales con ratas, se ha observado que 90 minutos de isquemia hepática total van seguidos de la muerte del 100% de los animales (31); parece, pues, que el dintel de reversibilidad de la rata Wistar estaría alrededor de los 60 minutos en un modelo de isquemia completa sectorial (32).

En el perro, se ha visto que 30 minutos de maniobra de Pringle no provocan efectos apreciables (33), y que el daño hepático es severo a los 40 minutos (34-36).

Por otro lado, y como ya se ha comentado previamente, se ha visto que el daño inducido por la isquemia depende también de la temperatura a que esté sometido el órgano durante el tiempo de privación del flujo sanguíneo, siendo habitualmente menor en situación de hipotermia. Sin embargo, se han comunicado resultados sorprendentes en isquemia fría en un modelo porcino, en el cual el daño hepático, valorado mediante microscopía electrónica, fue más intenso bajo refrigeración que en situación de isquemia caliente (37).

Diversos trabajos (37-40), recogen los patrones morfológicos del daño isquémico y reperfusional, siendo las células de Kupffer las que parecen acusar de forma especial, en estudios ultraestructurales, el efecto de la isquemia (39,41,42).

Las alteraciones funcionales se expresan como variaciones en determinados parámetros bioquímicos, que traducen el estado funcional del hígado (30,43-45), si bien algunos estudios han permitido conocer, además, el efecto sobre la circulación hepática, (disminución de la microcirculación) (46), y sobre el flujo biliar, que se correlacionarían estrechamente con el estado energético del hepatocito.

Entre los numerosos modelos experimentales empleados en el estudio de la isquemia-reperusión hepática, la mayoría utilizan la rata como

animal de experimentación, por varias razones: bajo costo (respecto de otros animales), comodidad, y homogeneidad.

El ambiente en el que se produce la isquemia puede ser normotérmico, frío, o secuencial, con una fase normotérmica seguida de otra fría (37), como en el modelo de trasplante (47-49). La mayoría de los modelos de isquemia fría se realizan sobre órgano aislado (34,50-55), aunque también se han estudiado los efectos de la isquemia sobre cultivos celulares de hepatocitos y de células de Kupffer (38,39,41,56).

También es importante valorar la “cuantía” de la isquemia, a saber:

- Interrupción exclusiva del flujo de la arteria hepática, que, como ya se ha comentado, apenas acarrea trastornos (30,57).

- Isquemia total (arterial y portal), sin ninguna medida adicional que evite la congestión del territorio portal, reproduciendo las condiciones de la maniobra de Pringle (36,45,58).

- Isquemia total con shunt portosistémico, para evitar la congestión (31,36,58-63).

- Isquemia total con clampaje del tronco celíaco, o de éste y de la arteria mesentérica superior (46,64).

- Isquemia sectorial, afectando a una parte del territorio hepático, pero conservando el flujo hacia el resto (32,40,43,44,47,48,58,65,66).

Además de los modelos de interrupción vascular, se han desarrollado

modelos "tóxicos", en los cuales se induce la lesión hepática por medio de una toxina, como las endotoxinas bacterianas (67,68), el etanol (69), o el tetracloruro de carbono (70).

Por otra parte, los tiempos de isquemia y de reperfusión oscilan entre los 15 y los 120 minutos para ambos períodos, dando lugar a gran cantidad de combinaciones.

RADICALES LIBRES Y PEROXIDACION LIPIDICA

En la actualidad se asume que los radicales libres del oxígeno y la peroxidación lipídica juegan un papel determinante en la patogenia de la lesión tisular inducida por numerosos procesos, como la inflamación, la infección, agentes químicos o físicos, y el daño reperfusional.

Se ha estudiado a fondo el mecanismo hepatotóxico inducido por el tetracloruro de carbono, en modelos experimentales (71-73). Brevemente, la transformación de dicho producto a nivel del sistema microsomal hepático (en relación con el citocromo P-450), daría lugar al radical triclorometilo (CCl_3^*), que reaccionaría rápidamente con el oxígeno molecular, formándose el radical triclorometilperoxilo (CCl_3O_2^*). Estas moléculas iniciarían el proceso lesivo, mediante la unión covalente con macromoléculas celulares (como en el caso del radical triclorometilo), o la peroxidación de los lípidos de membrana (triclorometilperoxilo), y, en un

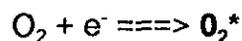
segundo paso, alterando la homeostasis intracelular del calcio libre. La compleja interacción entre estos mecanismos provocaría la amplificación y difusión del daño, expresándose en forma de acúmulo anormal de lípidos, y ocasionando la muerte celular.

Se han realizado estudios similares con otros productos, encontrando numerosos agentes químicos que, por sus características prooxidantes, provocarían toxicidad a nivel hepático principalmente por la vía de la peroxidación lipídica. Son, entre otros, además del tetracloruro de carbono, los siguientes: triclorobromometano, 1,2-dibromoetano, cloroformo, halotano, sobrecarga de hierro, etanol, paracetamol, bromobenceno, adriamicina, t-butil-hidroperóxido (74). Lo anteriormente expuesto se refuerza por la evidencia de la inhibición significativa de la peroxidación lipídica que tiene lugar al emplear agentes antioxidantes, como prometacina (75), vitamina E (76), silimarina (77), silibina (78), difenilfenilenediamina (74), o bien α -tocoferol-polietileno-glicol-succinato (79), entre otros.

Sin embargo, el daño celular secundario a los radicales libres puede producirse, además, por otros mecanismos, como la formación de enlaces covalentes y la alteración de la homeostasis del calcio (ya mencionados), pero también a través de la fragmentación del ADN o la depleción del glutatión y proteínas con grupos tiol (80).

Los radicales libres son sustancias químicas que poseen un electrón desapareado; también podrían definirse como fragmentos de una molécula. Pueden ser neutros o tener carga eléctrica positiva o negativa. Los más importantes en los sistemas biológicos son los derivados del oxígeno (81,82), y de éstos los principales serían:

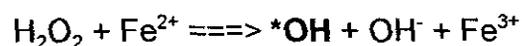
- el radical SUPEROXIDO: este radical libre, de carácter aniónico, se forma merced a la reducción del oxígeno por la transferencia de un electrón:



No es el más lesivo, posiblemente su función principal sea la de ser precursor del peróxido de hidrógeno, así como el reductor de iones metálicos (reducción de ión cúprico a cuproso, o de férrico a ferroso).

En situaciones de acidosis se transformaría en el radical perhidroxilo (HO_2^*), más reactivo, pero cuya concentración relativa en condiciones fisiológicas es menor del 1%.

- el radical HIDROXILO, que parece ser el más peligroso, pero que, sin embargo, tiene una vida media muy corta y un radio de acción limitado a las cercanías de su lugar de producción:



Mención aparte merece el PEROXIDO DE HIDROGENO, agente oxidante,

aunque no especialmente reactivo, y cuya mayor importancia reside en ser la fuente de radicales hidroxilo en presencia de iones de metales de transición (hierro, cobre) (83). En ausencia de estos metales, tanto el superóxido como el peróxido de hidrógeno se eliminan rápidamente y sin provocar daño (figura 1).

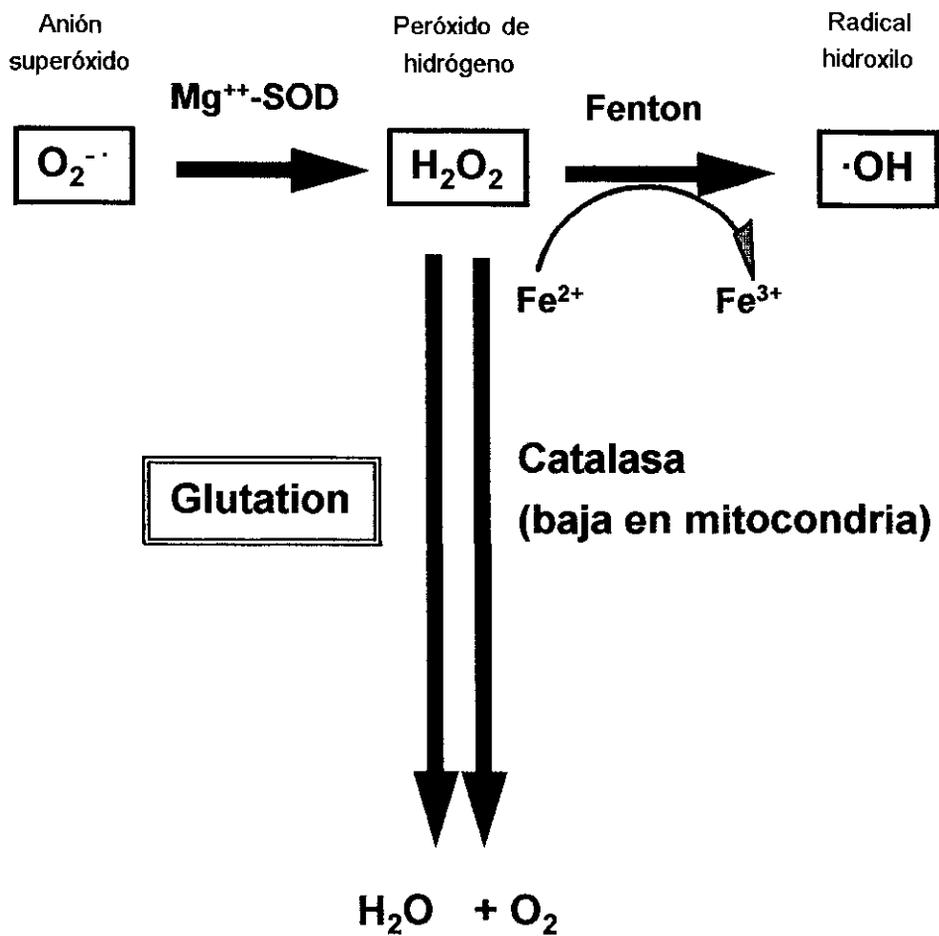


Figura 1

La mayoría de las moléculas biológicas pueden ser atacadas por los radicales libres, pero probablemente las más susceptibles sean los lípidos; Las membranas celulares contienen gran cantidad de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), cuya oxidación (peroxidación lipídica) es particularmente lesiva por tratarse de un proceso autoperpetuado. La oxidación de los PUFA genera un radical alquilo, que por la acción del oxígeno se transforma en un radical peroxilo, capaz de oxidar nuevos PUFA, para dar lugar a hidroperóxidos lipídicos, precursores de otros radicales libres (alcoxilo, peroxilo), y de aldehídos. Estos productos pueden difundir a partir del punto de la reacción original, y extender de este modo la lesión a otras zonas de la célula (figura 2).

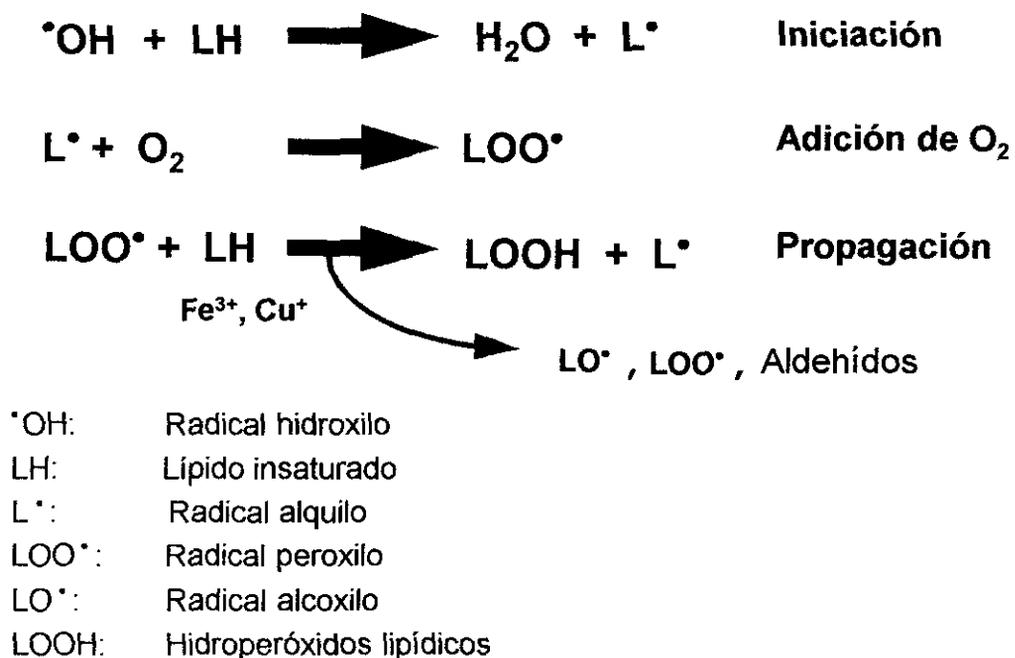


Figura 2

En resumen, la peroxidación lipídica provoca la fragmentación de las membranas y la formación de nuevos productos reactivos. Estos (peróxidos lipídicos), son potentes inhibidores de numerosas enzimas celulares, y además pueden descomponerse en otros metabolitos, tóxicos para proteínas y membranas (84-86).

El daño hepatocelular que aparece en situaciones de isquemia-reperfusión parece tener como una de sus causas principales la peroxidación lipídica. Apoyarían esta hipótesis: el aumento evidente de la resistencia hepática a la isquemia fría cuando se añaden a la solución de preservación, antioxidantes como el glutatión o el alopurinol (87), y la reciente demostración de la formación de radicales libres en ratas tras el trasplante ortotópico de hígado, detectados mediante "spin-resonancia" de los electrones (88).

La presencia de malondialdehído (MDA) en los hepatocitos, por ser un producto de peroxidación lipídica, demuestra que dicho proceso ha tenido lugar, y se utiliza como índice del mismo (89). El incremento en su liberación ocurre después de la formación de los radicales libres, lo cual también apoya la hipótesis de que la peroxidación lipídica es iniciada por los radicales libres del oxígeno (90).

La evidencia de que es inevitable cierta producción de radicales

libres, unida al hecho de que éstos son enormemente lesivos, indujo a pensar que deben existir mecanismos de defensa frente a los mismos. Se les conoce como “antioxidantes”, y pueden dividirse en dos categorías, según su modo de acción sea prevenir la formación de radicales, o bien la “intercepción” de los ya generados (91). Están presentes tanto en el citosol como en las membranas celulares; algunos son enzimas, otros no.

Uno de los mecanismos defensivos podría consistir en asegurar una transferencia adecuada de electrones, así como eliminar los iones metálicos de transición. Por ejemplo, el hierro se une fuertemente a proteínas como la transferrina y la ferritina, disminuyendo así la disponibilidad de iones férricos capaces de intervenir en reacciones de generación de radicales libres (92).

Otra posibilidad, sería la eliminación de los peróxidos ya formados (incluyendo el peróxido de hidrógeno y los peligrosos hidroperóxidos lipídicos). Aquí intervienen dos enzimas, catalasa y glutathion peroxidasa. La primera se localiza fundamentalmente en los peroxisomas, y cataliza la transformación del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno molecular. La glutathion peroxidasa es de ubicación citosólica y, utilizando como sustrato el glutathion, actúa tanto sobre el peróxido de hidrógeno como sobre los peróxidos lipídicos, formados previa liberación de los fosfolípidos de membrana por la fosfolipasa (93) (ver figura 1).

La otra opción sería interceptar los radicales libres antes de que actúen: las sustancias encargadas de ello se denominan “scavengers”. Uno de ellos, la superóxidodismutasa, es el único enzima conocido cuyo sustrato es un radical. Sin embargo, la mayoría de los “scavengers”, no son enzimas. El mejor conocido, localizado a nivel de la membrana celular, es el α -tocoferol, del grupo de la vitamina E (94). Su función es interceptar la acción de los radicales lipídicos peroxilos, deteniendo así la cadena de las reacciones de la peroxidación lipídica (95). El radical tocoferoxilo, formado en esta reacción, es relativamente estable, y, en condiciones normales, no es lo suficientemente reactivo como para iniciar *per se* la peroxidación lipídica. Otros antioxidantes, como el ubiquinol, actuarían por un mecanismo similar (96).

La vitamina C (ácido ascórbico), es un importante antioxidante, presente tanto en las células como en el plasma. *In vitro* se ha observado que es capaz de transformar el radical tocoferilo, de nuevo, en α -tocoferol (97). Otras sustancias que pueden interceptar los radicales libres son el ácido úrico, en el plasma, (98), o el glutatión en el citosol (91).

En un tercer grupo podríamos considerar “antioxidantes naturales” los procesos de reparación, a través de los cuales se eliminan las biomoléculas dañadas antes de que puedan alterar el metabolismo celular o comprometer su viabilidad. Por ejemplo, los ácidos nucleicos deteriorados

son reparados por enzimas específicos, las proteínas oxidadas son eliminadas por proteolisis, y los lípidos de membrana alterados son sometidos a la acción catabólica de lipasas, peroxidasas y aciltransferasas (82).

PAPEL DE LA ENDOTOXINA; RELACION CON OTROS MEDIADORES

El estudio de los efectos de la endotoxina y las citoquinas en el metabolismo hepatocelular tiene relevancia clínica porque, aunque no siempre, a menudo la disfunción del hígado acompaña al síndrome del fallo multiorgánico en pacientes quirúrgicos y traumatizados (99). Como veremos más adelante, en la fisiopatología de estos procesos, además de procesos macro- ó microscópicos de isquemia-reperfusión, interviene de modo decisivo la liberación de endotoxina por parte de microorganismos invasores y/o presentes en la flora intestinal.

El lipopolisacárido bacteriano (LPS) es un componente estructural de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas. De los factores microbianos implicados en la activación de la respuesta inflamatoria, es el mejor estudiado; Se le considera el mediador exógeno más importante del shock séptico (100).

El LPS está compuesto por una fracción antigénica, variable, de polisacáridos, unida al lípido A. La fracción de polisacáridos consiste en una

La endotoxina inicia la respuesta del huésped a través de la unión a un receptor, lo cual provoca la activación de diversos procesos intracelulares. En el plasma, el LPS puede unirse a proteínas, como la proteína "enlazante" de LPS (LBP, *LPS-binding-protein*) (103), formándose un complejo que puede unirse a la superficie de los leucocitos (104), a través del receptor CD14. El efecto final de esta vía, LBP/CD14-dependiente, es aumentar la sensibilidad de las células al LPS e inducir una respuesta más rápida de citoquinas. *In vitro*, se ha demostrado que la activación de los neutrófilos por la endotoxina hace que éstos produzcan elastasa (105), y radicales superóxido (106), y orientan, por tanto, hacia el mecanismo lesivo. La acción sinérgica de estos agentes provoca una considerable lesión epitelial.

Sin embargo, y a pesar del potente efecto de la endotoxina sobre los neutrófilos, parece que no son éstos las principales células efectoras que provocan la lesión orgánica inducida por la endotoxina, sino los macrófagos tisulares, que en respuesta a dicho producto dan lugar rápidamente a grandes cantidades de citoquinas, tales como el factor de necrosis tumoral (TNF α), y la interleuquina 1 (IL-1).

Pero también hay datos que apoyan la hipótesis de que algunos de los efectos de la endotoxina son causados por mediadores lipídicos, como el factor activador de las plaquetas (PAF), o los metabolitos del ácido

araquidónico, o incluso a través del sistema del complemento:

- la inyección directa del PAF reproduce muchos de los efectos del shock séptico, y el empleo de un antagonista selectivo del mismo inhibe la lesión pulmonar inducida por endotoxina en ratas (107).

- la endotoxemia activa el sistema del complemento, que a su vez activa a los neutrófilos y puede inducir *per se* una lesión pulmonar transitoria. El complemento activado, por otra parte, también facilita la adhesión de los neutrófilos al endotelio (108).

La endotoxina también activa la cascada de la coagulación, probablemente por activación del factor Hageman, y por aumento de monocitos y de la expresión endotelial del factor tisular (102). En un estudio experimental en mandriles con bacteriemia por *E. Coli*, se analizaron los efectos de la inmunización pasiva frente al factor tisular, observando que, en el grupo placebo, todos murieron en las primeras 24 horas, mientras que los animales inmunizados sobrevivieron hasta el final del estudio (109).

En la endotoxemia, el tono del músculo liso vascular está disminuido, lo cual provoca que haya hipotensión a pesar de existir un gasto cardíaco elevado. En este punto, el óxido nítrico (NO), parece jugar un importante papel (110). La vasodilatación es un proceso activo, que supone la producción previa en el citosol de guanosilmonofosfato cíclico (GMPc), que provocará la relajación de la fibra muscular lisa vascular.

La guanilatociclasa, enzima responsable de la síntesis del GMPc, se activa por el NO, y se ha sugerido que la hipotensión observada durante la sepsis podría deberse a una producción excesiva de NO (110).

Por otra parte, y aunque estudios previos *in vitro* sugerían que el NO era hepatotóxico por provocar disminución de la síntesis proteica por los hepatocitos en respuesta a la endotoxina y a la acción de citoquinas (111), estudios recientes *in vivo* sugieren que el NO podría tener un efecto incluso hepatoprotector durante la endotoxemia y la inflamación crónica, como demuestra la disminución de la necrosis hepatocelular, que se objetiva por una menor elevación de los niveles de la aspartatoaminotransferasa (AST), cuando se mantiene la producción de NO (112). Es más, parece que el NO podría estimular la síntesis proteica a nivel hepático en situaciones de sepsis (113).

CITOQUINAS: TNF α , IL-1, IL-6

Las citoquinas son polipéptidos producidos principalmente por células mononucleares en respuesta a numerosos estímulos. Entre ellas, se considera que el factor de necrosis tumoral y la interleuquina-1 juegan un importante papel en la fisiopatología de la sepsis y del fallo multiorgánico (114). Algunos estudios han demostrado que tanto el TNF α como la IL-1 estimulan la producción de proteínas de fase aguda por los hepatocitos,

mientras que, simultáneamente, desciende la síntesis hepática de otras proteínas (115,116).

Las citoquinas pueden actuar directamente sobre las células diana, o bien pueden estimular la liberación de mediadores secundarios, como otras citoquinas, metabolitos del ácido araquidónico, nucleótidos cíclicos o radicales libres del oxígeno (RLO) (117).

El TNF α se descubrió como resultado de la búsqueda, por un lado, de un "factor caquectizante", responsable de la caquexia asociada a ciertas infecciones crónicas (118), y, por otro lado, de un "factor necrosante tumoral", capaz de provocar necrosis hemorrágica intratumoral en animales de experimentación (119). Ambas moléculas fueron aisladas, e identificadas como una sola, el TNF α o "caquectina", en 1985 (120). Se trata de un polipéptido de Pm de 17.000, formado por tres subunidades idénticas, de 157 aminoácidos cada una, y codificado por el brazo corto del cromosoma 6 (6p) (121,122).

Al ser estimulados por la endotoxina, los macrófagos activados de mamíferos (incluidos los humanos), sintetizan y liberan grandes cantidades de TNF α , alcanzándose niveles plasmáticos máximos aproximadamente a ls 90 minutos. Su vida media en plasma es de 5-20 minutos, y a las 4-6 horas, los niveles plasmáticos vuelven a ser indetectables (123).

Además del macrófago, otras células pueden sintetizarlo, como los monocitos, mastocitos, células de Kupffer, astrocitos, células NK, y algunas células tumorales; los estímulos para su producción serían, además de la endotoxina, exotoxinas, virus, antígenos de hongos y parásitos, la fracción 5a del complemento, y complejos antígeno-anticuerpo (124). La administración de pequeñas dosis de endotoxina bacteriana en animales y voluntarios humanos, induce un rápido aumento de los niveles plasmáticos de TNF α (125,126).

La mayoría de los efectos de la endotoxina, incluido el shock, la acidosis metabólica y el fracaso multiorgánico, son reproducidos, en ratas y perros, por la infusión de TNF α purificado (127,128). En humanos, la administración de pequeñas dosis provoca fiebre, taquicardia, hipotensión, trombopenia, leucopenia transitoria, alteración de enzimas hepáticos, producción de proteínas de fase aguda, y activación de la vía extrínseca de la coagulación (129,130). Asimismo, se han detectado niveles plasmáticos elevados en pacientes con enfermedades parasitarias (130), cáncer (131), lesiones térmicas (132), rechazo de órganos transplantados (133), y fracaso hepático fulminante (134).

Por otra parte, se ha propuesto al TNF α como principal mediador responsable de la hiperlipidemia que se asocia a algunas infecciones (135); también se han observado diversos efectos del TNF α *in vitro*, inhibición del

metabolismo energético de los hepatocitos; fragmentación del ADN (136); ribosilación del ADP (137), incremento de la permeabilidad de la membrana (138), e inhibición de la respiración mitocondrial (139). Además, se ha visto que el tratamiento previo con anticuerpos monoclonales anti-TNF α , reduce las lesiones orgánicas y la mortalidad en animales tratados con dosis letales de bacterias (140,141).

En resumen, podemos considerar al TNF α un mediador implicado en la mayoría de las consecuencias de la sepsis, y no solo un posible inductor de la destrucción de células tumorales, como se creyó inicialmente (127).

La IL-1 es una de las citoquinas clave en la respuesta del organismo a invasiones microbianas, inflamación, reacciones inmunológicas y daño tisular. En las primeras horas después de la agresión, sus efectos biológicos se manifiestan en prácticamente todos los órganos y tejidos. La familia de las interleuquinas 1 la componen tres moléculas polipeptídicas: IL-1 α , IL-1 β , y el antagonista del receptor de la IL-1 (142). Tanto la IL-1 α como la IL-1 β poseen un amplio espectro de actividades biológicas, que son inhibidas por el antagonista del receptor de la IL-1. Su vida media en el plasma es de 6 a 10 minutos. Su principal fuente de producción es el fagocito mononuclear, aunque también las células endoteliales, los queratinocitos, los neutrófilos y los linfocitos B son capaces de producirla.

Su estímulo fisiológico más potente es el LPS, pero también la sílice, el $\text{TNF}\alpha$, y la misma IL-1 pueden inducir su síntesis (143).

Es bien conocido que la IL-1 actúa como inductor de la liberación de otras citoquinas, participando de este modo en una compleja red de citoquinas inducidas por citoquina. En fibroblastos, células endoteliales, macrófagos y linfocitos, IL-1 induce la producción de interferones, factores estimuladores de colonias hematopoyéticas y de linfocitos T y B. Aunque el $\text{TNF}\alpha$ también induce esas citoquinas inmunoestimuladoras, solo la IL-1 participa en la activación directa de linfocitos (144). Estudios recientes indican que IL-1 potencia los efectos catabólicos del $\text{TNF}\alpha$, de forma que sus acciones combinadas son, a menudo, más intensas.

Un sistema inmune funcional es necesario para la eliminación de invasores microbianos y células neoplásicas; la capacidad de IL-1 de activar linfocitos T y B, células NK y macrófagos, contribuye a este proceso. Pero los cambios inducidos por esta citoquina suponen un enorme gasto para el huésped, de modo que, cuando la producción y activación de IL-1 persiste y escapa a los procesos de regulación, contribuye de modo importante a los procesos fisiopatológicos de la sepsis y, tal vez, a la muerte del huésped (144).

La familia de las IL-6 consta de, al menos, seis moléculas diferentes

de fosfogluco proteína (145). Es secretada por fibroblastos, monocitos y macrófagos, y liberada rápidamente a la circulación en respuesta a la lesión. Se detecta en plasma aproximadamente una hora después de la administración del LPS, y actúa mediante la unión a un receptor específico (146). Tiene un espectro de acción similar al $TNF\alpha$ y la IL-1: favorece la respuesta de las células linfoides y hematopoyéticas a sus respectivos factores de crecimiento y diferenciación, estimula a los linfocitos B para que produzcan anticuerpos, y es el principal inductor de la síntesis hepática de proteínas de fase aguda (147). Tanto *in vivo* como *in vitro* inhibe la producción de $TNF\alpha$, pero, a pesar de este aparente efecto beneficioso, sus niveles séricos elevados se correlacionan con un mal pronóstico para el paciente (148).

OXIDO NITRICO (NO) Y MONOXIDO DE CARBONO (CO)

En los últimos tiempos se ha dedicado una gran atención al óxido nítrico. Entre 1981 y 1986, podían encontrarse en la bibliografía internacional apenas diez artículos acerca de su biosíntesis. En los cinco años siguientes, se publicaron más de 500. En el año 1993, la palabra clave "óxido nítrico" ya era capaz de generar una lista con más de 1.500 trabajos (149).

Se ha implicado al óxido nítrico como mediador, mensajero o

regulador de las funciones celulares en situaciones fisiológicas que incluyen el tono vascular, la función plaquetaria, la memoria reciente y remota, el metabolismo de los hepatocitos, el shock séptico e, incluso, la erección. Parece, por otra parte, que la disminución de la síntesis del NO podría estar implicada en la patogenia de la aterosclerosis, la hipertensión pulmonar, la estenosis pilórica, o la hipertensión arterial que se asocia a la insuficiencia renal. Se ha visto, además, que algunos agentes farmacológicos, como el nitroprusiato sódico o los nitrosotioles, por ser fuentes exógenas de NO, podrían resultar beneficiosos en el tratamiento de tales patologías (150).

En presencia de oxígeno molecular, el nitrógeno guanídico de la L-arginina se oxida para dar lugar al radical libre óxido nítrico y a L-citrulina, en una reacción catalizada por el enzima **óxido nítrico sintasa (NOS)**. Parece que la L-arginina habría sido seleccionada por la naturaleza como sustrato de la NO sintasa por contener en su molécula dos nitrógenos guanídicos químicamente equivalentes, que aceptan electrones con facilidad en los procesos oxidativos, dando lugar a la formación de NO. Son cofactores esenciales en esta reacción, además de la nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato (NADPH), los nucleótidos de flavina (FAD, FMN), el grupo hemo (protoporfirina IX), y la tetrahidrobiopterina (BH₄) (151).

Se presenta como un gas paramagnético, incoloro, moderadamente soluble en agua (2 mM a 1 atm a 20 °C). En solución, se oxida rápidamente a nitrito y nitrato, teniendo una vida media estimada de menos de 4 minutos. En condiciones fisiológicas, se calcula que la vida media del óxido nítrico es de 3 a 30 segundos, siendo inactivado por el anión superóxido, y uniéndose a proteínas que contienen el grupo hemo en su molécula (152)(figura 4).

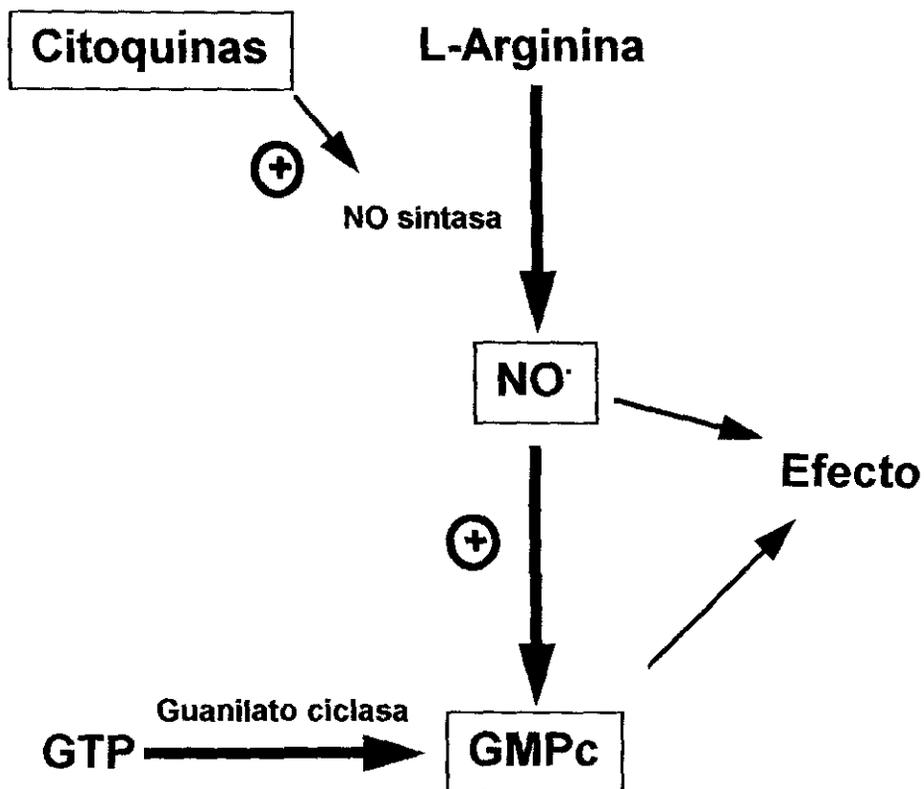


Figura 4

Las moléculas diana del NO son numerosas, incluyendo:

- proteínas que contienen el grupo hemo, como la guanilato ciclasa soluble, la interacción con la cual determina la relajación del músculo liso vascular.

- proteínas ferrosulfuradas, como la *cis*-aconitasa, del ciclo de los ácidos tricarbóxicos. Su interacción con ésta y otras proteínas ferrosulfuradas del ciclo de Krebs, así como con los complejos 1 y 2 de la cadena de transporte de electrones, son responsables de la citostasis provocada tras la liberación del NO por los macrófagos activados; Parece ser que la actividad citotóxica del NO producido por los macrófagos, depende de la inhibición de la ribonucleotido reductasa, el enzima limitante de la síntesis del ADN.

- grupos tiol de centros activos enzimáticos, como en el caso de la gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa, cuya inhibición a nivel hepatocitario es una de las funciones reguladoras del NO recientemente descritas (153).

- anión superóxido: tiene gran importancia la transformación del NO en peroxinitrito (ONOO⁻), por su reacción con dicho radical. El peroxinitrito se forma tras la activación de los macrófagos, y parece estar implicado en la fisiopatología del infarto, la aterosclerosis, y el edema pulmonar mediado por inmunocomplejos (154-157). Al pH del organismo, el peroxinitrito se

descompone, liberándose más NO_2 y otros productos reactivos, inicializándose el proceso de peroxidación lipídica, e inactivándose los canales iónicos de sodio.

En presencia de oxígeno, el NO se transforma rápidamente en NO_2 y en los oxidantes N_2O_4 y N_2O_3 .

Se ha aislado NO sintasa en gran cantidad de tejidos, incluyendo endotelio, músculo liso vascular, hepatocitos, células de Kupffer, plaquetas, células beta de los islotes pancreáticos, y algunas neuronas. Existen dos isoformas:

- NO sintasa constitutiva, con un Pm de 133 kD, presente en endotelio (**ecNOS**, codificada en el cromosoma 7), en plaquetas y en algunas neuronas (**ncNOS**, codificada en el cromosoma 12). Son dependientes de calcio y calmodulina, y se expresan continuamente, determinando una síntesis basal constante de NO en concentraciones picomolares.

- NO sintasa inducible (**iNOS**), con un Pm de 130 kD, y codificada en el cromosoma 17. Se expresa en macrófagos, hepatocitos y músculo liso vascular, tras ser estimulada por endotoxina y citoquinas (interferón- γ , IL-1, $\text{TNF}\alpha$). Esta isoforma es calcio-independiente, y el factor limitante de su acción es la disponibilidad de sustrato o cofactores. Tras su inducción, permanece activa entre 4 y 24 horas, sintetizándose NO en concentraciones

nanomolares. La regulación de este enzima tiene lugar a nivel transcripcional, por glucocorticoides, IL-4 e IL-10.

Hasta el momento, no se han encontrado agentes fisiológicos que inhiban la actividad enzimática de la nitrato sintasa, tanto su isoforma constitutiva como la inducible (150,158-160). En cambio, se han descrito gran cantidad de agentes farmacológicos que pueden inhibir o promover la producción de NO.

Entre los promotores, tenemos los nitratos orgánicos (nitroglicerina, nitroprusiato sódico, nitrosotioles). Entre los inhibidores, están: los quelantes de flavoproteínas, calmodulina o hemo; los agentes deplecionantes de tetrahidrobiopterina, y los análogos del sustrato. Por su disponibilidad y facilidad de empleo, éstos últimos son los inhibidores de la síntesis de NO más utilizados. Por ser análogos estructurales del sustrato original, L-arginina, actúan como inhibidores competitivos de la actividad de NOS a nivel de sustrato. Los más utilizados son los siguientes: L-NNA (N^G -nitro-L-arginina), L-NMMA (N^G -metil-L-arginina), y L-NAME (N^G -nitro-L-arginina metil éster). Estos inhibidores, aunque parecen actuar preferentemente sobre la isoforma inducible, pueden inhibir también a la NOS constitutiva (161). Ultimamente se han descrito inhibidores más selectivos de la NOS inducible, como la aminoguanidina.

Otro gas que está cobrando cierta importancia es el monóxido de

carbono (CO). Este óxido de bajo peso molecular se sintetiza endógenamente en condiciones fisiológicas (162). Se acepta que tiene diversos efectos sobre las funciones celulares: se ha demostrado que, al igual que el NO, es capaz de activar la guanilato-ciclasa soluble, dando lugar a un incremento en la producción de GMPc (163). La activación de dicho enzima por el CO *in vitro* (164), o en células aisladas (165), tiene efectos asimismo superponibles a los inducidos por el NO, tales como inhibición de la agregación plaquetaria (166), relajación del músculo liso visceral (167), o vasodilatación (168). Asimismo, parece que los mecanismos y características de dicha activación enzimática son similares a los mediados por el NO (166).

Si el CO tiene una misión en condiciones fisiológicas, deben existir fuentes endógenas para su producción. Una de dichas fuentes es el metabolismo del grupo hemo, en una reacción catalizada por hemo-oxigenasa. Otra sería la peroxidación lipídica (162). No se conoce todavía si esta producción de CO puede ser regulada a nivel celular, pero lo que sí se sabe es que el aumento de la generación de radicales libres del oxígeno es un factor bien caracterizado que interviene en su fisiopatología (169). Por otra parte, se ha observado que la hemo-oxigenasa puede ser inducida por numerosos estímulos oxidantes, en especial agentes que provocan depleción de glutatión (170), las propias citoquinas o la endotoxina (171).

Se ha visto también que los productos derivados del metabolismo del grupo hemo incrementan la producción de CO, de TNF α y de GMPc, lo que parece indicar que la producción de CO a través de una vía hemo-oxigenasa dependiente, es capaz de estimular la producción de TNF α por los macrófagos (172). Sin embargo, hay otros datos que hacen pensar que la vía mencionada antes no es el único mecanismo implicado en el aumento en la producción de CO en respuesta a diversos estímulos y que el incremento en la peroxidación lipídica jugaría aquí un importante papel (173,174)(figura 5).

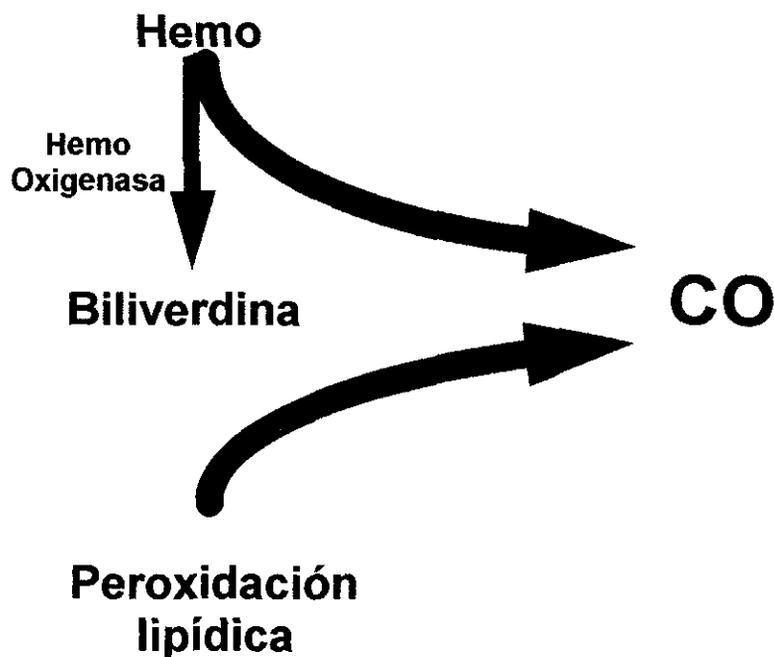
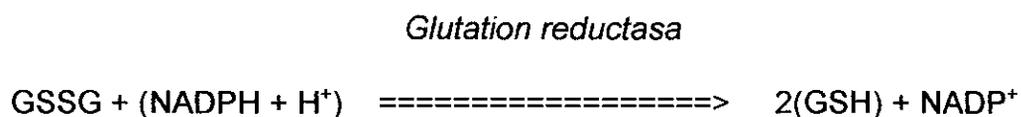
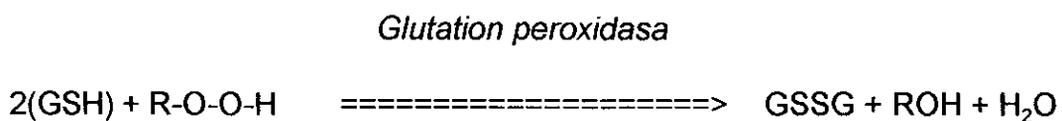


Figura 5

GLUTATION Y S-ADENOSIL-L-METIONINA (SAMet)

Como hemos comentado previamente, uno de los principales antioxidantes celulares es el glutation. Puede presentarse en dos formas: forma reducida de tiol (GSH) y forma oxidada, de disulfuro de glutation (GSSG):



Dada la gran cantidad de funciones que se fundamentan en el poder reductor del grupo sulfhidrilo, se acepta como abreviatura del glutation, "GSH". En la década pasada ha sido tema de enorme interés, siendo muchos los artículos publicados sobre su regulación y función desde 1980 (175-180).

El hígado es el órgano con mayor contenido en GSH, si bien se encuentra en numerosos tejidos de vida aerobia en concentraciones milimolares (181-183). Juega un papel clave en las reacciones de detoxificación, siendo un sustrato específico para GSH-peroxidasa (184), y GSH-transferasa (185), y participando en reacciones de peroxidación

microsomal de captura de radicales (186,187), siendo posiblemente su misión más importante la reducción del peróxido de hidrógeno, reacción catalizada por GSH-peroxidasa. Aunque dicha acción podría ser realizada también por la catalasa, la concentración de este último enzima es baja en el interior de la mitocondria, lugar donde tendría lugar la mayor parte de la producción de radicales libres de oxígeno.

Se sabe, además, que el glutathion puede proteger a las células de la toxicidad mediada por radicales libres (177,188-190,14), al menos de dos maneras: disminuyendo la formación de radicales libres, o deteniendo la amplificación de la peroxidación de los lípidos de membrana. La citada detoxificación GSH-dependiente, podría desempeñar un papel vital, previniendo el daño celular y el cáncer; en este sentido, se han identificado recientemente sustratos endógenos para estas reacciones, de modo que, por ejemplo, se ha involucrado al GSH en la biosíntesis de prostaglandinas y leucotrienos (191).

Se ha sugerido que el estado de oxido-reducción del GSH, por medio de su efecto sobre el estado, oxidado o reducido, de las proteínas con grupos tiol, podría actuar a modo de "tercer mensajero", incrementando o disminuyendo las actividades de numerosos procesos biológicos, como catálisis enzimática, síntesis de proteínas y unión a receptores (192). Incluso se ha sugerido que el NO podría jugar un papel beneficioso o tóxico

sobre el hepatocito, dependiendo del ambiente oxidativo intracelular (193).

El GSH está compuesto por tres aminoácidos: L-glutamato, L-cisteína, y L-glicina, y en su síntesis están implicados dos pasos, catalizados enzimáticamente, y que consumen ATP.

El primero, limitante del proceso, es la formación de γ -glutamilcisteína a partir de L-glutamato y L-cisteína, proceso catalizado por γ -glutamilcisteínasintetasa, regulada por inhibición competitiva del sitio de unión del γ -glutamato al GSH (194,195), y por la disponibilidad de cisteína (196-198). En estudios recientes se ha demostrado que dicho enzima puede ser inhibido por análogos de metionina-sulfoximina, como propionina y butionina-sulfoximina (199,200). La inhibición de este enzima hace que disminuyan los niveles intracelulares de GSH, ya que este producto sigue siendo segregado y utilizado, pero sin una resíntesis significativa.

El segundo paso enzimático está catalizado por GSH-sintetasa, formándose un enlace peptídico entre γ -glutamilcisteína y L-glicina; algunos estudios en hígado de cerdo y de paloma sugieren que este enzima podría estar regulado por ADP (201,202).

La síntesis hepática de GSH se regula principalmente por la biodisponibilidad de su precursor, L-cisteína (197,198). En condiciones fisiológicas, la cisteína procede principalmente de la dieta o del catabolismo

proteico, aunque, alternativamente, podría obtenerse a partir de una dieta rica en metionina, que serviría como fuente de cisteína por la vía de la transulfuración hepática (198,203-205). En estudios experimentales, los sustitutos de los precursores para la síntesis hepática de GSH, se obtienen suministrando a los hepatocitos tanto cisteína como metionina (196-198,203-207).

La conversión de metionina en cisteína se produce de forma secuencial, a través de varios pasos enzimáticos; el primero de ellos consiste en la activación de metionina a S-adenosil-metionina (SAMet); su posterior dimetilación y separación da lugar a homocisteína, que reacciona con la serina para formar cistationina, en una reacción catalizada por cistationinasintetasa. La rotura de cistationina por la cistationasa, dará lugar a cisteína libre. La cisteína constituye una de las principales fuentes orgánicas de azufre, que puede encontrarse en diversos grados de oxidación, desde sulfuro a sulfato. El azufre de la cisteína está disponible indirectamente para reacciones de detoxificación y para su incorporación a proteínas, como la ferredoxina.

Teóricamente, pues, la depleción de glutatión podría ser corregida tanto por la N-acetil-cisteína, precursor de la cisteína, como por la metionina, o bien su precursor, SAMet. Esta última molécula reviste particular interés, además de por ser precursora de la metionina y, por

tanto, del glutation, por ser el principal donante de grupos metilo del organismo (208)(figura 6).

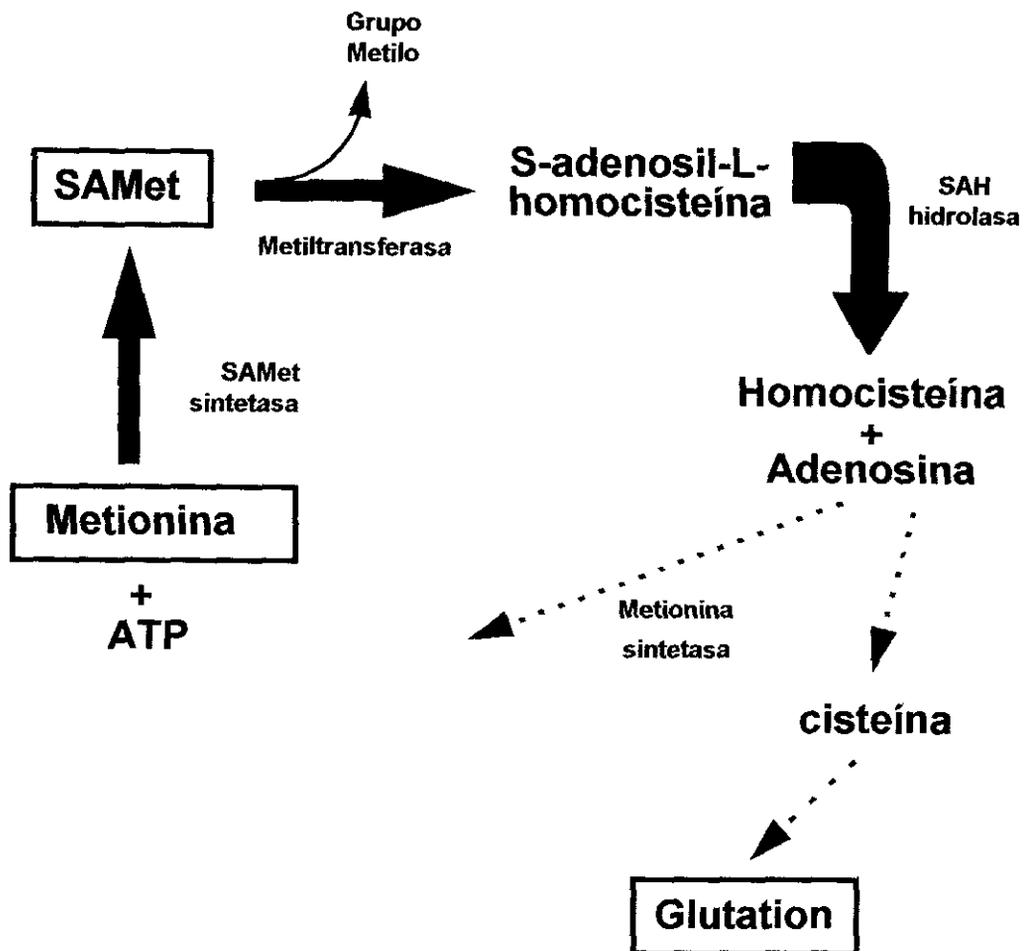


Figura 6

En 1952, el Dr. Cantoni hace la primera comunicación del hallazgo de la sulfoadenosilmetionina (SAMet), que, merced a la inestabilidad de su grupo metilo, por el nuevo enlace covalente que toma el azufre de la metionina, se comportaría como donante universal de grupos metilo (208) (figura 7).

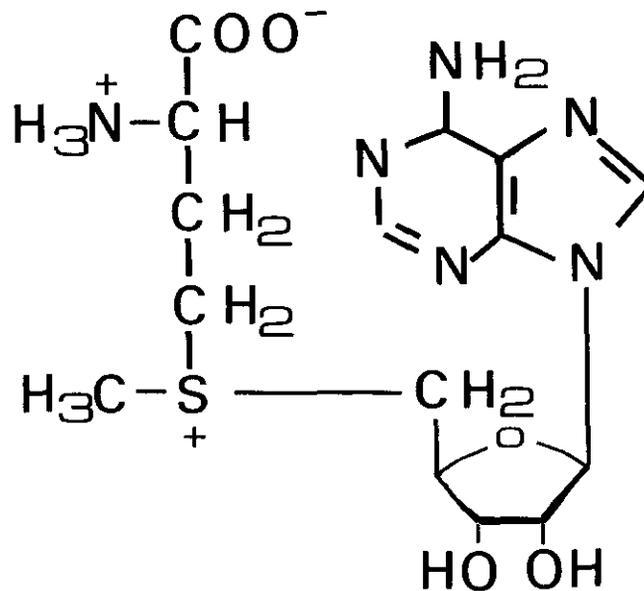


Figura 7

Hasta entonces, no se había comprendido del todo la participación fundamental de la transferencia de grupos metilo en el metabolismo de muchos componentes vitales de la economía.

En 1963, Greenberg revisa las reacciones de transmetilación en las que SAMet es donante de metilos, entre ellas:

- transmetilación de nicotinamida,
- de guanidoacético (creatina),
- de purinas y pirimidinas,
- metilaciones de derivados de grupos catecol- e indol- (nor-adrenalina/adrenalina),
- biosíntesis de fosfatidilcolina,
- metilación de grupos sulfhidrilos exógenos,
- metilación de carnitina, ergosterol, etc (209).

Hoy sabemos que SAMet es un metabolito endógeno celular, que participa activamente en el metabolismo de aminoácidos que contienen grupos sulfuro, y en el del GSH, y se ha observado que puede proteger al hígado frente a diversos agentes citotóxicos, tanto en animales (20), como en humanos (210).

También es bien conocido el hecho de que el glutatión es la llave del mecanismo de protección celular contra la toxicidad mediada por radicales libres, constituyendo un mecanismo natural de defensa. En otras palabras,

la depleción de glutatión puede potenciar la toxicidad debida a los RLO. Por tanto, si pudiéramos anticiparnos a la depleción de glutatión y mantener sus niveles normales, podríamos proteger a las células frente a dicha toxicidad. Como quiera que una de las acciones principales de SAMet es la de mantener elevados los niveles de glutatión (20), éste podría ser un mecanismo protector de gran importancia ante los efectos lesivos inducidos por fármacos y otras sustancias.

Revisando la bibliografía al respecto, podemos encontrar acciones beneficiosas de SAMet a muy distintos niveles: en pacientes cirróticos, incrementando la conjugación de taurina con las sales biliares (211); en patología neurológica (212); protector, en animales, frente a la colostasis inducida por la nutrición parenteral (213); en las lesiones secundarias a la isquemia-reperfusión en hígado aislado (214); en la disfunción mitocondrial hepatocitaria inducida por el etanol (215); en el daño hepático provocado por la obstrucción biliar (216); en la toxicidad inducida por citoquinas en hepatocitos aislados (21,217), o incluso en la cardiotoxicidad inducida por la doxorubicina (218).

Como se ha comentado anteriormente, en todos los organismos estudiados, SAMet actua como donante de grupos metilo en las reacciones biológicas de transmetilación, incluyendo la metilación de fosfatidiletanolamina a fosfatidilcolina, y este efecto podría desempeñar un

importante papel en el mantenimiento de la estructura y función de las membranas celulares (219).

Todas las reacciones de transmetilación dan lugar a S-adenosil-L-homocisteína (SAH), que se metaboliza a homocisteína y adenosina. Esta última se transforma en inosina, y la homocisteína, a través de reacciones de transulfuración, en cistationina y derivados (cisteína, glutation-sulfato, etc), o bien puede ser reutilizada para la síntesis de metionina (220). Es decir, que el papel de SAMet es decisivo en, al menos, dos procesos bioquímicos de importancia capital, a saber: la transmetilación y la transulfuración. Y estaría involucrado, además, en la síntesis de poliaminas, biotina, cisteína, glutation (220).

La biosíntesis endógena de SAMet tiene lugar gracias a la acción de SAMet-sintetasa. Este enzima cataliza la síntesis de SAMet a partir de metionina y ATP (221), y se ha encontrado en levaduras, bacterias, plantas y animales. Parece que en los mamíferos existen diferentes isoenzimas. Se conoce poco sobre su estructura y regulación, aunque las formas específicas del hígado humano están siendo intensamente estudiadas por su implicación en la patología hepática (222,223). Las dos formas oligoméricas de SAMet-sintetasa identificadas en el hígado humano parecen ser similares a las encontradas en el hígado de rata (222).

Una reducción de glutation en el hígado, como ocurre en pacientes

con daño hepático, podría iniciar un círculo vicioso, ya que dicha depleción podría provocar la inactivación de SAMet-sintetasa, dando lugar a una disminución adicional en los niveles de glutathione, con el consiguiente empeoramiento en la función de dicha enzima (224). Apoya lo anteriormente expuesto la observación experimental de la intensa correlación existente entre los niveles celulares de glutathione y la actividad de SAMet-sintetasa. Por ejemplo, la administración a animales de experimentación del inhibidor de la síntesis de glutathione butionina-sulfoximina (225), provoca una disminución en los niveles de glutathione y de SAMet hepáticos, y una reducción marcada de la actividad de SAMet-sintetasa. De este modo, la depleción de glutathione afectaría al metabolismo de la metionina a través de la disminución de su conversión a SAMet (224).

SAMet, por tanto, además de ser un precursor de la síntesis de glutathione, presenta la ventaja adicional, en comparación con otros precursores del GSH, de evitar el déficit en la actividad de SAMet-sintetasa, lo cual podría contribuir a explicar su efecto beneficioso, a través de un mecanismo de "autorregeneración".

HIPOTESIS

Las situaciones de isquemia-reperfusión hepática en la práctica clínica son frecuentes, puesto que acontecen no solo en el trasplante hepático, sino también en diversas intervenciones quirúrgicas sobre el hígado en las que se requiere clampaje temporal del pedículo hepático (maniobra de Pringle), con objeto de reducir la pérdida hemática. Por otro lado, microfenómenos de isquemia-reperfusión están implicándose cada vez con más relevancia en la fisiopatología de diversos estados de shock, especialmente el shock séptico. Un fármaco que protegiese a las células de los efectos metabólico/tóxicos de la isquemia-reperfusión sería de gran utilidad en el manejo de estas situaciones, enmarcándose dentro del moderno enfoque de antagonizar precozmente mediadores específicos del daño celular que conduce finalmente al fracaso del órgano.

Dado que los radicales de oxígeno están implicados en el daño hepático secundario a isquemia-reperfusión, así como el hecho de que la S-adenosil-metionina es capaz, entre otros posibles mecanismos protectores, de incrementar el contenido en glutatión de los hepatocitos, hemos partido de la hipótesis de que dicha sustancia sería beneficiosa en un modelo experimental de isquemia-reperfusión hepática.

OBJETIVOS CONCRETOS

Objetivos..

1. Estudiar el efecto de la isquemia-reperfusión sobre la peroxidación de los lípidos de membrana en el tejido hepático.
2. Estudiar el efecto de la isquemia-reperfusión sobre la síntesis de fosfolípidos de membrana.
3. Estudiar el grado de traslocación bacteriana (endotoxina en sangre portal y sistémica), inducido por la isquemia-reperfusión hepática.
4. Estudiar el efecto de la isquemia-reperfusión hepática sobre la concentración de citoquinas en tejido hepático y sangre circulante, tanto sistémica como portal.
5. Estudiar la posible repercusión de la isquemia-reperfusión hepática sobre la producción de óxido nítrico, monóxido de carbono y GMP cíclico.
6. Estudiar el efecto del tratamiento con SAMet sobre todos los parámetros anteriores, así como sobre la supervivencia de los animales.

MATERIAL Y METODOS

Animales de Experimentación:

Hemos empleado ratas Wistar, macho, de 250-300 grs de peso, alimentadas con una dieta estándar suministrada por Panlab (Barcelona, España), y agua *ad libitum*, y sometidas a un control automático de los ciclos de luz-oscuridad (12 horas de luz, de 8 a 20 horas, y 12 horas de oscuridad), y de temperatura (22 ± 2 °C).

Los animales fueron tratados humanitariamente y se siguieron siempre, estrictamente, las Normas Éticas en Investigación con animales dictadas por la Unión Europea.

Diseño Experimental:

Tras haber mantenido a las ratas en situación de ayuno durante 24 horas, se distribuyeron al azar en seis grupos:

GRUPO 1: Se sometió a una operación simulada (*sham operation*), siendo utilizado como grupo control.

GRUPO 2: Similar al grupo 1, salvo que se administró SAMet a los animales, a dosis de 20 mg/kg de peso, 15 minutos antes de la intervención.

GRUPO 3: Se sometió a los animales a una hepatectomía de prácticamente el 80 % de la masa hepática, resecaando los lóbulos medio y lateral izquierdo, y dejando el lóbulo derecho *in situ*.

GRUPO 4: Similar al grupo 3, salvo por la administración previa de

SAMet.

GRUPO 5: Fue sometido a 60 minutos de isquemia del lóbulo lateral derecho por oclusión temporal de la vena Porta y la arteria Hepática (sus ramas correspondientes), de acuerdo con el modelo descrito por Hayashi (226). En el momento de la reperfusión del lóbulo derecho, se extirparon los lóbulos medio y lateral izquierdo (es decir, aproximadamente el 80 % de la masa hepática) (figuras 8-12).

GRUPO 6: Las ratas se sometieron al mismo tratamiento que en el grupo 5, excepto que se les administró SAMet, a la dosis previamente indicada, 15 minutos antes de la provocación de la isquemia.

En cada uno de los grupos, las ratas fueron divididas de forma aleatoria en dos subgrupos: algunas se dejaron vivir, con libre acceso a comida y agua, para estudio de la supervivencia; otras, fueron sacrificadas a los 10 ó 120 minutos de la reperfusión, tomándose muestras de sangre y de hígado.

Obtención de Muestras:

Las ratas fueron anestesiadas con éter dietílico por vía inhalatoria. A continuación, se les inyectó el producto correspondiente (SAMet a dosis de 20 mg/kg, diluido en 0.2 ml de solución salina o un volumen equivalente

de solución salina sola), lentamente, para evitar una sobrecarga brusca del aparato cardiocirculatorio del animal. Así mismo, se procedió a la heparinización sistémica (a dosis de 100 UI por kg de peso, de heparina sódica). Dichas inyecciones se realizaron en la Vena Yugular Interna, por punción percutánea.

Posteriormente, se abordó a los animales por laparotomía subcostal bilateral y se les practicó la intervención previamente explicada. Seguidamente, se obtuvieron muestras del lóbulo derecho hepático y de sangre de vena Cava y vena Porta. Estas últimas muestras se centrifugaron para separar el plasma, y se almacenaron congeladas, junto con las muestras tisulares, hasta la determinación de los productos investigados.

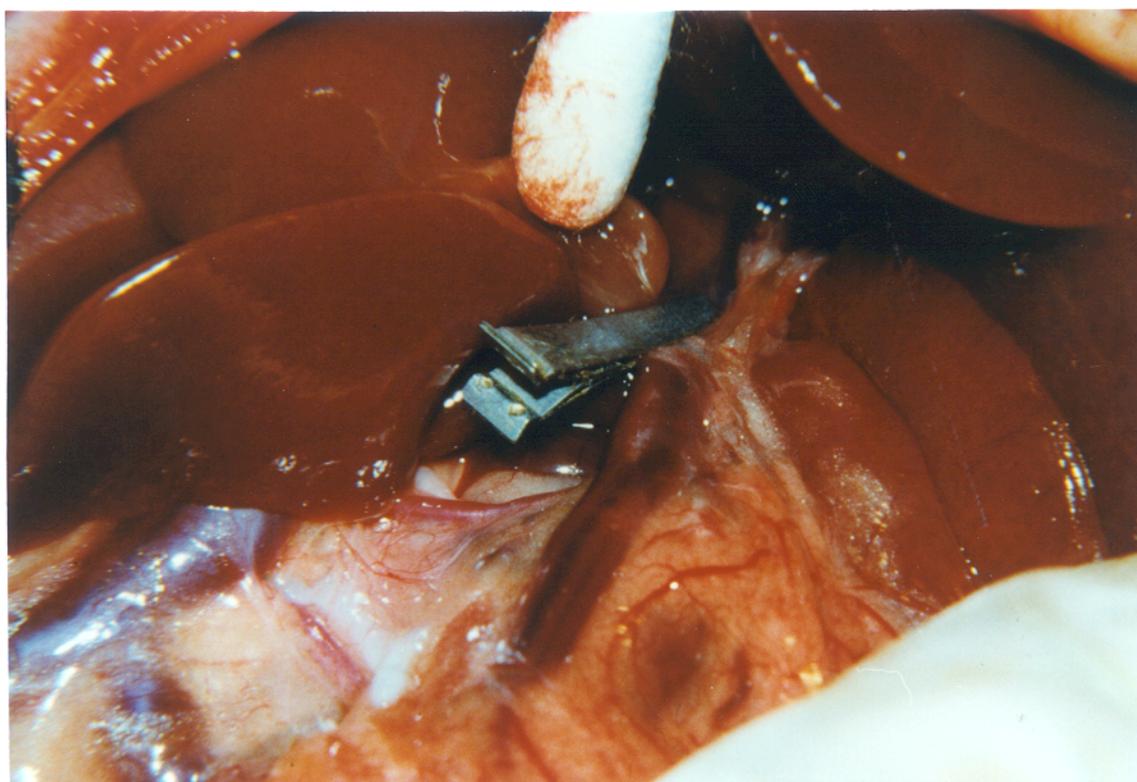
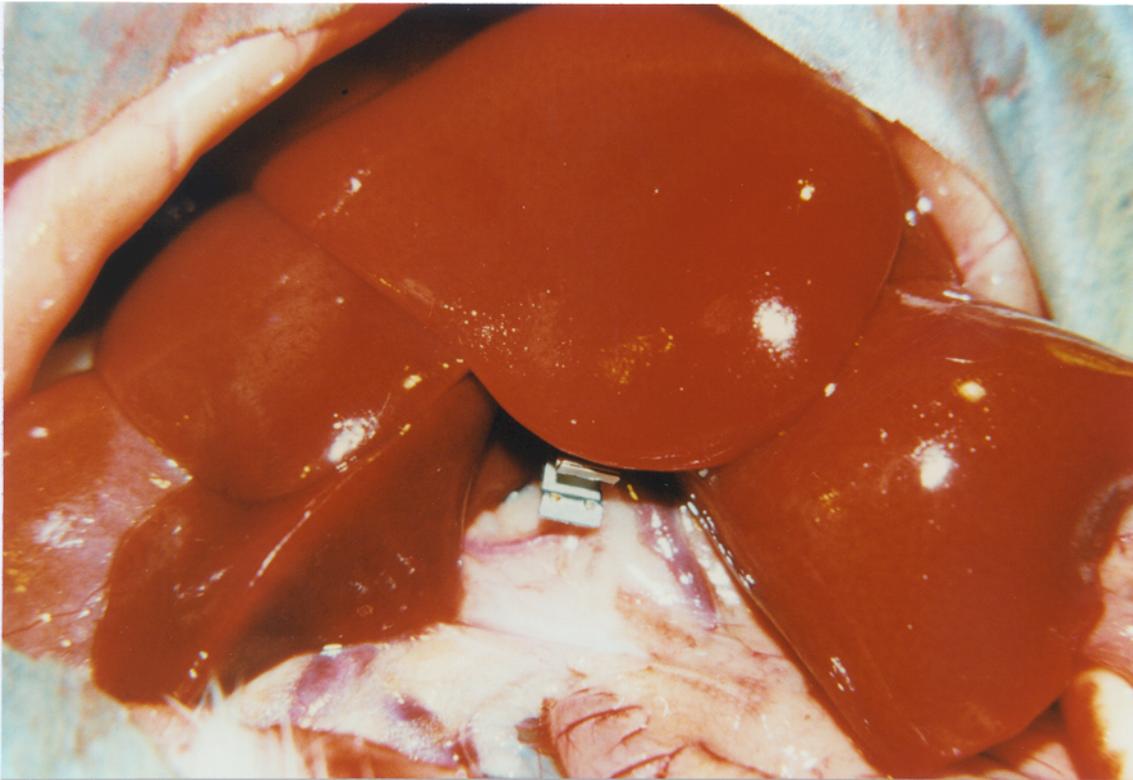
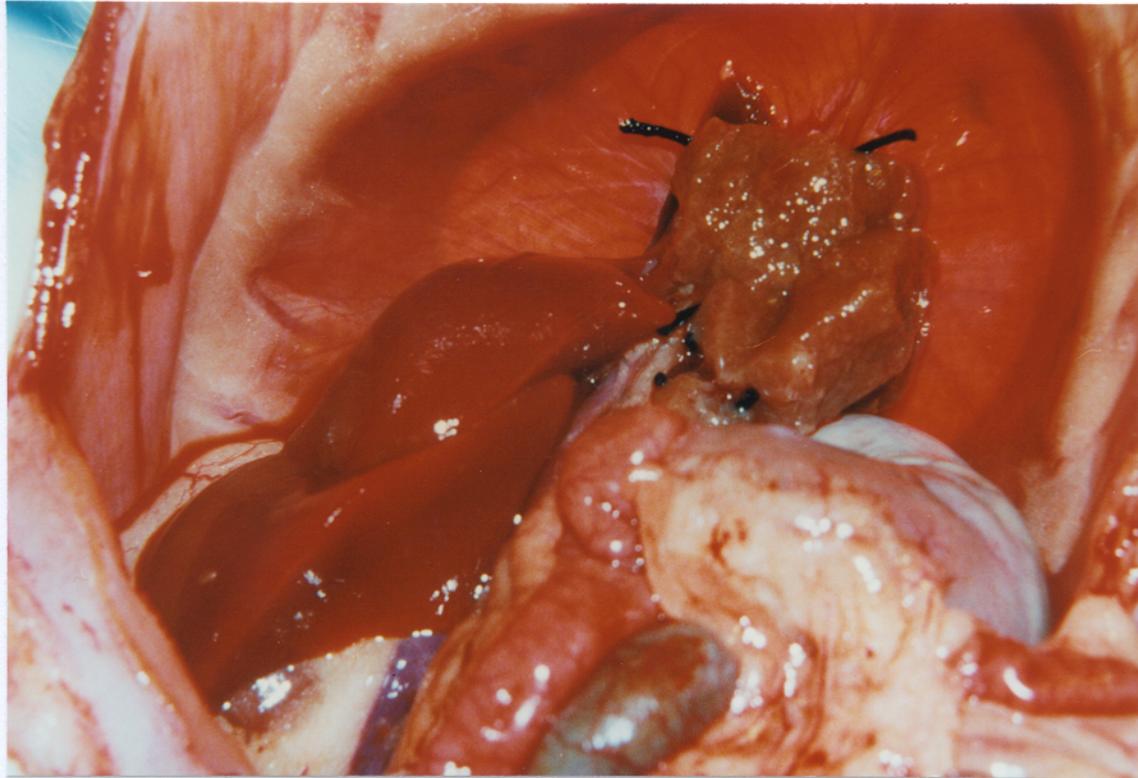


Figura 8: Imagen fotográfica del campo operatorio al inicio de la intervención, tras laparotomía subcostal bilateral y maniobras de liberación del hígado. Se observa el clampaje selectivo del lóbulo hepático derecho.



Figuras 9 y 10: En la imagen superior, se aprecia el aspecto del lóbulo hepático derecho sometido a isquemia. En la inferior, el que presenta tras la reperusión. Nótese el discreto cambio de coloración.



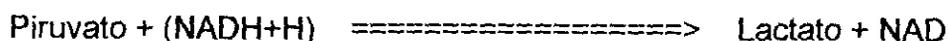
Figuras 11 y 12: En la imagen superior se observa el campo quirúrgico tras la hepatectomía subtotal practicada. En la imagen inferior puede apreciarse cómo el hígado remanente representa aproximadamente el 20% del total.

Determinaciones Realizadas:

LACTICO-DESHIDROGENASA (LDH):

Se determinó utilizando un kit específico, basado en la reacción siguiente:

LDH



El grado de disminución de la absorbancia a 334, 340 ó 365 nm, debido a la formación de NAD, es directamente proporcional a la actividad de LDH.

GLUTATION (GSH):

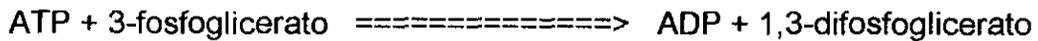
Para su determinación se empleó un micrométodo colorimétrico específico (227), basado en la reacción no enzimática del GSH con el ácido 5-5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico) (DTNB), para dar lugar a la formación de ácido 2-nitro-5-tiobenzoico (TNB) y GSSG. La velocidad de formación del TNB es seguida espectrofotométricamente a 412 nm.

ADENOSIN-TRIFOSFATO (ATP):

Se determinó mediante un kit específico, basado en las siguientes reacciones:

1º: El enzima fosfoglicerato fosfoquinasa (PGK) cataliza la reacción:

PGK



2º: El enzima gliceraldehido fosfato deshidrogenasa (GAPD) interviene en la reacción siguiente:



La disminución de la absorbancia a 340 nm, debida a la oxidación del NADH a NAD, es proporcional al incremento de ATP en el medio.

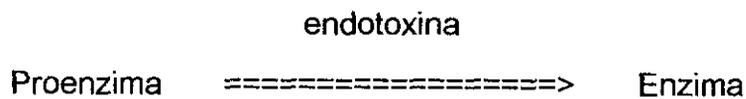
PEROXIDOS LIPIDICOS:

Se determinaron utilizando kits específicos. Su fundamento se basa en la reacción de los hidroperóxidos con un derivado del azul de metileno, el 10-N-metilcarbamoil-3,7-dimetilamino-10-H-fenotiacina (MCDP), en una reacción catalizada por la hemoglobina, para dar lugar a la formación de azul de metileno. Los peróxidos lipídicos se cuantifican colorimétricamente, midiendo el azul de metileno formado.

ENDOTOXINA:

Se empleó un kit colorimétrico específico para endotoxina bacteriana.

Se basa en que la endotoxina bacteriana de Gram (-) cataliza la activación de una proenzima presente en el lisado de *Limulus Amebocyte* (LAL). La velocidad inicial de activación depende de la concentración de endotoxina presente.



CITOQUINAS: TNF α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6

Se determinaron por ELISA mediante kits comerciales específicos (228).

OXIDO NITRICO (NO):

Se determinó como contenido de nitrito+nitrato (NO $_2^-$ +NO $_3^-$).

Para ello, las muestras se desproteinizaron por adición de ácido sulfosalicílico, y se incubaron durante 30 minutos a 4°C. Tras centrifugación durante 20 minutos (12.000 g), se separó el sobrenadante, que se incubó en presencia de nitrato-reductasa para la reducción de nitrato a nitrito (229). A continuación, se añadió reactivo de Griess a todas las muestras, y se midió su absorbancia a 546 nm (230), utilizando una solución de NaNO $_2$ como *standard*.

MONOXIDO DE CARBONO (CO):

Para cuantificar la cantidad de CO formado, se añadió hemoglobina (Hb) y se estimó la cantidad de carboxihemoglobina (COHb) (231). Para ello, se añadió Hb a la muestra, y se esperó 1 minuto, con el fin de asegurar la máxima unión del CO. A continuación, las muestras se diluyeron con tampón fosfato conteniendo ditionito sódico, se dejaron reaccionar 10 minutos a temperatura ambiente, y se leyó su absorbancia a 421 y 432 nm, utilizando como "blanco", una muestra conteniendo solo tampón.

GUANOSILMONOFOSFATO CICLICO (GMPc):

Se midió mediante radioinmunoanálisis específicos (RIA kit NEN) (232). Brevemente, tras adición de isometilbutilxantina (inhibidor de la fosfodiesterasa), el tejido se homogeneizó manualmente en un homogeneizador de vidrio y, a continuación, se sonicó con un disruptor ultrasónico. Las proteínas precipitaron, y el nucleótido cíclico se extrajo con etanol (80 % v/v). Tras centrifugación, el sobrenadante se separó en dos alícuotas, que se transfirieron a tubos de RIA y se evaporaron a 37 °C. Los residuos se reconstruyeron con *buffer* de RIA, y se determinaron siguiendo las instrucciones específicas de cada *kit*.

FOSFOLIPIDOS: FOSFATIDILCOLINA (PC) Y LISOFOSFATIDILCOLINA (LPC):

Se determinaron mediante la incorporación de colina marcada (^3H -colina), a cada una de las dos fracciones lipídicas.

Para ello, a las ratas se les inyectó el isótopo marcado 2 horas antes de la obtención de las muestras. Para la extracción de los fosfolípidos de las muestras de tejido hepático, una muestra del mismo se homogeneizó en cloroformo/metanol (2:1) a una dilución final 1/17. A continuación, se equilibró la muestra a temperatura ambiente durante una hora, y se filtró a un tubo de vidrio con tapón esmerilado. El extracto crudo se mezcló con 0.2 veces su volumen de solución Folch, y las dos fases de la mezcla se separaron por centrifugación. Tras aspirar la fase superior, se realizaron tres lavados con UPS (50 % del volumen original), centrifugando tras cada lavado, y descartando la fase superior. Finalmente, la fase inferior y el remanente de la superior se convirtieron en una fase por adición de metanol, y la solución resultante se evaporó al vacío. El extracto seco se redisolvió con cloroformo/metanol, aplicandose una muestra de 30 μl a placas de cromatografía (Silica Gel 60, 20x20) previamente activadas durante 1 hora a 110°C. Las fracciones de PC y LPC se separaron por cromatografía unidimensional en dos recorridos utilizando dos mezclas de solventes.

Después de espolvorear las placas con 2',7'-diclorofluoresceína, las manchas correspondientes a PC y LPC fueron identificadas con marcadores adecuados. Cada mancha se raspó en un vial de centelleo y se midió su radiactividad en un contador de centelleo líquido.

Análisis Estadístico:

Se ha utilizado el paquete estadístico Statgraphics v. 2.6.

Se han empleado *test* estadísticos no paramétricos. Para la comparación de supervivencias se empleó el *test* de la *chi*-cuadrado, y para las comparaciones entre los diversos grupos el *test* de Kruskal-Wallis de análisis de varianza por rangos, seguido, en caso de dar significación, del *test* de Mann-Whitney para muestras independientes, con el fin de identificar el origen de las diferencias. Se han considerado **significativas** y **muy significativas** unas confianzas iguales o superiores al 95% ($p < 0.05$) y 99% ($p < 0.01$), respectivamente.

Los resultados se expresan como media + error *standard*, siendo "n" el número de muestras empleadas en cada determinación.

RESULTADOS

LACTICO-DESHIDROGENASA (LDH)

La hepatectomía produjo una elevación en los niveles plasmáticos de LDH. La isquemia-reperfusión indujo un incremento aun mayor, estadísticamente significativo respecto de los demás grupos ($p < 0.01$), efecto que fue atenuado por SAMet, tanto a los 10 minutos (1117.35 ± 66.43 U/L vs 534.41 ± 46.04 U/L, $n=17$; $p < 0.01$), como a los 120 minutos (314.58 ± 14.41 U/L vs 60.58 ± 5.01 U/L, $n=12$; $p < 0.01$), en plasma procedente de la vena Cava. (Tabla I; Figura 13).

Se obtuvieron resultados similares en el plasma procedente de la vena Porta, a los 10 minutos (409.12 ± 39.96 U/L vs 76.65 ± 6.52 U/L, $n=17$; $p < 0.01$), y a los 120 minutos (95.08 ± 9.10 U/L vs 27.00 ± 1.75 U/L, $n=12$; $p < 0.01$). (Tabla I; Figura 14).

GRUPO	LDH (Cava) U/L plasma	LDH (Porta) U/L plasma
Control	35.00±7.64 (3)	24.33±2.85 (3)
Control+SAMet	23.67±1.86 (3)	26.00±1.53 (3)
Hepatectomia	108.00±6.25 (3)	67.33±9.94 (3)
Hepatectomía+SAMet	36.67±2.85 (3)	32.00±1.53 (3)
I-R 10 min	1117.35±66.43 (17)*	409.12±39.96 (17)*
I-R 10 min+SAMet	534.41±46.04 (17)*	76.65±6.52 (17)
I-R 2 h	314.58±14.41 (12)*	95.08±9.10 (12)*
I-R 2h+SAMet	60.58±5.01 (12)	27.00±1.75 (12)

Tabla I: Niveles plasmáticos de LDH en los diversos grupos.

*p<0.01 vs todos los demás valores

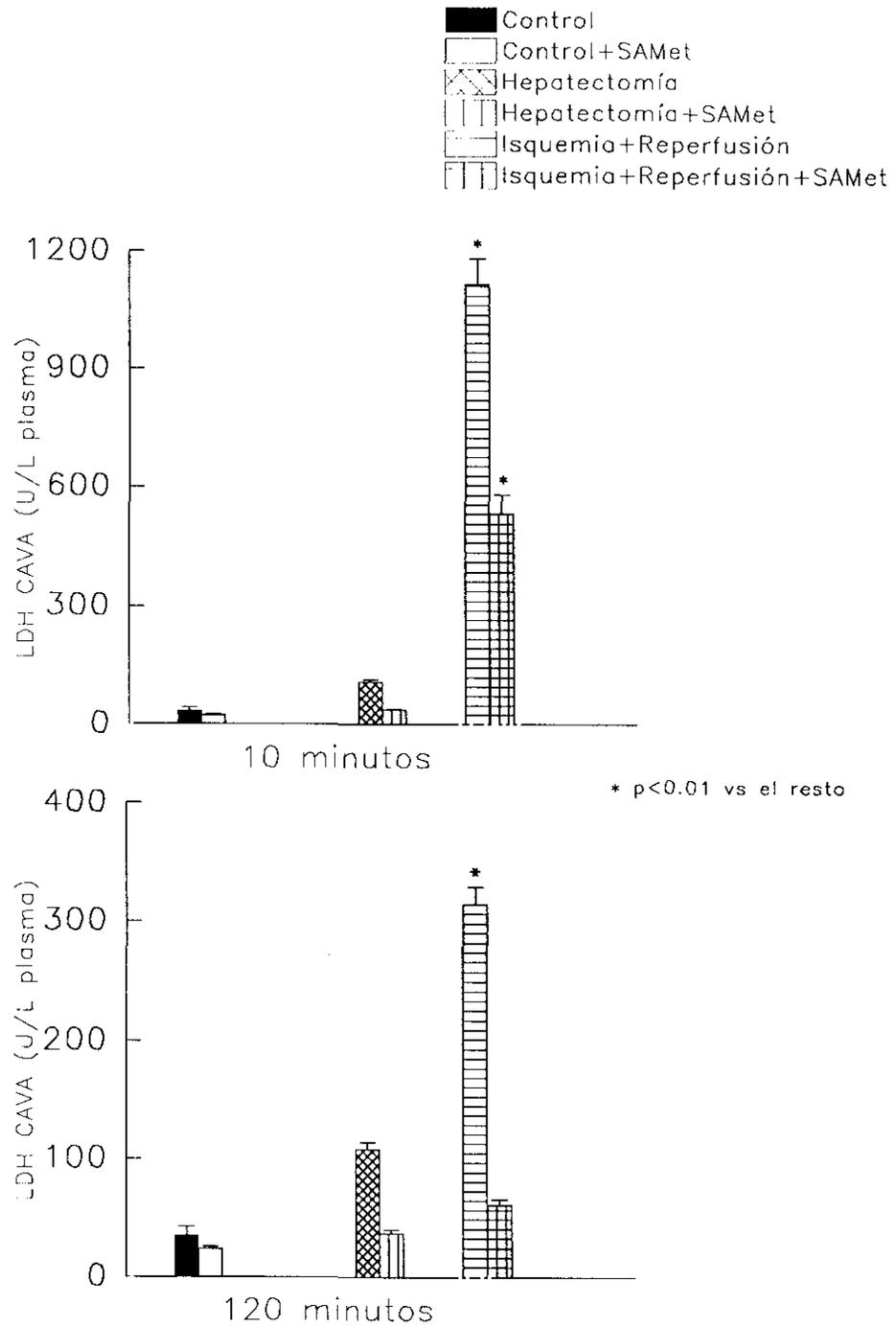


FIGURA 13: Niveles de láctico-deshidrogenasa (LDH) en plasma procedente de la vena Cava.

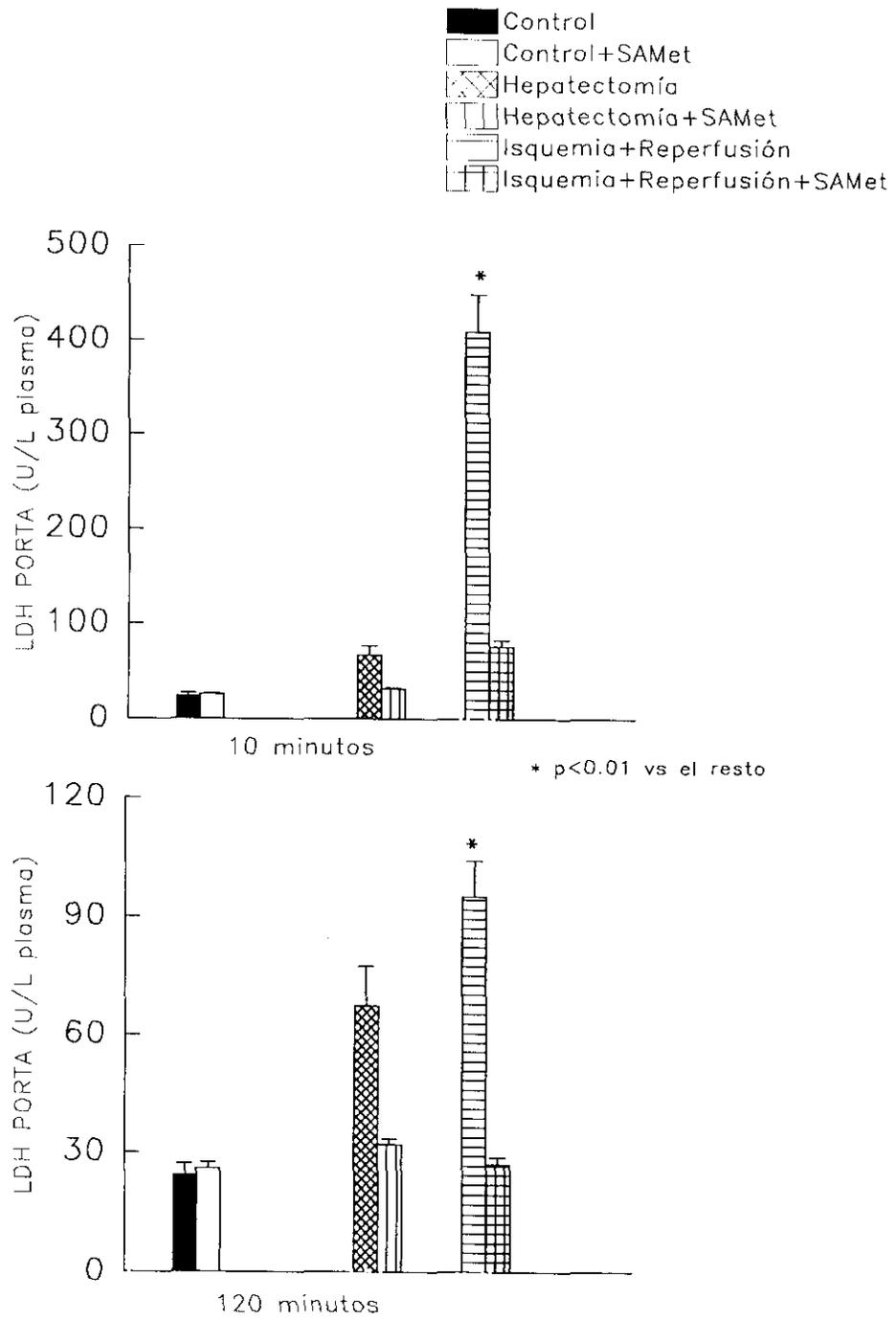


FIGURA 14: Niveles de láctico-deshidrogenasa (LDH) en plasma procedente de vena Porta.

GLUTATION Y ATP

La hepatectomía *per se* no modificó los niveles hepáticos de glutation ni de ATP.

En los grupos sometidos a isquemia-reperfusión, los niveles de GSH descendieron de modo significativo, no observándose este descenso en los animales tratados con SAMet, tanto a los 10 minutos (300.353 ± 19.74 pmol/mg vs 1226.65 ± 84.95 pmol/mg, $n=17$; $p<0.01$), (Tabla II; Figura 15), como a los 120 minutos (162.17 ± 14.31 pmol/mg vs 1107.08 ± 79.44 pmol/mg, $n=17$; $p<0.01$). (Tabla II; Figura 16).

Lo mismo ocurrió con los niveles de ATP (0.17 ± 0.01 nmol/mg vs 0.30 ± 0.01 nmol/mg, $n=17$), a los 10 minutos, (Tabla II; Figura 17); y a los 120 minutos (0.22 ± 0.01 nmol/mg vs 0.45 ± 0.02 nmol/mg, $n=12$). (Tabla II; Figura 18).

Resultados

GRUPO	GSH (Hígado) pmol/mg tejido	ATP (Hígado) nmol/mg tejido
Control	2163.33±168.36 (3)	0.73±0.07 (3)
SAMet	2466.67±272.85 (3)	0.77±0.04 (3)
Hepatectomía	1842.00±61.44 (3)	0.70±0.10 (3)
Hepatectomía+SAMet	1988.67±44.64 (3)	0.74±0.02 (3)
I-R 10 min	300.353±19.74 (17)*	0.17±0.01 (17)
I-R 10 min+SAMet	1226.65±84.95 (17)*	0.30±0.01 (17)
I-R 2h	162.17±14.31 (12)*	0.22±0.01 (12)
I-R 2h+SAMet	1007.08±79.44 (12)*	0.45±0.02 (12)

Tabla II: Niveles de Glutation y ATP tejido hepático.

*p<0.01 vs todos los demás valores

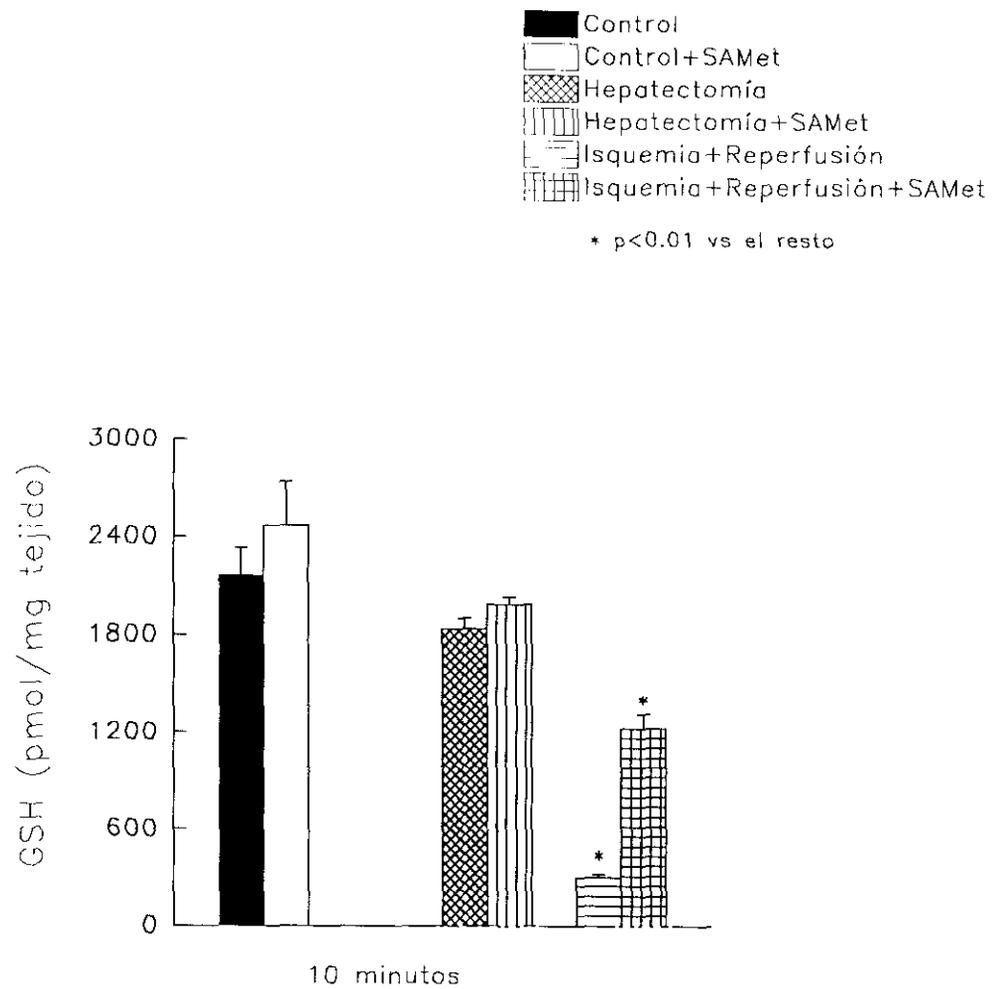


FIGURA 15: Niveles de glutatión (GSH) en tejido hepático, tras 10 minutos de reperusión en los grupos correspondientes.

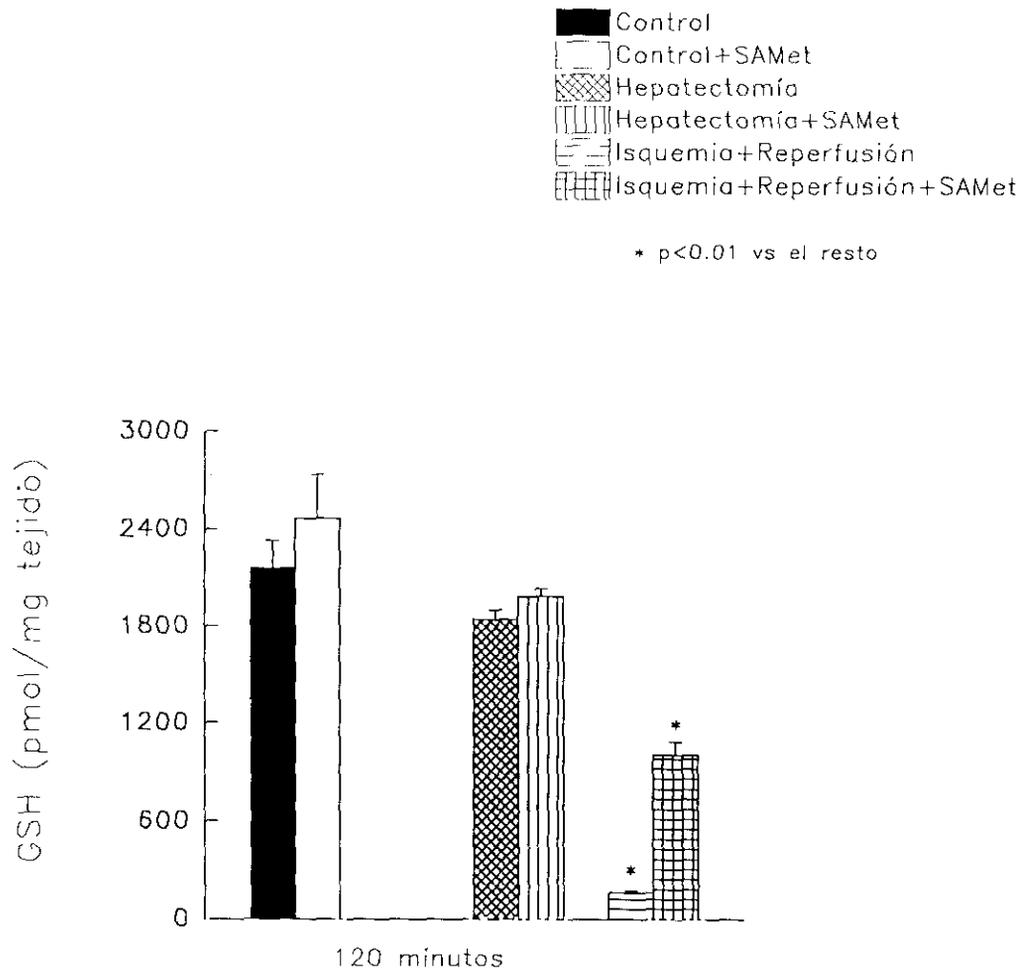


FIGURA 16: Niveles de glutatión (GSH) en tejido hepático, tras 120 minutos de reperusión en los grupos correspondientes.

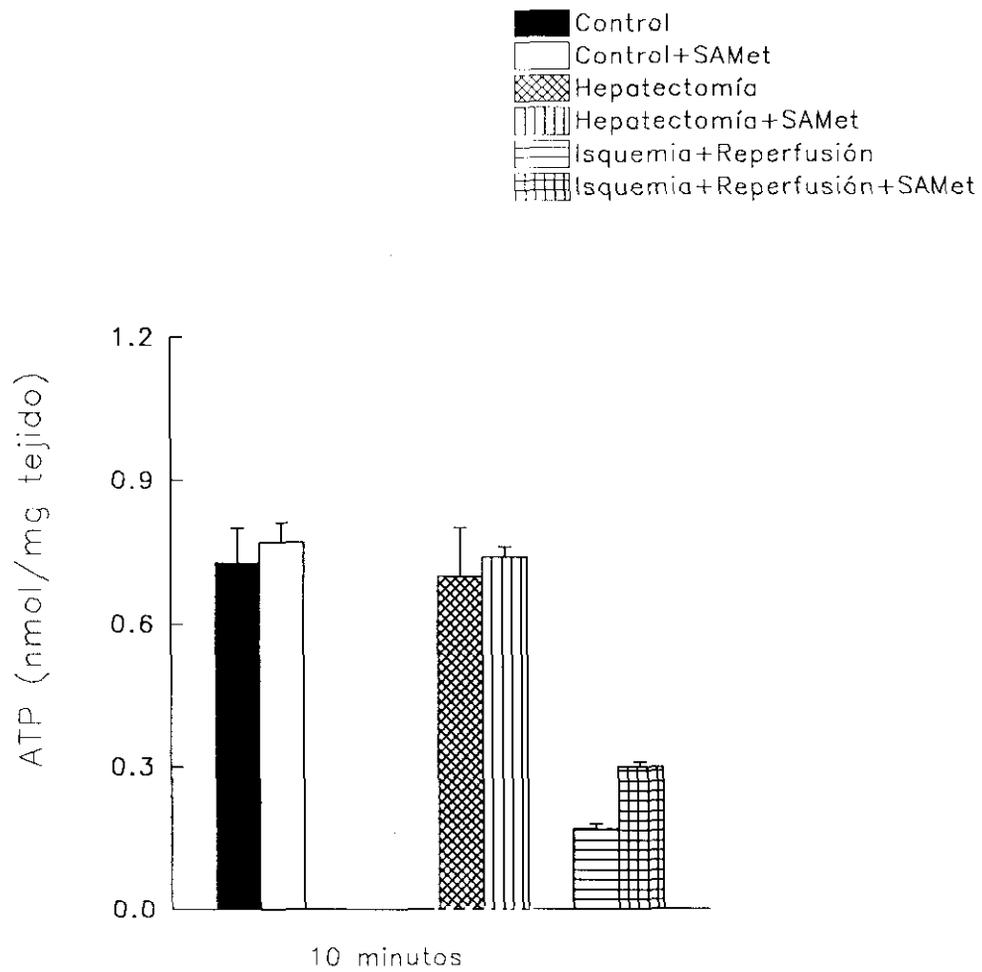


FIGURA 17: Niveles de ATP en tejido hepático, tras 10 minutos de reperusión en los grupos correspondientes.

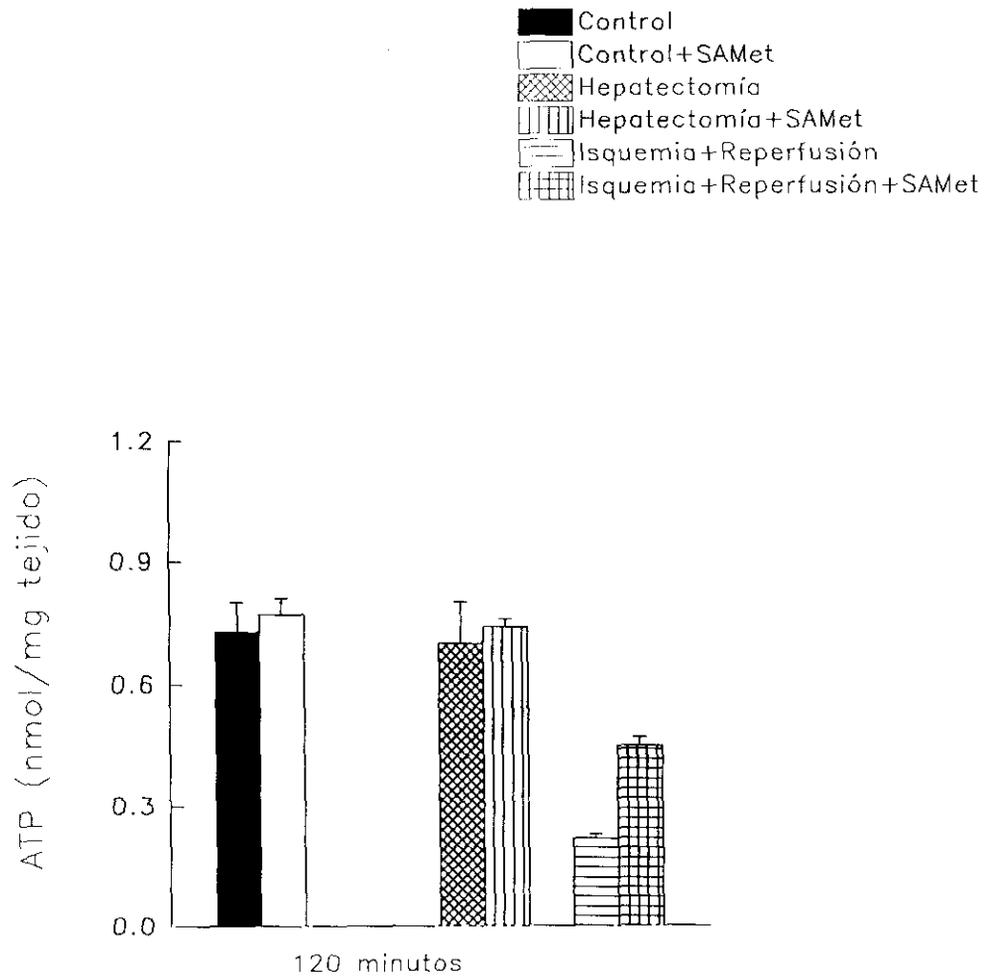


FIGURA 18: Niveles de ATP en tejido hepático, tras 120 minutos de reperusión en los grupos correspondientes.

PEROXIDACION DE LIPIDOS

La isquemia-reperfusión produjo un aumento significativo de los niveles de peróxidos lipídicos en el hígado, no observándose este incremento en los animales tratados previamente con SAMet , tanto a los 10 minutos, (3.17 ± 0.07 nmol/mg tejido vs 0.84 ± 0.03 nmol/mg, $n=17$; $p<0.01$), (Tabla III; Figura 19), como a los 120 minutos de revascularización, (3.23 ± 0.15 nmol/mg tejido vs 1.28 ± 0.10 nmol/mg, $n=12$; $p<0.01$). (Tabla III; Fig.20).

Resultados similares se observaron al determinar los peróxidos lipídicos en plasma procedente de vena Cava (37.78 ± 4.50 nmol/ml vs 19.77 ± 1.31 nmol/ml a los 10 min, $n=17$; $p<0.05$; 43.57 ± 12.57 nmol/ml vs 25.71 ± 4.74 nmol/ml a los 120 min, $n=12$; $p<0.05$), (Tabla III; Figura 21), pero no en el procedente de vena Porta (Tabla III, Fig.22).

Resultados

GRUPO	Peróxidos Lipídicos (Hígado) nmol/mg tejido	Peróxidos Lipídicos (Porta) nmol/ml plasma	Peróxidos Lipídicos (Cava) nmol/ml plasma
Control	0.497±0.017 (3)	16.19±6.20 (3)	15.06±2.42 (3)
SAMet	0.533±0.028 (3)	5.71±2.47 (3)**	11.19±1.71 (3)
Hepatectomía	0.556±0.014 (3)	21.91±5.04 (3)	23.33±1.25 (3)
Hepatec+SAMet	0.483±0.003 (3)	17.40±4.53 (3)	15.00±1.88 (3)
I-R 10 min	3.177±0.073 (17)*	23.71±2.58 (17)	37.78±4.50 (17)**
I-R 10 min+SAMet	0.847±0.033 (17)	19.20±1.60 (17)	19.77±1.31 (17)
I-R 2h	3.238±0.157 (12)*	17.38±3.26 (12)	43.57±12.57 (12)**
I-R 2h+SAMet	1.283±0.101 (12)**	13.63±1.71 (12)	25.71±4.74 (12)

Tabla III: Niveles de peróxidos lipídicos en tejido hepático y en plasma procedente de las venas Cava y Porta.

*p<0.01 vs todos los demás valores

**p<0.05 vs el resto de valores

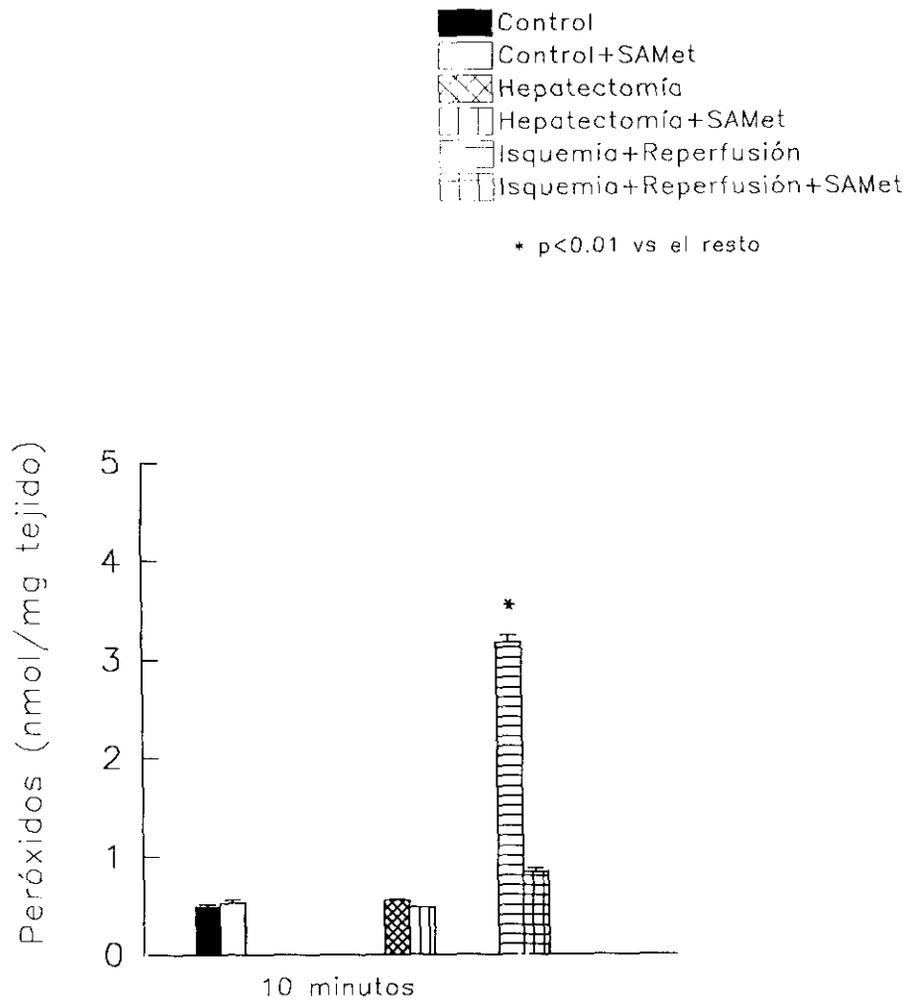


FIGURA 19: Niveles de peróxidos lipídicos en tejido hepático, tras 10 minutos de reperfusion en los grupos correspondientes.

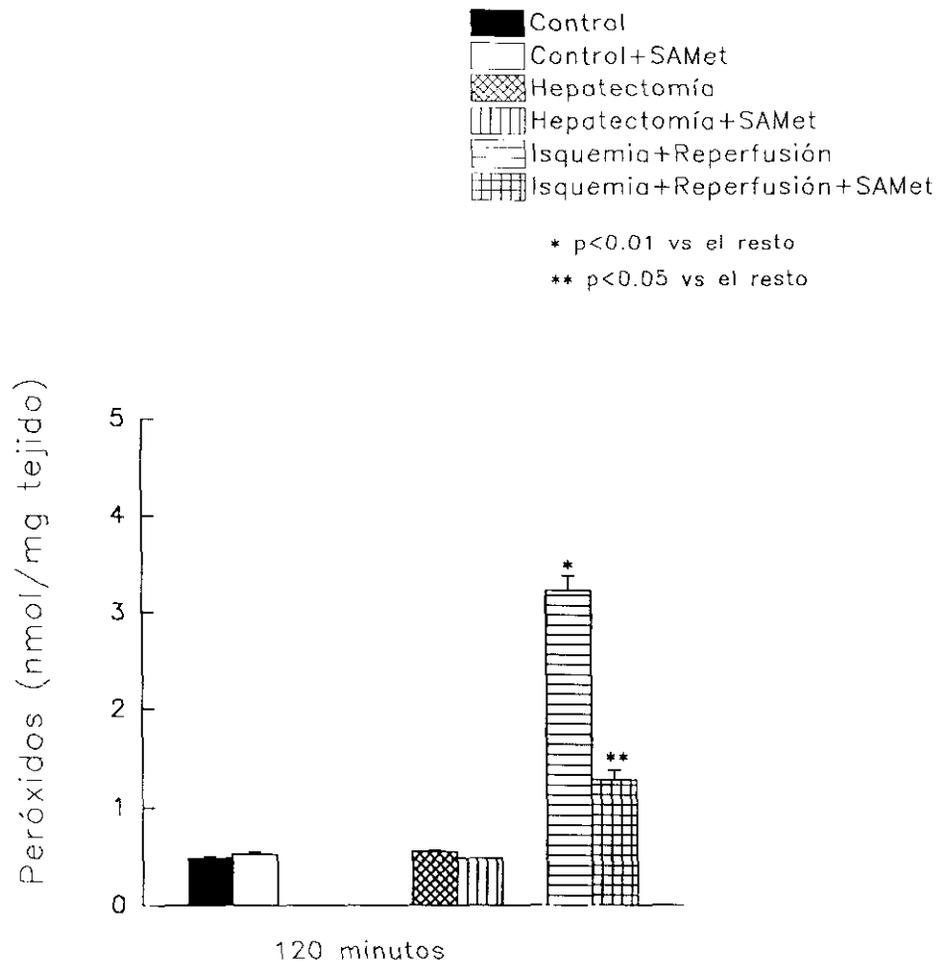


FIGURA 20: Niveles de peróxidos lipídicos en tejido hepático, tras 120 minutos de reperfundición en los grupos correspondientes.

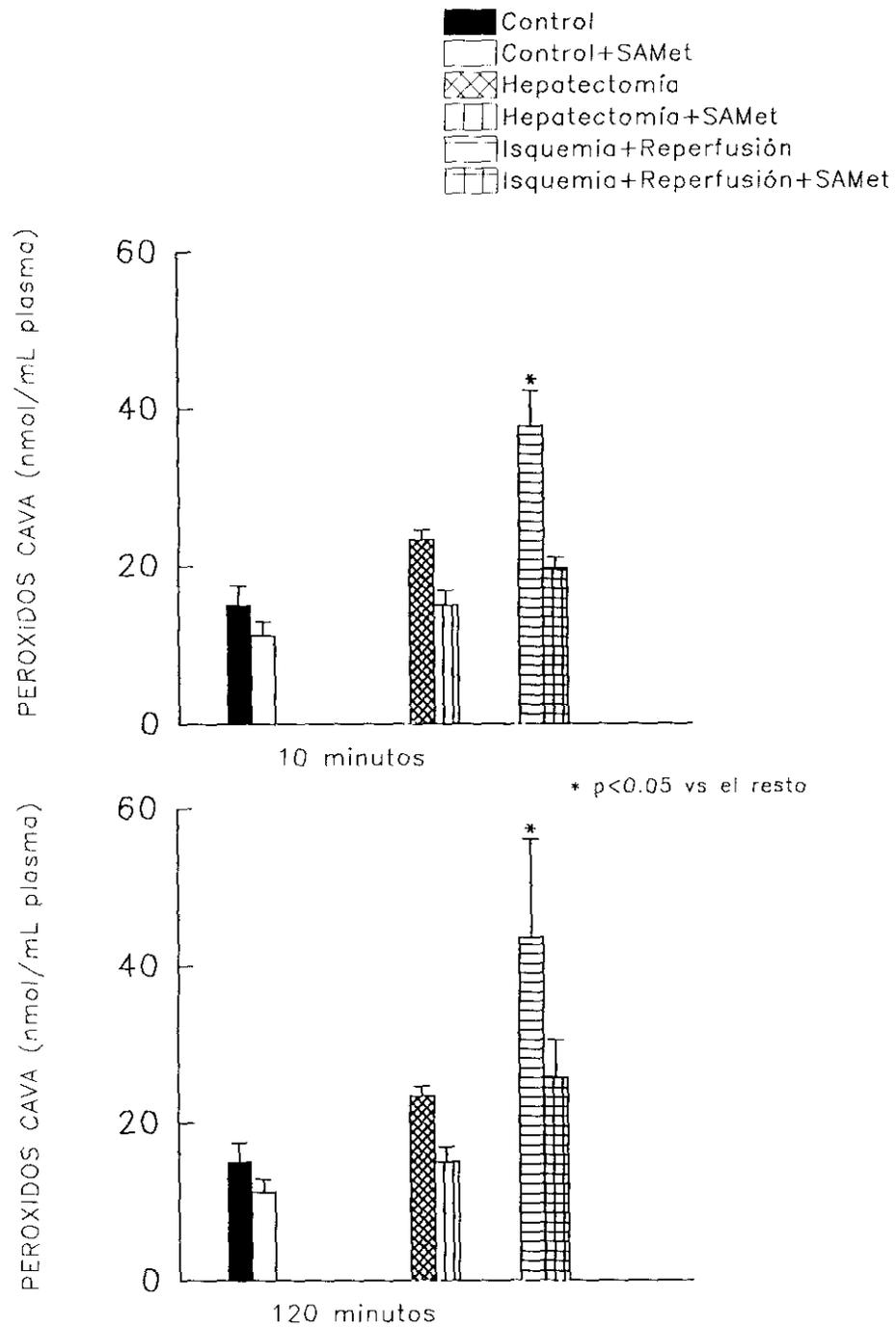


FIGURA 21: Niveles de peróxidos lipídicos en plasma procedente de vena Cava.

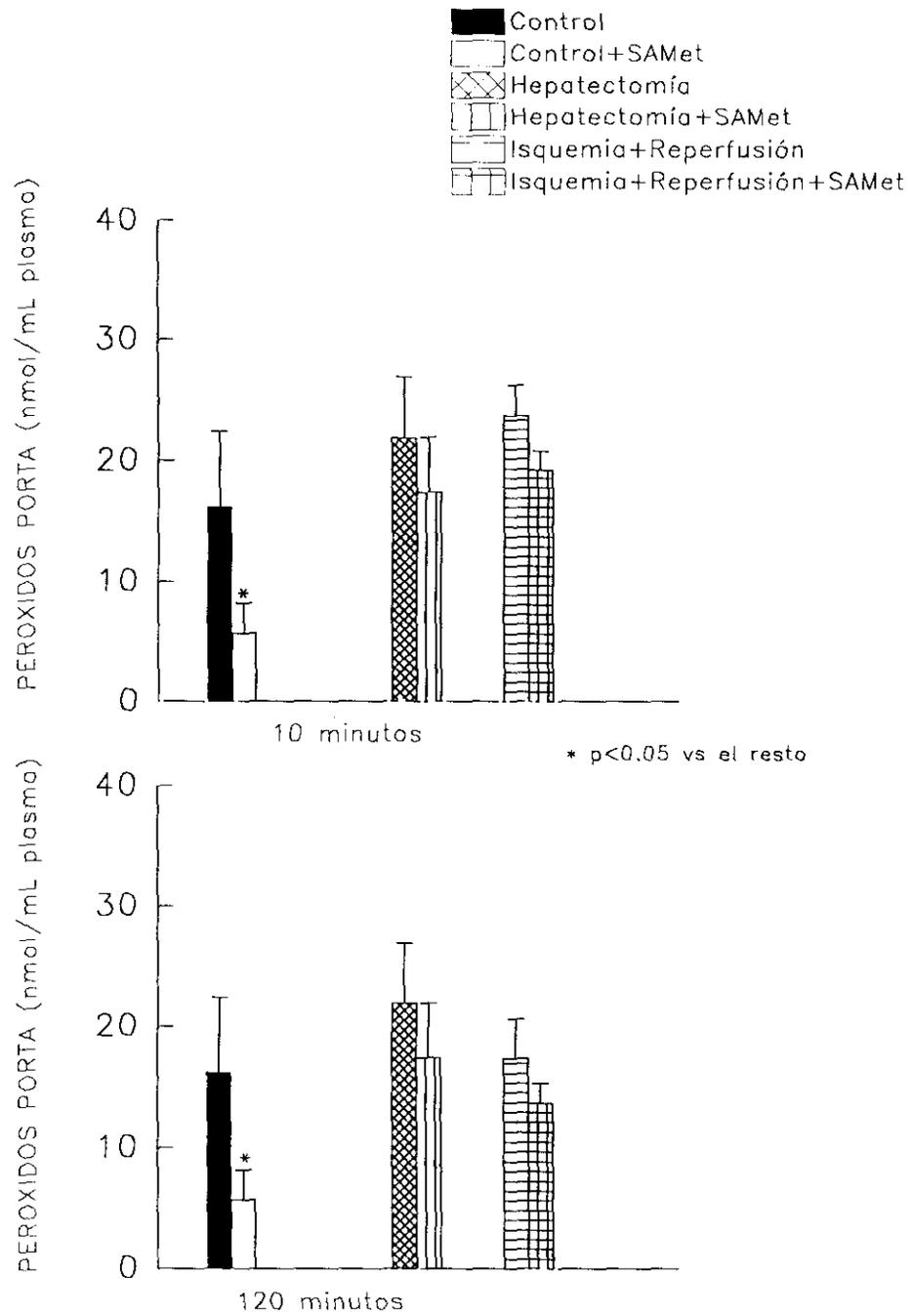


FIGURA 22: Niveles de peróxidos lipídicos en plasma procedente de vena Porta.

TRANSLOCACION BACTERIANA

Tras la determinación de los niveles de endotoxina en vena Cava, hemos observado que éstos aumentaron de forma significativa en los animales sometidos a isquemia reperusión, siendo este efecto atenuado por SAMet, tanto a los 10 minutos, (1.06 ± 0.06 UI/ml vs 0.43 ± 0.04 UI/ml plasma, $n=17$; $p<0.01$), como a los 120 minutos de la revascularización (2.78 ± 0.18 UI/ml vs 1.75 ± 0.17 UI/ml plasma, $n=12$; $p<0.01$). (Tabla IV; Fig. 23). En plasma procedente de vena Porta, también se encontraron niveles más elevados en las ratas del grupo no tratado que en aquéllas las que se administró SAMet, a los 10 minutos (0.61 ± 0.05 UI/ml plasma vs 0.48 ± 0.03 UI/ml, $n=17$; $p<0.05$), y a los 120 minutos de la reperusión, (2.02 ± 0.17 UI/ml plasma vs 1.37 ± 0.10 UI/ml, $n=12$; $p<0.01$). (Tabla IV, Fig.24).

GRUPO	Endotoxina (Porta) UI/ml plasma	Endotoxina (Cava) UI/ml plasma
Control	0.49±0.04 (3)	0.53±0.08 (3)
SAMet	0.54±0.01 (3)	0.59±0.03 (3)
Hepatectomía	0.51±0.06 (3)	0.54±0.11 (3)
Hepatec+SAMet	0.48±0.06 (3)	0.50±0.06 (3)
I-R 10 min	0.62±0.05 (17)**	1.06±0.07 (17)*
I-R 10 min+SAMet	0.49±0.03 (17)	0.44±0.04 (17)
I-R 2h	2.02±0.18 (12)*	2.79±0.18 (12)*
I-R 2h+SAMet	1.37±0.11 (12)*	1.76±0.11 (12)*

Tabla IV: Niveles de Endotoxina en plasma procedente de las venas Cava y Porta.

*p<0.01 vs todos los demás valores

**p<0.05 vs el resto de valores

Resultados

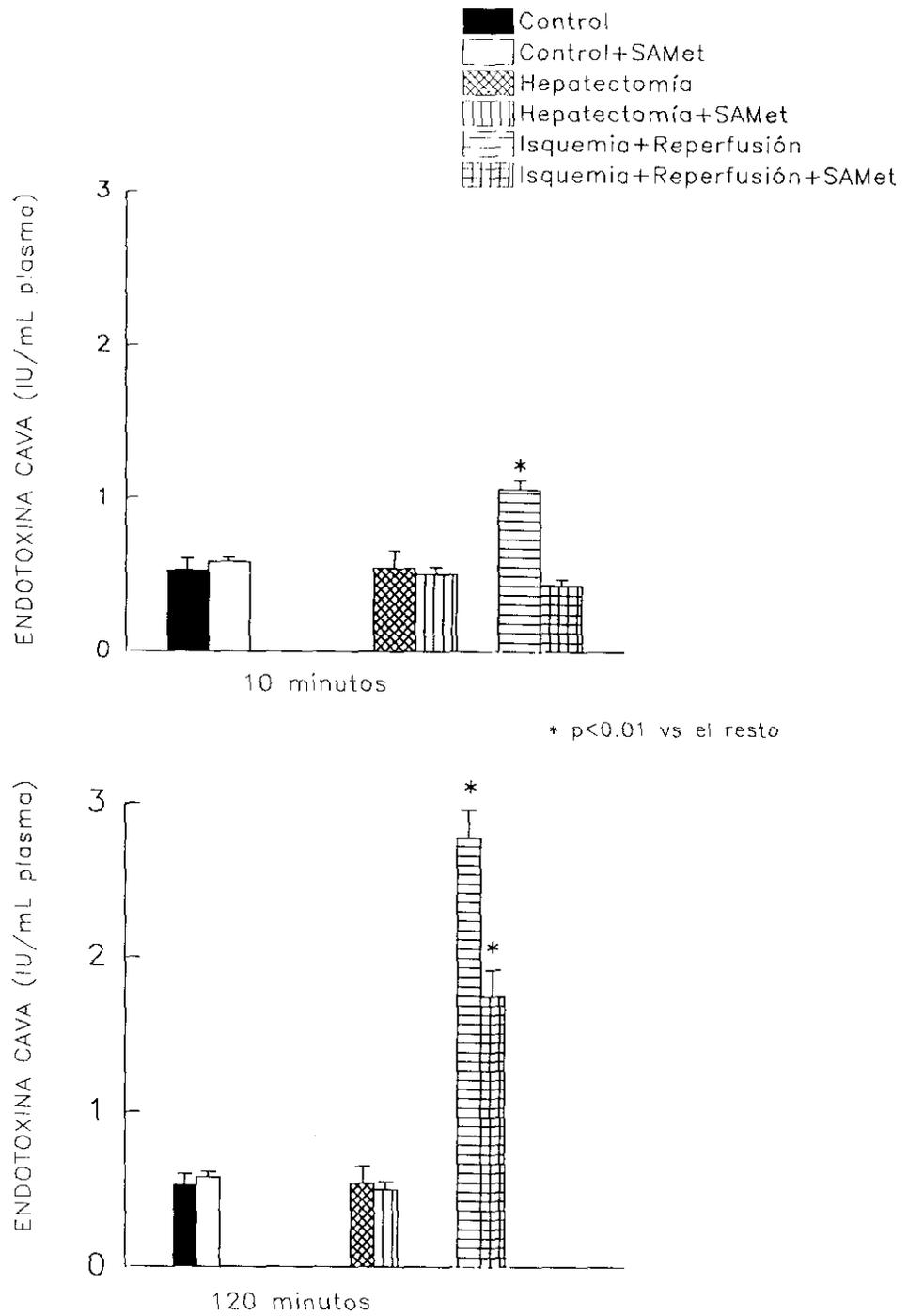


FIGURA 23: Niveles de endotoxina en plasma procedente de vena Cava.

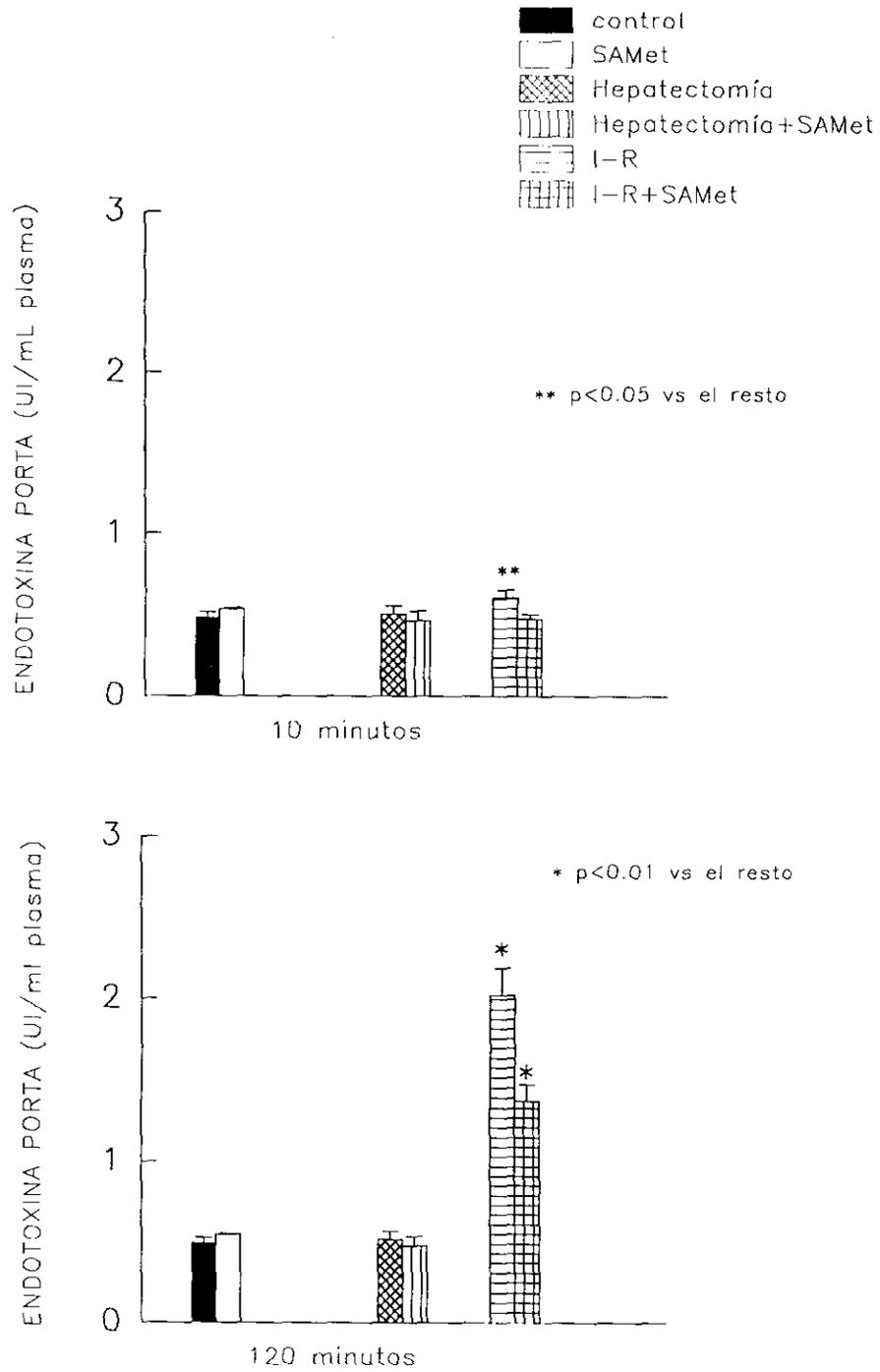


FIGURA 24: Niveles de endotoxina en plasma procedente de vena Porta.

CITOQUINAS

Sesenta minutos de isquemia, seguidos de 10 min de reperfusión indujeron un aumento significativo de los niveles de TNF α y de IL-1 β en tejido hepático, siendo reducido este efecto por la administración de SAMet (173.171 \pm 20.39 pg/mg vs 81.69 \pm 12.32 pg/mg tejido, n=17; p<0.01, en el caso del TNF α , (Tabla V; Figura 25), y 15.51 \pm 1.01 pg/mg vs 11.31 \pm 0.53 pg/mg tejido, n=17; p<0.01, para la IL-1 β). (Tabla V, Fig.26). Cuando se midió el contenido de estas citoquinas tras 120 minutos de reperfusión, no se han encontrado valores detectables (Tabla V).

Cuando determinamos los niveles de IL-1 α en el hígado, observamos que los niveles de esta citoquina aumentaron en la hepatectomía y tras 10 o 120 minutos de reperfusión. De nuevo el efecto de la isquemia-reperfusión fue atenuado por la administración de SAMet (25.62 \pm 12.82 vs 6.30 \pm 6.30 pg/mg tejido, n=3; p<0.05; 33.38 \pm 5.69 vs 14.91 \pm 3.85 pg/mg tejido, n=15; p<0.05, a los 10 minutos (Tabla V; Fig.27); 99.66 \pm 12.02 vs 66.54 \pm 8.00 pg/mg tejido, n=12; p<0.01, respectivamente). (Tabla V, Fig.28).

Los niveles hepáticos de IL-6 aumentaron por la hepatectomía, no observándose un efecto adicional de la isquemia-reperfusión, ni una reducción significativa por el tratamiento con SAMet, (16.84 \pm 3.18 vs 13.50

± 1.95 pg/mg tejido, n=3; 14.62 ± 4.23 vs 14.93 ± 6.54 pg/mg tejido, n=17; y 7.61 ± 0.41 vs 7.19 ± 0.48 pg/mg tejido, n=12, respectivamente). (Tabla V; Figs.29 y 30).

Un resultado similar se observó cuando determinamos los niveles de IL-6 en plasma procedente de vena cava (432.61 ± 147.75 vs 66.78 ± 8.84 pg/mL plasma, n=3; $p<0.01$; 275.16 ± 64.67 pg/mL, n=15; $p<0.01$; y 265.07 ± 74.06 vs 294.302 ± 70.06 pg/mL, n=12; $p<0.01$, respectivamente). El efecto del SAMet fue aún mas evidente que en tejido hepático. (Tabla V, Fig.31).

En el plasma procedente de vena Porta, no se modificaron los niveles de IL-6 por la hepatectomía, pero, en cambio, sí se elevaron en los animales sometidos a isquemia-reperfusión, tanto a los 10 como a los 120 minutos de la revascularización, siendo atenuado, de forma significativa, este incremento, por SAMet. (187.27 ± 38.18 vs 134.05 ± 15.20 pg/mL plasma, n=17; $p<0.05$; a los 10 minutos; 175.45 ± 62.34 vs 128.69 ± 29.83 pg/mL plasma, n=12, $p<0.05$, a los 120 minutos) (Tabla V; Fig.32).

GRUPO	TNF α (Hígado) pg/mg tejido	IL-1 β (Hígado) pg/mg tejido	IL-1 α (Hígado) pg/mg/tejido	IL-6 (Hígado) pg/mg tejido	IL-6 (Porta) pg/ml plasma	IL-6 (Cava) pg/ml plasma
Control	ND	ND	ND	5.91 \pm 3.01 (3)	76.57 \pm 13.17 (3)	56.78 \pm 31.93 (3)
SAMet	ND	ND	ND	7.18 \pm 3.63 (3)	69.80 \pm 9.85 (3)	90.24 \pm 30.96 (3)
Hepatectomía	ND	ND	25.63 \pm 12.82 (3)**	16.84 \pm 3.18 (3)	68.87 \pm 9.26 (3)	432.61 \pm 147.75 (3) [§]
Hepatec+SAMet	ND	ND	6.31 \pm 6.31 (3)	13.50 \pm 1.96 (3)	69.33 \pm 17.26 (3)	66.78 \pm 8.84 (3)
I-R 10 min	173.17 \pm 20.40 (17)*	15.52 \pm 1.01 (17)*	33.39 \pm 5.69 (15)**	14.63 \pm 4.23 (17)	187.27 \pm 38.18 (17)***	275.16 \pm 64.67 (17) [§]
I-R 10 min+SAMet	81.69 \pm 12.33 (17)*	11.32 \pm 0.54 (7)*	14.91 \pm 3.86 (15)	14.93 \pm 6.55 (17)	134.06 \pm 15.20 (17)	229.32 \pm 62.92 (17) [§]
I-R 2h	ND	ND	99.66 \pm 12.02 (12)*	7.61 \pm 0.42 (12)	175.45 \pm 62.34 (12)***	265.08 \pm 74.07 (12) [§]
I-R 2h+SAMet	ND	ND	66.55 \pm 8.01 (12)*	7.19 \pm 0.49 (12)	128.69 \pm 29.84 (12)	294.30 \pm 70.07 (12) [§]

Tabla V: Niveles de citoquinas (TNF α , IL-1 β , IL-1 α , e IL-6 en tejido hepático y en plasma procedente de las venas Cava y Porta.

*p<0.01 vs todos los demás valores

**p<0.05 vs el control y los grupos con SAMet

***p<0.05 vs el control, los grupos con SAMet y los grupos sometidos a hepatectomía

§p<0.05 vs el control, los grupos con SAMet, y los sometidos a hepatectomía previo tratamiento con SAMet

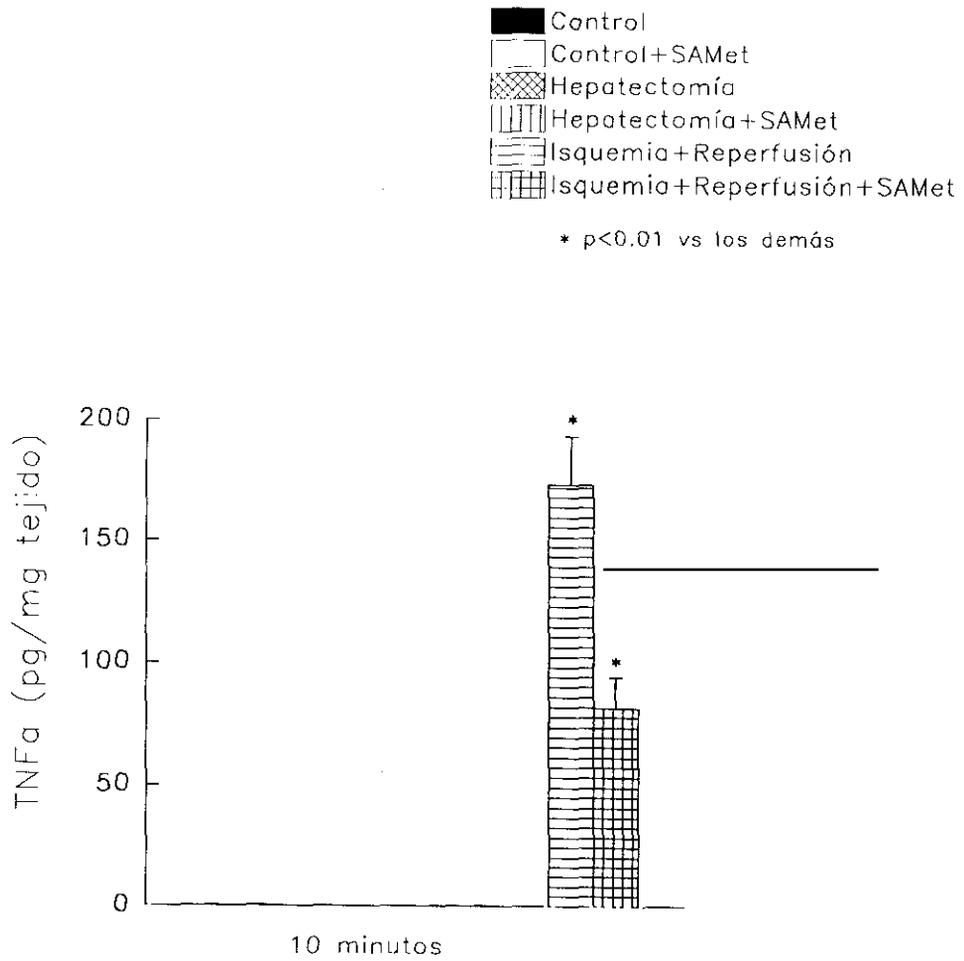


FIGURA 25: Niveles de factor de necrosis tumoral-alfa (TNF α) en tejido hepático. Los niveles tras 120 minutos de reperfusion fueron indetectables.

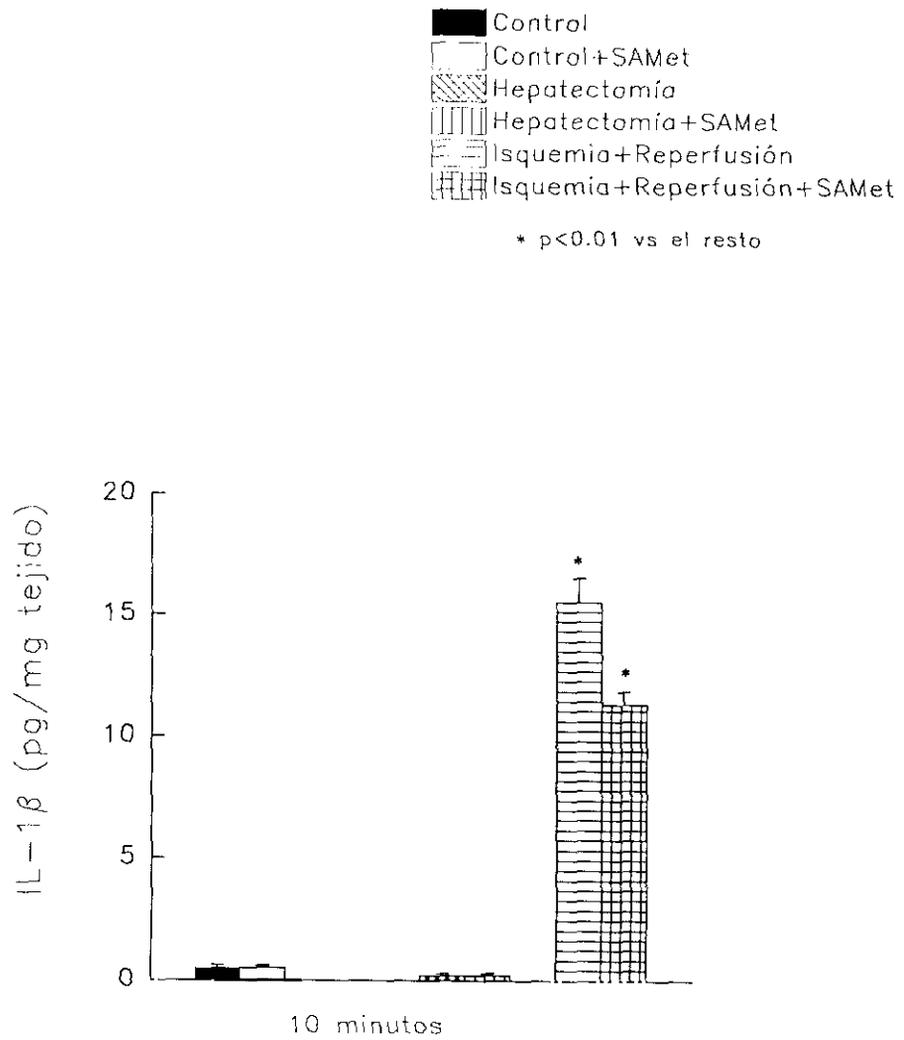


FIGURA 26: Niveles de interleuquina-1-beta (IL-1 β) en tejido hepático. Los niveles tras 120 minutos de reperfusión fueron indetectables.

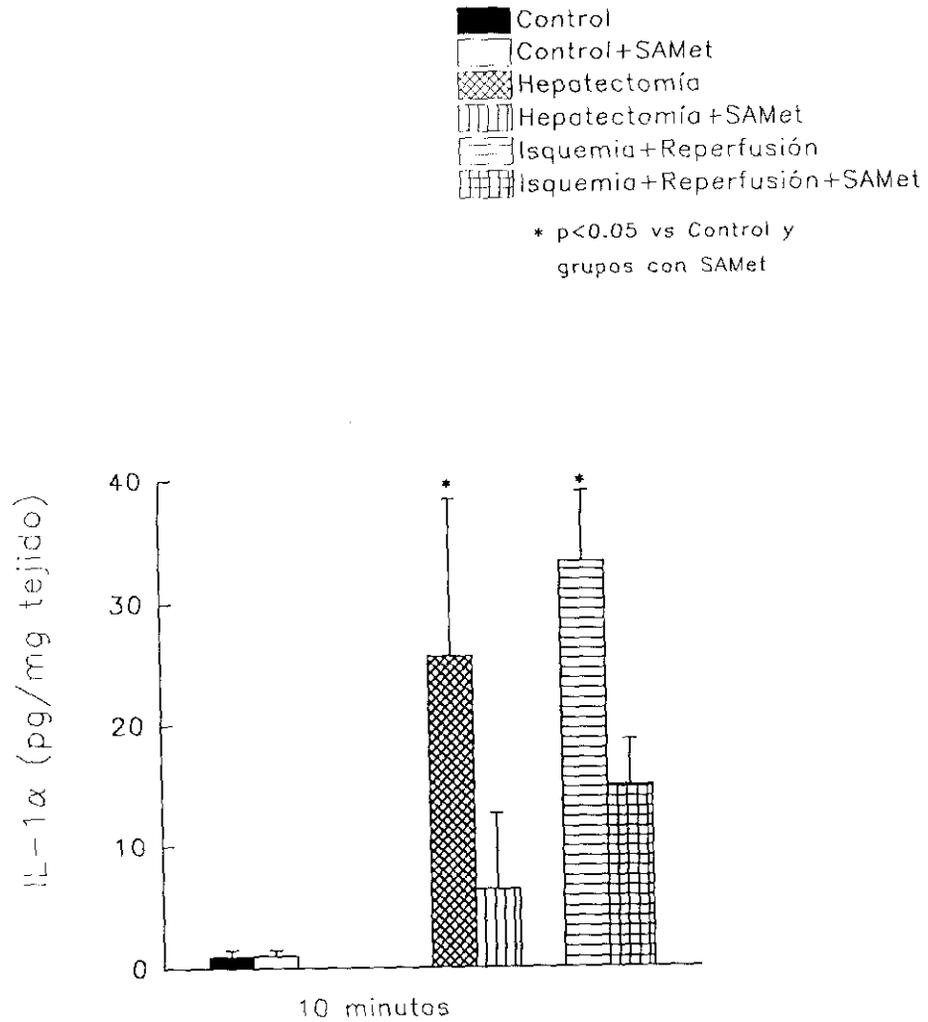


FIGURA 27: Niveles de interleuquina-1-alfa (IL-1 α) en tejido hepático. El tiempo de reperusión fue de 10 minutos en los grupos correspondientes.

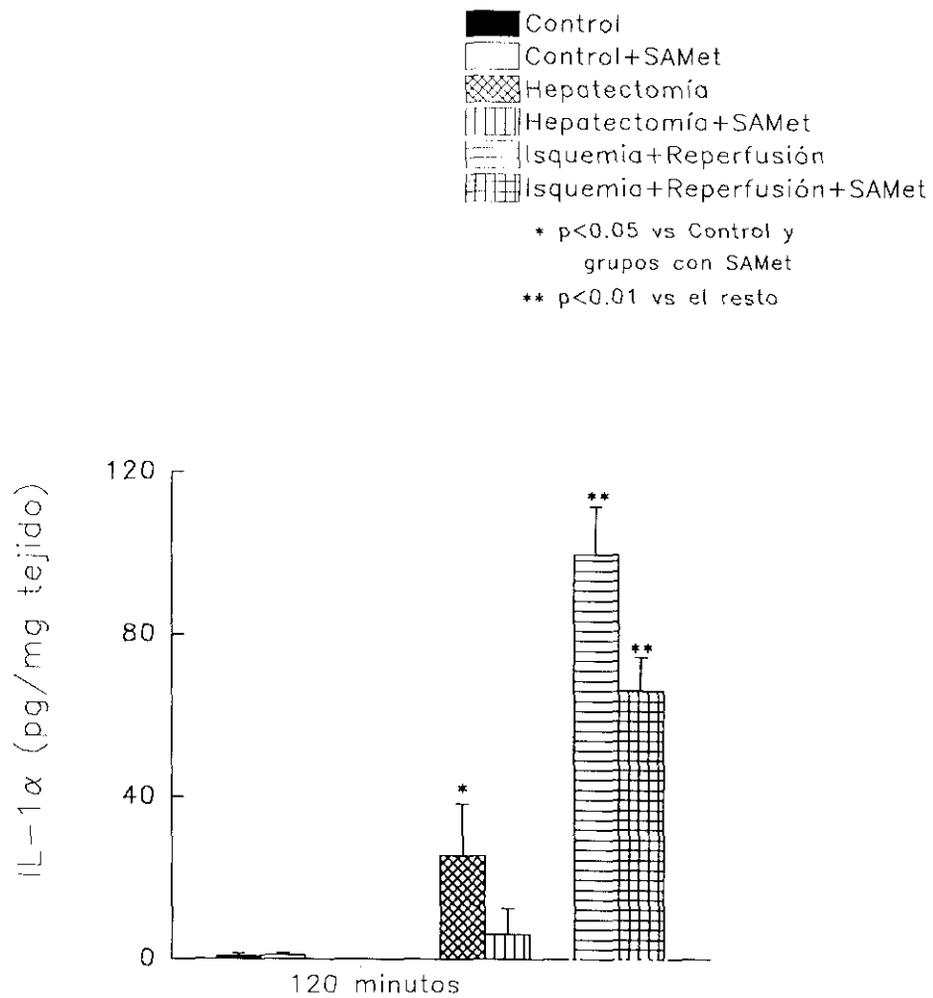


FIGURA 28: Niveles de interleuquina-1-alfa (IL-1 α) en tejido hepático. El tiempo de reperfusión fue de 120 minutos en los grupos correspondientes.

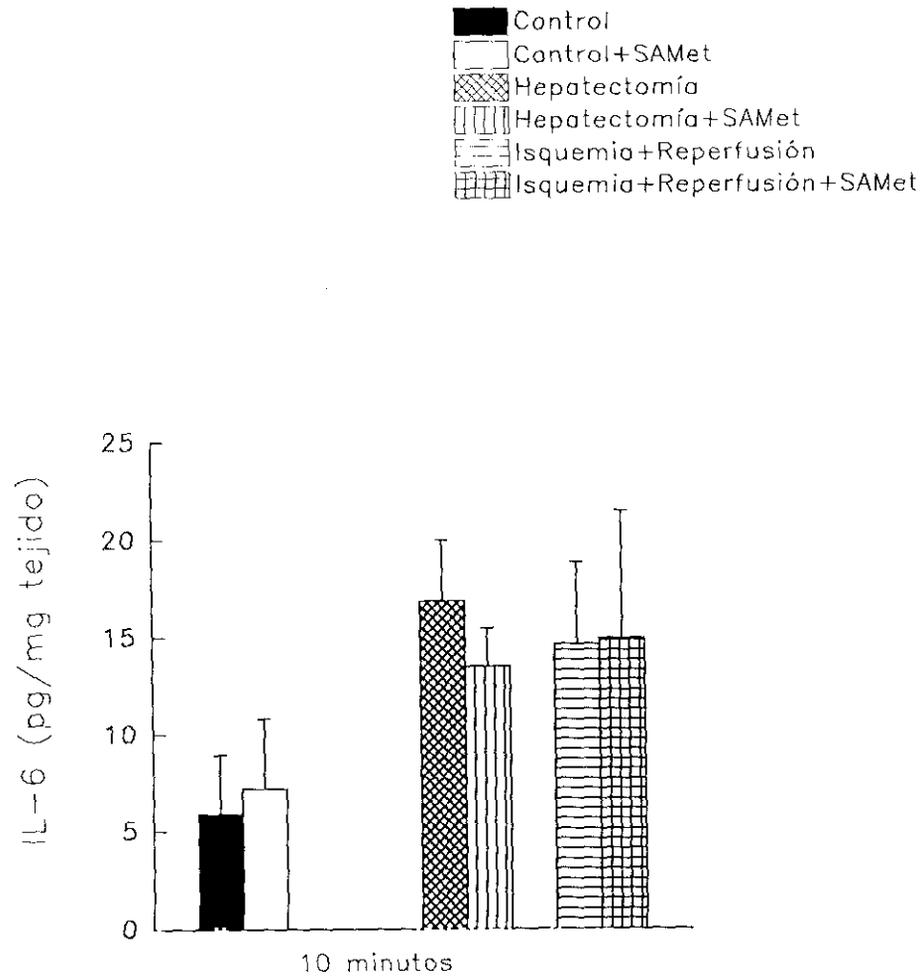


FIGURA 29: Niveles de interleuquina-6 (IL-6) en tejido hepático. El tiempo de reperusión fue de 10 minutos en los grupos correspondientes.

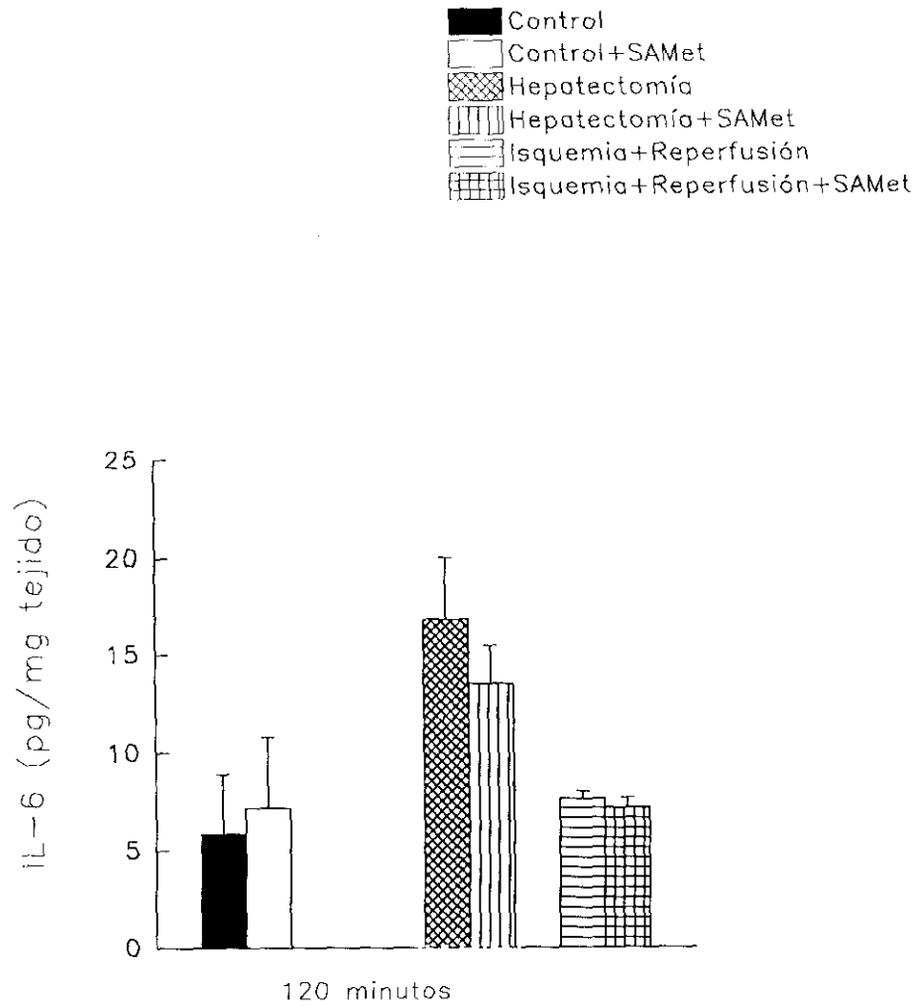


FIGURA 30: Niveles de interleuquina-6 (IL-6) en tejido hepático, tras 120 minutos de reperusión en los grupos correspondientes.

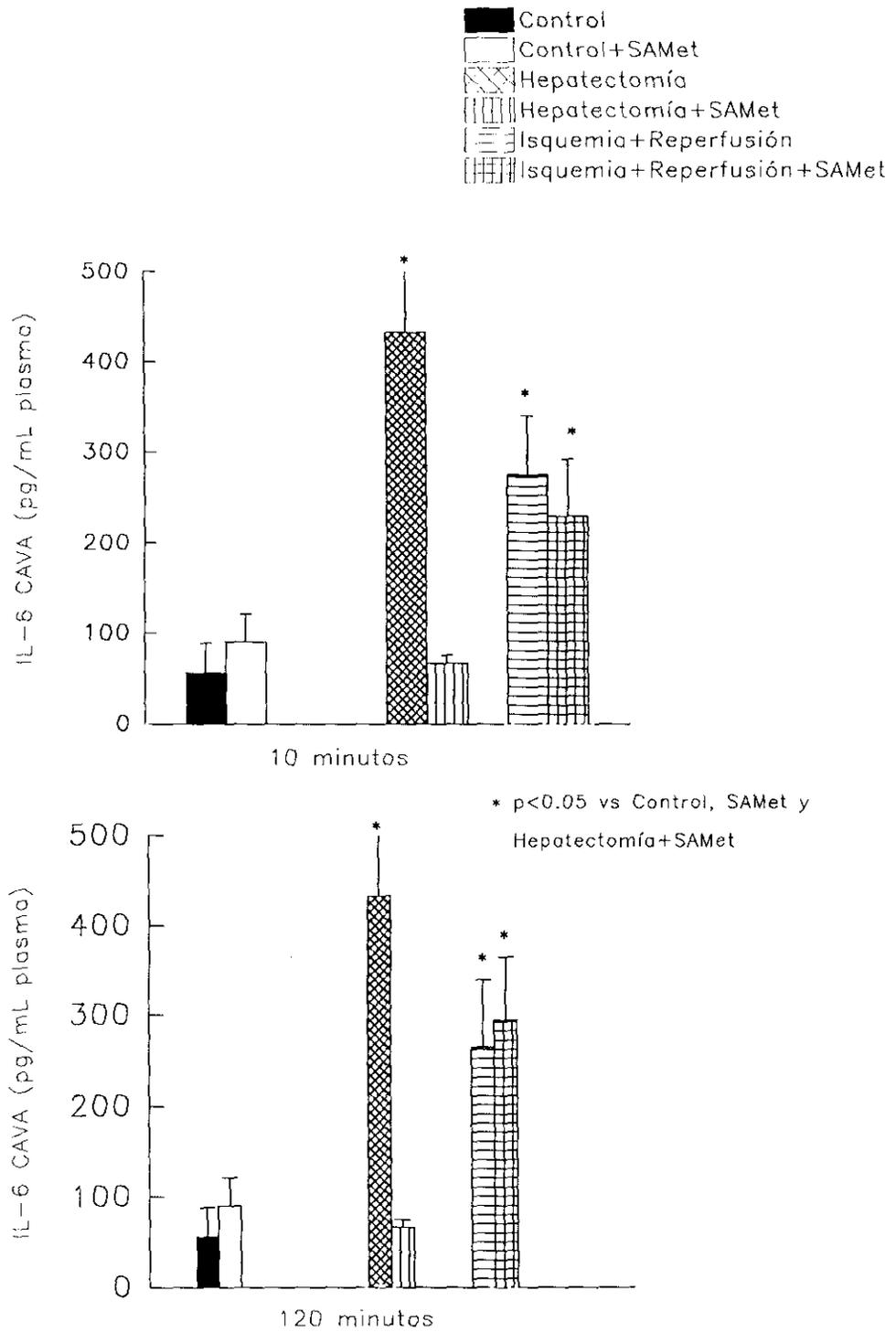


FIGURA 31: Niveles de IL-6 en plasma procedente de vena Cava.

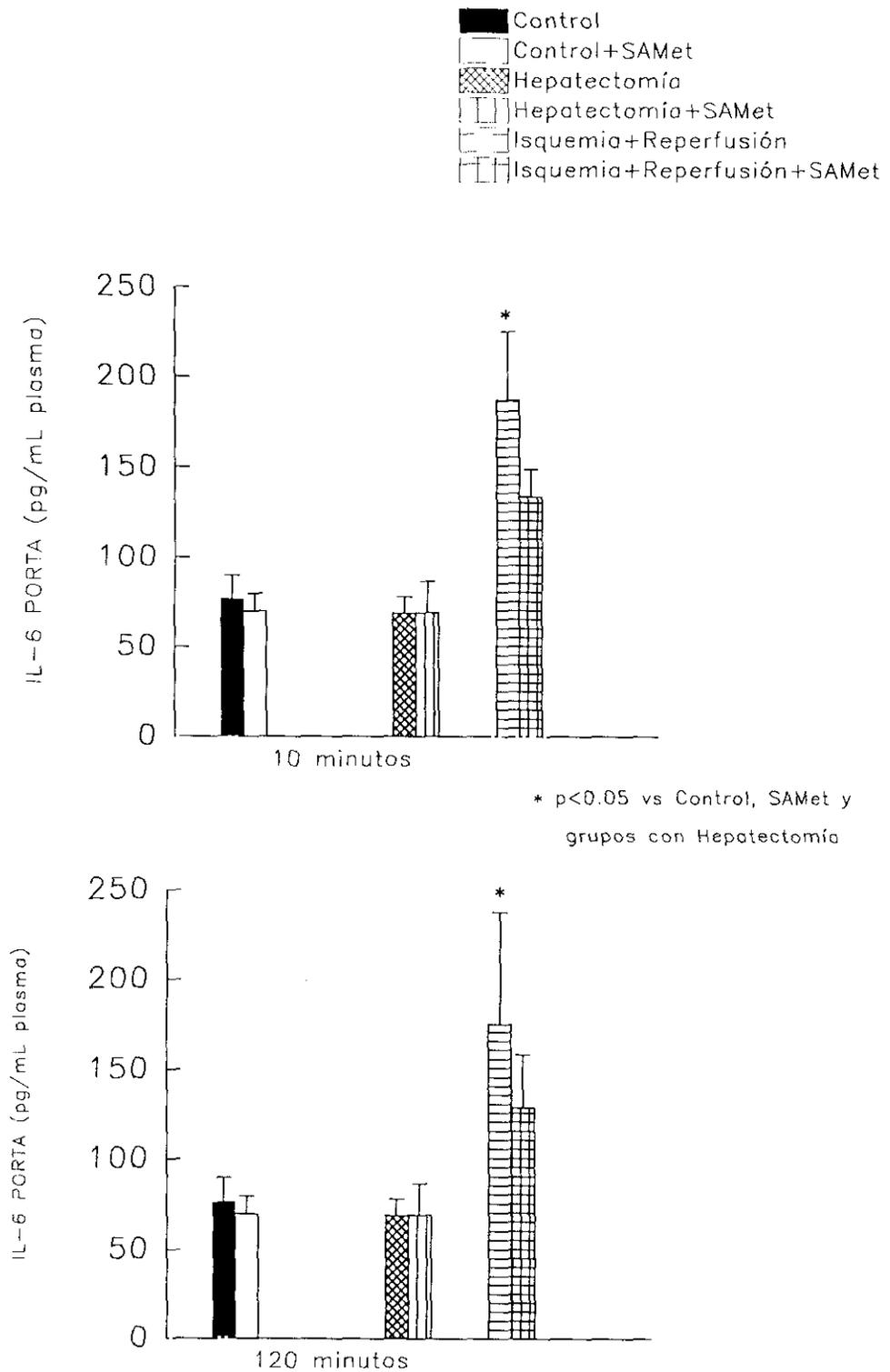


FIGURA 32: Niveles de IL-6 en plasma procedente de vena Porta.

OXIDO NITRICO (NO), MONOXIDO de CARBONO (CO), y GMP cíclico

Un mediador molecular implicado en las acciones de las citoquinas es el NO. Además de sus efectos tóxicos directos, el NO puede actuar a través de la activación de la fracción soluble de la guanilatociclasa, con el consiguiente aumento en la concentración del segundo mensajero intracelular GMPc. La guanilatociclasa puede ser activada también por el monóxido de carbono (CO); este gas puede formarse endógenamente, y tiene efectos fisiológicos.

La isquemia-reperfusión indujo un incremento en la concentración de NO en plasma procedente de vena Cava, que disminuyó de forma significativa tras el tratamiento con SAMet (70.57 ± 6.19 vs 45.34 ± 3.06 nmol/mL plasma, n=14; p<0.01, a los 10 minutos; 88.94 ± 12.87 vs 66.53 ± 6.28 nmol/mL plasma, n=12; p<0.05, a los 120 minutos). (Tabla VI; Fig.33).

Se obtuvieron resultados similares en el plasma procedente de vena Porta. (46.90 ± 6.67 vs 40.55 ± 4.53 nmol/mL plasma, n=16; p<0.01, a los 10 minutos; 53.32 ± 7.63 vs 49.49 ± 4.70 nmol/mL plasma, n=12; p<0.01, a los 120 minutos). (Tabla VI; Fig.34)

La concentración de CO en vena Porta aumentó tras la hepatectomía sola (5.44 ± 1.67 vs 2.86 ± 0.15 pmol/mL plasma, $n=3$; $p<0.01$). Un incremento aún mayor fue observado después de la isquemia-reperfusión (9.62 ± 0.87 y 7.76 ± 0.62 pmol/mL plasma, tras 10 y 120 min de perfusión, respectivamente). (Tabla VI; Fig.34). El efecto inductor de la isquemia-reperfusión parece estar bloqueado por la administración de SAMet. (Tabla VI; Fig.35).

En vena Cava, se observaron efectos similares tras la isquemia-reperfusión (10.80 ± 1.17 vs 2.87 ± 0.41 pmol/ mL plasma, $n=17$; $p<0.01$, y 10.45 ± 1.43 vs 2.87 ± 0.41 pmol/mL plasma, $n=12$; $p<0.01$; tras 10 y 120 minutos de perfusión, respectivamente). (Tabla VI; Fig.36).

En cuanto a los niveles de GMPc, se observó un aumento significativo del mismo tras la hepatectomía (36.8 ± 10.01 vs 17.03 ± 6.92 pmol/mg tejido, $n=3$; $p<0.05$) que fue revertido por la administración de SAMet (22.90 ± 13.30 vs 36.80 ± 10.01 pmol/mg tejido, $n=3$; $p<0.05$). Isquemia seguida de 10 minutos de perfusión no modificó los niveles de cGMP, hallando valores significativamente menores tras 120 minutos de perfusión, tanto en el grupo control como en el tratado con SAMet. (Tabla VI; Figs.37 y 38).

GRUPO	NO (Porta) nmol/mL plasma	NO (Cava) nmol/mL plasma	CO (Porta) pmol/mL plasma	CO (Cava) pmol/mL plasma	GMPc (Hígado) pmol/mg tejido
Control	20.63±6.03 (3)	25.61±1.95 (3)	2.86±0.15 (3)	2.87±0.41 (3)	17.03±6.92 (3)
SAMet	24.88±1.73 (3)	27.28±1.03 (3)	2.90±0.15 (3)	2.57±0.52 (3)	16.706±6.16 (3)
Hepatectomía	19.99±4.30 (3)	30.90±3.10 (3)	5.44 ±1.67 (3)	3.70 ±0.78 (3)	36.80±10.01 (3)*
Hepatec+SAMet	23.95±1.40 (3)	29.70±1.51 (3)	6.33±1.82 (3)	3.69±0.25 (3)	22.90±13.30 (3)
I-R 10 min	46.90±6.67 (14)*	70.58±6.20 (14)*	9.62 ±0.87 (17)\$§	10.80 ±1.18 (17)*	20.38±2.75 (17)
I-R 10 min+SAMet	40.55±4.53 (16)*	45.34±3.06 (13)	7.87±0.83 (17)\$§	6.59±0.45 (17)*	15.25±2.78 (17)
I-R 2h	53.33±7.63 (12)**	88.94±12.88 (12)**	7.76±0.618 (12)##	10.45±1.43 (12)*	9.10±1.16 (12)*
I-R 2h+SAMet	49.49±4.71 (12)**	66.53±6.28 (12)*\$	6.71±0.78 (12)##	6.23±0.86 (12)*	5.67±0.74 (12)*

Tabla VI: Niveles de óxido nítrico (NO) y monóxido de carbono (CO) en plasma procedente de las venas Cava y Porta, y concentración de GMPc en tejido hepático.

*p<0.01 vs todos los demás valores

+p<0.05 vs el resto de valores

**p<0.01 vs el control, el grupo con SAMet, y el sometido a hepatectomía

\$p<0.05 vs I-R

#p<0.05 vs el control, el grupo con SAMet, y los sometidos a hepatectomía

##p<0.01 vs el control y el grupo con SAMet

\$\$\$p<0.05 vs el control y el grupo con SAMet

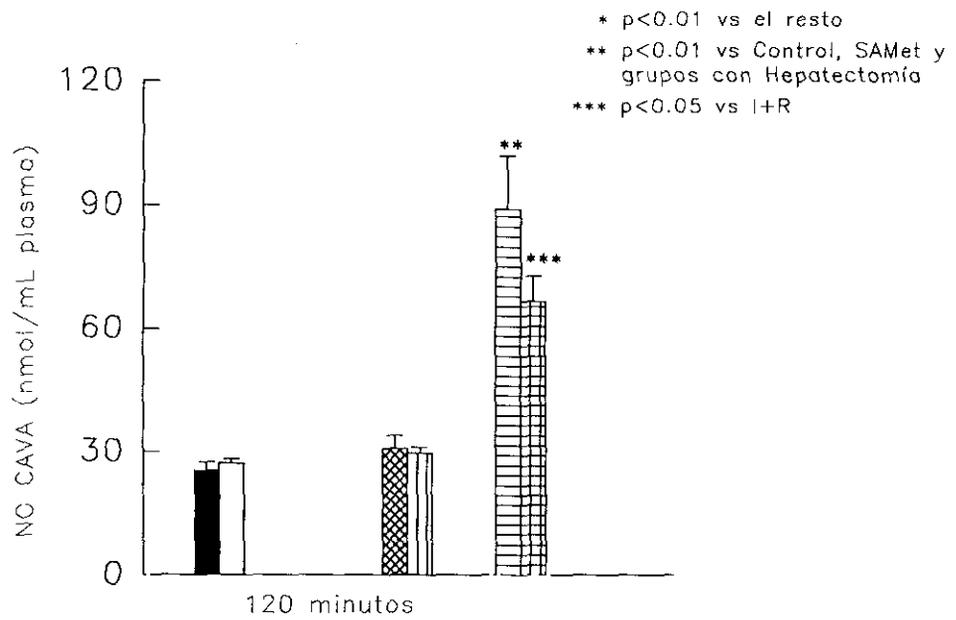
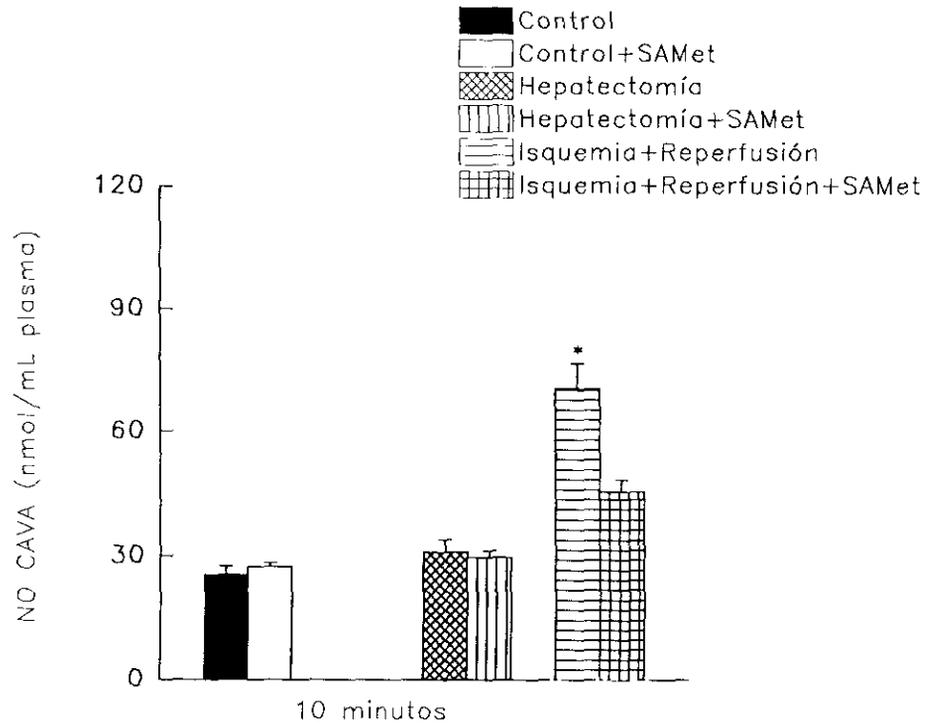


FIGURA 33: Niveles de óxido nítrico (NO) en plasma procedente de vena Cava.

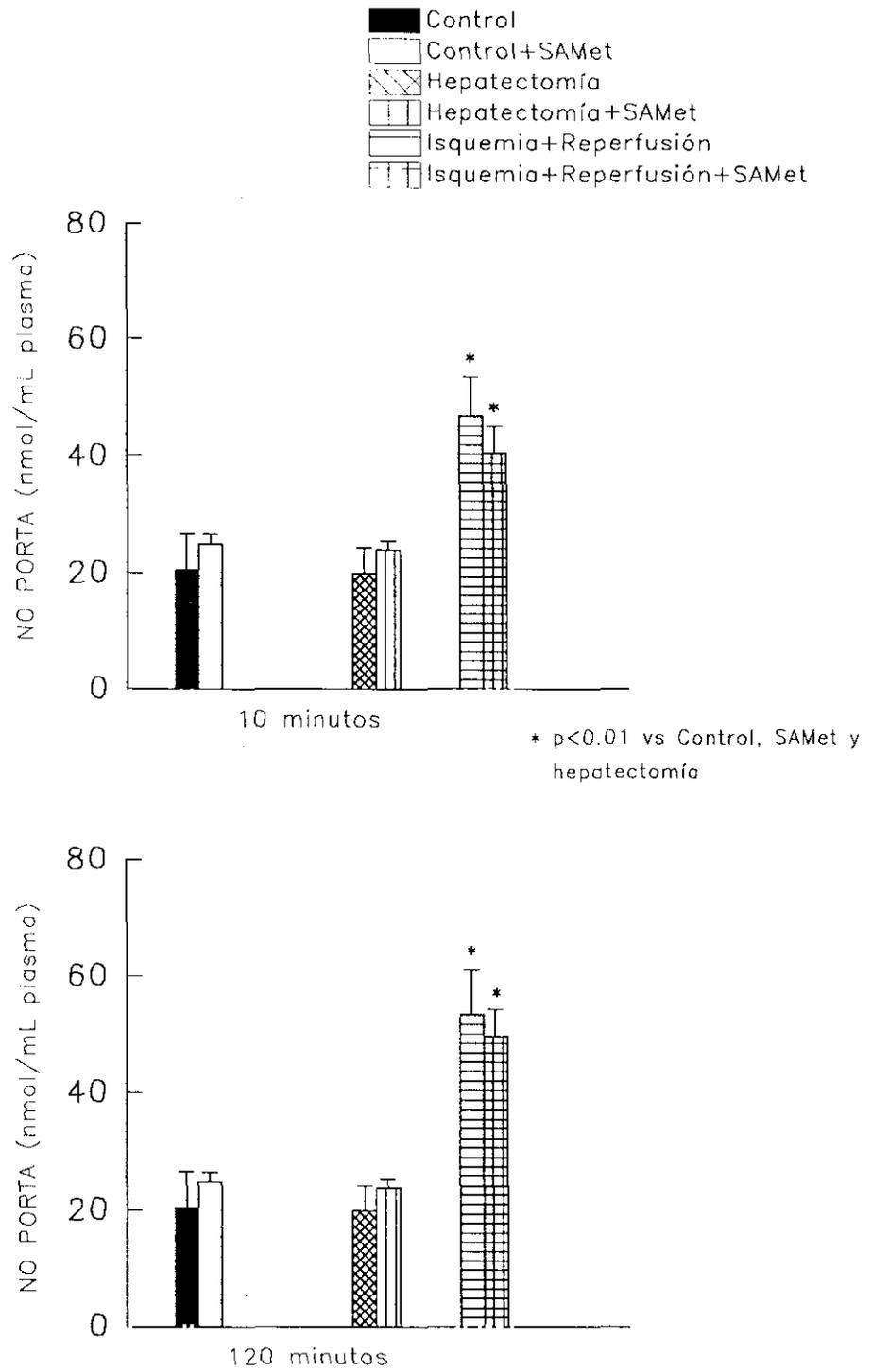


FIGURA 34: Niveles de NO en plasma procedente de vena Porta.

Resultados

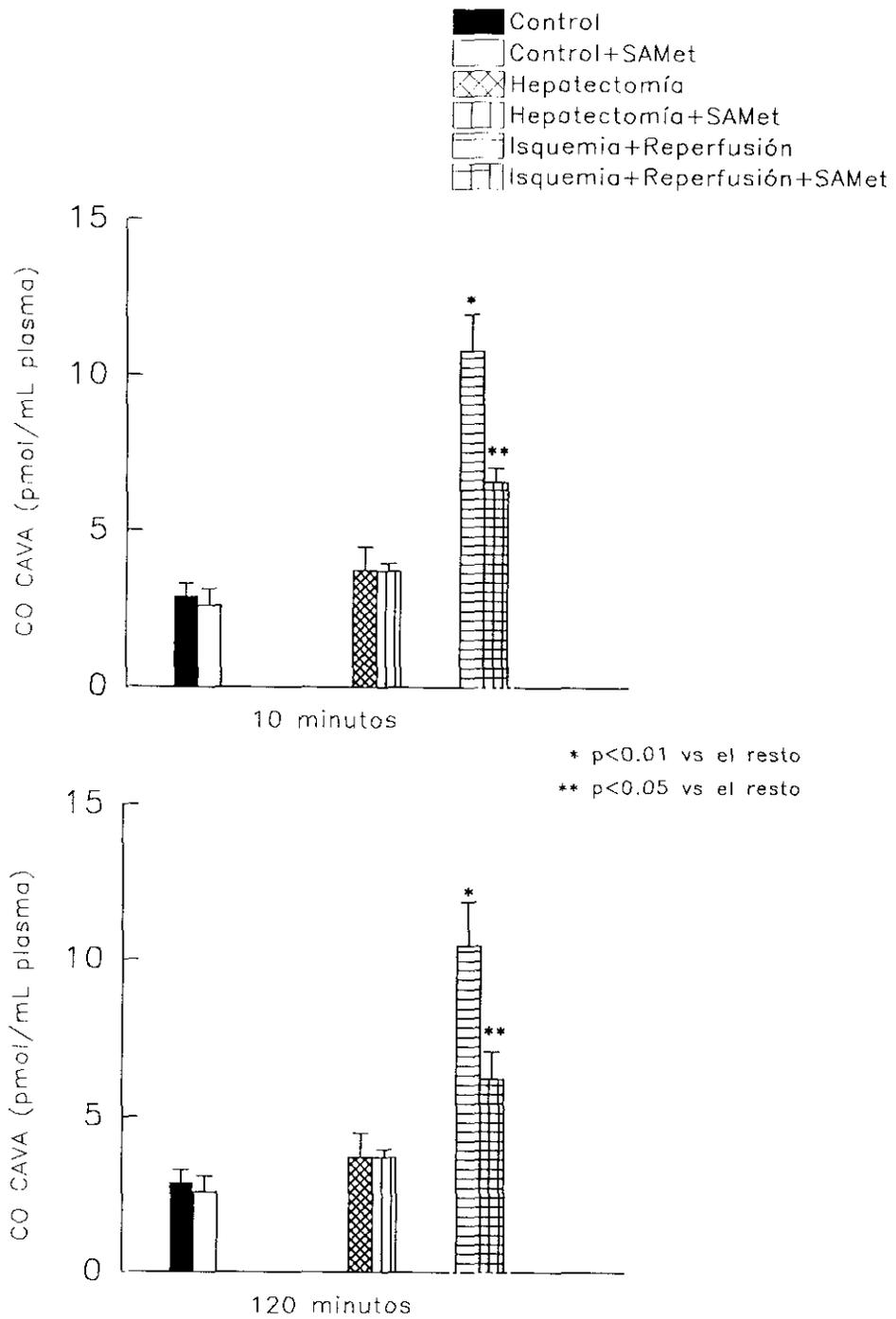


FIGURA 35: Niveles de monóxido de carbono (CO) en plasma procedente de vena Cava.

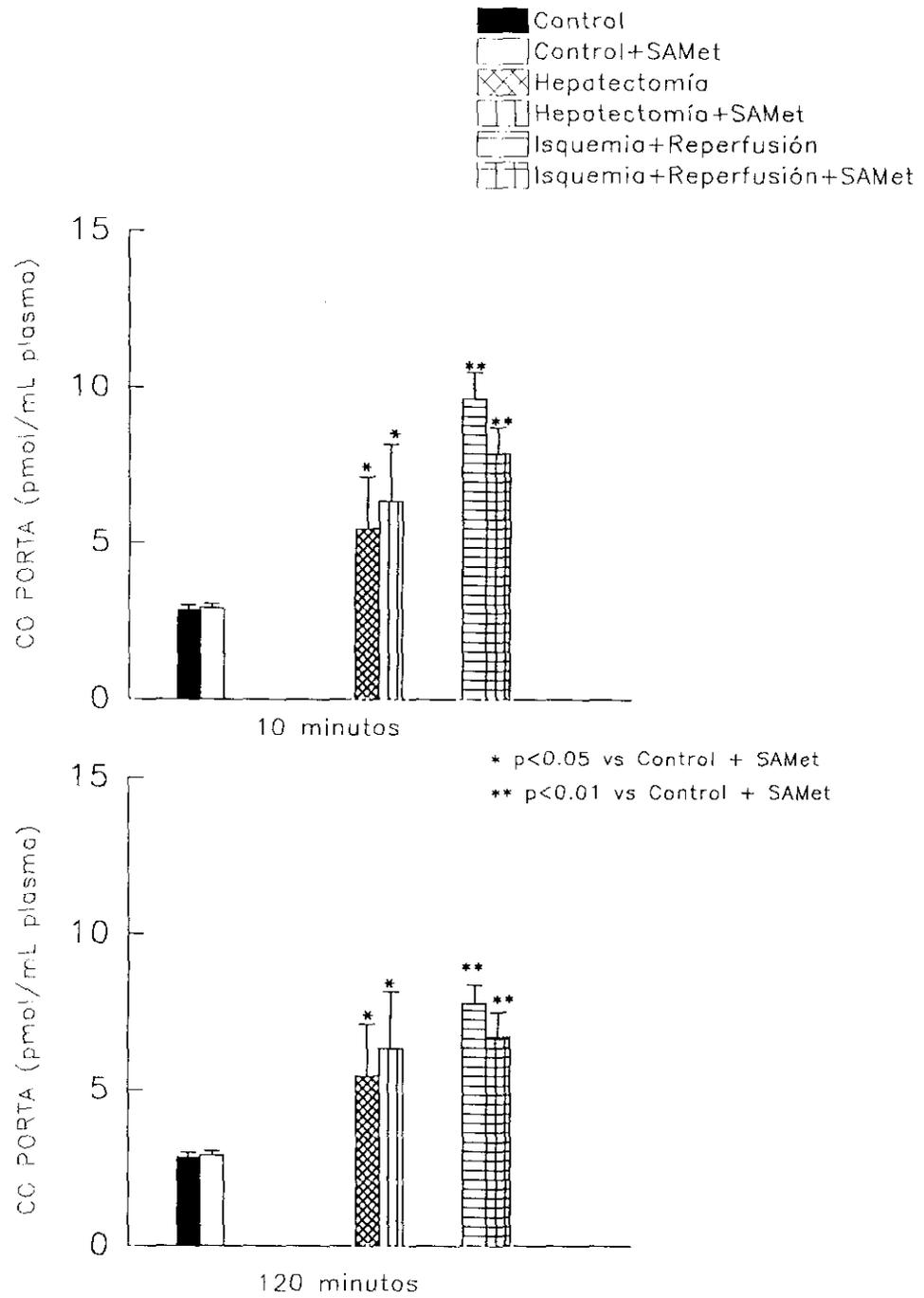


FIGURA 36: Niveles de CO en plasma procedente de vena Porta.

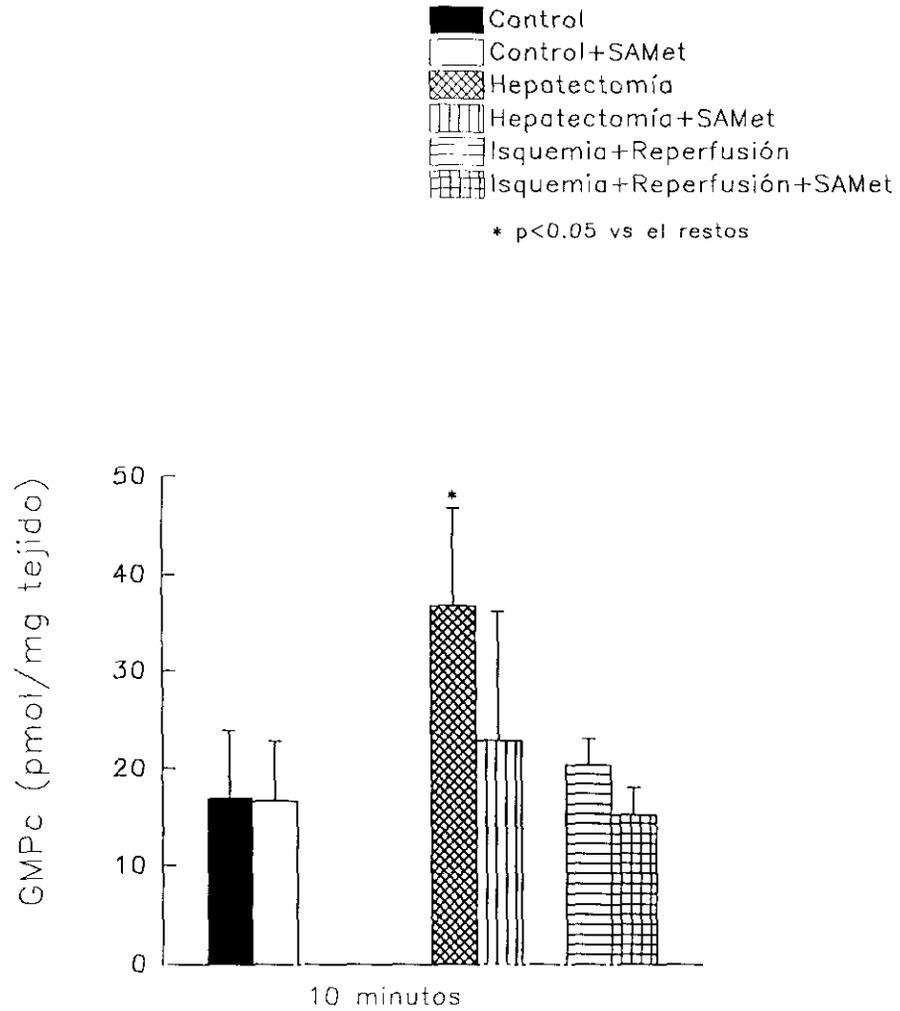


FIGURA 37: Niveles de GMPcíclico (GMPc) en tejido hepático, tras 10 minutos de reperfundición en los grupos correspondientes.

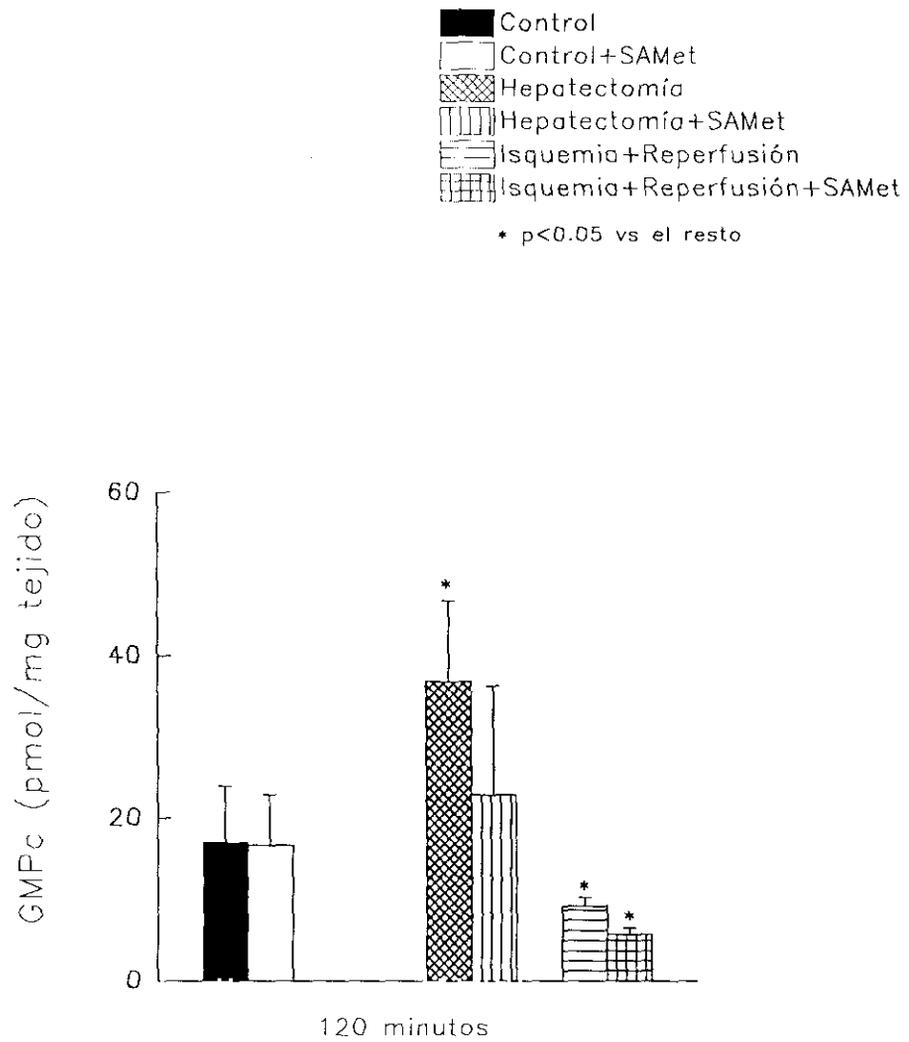


FIGURA 38: Niveles de GMPc en tejido hepático, tras 120 minutos de perfusión en los grupos correspondientes.

FOSFATIDILCOLINA Y LISOFOSFATIDILCOLINA

Los fosfolípidos son componentes esenciales de las membranas celulares, y se sabe que la fosfatidilcolina (PC), desempeña un importante papel en la estructura de la membrana celular. Al estudiar el efecto de la isquemia-reperfusión sobre la síntesis de PC, hemos observado que la isquemia-reperfusión provoca un descenso significativo de la síntesis de PC, medida como incorporación de colina tritiada. Este efecto fue atenuado por SAMet (15147.5 ± 183.34 cpm/mg vs 9034.17 ± 405.15 cpm/mg tejido, $n=12$; $p<0.01$). (Tabla VII; Fig.39).

Por el contrario, aumentó la síntesis de lisofosfatidilcolina (LPC), lo cual sugiere un incremento en la actividad de la fosfolipasa A_2 , , siendo también este efecto revertido por la administración de SAMet (4734.17 ± 58.26 cpm/mg vs 7071.67 ± 301.68 cpm/mg tejido, $n=12$; $p<0.01$). (Tabla VII; Fig.40).

GRUPO	PC (Hígado) cpm/mg tejido	LPC (Hígado) cpm/mg tejido
Control	18433.3±1071.6 (3)	4183.3±164.1 (3)
SAMet	25253.3±138.6 (3)*	3723.3±422.7 (3)
Hepatectomía	18326.7±800.1 (3)	4236.7±31.8 (3)
Hepatec+SAMet	21390.0±1377.6 (3)*	4550.0±94.5 (3)
I-R 2h	9034.2±405.2 (12)*	7071.7±301.7 (12)*
I-R 2h+SAMet	15147.5±183.3 (12)*	4734.2±58.3 (12)

Tabla VII: Síntesis de fosfatidilcolina (PC) y de lisofosfatidilcolina (LPC) en tejido hepático.

*p<0.01 vs todos los demás valores.

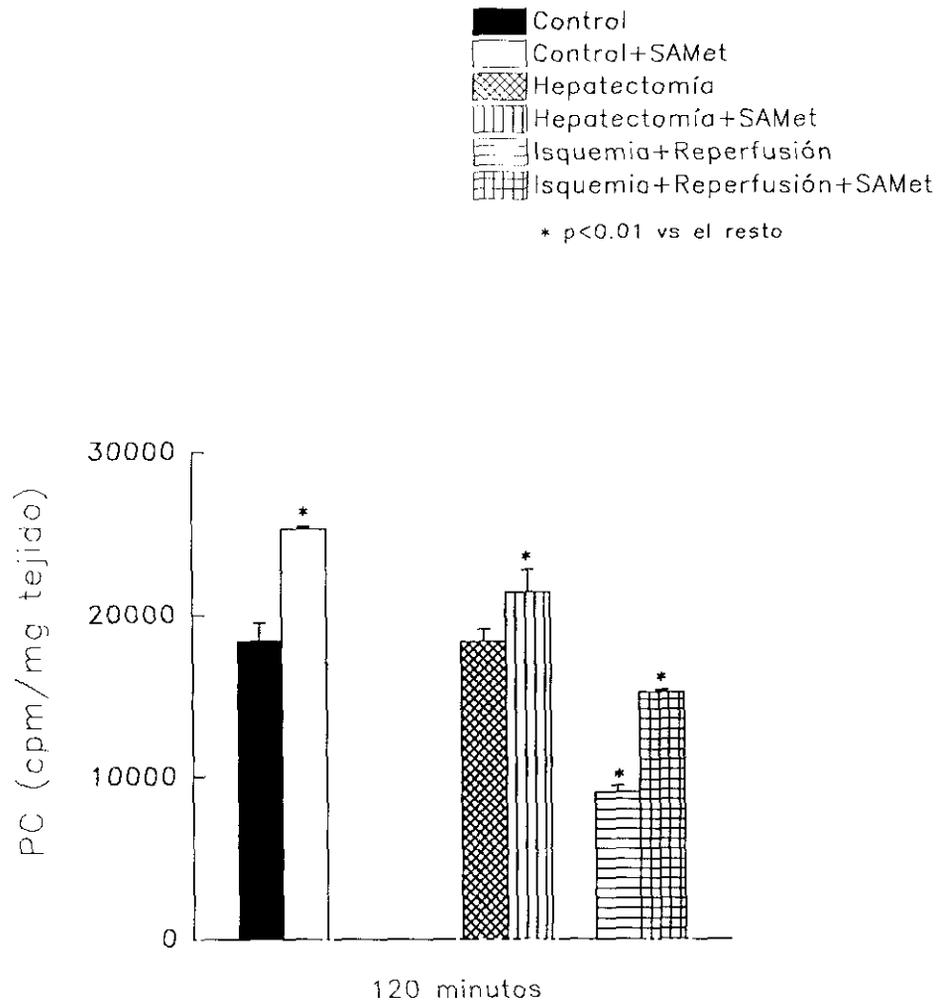


FIGURA 39: Niveles de fosfatidilcolina (PC) en tejido hepático.

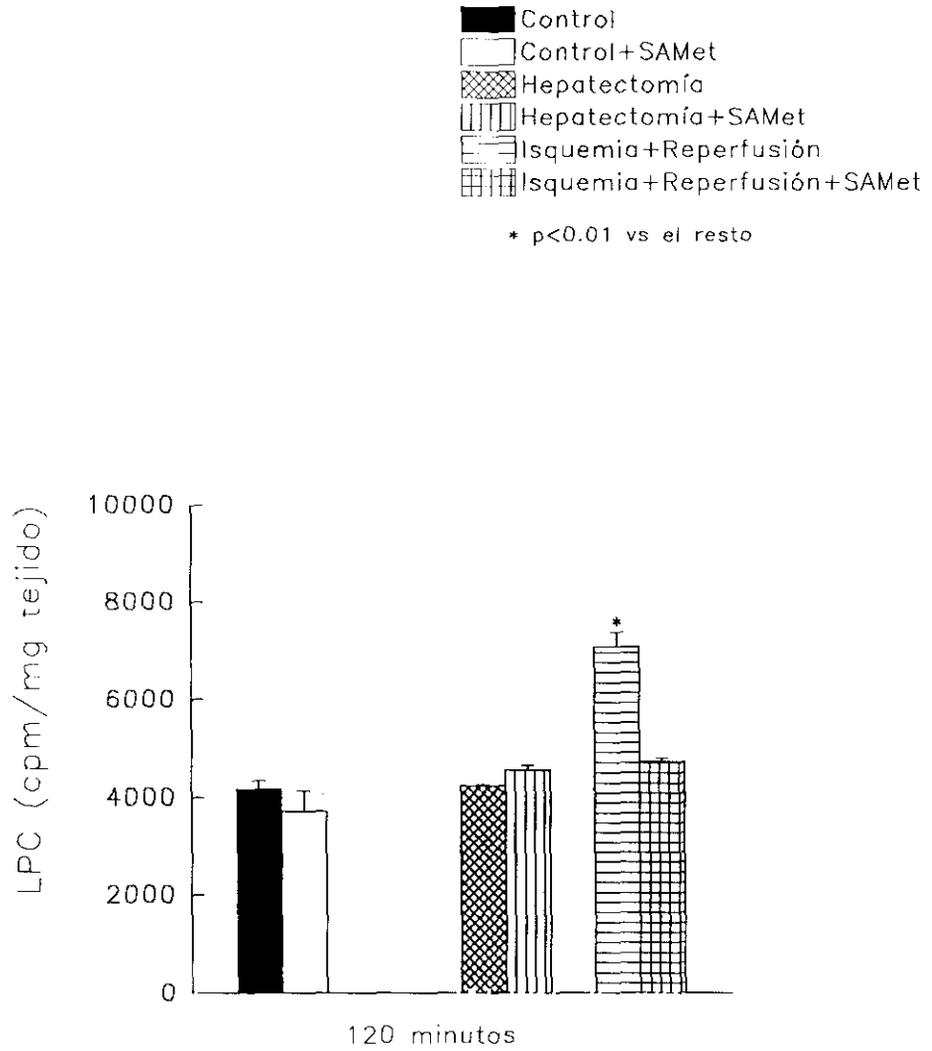


FIGURA 40: Niveles de lisofosfatidilcolina (LPC) en tejido hepático.

SUPERVIVENCIA

Los animales a los cuales se les practicó únicamente una hepatectomía, tuvieron una mortalidad atribuible al procedimiento, nula.

La mortalidad del grupo sometido a isquemia-reperfusión alcanzó el 68%, disminuyendo de modo significativo, (al 30%), en las ratas previamente tratadas con SAMet ($p < 0.01$).

Se consideraron supervivientes permanentes todos los animales que sobrevivieron más de 72 horas tras el procedimiento quirúrgico.

DISCUSSION

La isquemia hepática es un problema frecuente en la práctica clínica, ya sea secundario a un problema hemorrágico, asociado a los estados de sepsis, o bien en relación con la cirugía hepática, principalmente el trasplante. Como en el caso de otros órganos, se ha reconocido últimamente que los procesos secundarios a la reperfusión del hígado isquémico contribuyen de forma fundamental a la lesión hepática. Este reconocimiento adquiere enorme importancia porque da la impresión de que el daño reperfusional sería más accesible al tratamiento que la propia isquemia.

Para explicar el daño hepático debido a la isquemia-reperfusión, se han postulado diversos mecanismos, como migración y activación de leucocitos polimorfonucleares (26,233), lesión de células endoteliales (27), alteraciones en la microcirculación (29), activación de los sistemas de la coagulación y del complemento (234), depleción de energía (60), activación de las células de Kupffer con liberación de mediadores tóxicos, tales como proteasas, leucotrienos y citoquinas (235,236), generación de radicales libres (237), e incremento en la producción de peróxidos lipídicos (238), entre otros.

En estudios previos, se ha demostrado que la isquemia hepática determina una lesión histológica y unas alteraciones bioquímicas características que pueden ser reproducidas a nivel experimental (239). De

igual modo, se ha establecido el importante papel de los agentes oxidantes durante la reperfusión (4).

Se han empleado numerosos fármacos para intentar prevenir la lesión hepática secundaria a la isquemia-reperfusión, como el alopurinol o la N-acetilcisteína, entre otros (240-244). En este trabajo hemos intentado evaluar el posible papel del SAMet en este campo, de modo similar a lo que diversos grupos han hecho en otros sistemas orgánicos, por ejemplo en el sistema nervioso o en el corazón (212,218), y en otras afecciones hepáticas, tales como la cirrosis o la colestasis de diversa etiología (210,211,213,221).

Se han diseñado modelos experimentales de isquemia-reperfusión hepática con el propósito de evaluar los efectos de intervenciones terapéuticas que disminuyan la lesión isquémica, siendo su objetivo final buscar medidas encaminadas a mejorar la función del injerto tras el trasplante o tras un eventual clampaje prolongado del pedículo hepático (245). Los modelos iniciales de isquemia total, en los cuales ésta se provocaba mediante la oclusión de la arteria hepática, la vena porta y la vía biliar principal, presentaban el problema de causar estasis y secuestro sanguíneo a nivel esplácnico, requiriendo la realización de un *shunt* portosistémico a fin de evitar la elevada mortalidad asociada a dicha contingencia. Posteriormente se desarrollaron otras técnicas en las cuales se evitaba la necesidad de realizar dicho *shunt* provocando isquemia

hepática parcial. Nosotros nos hemos inclinado por esta segunda alternativa y hemos empleado un modelo de isquemia-reperfusión en condiciones normotérmicas y sin apenas estasis venoso, que hubiera podido provocar inestabilidad hemodinámica e influir en los resultados, como ya se ha comentado más arriba (58,246). Hemos elegido el modelo descrito por Hayashi (226) por haber acuerdo en la bibliografía acerca de sus ventajas en estudios como el que nos ocupa (247). Esta técnica incluye oclusión del pedículo hepático derecho, con o sin resección del resto del parénquima.

En cuanto a la evaluación de la función hepatocelular, se suele realizar a través de la valoración de los cambios morfológicos (37,239) o bien de las alteraciones bioquímicas, reflejo de las variaciones en el metabolismo celular (54,60,248). Sin embargo, la lesión celular secundaria a la isquemia hepática sólo es relevante en la medida en que conlleva un fallo irreversible de las funciones celulares, y por tanto, la muerte del organismo (249); de ahí que los estudios morfológicos sean de utilidad limitada en este tipo de trabajos. En nuestros resultados se muestra cómo la administración de SAMet previamente a la provocación de la isquemia tiene un efecto beneficioso sobre la tasa de supervivencia, incrementando ésta de forma significativa.

Los resultados de numerosos estudios experimentales previos sugieren que SAMet podría desempeñar una función hepatoprotectora

frente a las lesiones provocadas por la isquemia-reperfusión. Dicho efecto protector sería probablemente debido al restablecimiento de los niveles intracelulares de glutatión y ATP a sus valores normales (215,250). Nuestros resultados confirman la disminución en los niveles hepáticos de glutatión en los grupos sometidos a isquemia-reperfusión, mientras que dichos niveles se mantuvieron en el grupo también sometido a isquemia-reperfusión pero tratado previamente con SAMet, que asimismo normalizó los niveles de otros parámetros bioquímicos.

Ultimamente ha cobrado especial interés el papel hepatoprotector del glutatión, entre otros motivos por haberse demostrado en estudios experimentales *in vivo* que el GSH liberado por los hepatocitos al espacio extracelular sería capaz de detoxificar los radicales libres liberados en ese mismo espacio, contribuyendo así a atenuar el daño provocado por la isquemia-reperfusión (251).

La eficacia y seguridad, recogidas en la bibliografía, de la utilización de SAMet en el tratamiento sintomático de la colestasis intrahepática asociada a la patología hepática aguda y crónica, así como en la ocasionalmente asociada a la gestación, resultan prometedoras (220). Los resultados de nuestro trabajo también parecen apoyar la eficacia de SAMet en la mejoría de los parámetros bioquímicos tras la provocación de lesiones hepáticas por isquemia-reperfusión. Dicha mejoría se refleja en los cambios observados en los niveles plasmáticos de LDH, cuya elevación fue

significativamente inferior en los grupos sometidos a isquemia-reperfusión pero "protegidos" por el tratamiento previo con SAMet.

Los efectos de SAMet sobre el *pool* hepático de glutatión podrían explicarse teniendo en cuenta que la transulfuración de aquél da lugar a cisteína (previa transformación sucesiva en S-adenosil-L-homocisteína y homocisteína, según se ha explicado previamente; ver figura 6). Es bien conocido que la biodisponibilidad de cisteína constituye el paso limitante para la síntesis de glutatión. Y, como ya se ha comentado anteriormente, se sabe que el glutatión es el principal agente protector frente a los radicales libres de oxígeno producidos endógenamente (252).

Asimismo, el ATP es esencial para el mantenimiento de la integridad celular, de modo que su depleción tendría capital importancia. Puesto que el ATP se produce en la mitocondria a través de un proceso exclusivamente aeróbico, sería de esperar que su nivel tisular descendiera en las situaciones de isquemia (253). Además, por el hecho de ser las mitocondrias las principales organelas productoras de éste y otros fosfatos de alta energía, esenciales en todos los procesos activos que tienen lugar en las células, es fundamental el mantenimiento de su función (254). En nuestro estudio hemos observado que el metabolismo celular energético no se restablece en ninguno de los grupos tras 120 minutos de perfusión. Sin embargo, el aumento del nivel de ATP fue significativamente superior en el grupo tratado con SAMet. Esto sugiere un posible papel de este producto

como estabilizador de la membrana mitocondrial, atenuándose de este modo los desequilibrios que la isquemia provoca en el metabolismo energético. Este posible efecto protector se deduce también del análisis de los niveles de LDH, cuya liberación plasmática tras la isquemia-reperfusión fue menor en los grupos tratados, como ya hemos señalado más arriba.

El posible papel protector de SAMet en el mantenimiento de los niveles hepáticos de ATP en situaciones de isquemia tal vez se deba a la presencia de una molécula de adenosina en su composición (254), y/o a los efectos reguladores que SAMet parece ejercer sobre los enzimas implicados en el metabolismo de la adenosina, por ejemplo a través de la metilación de dichos enzimas (220). Por otra parte, los niveles de glutatión regularían la oxidación de SAMet-sintetasa y, con ello, la producción endógena de SAMet (255).

La mayoría de los investigadores están de acuerdo en que los radicales libres del oxígeno desempeñan un papel esencial en la producción de la lesión microvascular y parenquimatosa (4) asociada a la perfusión de los tejidos isquémicos (256), ya que se ha descrito que hay un enorme incremento de los mismos tras la revascularización (230). Hay numerosos compuestos que protegen al hígado frente a la isquemia presumiblemente a través de este mecanismo, esto es, evitar la acción de los radicales libres del oxígeno (257).

El mecanismo tóxico mejor caracterizado de los radicales libres reside en la iniciación de la peroxidación de los lípidos constituyentes de las membranas celulares (258,259). El nivel elevado de peróxidos lipídicos que hemos detectado tanto en el plasma como en el tejido hepático de los grupos sometidos a isquemia-reperfusión, sugiere que la lesión podría ser debida, al menos en parte, a un daño oxidativo (260). La prevención de este incremento por el tratamiento previo con SAMet, nos induce a pensar en la inhibición de dicho mecanismo de peroxidación lipídica. Dado que los niveles de glutathione en los grupos tratados con SAMet estaban incrementados con respecto a los no tratados, este efecto inhibitorio podría ser secundario, en parte, a una mayor tasa de neutralización de los radicales libres de oxígeno, si bien no podemos descartar un efecto directo sobre los lípidos de membrana, protegiéndolos frente a la peroxidación. La capacidad antioxidante del glutathione sería especialmente decisiva, dado que la acción de la catalasa podría ser inhibida por el NO que se produce concomitantemente en estas situaciones (193).

Por otra parte, algunos modelos *in vivo* han demostrado que los estímulos inflamatorios serían capaces de provocar translocación bacteriana (261-263). De acuerdo con estos resultados, nosotros hemos encontrado que 60 minutos de isquemia, seguidos de 120 minutos de perfusión, inducen un incremento en el nivel plasmático de endotoxina, tanto en vena Cava como en Porta. Nuestro estudio demuestra que SAMet

es capaz de inhibir de modo significativo el aumento de traslocación bacteriana que sigue a la isquemia-reperfusión grave, del mismo modo que induce un aumento de la supervivencia. De este modo, se intuye otro posible mecanismo protector de SAMet, que sería más genérico y que tendría, teóricamente, utilidad en otras situaciones, por tener su lugar de acción a nivel de uno de los pasos iniciales de la cascada de reacciones que se suceden ante muy diversos estímulos inflamatorios, y que es la translocación bacteriana (264).

Otro radical activo que se genera en situaciones de isquemia-reperfusión es el óxido nítrico (150). Este, a su vez, es capaz de reaccionar con otros radicales, como el superóxido, para formar peroxinitrito (156), que puede transformarse posteriormente en radical hidroxilo, un potente oxidante (265). En condiciones fisiológicas, el NO se produce continuamente, por la acción de la nitrato-sintasa constitutiva y se ha descrito que en muchos tipos celulares es un importante modulador de la permeabilidad endotelial. El papel fisiopatológico de la síntesis de óxido nítrico en el hígado no está claro (264). Podría ser un mediador paracrino con gran importancia potencial en la función del hígado enfermo (266). Es más, estudios recientes sugieren que el NO podría ser una molécula con una importante función en la fisiopatología del proceso de isquemia-reperfusión (152). Dicha función podría ser incluso beneficiosa en los

estadios iniciales del fenómeno (267). Por ejemplo, se ha visto que la administración de fármacos que liberan NO previene el incremento inicial de la permeabilidad epitelial (268), y de la disfunción tisular (269,270) asociadas a la isquemia-reperfusión. No obstante, otros investigadores han propuesto que la producción aumentada de óxido nítrico en niveles superiores a los derivados de la acción del enzima constitutivo (calcio-dependiente), podrían resultar lesivos en ciertas condiciones inflamatorias (156,157). Dicho exceso en la producción de NO, sería debido al efecto de la NO-sintasa inducible (calcio-independiente), que no se expresa en condiciones normales, pero que puede ser inducida por diversos estímulos en numerosas células. Como hemos mencionado anteriormente, el NO podría reaccionar con el superóxido en el momento de la perfusión para dar lugar a productos citotóxicos, incluyendo el anión peroxinitrito y el radical hidroxilo (156). Estos radicales libres podrían ser los efectores finales del daño asociado con la isquemia-reperfusión (271). Parece que la producción masiva de NO secundaria a la expresión de la NO-sintasa inducible se habría conservado a lo largo de la evolución por tener una acción potencialmente beneficiosa en determinadas situaciones, como, por ejemplo, la destrucción de microorganismos o de células tumorales. En este caso, la producción de radicales libres sería limitada y cesaría al desaparecer el estímulo lesivo. Sin embargo, en ciertos procesos patológicos, como la inflamación o la isquemia-reperfusión, la producción

excesiva e incontrolada de estas moléculas resultaría lesiva para el organismo.

Como hemos descrito previamente, uno de los posibles mecanismos de acción del NO sería la activación de la fracción soluble de la guanilatociclasa, con el consiguiente aumento de la concentración intracelular del segundo mensajero GMPc (152). Esta misma vía puede ser activada por el monóxido de carbono, una de las moléculas de más reciente incorporación en el estudio de los procesos fisiopatológicos implicados en la isquemia-reperfusión (172). La producción aumentada de GMPc, principalmente por NO, pero también, como ya hemos comentado, por CO, provocaría, entre otros efectos: inhibición de la agregación plaquetaria (166), relajación del músculo liso visceral (168), o vasodilatación (169).

Las fuentes endógenas de CO serían, por un lado, el metabolismo del grupo hemo y, por otro, la peroxidación lipídica (162). El CO presenta una enorme afinidad por la hemoglobina, de forma que la mayor parte del mismo circula unido a dicha molécula. Este hecho, que precisamente constituye la base del método habitualmente empleado para su cuantificación (231), origina que resulte difícil la interpretación de los valores absolutos de este producto en plasma, sobre todo en estudios *in vivo*, como el presente. En cualquier caso, como quiera que las muestras se recogieron y procesaron de modo similar en todos los grupos experimentales, creemos que las diferencias encontradas son

representativas de diferencias en su producción.

Las concentraciones plasmáticas de CO en vena Porta experimentaron un incremento significativo en los grupos sometidos a hepatectomía, independientemente de SAMet, mientras que dicho procedimiento no afectó a los niveles de CO en Cava. Podríamos aventurar, pues, que el origen de las concentraciones aumentadas de CO en Porta podría ser el propio intestino, y que estaría relacionado de alguna manera con algún efecto local de la translocación bacteriana que, como ya hemos visto, también aumenta tras la hepatectomía, o bien con el aumento de resistencia al flujo portal. Las concentraciones plasmáticas de CO, tanto en Porta como en Cava, aumentaron tras la isquemia-reperfusión, siendo este efecto atenuado por SAMet, cuyo mecanismo probablemente residiría en la disminución de su producción, secundaria a la menor peroxidación lipídica.

Una prueba adicional del complejo mecanismo que debe estar implicado en estas reacciones, lo constituye el hecho de que los niveles de GMPc a nivel hepático se elevaron de modo significativo en los grupos sometidos a hepatectomía. En cambio, no experimentaron variación tras 10 minutos de perfusión, e incluso, disminuyeron de modo significativo tras 120 minutos de perfusión. A la vista de estos resultados, parece que la síntesis y degradación del GMPc deben estar reguladas por otros mecanismos además del NO y CO.

Además de los mecanismos relacionados con la formación de agentes oxidantes, la exposición del tejido hepático al TNF α es un importante mecanismo implicado en la lesión reperfusional (272,273). Por otra parte, numerosos modelos *in vivo* han estudiado el papel de las citoquinas en la fisiopatología de este proceso, demostrando que un estímulo inflamatorio dado no provoca solamente la producción de una única citoquina, sino que induce la liberación de una compleja cascada de citoquinas (274-276). Teniendo en cuenta estas observaciones, hemos estudiado la producción de otras citoquinas, además del TNF α , en nuestro modelo de isquemia-reperfusión.

Las citoquinas son mediadores pluripotenciales de naturaleza proteica, que influyen en gran variedad de tejidos y de funciones celulares. En particular, se ha demostrado que TNF α , IL-1 e IL-6 tienen un amplio abanico de efectos, que abarca desde la inmunoestimulación hasta la modulación de procesos metabólicos (277). Además, las citoquinas *per se* son capaces de desacoplar la fosforilación oxidativa en algunos tipos celulares, estimulando la producción de radicales libres de oxígeno, lo cual podría constituir su principal mecanismo de toxicidad en dichas células (169).

Numerosos tejidos del organismo, incluyendo el hígado, son capaces de producir citoquinas. Estudios recientes han investigado los factores que regulan su producción a nivel tisular, y parece que la endotoxemia, la sepsis

y los procesos tumorales, entre otros estímulos, son potentes promotores de la liberación de citoquinas por parte de los tejidos. Se ha descrito asimismo que las citoquinas tendrían una acción predominantemente local, de tal modo que su efecto máximo se llevaría a cabo en las células y tejidos próximos a su lugar de producción (145). Sus aparentes efectos a distancia, como por ejemplo la disfunción pulmonar que puede producirse tras la liberación de citoquinas a nivel hepático en relación con procesos de isquemia-reperfusión, serían probablemente debidos a la liberación de grandes cantidades de citoquinas por los macrófagos del intersticio pulmonar, en respuesta tanto a mediadores como a polimorfonucleares activados presentes en la sangre aferente (278).

Nuestros resultados muestran una elevación significativa de los niveles tisulares de $\text{TNF}\alpha$ e $\text{IL-1}\beta$ tras la isquemia-reperfusión, siendo atenuado este efecto en los animales tratados con SAMet. Este efecto se observó únicamente en la fase precoz de la perfusión, no en la tardía, en la cual los niveles de ambas citoquinas fueron indetectables, tal vez debido a su rápida degradación y/o a su paso a la sangre circulante. Los niveles de $\text{IL-1}\alpha$, en cambio, mostraron elevaciones significativas tras hepatectomía y tras isquemia-reperfusión, a los 10 y a los 120 minutos. Al igual que en el caso de las citoquinas anteriores, el incremento fue inferior en los animales tratados. Tal vez estas diferencias en los niveles tisulares de una y otras citoquinas podrían obedecer a un patrón secuencial en su liberación, sin

poder descartar otras causas con los datos que manejamos.

La IL-6 presenta ciertas peculiaridades con respecto a otras citoquinas. Se ha visto que tiene potentes efectos sobre el metabolismo hepatocitario, y que puede ser liberada por las células de Kupffer cercanas, entre otras células (279). Se sabe que es una de las citoquinas que presenta niveles circulantes más elevados en los estados catabólicos, tales como infecciones, traumatismos o neoplasias (280). Hay amplia evidencia de que IL-6 es un mediador esencial para la recuperación tras la hepatectomía y se considera, asimismo, una proteína de fase aguda. La administración de anticuerpos específicos contra IL-6 no solo retrasa la regeneración del tejido hepático, sino que también incrementa de modo significativo la mortalidad tras la hepatectomía (281). De acuerdo con este concepto, en nuestro estudio la hepatectomía aislada incrementó la producción tisular de IL-6, si bien no se observó un efecto adicional de la isquemia-reperfusión. Este hecho podría explicarse tal vez, porque la hepatectomía *per se* ya proporcionaría un estímulo máximo para su producción.

Por otra parte, se ha propuesto que tanto la alteración de la homeostasis intracelular del calcio como la activación de fosfolipasa A₂, serían procesos fisiopatológicos fundamentales en la lesión provocada por la isquemia (282,283). Se sabe que la anoxia de los órganos sólidos,

determina una rápida caída del gradiente normal de calcio a través de la membrana celular, dando como resultado un aumento en el calcio intracelular, con la activación consiguiente de la fosfolipasa A₂. En nuestro trabajo, hemos observado que la isquemia-reperfusión indujo un incremento del marcaje de la fracción de lisofosfatidilcolina. Por el contrario, provocó un descenso significativo en el marcaje de fosfatidilcolina. La interpretación conjunta de ambos resultados nos sugiere un probable aumento de la actividad de fosfolipasa A₂. Ambos efectos fueron atenuados por SAMet, perfilándose así otro posible mecanismo protector de este producto, dado el bien conocido papel de la fosfatidilcolina en el mantenimiento de la estructura y función de las membranas celulares.

Por otra parte, hay estudios recientes que sugieren la posibilidad de que los hepatocitos humanos sean más resistentes a los efectos inducidos por la isquemia-reperfusión hepática que los procedentes de rata, habiéndose observado una menor producción de radicales libres de oxígeno y peróxidos lipídicos bajo condiciones similares de isquemia y perfusión (284). Aunque estos resultados podrían llevarnos a pensar que SAMet tendría menor interés en la protección del hígado humano frente a las lesiones inducidas por la isquemia-reperfusión, otros estudios, también *in vitro* como el previamente mencionado, encuentran un marcado efecto protector de SAMet frente a los efectos tóxicos mediados por citoquinas en hepatocitos humanos aislados (21). Estudios de este tipo, aunque escasos

todavía, son de gran interés a fin de extrapolar, si ello es posible, los resultados de los numerosos trabajos de experimentación animal a la práctica clínica, objetivo final de nuestros esfuerzos.

En resumen, nuestros resultados indican un efecto beneficioso de SAMet en las lesiones hepáticas por isquemia-reperfusión. Como se apunta en estudios previos (285), probablemente el mecanismo fisiopatológico responsable esté relacionado, en última instancia, con la restauración del contenido hepático de ATP. Esto parece ser debido fundamentalmente a la recuperación de las defensas antioxidantes celulares (aumento de glutathione), aunque también parece jugar un importante papel una acción directa estabilizando las membranas celulares (incremento del cociente fosfatidilcolina/lisofosfatidilcolina) e, incluso, una disminución de la translocación bacteriana y de la producción local de mediadores de la inflamación. Estos resultados podrían ser de importancia clínica para la preservación de órganos antes y durante el trasplante, así como en otras situaciones asociadas a isquemia-reperfusión hepática.

CONCLUSIONES

1. Los resultados obtenidos sugieren un posible efecto beneficioso de SAMet en nuestro modelo de isquemia-reperfusión hepática.
2. SAMet parece proteger a los hepatocitos frente al deterioro del metabolismo energético habitualmente asociado a las situaciones de isquemia-reperfusión hepática.
3. El incremento en los niveles tisulares de glutathione parece contribuir al efecto protector de SAMet.
4. El aumento del cociente fosfatidilcolina/lisofosfatidilcolina inducido por SAMet indica un posible efecto adicional como estabilizador de las membranas celulares.
5. Parte del efecto protector de SAMet podría estar mediado, también, por una disminución de la translocación bacteriana y por un descenso en la producción local de mediadores de la inflamación.

BIBLIOGRAFIA

1. **Pichmaylr R, Ringe B, Lauchart W, Wonigeit K:** Liver Transplantation. *Transplant Proc* 19:103-112; 1987.
2. **Kahn D, Esquivel CO, Makowka L, Madrigal-Torres M, Yunis E, Iwatsuki S, Starzl TE:** Causes of death after liver transplantation in children treated with cyclosporine and steroids. *Clin Transplant* 3:150-155; 1989.
3. **Howard TK, Klintmalm CBG, Cofer JB, Husberg BS, Goldstein RM, Gonwa TA:**The influence of preservation injury or rejection in the hepatic transplant recipient. *Transplantation Baltimore* 49:103-107; 1990.
4. **Marzi I, Zhong Z, Zimmermann FA, Lemaster JJ, Thurman RG:** Xanthine and hypoxanthine accumulation during storage injury may contribute to reperfusion injury following liver transplantation in the rat. *Transplant Proc* 21:1319-1320; 1989.
5. **Caldwell-Kenkel JC, Currin RT, Tanaka Y, Thurman RG, Lemasters JJ:** Reperfusion injury following cold ischemia storage of rat liver. *Hepatology Baltimore* 10:292-299; 1989.
6. **Thurman RG, Marzi I, Seitz G, Thies J, Lemasters JJ, Zimmermann FA:** Hepatic reperfusion injury following orthotopic liver transplantation in the rat. *Transplant Baltimore* 46:502-506; 1988.
7. **Lindert KA, Caldwell-Kenkel JC, Nukin S, Lemasters JJ, Thurman RG:** Activation of Kupffer cells on reperfusion following hypoxia: particle phagocytosis in a low-flow reflow model. *Am J Physiol* 25:G345-G350; 1992.
8. **Bouwens L:** Structural and functional aspects of Kupffer cells. *Rev Biol Cell* 16: 69-94;1988.
9. **Cerra FB, West MA, Keller G, Mazuski J, Simmons RL:** Hypermetabolism/organ failure. The role of the activated macrophage as a metabolic regulator. *Prog Clin Biol Res* 264:27-42; 1988.
10. **Wardle EN:** Kupffer cells and their function. *Liver* 7:63-75; 1987.
11. **Chance B, Sies H, Boveris A:** Hidroperoxide metabolism for mammalian organs. *Physiol Rev* 59:527-605; 1979.

12. **Takei Y, Marzi I, Gao W, Gores GJ, Lemaster JJ, Thurman RG:** Leukocyte adhesion and cell death following orthotopic liver transplantation in the rat. *Transplantation Baltimore* 51: 959-965; 1991.
13. **Jaeschke H, Benzick EA:** Pathophysiological consequences of enhanced intracellular superoxide formation in isolated perfused rat liver. *Chem Biol Interact* 84:55-68;1992.
14. **Sies H, Moskin A:** Role of mitochondrial glutathione peroxidase in modulating mitochondrial oxidations in liver. *Eur J Biochem* 84:377-383; 1978.
15. **Yamauchi N, Watanabe N, Kuriyama H, Neda H, Maceda M, Himeno T, Tsuji Y, Nitsu Y:** Suppressive effects of intracellular glutathione on hydroxyl radical production induced by tumor necrosis factor. *Int J Cancer* 46:884-888; 1990.
16. **Jaeschke H:** Vascular oxidant stress and hepatic ischemia-reperfusion injury. *Free Radical Res Commun* 12:737-749; 1991.
17. **Jaeschke H:** Enhanced sinusoidal glutathione efflux during endotoxin-induced oxidant stress in vivo. *Am J Physiol* 263:G60-G68; 1992.
18. **Fernández-Checa JC, García-Ruiz MC, Ookhteno M, Kaplowitz N:** Impaired uptake of glutathione by hepatic mitochondria from ethanol-fed rats. *J Clin Invest* 87:397-405; 1991.
19. **Tsuji M, Kodama K, Oguchi K:** Protective effect of S-adenosyl-L-methionine against CCl₄-induced hepatotoxicity in cultured hepatocytes. *Japan J Pharm* 52:209-214; 1990.
20. **Lieber CS, Casoni A, De Carli LM, Kin C, Lowe N:** S-adenosyl-L-methionine attenuates alcohol-induced liver injury in the boboon. *Hepatology* 11:165-172; 1990.
21. **Vara E, Arias-Díaz J, Garcia C, Villa N, Simón C, Ortiz P, Balibrea JL:** S-adenosyl-L-methionine may protect transplanted hepatocytes against the toxic effects of cytokines. *Transplant Proc* 26:3364-3366; 1994.
22. **Cross CE, Halliwell B, Borish ET, Pryor WA, Ames BN, Saul RN, Mc Cord JM, Harman D:** Oxygen radicals and human disease. *Ann*

Int Med 107:526-545;1987.

23. **Hearse DJ, Humphrey SM, Bullock GR:** The oxygen paradox and the calcium paradox: two facets of the same problem? *J Mol Cell Cardiol* 10:641-668; 1978.
24. **Ernster, L:** Biochemistry of reoxygenation injury. *Crit Care Med* 16:947-953;1988.
25. **Orrenius S:** Mechanism of oxidative cell damage. (In: "Free Radicals: From Basic Science to Medicine") *Birhäuser Verlag* 47-64; 1993.
26. **Welburn CRB, Goldman G, Paterson IS Valeri CR, Shepro D, Hechtman HB:** Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury: central role of the neutrophil. *Brit J Surg* 78:651-655; 1991.
27. **Davies MG, Hagen PO:** The vascular endothelium. A new horizon. *Ann Surg* 218: 593-609; 1993.
28. **Haglund U, Lundgren O:** Intestinal ischemia and shock factors. *Fed Proc* 37:2729-2733; 1978.
29. **Parks DA, Granger DN:** Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation. *Am J Physiol* 250:G749-753; 1986.
30. **O'Donohue MK , Blake A , Waldron RP , Dervan P , Fitzpatrick JM:** Patho-physiological sequelae of hepatic artery ligation: an experimental study. *Eur Surg Res* 20:330-334; 1988.
31. **Marubayashi S, Dohi K, Ezaki H, Hayashi, Kawasaki T:** Preservation of ischemic rat liver mitochondrial functions and liver viability with CoQ10. *Surgery* 91:631-637; 1982.
32. **Wang WY, Taki Y, Morimoto T, Nishihira T, Yokoo N, Jikko A, Nishikawa K, Tanaka J, Kamiyama Y, Ozawa K:** Effects of partial ischemia and reflow on mitochondrial metabolism in rat liver. *Eur Surg Res* 20:181-189; 1988.
33. **Hashimoto LAM , Ouchi K , Rahman M , Sato T :** The Pringle maneuver and the release of free radicals. (In: Free radicals in digestive diseases). *Excerpta Medica*. 153-158; 1988.
34. **Atalla SL, Toledo-Pereyra LH, MacKenzie GH, Cederna JP:** Influence of oxygen-derived free radical scavengers on ischemic

- livers. *Transplantation* 40; 584-590; 1985.
35. **Toledo-Pereyra LH**: Assesmente of oxygen free radical scavengers on isquemic livers. (In:Novelli GP, Ursini F, editors: "Oxygen free radicals in shock") *Basel Karger*; 212-219; 1986.
 36. **Ortega J , Cortés J , Mendoza A , Ortega MP , Colina F** : Modelo experimental de hepatitis isquémica mediante isquemia y revascularización hepática en el perro. *Cir Esp* 41:440-452; 1987.
 37. **Romagnoli P, Rosi S, Filipponi F, Marsili M, Boncinelli S**: Alterations in the fine structure of the pig liver upon cold ischemia. *Eur Surg Res* 22:189-196; 1990.
 38. **Michel A, Vons C, Hillaire S, Icard P, Hazebroucq G, Gemeny F, Houssin D, Franco D**: Comparison of rat liver preservation with Eurocollins and modified University of Wisconsin solution: transplantation and isolation of hepatocytes for culture. *Eur Surg Res* 22:249-255; 1990.
 39. **Ryma B, Wang JF, De Groot H**: O₂⁻ release by activated Kupffer cells upon hypoxia-reoxygenation. *Am J Physiol* 261:G602-G607; 1991.
 40. **Rodríguez AA, LaMorte WW, Hanrahan LM, Hopkins SR, O'Keane JC, Cachecho R, Hirsch EF**: Liver viability after ischemia-reperfusion. *Arch Surg* 126:767-772;1991.
 41. **Arii S, Monden K, Itay S, Sasaoki T, Shigabaki K, Sasada M, Tobe T**: Superoxide production and its biological significance of Kupffer cells in liver injuries. (In: Tsuchiya M, Kawai K, Kondo M, Yoshikaba T, editors. "Free radicals in digestive diseases"). *Excerpta Medica* 147-152; 1988.
 42. **Iimuro Y, Yamamoto M, Inohue S, Kohno H, Matsumoto Y**: Superoxide production by liver macrophages in a septic rat model. Relation to arterial ketone-body ratio. *Eur Surg Res* 24:363-371; 1992.
 43. **Karwinski W, Husoy AM, Farstad M, Soreide O**: Sixty minutes of normothermic ischemia in the rat liver : correlation between adenine nucleotides and bile excretion. *J Surg Res* 46:99-103; 1989.
 44. **Nordström G, Säljö A, Li S, Haselgren PO**: Effects of ischemia and

- reperfusion on protein synthesis in livers with different glutathione levels. *Ann Surg* 211:97-102; 1990.
45. **Stein HJ, Oosthuizen MMJ, Hinder RA, Lamprechts H:** Oxygen free radicals and glutathione in hepatic ischemia-reperfusion injury. *J Surg Res* 50:398-402; 1991.
 46. **Oshima A, Kitajima M, Sakai N, Nakazawa H, Okino H, Asayama K:** The role of CoQ10 anion radical in the ischemic liver (In: Tsuchiya M, Kawai K, Kondo M, Yoshikawa T, editors. "Free radicals in digestive diseases") *Excerpta Medica* 185-190; 1988.
 47. **Ikeda T, Yanaga K, Kishikawa K, Karizoe S, Shimada M, Sugimachi K:** Ischemic injury in liver transplantation: difference in injury sites between warm and cold ischemia in rats. *Hepatology* 16:454-461; 1992.
 48. **Marzi I, Knee J, Bühren V, Menger M, Trentz O:** Reduction by superoxide dismutase of leukocyte-endothelial adherence after liver transplantation. *Surgery* 111:90-97; 1992.
 49. **Minor T, Chung CW, Yamamoto Y, Obara M, Saad S, Isselhard W:** Evaluation of antioxidant treatment with superoxide dismutase in rat liver transplantation after warm ischemia. *Eur Surg Res* 24:333-338; 1992.
 50. **Jaeschke H, Smith CV, Mitchel JR:** Reactive oxygen species during ischemia-reflow injury in isolated perfused rat liver. *J Clin Invest* 81:1240-1246; 1988.
 51. **Okuda M, Lee HC, Chance B, Kumar C:** Glutathione and ischemia-reperfusion injury in the perfused rat liver. *Free Rad Biol Med* 12:271-279; 1992.
 52. **Toledo-Pereyra LH, Cederna J:** Protection of liver allografts from ischemic damage prior to transplantation using insulin and catalase (In: Novelli GP, Ursini F, editors: "Oxygen free radicals in shock") *Basel: Karger* 205-211; 1986.
 53. **Konno H, Hardison WG, Miyai K:** Reoxygenation injury following anoxic perfusion preferentially impairs bile acid-independent bile flow. *Eur Surg Res* 23:151-157; 1991.

54. **Chen H, Tappel AL, Boyle RC:** Oxidation of heme proteins as a measure of oxidative damage to liver tissue slices. *Free Rad Biol Med* 14:509-517; 1993.
55. **Barnard ML, Snyder SJ, Engerson TD, Turrens JF:** Antioxidant enzyme status of ischemic and postischemic liver and ischemic kidney in rats. *Free Rad Biol Med* 15:227-232; 1993.
56. **Wang JF, Komarov P, Sies H, De Groot H:** Inhibition of superoxide and nitric oxide release and protection from reoxygenation injury by Ebselen in rat Kupffer cells. *Hepatology* 15:1112-1116; 1992.
57. **Puntis MCA, Persson B, Jeppson B, Bengmark S, Jonsson GG, Pero RN:** Free radical production in the ischemic rat liver. *Surg Res Comm* 1:17-20; 1987.
58. **Suzuki S, Toledo-Pereyra LH, Rodríguez FJ, Nakamura S, Nishiyama R, Baba S:** Physiopathological advantages of portosystemic shunting for studies of total hepatic ischemia and reperfusion injury in the rat. *Transplantation* 3:96-101; 1992.
59. **Marubayashi S, Dohi K, Yamada K, Kawasaki T:** Role of conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemic rat liver injury. *Surgery* 110:537-543; 1991.
60. **Hanazaki K, Kuroda T, Kajikawa S, Horigome N, Shiohara E, Haba Y, Iida F:** Metabolic changes in reperfused liver after warm ischemia, and protective effects of coenzyme Q10. *Research in Surgery* 5:98-102; 1993.
61. **Hanazaki K, Kuroda T, Kajikawa S, Miyamoto H, Iida F:** Protective effects of coenzyme Q10 on the metabolism of prostaglandin I₂ and thromboxane A₂ in the warm ischemic liver. *Research in Surgery* 5:112-116; 1993.
62. **Marubayashi S, Dohi K, Ochi K, Kawasaki T:** Role of free radicals in ischemic rat liver cell injury: prevention of damage by α -tocopherol administration. *Surgery* 90:184-192; 1986.
63. **Isozaki H, Adam R, Gigou M, Szekely AM, Shen M, Bismuth H:** Experimental Study of the protective effect of intermittent hepatic pedicle clamping in the rat. *Br J Surg* 79:310-313; 1992.
64. **Portugal V, García-Alonso I, Bilbao J, Barceló P, Méndez J:**

Efecto de terapéuticas antioxidantes en la regeneración del hígado isquémico. *Rev Esp Enf Digest* 83:434-438; 1993.

65. **Nauta RJ, Tsimoyiannis E, Uribe M, Walsh DB, Miller D, Butterfield A** : The role of calcium ions and calcium channel entry blockers in experimental ischemia-reperfusion-induced liver injury. *Ann Surg* 213:137-142; 1991.
66. **Lee SM, Clemens MG**: Effect of α -tocopherol on hepatic mixed function oxidases in hepatic ischemia-reperfusion. *Hepatology* 15:276-281; 1992.
67. **Arthur MJP, Bentley IS, Tanner AR, Kowalski-Saunders P, Millward-Sadler GH, Wright R**: Oxygen-derived free radicals promote hepatic injury in the rat. *Gastroenterology* 89:1114-1122; 1985.
68. **Bautista AP, Spitzer JJ**: Superoxide anion generation by in situ perfused rat liver: effect of in vivo endotoxin. *Am J Physiol* 22:G907-G912; 1990.
69. **Kato S, Kawase T, Alderman J, Inatomi N, Lieber CS**: Role of xanthine oxidase ethanol-induced lipid peroxidation in rats. *Gastroenterology* 98:203-210; 1989.
70. **Masaki N, Ohta Y, Shirataki H, Ogata I, Hayashi S, Yamada S, Hirata K, Nagoshi S, Mochida S, Tomiya T, Ohno A, Ohta Y, Fujiwara K**: Hepatocyte membrane stabilization by prostaglandins E_1 and E_2 : Favorable effects on rat liver injury. *Gastroenterology* 102:572-576; 1992.
71. **Slater TF**: Free radical mechanisms in tissue injury. *Biochem J* 222:1-15; 1984.
72. **Recknagel RO**: Minireview: a new direction in the study of carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Life Sci* 33:401-418; 1983.
73. **Brattin WJ, Glende EA Jr, Recknagel RO**: Pathological mechanisms in carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Free Radic Biol Med* 1:27-38; 1985.
74. **Poli G, Albano E, Dianzani MV**: The role of lipid peroxidation in liver damage. *Chem Phys Lipids* 45:117-142; 1987.

75. **Poli G , Cheeseman KH, Biasi F:** Promethazine inhibits the formation of aldehydic products of lipid peroxidation but not covalent binding resulting from the exposure of rat liver fractions to CCl₄. *Biochem J* 264:527-532; 1989.
76. **Biasi F, Albano E, Chiarpotto E:** In vivo and in vitro evidence concerning the role of lipid peroxidation in the mechanism of hepatocyte death due to carbon tetrachloride. *Cell Biochem Funct* 9:111-118; 1991.
77. **Valenzuela A, Lagos C, Schmidt K, Videla LA:** Silymarin protection against hepatic lipid peroxidation induced by acute ethanol intoxication in the rat. *Biochem Pharmacol* 34:2209-2212; 1985.
78. **Carini R, Comoglio A, Albano E, Poli G:** Lipid peroxidation and irreversible damage in the rat hepatocyte model. Protection by the silibyn-phospholipid complex IdB 1016. *Biochem Pharmacol* 43:2111-2115; 1992.
79. **Carini R, Poli G, Dianzani MV, Moddix SP, Slatter TF, Cheeseman KH:** Comparative evaluation of the antioxidant activity of α -tocopherol-poliethylene-glycol-1000-succinate and α -tocopherol succinate in isolated hepatocytes and liver microsomal suspensions. *Biochem Pharmacol* 39:1597-1601; 1990.
80. **Freeman BA, Crapo JD:** Biology of disease. Free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 47:412-426; 1982.
81. **Hinder RA, Stein HJ:** Oxygen-derived free radicals. *Arch Surg* 126:104-105;1991.
82. **Cheeseman KH, Slater TF:** An introduction to free radical biochemistry. *British Medical Bulletin* 49: 481-493; 1993.
83. **Arora AS, Gores GJ:** The role of metals in ischemia-reperfusion injury of the liver. *Seminars in liver disease* 16:31-38; 1996.
84. **Esterbauer H, Cheeseman KH:** Lipid Peroxidation: pathological implications. *Chem Phys Lipids* 45:103-370; 1987.
85. **Davies KJA, Quintanilha AT, Brooks GA, Packer LJ:** Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem Biophys Res Commun* 107:1198-1205; 1982.

86. **Sugino K, Dohi K, Yamada K, Kawasaki T:** The role of lipid peroxidation in endotoxin induced hepatic damage and the protective effects of antioxidants. *Surgery* 101: 746-752; 1987.
87. **Belzer FO, Southard JH:** Principles of solid organ preservation by cold storage. *Transplantation* 45:673-676; 1988.
88. **Connor HD, Gao W, Nukina S, Lemaster JJ, Mason RP, Thurman RG:** Evidence that free radicals are involved in graft failure following orthotopic liver transplantation in the rat. An electron paramagnetic resonance spin trapping study. *Transplantation* 54:199-204; 1992.
89. **Auer T, Khoschorur GA, Rabl H, Iberer F, Petutschnigg B, Wasler A, Tscheliessnig KH:** Detection of liver peroxidation products by malondialdehyde (MDA-TBA reaction) in organ transplantation. *Transplant Proc* 27:2749-2751; 1995.
90. **Kappos H:** Lipid peroxidation: Mechanisms, analysis, enzymology and biological relevance. (In: Sies H. "Oxidative stress") London: Academic Press; 273-310; 1985.
91. **Cotgreave I, Moldeus P, Orrenius S:** Host biochemical defense mechanisms against prooxidants. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 28:189-212; 1988.
92. **Halliwell B, Gutteridge JMC, Cros CE:** Free radicals, antioxidants and human disease: where are we now? *J Lab Clin Med* 119:598-620; 1992.
93. **Wendel A:** Glutathione peroxidase (In: Jakobi WB, Bend JR, Caldwell J ed "Enzymatic basis of detoxication") New York: Academic Press 333-348; 1980.
94. **Burton GW, Ingold KU:** Vitamina E: application of the principles of physical organic chemistry to the exploration of its structure and function. *Acc Chem Res* 19:194-201; 1986.
95. **Lee SM, Clemens MG:** Effects of α -tocopherol on hepatic mixed function oxidases in hepatic ischemia-reperfusion. *Hepatology* 15:276-281; 1992.
96. **Stocker R, Bowry VW, Frei B:** Ubiquinol-10 protects human low density Lipoprotein more efficiently against lipid peroxidation than does α -tocopherol. *Proc Natl Acad Sci* 88:1646-1650; 1991.

97. **Packer JE, Slater TF, Wilson RL:** Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C. *Nature* 278: 737-738; 1979.
98. **Stocker R, Frei B:** Endogenous antioxidant defences in human blood plasma, (In Sies H ed; "Oxidative stress: oxidants and antioxidants") London: Academic Press 213-242; 1991.
99. **Cerra FB:** Hypermetabolism, organ failure, and metabolic support. *Surgery* 101:1-14; 1987.
100. **Billiau A, Vandekerckhove F:** Cytokines and their interactions with other inflammatory mediators in the pathogenesis of sepsis and septic shock. *Eur J Clin Invest.*21:559-573; 1991.
101. **Westphal O, Hann K, Himmelspach K:** Chemistry and immunochemistry of bacterial lipopolysaccharide as cell wall antigens and endotoxins. *Prog Allergy* 33:9-39; 1983.
102. **Manthous CA, Hall JB, Samsel RW:** Endotoxin in human disease. Part 1: Biochemistry, assay, and possible role in diverse disease states. *Chest* 104: 1572-1581. 1993.
103. **Schumann RR, Leong SR, Flagss GW, Gray PW, Wright S, Mathison JC, Tobias PS, Ulevitch RJ:** Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science* 249:1429-1431; 1990.
104. **Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC:** CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 249: 1431-1433; 1990.
105. **Smedly LA, Tonnesen MG, Sandhaus RA:** Neutrophil-mediated injury to endothelial cells. Enhancement by endotoxin and essential role of neutrophil elastase. *J Clin Invest* 77: 1233-1243; 1986.
106. **Homan RG, Maier RV:** Superoxide production by neutrophils in a model of adult respiratory distress syndrome. *Arch Surg* 123:1491-1495; 1988.
107. **Chang HW, Federsen CO, Henson PM, Voelkel NF:** Platelet-activating factor mediates hemodynamic changes and lung injury in endotoxin-treated rats. *J Clin Invest* 79:1498-1509; 1987.
108. **Till GO, Johnson JK, Kunkel R, Ward PA:** Intravascular activation

- of complemente and acute lung injury. Dependence of neutrophils and toxic oxygen metabolites. *J Clin Invest* 69:1126-1135; 1982.
109. **Taylor FB, Chang A, Ruf W, Morrissey JH, Hinshaw LB, Catlett R:** E. Coli septic shock is prevented by blocking tissue factor with monoclonal antibody. *Circ Shock* 33:127-134; 1991.
110. **Evans E, Carpenter A, Kinderman H, Cohen J:** Evidence of increased nitric oxide production in patients with the sepsis syndrome. *Circ Shock* 41:77-81; 1993.
111. **Curran RD, Billiar TR, Stuehr DJ:** Multiple cytokines are required to induce hepatocyte nitric oxide production and inhibit total protein synthesis. *Ann Surg* 212:462-471; 1990.
112. **Billiar TR, Curran RD, Harbrecht BG, Stuehr DJ, Demetris AJ, Simmons RL:** Modulation of nitrogen oxide synthesis in vivo: N-monomethyl-L-arginine inhibits endotoxin-induced nitrite/nitrate biosynthesis while promoting hepatic damage. *J Leukoc Biol* 48: 565-569; 1990.
113. **Frederick JA, Hasselgren PO, Davis S, Higashiguchi T, Jacob TD, Fischer JE:** Nitric oxide may upregulate in vivo hepatic protein during endotoxemia. *Arch Surg* 128:152-157; 1993.
114. **Fong Y, Tracey KJ, Moldawer LL, Hesse G, Manogue KR, Kenney JS, Lee AT, Kuo GC, Allison AC, Lowry SF, Cerami A:** Antibodies cachectin/tumour necrosis factor reduce interleukin 1 β and interleukin-6 appearance during lethal bacteriemia. *J Exp Med* 170:1627-1633; 1989.
115. **Perlmunter DH, Dinarello CA, Punsal PI, Colten HR:** Cachectin/tumour necrosis factor regulates hepatic acute-phase gene expression. *J Clin Invest* 78:1349-1354; 1986.
116. **Darlington GJ, Wilson DR, Lachman LB:** Monocyte-conditional medium, interleukin-1 and tumour necrosis factor stimulate the acute phase response in human hepatoma cells in vitro. *J Cell Biol* 103:787-793; 1987.
117. **Camussi G, Albano E, Tetta C, Bussolino F:** The molecular action

- of tumour necrosis factor- α . *Eur J Biochem* 202:3-14; 1991.
118. **Balibrea JL**: Factor de necrosis tumoral y shock séptico. *Cir Esp* 52:379-381; 1992.
119. **Carswell EA, Old LJ, Kassel RL**: An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 72:3666-3670; 1975.
120. **Beutler B, Greenwald D, Hulmes JD, Chang M, Pan YCE, Mathison J, Ulevitch R, Cerami A**: Identity of tumour necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin. *Nature* 316:552-554; 1985.
121. **Jones EY, Stuart DI, Walker NPC**: Structure of tumour necrosis factor. *Nature* 338:225-228; 1989.
122. **Webb GC, Chaplin DD**: Genetic variability at the human tumor necrosis factor loci. *J Immunol* 145:1278-1285; 1990.
123. **Hesse DG, Tracey KJ, Fong Y, Manogue KR, Pallidino MA Jr, Cerami A, Shires GT, Lowry SF**: Cytokine appearance in human endotoxemia and primate bacteriemia. *Surg Gynecol Obstet* 166:147-153; 1988.
124. **Tracey KJ**: Tumour necrosis factor (cachectin) in the biology of septic shock syndrome. *Circ Shock* 35:123-128; 1991.
125. **Michie HR, Manogue KR, Spriggs DR, Revhaugh A, O'Dwyer S, Dinarello CA, Cerami A, Wolf SM, Wilmore DW**: Detection of circulating tumor necrosis factor after endotoxin administration. *N Eng J Med* 318:1481-1486; 1988.
126. **Mathison JC, Wolfson E, Ulevitch J**: Participation of tumor necrosis factor in the mediation of Gram-negative bacterial lipopolysaccharide-induced injury in rabbits. *J Clin Invest* 81:1925-1937; 1988.
127. **Tracey KJ, Beutler B, Lowry SF, Merryweather J, Wolpe S**: Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. *Science* 234: 470-474; 1986.

128. **Tracey KJ, Lowry SF, Fahey TJ, Albert JD, Fong Y Hesse D, Beutler B, Manogue KR, Calvano S, Wei H, Cerami A, Shires GT:** Cachectin/tumour necrosis factor induces lethal shock and stress hormone response in the dog. *Surg Gynecol Obstet* 164:415-422; 1987.
129. **Creagan ET, Kovach JS, Moertel CG, Frytak S, Kvols LK:** A phase I clinical trial of recombinant human tumor necrosis factor. *Cancer* 62:2467-2471; 1988.
130. **Scuderi P, Sterling KE, Lam KS, Finley PR, Ryan KJ, Ray CG, Petersen E, Slymen DJ, Salmon S:** Raised level of tumour necrosis factor in parasitic infections. *Lancet* 2:1364-1365; 1986.
131. **Balkwill F, Bucke F, Talbot D, Tavernier J, Osborne R, Naylor S, Durbin H, Fiers W:** Evidence for tumor necrosis factor/cachectin production in cancer. *Lancet* 1:1229-1232; 1987.
132. **Maranno MA, Fong Y, Moldawer LL, Wei H, Calvano SE, Tracey KJ, Barie PS, Manogue K, Cerami A, Shires GT, Lowry SF:** Serum cachectin/tumor necrosis factor in critically ill patients with burns correlates with infection and mortality. *Surg Gynecol Obstet* 170:32-38; 1990.
133. **Maury CPJ, Teppo AM:** Raised serum levels of cachectin/tumor necrosis factor alpha in renal allograft rejection. *J Exp Med* 166:1132-1137; 1987.
134. **Muto Y, Nouri-Aria KY, Meager A, Alexander GJ, Eddleston, Willians:** Enhanced tumor necrosis factor and interleukin-1 fulminant hepatic failure. *Lancet* 2:72-74; 1988.
135. **Beutler B, Cerami A:** Cachectin and tumour necrosis factor as two sides of the same coin. *Nature* 320:584-588; 1986.
136. **Rubin BY, Smith LJ, Hellerman GR, Lunn RM, Richardson NK, Anderson SL:** Correlation between the anticellular and DNA fragmenting activities of tumor necrosis factor. *Cancer Res* 48:6006-6010; 1988.
137. **Agarwal S, Drysdale BE, Shin HS:** Tumor necrosis factor-mediated cytotoxicity involves ADP-ribosylation. *J Immunology* 140:4187-4192;

- 1988.
138. **Brett J, Gerlach H, Nawroth P, Steinberg S, Godman G, Stern D:** Tumor necrosis factor/cachectin increases permeability of endothelial cell monolayers by a mechanism involving regulatory G proteins. *J Exp Med* 169:1977-1991; 1989.
 139. **Lancaster JR Jr, Laster SM, Gooding LR:** Inhibition of target cell mitochondrial electron transfer by tumor necrosis factor. *FEBS Lett* 248:169-174; 1989.
 140. **Hinshaw LB, Tekamp-Olson P, Chang AC, Lee PA, Taylor FB Jr, Murray CK, Peer GT, Emerson TE Jr, Passey RB, Kuo GC:** Survival of primates in LD 100 septic shock following therapy with antibody to tumour necrosis factor. *Circ Shock* 30:279-292; 1990.
 141. **Tracey KJ, Fong Y, Hesse DG, Manogue KR, Lee AT, Kuo GC, Lowry SF, Cerami A:** Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteriemia. *Nature* 330:662-664; 1987.
 142. **Dinarello CA, Wolf SM:** The role of interleukin-1 in disease. *N Eng J Med* 328:106-113; 1993.
 143. **Dinarello CA:** Biology of interleukin-1. *FASEB J* 2:108-115; 1988.
 144. **Dinarello CA:** Interleukin-1: aminoacid sequences, multiple biological activities and comparison with tumor necrosis factor (cachectin). *Year Immunol* 2:68-69; 1986.
 145. **Fong Y, Moldawen LL, Shires T, Lowry SF:** The biologic characteristics of cytokines and their implication in surgical surgery injury. *Surg Gynecol Obstet* 170:363-378; 1990.
 146. **Wong GC, Clark SC:** Multiple actions of interleukin-6 within a cytokine network. *Immunol Today* 3:133-157; 1985.
 147. **Van Snick J:** Interleukin-6: an overview. *Annu Rev Immunol* 8:253-278; 1990.
 148. **Nijsten NWN, De Groot ER, Ten Duis HJ:** Serum levels of interleukin-6 and acute phase responses. *Lancet* ii:921; 1987.

149. **Nathan C:** Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 6:3051-3064; 1992.
150. **Kuo PC, Schroeder RA:** The emerging multifaceted role of nitric oxide. *Ann Surg* 221:220-235; 1995.
151. **Rodeberg DA, Chaet MS, Bass RC, Arkovitz MS, García VF:** Nitric oxide: an overview. *Am J Surg* 170:292-303; 1995.
152. **Billiar TR:** Nitric oxide; Novel biology with clinical relevance. *Ann Surg* 221:339-349; 1995.
153. **Moncada S, Higgs A:** The L-arginine: nitric oxide pathway. *N Eng J Med* 329:2002-2012; 1993.
154. **Henry Y, Lepoivre M, Drapier JC:** EPR characterization of molecular targets for NO in mammalian cells and organelles. *FASEB J* 7:1124-1134; 1993.
155. **Koppenol WH, Moreno JJ, Pryor WA, Ischiropoulos H, Beckmann JS:** Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide. *Chem Res Toxicol* 5:834-842; 1992.
156. **Ischiropoulos H, Zhu L, Beckmann JS:** Peroxynitrite formation from macrophage-derived nitric oxide. *Arch Biochem Biophys* 298:446-451; 1992.
157. **Matheis G, Sherman MP, Buckberg GD, Hybron DM, Young HH, Ignarro LJ:** Role of L-arginine nitric oxide pathway in myocardial reoxygenation injury. *Am J Physiol* 262:H616-H620; 1992.
158. **Mulligan MS, Hevel JM, Marletta MA, Ward PA:** Tissue injury caused by deposition of immune complexes is L-arginine dependent. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:6638-6642; 1991.
159. **Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA:** Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43:109-141; 1991.
160. **Marsden MA, Heng HHQ, Scherer SW:** Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem* 268:17478-17488; 1993.

161. **Palmer RMJ**: The discovery of nitric oxide in the vessel wall. *Arch Surg* 128:396-401; 1993.
162. **Wolff DG, Bidlack WR**: The formation of carbon monoxide during peroxidation of microsomal lipids. *Biochem Biophys Res Commun* 73:850-857; 1976.
163. **Verma A, Hirsch DJ, Glatt CE, Ronnett GV, Snyder SH**: Carbon monoxide: a putative neural messenger. *Science* 259:381-384; 1993.
164. **Brüne B, Schdmit KM, Ullrich V**: Activation of soluble guanylate cyclase by carbon monoxide and inhibition by superoxide anion. *Eur J Biochem* 192:683-688; 1990.
165. **Ramos KS, Liu H, Mc Grath JJ**: Modulation of cyclic guanosine monophosphate levels in cultured aortic smooth muscle cells by carbon monoxide. *Biochem Pharmacol* 38:1368-1370; 1989.
166. **Brüne B, Ullrich V**: Inhibition of platelet aggregation by carbon monoxide is mediated by activation of guanylate cyclase. *Mol Pharmacol* 32:497-504; 1987.
167. **Utz J, Ullrich V**: Carbon monoxide relaxes ileal smooth muscle through activation of guanylate cyclase. *Biochem Pharmacol* 41:1195-1201; 1991.
168. **Grasser T, Vedernikov YP, Li DS**: Study on the mechanism of carbon monoxide induced endothelium-independent relaxation in porcine coronary artery and vein. *Biomed Biochem Acta* 49:293-296; 1990.
169. **Schulze-Osthoff K, Bakker AC, Vanhaesebroeck B, Beyaert R, Jacob WA, Fiers W**: Cytotoxic activity of tumor necrosis factor is mediated by early damage of mitochondrial functions: evidence for the involvement of mitochondrial radical generation. *J Biol Chem* 267:5317-5323; 1992.
170. **Lautier D, Luscher P, Tyrrell RM**: Endogenous glutathione levels modulate both constitutive and UVA radiation/hydrogen peroxide inducible expression of the human heme oxygenase gene. *Carcinogenesis* 13:227-232; 1992.

171. **Cantoni L, Rossi C, Rizzardini M, Gadina M, Ghezzi P:** Interleukin-1 and tumour necrosis factor induce hepatic haem oxygenase. *Biochem J* 279:891-894; 1991.
172. **Arias Díaz J, Vara E, García C, Villa N, Balibrea JL:** Evidence for a cyclic guanosine monophosphate-dependent, carbon monoxide-mediated, signaling system in the regulation of TNF α production by human pulmonary macrophages. *Arch Surg* 130:1287-1293; 1995.
173. **Maines MD:** Zinc protoporphyrin is a selective inhibitor of heme oxygenase activity in the neonatal rat. *Biochem Biophys Acta* 673:303-309; 1981.
174. **Rubanyi GM, Vanhontte PM:** Superoxide anion and hyperoxic inactivate endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol* 250:H822-H827; 1986.
175. **Mc Intyre TM, Curthoys NP:** The interorgan metabolism of glutathione. *Int J Biochem* 12:545-551; 1980.
176. **Kaplowitz N:** The importance and regulation of hepatic glutathione. *Yale J Biol Med* 54:497-502; 1981.
177. **Meister A, Anderson ME:** Glutathione. *Ann Rev Biochem* 52:711-760; 1983.
178. **Meister A:** Selective modification of glutathione metabolism. *Science* 220:473-477; 1983.
179. **Orrenius S, Ormstad K, Thor H, Jewell SA:** Turnover and functions of glutathione studied with isolated hepatic and renal cells. *Fed Proc* 42:3177-3188; 1983.
180. **Meister A:** New developments in glutathione metabolism and their potential application in therapy. *Hepatology* 4:739-742; 1984.
181. **Smith MT, Loveridge N, Wills ED, Chayen J:** The distribution of glutathione in the rat liver lobule. *Biochem J* 182:103-108; 1979.
182. **Cornell JS, Meister A:** Glutathione and γ -glutamyl cycle enzymes in crypt and villus tip cells of rat jejunal mucosa. *Proc Natl Acad Sci USA* 73:420-422; 1976.

183. **Brehe JE, Chan AW, Alvey TR, Burch HB:** Effect of methionine sulfoximine on glutathione and aminoacid levels in the nephron. *Am J Physiol* 23:1536-1540; 1976.
184. **Stadtman TC:** Selenium-dependent enzymes. *Ann Rev Biochem* 49:93-110; 1980.
185. **Kaplowitz N:** Physiologic significance of the glutathione S-transferases. *Am J Physiol* 1239:439-444; 1980.
186. **Reddy CC, Tu CPD, Burgess JR, Ho CY, Scholz RW, Massaro EJ:** Evidence for the occurrence of selenium-independent glutathione peroxidase activity in rat liver microsomes. *Biochem Biophys Res Commun* 101:970-978; 1981.
187. **Burk RF:** Glutathione-dependent protection by rat liver microsomal protein against lipid peroxidation. *Biochem Biophys Acta* 757:21-28; 1983.
188. **Kaplowitz N, Aw TY, Ookhtens M:** The regulation of hepatic glutathione. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 25:715-744; 1985.
189. **Fernández- Checa JC, Lu S, Ookhtens M, Deleve L, Kannan R, Runnegar M, Yoshida H, Hideki H, García-Ruiz C, Kulenhkamp J, Kaplowitz N:** Regulation of hepatic GSH. (In : "Hepatic anion transport and bile secretion: physiology and pathophysiology." Tavoloni N and Berk P, editors.) *Raven Press, New York*; 345-395; 1993.
190. **Reed DJ:** Regulation of reductive processes by glutathione. *Biochem Pharmacol* 35:7-13; 1986.
191. **Grundfest CC, Chang J, Newcombe D:** Arcolein: a potent modulator of lung macrophage arachidonic acid metabolism. *Biochem Biophys Acta* 713:149-159; 1982.
192. **Gilbert HF:** Biological disulfides: the third messenger?. *J Biol Chem* 257:12086-12091; 1982.
193. **Ma TT, Ischiropoulos H, Brass CA:** Endotoxin stimulated nitric oxide production increases injury and reduces rat liver chemiluminescence during reperfusion. *Gastroenterology* 108:463-469; 1995.

194. **Davis JS, Bahinsky JB, Harrington JS, Shepherd JB:** Assay, purification, properties and mechanism of action of γ -glutamylcysteine synthetasa from the liver of the rat and *Xenopus Laevis*. *Biochem J* 133:667-678; 1973.
195. **Richman PG, Meister A:** Regulation of γ -glutamylcysteine synthetase by non-allosteric feedback inhibition by glutathione. *J Biol Chem* 250:1422-1426; 1975.
196. **Thor H, Moldeus P, Hermasson R, Högberg J, Reed DJ, Orrenius S:** Metabolic activation and hepatotoxicity: toxicity of bromobenzene in hepatocytes isolated from phenobarbital and diethylmaleate-treated rats. *Arch Biochem Biophys* 188:122-129; 1978.
197. **Viña J, Reginald H, Krebs HA:** Maintenance of glutathione content in isolated hepatocytes. *Biochem J* 149:627-630; 1978.
198. **Beatty PW, Reed DJ:** Involvement of the cystathionine pathway in the biosynthesis of glutathione by isolated rat hepatocytes. *Arch Biochem Biophys*. 204:80-87; 1980.
199. **Griffith OW, Meister A:** Potent and specific inhibition of glutathione synthesis by buthionine sulfoximine. *J Biol Chem* 254:7558-7560; 1979.
200. **Griffith OW, Anderson ME, Meister A:** Inhibition of glutathione biosynthesis by propionine sulfoximine, a selective inhibition of γ -glutamyl-cysteine synthetase. *J Biol Chem* 254:1205-1210; 1979.
201. **Snoke JE, Yanan S, Bloch K:** Synthesis of glutathione from γ -glutamylcysteine. *J Biol Chem* 201:573-586; 1953.
202. **Yanari S, Snoke JE, Bloch K:** Energy sources in glutathione biosynthesis. *J Biol Chem* 201:561-571; 1953.
203. **Reed DJ, Orrenius S:** The role of methionine in glutathione biosynthesis by isolated hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 77:1257-1264; 1977.
204. **Reed DJ, Brodie AE, Meredith MJ:** Cellular heterogeneity in the status and functions of cysteine and glutathione. *Hepatology* 4:39-49; 1984.

205. **Reed DJ, Beatty P:** Biosynthesis and regulation of glutathione: toxicological implications. (In: "Review of biochemical toxicology." Hodgson E, editor) *Bend, Philpot New York:Elsevier North Holland*: 213-241.
206. **Beatty P, Reed DJ:** Influence of cysteine upon the glutathione states of isolated rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol* 30:1227-1230; 1981.
207. **Hill, Burk:** Effect of methionine and cysteine in glutathione synthesis by selenium-deficient isolated rat hepatocytes. *Hepatology* 4:17-124; 1984.
208. **Cantoni GL:** The nature of the active methyl donor formed enzymatically from L-methionine and adenosinetriphosphate. *J Amer Chem Soc* 74:2942; 1952.
209. **Greenberg DM:** Biological methylation. *Adv Enzymol* 25:395; 1963.
210. **Vendemicle G, Altomare E, Trizio T, Le Grazie C, Di Padova C, Salerno MT, Carrieri V, Albano O:** Effects of oral S-adenosyl-L-methionine on hepatic glutathione in patients with liver disease. *Scand J Gastroenterol* 24:407-415; 1989.
211. **Angelico M, Gandin C, Nistri A, Baiocchi L, Capocaccia L:** Oral S-adenosyl-L-methionine administration enhances bile salt conjugation with taurine in patients with liver cirrhosis. *Scan J Clinb Lab Invest* 54:459-464; 1994.
212. **Bottiglieri T, Hyland K, Reynolds EH:** The clinical potential of ademetionine (S-adenosylmethionine) in neurological disorders. *Drugs* 48:137-152; 1994.
213. **Belli DC, Fournier LA, Lepage G, Yousef I, Roy CC:** S-adenosylmethionine prevents total parenteral nutrition-induced cholestasis in the rat. *J Hepatol* 21:18-23; 1994.
214. **Dunne, Davenport, Williams, Tredger:** Evidence that S-adenosylmethionine and N-acetylcysteine reduce injury from sequential cold and warm ischemia in the isolated perfused rat liver. *Transplant* 57:1161-1168; 1994.
215. **García-Ruiz C, Morales A, Colell A, Ballesta A, Rodés J,**

- Kaplowitz N, Fernández-Checa JC:** Feeding S-adenosyl-L-methionine attenuates both ethanol-induced depletion of mitochondrial glutathione and mitochondrial dysfunction in periportal and perivenous rat hepatocytes. *Hepatology* 21:207-214; 1995.
216. **Muriel P, Suárez OR, González P, Zúñiga L:** Protective effect of S-adenosyl-L-methionine on liver damage induced by biliary obstruction in rats: a histological, ultrastructural and biochemical approach. *J Hepatol* 21:95-102; 1994.
217. **Arias Díaz J, Vara E, García C, Villa N, Rodríguez JM, Ortiz P, Balibrea JL:** SAMet protects hepatocytes against the effect of cytokines. *J Surg Res* 62:79-84; 1996.
218. **Russo S, Filipelli W, Ferraraccio F, Berrino L, Guarino V, Rossi F:** Effects of S-adenosilmethionine (SAME) on doxorubicin-induced cardiotoxicity in the rat. *J Med* 25:65-89; 1994.
219. **Mato JM:** Regulation of phospholipid methylation and its effect on membrane proteins. (In: "Progress in protein-lipid interactions 2") *Elsevier Scientific Publishing, New York* :267-302; 1986.
220. **Cantoni GL:** Biochemical methylations: selected aspects. *Ann Rev Biochem* 44:435-451; 1975.
221. **Frezza M, Surrenti C, Manzillo G, Fiaccadori F, Bortolini M, di Padova C:** Oral S-adenosyl-methionine in the symptomatic treatment of intrahepatic cholestasis. A double-blind, placebo-controlled study. *Gastroenterology* 99:211-215; 1990.
222. **Cantoni GL:** S-adenosylmethionine and methionine biosynthesis. *Univ of Chicago Press* :21-32; 1965.
223. **Cabrero C, Martín-Duce A, Ortiz P, Alemany S, Mato JM:** Specific loss of the high-molecular-weight form of S-adenosyl-methionine synthetase in human liver cirrhosis. *Hepatology* 8:1530-1534; 1988.
224. **Corrales F, Alvarez L, Pajares MA, Ortiz P, Mato JM:** Impairment on methionine metabolism in liver disease. *Drug Invest* 4:8-13; 1992.
225. **Anderson ME, Powrie F, Puri RN, Meister A:** Glutathione monoethyl ester: preparation, uptake by tissues, and conversion to glutathione.

- Arch in Biochem and Biophys* 239:538-548; 1985.
226. **Hayashi H, Chaudry IH, Clemens MG, Baue AE**: Hepatic ischemia models for determining the effects of ATP-MgCl₂ following hepatic ischemia. *J Surg Res* 40:167-175; 1986.
227. **Owens CW, Belcher RV**: A colorimetric micro-method for the determination of glutathione. *Biochem J* 94:705-711; 1965.
228. **Arias-Díaz J, Vara E, Torres-Melero, J, García C, Baki W, Ramírez-Armengol JA, Balibrea JL**: Nitrite/nitrate and cytokine levels in bronchoalveolar lavage fluid of lung cancer patients. *Cancer* 74:1546-1551; 1994.
229. **Bartholomew B**: A rapid assay of urine nitrate using the nitrate reductase enzyme of E. Coli. *Food Chem Toxicol* 22:541-543; 1984.
230. **Ding AH, Nathan CF, Stuehr DJ**: Release of reactive nitrogen and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J Immunol* 141:2407-2412; 1988.
231. **Wolff DJ, Bidlack WR**: The formation of carbon monoxide during peroxidation of microsomal lipids. *Biochem Biophys Res Commun* 73:850-857; 1976.
232. **Yalow RS, Berson SA**. (In: "Principles of competitive protein binding assays", Ch 1. Odell WD, Daughaday WH, eds.) Philadelphia. JB Lippincott Co :73-77; 1971.
233. **Jaeschke H, Farhood A, Smith CW**: Contribution of complement-stimulated hepatic macrophages and neutrophils to endotoxin-induced liver injury in rats. *Hepatology* 19:973-979; 1994.
234. **Jaeschke H, Farhood A, Bautista AP, Spolarics Z, Spitzer JJ**: Complement activates Kupffer cells and neutrophils during reperfusion after hepatic ischemia. *Am J Physiol* 264:G801-G809; 1993.
235. **Suzuki S, Toledo-Pereyra LH, Rodríguez F, López F**: Role of Kupffer cells in neutrophil activation and infiltration following total hepatic ischemia and reperfusion. *Circ Shock* 42:204-209; 1994.

236. **Bremer C, Bradford BU, Hunt KJ, Knecht KT, Connor HD, Mason RP, Thurman RG:** Role of Kupffer cells in the pathogenesis of hepatic reperfusion injury. *Am J Physiol* 267:G630-G636; 1994.
237. **Britton RS, Bacon BR:** Role of free radicals in liver diseases and hepatic fibrosis. *Hepato-Gastroenterol* 41:343-348; 1994.
238. **Yoshikawa T, Oyamada H, Ichikawa H, Naito Y, Ueda S, Tainaka K, Takemura T, Tanigawa T, Sugino S, Kondo M:** Role of active oxygen species and lipid peroxidation in liver injury induced by ischemia-reperfusion. *Nippon Shokakibyo Gakkai Zasshi* 87:199-205; 1990.
239. **Nauta R, Uribe M, Walsh D:** Histopathologic correlates of murine hepatic ischemic reperfusion injury: evidence from a chronic in vivo model. *J Univ Surg* 1:155-162; 1988.
240. **Karwinski W, Drange A, Farstad M, Ulvik R, Soreide O:** 60 min normothermic liver ischemia in rats: Allopurinol improves energy status and bile flow during reperfusion. *Eur Surg Res* 22:27-33; 1990.
241. **Nauta R, Tsimoyiannis E, Uribe M, Walsh B, Miller D, Butterfield A:** The role of calcium ions and calcium channel entry blockers in experimental ischemia-reperfusion-induced liver injury. *Ann Surg* 113:142-173; 1991.
242. **Karwinski W, Farstad M, Ulvik R, Soreide O:** Sixty-minute normothermic liver ischemia in rats. *Transplantation* 52:231-234; 1991.
243. **Fukuzawa K, Emre S, Senyuz O, Acarly K, Schwartz ME, Miller CM:** N-acetylcysteine ameliorates reperfusion injury after warm hepatic ischemia. *Transplantation* 59:6-9; 1995.
244. **Nakano H, Boudjema K, Alexandre E, Imbs P, Chenard MP, Wolf P, Cinqualbre J, Jaeck D:** Protective effects of N-acetylcysteine on hypothermic ischemia-reperfusion injury of rat liver. *Hepatology* 22:539-545; 1995.
245. **Emond J, Capron-Laudereau M, Meriggi F, Bernuau J, Reynes M, Houssin D:** Extent of hepatectomy in the rat. *Eur Surg Res* 21:251-259; 1989.

246. **Um S, Nishida O, Tokubayashi M, Kimura F, Takimoto Y, Yoshioka H, Inque R, Kita T:** Hemodynamic changes after ligation of a major branch of the portal vein in rats: comparison with rats with portal vein constriction. *Hepatology* 19:202-209; 1994.
247. **Canada AT, Stein K, Martel D, Watkins WD:** Biochemical appraisal of models for hepatic ischemia-reperfusion injury. *Circ Shock* 36:163-168; 1992.
248. **Hanazaki K, Kurodi T, Kajikawa S, Horigome N, Shiohara E, Haba Y, Iida F:** Metabolic changes in reperfused liver after warm ischemia, and protective effects of coenzyme Q10. *Research in Surg* 5:96-102; 1993.
249. **Harris KA, Wallace AC, Wall WJ:** Tolerance of the liver to ischemia in the pig. *J Surg Res* 34:44-52; 1983.
250. **Fujikawa M, Kamiike W, Hatanaka M, Shimizu S, Akashi A, Miyata M, Kurosawa K, Yoshida Y, Tagawa K, Matsuda H:** Changes in biliary glutathione level during ischemia-reperfusion of rat liver. *J Surg Res* 57:569-573; 1994.
251. **Liu P, Fisher MA, Farhood A, Smith CW, Jaeschke H:** Beneficial effects of extracellular glutathione against endotoxin-induced liver injury during ischemia and reperfusion. *Circ Shock* 43:64-70; 1994.
252. **Chawla RK, Bonkovsky HL, Galambos JT:** Biochemistry and Pharmacology of S-adenosyl-L-methionine and rationale for its use in liver damage. *Drugs* 40:98-110; 1990.
253. **Kobayashi H, Nonami T, Kurokawa T, Sugiyama S, Ozawa T, Takagi H:** Mechanism and prevention of ischemia-reperfusion-induced liver injury in rats. *J Surg Res* 51:240-244; 1991.
254. **Montero C, Smolenski RT, Duley JA, Simmonds HA:** S-adenosylmethionine increases erythrocyte ATP in vitro by a route independent of adenosine kinase. *Biochem Pharmacol* 40:2617-2623; 1990.
255. **Corrales F, Giménez A, Alvarez L, Caballería J, Pajares MA:** S-adenosyl-L-methionine treatment prevents CCl₄-induced S-adenosyl-L-methionine synthetase inactivation and attenuates liver injury.

Hepatology 16:1022-1027; 1992.

256. **Tatsuma T, Kim YI, Ono M, Kai T, Ishii T, Akizuki S, Kobayashi M:** Suppression of superoxide production from polymorphonuclear leukocytes by cyclosporine in ischemia-reperfusion of the liver. *Trans Proc* 26:2413-2416; 1994.
257. **Zweier JL, Kuppusamy P, Lutty GA:** Measurement of cell free radical generation: Evidence for a central mechanism of free radical injury in postischemic tissue. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:4046-4050; 1988.
258. **Mathews WR, Fisher MA, Jaeschke H:** Lipid peroxidation as molecular mechanism of liver cell injury during reperfusion after ischemia. *Free Rad Biol Med* 16:763-770; 1994.
259. **Hamamoto I, Nemoto EM, Evans RW, Mischinger HJ, Fujita S, Murase N, Todo S:** Rat liver lipids during ex vivo warm and cold ischemia and reperfusion. *J Surg Res* 55:382-389; 1993.
260. **Poggetti RS, Moore EE, Moore FA, Koike K, Tuder R, Anderson BO, Banerjee A:** Quantifying oxidative injury in the liver. *Am J Physiol* 268:G471-G479; 1995.
261. **Webster NR, Nurin JF:** Molecular structure of free radicals and their importance in biological reactions. *J Anaesth* 60:98-108; 1988.
262. **Wibbenmeyer LA, Lechner AJ, Muñoz CF, Matuschak GM:** Downregulation of E. Coli-induced TNF- α expression in perfused liver by hypoxia-reoxygenation. *Am J Physiol* 268: G311-G319; 1995.
263. **Matuschak GM, Mattingly ME, Tredway TL, Lechner AJ:** Liver-lung interactions during E.Coli endotoxemia. *Am J Resp Crit Care Med* 149:41-49; 1994.
264. **Jiang J, Bahrami S, Leichtfried G, Redl H, Öhlinger W, Schlag G:** Kinetics of endotoxin and tumor necrosis factor appearance in portal and systemic circulation after hemorrhagic shock in rats. *Ann Surg* 221:100-106; 1995.
265. **Hortelano S, Dewez B, Genaro AM, Díaz-Guerra MJM, Boscá L:** Nitric oxide is released in regenerating liver after partial hepatectomy.

- Hepatology* 21:776-786; 1995.
266. **Billiar TR, Curran RD, Ferrari FK, Williams DL**: Kupffer cell: hepatocyte cocultures release nitric oxide in response to bacterial endotoxin. *J Surg Res* 48:349-353; 1990.
267. **Kobayashi H, Nonami T, Kurokawa T, Takeuchi Y, Harada A, Nakao A, Takagi H**: Role of endogenous nitric oxide in ischemia-reperfusion injury in rat liver. *J Surg Res* 59:772-779; 1995.
268. **Payne D, Kubes P**: Nitric oxide donors reduce the rise in reperfusion-induced intestinal mucosal permeability. *Am J Physiol* 265:G189-G195; 1993.
269. **Aoki N, Johnson G, Lefer AM**: Beneficial effect of two forms of NO administration in feline splachnic artery occlusion shock. *Am J Physiol* 258:G275-G281; 1990.
270. **Carey C, Siegfried MR, Ma XL, Weyrich AS, Lefer AM**: Antishock and endothelial protective actions of a nitric oxide donor in mesenteric ischemia and reperfusion. *Circ Shock* 38:209-216; 1992.
271. **Rauen U, Viebahn R, Lauchart W, de Groot H**: The potential role of reactive oxygen species in liver ischemia/reperfusion injury following liver surgery. *Hepatogastroenterology* 41:333-336; 1994.
272. **McCurry KR, Campbell DA, Scales WE, Warren JS, Remick DG**: Tumor necrosis factor, interleukin 6 and the acute phase response following hepatic ischemia/reperfusion. *J Surg Res* 55:49-54; 1993.
273. **Colletti LM, Kunkel SL, Walz A, Burdick MD, Kunkel RG, Wilke CA, Strieter RM**: The role of cytokine networks in the local liver injury following hepatic ischemia-reperfusion in the rat. *Hepatology* 23:506-514; 1996.
274. **Creasey AA, Stevens P, Kenney J, Allison AC, Warren K, Cattel R, Hinshaw L, Taylor FB**: Endotoxin and cytokine profile in plasma of baboons challenged with lethal and sublethal E. Coli. *Circ Shock* 33:84-87; 1991.
275. **Shalaby MR, Waage A, Aarden L, Espevik T**: Endotoxin, tumor necrosis factor and interleukin 1 induce interleukin 6 production in

- vivo. *Clin Immunol Immunopathol* 53:488-491; 1989.
276. **Fong Y, Lowry SF**: Cytokines and the cellular response to injury and infection. In: Wilmore DW, Brennan MF, Harken AH, Holcroft JW, Meakins JL eds. "Care of Surgical Patients". New York NY: *Scientific American* :1-16; 1990.
277. **Billiar TR, Curran RD, Williams DL, Kispert PH**: Liver nonparenchymal cells are stimulated to provide interleukin 6 for induction of hepatic acute-phase response in endotoxemia but not in remote localized inflammation. *Arch Surg* 127:31-37; 1992.
278. **Colletti LM, Kunkel SL, Walz A, Burdick MD, Kunkel RG, Wilke CA, Strieter RM**: Chemokine expression during hepatic ischemia/reperfusion-induced lung injury in the rat. *J Clin Invest* 95:134-141; 1995.
279. **Hisama N, Yamaguchi Y, Miyanari N, Ichiguchi O, Goto M, Mori K, Ogawa M**: Ischemia-reperfusion injury: the role of Kupffer cells in the production of cytokine-induced neutrophil chemoattractant, a member of the interleukin-8 family. *Transpl Proceed* 27:1604-1606; 1995.
280. **Stouthard JML, Romijn JA, Van der Poll T, Endert E, Klein S, Bakker PJM, Veenhof CHN, Sauerwein HP**: Endocrinologic and metabolic effects of interleukin-6 in humans. *Am J Physiol* 268:E813-E819; 1995.
281. **Fong Y, Helfgot DG, Brennan MF**: Interleukin-6 blockade impedes recovery from experimental hepatectomy. *Surg Forum* 49:190-192; 1993.
282. **Koike K, Moore EE, Moore FA, Kim FJW, Carl VS, Banerjee A**: Gut phospholipase A₂ mediates neutrophil priming and lung injury after mesenteric ischemia-reperfusion. *Am J Physiol* 268:G397-G403; 1995.
283. **Hatch GM, Vance DE, Wilton DC**: Rat liver mitochondrial phospholipase A₂ is an endotoxin-stimulated membrane-associated enzyme of Kupffer cells which is released during liver perfusion. *Biochem J* 293:143-150; 1993.

284. **Caraceni P, Gasbarrini A, Nussler A, Di Silvio A, Bartoli F, Borle AB, Van Thiel DH:** Human hepatocytes are more resistant than rat hepatocytes to anoxia-reoxygenation injury. *Hepatology* 20:1247-1254; 1994.
285. **Dunne JB, Davenport M, Williams R, Tredger JM:** Evidence that s-adenosylmethionine and N-acetylcysteine reduce injury from sequential cold and warm ischemia in the isolated perfused rat liver. *Transplantation* 57:1161-1168; 1994.