

Universidad Nacional de La Plata



Facultad de Ciencias Médicas

Carrera de Doctorado

*Estudio Experimental de la*

*Isquemia-Reperfusión Hepática*

Autor: Médica Ana Carolina del Pozo

Director de Carrera y Tesis: Prof. Dr. Pedro Horacio González

Co-Director de Tesis: Dr. Clemente Raimondi

*A mis grandes amores Paolo y Sofía*

*A mi mamá y a mi papá*

## *Agradecimientos*

Esta tesis doctoral fue desarrollada en el Laboratorio de Trasplante de Órganos de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de La Plata.

Deseo agradecer a cada uno de los que han colaborado en el desarrollo de esta tesis:

- Al Prof. Dr. Pedro Horacio González, quien ha encendido en mí la llama de la investigación
- Al Dr. Clemente Raimondi, quien me ha abierto las puertas del Laboratorio de Trasplante de Órganos
- A la Dra. Natalia Lausada, quien me ha introducido en el fascinante mundo de la microcirugía, por ser mi maestra, por su predisposición y su colaboración en cada paso de este trabajo
- A todos los profesores de la Universidad Nacional de La Plata por su pasión en la docencia
- A todos los cirujanos que han sido y son mis maestros en la difícil tarea de enseñar un arte

*Presentaciones de resultados preliminares del presente estudio*

- Cambios Histológicos y Enzimáticos por Isquemia- Reperfusión en el Hígado de Rata. *del Pozo A.C.*, Lausada N., Dreizzen H., Giordano H., González P.H., Raimondi C. VII Congreso Argentino de Trasplante, Sociedad Argentina de Trasplante, Córdoba, Argentina, Noviembre 2003.
- La Administración de Lidocaína Atenúa las Alteraciones Enzimáticas en la Isquemia-Reperfusión Hepática Experimental. *del Pozo A.C.*, Lausada N., Raimondi J.C., González P.H. Congreso Internacional de la Sociedad Argentina de Trasplante. Buenos Aires, Argentina, Noviembre 2005.

*Si has construido castillos en el aire...  
no has perdido el tiempo,  
allí es donde deben estar.  
Ahora, ponle cimientos.*

*Thoreau*

# Índice

---

|  | Página |
|--|--------|
| <i>Introducción a la cirugía hepática</i>                            | 7      |
| - Reseña histórica de la cirugía hepática                            | 8      |
| - Trasplante hepático: revolución de la cirugía hepática             | 11     |
| <i>Isquemia-reperfusión - Revisión</i>                               | 14     |
| - Fisiopatología de la isquemia-reperfusión hepática                 | 15     |
| - Manejo actual de la isquemia-reperfusión hepática                  | 30     |
| <i>Lidocaína</i>   | 42     |
| - Historia   | 43     |
| - Propiedades químicas y relaciones entre estructura y actividad     | 44     |
| - Farmacodinámica - Mecanismos de acción y funciones                 | 45     |
| - Otras funciones  | 49     |
| - Efecto protector frente a isquemia-reperfusión                     | 52     |
| - Farmacocinética  | 53     |
| - Efectos adversos - Toxicidad                                       | 55     |
| <i>Fundamentos de la elección del tema</i>                           | 57     |
| - Objetivo general   | 58     |
| - Objetivos específicos  | 58     |
| <i>Material y Métodos</i>  | 59     |
| - Animales - Anatomía hepática de la rata                            | 61     |
| - Material de microcirugía   | 63     |
| - Anestesia y preparación  | 64     |
| - Técnica quirúrgica   | 65     |
| - Extracción de muestras de sangre y explante                        | 67     |
| - Procesado del material   | 68     |
| - Determinación de marcadores de injuria por la isquemia-reperfusión | 69     |
| - Grupos   | 72     |
| - Análisis estadístico   | 74     |
| <i>Resultados</i>  | 75     |
| - Resultados enzimáticos   | 76     |
| - Estudio histológico  | 93     |
| - Resultados de inmunohistoquímica                                   | 97     |
| - Resultados - Resumen   | 111    |
| <i>Imágenes</i>  | 114    |
| <i>Discusión</i>   | 127    |
| <i>Conclusiones</i>  | 121    |
| <i>Referencias</i>   | 123    |

## *Introducción a la cirugía hepática*

## *Reseña histórica de la cirugía hepática*



Wilhelm Fabricius Hildanus (1560-1634) realizando un procedimiento quirúrgico en la era pre-anestesia.

A principios del siglo XVII, Wilhelm Fabricius Hildanus describió las primeras maniobras quirúrgicas realizadas con éxito en las heridas hepáticas penetrantes; series subsiguientes fueron descritas durante las guerras Napoleónicas y Franco-Prusiana <sup>(1-3)</sup>.

El primer intento de resección de un tumor hepático no fue llevado a cabo hasta el 1886 por Luis, quien ese mismo año extirpó un adenoma del lóbulo izquierdo mediante ligadura y corte del pedículo tumoral, con intentos fallidos de hemostasia por lo que, no sorpresivamente, el paciente murió en las primeras horas de postoperatorio por hemorragia <sup>(4)</sup>.

La primera resección hepática exitosa se atribuye a von Langenbuch, quien en 1888, resecó una porción del lóbulo izquierdo de 370 gramos que contenía un adenoma.

Dos años más tarde, McLane Tiffany, cirujano de Baltimore, reportó la exportación de un tumor benigno y al año siguiente se realizó en manos de Lucke la primera resección por malignidad <sup>(5-7)</sup>.

En 1908, en una magistral presentación, J. Hogarth Pringle describió la maniobra de clampeo temporáneo de todos los elementos del pedículo hepático (maniobra de Pringle) para el tratamiento de los traumatismos del hígado <sup>(8)</sup>.



En 1911, Wendel publicó el primer caso de hepatectomía derecha por tumor maligno primario y en el 1940 Cattell fue el primero en remover con éxito una metástasis de un carcinoma colorrectal <sup>(9, 10)</sup>.



Fotografía de inicio del S.XX que muestra una operación conducida por Sir William Macewen (1848-1924). A su derecha, lo asiste James Hogarth Pringle.

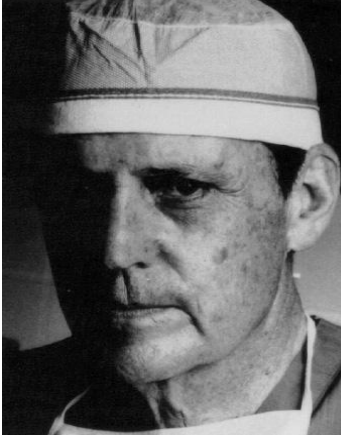
En 1943, Wangensteen realizó en forma combinada una resección hepática con gastrectomía <sup>(11)</sup>, mientras que la primera correcta descripción de una resección anatómica pertenece a Raven, quien en 1948, llevó a cabo una segmentectomía izquierda por una metástasis colónica <sup>(12)</sup>.

En 1952 Lortat-Jacob y Robert realizaron la primera hepatectomía derecha <sup>(13)</sup>.

En 1960, Heaney y Jacobson propusieron la “Exclusión Vascular Total”, procedimiento en el cual toda la circulación hepática es interrumpida, (clampeo de pedículo hepático con clampeo de la vena cava inferior supra e infrahepática) para el tratamiento de severos traumatismos hepáticos <sup>(14)</sup>.

Thomas Starzl realizó en 1963 en Denver el primer trasplante de hígado en humanos con escaso éxito, sin embargo, su persistencia se vio premiada en los años subsiguientes. En 1968 se inauguraba el segundo equipo de trasplante hepático en el mundo bajo la dirección de Sir Roy Yorke Calne en Cambridge.

Grandes esfuerzos durante más de dos décadas, permitieron los actuales alentadores resultados del trasplante hepático con una excelente sobrevida de los pacientes e injertos (15).



Thomas Starzl

A pesar de los anteriormente mencionados, lentos pero firmes pasos en la cirugía hepática, ésta fue considerada hasta décadas recientes un campo “heroico” de la medicina asociado con importante pérdida hemática y elevadas morbilidad y mortalidad. Con esta “reputación” la cirugía hepática era solamente ofrecida como medida extrema a pacientes en condiciones críticas.

Los avances tecnológicos, la mejor comprensión de la anatomía y de la fisiología hepáticas, el perfeccionamiento del soporte anestésico y del manejo postoperatorio junto a un entrenamiento quirúrgico intensivo han contribuido a su desarrollo y continuo avance.



Sir Roy Yorke Calne

Hoy, la cirugía hepática es uno de los campos más complejos y exitosos de la especialidad, incluye una sofisticada variedad de procedimientos que abarcan desde la realización de técnicas miniinvasivas al uso de complejos injertos segmentarios obtenidos de donantes cadavéricos o, incluso, de donantes vivos para trasplante.

## *Trasplante hepático: revolución de la cirugía hepática*



San Cosme y San Damián, gemelos que ejercían la medicina gratuitamente. Vivieron durante la época del emperador romano Diocleciano (284-305). Fueron inmortalizados en diferentes pinturas “trasplantando” a un sacerdote el miembro inferior.

El hígado es el órgano noble por excelencia. La historia del trasplante hepático va indisolublemente ligada a la de un cirujano norteamericano nacido en Iowa: Thomas Starzl. Verdadero antecesor de la cirugía trasplantológica que constituye actualmente una verdadera especialidad en todo el mundo. Fue uno de los primeros cirujanos en hacer trasplantes renales al inicio de los años sesenta. Preparó una técnica experimental de trasplantes en animales que validó hasta la saciedad y el 1 de marzo de 1963, llevó a cabo el primer trasplante de hígado en el Veteran's Hospital de Denver, Colorado. El receptor sería un niño de 3 años víctima de una atresia congénita de la vía biliar, al que implantó el órgano de otro niño fallecido como consecuencia de un tumor cerebral. Como el mismo Starzl describiera gráficamente: “la intervención comenzó con un clima de confianza que sin embargo acabó en tragedia”. El niño murió por hemorragia en la sala operatoria. Dos meses más tarde, el 5 de mayo, realizó el segundo intento en un hombre de 48 años con un cáncer de hígado que recibió el órgano de un paciente de 55

años muerto a causa de un tumor cerebral. El paciente trasplantado vivió 22 días, pero murió a causa de embolia pulmonar con el injerto funcionando. El camino comenzaba a abrirse.... pero solo un poco. Entre 1963 y 1967, en Francia (Demirleau), Inglaterra (Calne) y los Estados Unidos (Starzl) se hicieron varias decenas de trasplantes hepáticos con resultados diversos, sin alcanzar el año de sobrevida <sup>(16-19)</sup>.

La historia del trasplante de hígado está plagada de numerosos intentos en todo el mundo durante las décadas de los sesenta y los setenta, pero con unos resultados muy pobres, que en las mejores manos apenas suponía una sobrevida al año del 30% de los pacientes.

Hubo que esperar a la década de los ochenta para que los avances quirúrgicos, anestesiológicos, de manejo de la coagulación, de las terapias antibióticas, y sobre todo de la inmunosupresión llevaran a una verdadera explosión de la técnica.

Finalmente, una conferencia de consenso celebrada en Bethesda (Maryland) en Junio de 1983 declara al trasplante hepático de utilidad terapéutica demostrada, llevando a su verdadera difusión por todo el mundo <sup>(20)</sup>. La sobrevida al año pasó del 30 al 70%, mejorando más aún subsecuentemente, en enfermos que, de otra forma, eran condenados a muerte en días o meses.

La disparidad entre el número siempre creciente de pacientes en lista de espera para trasplante y la escasez en el número de donantes impulsó la ideación de diferentes estrategias. El uso de órganos de donantes en paro cardíaco (non-heart-beating-donors), la bipartición del injerto (split livers), el uso de órganos considerados marginales por su calidad (donantes con importante esteatosis, con positividad para hepatitis B o C, donantes con tumores malignos extrahepáticos, donantes ancianos, etc.) e incluso el uso de injertos provenientes de donantes vivos son técnicas utilizadas por la mayoría de los principales grupos dedicados al trasplante hepático en el mundo <sup>(21)</sup>.

Sigue siendo un importante campo de la investigación la potencial utilización de órganos obtenidos de otras especies genéticamente modificadas (fundamentalmente cerdos y primates) para la realización de xenotrasplantes, así como la realización de trasplante de células madre y hepatocitos.

# *Isquemia-reperfusion*

## *Revisión*

## *Fisiopatología de la isquemia-reperfusión hepática*

El proceso de isquemia-reperfusión hepática (IRH) representa una serie de complejos eventos que ocurren durante el bloqueo transitorio del flujo de sangre y oxígeno (isquemia) y el retorno del flujo (reperfusión), condicionando la disfunción celular del órgano <sup>(22-25)</sup>.

La IRH se produce en diferentes situaciones clínicas que van desde la cirugía del trauma, resección, shock y trasplante, entre otras. En trasplante, la IRH es un fenómeno inevitable, que se puede minimizar en extremo en los donantes vivos relacionados, pero que se ve incrementado con el uso de donantes en paro cardíaco (Non-heart-beating donors) <sup>(26)</sup>. Del 5 al 15 % de los hígados trasplantados de donantes cadavéricos desarrollan no-función primaria del injerto (primary non-function) llevando al receptor al retrasplante o al óbito mientras que hasta un 30% sufre disfunción inicial (delayed graft function) con la consecuente lenta recuperación <sup>(27-29)</sup>.

En el trasplante, el hígado puede sufrir tres tipos diferentes de isquemia: 1) la isquemia "fría" que se relaciona casi exclusivamente a la parte ablativa del trasplante, cuando el órgano es intencionalmente conservado en frío para reducir la actividad metabólica hasta su implante; 2) la isquemia "tibia o caliente" que es característica de la cirugía del trauma, resección hepática con clampeo del pedículo, shock hipovolémico, etapa ablativa del órgano para trasplante, y 3) la isquemia de "re-calentamiento" que ocurre durante la manipulación del hígado y la confección de las anastomosis vasculares pre-reperfusión en el trasplante (considerada generalmente como isquemia tibia) <sup>(30)</sup>.

Notoriamente, la injuria de las células hepáticas en cada uno de los mencionados tipos de isquemia se detecta fundamentalmente luego de la reperfusión cuando el aporte de oxígeno es restablecido.

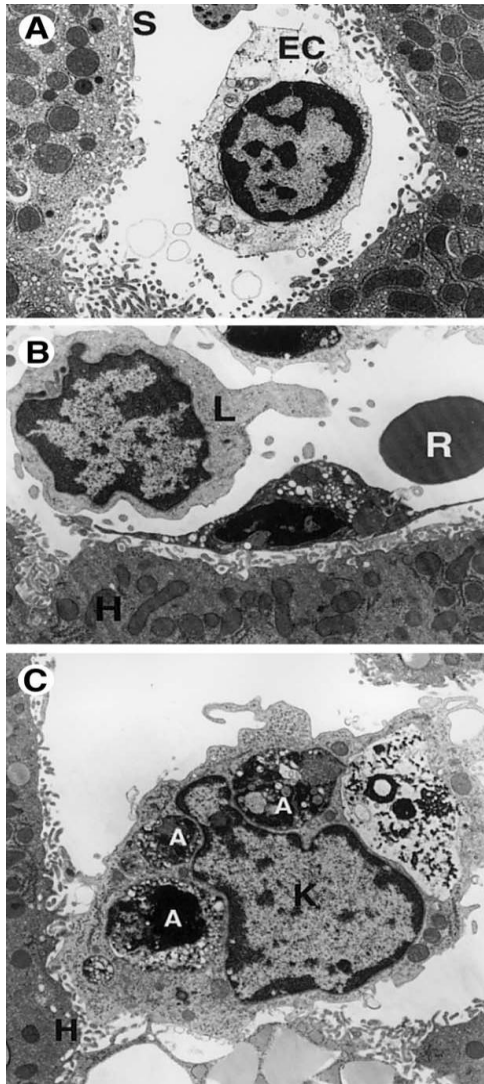


Fig. 1 Fotografía electrónica de hígados de rata preservados en solución fría de Euro-Collins por 16 horas. (A) Típica injuria por isquemia fría con abalonamiento y desprendimiento de células endoteliales. (B) Hígado a una hora de perfusión. Células endoteliales apoptóticas con condensación de la cromatina, mitocondrias intactas y vacuolización citoplasmática. (C) En el mismo grupo, células de Kupffer activadas con fagolisosomas. S, Sinusoide; EC, célula endotelial; K, célula de Kupffer; L, linfocito; H, hepatocito; R, eritrocito; A, cuerpo apoptótico. (Con permiso de Clavien et al.)

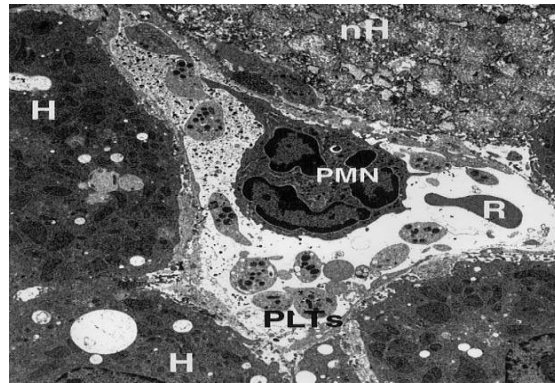


Fig. 2 Micrografía electrónica que representa injuria por isquemia tibia en el hígado de rata. Se observa abalonamiento de células endoteliales acompañada de necrosis hepatocitaria (nH). Presencia sinusoidal de polimorfonucleares (PMN), plaquetas (PLTs) y eritrocitos (R).

Estudios morfológicos en animales luego de cada uno de los diferentes tipos de isquemia han demostrado diferencias significativas según ésta sea fría o tibia. Ya en la década del ochenta, se observó que la isquemia fría produce daño en las células endoteliales sinusoidales (SEC) <sup>(31-34)</sup>, éstas se desprenden, pierden sus procesos citoplasmáticos, se abalonan como resultado de la alteración de la matriz extracelular y citoesquelética y precipitan en el lumen sinusoidal (Fig. 1).

A pesar de estos cambios estructurales, la

mayoría de las SEC permanecen vivas durante el período de isquemia muriendo rápidamente una vez instaurada la perfusión <sup>(35,36)</sup>.



La disrupción de la pared endotelial promueve la adherencia de leucocitos y plaquetas que inducen alteraciones de la microcirculación.

El grado de perturbación del endotelio se correlaciona con la duración de la isquemia.

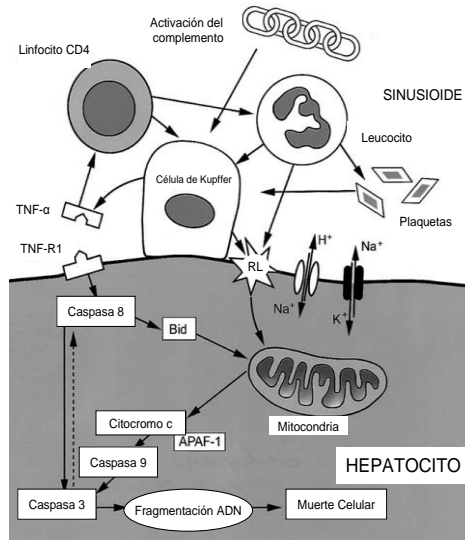


Fig. 3. Mecanismos de injuria por isquemia tibia. El principal mecanismo incluye apoptosis mediada por TNF- $\alpha$ , daño en la distribución iónica y generación de radicales libres (RL). La acumulación de sodio intracelular es causada por una combinación del bloqueo de la bomba Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> y el influjo de Na<sup>+</sup> por parte del intercambiador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>. En la isquemia fría, factores similares causan injuria de las células endoteliales. Luego de la reperfusion estas células sufren rápidamente apoptosis.

La adherencia de plaquetas al endotelio induce la apoptosis de las SEC durante la reperfusion post-isquemia <sup>(37-39)</sup>. La liberación de óxido nítrico (ON) a partir de las plaquetas en combinación con la producción de radicales libres durante la re-oxigenación aumenta la formación de peroxinitrito, potente activador de la apoptosis de las SEC.

En contraste a la isquemia fría, la isquemia tibia, muy pobremente tolerada, induce una rápida muerte hepatocitaria (Fig. 2). Este severo daño es probablemente precedido por una masiva muerte de las células endoteliales. El rol de las células de Kupffer, leucocitos y plaquetas

adheridos constituye una activa área de investigación. Durante la reperfusion, las células de Kupffer son activadas, fenómeno que se evidencia por los cambios estructurales, la formación de radicales libres, el aumento de la capacidad fagocitaria y la liberación de enzimas lisosomales y citoquinas que incluyen el Factor de Necrosis Tumoral Alfa (TNF- $\alpha$ ) (Fig.3). La unión de estas sustancias a sus receptores y la liberación de radicales libres durante la etapa temprana de la reperfusion inicia un complejo mecanismo de apoptosis que conduce a la muerte de los hepatocitos (40).

Durante la reperfusión, los leucocitos se adhieren rápidamente a los sinusoides denudados contribuyendo más aún a la injuria. Tanto la Interleukina-1 (IL-1) como el TNF- $\alpha$  liberados por las células de Kupffer producen un aumento (up-regulation) del receptor CD11 en la membrana de los leucocitos recluyéndolos dentro de los sinusoides. El impacto de la isquemia de re-calentamiento en la integridad estructural del hígado y sus mecanismos de injuria son poco conocidos, se cree que probablemente sean el reflejo de la sumatoria de los efectos de la isquemia fría y tibia <sup>(41,42)</sup>.

Los mecanismos moleculares responsables de la lesión son tan complejos que no puede definirse una vía final común de muerte celular.

Aunque no siempre es posible determinar el lugar bioquímico preciso sobre el que actúa un agente lesivo, en este caso la isquemia-reperfusión, 4 son los sistemas intracelulares vulnerables: 1) mantenimiento de integridad de membranas celulares, de la que dependen la homeostasis iónica y osmótica de las células y sus orgánulos; 2) la respiración aeróbica que afecta la fosforilación oxidativa y la producción de trifosfato de adenosina (ATP); 3) la síntesis de proteínas enzimáticas y estructurales y 4) la conservación de la integridad del aparato genético de la célula.

- ❖ Los elementos estructurales y bioquímicos de la célula están tan estrechamente interrelacionados que cualquiera sea el punto preciso del ataque inicial, la lesión conduce a efectos secundarios de gran alcance. Por ejemplo la alteración de la respiración aeróbica interrumpe la actividad de la bomba de sodio dependiente de energía que mantiene el equilibrio iónico de la célula, dando lugar a alteraciones en el contenido de iones y agua de dicha célula.
- ❖ Los cambios morfológicos de la lesión celular se hacen evidentes sólo después de haberse alterado alguno de los sistemas bioquímicos

críticos del interior celular.

- ❖ Las reacciones de la célula a los estímulos lesivos dependen del tipo de lesión, su duración y su gravedad. Por ejemplo la isquemia de corta duración puede generar cambios reversibles, mientras que la isquemia de larga duración puede conducir a una muerte celular instantánea o a una lesión lenta que con el tiempo conduce a la muerte celular.
- ❖ El tipo, estado y adaptabilidad de la célula lesionada también determinan las consecuencias de la lesión celular.

Diferentes temas bioquímicos comunes parecen ser importantes en la determinación de la lesión y/o muerte celular, cualquiera sea el agente instigador. Estos comprenden:

- ❖ Oxígeno y radicales libres derivados del oxígeno. La falta de oxígeno sirve de base a la patogenia de la lesión celular en la isquemia. Especies de oxígeno activado parcialmente reducidas son mediadores importantes de la muerte celular. Estos radicales libres causan peroxidación oxidativa y tienen efectos nocivos sobre la estructura celular.
- ❖ Respiración aeróbica de la célula. Al afectarse la respiración aeróbica, es decir, la fosforilación oxidativa de la mitocondria, disminuye el oxígeno en el interior celular, con lo que se retarda la producción de ATP, aumentando progresivamente el monofosfato de adenosina (AMP). Esto estimula la actividad de la fosfofructokinasa y fosforilasa, activando el proceso de glucólisis anaeróbica con el fin de mantener las fuentes de energía. La glucólisis da lugar a la acumulación de ácido láctico y fosfatos inorgánicos que reducen el Ph intracelular.

- ❖ Depleción de ATP. La pérdida de ATP y la disminución de su síntesis, consecuencia de la isquemia, juega un papel fundamental en la pérdida de la integridad de membranas. El fosfato de alta energía en forma de ATP es necesario en muchos procesos sintéticos y degradativos de la célula que abarcan, entre otros, el transporte de membrana, la síntesis de proteínas, la lipogénesis y las reacciones de deacilación-reacilación necesarias para el recambio fosfolipídico.
  
- ❖ Calcio intracelular y pérdida de la homeostasis del calcio. El calcio citosólico libre se mantiene en concentraciones extremadamente bajas (menos de 0.1  $\mu\text{M}$ ) en comparación con los niveles extracelulares (1.3  $\mu\text{M}$ ). La mayor parte del calcio intracelular se encuentra secuestrado en las mitocondrias y retículos endoplasmáticos. Dichos gradientes están mantenidos por bombas  $\text{Ca}^{++}\text{-Mg}^{++}$  ATPasas dependientes de energía. La isquemia causa un aumento precoz de la concentración de calcio citosólico debido a su afluencia a través de la membrana plasmática y a su liberación desde mitocondrias y retículos endoplásmicos. Los aumentos sostenidos de calcio activan, a su vez, una serie de enzimas con efectos celulares nocivos. Las enzimas que se saben son activadas por el calcio comprenden las fosfolipasas (fomentando por tanto la lesión de la membrana celular), las proteasas (que escinden proteínas citoesqueléticas y de membrana), las ATPasas (acelerando la depleción de ATP) y las endonucleasas (que se asocian a la fragmentación de la cromatina). Aunque no cabe duda de que las células lesionadas acumulan calcio y que éste es un mediador de los mecanismos de lesión celular, existe controversia respecto a si el

aumento de calcio es necesariamente la causa inicial de la lesión celular irreversible o una consecuencia (Fig. 4).

- ❖ Efectos de la permeabilidad de membranas. La pérdida precoz de la permeabilidad selectiva de la membrana que conduce a una lesión franca de la misma es un rasgo característico de todos los tipos de lesión celular. Este efecto puede ser el resultado de una serie de acontecimientos que implican depleción de ATP y activación moduladora del calcio de las fosfolipasas. Las membranas celulares también pueden ser dañadas en forma directa por toxinas bacterianas, proteínas virales, componentes líticos del sistema de complemento, productos de linfocitos citolíticos (perforinas), agentes físicos y químicos (Fig. 4).
- ❖ Activación del Sistema Toll Like Receptor (TLR). El sistema Toll Like Receptor (TLR), homólogo de la *Drosophila* Toll Proteins, juega un rol fundamental en los mecanismos innatos de defensa del huésped contra agentes patógenos mediante el reconocimiento de sus moléculas asociadas. Los receptores TRL, expresados en diversos tipos celulares que incluyen macrófagos, monocitos y células dendríticas, se unen a diferentes estructuras moleculares de bacterias, virus y hongos, favoreciendo la producción de citoquinas pro-inflamatorias. TLR4, uno de los receptores TRL mejor caracterizados, inicialmente identificado como el receptor celular para el reconocimiento de los polisacáridos de la pared celular de las bacterias Gram negativas, se une también a diferentes proteínas endógenas generando una respuesta inmune incluso en ausencia de infección. La

congestión portal que se produce durante la isquemia hepática conduce a la liberación de ligandos/agonistas endógenos en el torrente circulatorio que incluyen proteínas de la matriz extracelular (como el dominio A de la fibronectina, fibrinógeno, ácido hialurónico, heparán sulfato, beta defensina, proteínas de shock séptico, proteína S100 y el grupo hemo). Estudios recientes han demostrado que la activación del TLR4 generada durante el proceso de IRH desencadena un proceso de inflamación local que culmina en daño hepatocelular. Diferentes trabajos han demostrado que la participación del TLR4 resulta de importancia crítica en el proceso de injuria por IRH ya que ratones deficientes de TLR4 resultaron indemnes al daño <sup>(43-45)</sup>.

Las células de los mamíferos poseen una elevada presión coloidosmótica debido a la presencia elevada de proteínas intracelulares. Para equilibrar esta presión, el sodio se mantiene a bajas concentraciones intracelulares gracias a la acción de la bomba  $\text{Na}^+\text{-k}^+$  ATPasa. La disminución de la actividad de esta bomba hace que se acumule sodio intracelular.

Durante el proceso de isquemia-reperfusion, el aumento intracelular de sodio junto a la acumulación de catabolitos como el ácido láctico y fosfatos inorgánicos producen un aumento de la osmolaridad que es contrarrestado con el ingreso de agua y el consecuente edema celular.

La intensa vacuolización mitocondrial, el intenso influjo de calcio, la pérdida importante de proteínas, enzimas, coenzimas y ácidos ribonucleicos y la depleción de fosfatos de alta energía intracelulares producen lesión de las membranas lisosomales y alteración del citoesqueleto, seguida de la salida de sus enzimas al citoplasma y la

activación de sus hidrolasas (ARNasa, ADNasa, proteasas, glucosidasas y catepsinas), llevando a un proceso de digestión celular. La célula finalmente muere y es fagocitada por otras células.

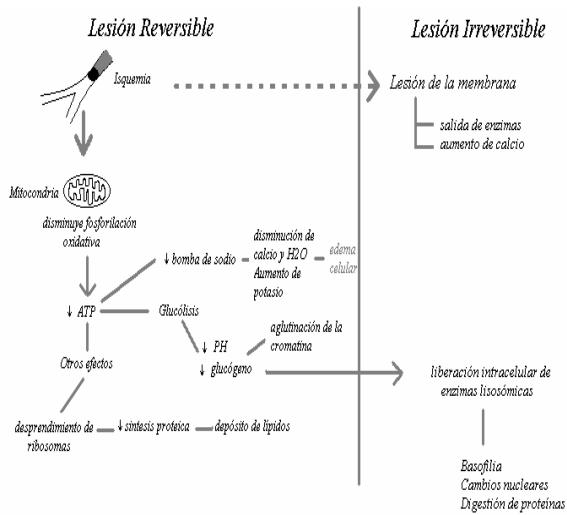


Fig. 4. Secuencia postulada de daños inducidos por la isquemia.

La duración de la hipoxia necesaria para producir los mecanismos deletéreos anteriormente mencionados varía considerablemente según el tipo de célula y el tipo de isquemia. Paradójicamente, el restablecimiento de la circulación sanguínea produce un continuo e incluso mayor deterioro. Los radicales libres generados durante la reperfusión parecen ser los responsables de, al menos, parte este fenómeno.

En 1981, McCord propuso un mecanismo para explicar el rol del oxígeno en la injuria por isquemia-reperfusión. La clave de este mecanismo es la conversión de la xantino deshidrogenasa a xantino oxidasa, lo que genera el radical superóxido (radical libre altamente reactivo), mediante la reducción del oxígeno en la vía catabólica final del ATP a ADP. Los radicales libres formados durante la reperfusión producen activación de células fagocitarias, liberación de moléculas de adhesión y activación del sistema de complemento <sup>(46-48)</sup>.

El ataque a los ácidos grasos de la bicapa fosfolipídica de las membranas celulares por parte de las formas reactivas del oxígeno, puede estudiarse mediante la cuantificación de los productos finales de la peroxidación lipídica, como por ejemplo el

malondialdehído (MDA), producto altamente reactivo de la peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados y del metabolismo del ácido araquidónico.

El MDA se conjuga con múltiples grupos funcionales que incluyen proteínas, lipoproteínas y ADN produciendo importantes cambios estructurales. Al reaccionar con el ADN, forma deoxiadenina, deoxiguanosina y pirimidopurinas, importantes transformaciones oncogénicas del ADN. Las proteínas modificadas por el MDA muestran alteraciones físico-químicas y antigénicas.

Aunque el mecanismo de injuria por isquemia-reperfusion en el hígado no está totalmente dilucidado, se hipotetiza que las células de Kupffer serían las responsables de la activación de las diferentes vías que conllevan al daño. Las células de Kupffer, macrófagos hepáticos, tienen como función fundamental la fagocitosis de bacterias, endotoxinas, virus, complejos inmunes, la iniciación de una respuesta inmune no específica, la presentación de antígenos y la liberación de diferentes productos citotóxicos como el TNF, interleuquinas, ON, leucotrienos y proteasas <sup>(49,50)</sup>.

La activación de las células de Kupffer durante la IRH, se comprueba mediante un aumento de su capacidad de fagocitosis, de la secreción de sus productos tóxicos y a cambios ultraestructurales. Esta activación precipita la muerte de las células endoteliales con el consecuente trastorno de la microcirculación que conduce a inflamación, incremento del metabolismo aeróbico de los hepatocitos, aumento de la susceptibilidad de hepatocitos a la hipoxia, muerte celular y, consecuentemente, fallo del órgano <sup>(51,52)</sup>.

La principal sustancia relacionada con el daño celular es el TNF- $\alpha$ , potente activador de la respuesta inflamatoria, inductor de la producción del anión superóxido y de metabolitos tóxicos, generador de apoptosis de hepatocitos y células endoteliales, activador de la adherencia leucocitaria al endotelio, entre otras funciones.

El TNF- $\alpha$  puede inducir apoptosis mediante su unión a un receptor de superficie celular,



el TNF-R1, que traduce su señal mediante la activación de una familia única de proteasas llamadas caspasas. Las caspasas pertenecen a una familia de cisteína-proteinasas. Isoformas específicas están involucradas en la iniciación y ejecución de las diferentes etapas de la apoptosis. Entre estas isoformas, por ejemplo, la caspasa 8 se activa durante las fases iniciales de la apoptosis mientras que la caspasa 3 lo hace en las fases tardías. La supresión o inhibición de la actividad de las caspasas reduce o, incluso, previene la apoptosis en modelos de cultivos celulares <sup>(53-56)</sup>.

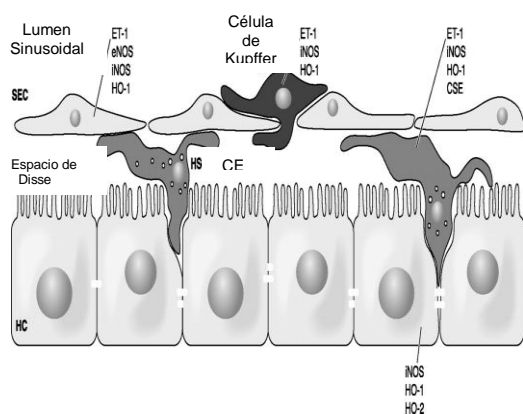


Fig. 5. Reguladores locales de la microcirculación sinusoidal hepática. El sinusoides está compuesto por células contráctiles no parenquimales como las células estrelladas (CE), células endoteliales (SEC), y de Kupffer, que constituyen fuente y blanco de la ET-1, ON sintetasa (NOS) y Hemoxigenasa (HO), entre otros.

Por otra parte, el TNF- $\alpha$  estimula las células endoteliales y de Kupffer para que expresen el Factor Tisular (FT), también llamado Tromboplastina o Factor III, proteína de membrana similar al receptor del factor VII/VIIa. El FT activa la cascada de la coagulación, mecanismo que altera la microcirculación a través de la formación de microtrombos.

Otra vía por la cual el TNF- $\alpha$  lleva a la alteración de la microcirculación es mediante la inducción de la liberación de endotelina-1 (ET-1) por parte del endotelio vascular así como mediante la generación local de la proteína de activación de neutrófilos epiteliales-78 (ENA-78) que juegan un rol fundamental en la quimiotaxis y activación de PMN (Fig. 5).

Se observa una correlación directa entre el grado de adherencia de PMN y el nivel de las transaminasas en el postoperatorio, lo que sugiere que los PMN contribuyen al daño parenquimatoso por IRH.

A pesar de las numerosas investigaciones sobre la participación de las células de

Kupffer, endoteliales y PMN en la injuria por IRH, poco se conoce sobre el rol de las células estrelladas hepáticas en este proceso de daño hepatocelular. Las células estrelladas, dispuestas bajo la línea de células endoteliales en los espacios de Disse, contienen proteínas contráctiles (actina y miosina) en el citoplasma que, mediante su contracción o relajación, regularan la microcirculación hepática. Se supone que la ET-1 actuaría produciendo contracción de las células estrelladas durante la IRH resultando en una disrupción de la microcirculación.

Durante el proceso de IRH se activa, así mismo, el sistema de complemento, que presumiblemente favorece la opsonización de las células dañadas mediante fagocitosis. Se comprueba un aumento de los niveles plasmáticos de los componentes del complemento en estado activado durante estudios experimentales de IRH en cerdos y humanos. Productos del sistema de complemento como las anafilatoxinas y el sistema de ataque a membranas (MAC) poseen efectos deletéreos en el hígado, contribuyendo a la activación de PMN, vasoconstricción y alteración de la microcirculación, aumento de la permeabilidad vascular y lisis celular. En ratas, la depleción experimental de los componentes del sistema de complemento previa a la isquemia ha demostrado atenuar la generación de superóxido a partir de las células de Kupffer y la acumulación de PMN en el parénquima hepático durante la reperusión, atenuando por lo tanto, la injuria. La inhibición de la cascada de complemento mediante la administración experimental del receptor de complemento tipo 1 (sCR1) inmediatamente posterior al inicio de la isquemia demostró reducir significativamente la deposición de C3 y la ocurrencia de necrosis hepatocitaria.

El principal activador de la vía clásica del complemento es la presencia de complejos antígeno-anticuerpo IgM o IgG, mientras que diferentes componentes bacterianos activan la vía alternativa. Las citoquinas, la presencia extracelular de proteínas

citoplasmáticas y de radicales libres constituyen, así mismo, activadores del sistema de complemento.

Los productos de activación del complemento C3a y C5a juegan un rol importante en la respuesta de proliferación y regeneración hepática actuando sobre la expresión de TNF- $\alpha$  e Il-6<sup>(57-74)</sup>, esta última, a su vez, inductora de la Il-17, mediador crítico de la quimiotaxis y migración de PMN.

La interleuquina-6 (Il-6) es una citoquina multifuncional reguladora del proceso inflamatorio. En el hígado, su liberación inducida por el TNF- $\alpha$ , induce una respuesta de fase aguda en caso de injuria parenquimatosa (ejemplo resecciones quirúrgicas, necrosis por hepatitis, etc.) que conlleva a un aumento de la regeneración tisular mediante efectos pro-mitogénicos y anti-apoptóticos. Este mecanismo estaría asociado a una inhibición de la activación mitocondrial y al aumento de la expresión de los factores anti-apoptóticos Bcl-2 y Bcl-xL.

En diferentes estudios se ha suministrado Il-6 en forma experimental como tratamiento frente a situaciones de “stress” hepático, observando una disminución en la liberación de caspasas y de proteínas mitocondriales y de consecuencia un efecto protector frente a la muerte celular programada. Sin embargo, una exposición prolongada a la IL-6 se asocia, no sólo a un aumento continuo de múltiples factores anti-apoptosis, sino que también, se asocia a la inducción de la proteína mitocondrial Bax que ejerce en contrapartida una función pro-apoptótica. La inducción de las proteínas Bax sensibiliza a los hepatocitos a la vía intrínseca de muerte celular inclinando el equilibrio entre señales pro- y anti-apoptosis hacia la desestabilización mitocondrial y la muerte celular mediante la activación de las caspasas-9. En casos de enfermedad hepática crónica y en estadios finales de sepsis se observa upregulation de las Bax hepáticas<sup>(75-85)</sup>.

Otra interleuquina reguladora del proceso inflamatorio constituye la Il-10, involucrada

en la supresión de la producción de citoquinas pro-inflamatorias y la inhibición de las células presentadoras de antígenos, jugando consecuentemente, un rol fundamental en la regulación de la respuesta a la injuria. La Il-21, producida por linfocitos CD4 activados y Natural Killers (NK) actúa a nivel del tejido linfoideo y no-linfoideo a través de su unión a receptores específicos expresados en linfocitos T, B y NK, favoreciendo el crecimiento y diferenciación de estas poblaciones celulares. En vivo, se comprobó que la deficiencia de Il-21 conlleva a un estado de hipogammaglobulinemia. La Il-21 actúa directamente sobre las células B para inducir la expresión de Bcl6 y regular la respuesta de los centros germinales. Aunque la Il-21 puede potencialmente aumentar las respuestas celular y humoral, posee, así mismo, funciones inhibitorias. La Il-21 resulta crítica en la regulación de la producción de inmunoglobulinas y en la diferenciación de células B a células plasmáticas, en la expansión de linfocitos CD8 y NK y, de esta manera, en el montaje de una respuesta antitumoral. Contrariamente, la Il-21 puede ejercer un efecto negativo sobre el tejido linfoide y mieloide que implica la apoptosis de linfocitos B y la inhibición y maduración de las células dendríticas.

El resultado final de la actividad de la Il-21 depende, presumiblemente, del contexto biológico <sup>(85-90)</sup>.

Existen otros sistemas endógenos de protección que contienen fundamentalmente enzimas como las catalasas, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, el complejo Q10 y vitaminas antioxidantes como el  $\alpha$ -tocoferol y el ácido ascórbico <sup>(91-96)</sup>. Resultados obtenidos en diferentes estudios indican que el preacondicionamiento térmico previo a la injuria (hipertermia corporal total) induce una importante expresión de la proteína de shock térmico (HSP) y de la hemoxygenasa-1 (HO-1) que protegen al hígado frente a la injuria. La proteína de shock térmico-70 (HSP-70), proteína de 70-kDa originalmente descrita como chaperona está íntimamente involucrada en el

transporte transmitocondrial de proteínas. Además de sus funciones como chaperona, la HSP-70 funciona como importante citoprotector frente al stress oxidativo y la apoptosis. Frente al stress celular, como el producido durante el proceso de isquemia-reperfusión, la concentración de calcio aumenta favoreciendo la fosforilación del factor de transcripción 1 (HSF1) mediante una proteinkinasa C, lo cual lleva a la transformación del HSF1 en trímeros. El trímero del HSF1 se trasloca al núcleo donde se une con el ADN e induce, de esta manera, la transcripción de la HSP-70 <sup>(96-103)</sup>.

Las posibles funciones de las HSPs incluyen reparación de proteínas dañadas, supresión de citoquinas pro-inflamatorias y reparación de los canales iónicos. Sin embargo, a pesar de los beneficios teóricos del preacondicionamiento térmico y la consecuente activación de la HSPs, su aplicación en la práctica clínica es muy limitada.

## *Manejo actual de la isquemia-reperusión hepática*

Con la finalidad de contrarrestar el daño por IRH diferentes estrategias han sido sugeridas, aunque no sistemáticamente aplicadas en la actividad clínica, probablemente, debido a la complejidad del mecanismo de injuria que incluye cambios metabólicos, inmunológicos y microvasculares y a las numerosas interacciones entre ellos, que condicionan la dificultad de individualizar un único “target” en el intrincado mecanismo (56-64).

Entre las numerosas estrategias que han sido utilizadas con el fin de disminuir la injuria por IRH se encuentran:

### *A - Estrategias Quirúrgicas*

#### *Preacondicionamiento isquémico*

Consiste en un breve período de isquemia seguido de un corto intervalo de reperusión previos al procedimiento quirúrgico en el cual ocurre el stress por IRH (por ejemplo mediante la maniobra de Pringle previa a la resección hepática) <sup>(41,104-114)</sup>. El principio biológico del preacondicionamiento se basa en la hipótesis de la activación de mecanismos de defensa protectores frente a una similar subsecuente injuria. Este fenómeno fue inicialmente propuesto por Murry en la isquemia miocárdica en 1986 <sup>(108)</sup>. Posteriormente los similares beneficios fueron demostrados en otros tejidos como músculo <sup>(109)</sup>, cerebro <sup>(110)</sup>, médula espinal <sup>(111)</sup>, riñón <sup>(112)</sup>, retina<sup>(113)</sup>, pulmón <sup>(114)</sup>, intestino <sup>(115)</sup> e hígado <sup>(116-119)</sup>. A pesar de que los beneficios del preacondicionamiento hepático fueron demostrados por diferentes estudios clínicos y por un gran estudio

randomizado, la comprensión de los mecanismos moleculares sigue siendo limitada <sup>(94)</sup>. Diferentes hipótesis han sido propuestas como base del preconditionamiento incluyendo la producción de adenosina, el aumento del ON <sup>(120)</sup> y proteínas de shock térmico <sup>(121)</sup> y el bloqueo del TNF- $\alpha$  <sup>(122,123)</sup>. Clavien et al. realizaron los primeros estudios de preconditionamiento hepático en humanos a través del clampeo del flujo portal durante períodos de 10 minutos. Los resultados fueron una mayor estabilidad hemodinámica intraoperatoria y una reducción significativa de los marcadores postoperatorios de daño hepatocitario <sup>(103)</sup>. Sin embargo, numerosos estudios no han sido capaces de demostrar beneficios clínicos, e incluso, un estudio señaló un aumento en el daño post-reperusión <sup>(124,125)</sup>.

### *Clampeo intermitente*

Consiste en la interrupción de largos períodos de isquemia con múltiples cortos intervalos de reperusión. Se asume que los mecanismos protectores serían similares a los del preconditionamiento, básicamente por inhibición de la apoptosis <sup>(126)</sup>. En un estudio randomizado, Belghiti et al. demostraron que períodos de 15 minutos de isquemia intercalados en forma repetitiva con intervalos de 5 minutos de reperusión aportaron un efecto hepatoprotector con similares resultados a los del preconditionamiento. En la práctica quirúrgica la elección de uno u otro sistema se basa en la duración total de isquemia necesaria <sup>(127,128)</sup>.

### *Sistema de Perfusión Extracorpóreo*

De potencial utilidad en el trasplante, las máquinas de perfusión extracorpórea han sido propuestas para preservar la calidad del órgano durante el tiempo de isquemia fría o para prolongar el mismo mediante un aporte continuo de glucosa, aminoácidos,

nucleótidos, oxígeno, etc. Diferentes estudios han demostrado que la perfusión de sangre tibia oxigenada permitiría conservar la función hepática por un período de isquemia de 24 horas, mientras que la simple conservación en solución de preservación por un período similar rendía al órgano inutilizable <sup>(129-133)</sup>.

### *Preacondicionamiento hipertérmico*

Diversos estudios indican que el hígado puede ser preacondicionado mediante su exposición temporánea o, incluso mediante la exposición corpórea total a hipertermia <sup>(134,135)</sup>. El beneficio aportado por la hipertermia se asocia a la inducción de las proteínas de stress intracelular, en particular HSP-70 y HO-1 <sup>(136,137)</sup>. Estudios experimentales han demostrado que estas proteínas aumentan frente a diferentes injurias que incluyen la isquemia. A pesar de que no es improbable practicar hipertermia corpórea en humanos, esta estrategia podría ser de mayor utilidad durante la fase ablativa del trasplante.

### *B - Estrategias farmacológicas*

Un gran número de agentes farmacológicos se demostraron útiles en conferir hepatoprotección frente a la injuria por isquemia-reperusión. Estas sustancias actúan inhibiendo el daño en forma directa, o bien, produciendo un preacondicionamiento farmacológico al causar bajos niveles de stress previos al gran insulto subsecuente. Una lista de algunas de los potenciales agentes son enunciados en la Tabla 1.

#### *Antioxidantes*

Debido al importante rol del stress oxidativo en el cuadro de isquemia-reperusión, un gran número de estudios (Tabla 1) ha intentado identificar métodos farmacológicos para



prevenir o neutralizar al stress oxidativo o, incluso, para favorecer la sobreexpresión de proteínas antioxidantes (Ej.: superóxido dismutasa <sup>(138-141)</sup>). Sin embargo, ninguna de estas estrategias encontró una total aplicación clínica, con excepción de algunas sustancias antioxidantes introducidas en las soluciones de reperfusion. Ejemplos de antioxidantes incluyen:

- *N-acetil cisteína (NAC)*: potente antioxidante “scavenger” de fácil absorción, es un derivado *N*-acetil del aminoácido L-cisteína. NAC es precursora del glutathion, conocido antioxidante intracelular que viene deplecionado durante la injuria por IRH. Además de sus propiedades antioxidantes, directas e indirectas, NAC parece ser beneficiosa para las funciones del citocromo P-450. Así mismo, al ser dador de grupos sulfidrilos, NAC prolonga la vida media y potencia el efecto del óxido nítrico (ON). Contribuye, así mismo, a la regeneración del factor de relajación derivado del endotelio, protegiendo consecuentemente, al hígado frente a las alteraciones de la microcirculación. En adición, NAC posee efectos antiinflamatorios que parecen ser el resultado de la inhibición de la transcripción de los receptores del sistema TRL, atenuando la producción de citoquinas inflamatorias y la quimiotaxis de PMN y plaquetas. Disminuye, además, los niveles circulantes de las moléculas de adherencia. Diferentes estudios han demostrado que desempeña efectos inotrópico positivo y vasodilatador y, consecuentemente, optimiza el consumo sistémico de oxígeno. Sin embargo, existen informes ambiguos en cuanto a su eficacia clínica para prevenir los daños por isquemia-reperfusion <sup>(141-143)</sup>.
- *α-Tocoferol*: constituye un scavenger liposoluble, de bajo peso molecular, que actúa como antioxidante introduciéndose en las membranas celulares, reduciendo las especies lipofílicas de los radicales libres a una forma menos tóxica. Su efectividad

en la reducción de la injuria por isquemia-reperfusion se ha demostrado en diferentes modelos experimentales de isquemia-reperfusion <sup>(144-148)</sup>.

- *Allopurinol*: durante la isquemia, fosfatos de alta energía son catabolizados generando productos como el AMP, inosina, hipoxantina, xantina y adenosina, que se acumulan en la célula isquémica. Las alteraciones en el transporte del calcio activan una proteasa citosólica que transforma a la xantina deshidrogenasa en xantina oxidasa. La hipoxantina, acumulada durante la isquemia, reacciona con el oxígeno molecular que aumenta luego de la reperfusion generando un aumento en la producción de radicales libres. El allopurinol, un inhibidor de la xantina oxidasa, podría limitar la producción de radicales libres de esta fuente, y por lo tanto, proteger frente a este componente de la injuria. El efecto beneficioso parece ser parcial ya que la xantina oxidasa no es la única fuente creadora de radicales libres que, a su vez, no son el único factor relacionado con el daño por reperfusion <sup>(149-151)</sup>.

### *Agonistas de la Adenosina y Oxido Nítrico*

Desde hace varias décadas, en varios modelos animales de preconditionamiento miocárdico, se observó que la acumulación de adenosina resulta protectora frente a la injuria por isquemia-reperfusion <sup>(152-154)</sup>. Diferentes estudios experimentales identificaron mecanismos similares de protección en la IRH que se basarían en la inducción de la enzima ON sintetiza que produciría un aumento de la producción de ON con el consecuente beneficio hepatocitario <sup>(154)</sup>. Este fenómeno ofrece diferentes posibilidades farmacológicas que incluyen el uso de agonistas de los receptores de adenosina (A<sub>2</sub>) y agonistas o precursores del ON (donantes de ON) que conferirían protección frente al daño por isquemia tanto tibia como fría. Alternativamente, la

administración de donantes de ON como la L-arginina protegería, exclusivamente, frente a la isquemia tibia <sup>(155-159)</sup>.

### *Superóxido dismutasa (SOD)*

Es una metaloproteína con reconocido efecto scavenger. Convierte al anión superóxido a peróxido de hidrógeno que posteriormente se transforma en agua y oxígeno mediante la catalasa. La utilización de la SOD, en forma aislada o conjuntamente a la catalasa, produciría una reducción de la adherencia de leucocitos al endotelio y a una disminución de la inactivación del ON. Sin embargo los resultados en su utilización son contradictorios <sup>(160-162)</sup>.

### *Favorecedores de la Microcirculación*

La alteración en la microcirculación hepática y en la interacción leucocitos-endotelio representan, en parte, mecanismos responsables de la injuria por IRH.

Ejemplos de agentes que favorecen la microcirculación y oxigenación tisular son:

- *Pentoxifilina*: constituye un derivado de las metilxantinas que ha sido utilizado durante varios años para el tratamiento de las vasculopatías periféricas. El mecanismo de acción aceptado es la inhibición del aumento de la fosfodiesterasa del monofosfato cíclico de adenosina, conllevando a un aumento intracelular de sus niveles. Una observación importante es que la pentoxifilina reduce la síntesis de TNF- $\alpha$  en diferentes órganos. Por otra parte, la pentoxifilina produce aumento de la flexibilidad de la membrana eritrocitaria, reducción de la viscosidad sanguínea e inhibición de la agregación plaquetaria, factores que mejorarían los disturbios de la oxigenación y microcirculación. Estos efectos protectores fueron observados tanto en la isquemia fría como tibia. <sup>(163-167)</sup>.

- *Antitrombina III (AT III) y aprotinina*: estas proteasas reducirían el reclutamiento de leucocitos en la microvasculatura. La AT III es un anticoagulante que inhibe la actividad de proteasas séricas como la trombina en la cascada de la coagulación. Estudios experimentales certifican que la AT III estimula la producción de prostaciclina por parte de las células endoteliales, potente vasodilatador e inhibidor de la agregación plaquetaria. La administración de AT III reduciría, así mismo, la interacción leucocitos-endotelio y prevendría frente a las alteraciones de la microcirculación <sup>(168-169)</sup>.
- *Heparina*: aunque las vías exactas por las cuales la heparina confiere protección frente a la injuria por IRH no son del todo comprendidas, varios podrían ser los mecanismos responsables. Por un lado su carga fuertemente negativa mantiene dispersos a los eritrocitos y tal vez a otras células sanguíneas y reduce la viscosidad de la sangre favoreciendo una adecuada microcirculación. Por otra parte, la heparina administrada en forma prolongada ha demostrado ser eficiente en reducir la presión arterial debido a una importante caída de la resistencia periférica. Este fenómeno puede parcialmente ser explicado debido a la inhibición, por parte de la heparina, de la producción de endotelina-1 (ET-1) por el endotelio vascular (Fig. 4). ET-1, potente vasoconstrictor, aumenta en pacientes con infarto de miocardio, isquemia hepática, insuficiencia renal aguda o hipertensión severa. Se comprobó que la ET-1 produce un aumento importante de la presión de la vena porta, acompañado por un aumento de la glicogenolisis y alteraciones en el consumo hepático de oxígeno, por lo que su inhibición podría ser beneficiosa frente al daño por isquemia-reperusión <sup>(170-174)</sup>.
- *Prostaglandinas*: liberadas principalmente por las células de Kupffer activadas durante la fase de reperusión, mostrarían un efecto beneficioso frente a la IRH al

producir un incremento de la perfusión hepática, inhibición de la agregación plaquetaria e, incluso, directa citoprotección por reducción de la liberación de proteasas y radicales libres por parte de leucocitos activados. Diferentes estudios han demostrado que el tratamiento del hígado a trasplantar con albúmina y prostaglandinas mejoraría la función del injerto. Sin embargo, el uso de prostaglandinas en dosis farmacológicas se ve obstaculizado por la frecuente ocurrencia de efectos adversos. En estudios experimentales análogos sintéticos de las prostaglandinas como el misoprostol se asociaron a menor incidencia de efectos adversos y a un mayor tiempo de vida media <sup>(175-178)</sup>.

### *Inhibidores de las Proteasas y Moléculas Antiapoptosis*

La activación de PMN ha sido ampliamente considerada un mecanismo importante en la IRH. Moléculas de adhesión al endotelio favorecen la adherencia y migración de PMN a través de la pared vascular, fenómenos potenciados por las proteasas secretadas por parte de los mismos PMN.

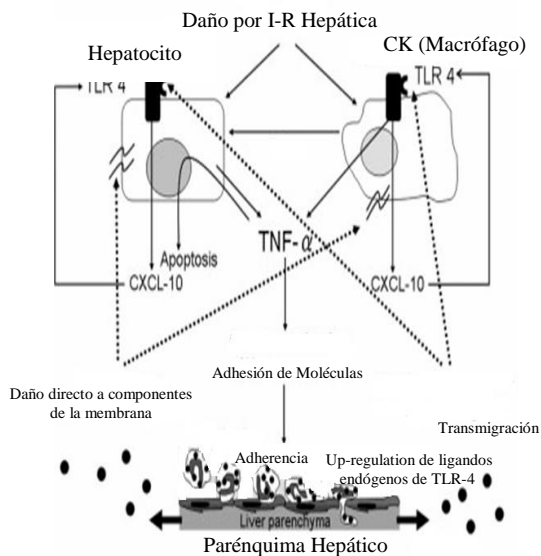


Fig. 6. Interacciones entre la proteasas de PMN y la respuesta inflamatoria local. Las células de Kupffer (CK) y hepatocitos producen TNF- $\alpha$  que conlleva a expresión de moléculas de adhesión en el endotelio vascular y a la consecuente migración de PMN desde el lumen vascular al parénquima hepático. La liberación de proteasas por parte de PMN acelera los daños por IRH mediante la injuria de los componentes de las membranas. Las proteasas sirven, incluso, como ligando endógenos del TLR4, causando su up-regulation en las células de Kupffer y hepatocitos. (XCL, ligando quimiocinas)

Estas proteasas desempeñan un rol fundamental en la migración leucocitaria gracias a la ruptura de las uniones intercelulares del epitelio endotelial y la degradación de los componentes de su

membrana basal <sup>(43,45,179-184)</sup>. Como resultado se produce degradación de elastina, colágeno, laminina y otros componentes de la matriz extracelular del endotelio que conduce al daño <sup>(180)</sup>.

Estos fenómenos sugieren que la inhibición de las proteasas conduciría a un efecto protector frente a la IRH (Fig. 6).

Las proteinasas caspasas, como anteriormente mencionado, se activan durante el proceso de apoptosis, favoreciendo sus diferentes fases. El tratamiento de animales de laboratorio sometidos a IRH con inhibidores de las caspasas demostró ser protector frente al daño. El peligro potencial de este tratamiento sería la inhibición de la apoptosis en tejidos no sometidos a isquemia y su interferencia con el recambio celular fisiológico o la remoción de células tumorales <sup>(185-186)</sup>.

### *Soluciones de preservación*

La actividad metabólica del hígado puede reducirse mediante su conservación a bajas temperaturas (1-4°C). Esta estrategia permite prolongar el tiempo de preservación del órgano a aproximadamente 8 horas, mientras que a temperatura ambiente sería solamente de un hora. El enfriamiento requiere la utilización de líquidos de perfusión/preservación. Un hito fundamental en este tema fueron los estudios de Belzer y Southard durante la década del 80. Estos investigadores idearon una solución basada en los hipotéticos efectos negativos de la hipotermia. Estos efectos negativos incluyen: edema celular causado por la inhibición de la bomba Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>, la acidosis intracelular causada por el metabolismo anaeróbico y la acumulación de lactato, alteraciones en el homeostasis del calcio y la generación de radicales libres. Belzer y Southard formularon, de este modo, la solución de Wisconsin (UW) con elementos que contrarrestan los fenómenos mencionados. A pesar de que la solución UW representa

uno de los progresos más significativos en la historia del trasplante que permitió extender a casi 24 horas el tiempo de preservación (en comparación con las 8 horas de la solución de Euro-Collins), los mecanismos involucrados continúan sin ser comprendidos en su totalidad. Se sabe que la solución UW previene fundamentalmente contra la injuria de las SEC.

Nuevas estrategias para intentar mejorar la eficacia de las soluciones actualmente utilizadas mediante el agregado de diferentes agentes farmacológicos deberían ser de prioridad en el campo de la investigación trasplantológica <sup>(41,187,188)</sup>.

### *C - Estrategias Génicas*

Recientes avances en la manipulación del genoma brindan nuevas herramientas para suprimir o reducir la injuria hepática resultante de la isquemia-reperusión. La utilización de adenovirus recombinante modificado podría ser eficaz para actuar sobre el hígado sin afectar otros órganos. Con respecto al trasplante, el pretratamiento de los donantes con los mencionados vectores podría ser beneficioso. Sin embargo, el trasplante de hígado resulta ser un procedimiento urgente que no permite la realización de complejas maniobras previas. En el caso del trasplante con donante vivo, podría ser de utilidad limitada debido a factores éticos <sup>(189-191)</sup>.

En conclusión, de las diversas estrategias farmacológicas enunciadas, solamente un número limitado resultan de aplicación clínica, siendo las estrategias quirúrgicas las de mayor utilización. La terapia génica, al menos en la actualidad, se encuentra lejana de poder ser una realidad en la práctica diaria.

Tabla 1: Agentes farmacológicos reportados protectores frente a la injuria por IRH.

| <b><i>Droga</i></b>                               | <b><i>Injuria</i></b> | <b><i>Sistema Efecto</i></b>  | <b><i>Especie</i></b> | <b><i>Ref.</i></b> |
|---|-----------------------|---|-----------------------|--------------------|
| <b><i>Stress Oxidativo</i></b>                    |                       |   |                       |                    |
| Albúmina  | Fría                  | Antioxidante  | Rata                  | 192                |
| Allopurinol                                       | Fría y Tibia          | Stress oxidativo, scavenger   | Rata                  | 193                |
| Peptido Natriurótico Atrial                       | Fría y Tibia          | Stress oxidativo, receptor GMP                                      | Rata                  | 193-196            |
| Bucilamina  | Fría                  | Antioxidante  | Rata                  | 194                |
| Ciclosporina + Ibuprofeno                         | Tibia                 | Peroxidación lipídica, stress oxidativo                             | Rata                  | 197                |
| Ebselen   | Tibia                 | Peroxidación lipídica, stress oxidativo?                            | Rata                  | 198                |
| FK-506  | Tibia                 | Radicales libres, supresor de citoquinas                            | Rata                  | 199                |
| $\gamma$ -glutamilcisteína                        | Tibia                 | Stress oxidativo  | Rata                  | 200                |
| Extracto de té verde                              | Tibia                 | Scavenger de radicales libres                                       | Rata                  | 201                |
| Melatonina  | Tibia                 | Stress oxidativo  | Rata                  | 202                |
| Nicaraven   | Tibia                 | Stress oxidativo  | Rata                  | 203                |
| PGI <sub>2</sub> , superóxido dismutasa, catalasa | Tibia                 | Stress oxidativo  | Rata                  | 204                |
| $\alpha$ -tocoferol                               | Fría y Tibia          | Peroxidación lipídica   | Rata                  | 29,205,206         |
| Trimetazidina                                     | Tibia                 | Scavenger de radicales libres                                       | Rata                  | 207                |
| <b><i>Depleción de energía mitocondrial</i></b>   |                       |   |                       |                    |
| Niacinamida                                       | Tibia                 | Trifosfato de adenosina   | Rata                  | 208                |
| Ozono   | Tibia                 | Trifosfato de adenosina   | Rata                  | 209                |
| <b><i>Microcirculación</i></b>                    |                       |   |                       |                    |
| 2-aminoetil-isotiurea                             | Tibia                 | Inducción de óxido nítrico sintetasa                                | Rata                  | 210                |
| Furosemida + bumetanide                           | Tibia                 | Bomba Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> -2Cl <sup>-</sup> antagonista | Rata                  | 211                |
| Misoprostol                                       | Tibia                 | Sistema microvascular   | Rata                  | 212                |
| Verapamilo  | Tibia                 | Bloqueante canales de calcio  | Rata                  | 213                |



*Estudio Experimental de la Isquemia-Reperusión Hepática  
del Pozo A.C.*

|  |              |                                       |               |          |
|--|--------------|---------------------------------------|---------------|----------|
| <b><i>Inhibidores de Proteasas/Antiapoptóticos</i></b> |              |                                       |               |          |
| Cbz-Leu-Leu-Tyr-CHN2                                   | Tibia        | Inhibidor de caspasa                  | Rata          | 214, 215 |
| Mesilato de Gabexato                                   | Tibia        | Inhibidor de proteasas                | Rata, Humanos | 216, 217 |
| ONO-5046   | Tibia        | Elastasa de granulocitos              | Rata          | 218, 219 |
| Inhibidor de proteasas leucocitarias                   | Tibia        | Proteasas leucocitarias               | Ratón         | 220      |
| Inhibidor de tripsina urinaria                         | Tibia        | Mieloperoxidasa, proteasas de PMN     | Rata          | 221      |
| ZVAD-fmk   | Tibia        | Inhibidores de caspasa                | Rata          | 222      |
| <b><i>Adherencia leucocitaria/inflamación</i></b>      |              |                                       |               |          |
| Inhibidor de Cox-2                                     | Tibia        | Antiinflamatorio                      | Rata          | 223      |
| Tacrolimus   | Tibia        | Inhibidor infiltración neutrofílica   | Rata          | 224      |
| Ciclosporina   | Tibia        | Nucleótidos, función mitocondrial     | Cerdo         | 225      |
| Il-6   | Tibia        | Antiinflamatorio                      | Ratón         | 226      |
| Il-10  | Fría         | Atenuación de citoquinas              | Ratón         | 227      |
| Lipopolisacáridos                                      | Tibia        | Preacondicionamiento inflamatorio     | Rata,Ratón    | 228      |
| Prostaglandina F1                                      | Tibia        | Adherencia leucocitaria               | Rata          | 229      |
| Ranitidina   | Tibia        | Antagonista H(2), activación PMN      | Rata          | 230      |
| Factor de crecimiento hepatocitario                    | Tibia        | Inhibidor de infiltración neutrófilos | Rata          | 231      |
| Ligando de P-selectina                                 | Fría y Tibia | Bloqueante de P-selectina             | Rata          | 232, 233 |

## *Lidocaína*



Erythroxylon coca

## *Historia*

A fines del siglo XIX se descubrió de manera casual que la cocaína, sustancia que abunda en las hojas de la coca (*Erythroxylon coca*), tenía propiedades anestésicas. Durante siglos los nativos de los Andes habían mascado un extracto alcalino de estas hojas por sus acciones estimulantes y eufóricas.

La cocaína, primer anestésico local, fue aislada por Andean Niemann en 1860, que al igual que muchos químicos de la época, saboreó su compuesto recién aislado y observó que producía adormecimiento de la lengua. Sigmund Freud estudió sus acciones fisiológicas y Carl Koller la introdujo en el ejercicio clínico en 1884 como anestésico tópico para operaciones oftalmológicas. Poco después, Halstead popularizó su uso para la anestesia por infiltración y bloqueo de la conducción nerviosa. Los muchos anestésicos locales que se emplean en el ejercicio clínico actual se originan de estas primeras observaciones.

La cocaína es un éster del ácido benzoico y del alcohol complejo 2-carbometoxi, 3-hidroxi-tropano. A causa de su toxicidad y propiedades adictivas, en 1892 se inició una búsqueda de sustitutivos sintéticos con las investigaciones de Einhorn y colaboradores. En 1905 este esfuerzo culminó en la síntesis de la procaína, que se convirtió en el prototipo de los anestésicos locales durante más de medio siglo, siendo la procaína, lidocaína, bupivacaína y tetracaína los agentes más utilizados en la actualidad.

La lidocaína, sintetizada por Löfgren en 1943 es actualmente el más utilizado de los anestésicos locales, de hecho, constituye el miembro prototipo del grupo de las aminoetilamidas <sup>(234-239)</sup>.

## Propiedades químicas y relaciones entre estructura y actividad

La estructura de los anestésicos locales típicos contiene dominios hidrófilos e hidrófobos que están separados por un éster intermedio o un enlace amídico. Gran variedad de compuestos que contienen estos aspectos estructurales mínimos satisfacen los requisitos para funcionar como anestésicos locales. La optimización de su efecto presupone un delicado equilibrio entre las fuerzas lipofílicas e hidrofílicas de tales grupos.

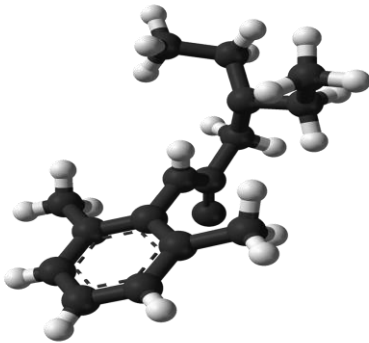
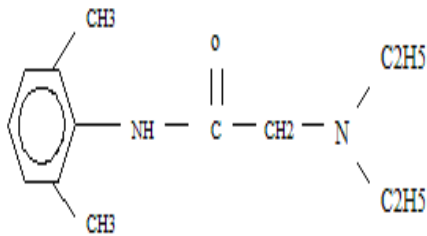


Fig.7. Fórmula química y tridimensional de la lidocaína

El grupo hidrófilo suele ser una amina secundaria o una amina terciaria, el grupo hidrófobo suele ser una mitad aromática. La naturaleza del grupo de enlace determina alguna de las propiedades de estos agentes (Fig. 7).

Los anestésicos locales, bases débiles, son solubles en lípidos y relativamente insolubles en agua. Para permitir su inyección, son preparados en forma de solución ácida de una sal hidrociorada.

En esta combinación, el grupo amina, se hace cuaternaria, aumentando la hidrosolubilidad de la droga permitiendo, de esta manera, su inyección.

Luego de su administración, los buffers tisulares incrementan el Ph de la solución, por lo que parte de la droga liposoluble es liberada pudiendo difundir a través de las membranas celulares lipídica hacia el citoplasma donde se ioniza nuevamente. Una vez ionizada, entra en los canales de sodio.

Simplificando la interacción, podría pensarse que la Lidocaína obstruye el poro por el cual entra sodio a la célula, lo que en realidad ocurre es una interacción de la molécula de Lidocaína con parte del canal interfiriendo en la apertura de sus compuertas.

La cualidad hidrófoba incrementa la potencia, la duración de acción y la toxicidad de los anestésicos locales. La asociación del fármaco en sitios hidrófobos (canales de sodio) favorece la distribución del mismo hacia sus sitios de acción y disminuye su tasa de metabolismo por esterasas y enzimas hepáticas.

El tamaño molecular influye en la tasa de disociación de los anestésicos locales desde sus sitios receptores. Las moléculas más pequeñas del fármaco pueden escapar del sitio receptor con mayor rapidez. Esta característica es importante en los tejidos con activación rápida, en los cuales el anestésico local se fija durante los potenciales de acción y se disocia durante los períodos de repolarización de la membrana <sup>(240)</sup>.

## *Farmacodinámica*

### *Mecanismos de acción y funciones*

#### *Mecanismo de acción*

El mecanismo de acción primario de los anestésicos locales consiste en el bloqueo de los canales de sodio voltaje dependientes. La membrana axonal, la membrana de las células miocárdicas así como la membrana de los cuerpos celulares neuronales se caracterizan por un potencial transmembrana comprendido entre -90 y -60 mV. Durante la fase de excitación los canales de sodio se abren permitiendo una corriente rápida de ingreso que despolariza la membrana a valores del potencial de equilibrio para el sodio (+40 mV); luego de la despolarización los canales de sodio se cierran y se abren los canales de potasio favoreciendo la salida de este electrolito al espacio extracelular. La salida de potasio conlleva la repolarización de la membrana a valores del potencial de equilibrio para tal ion (-95 mV) y la restitución del estado basal para los canales de sodio. El gradiente de iones transmembrana es mantenido por la bomba de sodio. Los anestésicos locales se unen a la extremidad intracelular de estos canales de sodio bloqueándolos en manera tiempo- y voltaje-dependiente <sup>(241,242)</sup>.

#### *Características estructura-actividad de los anestésicos locales*

La interacción de los anestésicos locales con los canales de sodio es tanto más veloz cuanto más pequeña es la molécula y la potencia es directamente proporcional a la liposolubilidad.

### *Acción sobre troncos nerviosos*

La acción de los anestésicos locales no se limita exclusivamente a la parálisis sensitiva, ya que poseen, así mismo, la capacidad de bloquear otros tipos de nervios. La parálisis motora, por ejemplo, puede dificultar la actividad respiratoria, mientras que el bloqueo simpático puede determinar hipotensión arterial. Cada tipo de fibra nerviosa posee una sensibilidad al bloqueo diferente según su grado de mielinización. Los anestésicos locales actúan particularmente sobre fibras de pequeño calibre en las cuales la propagación pasiva del impulso eléctrico es más breve, resultando ser las primeras en ser bloqueadas. Otro importante motivo que explica la mayor capacidad de bloqueo de las fibras sensitivas por parte de los anestésicos locales reside en el peculiar mecanismo de acción de los mismos en relación a las características electrofisiológicas de las fibras en cuestión. El bloqueo anestésico resulta, de hecho, más pronunciado a frecuencias y períodos de despolarización más elevado.

### *Efecto sobre otras membranas excitables*

Los anestésicos locales presentan una débil capacidad de bloqueo neuromuscular de escasa relevancia clínica. En cambio, resulta de gran importancia la acción de los mismos sobre las células miocárdicas y su función como antiarrítmicos.

### *Efectos cardíacos*

La Lidocaína es uno de los fármacos antiarrítmicos más comúnmente utilizado por vía endovenosa. Presenta baja toxicidad y un alto grado de eficacia en las arritmias asociadas a infarto agudo de miocardio. La Lidocaína es un potente supresor de la actividad cardíaca anormal al actuar sobre los canales de sodio en estado tanto activo como inactivo. De esta manera, reduce la duración del potencial de acción, prolongando

la diástole y el período necesario de recuperación. Los canales de sodio despolarizados (inactivos) permanecen en gran parte bloqueados durante la diástole. La Lidocaína suprime la actividad eléctrica del tejido despolarizado generador de la actividad arrítmica, mientras actúa mínimamente sobre el tejido normal. Este hecho parece ser el motivo por el cual la Lidocaína es muy efectiva en el tratamiento de arritmias asociadas a problemas de despolarización (isquemia, intoxicación digitálica), mientras es relativamente ineficaz en el tratamiento de arritmias originadas en el tejido normalmente polarizado (flutter y fibrilación auricular) <sup>(241,242)</sup>.



## *Otras acciones*

- Efecto antimicrobiano. En décadas pasadas se han publicado numerosos estudios que han descrito un efecto suplementario antimicrobiano de los anestésicos locales a concentraciones clínicas, fundamentalmente de la bupivacaína y la lidocaína. Estos han mostrado potente actividad bacteriostática, fungostática y fungicida contra un amplio espectro de microorganismos <sup>(243-245)</sup>.
- Efecto antiinflamatorio. Numerosos reportes sugieren la actividad antiinflamatoria de los anestésicos locales a través de su efecto sobre las células del sistema inmunitario, microorganismos, trombocitos y eritrocitos, entre otras. El potente efecto antiinflamatorio de los anestésicos locales sería superior, incluso, al de los tradicionales agentes antiinflamatorios como los esteroideos y no esteroideos. Este hecho, junto con la baja incidencia de efectos adversos, son en parte los motivos por los cuales diferentes grupos de trabajo los introduce en el tratamiento de condiciones mediadas por inflamación como en extensas quemaduras, proctitis ulcerativa, artritis, infecciones por herpes simple, peritonitis en modelos experimentales, etc. <sup>(239-248)</sup>. Los mecanismos intrincados por los cuales la Lidocaína posee este efecto antiinflamatorio no son aún totalmente dilucidados, aunque se supone que su interacción reversible con proteínas y lípidos de membrana y la consecuente regulación del metabolismo celular, de la migración, exocitosis y fagocitosis sería la clave a la respuesta. Se ha demostrado que los anestésicos locales inhiben la migración leucocitaria mediada por TNF- $\alpha$  y la expresión de moléculas de adherencia en los sitios de inflamación. Así mismo, los anestésicos locales inhiben la liberación de histamina, leucotrieno B4 e Il-1 por parte de las células proinflamatorias. Estos mediadores son componentes significativos de la cascada

inflamatoria. La migración y adherencia de las células inflamatorias, como la de los PMN, se ve, así mismo, inhibida <sup>(249-266)</sup>.

- Efecto sobre factores de coagulación y fibrinólisis. Se ha demostrado que la anestesia epidural reduce la incidencia de fenómenos trombóticos en el período postoperatorio <sup>(267)</sup> y las pérdidas hemáticas intraoperatorias. Estos efectos pueden ser atribuidos a la combinación de cambios fisiológicos inducidos por la anestesia neuroaxial y a factores farmacológicos de los mismos anestésicos locales. Con la anestesia epidural se ha observado una menor liberación del factor VIII y del factor de von Willebrand, un incremento de la actividad fibrinolítica debida a la reducción postoperatoria de la proteína inhibidora del activador del plasminógeno, una mayor concentración de activadores del plasminógeno y una mayor producción de activadores del plasminógeno por parte del endotelio venoso. Así mismo, la antitrombina III, principal inhibidor de la actividad trombínica que progresivamente disminuye su concentración durante el postoperatorio temprano, se restituye más rápidamente a concentraciones preoperatorias en pacientes que reciben anestesia epidural <sup>(268)</sup>.
- Agregación plaquetaria. Numerosos estudios publicados en los años 80 han establecido el efecto inhibitor de los anestésicos locales sobre la agregación plaquetaria, uno de los pasos fundamentales en el intrincado proceso de hemostasia. Se comprobó, así mismo que los anestésicos locales inhiben las señales del tromboxano A-2 (TXA<sub>2</sub>), la despolarización, los cambios en la microviscosidad de la membrana plasmática así como el aumento en la recaptación del sodio, todos factores estimulantes de la temprana agregación plaquetaria <sup>(269-272)</sup>.
- Microcirculación. Se demostró que luego de la aplicación tópica de lidocaína, la formación de trombos se vio netamente inhibida y la microcirculación sanguínea se

vio restituida en caso de daño endotelial. La reducción de la adherencia se observó tanto entre las misma células sanguíneas entre sí como entre los clusters celulares y el endotelio vascular. Diferentes investigaciones sugieren un efecto sistémico de los anestésicos locales sobre la prostaglandina E<sub>2</sub>, el TXA<sub>2</sub>, receptores del ácido lisofosfatídico y otros receptores asociados a proteínas-G que son de significativa importancia en la regulación del flujo microcirculatorio <sup>(273-275)</sup>.

## *Efecto protector frente a la isquemia-reperfusion*

El efecto protector de la Lidocaína frente a la isquemia-reperfusion sería el resultado de las múltiples funciones descritas previamente y ejercitadas por esta droga en múltiples estadios y mecanismos del proceso:

- **Inflamación:** la Lidocaína disminuye las concentraciones de IL-1, IL-6 e IL-8 y la expresión de ICAM-1 en presencia de TNF- $\alpha$ . Este efecto sería ejercido sobre diferentes poblaciones celulares como monocitos, macrófagos y neutrófilos. La inhibición de la secreción de citoquinas proinflamatorias, la quimiotaxis de neutrófilos y la expresión de moléculas de adherencia por parte del endotelio, modularía consecuentemente la respuesta inflamatoria <sup>(248-269)</sup>.
- **Bloqueo de los canales de sodio y reducción del calcio intracelular:** la Lidocaína favorece la conservación del trifosfato de adenosina (ATP) mediante una reducción de la actividad de la bomba sodio-potasio ATPasa debido a la reducción en la concentración del sodio intracelular resultante del bloqueo de sus canales. Este bloqueo se relaciona con una paralela disminución del calcio intracelular por reducción en la actividad de la bomba de intercambio sodio-calcio que normalmente permite el ingreso de calcio al citoplasma a expensas de la salida de sodio. Durante el proceso de IRH aumentan en forma marcada las concentraciones intracitoplasmáticas de sodio y calcio, por lo que la Lidocaína podría reducir esta sobrecarga <sup>(276-280)</sup>.
- **Propiedad antioxidante y estabilizador de membranas:** la Lidocaína constituye un scavenger de radicales hidroxilo e inhibe la peroxidación de lípidos dependiente de NADPH <sup>(281,282)</sup> observada durante el proceso de isquemia-reperfusion.

- Prevención de la apoptosis: podría ser el resultado de diferentes mecanismos enunciados como la de estabilizadora de membrana y antioxidante <sup>(283-285)</sup>.

## *Farmacocinética*

### *Absorción*

La absorción sistémica del anestésico local a partir del sitio de administración depende de algunos factores como la dosis, la sede de inyección, la unión fármaco-tejido, la presencia de sustancias vasoconstrictoras y las propiedades fisicoquímicas de la molécula. La inyección de los anestésicos locales en áreas ricamente vascularizadas comporta una absorción más rápida.

### *Distribución*

La Lidocaína es en su mayor parte metabolizada por el hígado en un primer pasaje, por lo cual solamente el 3% del fármaco suministrado por vía oral pasa al plasma, motivo por el cual, se administra por vía parenteral. Los anestésicos locales resultan distribuidos difusamente luego de la administración endovenosa en bolo. Existe evidencia de la acumulación en el tejido adiposo. Luego de una veloz fase de distribución inicial en encéfalo, hígado, riñón y corazón tiene lugar una segunda fase de distribución más lenta, por parte de tejidos más discretamente vascularizados como el músculo esquelético y el intestino.

### *Metabolismo de excreción*

La Lidocaína posee una vida media de 2 horas, es transformada en el hígado y en el plasma en metabolitos hidrosolubles y excretados por vía urinaria. La excreción urinaria ocurre en forma neutra y mínima ya que los anestésicos locales en forma no ionizada difunden a los lípidos con facilidad. La acidificación de la orina produce ionización de

las bases terciarias con el consecuente aumento de la hidrosolubilidad, impidiendo su reabsorción por parte de los túbulos renales y, consecuentemente, aumentando la eliminación renal. La unión amida de los anestésicos locales es hidrolizada por el sistema microsomal hepático del citocromo P450, por lo que su toxicidad aumenta en pacientes con insuficiencia hepática.

En resumen los parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos de la Lidocaína son:

- Disponibilidad por vía oral: 35%
- Excreción urinaria: 2%
- Unión a proteínas plasmáticas: 70%
- Clearance 38,4 L/ora/70 kg.
- Tiempo de vida media: 2 horas
- Concentración eficaz: 1,5-6 mg/L
- Concentración tóxica: >6 mg/L

## *Efectos adversos*

### *Toxicidad*

Los anestésicos locales interfieren con la función de todos los órganos en los que ocurre conducción o transmisión de impulsos. Por tanto, tiene efectos importantes en el sistema nervioso central, ganglios autonómicos, unión neuromuscular y todas las formas de músculo. La probabilidad de observar reacciones adversas es proporcional a la concentración del anestésico local en sangre.

#### *Toxicidad cardíaca*

Entre los fármacos comúnmente utilizados en el tratamiento de las arritmias cardíacas, la Lidocaína es aquella que presenta el menor grado de toxicidad. Los efectos adversos cardiovasculares son en parte la resultante de acciones directas sobre el músculo liso y cardíaco y acciones indirectas a nivel de los nervios vegetativos. Empeora las arritmias ventriculares en menos del 10% de los pacientes, en aproximadamente el 1% de los pacientes con infarto agudo de miocardio puede agravar el bloqueo del nodo senoauricular o dificultar una conducción ya alterada. A dosis elevadas, sobre todo en pacientes con insuficiencia cardíaca preexistente, la Lidocaína puede provocar hipotensión debido a depresión de la contractilidad del miocárdico.

#### *Toxicidad neurológica*

El efecto colateral más frecuente de la Lidocaína son los neurológicos, que pueden manifestarse como parestesias, temblores, náusea, perturbaciones del oído, del lenguaje y convulsiones. Las convulsiones pueden presentarse fundamentalmente en pacientes ancianos o vulnerables o cuando un bolo del fármaco viene suministrado en forma



excesivamente rápida. Estos efectos adversos son, en general, dosis dependientes, de corta duración y responden a la administración endovenosa de diazepam<sup>(240-242)</sup>.

### *Hipersensibilidad*

Son infrecuentes los casos de reacciones de hipersensibilidad que pueden manifestarse como dermatitis alérgica o ataque asmático. Parece ocurrir sensibilidad casi exclusivamente con los anestésicos locales del tipo estérico, mientras que los compuestos amidas están prácticamente libres de este problema.

### *Toxicidad de la unión neuromuscular y sinapsis ganglionar*

Los anestésicos locales afectan la transmisión en la unión neuromuscular al igual que a nivel de los ganglios autonómicos como consecuencia del bloqueo de los canales de iones de los receptores de acetilcolina.

### *Toxicidad en el músculo liso*

Los anestésicos locales deprimen las contracciones en el intestino intacto y en tiras de intestino aislado. Relajan, de igual modo, al músculo liso vascular y bronquial, aunque a concentraciones bajas pueden producir inicialmente espasmo de los mismos. Las anestésias raquídea y epidural, lo mismo que la inyección intraperitoneal, pueden producir parálisis del sistema nervioso simpático.

## *Fundamentos de la elección del tema*

## *Objetivo General*

Disminuir los efectos deletéreos de la isquemia-reperfusion experimental en el hígado de rata.

## *Objetivos Específicos*

- 1) Conocer el efecto de la isquemia-reperfusion sobre la concentración de diferentes marcadores de injuria hepática.
- 2) Establecer el efecto de la isquemia-reperfusion sobre las diferentes poblaciones celulares del hígado de rata.
- 3) Investigar el efecto de la Lidocaína administrándola a los animales en estudio, evaluar si su efecto protector frente a la isquemia-reperfusion planteado por diferentes equipos de trabajo a nivel miocárdico y cerebral, se cumple en el hígado de rata.

## *Material y Métodos*

Los procedimientos quirúrgicos fueron realizados en el Laboratorio de Trasplante de Órganos de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de La Plata, luego de haber realizado la Pasantía en Microcirugía Experimental.

## *Animales*

Se utilizaron 72 ratas adultas machos de la raza Wistar de un peso de 180 a 300 gramos de las que se obtuvieron los explantos hepáticos y muestras de sangre para realizar el estudio. Los animales fueron mantenidos en bioterio con ciclos de luz controlado (12 horas luz/12 horas oscuridad), alimentados ad libitum con dieta standard para ratas de laboratorio y con acceso libre al agua.

## *Anatomía hepática de la rata*

El hígado de la rata está compuesto por cinco lóbulos diferentes (Fig. 8). El lóbulo medial o lóbulo cístico, que representa el 70% del volumen hepático, está subdividido en los lóbulos centrales derecho e izquierdo por una cisura mediana. El lóbulo caudado o de Spiegel se encuentra alrededor del esófago y se interpone entre éste y el estómago. Los lóbulos lateral derecho y triangular nacen de una base en común. El lóbulo triangular, envuelve prácticamente en toda su circunferencia a la vena cava inferior infrahepática y cubre el polo superior del riñón derecho, se une con el lóbulo caudado por detrás de la vena porta.

Los medios de fijación son el ligamento falciforme, el ligamento lateral izquierdo, las adherencias con el retroperitoneo y fundamentalmente los pedículos vasculares.

El hígado de rata posee un doble sistema circulatorio, recibe sangre oxigenada a través arteria hepática y sangre venosa de la región esplácnica a través de la vena porta. La arteria hepática, rama terminal de la arteria hepática común luego de emitir la arteria gastroduodenal, corre paralela a la vena porta, hacia su lado izquierdo en el ligamento hepatoduodenal, para finalmente dividirse en las diferentes arterias lobares. La vena

porta se divide en una rama derecha e izquierda. La rama derecha irriga al lóbulo medial y lateral derechos, al lóbulo triangular y al lóbulo caudado, mientras que la rama izquierda irriga al lóbulo medial y lateral izquierdos.

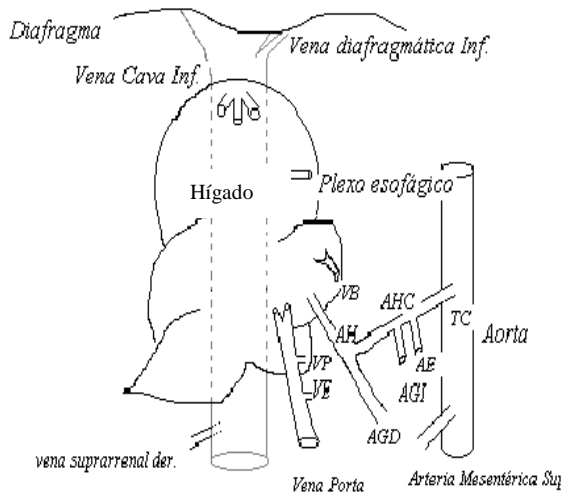


Fig. 8. TC: tronco celíaco; AHC: arteria hepática común; AH: arteria hepática; AE: arteria esplénica; AGD: arteria gastroduodenal; VB: vía biliar; VP: vena porta.

Las venas hepáticas reciben la sangre de las venas centrales de los lobulillos hepáticos y convergen en la vena cava inferior suprahepática justo por debajo del diafragma.

La vena cava infrahepática recibe a las venas suprarrenales derechas y corre embebida en el tejido hepático por la cara posterior del hígado, recolectando las tributarias hepáticas.

Los conductos biliares de cada lóbulo convergen para formar el conducto biliar común, que transcurre en el hilio sobre la vena porta, cubriendo a la arteria hepática en el borde libre del ligamento hepatoduodenal.

El conducto biliar común converge con el conducto pancreático un centímetro por debajo del hígado. La rata no posee vesícula biliar. El bajo tono del esfínter de Oddi impide el almacenamiento de la bilis, produciendo un permanente flujo de bilis hacia la porción descendente del duodeno aproximadamente a 2.5 cm del píloro.

## *Material de Microcirugía*

Los materiales de microcirugía están especialmente diseñados por lo que resultan delicados y costosos. La buena calidad y conservación de sus partes son esenciales para el éxito de la técnica microquirúrgica. La sangre es corrosiva por lo que cada instrumento debe lavarse inmediatamente luego de ser utilizado, sumergiéndolos en una solución con jabón durante 15 minutos para posteriormente ser cepillados suavemente y secados. Se conservan en cajas especialmente diseñadas para evitar su deterioro.

Para el presente trabajo se utilizaron:

- ❖ Microscopio quirúrgico
- ❖ Pinzas de relojero tamaño 3, 4 y 5, rectas y curvas
- ❖ Tijeras de microcirugía
- ❖ Porta-agujas de microcirugía
- ❖ Mini-clamps tipo bulldog
- ❖ Suturas irreabsorbibles, monofilamento, 1-0 para cierre del plano musculoaponeurótico y 3-0 para el cierre de la piel.



## *Anestesia y Preparación*

Las ratas se premedicaron con una combinación de atropina (0.04 mg/kg de peso) y diazepam (5 mg/kg de peso) y posteriormente se anestesiaron con ketamina (75 mg/kg de peso). Las drogas se aplicaron mediante inyección intraperitoneal con aguja de insulina en forma separada, en el cuadrante inferior izquierdo del abdomen, a fin de evitar la inyección en el ciego que ocupa el cuadrante derecho.

Se protegieron las córneas con ungüento oftálmico y se rasuró la superficie abdominal. Se colocó al animal en decúbito dorsal sobre una tablilla operatoria con manta térmica, se fijaron las extremidades con cinta adhesiva y se colocó la cabeza dentro de una mascarilla conectada a un tubo de oxígeno. Se realizó la antisepsia con alcohol 70°.

## *Técnica Quirúrgica*

- 1) Abordaje: se realizó una laparotomía mediante una incisión bisubcostal a aproximadamente 2 cm del reborde costal. Se retrajo el cartílago xifoides con una pinza hemostática. Se lateralizaron hacia la izquierda las asas intestinales protegiéndolas con gasas húmedas con solución fisiológica a 38° C. Se seccionó el ligamento falciforme.
- 2) Preparación del pedículo hepático: se elevaron los lóbulos derecho y central exponiendo el pedículo hepático. Se seccionó el ligamento gastrohepático para identificación del conducto biliar, vena porta y arteria hepática. Las maniobras de disección se realizaron bajo microscopio con la utilización del instrumental de microcirugía y la ayuda de hisopos húmedos con solución fisiológica a fin de minimizar el daño tisular.



Fig. 9. Miniclamps posicionados en el pedículo hepático durante la maniobra de Pringle.

3) Clampeo: se realizó una maniobra de Pringle, clampeo de los tres elementos del pedículo (arteria hepática, vena porta y vía biliar) mediante la colocación de dos miniclamps bulldog en forma paralela. Se mantuvo la maniobra durante 50 minutos (Fig. 9).

4) Hidratación: durante el procedimiento se administraron 3 ml de solución fisiológica a 37° C en forma subcutánea a fin de reponer los fluidos perdidos por perspiración y ventilación.

- 5) Desclampeo: transcurrido el tiempo estipulado de isquemia, se retiraron los clamps a fin de permitir la reperfusion hepática.
- 6) Cierre de la laparotomía: se reintrodujeron las vísceras en la cavidad abdominal y se procedió al cierre de la pared en dos planos con sutura continua, musculoaponeurótico con material monofilamento irreabsorbible 1-0 y piel con material monofilamento irreabsorbible 3-0. Los animales fueron mantenidos en bioterio con ciclos de luz controlado, alimentados ad libitum y con acceso libre al agua.

## *Extracción de muestras de sangre, biopsias y explante*

Se extrajeron muestras de sangre a cada una de las ratas, para la medición de Transaminasa glutámico oxalacética (TGO), Transaminasa glutámico pirúvica (TGP) y Lactato deshidrogenasa (LDH), a fin de observar sus variaciones en los diferentes períodos de reperusión.

La sangre se obtuvo mediante la punción del seno retrobulbar con un capilar heparinizado o mediante punción de la vena cava infrahepática. La muestra se colocó en un tubo seco y se mantuvo a temperatura ambiente hasta su procesamiento, el cual se realizó dentro de los 30 minutos posteriores a la extracción.

Para la determinación de ARNm de TNF- $\alpha$  mediante técnica de PCR se realizaron biopsias hepáticas seriadas (de aproximadamente 1 mm<sup>3</sup>) a 60 minutos, 24, 48 y 72 horas postreperusión.

Para efectuar el estudio histológico y una vez finalizado el tiempo post-reperusión estipulado para cada grupo se realizó la ablación hepática mediante una nueva laparotomía. Se seccionaron los elementos ligamentosos, los elementos del pedículo hepático y finalmente la vena cava inferior infrahepática y suprahepática. Se extrajo el hígado de la cavidad abdominal y se lo colocó en un frasco con formol-buffer al 10 % para su posterior procesamiento.

## *Procesado del material*

Los explantos se fijaron con formol-buffer al 10 %, se deshidrataron en alcoholes de graduación creciente y en benzol y se incluyeron en parafina. Un lóbulo fue conservado a -20° C. Sobre las muestras se realizaron cortes histológicos para microscopía de luz con tinciones de rutina (hematoxilina-eosina, tricrómico de Gomori, verde Luz y PAS). Por medio de las técnicas señaladas se cuantificaron numéricamente y densitométricamente las células investigadas utilizando un analizador de imágenes digitalizadas.

Las muestras de sangre fueron recolectadas en tubo seco (sin anticoagulante), y centrifugadas dentro de los 30 minutos posteriores a la extracción durante 15 minutos a 3000 rpm. Los sueros fueron separados y conservados a -20°C hasta el momento de ser analizados.

Las determinaciones de TGO y TGP se realizaron en un autoanalizador Targa BT 3000 con reactivos Wiener por método enzimático (UV optimizado IFCC) y se sometieron a controles de calidad internos (Standatrol S-E) y externos (Programa de Evaluación Externa de Calidad de la Fundación Bioquímica Argentina).

La determinación de la actividad de LDH se realizó en un autoanalizador Targa BT 3000 con reactivos Wiener por método enzimático (UV optimizado SFBC) y se sometieron a controles de calidad internos (Standatrol S-E) y externos (Programa de Evaluación Externa de Calidad de la Fundación Bioquímica Argentina).

### *Determinación de marcadores de injuria por isquemia-reperfusion*

Además del estudio histológico y enzimático (TGO, TGP y LDH) se realizaron las siguientes técnicas para el estudio de los diferentes marcadores de injuria por isquemia-reperfusion:

*TUNEL* (terminal deoxynucleotidyl-transferase-mediated 2'-deoxyuridine 5'-triphosphate-biotin nick-end labeling): fue realizado en los diferentes cortes histológicos para la detección de cuerpos apoptóticos. Se siguieron fielmente las recomendaciones e instrucciones del fabricante (Apoptag: ONCOR, INC, Gaithersburg, Maryland). En resumen, secciones de tejido hepático de 4 µm conservados en parafina fueron tratados con 20µL/mL de proteinasa K (DAKO; Glostrup, Denmark) durante 30 minutos a 37°C. Luego del lavado, las secciones fueron incubadas con digoxigenina-deoxyuridina en presencia de deoxynucleótido transferasa. Posteriormente al bloqueo de la función enzimática, las secciones fueron tratadas con anticuerpos anti-peroxidasa. La peroxidasa fue posteriormente reducida utilizando 0.05 diaminobenzidina en 0.1 mL/L de un buffer de solución salina (PBS), pH 7.6, conteniendo 1% de agua. Luego del lavado, las secciones fueron ligeramente teñidas con hematoxilina.

Reacciones de control negativas fueron realizadas para cada paso del procedimiento. Secciones de linfoma humano embebidos en parafina fueron utilizados como controles positivos.

*Inmunohistoquímica (IHQ)*: consiste en un método útil para evaluar de la presencia y localización de determinadas proteínas en secciones tisulares. A pesar de su sensibilidad inferior con respecto a inmunoensayos como el Western blot o el ELISA, permite la observación del proceso en el contexto del tejido intacto. Este hecho resulta particularmente útil en combinación con la microscopía para obtener un “cuadro

general” del fenómeno a estudiar. La tinción por IHQ se efectúa mediante la utilización de anticuerpos que reconocen una proteína “target” específica. Debido a la alta especificidad de dichos anticuerpos, éstos se unen solamente a la proteína en cuestión presente en la sección tisular. La interacción antígeno-anticuerpo es finalmente visualizada mediante detección cromogénica (en donde una enzima conjugada con el anticuerpo produce el clivaje de un sustrato produciendo la precipitación coloreada en el sitio donde se encuentra la proteína) o por fluorescencia (en donde una sustancia fluorescente es conjugada con los anticuerpos para evidenciarlos y estudiarlos mediante microscopía de fluorescencia).

Mediante la IHQ se evalúan tejidos previamente fijados (en general en formalina) y posteriormente embebidos en parafina. Los pasos básicos de los protocolos de IHC incluyen:

- 1- Fijación del tejido
- 2- Corte del tejido
- 3- Deparafinización de las secciones y rehidratación
- 4- Recuperación del antígeno
- 5- Tinción por inmunohistoquímica
- 6- Deshidratación y estabilización de la tinción
- 7- Estudio microscópico de la sección

Para el presente estudio se obtuvieron secciones de 4 µm de los tacos hepáticos embebidos en parafina. Las secciones fueron deparafinadas utilizando xileno, deshidratadas mediante inmersión en agua y alcohol y sumergidas en una solución 0.3% vol/vol de peróxido de hidrógeno y metanol durante 30 minutos con el fin de bloquear las peroxidasas endógenas. Los antígenos fueron recuperados mediante microondas a

750 W durante 15 minutos en 0.01 mol/L de buffer de citrato trisódico a pH 6.0 y posteriormente enjuagados en PBS, bloqueando las uniones no-específicas con suero equino al 10%.

Las secciones fueron incubadas con anticuerpos monoclonales anti-C3, anticuerpos policlonales de cabra anti-TNF- $\alpha$ , anti-Il-6, HSP60 (K-20) y HO-1 (C-18), anticuerpos policlonales de conejo anti-Bcl-2, IgG policlonales de conejo anti-Bax (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, USA) y anticuerpos anti-MDA (Abcam plc, Cambridge Science Park Cambridge, UK).

Luego del enjuagado de las secciones con PBS, las mismas fueron incubadas con anticuerpos secundarios en concentraciones según las instrucciones del fabricante (Vectastain, Universal Quick Kits; Vector Laboratories Ltd, Peterborough, UK). Las peroxidases fueron visualizadas mediante incubación de las secciones en 3.3'-diaminobenzidina (Sigma Chemical Co., Poole, UK) y peróxido de hidrógeno. Experimentos controles negativos fueron realizados mediante omisión de la incubación con los anticuerpos primarios. La extensión del área afectada fue calculada analizando 10 campos 200x consecutivos utilizando la siguiente escala semicuantitativa:

- <5% = 1
- 6-25% = 2
- 26-50% =3
- 51-75% =4
- >75% =5

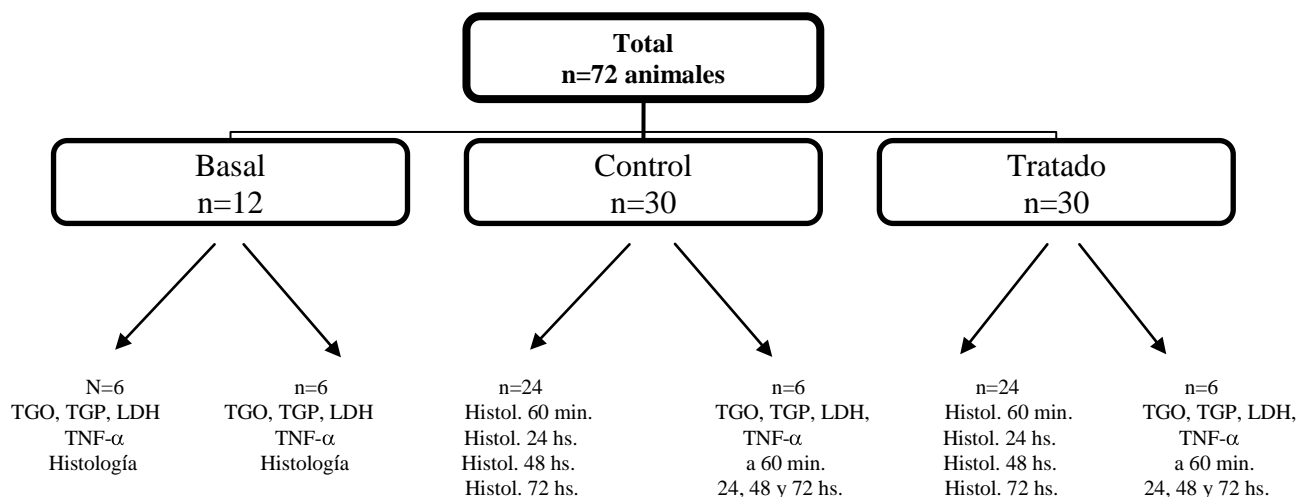
*Reacción en Cadena de la Polimerasa (Quantitative Real-Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR) para determinación de TNF- $\alpha$ : ARN mensajero (ARNm) del hígado de rata fue extraído con el reactivo Trizol (Invitrogen, Carlsbad,*



CA) y el ARN total fue transcrito en forma reversa a ADN complementario (ADN<sub>c</sub>). La técnica de qRT-PCR fue llevada a cabo utilizando el instrumento Rotor-Gene 6000 (Corbett Life Science). La relativa abundancia del gen target TNF- $\alpha$  fue normalizada a Cyclophilin ARNm como control interno.

## Grupos

Se utilizaron 72 animales, los cuales fueron randomizados y distribuidos en 5 grupos:



Los 72 animales fueron randomizados y distribuidos en 6 grupos:

- 1) **GRUPO BASAL:** constituido por 12 ratas de las cuales se obtuvieron muestras de sangre para determinación de niveles basales de TGO, TGP, LDH, biopsia hepática para realización de PCR para determinar TNF- $\alpha$  y ablación hepática para estudio de la histología del hígado de rata y sus diferentes poblaciones celulares. Las primeras 6 ratas fueron consideradas Grupo Basal Control y las segundas 6 Grupo Control Tratado, ya que estas últimas recibieron premedicación con Lidocaína a la dosis y modalidad indicada en Material y Métodos.
- 2) **GRUPO CONTROL:** constituido por 30 animales sometidos a 50 minutos de isquemia con posterior perfusión. Del total de estas ratas, 24 ratas sirvieron

para la realización de ablación hepática y estudio histológico del hígado a 60 minutos, 24, 48 y 72 horas post-reperfusion. Las restantes 6, fueron sometidas a extracción sanguínea y biopsia hepática seriadas a iguales tiempos post-reperfusion para la determinación de TGO, TGP, LDH y TNF- $\alpha$ .

- 3) GRUPO TRATADO: constituido por 30 animales premedicados con 1.5 mg/kg de Lidocaína vía intraperitoneal y sometidos a 50 minutos de isquemia con posterior reperfusion. Del total de estas ratas, 24 ratas sirvieron para la realización de ablación hepática y estudio histológico del hígado a 60 minutos, 24, 48 y 72 horas post-reperfusion. Las restantes 6, fueron sometidas a extracción sanguínea y biopsia hepática seriadas a iguales tiempos post-reperfusion para la determinación de TGO, TGP, LDH y TNF- $\alpha$ .

## *Análisis Estadístico*

Se compararon los resultados de los distintos parámetros estudiados entre los grupos BASAL, CONTROL y TRATADO en los diversos tiempos de reperfusion utilizando el T-test. Las diferencias entre los grupos fueron consideradas estadísticamente significativas cuando el valor de la *P* fue inferior a 0.05.

## *Resultados*

## Resultados Enzimáticos

### Grupo BASAL

Los niveles enzimáticos se expresaron en U/ml. Se obtuvieron los niveles de TGO, TGP y LDH (UI/ml) y se volcaron en las siguientes tablas:

| <i>Animal</i>          | <i>TGO</i> | <i>TGP</i> | <i>LDH</i> |
|------------------------|------------|------------|------------|
| <i>Basal Control 1</i> | 108        | 56         | 421        |
| <i>Basal Control 2</i> | 102        | 63         | 480        |
| <i>Basal Control 3</i> | 103        | 39         | 541        |
| <i>Basal Control 4</i> | 145        | 53         | 620        |
| <i>Basal Control 5</i> | 99         | 38         | 555        |
| <i>Basal Control 6</i> | 47         | 25         | 500        |

| <i>Animal</i>            | <i>TGO</i> | <i>TGP</i> | <i>LDH</i> |
|--------------------------|------------|------------|------------|
| <i>Basal Lidocaína 1</i> | 100        | 50         | 417        |
| <i>Basal Lidocaína 2</i> | 98         | 61         | 464        |
| <i>Basal Lidocaína 3</i> | 85         | 40         | 539        |
| <i>Basal Lidocaína 4</i> | 80         | 49         | 615        |
| <i>Basal Lidocaína 5</i> | 99         | 37         | 549        |
| <i>Basal Lidocaína 6</i> | 47         | 25         | 499        |

## Grupo CONTROL

Se obtuvieron los niveles de las enzimas TGO, TGP y LDH (UI/ml) en el grupo CONTROL a los 60 minutos, 24, 48 y 72 horas post-reperfusion y se volcaron en las siguientes tablas:

| <i>Animal</i>            | <i>TGO</i> | <i>TGP</i> | <i>LDH</i> |
|--------------------------|------------|------------|------------|
| <i>Control 60 min. 1</i> | 177        | 99         | 1353       |
| <i>Control 60 min. 2</i> | 170        | 112        | 1375       |
| <i>Control 60 min. 3</i> | 200        | 72         | 1177       |
| <i>Control 60 min. 4</i> | 188        | 90         | 1657       |
| <i>Control 60 min. 5</i> | 254        | 82         | 1320       |
| <i>Control 60 min. 6</i> | 364        | 124        | 2980       |

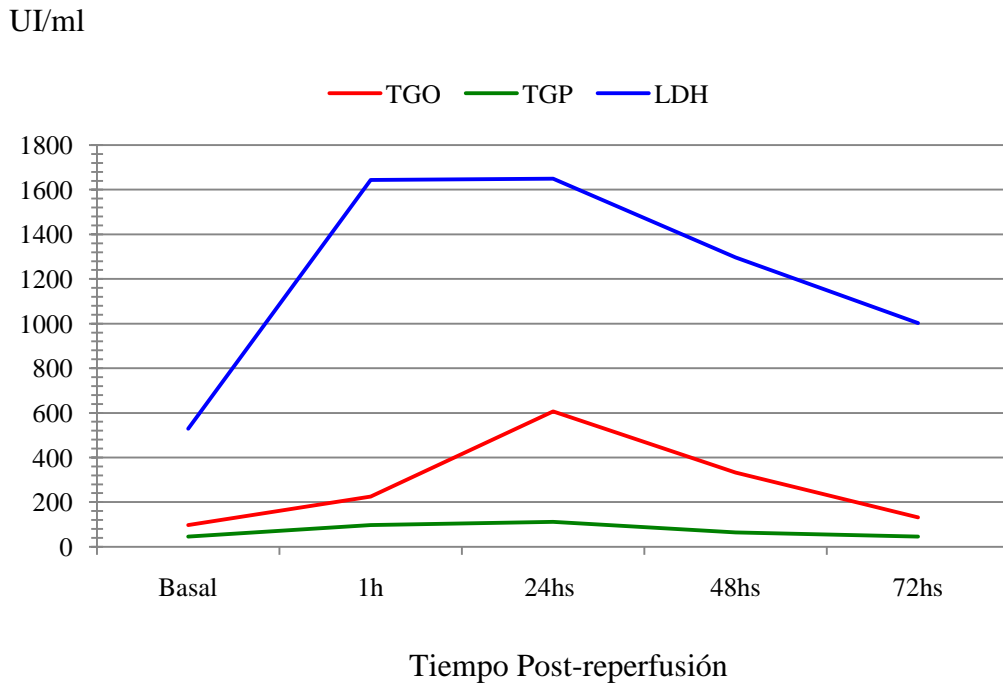
| <i>Animal</i>           | <i>TGO</i> | <i>TGP</i> | <i>LDH</i> |
|-------------------------|------------|------------|------------|
| <i>Control 24 hs. 1</i> | 803        | 230        | 1930       |
| <i>Control 24 hs. 2</i> | 303        | 79         | 1520       |
| <i>Control 24 hs. 3</i> | 450        | 76         | 1466       |
| <i>Control 24 hs. 4</i> | 810        | 98         | 1364       |
| <i>Control 24 hs. 5</i> | 520        | 84         | 1870       |
| <i>Control 24 hs. 6</i> | 754        | 102        | 1745       |

| <i>Animal</i>           | <i>TGO</i> | <i>TGP</i> | <i>LDH</i> |
|-------------------------|------------|------------|------------|
| <i>Control 48 hs. 1</i> | 303        | 79         | 1578       |
| <i>Control 48 hs. 2</i> | 450        | 76         | 1466       |
| <i>Control 48 hs. 3</i> | 171        | 50         | 1466       |
| <i>Control 48 hs. 4</i> | 523        | 136        | 714        |
| <i>Control 48 hs. 5</i> | 366        | 127        | 772        |
| <i>Control 48 hs. 6</i> | 185        | 62         | 1785       |

| <i>Animal</i>           | <i>TGO</i> | <i>TGP</i> | <i>LDH</i> |
|-------------------------|------------|------------|------------|
| <i>Control 72 hs. 1</i> | 94         | 49         | 1080       |
| <i>Control 72 hs. 2</i> | 189        | 49         | 1122       |
| <i>Control 72 hs. 3</i> | 114        | 43         | 578        |
| <i>Control 72 hs. 4</i> | 84         | 31         | 579        |
| <i>Control 72 hs. 5</i> | 110        | 46         | 1000       |
| <i>Control 72 hs. 6</i> | 293        | 59         | 1653       |

Se obtuvieron los valores promedios de las concentraciones de cada una de las enzimas en el grupo BASAL y CONTROL, se completó la siguiente tabla y se trazó el gráfico correspondiente:

| <i>Grupo</i>           | <i>TGO</i> | <i>TGP</i> | <i>LDH</i> |
|------------------------|------------|------------|------------|
| <i>Basal</i>           | 100        | 46         | 519        |
| <i>Control 60 min.</i> | 225        | 96         | 1644       |
| <i>Control 24 hs.</i>  | 606        | 111        | 1649       |
| <i>Control 48 hs.</i>  | 333        | 88         | 1297       |
| <i>Control 72 hs.</i>  | 147        | 46         | 1002       |





## Grupo TRATADO

Se obtuvieron los niveles de las enzimas TGO, TGP y LDH (UI/ml) en el grupo TRATADO y se volcaron en las siguientes tablas:

| <i>Animal</i>          | <i>TGO</i> | <i>TGP</i> | <i>LDH</i> |
|------------------------|------------|------------|------------|
| <i>Trat. 60 min. 1</i> | 110        | 80         | 790        |
| <i>Trat. 60 min. 2</i> | 111        | 111        | 783        |
| <i>Trat. 60 min. 3</i> | 279        | 81         | 1062       |
| <i>Trat. 60 min. 4</i> | 207        | 96         | 1485       |
| <i>Trat. 60 min. 5</i> | 126        | 99         | 1204       |
| <i>Trat. 60 min. 6</i> | 171        | 114        | 1101       |

| <i>Animal</i>         | <i>TGO</i> | <i>TGP</i> | <i>LDH</i> |
|-----------------------|------------|------------|------------|
| <i>Trat. 24 hs. 1</i> | 194        | 73         | 512        |
| <i>Trat. 24 hs. 2</i> | 174        | 87         | 501        |
| <i>Trat. 24 hs. 3</i> | 81         | 84         | 1707       |
| <i>Trat. 24 hs. 4</i> | 234        | 134        | 1243       |
| <i>Trat. 24 hs. 5</i> | 76         | 32         | 1012       |
| <i>Trat. 24 hs. 6</i> | 98         | 26         | 501        |

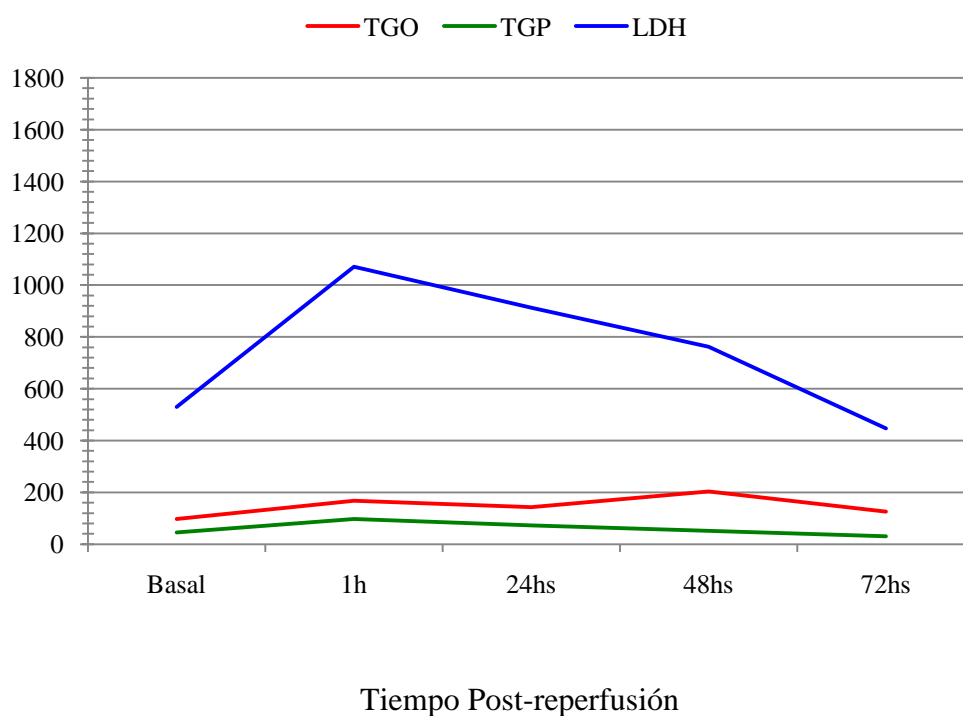
| <i>Animal</i>         | <i>TGO</i> | <i>TGP</i> | <i>LDH</i> |
|-----------------------|------------|------------|------------|
| <i>Trat. 48 hs. 1</i> | 227        | 43         | 800        |
| <i>Trat. 48 hs. 2</i> | 90         | 45         | 616        |
| <i>Trat. 48 hs. 3</i> | 171        | 33         | 780        |
| <i>Trat. 48 hs. 4</i> | 436        | 104        | 1082       |
| <i>Trat. 48 hs. 5</i> | 215        | 34         | 831        |
| <i>Trat. 48 hs. 6</i> | 85         | 52         | 464        |

| <i>Animal</i>         | <i>TGO</i> | <i>TGP</i> | <i>LDH</i> |
|-----------------------|------------|------------|------------|
| <i>Trat. 72 hs. 1</i> | 109        | 44         | 284        |
| <i>Trat. 72 hs. 2</i> | 115        | 30         | 500        |
| <i>Trat. 72 hs. 3</i> | 165        | 31         | 510        |
| <i>Trat. 72 hs. 4</i> | 231        | 33         | 422        |
| <i>Trat. 72 hs. 5</i> | 60         | 24         | 419        |
| <i>Trat. 72 hs. 6</i> | 71         | 17         | 545        |

Se obtuvieron los valores promedios de las concentraciones de cada una de las enzimas en el grupo BASAL y TRATADO, se completó la siguiente tabla y se trazó el gráfico correspondiente:

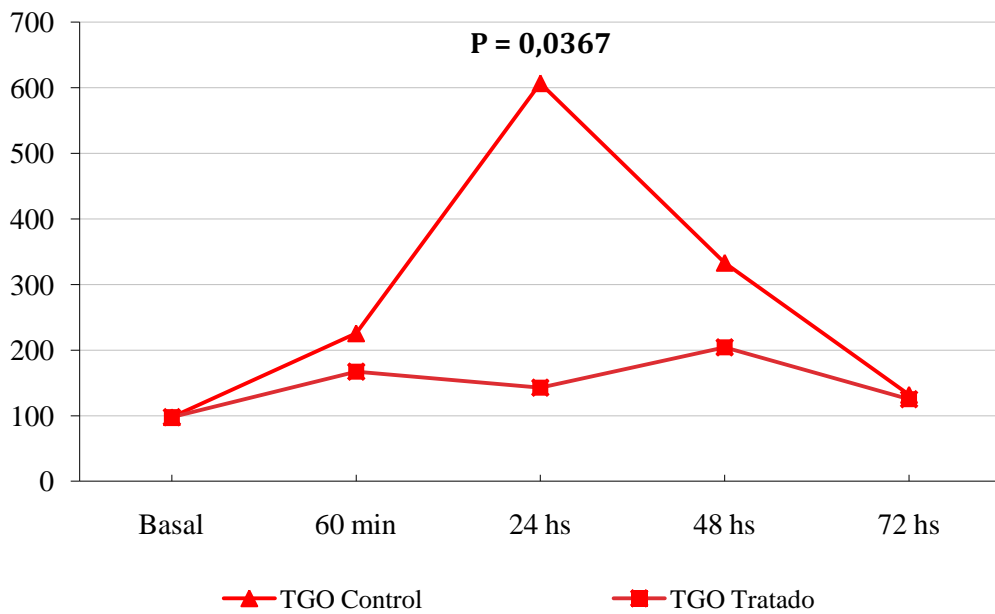
| <b>Grupo</b>           | <b>TGO</b> | <b>TGP</b> | <b>LDH</b> |
|------------------------|------------|------------|------------|
| <b>Basal</b>           | 85         | 44         | 514        |
| <b>Tratado 60 min.</b> | 167        | 97         | 1071       |
| <b>Tratado 24 hs.</b>  | 143        | 73         | 913        |
| <b>Tratado 48 hs.</b>  | 204        | 52         | 762        |
| <b>Tratado 72 hs.</b>  | 125        | 30         | 447        |

UI/ml



### TGO

Se trazó el gráfico resultante de la comparación de las variaciones de TGO en los diferentes tiempos post-reperfusion entre el grupo CONTROL y el grupo TRATADO y se realizó el estudio estadístico para cada tiempo establecido con el fin de establecer las diferencias entre ambos grupos.



### TGO BASAL Grupo CONTROL vs. TRATADO

|                         |                    |                    |
|-------------------------|--------------------|--------------------|
| Muestra 1               |                    |                    |
| Variable                | TGO Basal          |                    |
| Grupo                   | Control            |                    |
| Muestra 2               |                    |                    |
| Variable                | TGO Basal          |                    |
| Grupo                   | Lidocaína          |                    |
|                         | Basal Control      | Basal Lidocaína    |
| Tamaño muestra n=       | 6                  | 6                  |
| Media Aritmética        | 100,6667           | 84,8333            |
| 95% Intervalo Confianza | 67,7829 a 133,5505 | 69,4754 a 100,1912 |

|                                   |          |                    |
|-----------------------------------|----------|--------------------|
| Variance                          | 981,8667 | 214,1667           |
| Desví Standard                    | 31,3348  | 14,6344            |
| Error Standard                    | 12,7924  | 5,9745             |
| F-test                            |          | P = 0,120          |
| T-test (assuming equal variances) |          |                    |
| Diferencia                        |          | -15,8333           |
| Error Standard                    |          | 14,1187            |
| 95% Intervalo Confianza           |          | -47,2919 a 15,6252 |
| Test statistic t                  |          | -1,121             |
| Grado de Libertad (DF)            |          | 10                 |
| P=                                |          | P = 0,2883         |

### TGO Grupo CONTROL vs. TRATADO a los 60 minutos post-reperfusion

|                                   |                     |                     |
|-----------------------------------|---------------------|---------------------|
| Muestra 1                         |                     |                     |
| Variable                          | TGO 60 min.         |                     |
| Grupo                             | Control             |                     |
| Muestra 2                         |                     |                     |
| Variable                          | TGO 60 min.         |                     |
| Grupo                             | Lidocaína           |                     |
|                                   | 60 min. Control     | 60 min. Lidocaína   |
| Tamaño muestra n=                 | 6                   | 6                   |
| Media Aritmética                  | 225,5000            | 167,3333            |
| 95% Intervalo Confianza           | 147,6951 a 303,3049 | 97,3661 a 237,3006  |
| Variance                          | 5496,7000           | 4445,0667           |
| Desví Standard                    | 74,1397             | 66,6713             |
| Error Standard                    | 30,2674             | 27,2185             |
| F-test                            |                     | P = 0,821           |
| T-test (assuming equal variances) |                     |                     |
| Diferencia                        |                     | -58,1667            |
| Error Standard                    |                     | 40,7058             |
| 95% Intervalo Confianza           |                     | -148,8648 a 32,5315 |
| Test statistic t                  |                     | -1,429              |
| Grado de Libertad (DF)            |                     | 10                  |
| P=                                |                     | P = 0,1835          |

TGO Grupo CONTROL vs. TRATADO a las 24 horas post-reperfusion

| Muestra 1                         |                      |                     |
|-----------------------------------|----------------------|---------------------|
| Variable                          | TGO 24 hs.           |                     |
| Grupo                             | Control              |                     |
| Muestra 2                         |                      |                     |
| Variable                          | TGO 24 hs.           |                     |
| Grupo                             | Lidocaína            |                     |
|                                   | 24 hs. Control       | 24 hs. Lidocaína    |
| Tamaño muestra n=                 | 6                    | 6                   |
| Media Aritmética                  | 606,6667             | 264,8333            |
| 95% Intervalo Confianza           | 383,6191 a 829,7142  | -23,7889 a 553,4555 |
| Variance                          | 45173,4667           | 75639,3667          |
| Desvío Standard                   | 212,5405             | 275,0261            |
| Error Standard                    | 86,7693              | 112,2789            |
| F-test                            | P = 0,585            |                     |
| T-test (assuming equal variances) |                      |                     |
| Diferencia                        | -341,8333            |                     |
| Error Standard                    | 141,8995             |                     |
| 95% Intervalo Confianza           | -658,0052 a -25,6615 |                     |
| Test statistic t                  | -2,409               |                     |
| Grado de Libertad (DF)            | 10                   |                     |
| P=                                | P = 0,0367           |                     |

TGO Grupo CONTROL vs. TRATADO a las 48 horas post-reperfusion

| Muestra 1               |                     |                    |
|-------------------------|---------------------|--------------------|
| Variable                | TGO 48 hs.          |                    |
| Grupo                   | Control             |                    |
| Muestra 2               |                     |                    |
| Variable                | TGO 48 hs.          |                    |
| Grupo                   | Lidocaína           |                    |
|                         | 48 hs. Control      | 48 hs. Lidocaína   |
| Tamaño muestra n=       | 6                   | 6                  |
| Media Aritmética        | 333,0000            | 204,0000           |
| 95% Intervalo Confianza | 184,6423 a 481,3577 | 69,0179 a 338,9821 |
| Variance                | 19985,2000          | 16544,0000         |
| Desvío Standard         | 141,3690            | 128,6235           |
| Error Standard          | 57,7137             | 52,5103            |

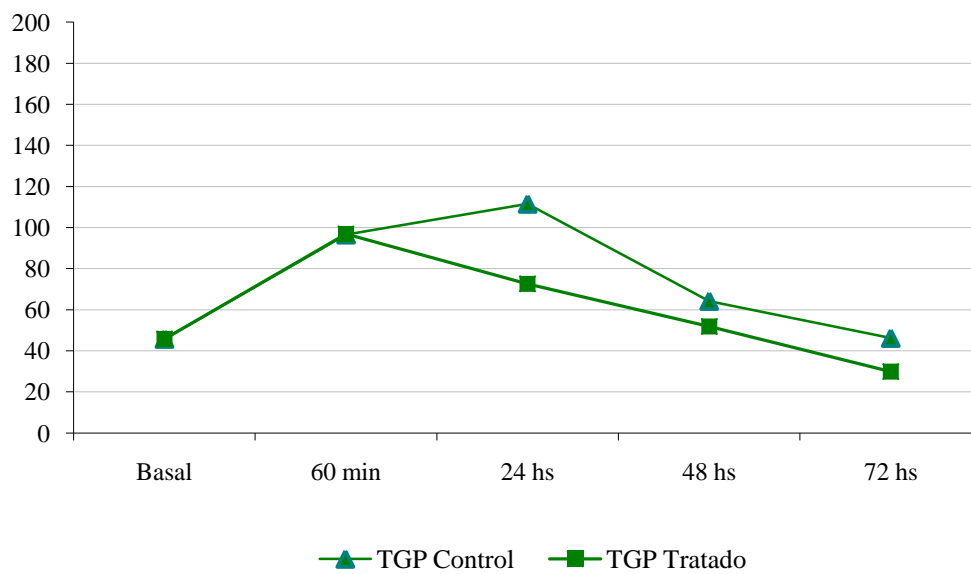
|                                   |  |                     |
|-----------------------------------|--|---------------------|
| F-test                            |  | P = 0,841           |
| T-test (assuming equal variances) |  |                     |
| Diferencia                        |  | -129,0000           |
| Error Standard                    |  | 78,0269             |
| 95% Intervalo Confianza           |  | -302,8548 a 44,8548 |
| Test statistic t                  |  | -1,653              |
| Grado de Libertad (DF)            |  | 10                  |
| P=                                |  | P = 0,1293          |

### TGO Grupo CONTROL vs. TRATADO a las 72 horas post-reperusión

|                                   |                     |                      |
|-----------------------------------|---------------------|----------------------|
| Muestra 1                         |                     |                      |
| Variable                          | TGO 72 hs.          |                      |
| Grupo                             | Control             |                      |
| Muestra 2                         |                     |                      |
| Variable                          | TGO 72 hs.          |                      |
| Grupo                             | Lidocaína           |                      |
|                                   | 72 hs. Control      | 72 hs. Lidocaína     |
| Tamaño muestra n=                 | 6                   | 6                    |
| Media Aritmética                  | 147,3333            | 125,1667             |
| 95% Intervalo Confianza           | 62,9658 to 231,7008 | 58,2445 to 192,0888  |
| Variance                          | 6463,0667           | 4066,5667            |
| Desvío Standard                   | 80,3932             | 63,7696              |
| Error Standard                    | 32,8204             | 26,0338              |
| F-test                            |                     | P = 0,624            |
| T-test (assuming equal variances) |                     |                      |
| Diferencia                        |                     | -22,1667             |
| Error Standard                    |                     | 41,8920              |
| 95% Intervalo Confianza           |                     | -115,5078 to 71,1745 |
| Test statistic t                  |                     | -0,529               |
| Grado de Libertad (DF)            |                     | 10                   |
| P=                                |                     | P = 0,6083           |

### TGP

Se trazó el gráfico resultante de la comparación de las variaciones de TGP en los diferentes tiempos post-reperfusion entre el grupo CONTROL y el grupo TRATADO y se realizó el estudio estadístico para cada tiempo establecido con el fin de establecer las diferencias entre ambos grupos.



### TGP BASAL Grupo CONTROL vs. TRATADO

|                         |                    |                    |
|-------------------------|--------------------|--------------------|
| Muestra 1               |                    |                    |
| Variable                | TGP Basal          |                    |
| Grupo                   | Control            |                    |
| Muestra 2               |                    |                    |
| Variable                | TGP Basal          |                    |
| Grupo                   | Lidocaína          |                    |
|                         | Basal Control      | Basal Lidocaína    |
| Tamaño muestra n=       | 6                  | 6                  |
| Media Aritmética        | 45,6667            | 43,6667            |
| 95% Intervalo Confianza | 30,8899 to 60,4435 | 39,2807 to 48,0526 |
| Variance                | 198,2667           | 17,4667            |
| Desvíó Standard         | 14,0807            | 4,1793             |

|   |        |                    |
|---|--------|--------------------|
| Error Standard                          | 5,7484 | 1,7062             |
| F-test for equal variances              |        | P = 0,019          |
| Welch-test (assuming unequal variances) |        |                    |
| Diferencia                              |        | -2,0000            |
| Error Standard                          |        | 5,9963             |
| 95% Intervalo Confianza                 |        | -16,6724 a 12,6724 |
| Test statistic t                        |        | -0,334             |
| Grado de Libertad (DF)                  |        | 5,9                |
| P=                                      |        | P = 0,7501         |

TGP Grupo CONTROL vs. TRATADO a los 60 minutos post-reperusión

|                                   |                    |                    |
|-----------------------------------|--------------------|--------------------|
| Muestra 1                         |                    |                    |
| Variable                          | TGP 60 min.        |                    |
| Grupo                             | Control            |                    |
| Muestra 2                         |                    |                    |
| Variable                          | TGP 60 min.        |                    |
| Grupo                             | Lidocaína          |                    |
|                                   | 60 min. Control    | 60 min. Lidocaína  |
| Tamaño muestra n=                 | 6                  | 6                  |
| Media Aritmética                  | 96,5000            | 96,8333            |
| 95% Intervalo Confianza           | 76,2837 a 116,7163 | 81,7358 a 111,9309 |
| Variance                          | 371,1000           | 206,9667           |
| Desvío Standard                   | 19,2640            | 14,3863            |
| Error Standard                    | 7,8645             | 5,8732             |
| F-test for equal variances        |                    | P = 0,537          |
| T-test (assuming equal variances) |                    |                    |
| Diferencia                        |                    | 0,3333             |
| Error Standard                    |                    | 9,8155             |
| 95% Intervalo Confianza           |                    | -21,5370 a 22,2037 |
| Test statistic t                  |                    | 0,0340             |
| Grado de Libertad (DF)            |                    | 10                 |
| P=                                |                    | P = 0,9736         |



TGP Grupo CONTROL vs. TRATADO a las 24 horas post-reperfusión

| Muestra 1                         |                    |                    |
|-----------------------------------|--------------------|--------------------|
| Variable                          | TGP 24 hs.         |                    |
| Grupo                             | Control            |                    |
| Muestra 2                         |                    |                    |
| Variable                          | TGP 24 hs.         |                    |
| Grupo                             | Lidocaína          |                    |
|                                   | 24 hs. Control     | 24 hs. Lidocaína   |
| Tamaño muestra n=                 | 6                  | 6                  |
| Media Aritmética                  | 111,5000           | 111,3333           |
| 95% Intervalo Confianza           | 49,6144 a 173,3856 | 28,5312 a 194,1355 |
| Variance                          | 3477,5000          | 6225,4667          |
| Desvío Standard                   | 58,9703            | 78,9016            |
| Error Standard                    | 24,0745            | 32,2115            |
| F-test for equal variances        |                    | P = 0,538          |
| T-test (assuming equal variances) |                    |                    |
| Diferencia                        |                    | -0,1667            |
| Error Standard                    |                    | 40,2139            |
| 95% Intervalo Confianza           |                    | -89,7689 a 89,4356 |
| Test statistic t                  |                    | -0,00414           |
| Grado de Libertad (DF)            |                    | 10                 |
| P=                                |                    | P = 0,9968         |

TGP Grupo CONTROL vs. TRATADO a las 48 horas post-reperfusión

| Muestra 1               |                     |                    |
|-------------------------|---------------------|--------------------|
| Variable                | TGP 48 hs.          |                    |
| Grupo                   | Control             |                    |
| Muestra 2               |                     |                    |
| Variable                | TGP 48 hs.          |                    |
| Grupo                   | Lidocaína           |                    |
|                         | 48 hs. Control      | 48 hs. Lidocaína   |
| Tamaño muestra n=       | 6                   | 6                  |
| Media Aritmética        | 182,0000            | 245,5000           |
| 95% Intervalo Confianza | -47,8115 a 411,8115 | 22,7982 a 468,2018 |
| Variance                | 47954,8000          | 45033,5000         |
| Desvío Standard         | 218,9858            | 212,2110           |
| Error Standard          | 89,4006             | 86,6348            |

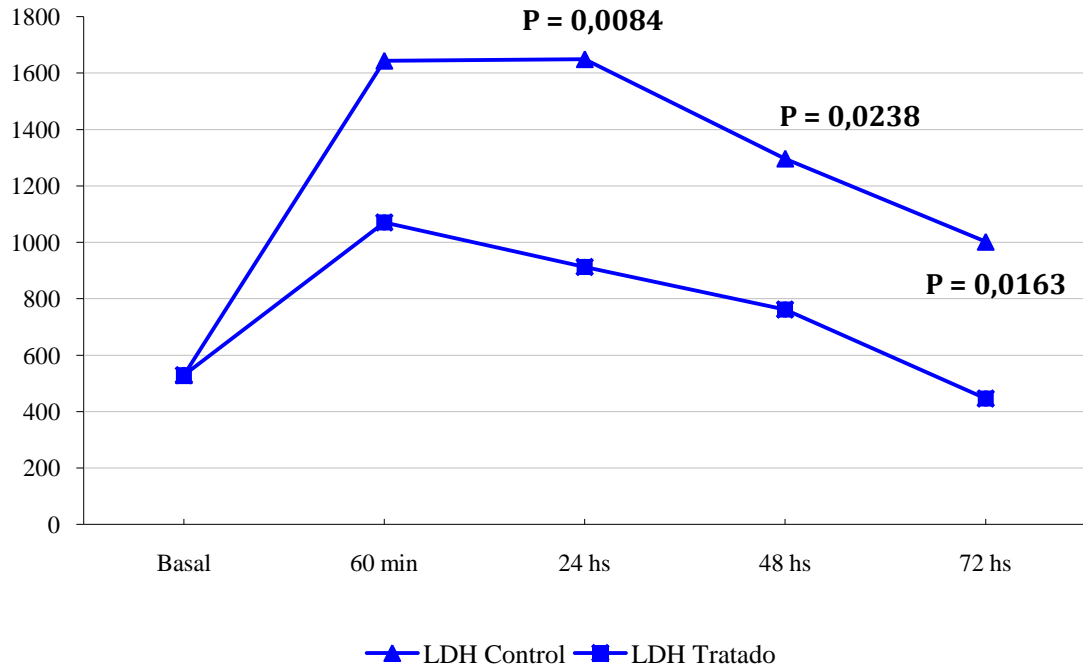
|                                   |                      |
|-----------------------------------|----------------------|
| F-test for equal variances        | P = 0,947            |
| T-test (assuming equal variances) |                      |
| Diferencia                        | 63,5000              |
| Error Standard                    | 124,4912             |
| 95% Intervalo Confianza           | -213,8836 a 340,8836 |
| Test statistic t                  | 0,510                |
| Grado de Libertad (DF)            | 10                   |
| P=                                | P = 0,6211           |

### TGP Grupo CONTROL vs. TRATADO a las 72 horas post-reperusión

|   |                      |                    |
|---|----------------------|--------------------|
| Muestra 1                               |                      |                    |
| Variable                                | TGP 72 hs.           |                    |
| Grupo                                   | Control              |                    |
| Muestra 2                               |                      |                    |
| Variable                                | TGP 72 hs.           |                    |
| Grupo                                   | Lidocaína            |                    |
|   | 72 hs. Control       | 72 hs. Lidocaína   |
| Tamaño muestra n=                       | 6                    | 6                  |
| Media Aritmética                        | 203,8333             | 92,1667            |
| 95% Intervalo Confianza                 | -61,6589 a 469,3255  | -4,0327 a 188,3660 |
| Variance                                | 64001,7667           | 8402,9667          |
| Desvío Standard                         | 252,9857             | 91,6677            |
| Error Standard                          | 103,2810             | 37,4232            |
| F-test for equal variances              | P = 0,044            |                    |
| Welch-test (assuming unequal variances) |                      |                    |
| Diferencia                              | -111,6667            |                    |
| Error Standard                          | 109,8520             |                    |
| 95% Intervalo Confianza                 | -380,4648 a 157,1314 |                    |
| Test statistic t                        | -1,017               |                    |
| Grado de Libertad (DF)                  | 6,3                  |                    |
| P=                                      | P = 0,3486           |                    |

## LDH

Gráfico resultante de la comparación de las variaciones de LDH en los diferentes tiempos post-reperfusion entre el grupo CONTROL y el grupo TRATADO



## LDH BASAL Grupo CONTROL vs. TRATADO

| Muestra 1                    |                     |                     |
|------------------------------|---------------------|---------------------|
| Variable                     | LDH Basal           |                     |
| Grupo                        | Control             |                     |
| Muestra 2                    |                     |                     |
| Variable                     | LDH Basal           |                     |
| Grupo                        | Lidocaína           |                     |
|                              | Basal Control       | Basal Lidocaína     |
| Tamaño muestra n=            | 6                   | 6                   |
| Media Aritmética             | 519,5000            | 513,3333            |
| 95% % Intervalo<br>Confianza | 447,6071 a 591,3929 | 466,0893 a 560,5774 |
| Variance                     | 4693,1000           | 2026,6667           |
| Desvío Standard              | 68,5062             | 45,0185             |

|                                   |         |                    |
|-----------------------------------|---------|--------------------|
| Error Standard                    | 27,9675 | 18,3787            |
| F-test for equal variances        |         | P = 0,378          |
| T-test (assuming equal variances) |         |                    |
| Diferencia                        |         | -6,1667            |
| Error Standard                    |         | 33,4658            |
| 95% Intervalo Confianza           |         | -80,7332 a 68,3998 |
| Test statistic t                  |         | -0,184             |
| Grado de Libertad (DF)            |         | 10                 |
| P=                                |         | P = 0,8575         |

### LDH Grupo CONTROL vs. TRATADO a los 60 minutos post-reperfusion

|                                   |                      |                      |
|-----------------------------------|----------------------|----------------------|
| Muestra 1                         |                      |                      |
| Variable                          | LDH 60 min.          |                      |
| Grupo                             | Control              |                      |
| Muestra 2                         |                      |                      |
| Variable                          | LDH 60 min.          |                      |
| Grupo                             | Lidocaína            |                      |
|                                   | 60 min. Control      | 60 min. Lidocaína    |
| Tamaño muestra n=                 | 6                    | 6                    |
| Media Aritmética                  | 1643,6667            | 1070,8333            |
| 95% Intervalo Confianza           | 937,3144 a 2350,0189 | 792,3981 a 1349,2685 |
| Variance                          | 453034,2667          | 70394,1667           |
| Desvío Standard                   | 673,0782             | 265,3190             |
| Error Standard                    | 274,7830             | 108,3160             |
| F-test for equal variances        |                      | P = 0,062            |
| T-test (assuming equal variances) |                      |                      |
| Diferencia                        |                      | -572,8333            |
| Error Standard                    |                      | 295,3609             |
| 95% Intervalo Confianza           |                      | -1230,9385 a 85,2718 |
| Test statistic t                  |                      | -1,939               |
| Grado de Libertad                 |                      | 10                   |
| P=                                |                      | P = 0,0812           |

### LDH Grupo CONTROL vs. TRATADO a las 24 horas post-reperfusion

| Muestra 1                         |                       |                        |
|-----------------------------------|-----------------------|------------------------|
| Variable                          | LDH 24 hs.            |                        |
| Grupo                             | Control               |                        |
| Muestra 2                         |                       |                        |
| Variable                          | LDH 24 hs.            |                        |
| Grupo                             | Lidocaína             |                        |
|                                   | 24 hs. Control        | 24 hs. Lidocaína       |
| Tamaño muestra n=                 | 6                     | 6                      |
| Media Aritmética                  | 1649,1667             | 912,6667               |
| 95% Intervalo Confianza           | 1406,0358 a 1892,2975 | 388,0695 a 1437,2639   |
| Variance                          | 53674,5667            | 249885,0667            |
| Desvío Standard                   | 231,6777              | 499,8851               |
| Error Standard                    | 94,5820               | 204,0772               |
| F-test for equal variances        |                       | P = 0,117              |
| T-test (assuming equal variances) |                       |                        |
| Diferencia                        |                       | -736,5000              |
| Error Standard                    |                       | 224,9295               |
| 95% Intervalo Confianza           |                       | -1237,6741 a -235,3259 |
| Test statistic t                  |                       | -3,274                 |
| Grado de Libertad (DF)            |                       | 10                     |
| P=                                |                       | <b>P = 0,0084</b>      |

### LDH Grupo CONTROL vs. TRATADO a las 48 horas post-reperfusion

| Muestra 1                         |                      |                     |
|-----------------------------------|----------------------|---------------------|
| Variable                          | LDH 48 hs.           |                     |
| Grupo                             | Control              |                     |
| Muestra 2                         |                      |                     |
| Variable                          | LDH 48 hs.           |                     |
| Grupo                             | Lidocaína            |                     |
|                                   | 48 hs. Control       | 48 hs. Lidocaína    |
| Tamaño muestra n=                 | 6                    | 6                   |
| Media Aritmética                  | 1296,8333            | 762,1667            |
| 95% Intervalo Confianza           | 829,9251 a 1763,7416 | 542,5116 a 981,8218 |
| Variance                          | 197948,1667          | 43809,7667          |
| Desvío Standard                   | 444,9137             | 209,3078            |
| Error Standard                    | 181,6352             | 85,4496             |
| F-test for equal variances        |                      | P = 0,123           |
| T-test (assuming equal variances) |                      |                     |

|                         |                      |
|-------------------------|----------------------|
| Diferencia              | -534,6667            |
| Error Standard          | 200,7311             |
| 95% Intervalo Confianza | -981,9235 a -87,4098 |
| Test statistic t        | -2,664               |
| Grado de Libertad (DF)  | 10                   |
| P=                      | <b>P = 0,0238</b>    |

### LDH Grupo CONTROL vs. TRATADO a las 72 horas post-reperfusion

|   |                       |                     |
|---|-----------------------|---------------------|
| Muestra 1                               |                       |                     |
| Variable                                | LDH 72 hs.            |                     |
| Grupo                                   | Control               |                     |
| Muestra 2                               |                       |                     |
| Variable                                | LDH 72 hs.            |                     |
| Grupo                                   | Lidocaína             |                     |
|   | 72 hs. Control        | 72 hs. Lidocaína    |
| Tamaño muestra n=                       | 6                     | 6                   |
| Media Aritmética                        | 1002,0000             | 446,6667            |
| 95% Intervalo Confianza                 | 581,4410 a 1422,5590  | 347,8197 a 545,5136 |
| Variance                                | 160598,8000           | 8871,8667           |
| Desvío Standard                         | 400,7478              | 94,1906             |
| Error Standard                          | 163,6046              | 38,4531             |
| F-test for equal variances              |                       | P = 0,006           |
| Welch-test (assuming unequal variances) |                       |                     |
| Diferencia                              | -555,3333             |                     |
| Error Standard                          | 168,0628              |                     |
| 95% Intervalo Confianza                 | -966,5682 a -144,0984 |                     |
| Test statistic t                        | -3,304                |                     |
| Grado de Libertad (DF)                  | 5,6                   |                     |
| P=                                      | <b>P = 0,0163</b>     |                     |

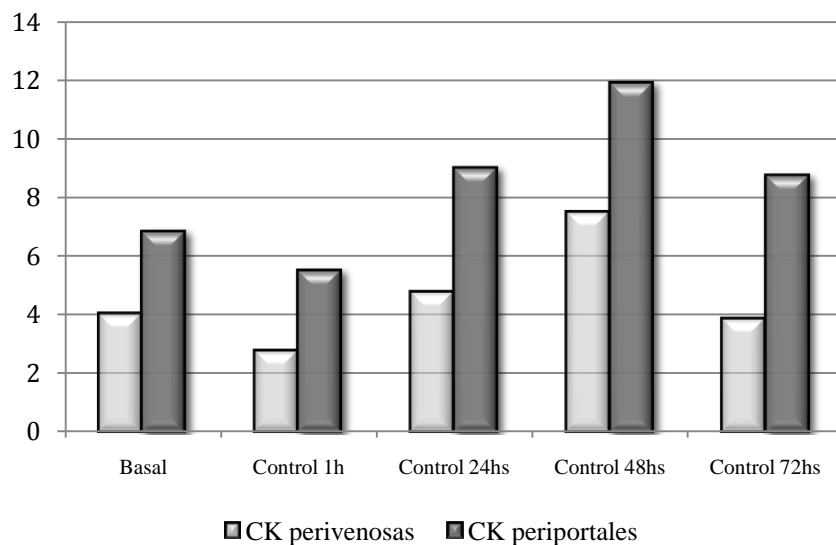
## Estudio Histológico

Con el fin de estudiar las poblaciones celulares del hígado de rata en condiciones basales y a los diferentes tiempos de reperusión, se cuantificaron numérica y densitométricamente las células de Kupffer (perivenosas y periportales) y los leucocitos (perivenosos y periportales) utilizando un analizador de imágenes digitalizadas en 10 cortes histológicos para cada explanto.

Se calcularon los recuentos celulares medios de cada animal para, a su vez, obtener el recuento celular medio de cada subgrupo, los cuales se reflejan en la siguiente tabla:

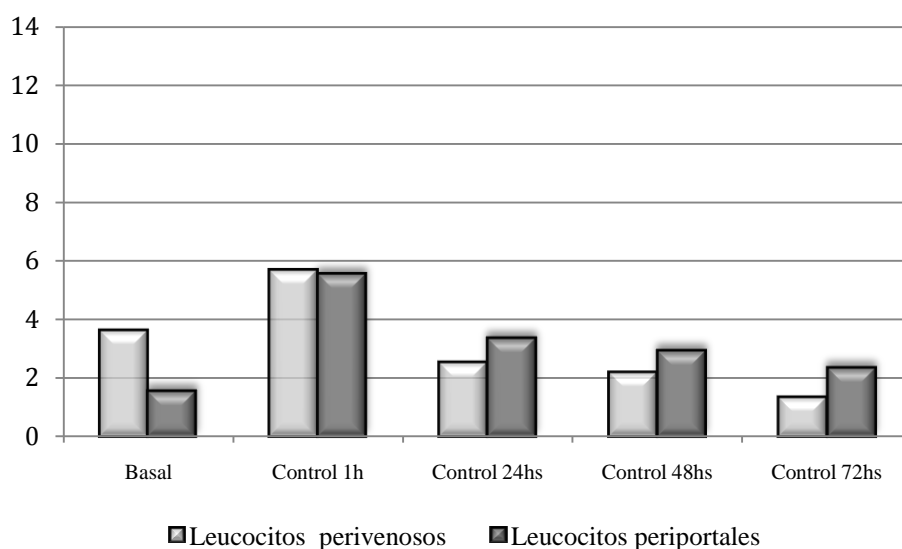
|                       | Media CK perivenosas | Media CK periportales |
|-----------------------|----------------------|-----------------------|
| <b>Basal</b>          | 4,02                 | 6,84                  |
| <b>Control 1 h</b>    | 2,76                 | 5,51                  |
| <b>Control 24 hs.</b> | 4,76                 | 9                     |
| <b>Control 48 hs.</b> | 7,46                 | 11,9                  |
| <b>Control 72 hs.</b> | 3,85                 | 8,75                  |

Se trazó el gráfico que muestra las variaciones en la cantidad de células de Kupffer perivenosas y periportales en el grupo CONTROL en relación a los diferentes tiempos post-reperusión:



|                       | Media Leucocitos perivenosos | Media Leucocitos periportales |
|-----------------------|------------------------------|-------------------------------|
| <b>Basal</b>          | 3,62                         | 1,56                          |
| <b>Control 1 h</b>    | 5,66                         | 5,53                          |
| <b>Control 24 hs.</b> | 2,53                         | 3,36                          |
| <b>Control 48 hs.</b> | 2,2                          | 2,93                          |
| <b>Control 72 hs.</b> | 1,35                         | 2,35                          |

Se trazó el gráfico que muestra las variaciones en la cantidad de células de los leucocitos perivenosos y periportales en el grupo CONTROL en relación a los diferentes tiempos post-reperfusion:



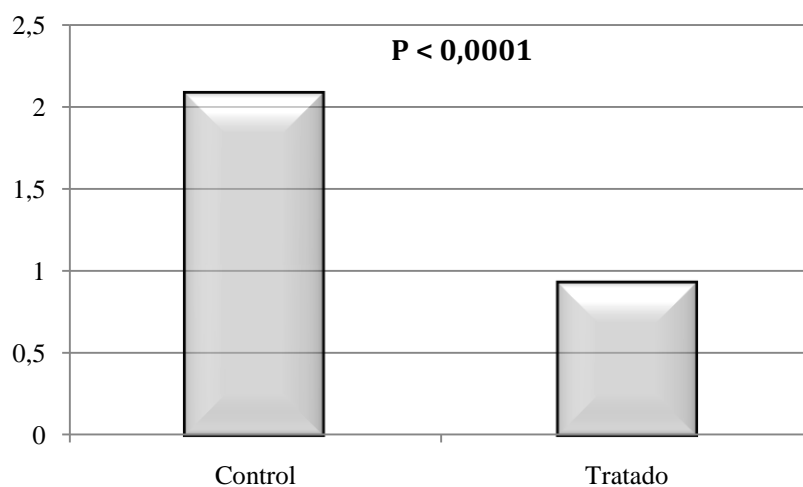
Mediante técnica de TUNEL se evaluó la presencia de cuerpos apoptóticos en 10 campos 200x para cada animal. En la siguiente tabla se enuncian las medias aritméticas para cada animal y la media total del grupo CONTROL Y TRATADO a las 24 horas postreperfusion:



| <i>Animal</i>          | <i>Apoptosis (media)</i> |
|------------------------|--------------------------|
| <i>24 hs control 1</i> | 1,7                      |
| <i>24 hs control 2</i> | 2,7                      |
| <i>24 hs control 3</i> | 1,9                      |
| <i>24 hs control 4</i> | 2,1                      |
| <i>24 hs control 5</i> | 2,2                      |
| <i>24 hs control 6</i> | 1,9                      |
| <i>Media Total</i>     | 2,08                     |

| <i>Animal</i>            | <i>Apoptosis (media)</i> |
|--------------------------|--------------------------|
| <i>24 hs Lidocaína 1</i> | 1,2                      |
| <i>24 hs Lidocaína 2</i> | 0,7                      |
| <i>24 hs Lidocaína 3</i> | 1                        |
| <i>24 hs Lidocaína 4</i> | 0,9                      |
| <i>24 hs Lidocaína 5</i> | 0,8                      |
| <i>24 hs Lidocaína 6</i> | 1                        |
| <i>Media total</i>       | 0,93                     |

Representación gráfica de la presencia de cuerpos apoptóticos a las 24 horas de la reperfusion:



Se realizó el estudio estadístico con el fin de determinar si existieron diferencias significativas en el recuento de cuerpos apoptóticos entre ambos grupos.

**APOPTOSIS Grupo CONTROL vs. TRATADO**  
a las 24 horas post-reperusión

| Muestra 1                                |                      |                  |  |
|--|----------------------|------------------|--|
| Variable                                 |                      | Apoptosis        |  |
| Grupo                                    |                      | 24 hs. Control   |  |
| Muestra 2                                |                      |                  |  |
| Variable                                 |                      | Apoptosis        |  |
| Grupo                                    |                      | 24 hs. Lidocaína |  |
|  | 24 hs. Control       | 24 hs. Lidocaína |  |
| Tamaño muestra n=                        | 6                    | 6                |  |
| Media Aritmética                         | 2,0833               | 0,9333           |  |
| 95% Intervalo Confianza                  | 1,7173 a 2,4494      | 0,7496 a 1,1171  |  |
| Variance                                 | 0,1217               | 0,03067          |  |
| Desvío Standard                          | 0,3488               | 0,1751           |  |
| Error Standard                           | 0,1424               | 0,07149          |  |
| F-test for equal variances               | P = 0,157            |                  |  |
| <b>T-test (assuming equal variances)</b> |                      |                  |  |
| Diferencia                               | -1,15                |                  |  |
| Error Standard                           | 0,1593               |                  |  |
| 95% Intervalo Confianza                  | -1,5050 a -0,7950    |                  |  |
| Test statistic t                         | -7,217               |                  |  |
| Grado de Libertad (DF)                   | 10                   |                  |  |
| P=                                       | <b>P &lt; 0,0001</b> |                  |  |

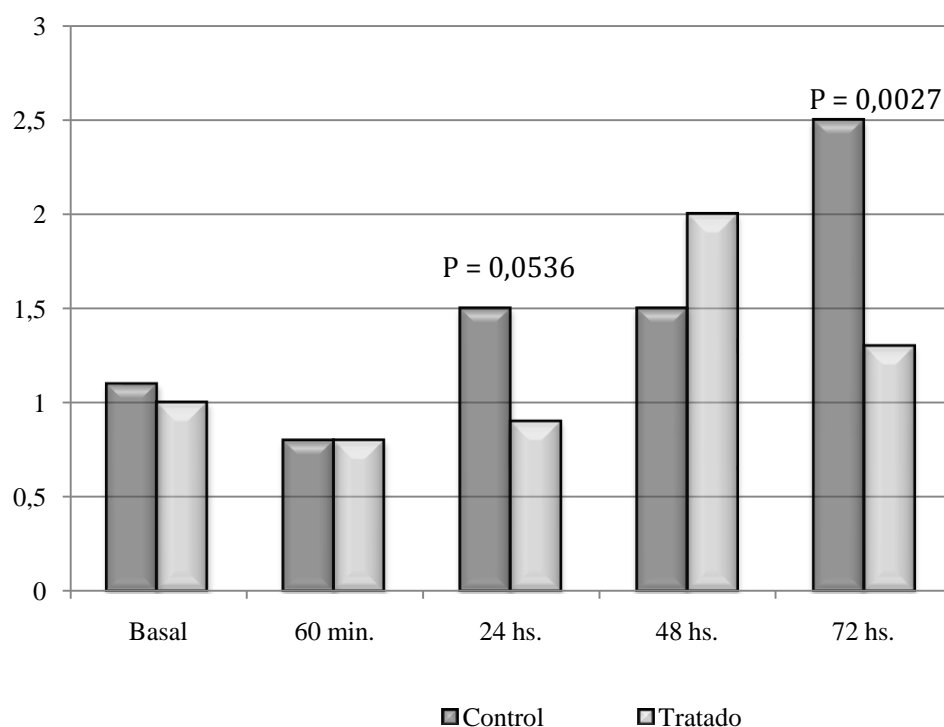
## Resultados de TNF- $\alpha$ por PCR

Se realizó la técnica de PCR para la detección de las variaciones del TNF- $\alpha$  en cada uno de los distintos tiempos de reperfusion para cada animal, se obtuvieron las medias aritméticas para cada grupo y se representaron los resultados en el correspondiente gráfico.

| <i>Animal</i>            | <i>TNF-<math>\alpha</math></i> | <i>Animal</i>              | <i>TNF-<math>\alpha</math></i> |
|--------------------------|--------------------------------|----------------------------|--------------------------------|
| <i>Control basal 1</i>   | 0,7                            | <i>Lidocaína basal 1</i>   | 0,7                            |
| <i>Control basal 2</i>   | 1,3                            | <i>Lidocaína basal 2</i>   | 1,3                            |
| <i>Control basal 3</i>   | 1,3                            | <i>Lidocaína basal 3</i>   | 1,3                            |
| <i>Control basal 4</i>   | 0,9                            | <i>Lidocaína basal 4</i>   | 0,9                            |
| <i>Control basal 5</i>   | 1,0                            | <i>Lidocaína basal 5</i>   | 0,9                            |
| <i>Control basal 6</i>   | 1,0                            | <i>Lidocaína basal 6</i>   | 0,9                            |
| <i>Control 60 min. 1</i> | 0,3                            | <i>Lidocaína 60 min. 1</i> | 0,6                            |
| <i>Control 60 min. 2</i> | 1,0                            | <i>Lidocaína 60 min. 2</i> | 0,7                            |
| <i>Control 60 min. 3</i> | 0,5                            | <i>Lidocaína 60 min. 3</i> | 0,9                            |
| <i>Control 60 min. 4</i> | 1,4                            | <i>Lidocaína 60 min. 4</i> | 1,1                            |
| <i>Control 60 min. 5</i> | 0,8                            | <i>Lidocaína 60 min. 5</i> | 0,8                            |
| <i>Control 60 min. 6</i> | 0,8                            | <i>Lidocaína 60 min. 6</i> | 0,8                            |
| <i>Control 24 hs. 1</i>  | 1,0                            | <i>Lidocaína 24 hs. 1</i>  | 0,9                            |
| <i>Control 24 hs. 2</i>  | 1,0                            | <i>Lidocaína 24 hs. 2</i>  | 0,9                            |
| <i>Control 24 hs. 3</i>  | 2,0                            | <i>Lidocaína 24 hs. 3</i>  | 1,0                            |
| <i>Control 24 hs. 4</i>  | 1,5                            | <i>Lidocaína 24 hs. 4</i>  | 0,9                            |
| <i>Control 24 hs. 5</i>  | 1,5                            | <i>Lidocaína 24 hs. 5</i>  | 0,7                            |
| <i>Control 24 hs. 6</i>  | 2,0                            | <i>Lidocaína 24 hs. 6</i>  | 0,9                            |
| <i>Control 48 hs. 1</i>  | 1,7                            | <i>Lidocaína 48 hs. 1</i>  | 1,5                            |
| <i>Control 48 hs. 2</i>  | 1,5                            | <i>Lidocaína 48 hs. 2</i>  | 2,0                            |
| <i>Control 48 hs. 3</i>  | 1,4                            | <i>Lidocaína 48 hs. 3</i>  | 2,5                            |
| <i>Control 48 hs. 4</i>  | 2,0                            | <i>Lidocaína 48 hs. 4</i>  | 3,0                            |
| <i>Control 48 hs. 5</i>  | 1,5                            | <i>Lidocaína 48 hs. 5</i>  | 1,0                            |
| <i>Control 48 hs. 6</i>  | 1,0                            | <i>Lidocaína 48 hs. 6</i>  | 2,0                            |
| <i>Control 72 hs. 1</i>  | 2,5                            | <i>Lidocaína 72 hs. 1</i>  | 1,3                            |
| <i>Control 72 hs. 2</i>  | 2,0                            | <i>Lidocaína 72 hs. 2</i>  | 2,2                            |
| <i>Control 72 hs. 3</i>  | 3,0                            | <i>Lidocaína 72 hs. 3</i>  | 1,0                            |
| <i>Control 72 hs. 4</i>  | 2,5                            | <i>Lidocaína 72 hs. 4</i>  | 1,0                            |
| <i>Control 72 hs. 5</i>  | 2,5                            | <i>Lidocaína 72 hs. 5</i>  | 1,3                            |
| <i>Control 72 hs. 6</i>  | 2,5                            | <i>Lidocaína 72 hs. 6</i>  | 1,1                            |

| <i>Medias Grupo Control</i>  | <b>TNF-<math>\alpha</math></b> | <i>Medias Grupo Lidocaína</i>  | <b>TNF-<math>\alpha</math></b> |
|------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| <i>Media Control Basal</i>   | 1,1                            | <i>Media Lidocaína basal</i>   | 1,0                            |
| <i>Media Control 60 min.</i> | 0,8                            | <i>Media Lidocaína 60 min.</i> | 0,8                            |
| <i>Media Control 24 hs.</i>  | 1,5                            | <i>Media Lidocaína 24 hs.</i>  | 0,9                            |
| <i>Media Control 48 hs.</i>  | 1,5                            | <i>Media Lidocaína 48 hs.</i>  | 2,0                            |
| <i>Media Control 72 hs.</i>  | 2,5                            | <i>Media Lidocaína 72 hs.</i>  | 1,3                            |

TNF- $\alpha$  por PCR



Se compararon los resultados entre ambos grupos aplicando el método estadístico.

## TNF- $\alpha$ por PCR Grupo CONTROL vs. TRATADO

### Basal

| Muestra 1                  |                  |                  |
|----------------------------|------------------|------------------|
| Variable                   | TNF- $\alpha$    |                  |
| Grupo                      | Basal Control    |                  |
| Muestra 2                  |                  |                  |
| Variable                   | TNF- $\alpha$    |                  |
| Grupo                      | Basal Lidocaína  |                  |
|                            | Basal Control    | Basal Lidocaína  |
| Tamaño muestra n=          | 6                | 6                |
| Media Aritmética           | 1,0333           | 1,0000           |
| 95% Intervalo Confianza    | 0,7880 to 1,2787 | 0,7429 to 1,2571 |
| Variance                   | 0,05467          | 0,0600           |
| Desvío Standard            | 0,2338           | 0,2449           |
| Error Standard             | 0,09545          | 0,1000           |
| F-test for equal variances | P = 0,921        |                  |

T-test (assuming equal variances)

|                         |                   |
|-------------------------|-------------------|
| Diferencia              | -0,03333          |
| Error Standard          | 0,1382            |
| 95% Intervalo Confianza | -0,3414 to 0,2747 |
| Test statistic t        | -0,241            |
| Grado de Libertad (DF)  | 10                |
| P=                      | P = 0,8143        |

## TNF- $\alpha$ por PCR Grupo CONTROL vs. TRATADO

a los 60 minutos post-reperfusion

| Muestra 1 |                  |                  |
|-----------|------------------|------------------|
| Variable  | TNF- $\alpha$    |                  |
| Grupo     | 60 min Control   |                  |
| Muestra 2 |                  |                  |
| Variable  | TNF- $\alpha$    |                  |
| Grupo     | 60 min Lidocaína |                  |
|           | 60 min Control   | 60 min Lidocaína |

|                                   |                  |                   |
|-----------------------------------|------------------|-------------------|
| Tamaño muestra n=                 | 6                | 6                 |
| Media Aritmética                  | 0,8000           | 0,8200            |
| 95% Intervalo Confianza           | 0,2659 to 1,3341 | 0,5812 to 1,0588  |
| Variance                          | 0,1850           | 0,0370            |
| Desvío Standard                   | 0,4301           | 0,1924            |
| Error Standard                    | 0,1924           | 0,08602           |
| F-test for equal variances        |                  | P = 0,148         |
| T-test (assuming equal variances) |                  |                   |
| Diferencia                        |                  | 0,0200            |
| Error Standard                    |                  | 0,2107            |
| 95% Intervalo Confianza           |                  | -0,4659 to 0,5059 |
| Test statistic t                  |                  | 0,0949            |
| Grado de Libertad (DF)            |                  | 8                 |
| P=                                |                  | P = 0,9267        |

## TNF- $\alpha$ por PCR Grupo CONTROL vs. TRATADO

24 hs post-reperusión

|   |                      |                    |
|---|----------------------|--------------------|
| Muestra 1                               |                      |                    |
| Variable                                | TNF- $\alpha$ 24 hs. |                    |
| Grupo                                   | Control              |                    |
| Muestra 2                               |                      |                    |
| Variable                                | TNF- $\alpha$ 24 hs. |                    |
| Grupo                                   | Lidocaína            |                    |
|   | 24 hs. Control       | 24 hs. Lidocaína   |
| Tamaño muestra n=                       | 6                    | 6                  |
| Media Aritmética                        | 1,5000               | 0,8800             |
| 95% Intervalo Confianza                 | 0,8792 to 2,1208     | 0,7440 to 1,0160   |
| Variance                                | 0,2500               | 0,0120             |
| Desvío Standard                         | 0,5000               | 0,1095             |
| Error Standard                          | 0,2236               | 0,04899            |
| F-test for equal variances              | P = 0,012            |                    |
| Welch-test (assuming unequal variances) |                      |                    |
|   |                      | -0,6200            |
| Error Standard                          |                      | 0,2289             |
| 95% Intervalo Confianza                 |                      | -1,2556 to 0,01556 |
| Test statistic t                        |                      | -2,708             |

|                        |            |
|------------------------|------------|
| Grado de Libertad (DF) | 4,4        |
| P=                     | P = 0,0536 |

TNF- $\alpha$  por PCR Grupo CONTROL vs. TRATADO

48 hs post-reperfusion

|                            |                  |                  |
|----------------------------|------------------|------------------|
| Muestra 1                  |                  |                  |
| Variable                   | 48 hs.           |                  |
| Grupo                      | Control          |                  |
| Muestra 2                  |                  |                  |
| Variable                   | 48 hs.           |                  |
| Grupo                      | Lidocaína        |                  |
|                            | 48 hs. Control   | 48 hs. Lidocaína |
| Tamaño muestra n=          | 6                | 6                |
| Media Aritmética           | 1,5200           | 2,0000           |
| 95% Intervalo Confianza    | 1,0604 to 1,9796 | 1,0184 to 2,9816 |
| Variance                   | 0,1370           | 0,6250           |
| Desví Standard             | 0,3701           | 0,7906           |
| Error Standard             | 0,1655           | 0,3536           |
| F-test for equal variances | P = 0,171        |                  |

T-test (assuming equal variances)

|                         |                   |
|-------------------------|-------------------|
|                         | 0,4800            |
| Error Standard          | 0,3904            |
| 95% Intervalo Confianza | -0,4202 to 1,3802 |
| Test statistic t        | 1,230             |
| Grado de Libertad (DF)  | 8                 |
| P=                      | P = 0,2538        |

TNF- $\alpha$  por PCR Grupo CONTROL vs. TRATADO

72 hs post-reperfusion

|           |         |
|-----------|---------|
| Muestra 1 |         |
| Variable  | 72 hs.  |
| Grupo     | Control |

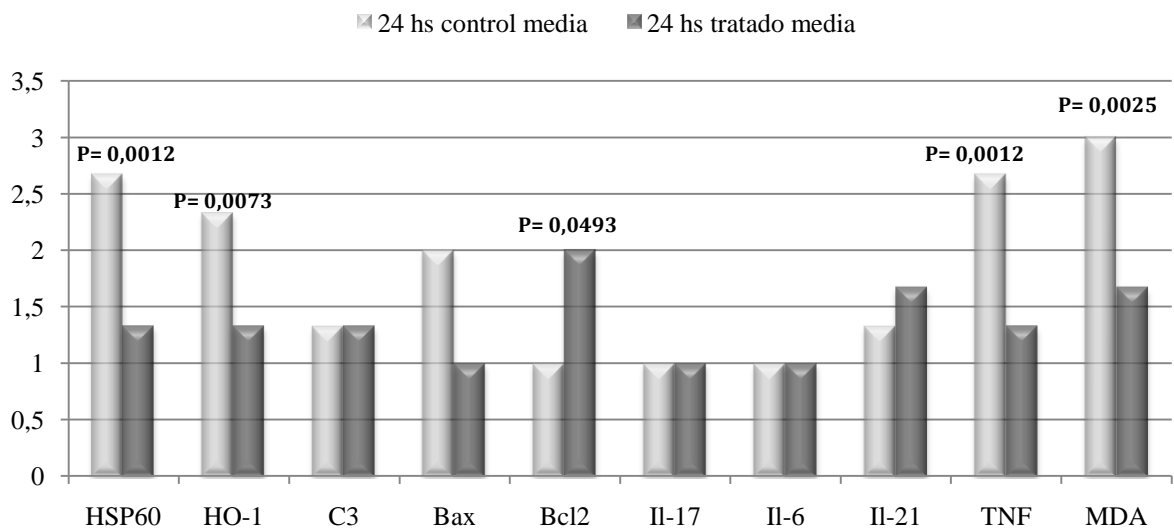
| Muestra 2                         |                    |                  |
|-----------------------------------|--------------------|------------------|
| Variable                          | 72 hs.             |                  |
| Grupo                             | Lidocaína          |                  |
|                                   | 72 hs. Control     | 72 hs. Lidocaína |
| Tamaño muestra n=                 | 6                  | 6                |
| Media Aritmética                  | 2,5000             | 1,3200           |
| 95% Intervalo Confianza           | 2,0610 to 2,9390   | 0,6905 to 1,9495 |
| Variance                          | 0,1250             | 0,2570           |
| Desvío Standard                   | 0,3536             | 0,5070           |
| Error Standard                    | 0,1581             | 0,2267           |
| F-test for equal variances        | P = 0,502          |                  |
| T-test (assuming equal variances) |                    |                  |
| Diferencia                        | -1,1800            |                  |
| Error Standard                    | 0,2764             |                  |
| 95% Intervalo Confianza           | -1,8174 to -0,5426 |                  |
| Test statistic t                  | -4,269             |                  |
| Grado de Libertad (DF)            | 8                  |                  |
| P=                                | P = 0,0027         |                  |



## Resultados de Inmunohistoquímica

La siguiente tabla y gráfico muestran los valores que reflejan el promedio de 10 campos 200x para cada animal en base a la escala semicuantitativa descrita en Material y Métodos para cada uno de los marcadores de injuria:

| <i>Animal</i>              | <b>HSP60</b> | <b>HO-1</b> | <b>C3</b> | <b>Bax</b> | <b>Bcl2</b> | <b>Il-17</b> | <b>Il-6</b> | <b>Il-21</b> | <b>TNF-<math>\alpha</math></b> | <b>MDA</b> |
|----------------------------|--------------|-------------|-----------|------------|-------------|--------------|-------------|--------------|--------------------------------|------------|
| <i>24 hs control 1</i>     | 3            | 3           | 1         | 1          | 1           | 1            | 1           | 1            | 3                              | 3          |
| <i>24 hs control 2</i>     | 3            | 2           | 1         | 3          | 1           | 1            | 1           | 2            | 3                              | 3          |
| <i>24 hs control 3</i>     | 3            | 2           | 2         | 2          | 1           | 1            | 1           | 1            | 2                              | 3          |
| <i>24 hs control 4</i>     | 2            | 3           | 1         | 1          | 1           | 1            | 1           | 1            | 3                              | 3          |
| <i>24 hs control 5</i>     | 3            | 2           | 2         | 2          | 1           | 1            | 1           | 1            | 2                              | 3          |
| <i>24 hs control 6</i>     | 2            | 2           | 1         | 3          | 1           | 1            | 1           | 2            | 3                              | 3          |
| <i>24 hs control media</i> | 2,67         | 2,33        | 1,33      | 2          | 1           | 1            | 1           | 1,33         | 2,67                           | 3          |
| <i>24 hs Lidocaína 1</i>   | 1            | 2           | 1         | 1          | 1           | 1            | 1           | 2            | 1                              | 2          |
| <i>24 hs Lidocaína 2</i>   | 1            | 2           | 2         | 1          | 2           | 1            | 1           | 2            | 1                              | 2          |
| <i>24 hs Lidocaína 3</i>   | 1            | 1           | 1         | 1          | 3           | 1            | 1           | 1            | 2                              | 1          |
| <i>24 hs Lidocaína 4</i>   | 2            | 1           | 2         | 1          | 2           | 1            | 1           | 1            | 1                              | 2          |
| <i>24 hs Lidocaína 5</i>   | 2            | 1           | 1         | 1          | 1           | 1            | 1           | 2            | 1                              | 2          |
| <i>24 hs Lidocaína 6</i>   | 1            | 1           | 1         | 1          | 3           | 1            | 1           | 2            | 2                              | 1          |
| <i>24 hs tratado media</i> | 1,33         | 1,33        | 1,33      | 1          | 2           | 1            | 1           | 1,67         | 1,33                           | 1,67       |



Se realizó el estudio estadístico con el fin de determinar si existieron diferencias significativas entre ambos grupos para cada uno de los diferentes marcadores de injuria por isquemia-reperfusion.

### HSP60 Grupo CONTROL vs. TRATADO a las 24 horas post-reperfusion

| Muestra 1                         |                   |                  |
|-----------------------------------|-------------------|------------------|
| Variable                          | HSP60             |                  |
| Grupo                             | 24 hs. Control    |                  |
| Muestra 2                         |                   |                  |
| Variable                          | HSP60             |                  |
| Grupo                             | 24 hs Lidocaína   |                  |
|                                   | 24 hs. Control    | 24 hs. Lidocaína |
| Tamaño muestra n=                 | 6                 | 6                |
| Media Aritmética                  | 2,6667            | 1,3333           |
| 95% Intervalo Confianza           | 2,1247 a 3,2086   | 0,7914 a 1,8753  |
| Variance                          | 0,2667            | 0,2667           |
| Desvío Standard                   | 0,5164            | 0,5164           |
| Error Standard                    | 0,2108            | 0,2108           |
| F-test for equal variances        | P = 1,000         |                  |
| T-test (assuming equal variances) |                   |                  |
| Diferencia                        | -1,3333           |                  |
| Error Standard                    | 0,2981            |                  |
| 95% Intervalo Confianza           | -1,9976 a -0,6690 |                  |
| Test statistic t                  | -4,472            |                  |
| Grado de Libertad (DF)            | 10                |                  |
| P=                                | P = 0,0012        |                  |

### HO-1 Grupo CONTROL vs. TRATADO a las 24 horas post-reperfusion

| Muestra 1 |                  |
|-----------|------------------|
| Variable  | HO-1             |
| Grupo     | 24 hs. Control   |
| Muestra 2 |                  |
| Variable  | HO-1             |
| Grupo     | 24 hs. Lidocaína |

|                                   | 24 hs. Control  | 24 hs. Lidocaína  |
|-----------------------------------|-----------------|-------------------|
| Tamaño muestra n=                 | 6               | 6                 |
| Media Aritmética                  | 2,3333          | 1,3333            |
| 95% Intervalo Confianza           | 1,7914 a 2,8753 | 0,7914 a 1,8753   |
| Variance                          | 0,2667          | 0,2667            |
| Desví Standard                    | 0,5164          | 0,5164            |
| Error Standard                    | 0,2108          | 0,2108            |
| F-test for equal variances        |                 | P = 1,000         |
| T-test (assuming equal variances) |                 |                   |
| Diferencia                        |                 | -1,0000           |
| Error Standard                    |                 | 0,2981            |
| 95% Intervalo Confianza           |                 | -1,6643 a -0,3357 |
| Test statistic t                  |                 | -3,354            |
| Grado de Libertad (DF)            |                 | 10                |
| P=                                |                 | <b>P = 0,0073</b> |

### C3 Grupo CONTROL vs. TRATADO a las 24 horas post-reperusión

|                                   |                 |                  |
|-----------------------------------|-----------------|------------------|
| Muestra 1                         |                 |                  |
| Variable                          |                 | C3               |
| Grupo                             |                 | 24 hs. Control   |
| Muestra 2                         |                 |                  |
| Variable                          |                 | C3               |
| Grupo                             |                 | 24 hs. Lidocaína |
|                                   | 24 hs. Control  | 24 hs. Lidocaína |
| Tamaño muestra n=                 | 6               | 6                |
| Media Aritmética                  | 1,3333          | 1,3333           |
| 95% Intervalo Confianza           | 0,7914 a 1,8753 | 0,7914 a 1,8753  |
| Variance                          | 0,2667          | 0,2667           |
| Desví Standard                    | 0,5164          | 0,5164           |
| Error Standard                    | 0,2108          | 0,2108           |
| F-test for equal variances        |                 | P = 1,000        |
| T-test (assuming equal variances) |                 |                  |
| Diferencia                        |                 | 0,0000           |
| Error Standard                    |                 | 0,2981           |
| 95% Intervalo Confianza           |                 | -0,6643 a 0,6643 |
| Test statistic t                  |                 | 0,000            |
| Grado de Libertad (DF)            |                 | 10               |
| P=                                |                 | P = 1,0000       |

Bax Grupo CONTROL vs. TRATADO a las 24 horas post-reperfusion

| Muestra 1                         |                   |                  |
|-----------------------------------|-------------------|------------------|
| Variable                          | Bax               |                  |
| Grupo                             | 24 hs. Control    |                  |
| Muestra 2                         |                   |                  |
| Variable                          | Bax               |                  |
| Grupo                             | 24 hs. Lidocaína  |                  |
|                                   | 24 hs. Control    | 24 hs. Lidocaína |
| Tamaño muestra n=                 | 6                 | 6                |
| Media Aritmética                  | 2,0000            | 1,1667           |
| 95% Intervalo Confianza           | 1,0614 a 2,9386   | 0,7382 a 1,5951  |
| Variance                          | 0,8000            | 0,1667           |
| Desvío Standard                   | 0,8944            | 0,4082           |
| Error Standard                    | 0,3651            | 0,1667           |
| F-test for equal variances        | P = 0,110         |                  |
| T-test (assuming equal variances) |                   |                  |
| Diferencia                        | -0,8333           |                  |
| Error Standard                    | 0,4014            |                  |
| 95% Intervalo Confianza           | -1,7277 a 0,06101 |                  |
| Test statistic t                  | -2,076            |                  |
| Grado de Libertad (DF)            | 10                |                  |
| P=                                | P = 0,0646        |                  |

Bcl2 Grupo CONTROL vs. TRATADO a las 24 horas post-reperfusion

| Muestra 1                         |                  |                  |
|-----------------------------------|------------------|------------------|
| Variable                          | Bcl2             |                  |
| Grupo                             | 24 hs. Control   |                  |
| Muestra 2                         |                  |                  |
| Variable                          | Bcl2             |                  |
| Grupo                             | 24 hs. Lidocaína |                  |
|                                   | 24 hs. Control   | 24 hs. Lidocaína |
| Tamaño muestra n=                 | 6                | 6                |
| Media Aritmética                  | 1,0000           | 2,0000           |
| 95% Intervalo Confianza           | 0,3363 a 1,6637  | 1,0614 a 2,9386  |
| Variance                          | 0,4000           | 0,8000           |
| Desvío Standard                   | 0,6325           | 0,8944           |
| Error Standard                    | 0,2582           | 0,3651           |
| F-test for equal variances        | P = 0,465        |                  |
| T-test (assuming equal variances) |                  |                  |
| Diferencia                        | 1,0000           |                  |

|                         |                   |
|-------------------------|-------------------|
| Error Standard          | 0,4472            |
| 95% Intervalo Confianza | 0,003546 a 1,9965 |
| Test statistic t        | 2,236             |
| Grado de Libertad (DF)  | 10                |
| P=                      | <b>P = 0,0493</b> |

### II-17 Grupo CONTROL vs. TRATADO a las 24 horas post-reperfusion

|                                   |                  |                  |
|-----------------------------------|------------------|------------------|
| Muestra 1                         |                  |                  |
| Variable                          | II-17            |                  |
| Grupo                             | 24 hs. Control   |                  |
| Muestra 2                         |                  |                  |
| Variable                          | II-17            |                  |
| Grupo                             | 24 hs. Lidocaína |                  |
|                                   | 24 hs. Control   | 24 hs. Lidocaína |
| Tamaño muestra n=                 | 6                | 6                |
| Media Aritmética                  | 1,1667           | 1,1667           |
| 95% Intervalo Confianza           | 0,7382 a 1,5951  | 0,7382 a 1,5951  |
| Variance                          | 0,1667           | 0,1667           |
| Desvío Standard                   | 0,4082           | 0,4082           |
| Error Standard                    | 0,1667           | 0,1667           |
| F-test for equal variances        | P = 1,000        |                  |
| T-test (assuming equal variances) |                  |                  |
| Diferencia                        | 0,0000           |                  |
| Error Standard                    | 0,2357           |                  |
| 95% Intervalo Confianza           | -0,5252 a 0,5252 |                  |
| Test statistic t                  | 0,000            |                  |
| Grado de Libertad (DF)            | 10               |                  |
| P=                                | P = 1,0000       |                  |

### II-6 Grupo CONTROL vs. TRATADO a las 24 horas post-reperfusion

|           |                  |                  |
|-----------|------------------|------------------|
| Muestra 1 |                  |                  |
| Variable  | II-6             |                  |
| Muestra   | 24 hs. Control   |                  |
| Muestra 2 |                  |                  |
| Variable  | II-6             |                  |
| Muestra   | 24 hs. Lidocaína |                  |
|           | 24 hs. Control   | 24 hs. Lidocaína |

|                                   |                 |                  |
|-----------------------------------|-----------------|------------------|
| Tamaño muestra n=                 | 6               | 6                |
| Media Aritmética                  | 1,0000          | 1,0000           |
| 95% Intervalo Confianza           | 0,3363 a 1,6637 | 0,3363 a 1,6637  |
| Variance                          | 0,4000          | 0,4000           |
| Desvío Standard                   | 0,6325          | 0,6325           |
| Error Standard                    | 0,2582          | 0,2582           |
| F-test for equal variances        |                 | P = 1,000        |
| T-test (assuming equal variances) |                 |                  |
| Diferencia                        |                 | 0,0000           |
| Error Standard                    |                 | 0,3651           |
| 95% Intervalo Confianza           |                 | -0,8136 a 0,8136 |
| Test statistic t                  |                 | 0,000            |
| Grado de Libertad (DF)            |                 | 10               |
| P=                                |                 | P = 1,0000       |

## II-21 Grupo CONTROL vs. TRATADO a las 24 horas post-reperfusion

|                                   |                 |                  |
|-----------------------------------|-----------------|------------------|
| Muestra 1                         |                 |                  |
| Variable                          |                 | II-21            |
| Grupo                             |                 | 24 hs. Control   |
| Muestra 2                         |                 |                  |
| Variable                          |                 | II-21            |
| Grupo                             |                 | 24 hs. Lidocaína |
|                                   | 24 hs. Control  | 24 hs. Lidocaína |
| Tamaño muestra n=                 | 6               | 6                |
| Media Aritmética                  | 1,3333          | 1,6667           |
| 95% Intervalo Confianza           | 0,7914 a 1,8753 | 1,1247 a 2,2086  |
| Variance                          | 0,2667          | 0,2667           |
| Desvío Standard                   | 0,5164          | 0,5164           |
| Error Standard                    | 0,2108          | 0,2108           |
| F-test for equal variances        |                 | P = 1,000        |
| T-test (assuming equal variances) |                 |                  |
| Diferencia                        |                 | 0,3333           |
| Error Standard                    |                 | 0,2981           |
| 95% Intervalo Confianza           |                 | -0,3310 a 0,9976 |
| Test statistic t                  |                 | 1,118            |
| Grado de Libertad (DF)            |                 | 10               |
| P=                                |                 | P = 0,2897       |

TNF- $\alpha$  Grupo CONTROL vs. TRATADO a las 24 horas post-reperfusion

| Muestra 1                         |                   |                  |
|-----------------------------------|-------------------|------------------|
| Variable                          | TNF- $\alpha$     |                  |
| Grupo                             | 24 hs. Control    |                  |
| Muestra 2                         |                   |                  |
| Variable                          | TNF- $\alpha$     |                  |
| Grupo                             | 24 hs. Lidocaína  |                  |
|                                   | 24 hs. Control    | 24 hs. Lidocaína |
| Tamaño muestra n=                 | 6                 | 6                |
| Media Aritmética                  | 2,6667            | 1,3333           |
| 95% Intervalo Confianza           | 2,1247 a 3,2086   | 0,7914 a 1,8753  |
| Variance                          | 0,2667            | 0,2667           |
| Desvío Standard                   | 0,5164            | 0,5164           |
| Error Standard                    | 0,2108            | 0,2108           |
| F-test for equal variances        | P = 1,000         |                  |
| T-test (assuming equal variances) |                   |                  |
| Diferencia                        | -1,3333           |                  |
| Error Standard                    | 0,2981            |                  |
| 95% Intervalo Confianza           | -1,9976 a -0,6690 |                  |
| Test statistic t                  | -4,472            |                  |
| Grado de Libertad (DF)            | 10                |                  |
| P=                                | P = 0,0012        |                  |

MDA Grupo CONTROL vs. TRATADO a las 24 horas post-reperfusion

| Muestra 1                  |                  |                  |
|----------------------------|------------------|------------------|
| Variable                   | MDA              |                  |
| Grupo                      | 24 hs. Control   |                  |
| Muestra 2                  |                  |                  |
| Variable                   | MDA              |                  |
| Grupo                      | 24 hs. Lidocaína |                  |
|                            | 24 hs. Control   | 24 hs. Lidocaína |
| Tamaño muestra n=          | 6                | 6                |
| Media Aritmética           | 3,0000           | 1,6667           |
| 95% Intervalo Confianza    | 2,3363 a 3,6637  | 1,1247 a 2,2086  |
| Variance                   | 0,4000           | 0,2667           |
| Desvío Standard            | 0,6325           | 0,5164           |
| Error Standard             | 0,2582           | 0,2108           |
| F-test for equal variances | P = 0,667        |                  |

T-test (assuming equal variances)

|                         |                   |
|-------------------------|-------------------|
| Diferencia              | -1,3333           |
| Error Standard          | 0,3333            |
| 95% Intervalo Confianza | -2,0760 a -0,5906 |
| Test statistic t        | -4,000            |
| Grado de Libertad (DF)  | 10                |
| P=                      | <b>P = 0,0025</b> |



## Resultados - Resumen

En la siguiente tabla se sintetizan los diversos marcadores de injuria por isquemia reperfusion que mostraron diferencias estadísticamente significativas entre el Grupo Control y el Grupo Tratado con lidocaína.

| <i>Variable</i>                      | <i>Tiempo post-reperfusion</i> | <i>P=</i> |
|--------------------------------------|--------------------------------|-----------|
| <b>TGO</b>                           | 24 hs.                         | 0,03      |
| <b>LDH</b>                           | 24 hs.                         | 0,008     |
|                                      | 48 hs.                         | 0,002     |
|                                      | 72 hs.                         | 0,01      |
| <b>Apoptosis</b>                     | 24 hs.                         | 0,0001    |
| <b>TNF-<math>\alpha</math> (PCR)</b> | 24 hs.                         | 0,005     |
|                                      | 72 hs.                         | 0,002     |
| <b>HSP-60</b>                        | 24 hs.                         | 0,0012    |
| <b>HO-1</b>                          | 24 hs.                         | 0,007     |
| <b>Bcl-2</b>                         | 24 hs.                         | 0,04      |
| <b>TNF-<math>\alpha</math> (IHQ)</b> | 24 hs.                         | 0,0012    |
| <b>MDA</b>                           | 24 hs.                         | 0,0025    |

## *Imágenes*

## *TUNEL*

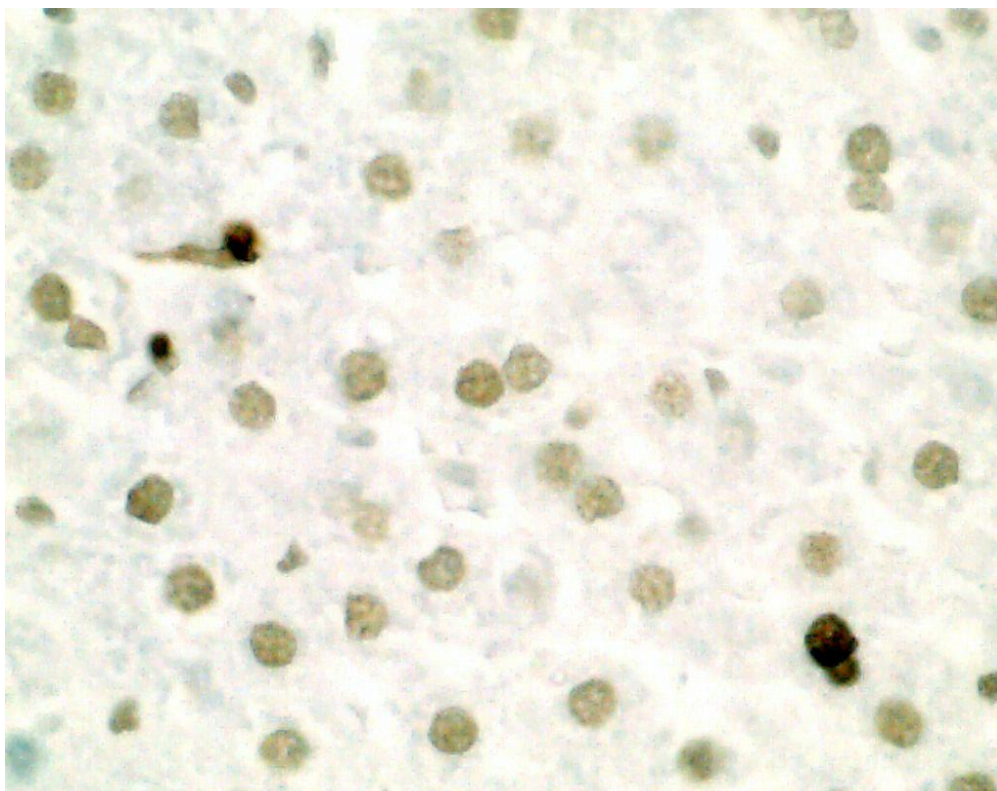


Fig. 1. Tres núcleos TUNEL positivos. El de menor tamaño corresponde a una célula intrasinusoidal. Técnica de TUNEL x 400

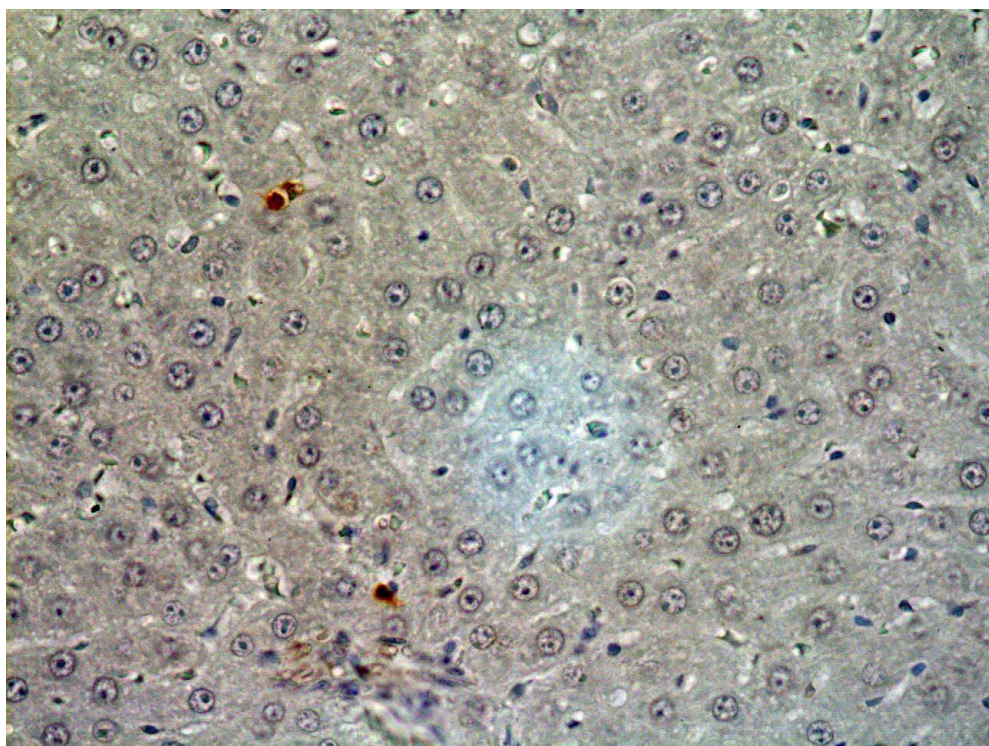


Fig. 2. Tres núcleos celulares TUNEL positivos. Técnica de TUNEL x 400

## *Inmunohistoquímica*

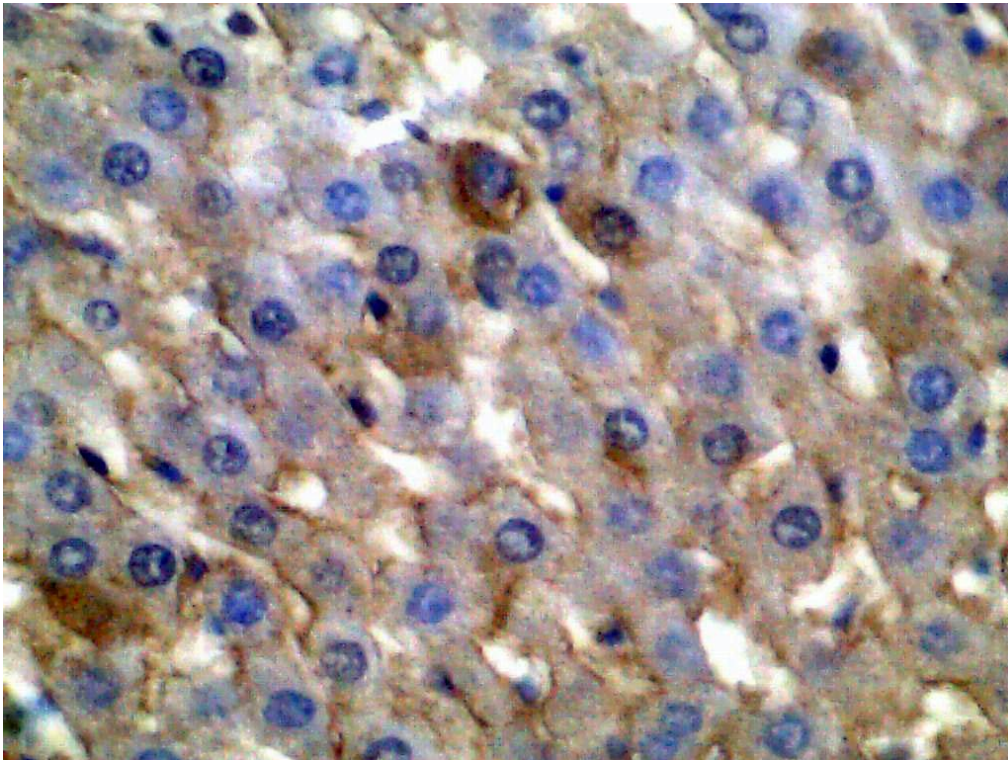


Fig. 3. Expresión de proteínas BAX en el citoplasma de ocasionales hepatocitos y en endotelios sinusoidales correspondiente a un animal del Grupo Control sacrificado a las 24 horas post-reperfusión. IHQ X 200

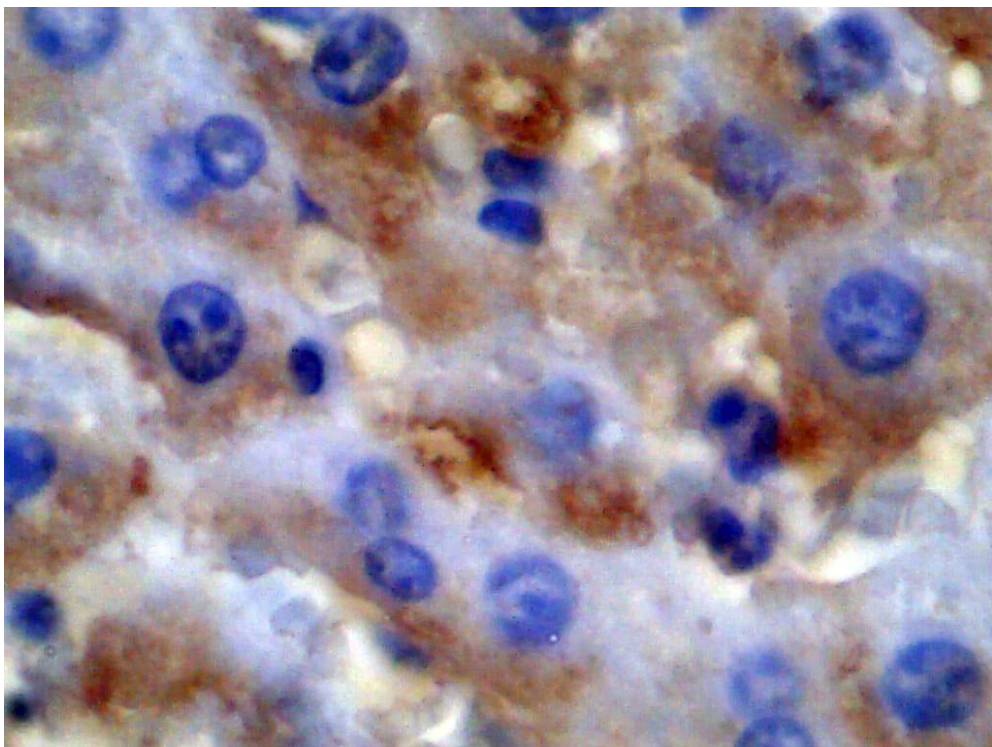


Fig. 4. Determinación IHQ de expresión de Bcl2 en hepatocitos y en endotelios sinusoidales del hígado de ratas tratadas con Lidocaína y sacrificadas a las 24 horas post-reperfusión. IHQ X 400

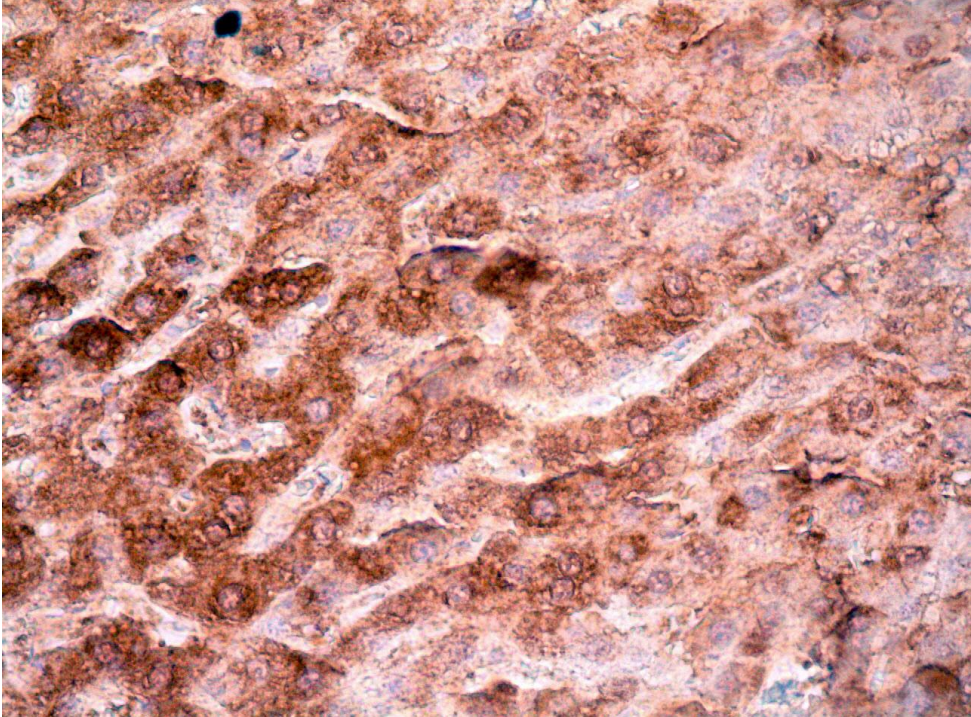


Fig. 5. Se detectó la presencia de C3 en forma focal en hepatocitos y paredes sinusoidales en animales de los Grupo Control y Tratado no encontrándose diferencias cuantitativas entre ambos grupos. IHQ X 400

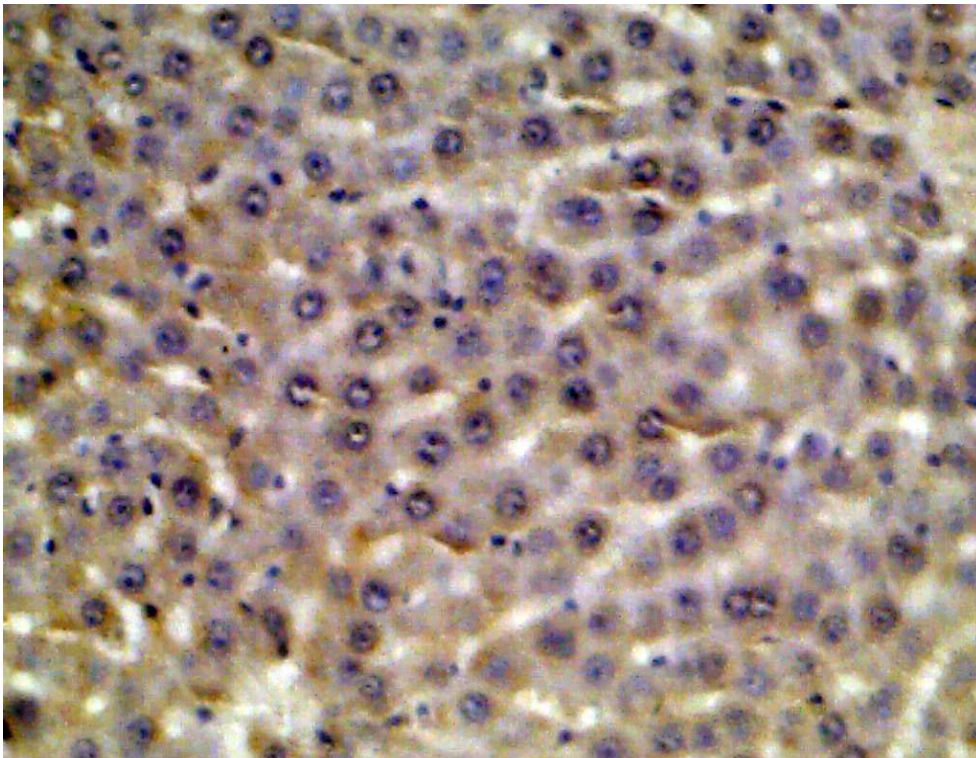


Fig. 6. Testigo control negativo de IHQ obviando el anticuerpo específico (Primario) IHQ x 100

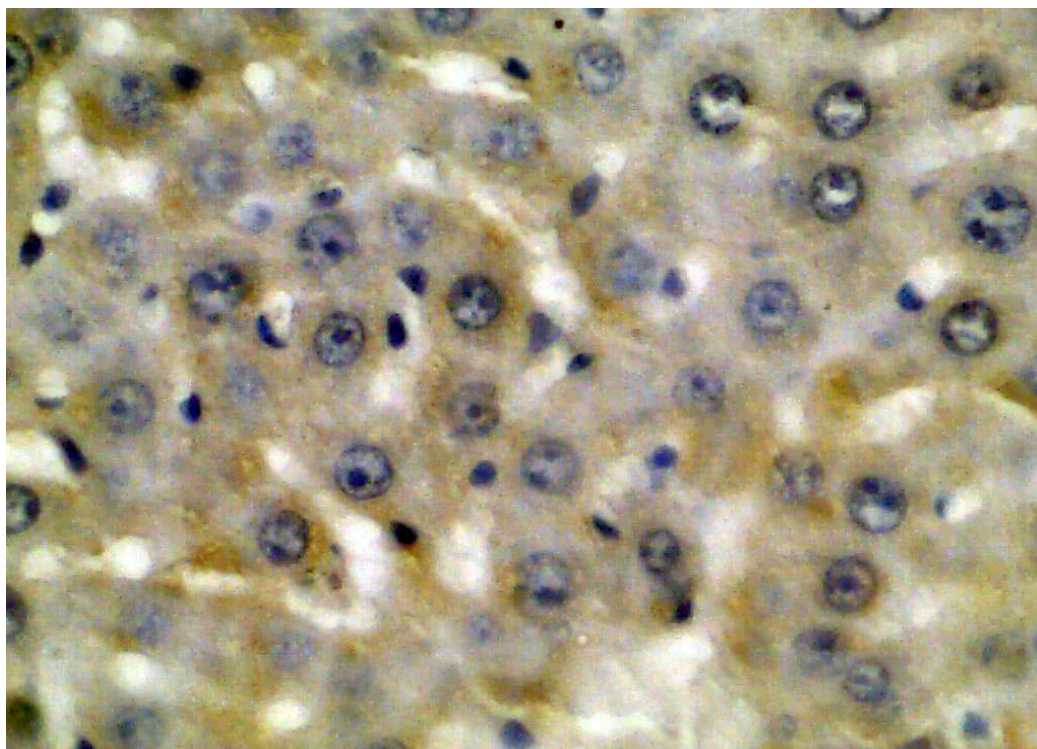


Fig. 7. Testigo control negativo de IHQ obviando el anticuerpo específico (Primario) IHQ x 200

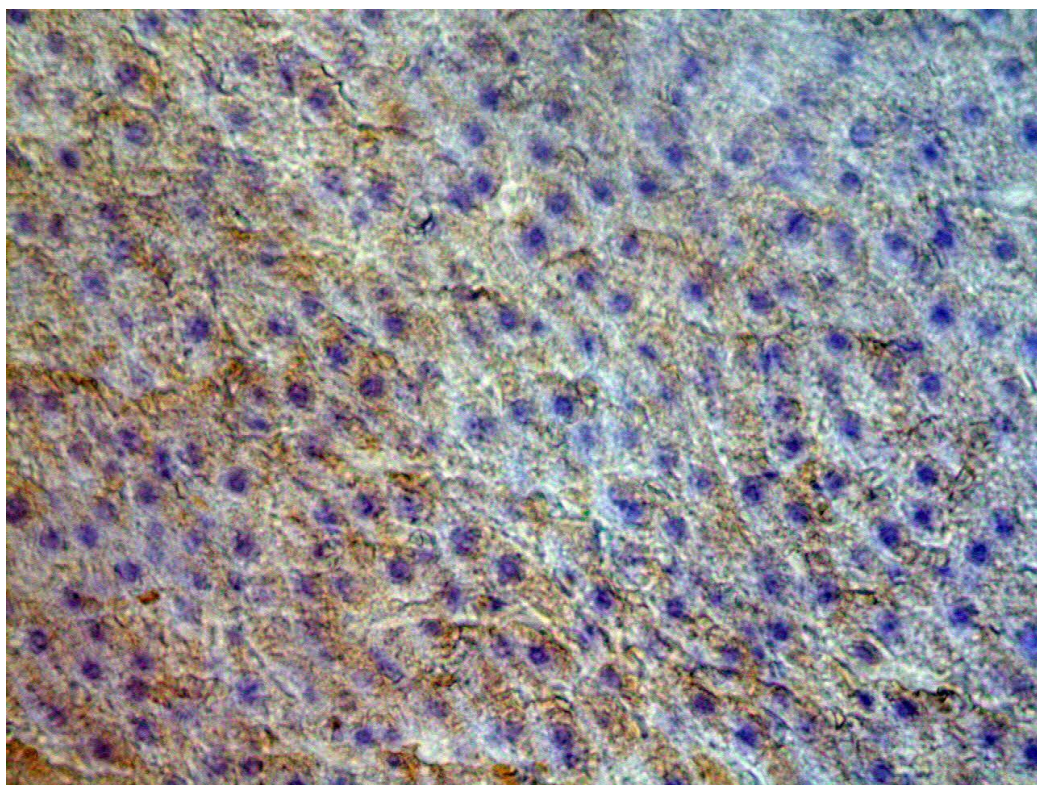


Fig. 8. Expresión de HO-1 en forma focal en tejido hepático de animales del grupo Control. IHQ X 400

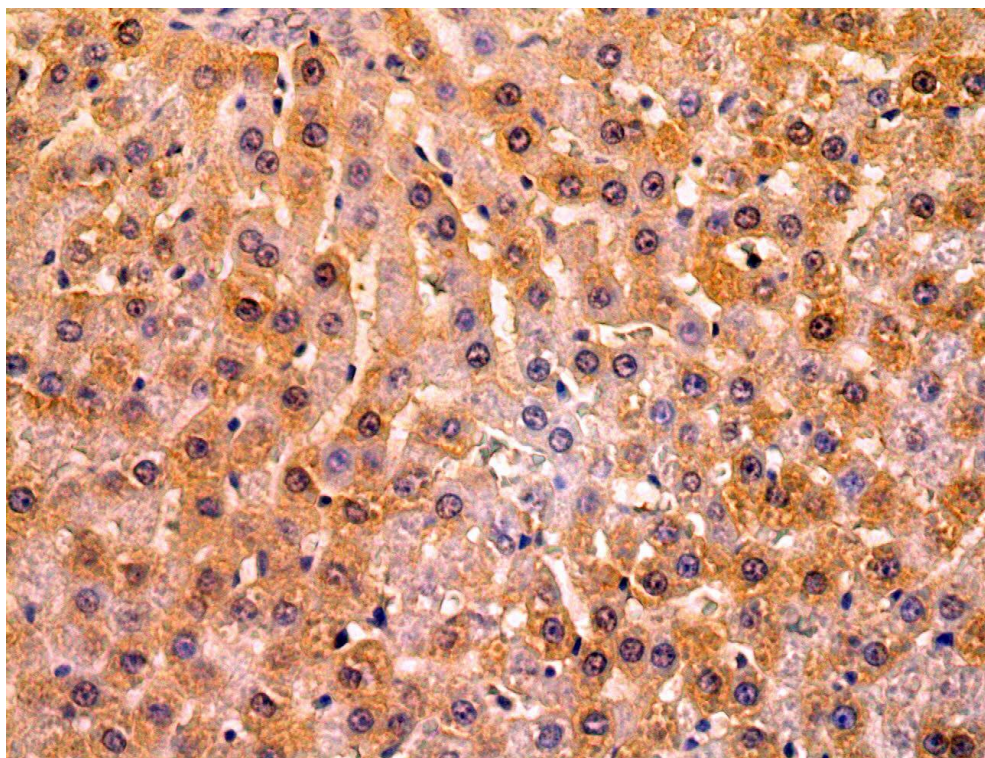


Fig. 9. Expresión de HSP en el citoplasma de hepatocitos y de endotelios sinusoidales en ratas sacrificadas a las 24 horas post-reperfusión. IHQ X 400

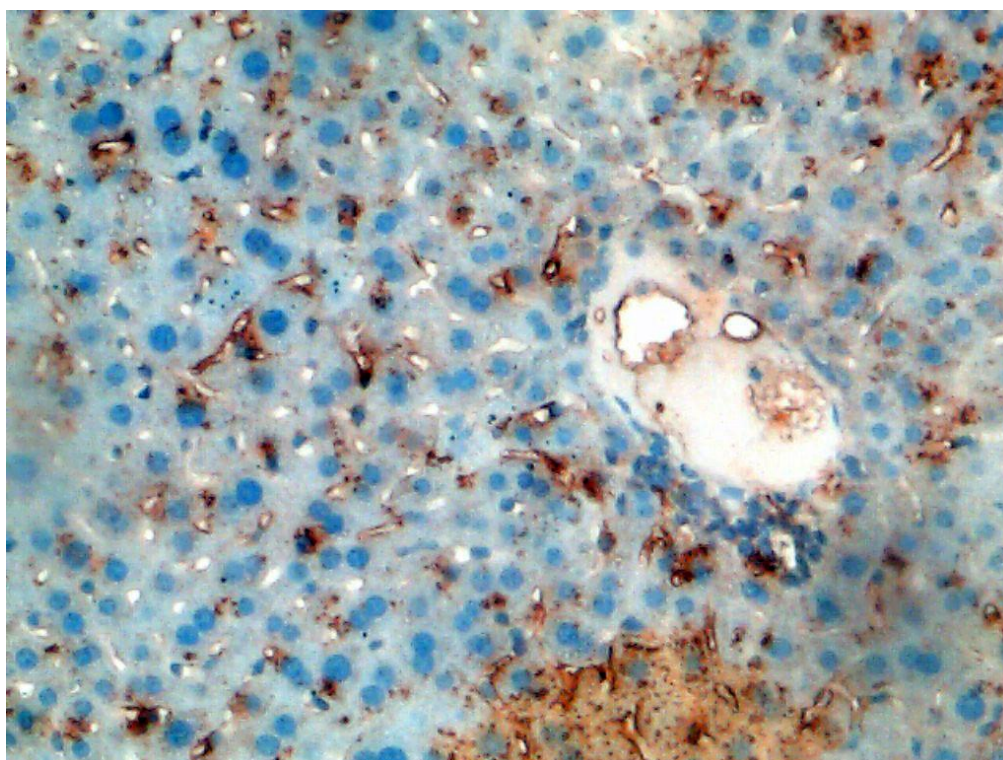


Fig. 10. TNF- $\alpha$ : determinación por IHQ de la presencia de proteínas de TNF- $\alpha$  en hepatocitos y en endotelio de sinusoides de ratas del Grupo Control sacrificadas a las 24 horas post-reperfusión. IHQ X 200

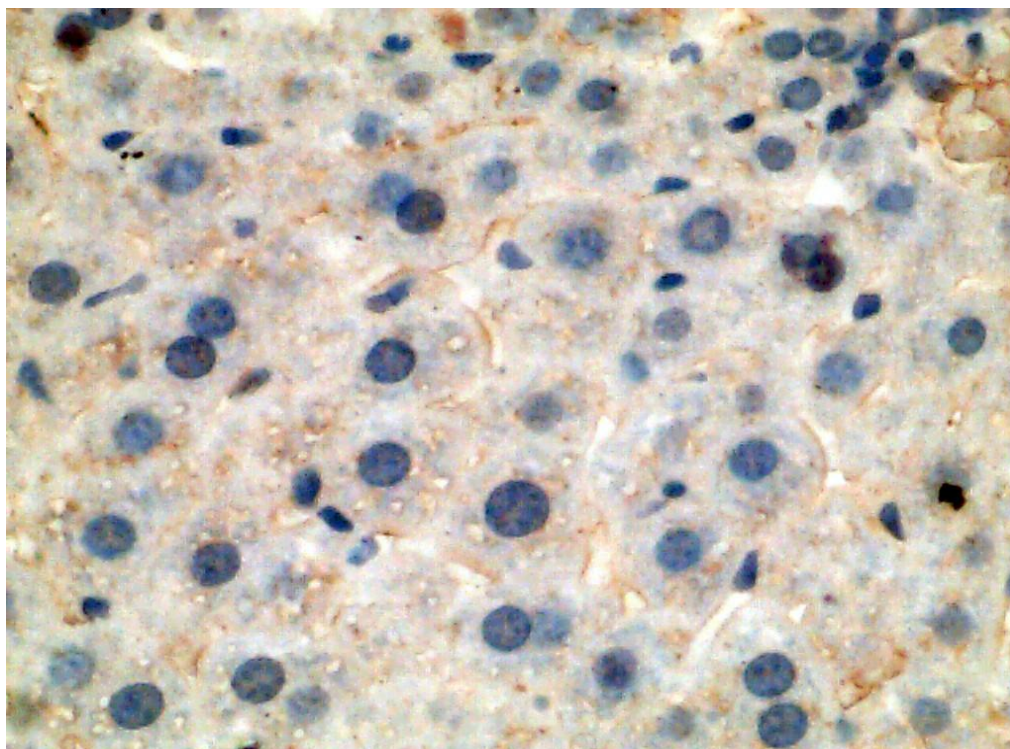


Fig. 11. Discretos depósitos de IL-6 marcados débilmente en endoterlio sinusoidal de ratas del Grupo Control sacrificadas a las 24 horas post-reperfusión. IHQ X400

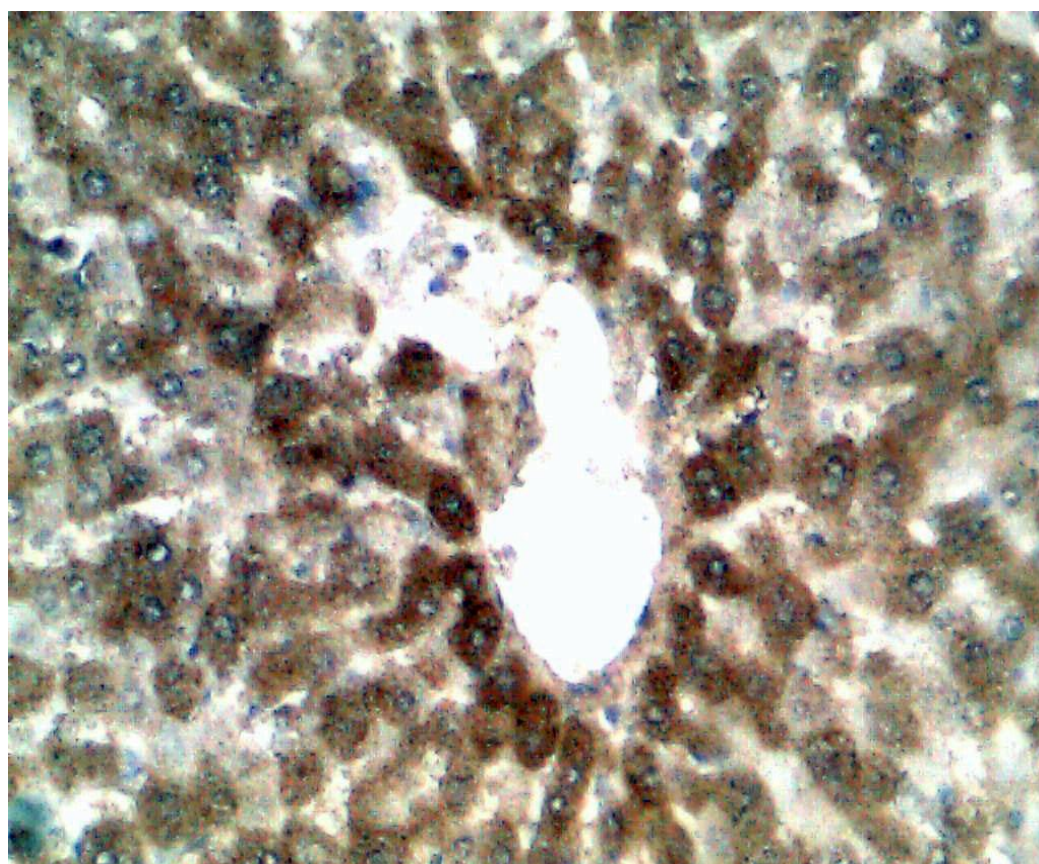


Fig. 12. Presencia de Malondialdehído en el citoplasma de hepatocitos de la zona 3 de animales del Grupo Control sacrificados a las 24 horas post-reperfusión. IHQ X20



## PAS y de Hematoxilina-Eosina

Células de Kupffer y a leucocitos periportales y perivenosos centrales coloreados por  
medio de técnicas de PAS y de H-E

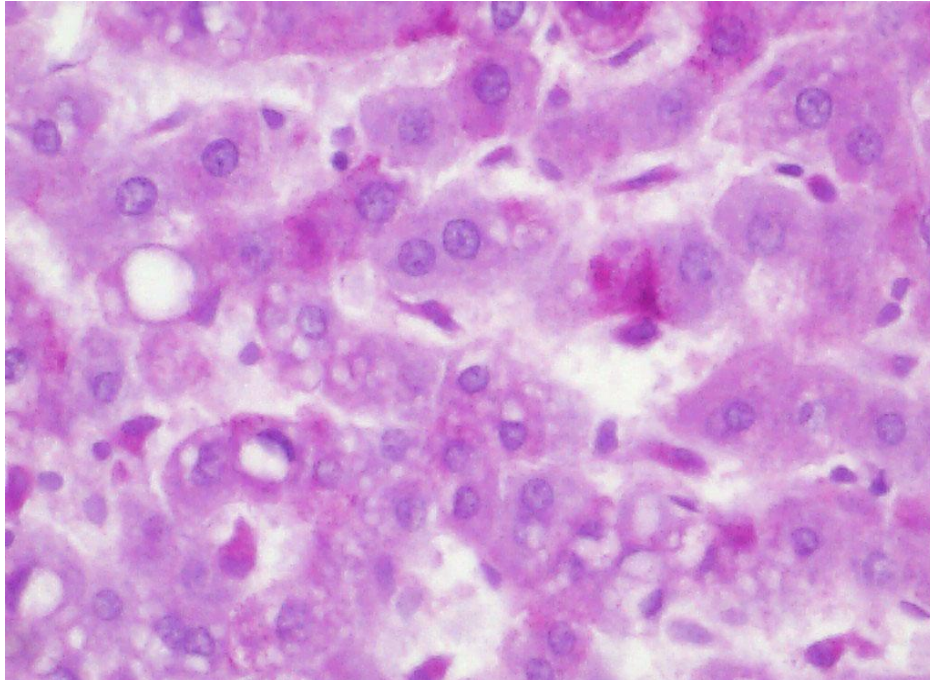


Fig. 13. Tinción de PAS en la que se observa células fusiformes en luces sinusoides correspondientes a células de Kupffer. En la mitad inferior de la imagen puede observarse microvacuolización citoplasmática de hepatocitos. PAS x 200.

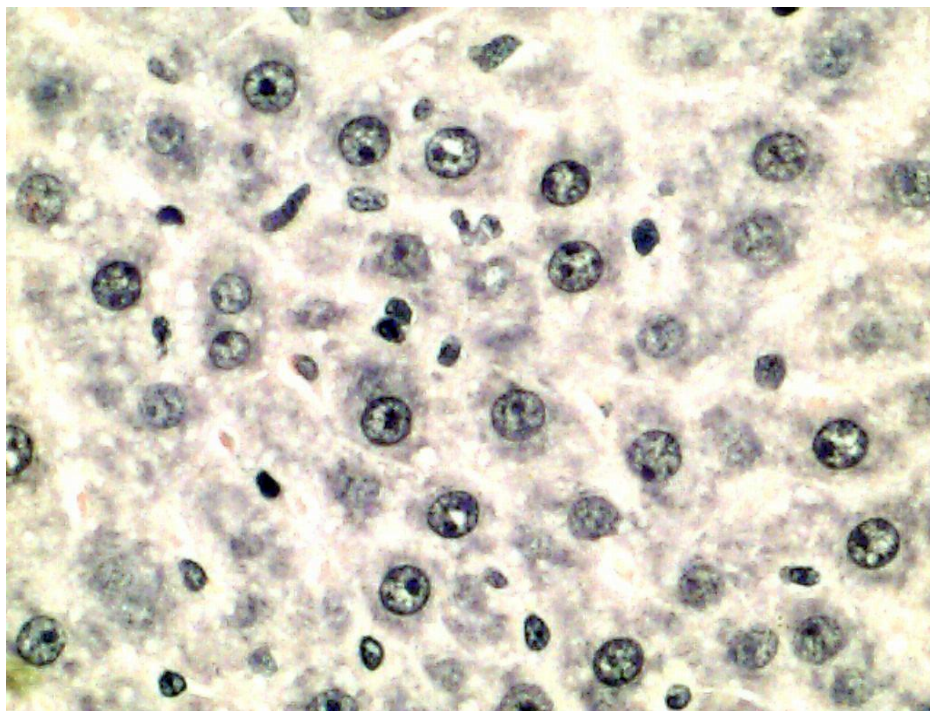


Fig. 14. Tinción de H-E. Escasas células de Kupffer observables e incremento de leucocitos mono y polimorfonucleares en luces sinusoides. Hematoxilina-Eosina X 400.

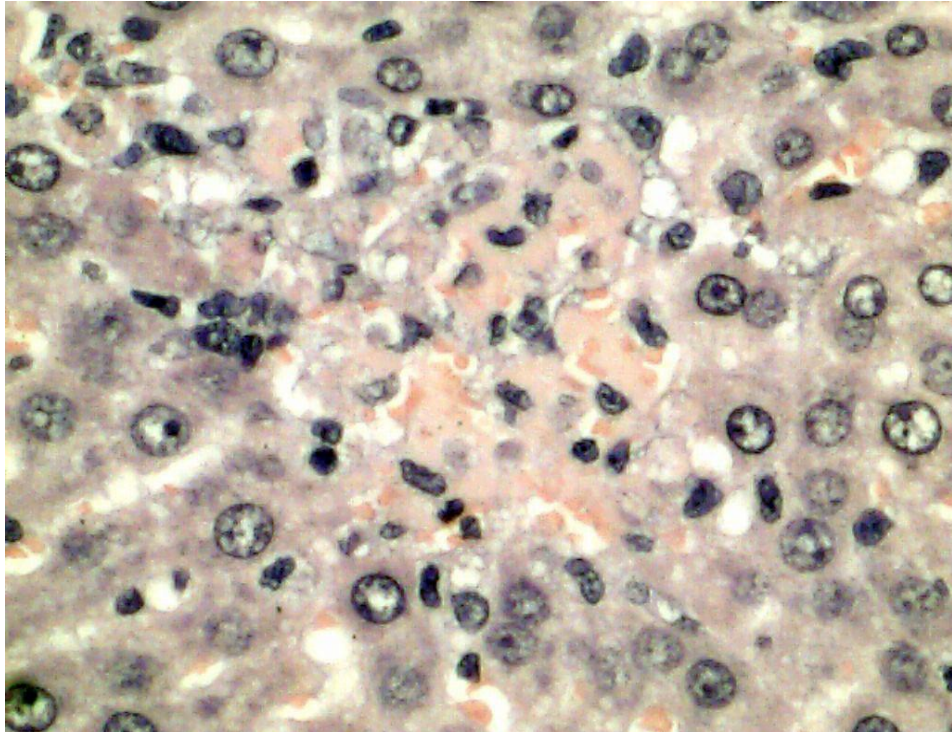


Fig.15. Leucocitos y células de Kupffer en luces sinusoides.  
Hematoxilina-Eosina X 400.

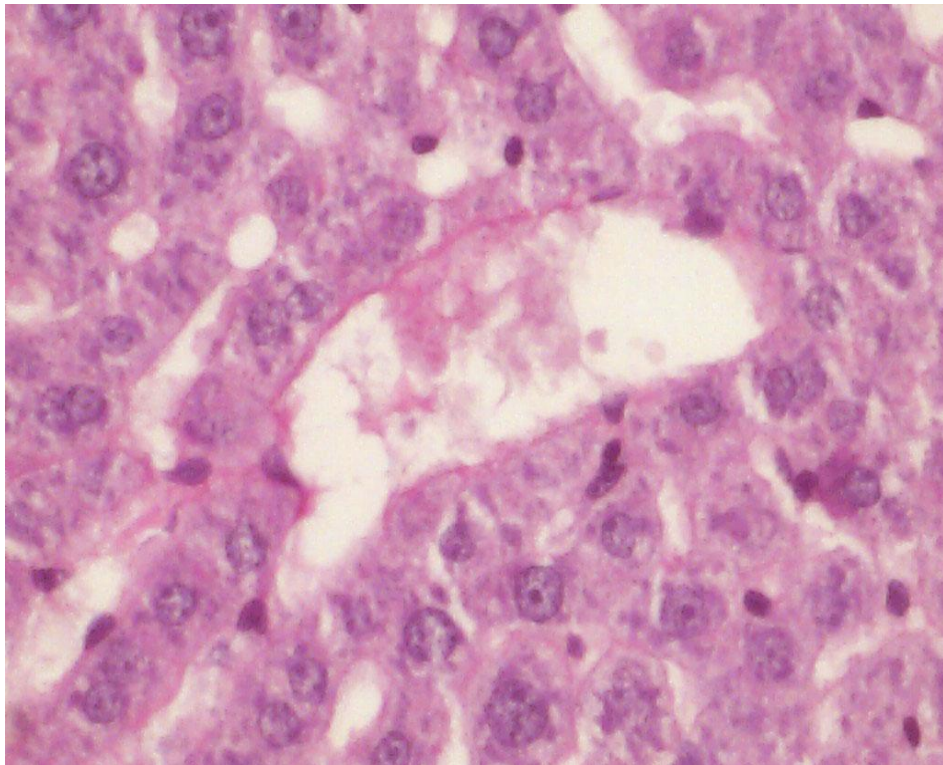


Fig. 16. Leucocitos en luces sinusoides perivenulares centrales (Zona 3 del lobulillo).  
Notevole escaso número de células Kupffer. Tinción de PAS X400.

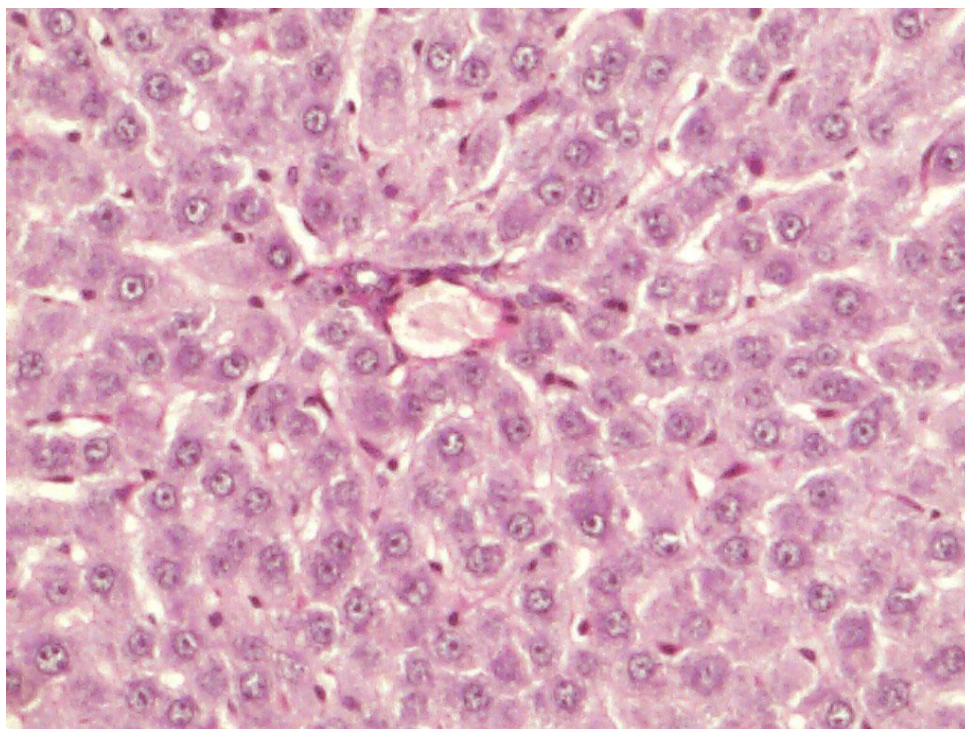


Fig. 17. Numerosas células de Kupffer en áreas 1 y 2 del lobulillo. PAS X 200.

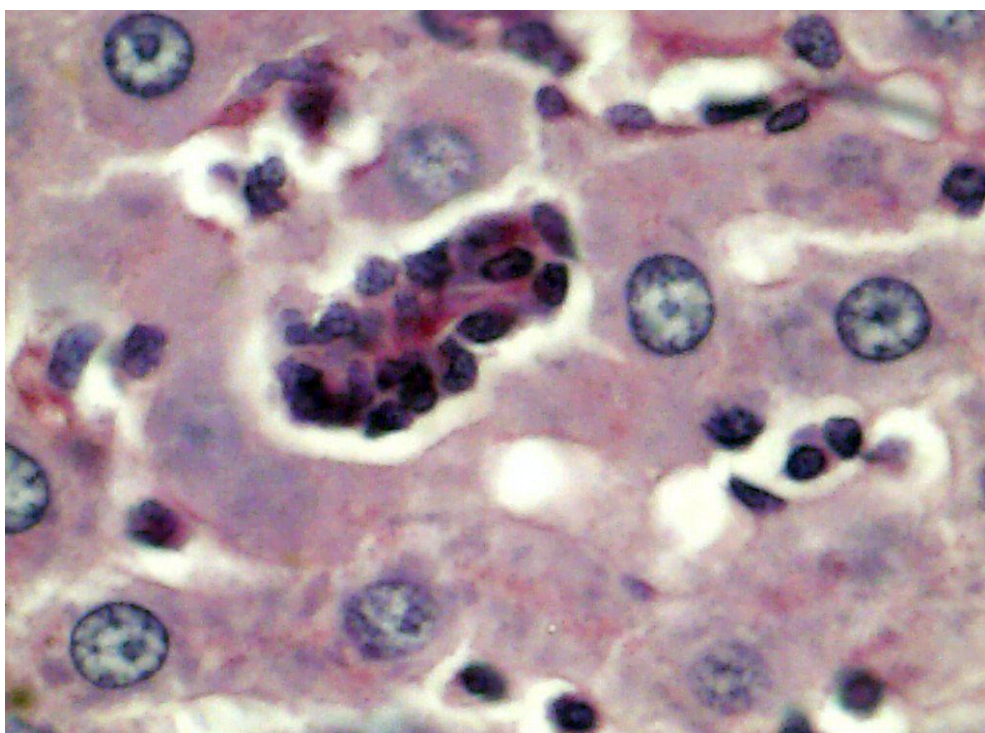


Fig. 18. Células de Kupffer descamadas y leucocitos en un espacio sinusoide.  
PAS X 400.

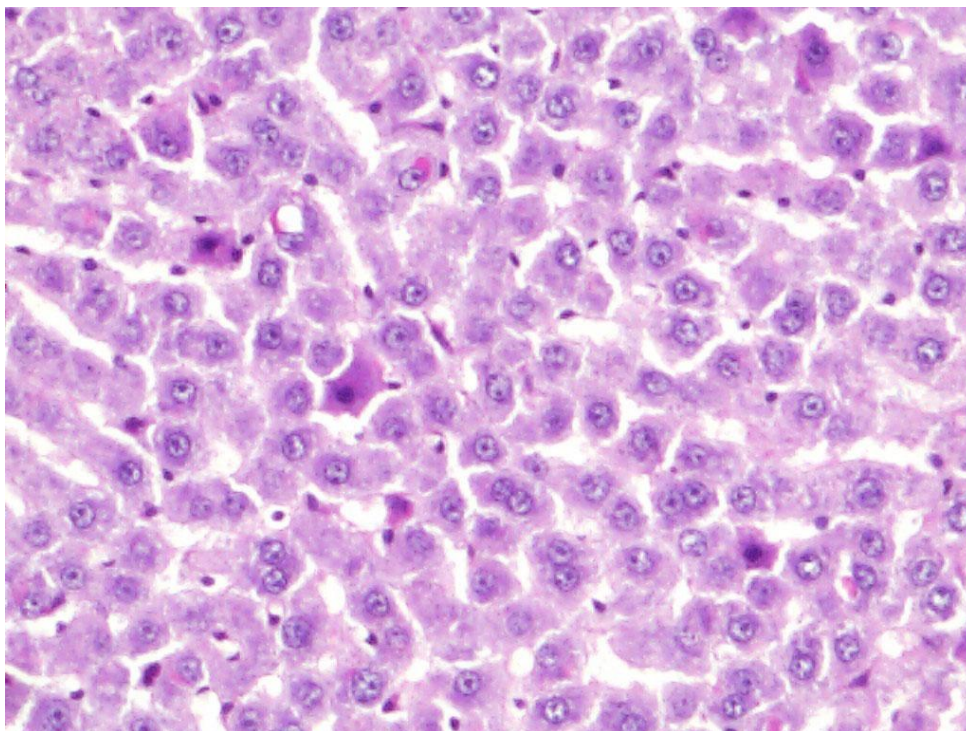


Fig. 19. Las células de citoplasma más eosinófilo y con retracciones del volumen celular y picnosis nuclear corresponden a hepatocitos apoptóticos.

## *Discusión*

A principios del siglo XVII, ya se realizaban los primeros intentos quirúrgicos en el hígado, con resultados poco alentadores. A pesar de un continuo estudio del órgano, la realización de maniobras en situaciones como resección de tumores, traumatismos con daño parenquimatoso, shock hemorrágico, presentaron, hasta hace pocas décadas atrás, altas morbilidad y mortalidad.

La comprensión de la anatomía, fisiología y fisiopatología hepáticas, junto con la puesta a punto de las técnicas quirúrgicas, del manejo anestesiológico y de la gestión postoperatoria hicieron que hoy la cirugía hepática sea uno de los campos más complejos y exitosos de la especialidad. Esta abarca un amplio espectro de posibilidades terapéuticas, desde la utilización de técnicas miniinvasivas para el tratamiento de tumores primarios, secundarios y otras lesiones (radiofrecuencia, quimioembolización, drenaje percutáneo de colecciones, etc.), la realización de complejas resecciones basadas en el minucioso conocimiento de la anatomía intraparenquimatoso del órgano, hasta la posibilidad del trasplante hepático (con injertos cadavéricos e incluso injertos provenientes de donantes vivos) en caso de fallo orgánico (crónico o fulminante) o presencia de determinados tumores <sup>(10-15)</sup>.

En el amplio abanico clínico-terapéutico mencionado (trauma, shock, cirugías de resección, trasplante, etc.), uno de los determinantes del fracaso de la continuidad o restitución de la función hepática es la injuria causada por isquemia-reperfusion de la cual es víctima el órgano en tales circunstancias. Tal es así, que este tema constituye un permanente campo de investigación por parte de los principales grupos dedicados al estudio del hígado en el mundo.

El proceso de isquemia-reperfusion hepática representa una serie de intrincados eventos que ocurren durante el bloqueo transitorio del flujo de sangre y oxígeno (isquemia) y el

retorno del aporte (reperusión) al parénquima, condicionando la disfunción temporánea o definitiva del órgano <sup>(22-25)</sup>.

A grandes rasgos existen diferentes tipos de isquemia: la isquemia "fría" que se relaciona, fundamentalmente, a la etapa ablativa del trasplante, cuando el órgano es intencionalmente conservado en frío para reducir su actividad metabólica hasta su implante; 2) la isquemia "tibia o caliente", característica de la cirugía del trauma, resección, shock hipovolémico y 3) la isquemia de "re-calentamiento" que ocurre durante la manipulación del hígado y la confección de las anastomosis vasculares pre-reperusión en el trasplante (considerada generalmente como isquemia tibia) <sup>(30)</sup>.

Desde un punto de vista teórico, pueden identificarse 4 sistemas intracelulares que se ven agredidos durante el complejo y, aún no del todo dilucidado, mecanismo de injuria que se produce durante el continuo proceso isquemia-reperusión:

1) mantenimiento de integridad de la bicapa fosfolipídica de las membranas de la que dependen la homeostasis iónica y osmótica de las células y sus orgánulos, cuyo ataque por parte de las formas reactivas del oxígeno fue evaluado en nuestro estudio mediante la cuantificación de MDA, producto final de la peroxidación lipídica, con técnica de IHQ. Como se observa en Resultados, la expresión de MDA fue estadísticamente superior ( $P= 0,0025$ ) en el Grupo Control en comparación con el Grupo Tratado, lo que indicaría protección por parte de la Lidocaína frente a una mayor producción de radicales libres en el proceso de IRH, con el consecuente beneficio de las membranas celulares;

2) la respiración aeróbica que afecta la fosforilación oxidativa y la producción de trifosfato de adenosina (ATP);

3) la síntesis de proteínas enzimáticas y estructurales y

4) la conservación de la integridad del aparato genético de la célula <sup>(30-45)</sup>.

Con la finalidad de inhibir o atenuar la injuria causada por los mecanismos enunciados determinantes del proceso de IRH diferentes grupos de trabajo en el mundo estudiaron diferentes estrategias en las últimas décadas; ninguna, sin embargo, logra satisfacer el objetivo en forma total. Es así que se idearon:

- *estrategias quirúrgicas* como el preacondicionamiento isquémico, el clampeo intermitente del pedículo hepático, el uso de sistemas de perfusión extracorpóreos, el preacondicionamiento hipertérmico, etc.;
- *estrategias farmacológicas* basadas en la utilización de sustancias antioxidantes, agonistas de la adenosina y óxido nítrico, superóxido dismutasa, drogas favorecedoras de la microcirculación, inhibidores de proteasas, soluciones de preservación de órganos para trasplante de variadas composiciones, etc.;
- *estrategias génicas*, aun en estudio y de escasa aplicación en la práctica clínica actual.

El objetivo de nuestro estudio consistió en evaluar en forma experimental una estrategia farmacológica, basada en el uso del anestésico local Lidocaína, ya que diferentes estudios han comprobado que contribuye a la recuperación celular en caso de isquemia e hipoxia tanto in vitro como in vivo en variadas poblaciones celulares.

Aunque su efecto protector y su consecuente uso clínico-terapéutico fue extensamente estudiado en caso de isquemia cardíaca, neuronal <sup>(286-288)</sup>, pulmonar <sup>(265)</sup>, intestinal <sup>(266)</sup>, poco se ha publicado sobre la posibilidad de un efecto similar a nivel hepático. Hoy en día, la Lidocaína forma parte de protocolos de tratamiento en casos de isquemia-reperusión miocárdica y cerebral.

La lidocaína, sustitutivo sintético de la cocaína, sintetizada por Löfgren en 1943, constituye actualmente el más utilizado de los anestésicos locales cuyo mecanismo de



acción principal consiste en el bloqueo de los canales de sodio voltaje dependientes encargados de mantener un activo y preciso gradiente de iones transmembrana.

Este bloqueo de canales de sodio se lleva a cabo mediante su unión a la extremidad intracelular de los canales con la aparejada reducción en la actividad de la bomba sodio-potasio ATPasa, el ahorro de ATP y la disminución del calcio intracelular por reducción en la actividad de la bomba de intercambio sodio-calcio <sup>(241,242)</sup>.

Además de su uso como anestésico local, la Lidocaína es uno de los fármacos antiarrítmicos más comúnmente utilizado por vía endovenosa debido al potente efecto supresor que ejerce sobre la actividad cardíaca anormal, a su alto grado de eficacia en el tratamiento de arritmias asociadas a infarto agudo de miocardio y a su baja toxicidad a dosis terapéuticas <sup>(241,242)</sup>.

Por otra parte, la Lidocaína ejerce una potente efecto antiinflamatorio mediante, probablemente, la combinación de su interacción reversible con proteínas y lípidos de membrana, la regulación del metabolismo celular, la inhibición de la migración leucocitaria mediada por TNF- $\alpha$ , la reducción de la expresión de moléculas de adherencia, la inhibición de la liberación de histamina, leucotrieno B4 e Il-1 por parte de las células proinflamatorias, entre otras acciones <sup>(249-266)</sup>.

La Lidocaína posee, así mismo, un efecto inhibitor sobre la agregación plaquetaria mediante la inhibición de las señales del TXA<sub>2</sub> y la reducción de los cambios en la microviscosidad de las membranas plasmáticas <sup>(269-272)</sup>.

Además, actúa como scavenger de radicales libres, inhibidor de la peroxidación lipídica, bacteriostático, fungostático y fungicida <sup>(243-245)</sup>.

El efecto protector de la Lidocaína frente a la isquemia-reperusión sería el resultado de las múltiples funciones descriptas previamente:

- reguladora de electrolitos intracelulares,

- reguladora del metabolismo celular,
- antiinflamatoria,
- antiagregante plaquetaria,
- scavenger y
- antimicrobiana

que intervendrían en los múltiples niveles, estadios y vías de activación del complejo proceso de IRH.

En nuestro trabajo hemos confrontado dos grupos de ratas expuestas a una maniobra de Pringle (clampeo de los elementos del pedículo hepático). El primero de los grupos, no previamente tratado, fue considerado Control mientras que el segundo recibió una dosis intraperitoneal pre-clampeo de Lidocaína para estudiar los posibles efectos benéficos de su administración.

La injuria por isquemia reperusión, como ya fue enunciado, consiste en un complejo proceso inflamatorio con múltiples vías de activación que se superponen, potencian y/o inhiben. La injuria endotelial, la infiltración leucocitaria, la ocurrencia de muerte celular programada, y el aumento de mediadores de la inflamación son algunos de los parámetros que pueden estudiarse para determinar el grado de injuria tisular.

Se hipotetiza que la activación de las células de Kupffer, macrófagos hepáticos, sería uno de los mecanismos responsables del inicio de la injuria. Estas células tienen como función fundamental la fagocitosis de bacterias, endotoxinas, virus y complejos inmunes, la iniciación de una respuesta inmune no específica, la presentación de antígenos y la liberación de diferentes productos citotóxicos como el TNF- $\alpha$ , interleuquinas, ON, leucotrienos y proteasas<sup>(49,50)</sup>. Su activación precipita la muerte de las células endoteliales con el consecuente trastorno de la microcirculación que conduce a inflamación, incremento del metabolismo aeróbico de los hepatocitos que los hace

más susceptibles a la hipoxia, muerte (apoptosis) de los mismos y, consecuentemente, fallo hepático<sup>(51,52)</sup>. En nuestro estudio, de hecho, la TGO fue significativamente más elevada en los animales no tratados a las 24 horas ( $P= 0,03$ ), mientras que la LDH mostró reducciones estadísticamente significativas en el Grupo premedicado con Lidocaina a las 24, 48 y 72 horas post-reperfusion ( $P= 0,008$ ;  $P= 0,002$ ;  $P= 0,01$ ; respectivamente), hecho posiblemente relacionado a una menor repercusión hepatocelular en el Grupo Tratado.

Se observó, así mismo, una importante diferencia estadísticamente significativa entre el Grupo Control y el Grupo Lidocaína ( $P < 0,0001$ ) cuando se estudió la presencia de cuerpos apoptóticos en los explantos hepáticos. La menor ocurrencia de apoptosis en animales tratados indicaría una reducción en la activación de las células de Kupffer, principales responsables de la muerte (apoptosis) de hepatocitos en hígados sometidos a isquemia-reperfusion y/o una mayor expresión de proteínas antiapoptóticas como se observa en nuestros resultados de IHQ. Tampoco puede descartarse un aumento de la expresión de proteínas protectoras de daño celular como HO-1 y HSP60, (ver tabla y gráfico de IHQ, página 105).

De los productos citotóxicos sintetizados por las células de Kupffer, la principal sustancia relacionada con el daño celular es el TNF- $\alpha$ , el cual desempeña numerosas respuestas pro-inflamatorias como la inducción de la producción de radicales libres y otros metabolitos tóxicos, la quimiotaxis, activación y adherencia leucocitaria al endotelio, la inducción de apoptosis de hepatocitos y células endoteliales, entre otras funciones. En nuestro trabajo se cuantificó el RNAm de TNF- $\alpha$  por PCR, el cual fue significativamente mayor en animales del Grupo Control a las 24 horas ( $P= 0,05$ ) y a las 72 horas ( $P= 0,0027$ ) de la reperfusion. Se observó una diferencia similar ( $P= 0,0012$ ) a las 24 horas post-reperfusion cuando el TNF- $\alpha$  fue estudiado por IHQ, en concordancia

con los resultados obtenidos por PCR. De acuerdo a estos resultados, uno de los mecanismos de acción por los cuales la Lidocaína protegería frente a la injuria en la IRH sería, posiblemente, la inhibición o la atenuación de los niveles de TNF- $\alpha$ , tal como ha sido sugerido previamente en patologías mediadas por TNF $\alpha$  y atenuadas por la administración de lidocaína <sup>(65-66,241,242,286-288, 290-292)</sup>.

Los diferentes sistemas responsables de la respuesta a la injuria se relacionan ya sea estimulándose o inhibiéndose recíprocamente. Por ejemplo, el TNF- $\alpha$  estimula a las células endoteliales y de Kupffer para que expresen Tromboplastina tisular que activa la cascada de la coagulación, mecanismo que altera la microcirculación a través de la formación de microtrombos.

Durante el proceso de IRH se activa, así mismo, el sistema de complemento favoreciendo la opsonización y fagocitosis de las células dañadas, aunque en nuestro estudio no pudimos comprobar una diferencia en la cuantificación de C3 por IHQ entre los Grupos en cuestión <sup>(57-74)</sup>.

No todos los mecanismos desencadenados durante la injuria tienden a favorecer la respuesta inflamatoria y el daño hepatocitario, sino que existen sistemas y reacciones que tienen como finalidad compensar los precedentes con un efecto antiinflamatorio. Para citar alguno de ellos, podemos mencionar a la IL-6, citoquina reguladora del proceso inflamatorio, cuya liberación, inducida por el TNF- $\alpha$ , produce un aumento de la regeneración tisular gracias a sus efectos pro-mitogénicos y anti-apoptóticos <sup>(75-85)</sup> y a la Il-10, involucrada en la supresión de la producción de citoquinas pro-inflamatorias y la inhibición de las células presentadoras de antígenos. En nuestro trabajo al cuantificar IL-6 por IHQ obtuvimos similares resultados entre ambos grupos. Posiblemente, este hecho se deba a una menor expresión de TNF- $\alpha$  en el Grupo Tratado que hace que la inducción que ejerce sobre la expresión de IL-6 se haya visto inhibida.

e igual modo podría explicarse la menor expresión del factor anti-apoptótico Bcl-2 en el Grupo Control.

Hemos observado una significativa mayor expresión de la proteína Bcl-2 a las 24 horas de la reperusión en el Grupo Tratado ( $P= 0,04$ ), hecho que constituya, presumiblemente, uno de los mecanismos que minimiza la injuria observada en los animales pertenecientes a dicho grupo.

Otros sistemas endógenos que confieren protección son aquellos que contienen enzimas como las catalasas, glutatión peroxidasa, el complejo Q10, la superóxido dismutasa, la HO-1, la HSP60 y vitaminas antioxidantes como el  $\alpha$ -tocoferol y el ácido ascórbico.

Entre nuestros resultados se puede observar como en la cuantificación por IHQ de HO1 y de HSP60 obtuvimos diferencias estadísticamente significativas al comparar el Grupo Control y el Grupo Tratado con Lidocaína a las 24 horas de la reperusión ( $P= 0,0073$  y  $P= 0,0012$  respectivamente), con una mayor expresión de estas proteínas en el Grupo Control, posible reflejo de la presencia de mayor daño por isquemia-reperusión con la consecuente activación de los sistemas endógenos de protección en el mencionado Grupo.

## *Conclusión*

En base a los resultados presentados podemos concluir en que la administración intraperitoneal de Lidocaína previa a la realización de un periodo de isquemia seguido de diferentes tiempos de reperfusión hepática en forma experimental produce reducciones significativas en diferentes marcadores de injuria. Por lo que su administración pre-isquemia resultaría beneficiosa al conferir protección del parénquima hepático frente al daño. Estos resultados determinarían, consecuentemente, beneficios a nivel histológico y, teóricamente, clínico. Estos hallazgos sugieren un potencial uso de esta droga droga ampliamente utilizada en medicina humana en forma inmediatamente previa a periodos de isquemia hepática (cirugía del trauma, shock hipovolémico, resecciones, trasplante, etc.) con la finalidad de atenuar los daños asociados al proceso de isquemia-reperfusión.

Estudios doble-ciego-randomizados con gran número de sujetos por grupo, tanto a nivel experimental como humano, con diferentes dosis y vías de administración, serían de gran utilidad clínica para determinar, en forma definitiva, la potencial capacidad de la Lidocaína de atenuar el grado de injuria producido por isquemia reperfusión hepática.

## *Referencias*

1. Foster JH. History Of Liver Surgery. Arch Surg. 1991;126 (3):381-387.
2. Lau WY. The History Of Liver Surgery. J R Coll Surg Edin. 1997;42:303-309.
3. Parks RW, Garden OJ. Liver Resection For Cancer. World J Gastroenterol. 2001;7 (6):766-771.
4. Luis A. Di Un Adenoma Del Fegato. Centralblatt Fur Chirg. 1887;5:99.
5. Langenbuch C. Ein Fall Von Resektion Eines Linksseitigen Schnurlappens Der Leber, Heilung. Berl Klin Wochenschr. 1888;25:37-38.
6. Tiffany LM. Surgery Of The Liver. Boston Med Surg J. 1890; 122:557.
7. Lucke T. Entfernung Des Linken Krebsigen Leberlappans. Zentralbl Chir. 1891;18:115-116.
8. Pringle JH. Notes On The Arrest Of Hepatic Hemorrhage Due To Trauma. Ann Surg. 1908; 209:211-218.
9. Wendel W. Ueber Leberlappenresektion. Arch Klin Chir. 1920;114:982-1000.
10. Cattell RB. Successful Removal Of Liver Metastasis From Carcinoma Of The Rectum. Lehey Clin Bull. 1940;2:7-11.
11. Wangenstein OH. The Surgical Problem Of Gastric Cancer: With Special Reference To: (1) The Closed Method Of Gastric Resection, (2) Coincidental Hepatic Resection And (3) Preoperative And Postoperative Management. Arch Surg. 1943;46(6):879-906.
12. Raven RW. Partial Hepatectomy. Br. J. Surg. 1945;36,397.
13. Lortat-Jacob JL, Robert HG: Hepatectomie Droite Fete. Presse Med. 1952;60,549.
14. Heaney JP, Stanton WR, Halbert DS Et Al. An Improved Technique For Vascular Isolation Of The Liver. Ann Surg. 1966;163:237-244.
15. Starzl TE, Groth CY, Brettschneider L, et Al. Orthotopic Homotransplantation Of The Human Liver. Ann Surg. 1968;168:392-415.
16. Starzl TE, Marchioro TL, Von Kaulla KN, et al. Homotransplantation Of The Liver In Humans. Surg Gynecol Obstet. 1963;117:659-676.
17. Demirleau, Noureddine, Vignes, et al. Tentative D'homogreffes Hepatique (Attempted Hepatic Homograft.) Mem Acad Chir. 1964;90:177-179.



18. Starzl TE, Groth CT, Brettschneider L, et al. Orthotopic Homotransplantation Of The Human Liver. *Ann Surg.* 1968;168:392-415.
19. Calne RY, William R. Liver Transplantation In Man. I. Observations On Technique And Organization In Five Cases. *Br Med J.* 1968;4:535-540.
20. Liver Transplantation: National Institutes Of Health Consensus Development Conference Statement, June 20-23,1983.
21. Starzl TE, Iwatsuki S, Van Thiel DH, et al. Evolution Of Liver Transplantation. *Hepatology.* 1982;2:614-636.
22. Knolle PA, Gerken G. Local control of the immune response in the liver. *Inmunol. Rev.* 2000;174:21-34.
23. Maksan S, Maksan M, Gebhard M, et al. Reduction of Hepatic reperfusion injury by antithrombin III and aprotinin. *Transpl Int.* 2000;13(1):562-564.
24. Richter S, Yamauchi J, Minor T, et al. Heparin and phentolamin combines, rather than heparin alone, improves hepatic microvascular procurement in a non-heart-beating donor rat model. *Transpl Int.* 2000;13:225-229.
25. Sankary H, Yin D, Chong A, et al. The Portosystemic Shunt Protects Liver against Ischemic Reperfusion Injury. *Transplantation.* 1999;68(7):958-963.
26. Gu M, Takada Y, Fukunaga K, et al. Pharmacologic graft protection without donor pretreatment in liver transplantation from non-heart-beating donors. *Transplantation.* 2000;70(7):1021-1025.
27. Brass CA, Nunes F, Nagpal R. Increased oxyradical production during reoxygenation of perfused rat liver: signal versus injury. *Transplantation.* 1994;58:1329-1335.
28. Crispe IN, Dao T, Klugewitz K, Mehal W, et al. The liver as a site of T-cell apoptosis: graveyard, or killing field? *Inmunol Rev.* 2000;174:47-62.
29. Gondolesi GE, Semplici AM, Luna MS et al. Alfa Tocoferol Reduces Hepatocyte Ischemia-Reperfusion Injury in an Isolated Rat Liver Model. *Transpl.Proc.* 1998;30:2885-2888.
30. Clavien PA, Harvey PR, Strasberg SM. Preservation and reperfusion injuries in liver allografts. An overview and synthesis of current studies. *Transplantation.* 1992;53:957-978.
31. Otto G, Woll H, David H. Preservation damage in liver transplantation: electron microscopic findings. *Transplant Proc.* 1984;46:178.

32. Gao W, Bentley RC, Madden JF, Clavien PA. Apoptosis of sinusoidal endothelial cells is a critical mechanism of injury in rat liver transplantation. *Hepatology*. 1998;27:1652-1660.
33. McKeown C, Edwards C, Phillips M, et al. Sinusoidal lining cell damage: the critical injury in cold preservation of liver allografts in the rat. *Transplantation*. 1988;46:178-191.
34. Momii S, Koga A. Time-related morphological changes in cold- stored rat livers: a comparison of Euro-Collins solution with UW solution. *Transplantation*. 1990;50:745.
35. Imamura H, Brault A, Huet PM. Effects of extended cold preservation and transplantation on the rat liver microcirculation. *Hepatology*. 1997;25:664-671.
36. Miyagawa Y, Imamura H, Soeda J, et al. Fate of hepatocyte and sinusoidal lining cell function and kinetics after extended cold preservation and transplantation of the rat liver. *Liver Transpl*. 2002;8:370-381.
37. Jaeschke H, Farhood A, Smith C. Neutrophils contribute to ischemia/reperfusion injury in rat liver in vivo. *FASEB J*. 1990;4:3355-3359.
38. Clavien PA, Morgan GR, Sanabria JR, et al. Effect of cold preservation on lymphocyte adherence in the perfused rat liver. *Transplantation*. 1991;52:412-417.
39. Clavien PA, Harvey PRC, Sanabria JR, et al. Lymphocyte adherence in the reperfused rat liver allograft. Mechanisms and effects. *Hepatology*. 1993;17:131-142.
40. Gujral JS, Bucci TJ, Farhood A, Jaeschke H. Mechanism of cell death during warm hepatic ischemia-reperfusion in rats: apoptosis or necrosis? *Hepatology*. 2001;33:397-405.
41. Selzner N, Rudiger H, Graf R, Clavien PA. Protective Strategies Against Ischemic Injury Of The Liver. *Gastroenterology*. 2003;125:917-936.
42. De Rougemont O, Lehmann K, Clavien PA. Preconditioning, Organ Preservation, And Postconditioning To Prevent Ischemia-Reperfusion Injury To The Liver. *Liver Transpl*. 2009;15:1172-1182.
43. Katsargyris A, Klonaris C, Alexandrou A, et al. Toll-like receptors in liver ischemia reperfusion injury: a novel target for therapeutic modulation? *Expert Opin Ther Targets*. 2009;13(4):427-442.

44. Seki E, Brenner DA. Toll-like receptors and adaptor molecules in liver disease: update. *Hepatology*. 2008;48(1):322-335.
45. Katsargyris A, Klonaris C, Bastounis E, et al. Toll-like receptor modulation: a novel therapeutic strategy in cardiovascular disease? *Expert Opin Ther Targets*. 2008;12(11):1329-1346.
46. Chavez-Cartaya R, Jamieson N, Ramirez P, et al. Free radical scavengers to prevent reperfusion injury following experimental warm liver ischemia. Is there a real physiological benefit? *Transpl Int*. 1999;12:213-221.
47. Crenesse D, Schmit-Alliana A, Hornoy J, et al. Hypoxia-reoxygenation differentially stimulates stress-activated protein kinases in primary-cultured rat hepatocytes. *Transpl Int*. 2000;13(1):597-599.
48. Sica A, Wang JM, Colotta F, et al. Monocyte chemotactic and activating factor gene expression induced in endothelial cells by IL 1 and tumor necrosis factor. *J Immunol*. 1990;144:3034-3038.
49. Clouston A, Jonsson J, Balderson G, et al. Lymphocyte apoptosis and cell replacement in human liver allografts. *Transplantation*. 2002;73(11):1828-1834.
50. Kreisel D, Petrowsky H, Krasinskas A, et al. The role of passenger leukocyte genotype in rejection and acceptance of rat liver allografts. *Transplantation*. 2002;73(9):1501-1507.
51. Kubes P, Payne D, Woodman RC. Anti-Selectin therapy against hepatic ischemia-reperfusion injury. *Hepatology*. 2003;37(1):220-222.
52. Uchinami M, Muraoka R, Horiuchi T, et al. Effect of intermittent hepatic pedicle clamping on free radical generation in the rat liver. *Surgery*. 1998;124:121.
53. Cursio R, Gugenheim J, Ricci JE, et al. Caspase inhibition protects from liver injury following ischemia and reperfusion in rats. *Transpl Int*. 2000;13(1):568-572.
54. Cursio R. Caspase inhibition in liver transplantation: from basic research to clinical studies. *HPB (Oxford)*. 2010;12(1):1-3.
55. Cursio R, Colosetti P, Auberger P, Gugenheim J. Liver apoptosis following normothermic ischemia-reperfusion: in vivo evaluation of caspase activity by FLIVO assay in rats. *Transplant Proc*. 2008;40(6):2038-2041.
56. Donati G, Kapetanios A, Dubois-Dauphin M, Pournaras CJ. Caspase-related apoptosis in chronic ischaemic microangiopathy following experimental vein occlusion in mini-pigs. *Acta Ophthalmol*. 2008;86(3):30230-6.

57. Heijnen BH, Straatsburg IH, Padilla ND, et al. Inhibition of classical complement activation attenuates liver ischaemia and reperfusion injury in a rat model. ) Clin Exp Immunol. 2006;143(1):15-23.
58. Chan RK, Ibrahim SI, Verna N, et al. Ischaemia-reperfusion is an event triggered by immune complexes and complement. Br J Surg. 2003;90:1470-1478.
59. Straatsburg IH, Boermeester MA, Wolbink GJ et al. Complement activation induced by ischemia-reperfusion in humans: a study in patients undergoing partial hepatectomy. J Hepatol. 2000; 32:783-791.
60. Bergamaschini L, Gobbo G, Gatti S et al. Endothelial targeting with C1-inhibitor reduces complement activation in vitro and during ex vivo reperfusion of pig liver. Clin Exp Immunol. 2001;126:412-420.
61. Wakabayashi H, Miyauchi A, Karasawa Y, et al. Effect of warm ischemia and reperfusion injury on inducing major histocompatibility complex antigens on hepatocytes and nonparenchymal cells in the rat liver. Transplant Proc. 1993; 25:3205-3207.
62. He S, Atkinson C, Qiao F, et al. A complement-dependent balance between hepatic ischemia/reperfusion injury and liver regeneration in mice. Clin. Invest. 2009;119:2304-2316
63. Clavien PA, Petrowsky H, De Oliveira ML, Graf R. Strategies for safer liver surgery and partial liver transplantation. N. Engl. J. Med. 2007;356:1545-1559.
64. Chavez-Cartaya, R.E., DeSola, G.P., Wright, L., Jamieson, N.V., and White, D.J. Regulation of the complement cascade by soluble complement receptor type 1. Protective effect in experimental liver ischemia and reperfusion. Transplantation. 1995;59:1047-1052.
65. Lehmann TG, Koeppel TA, Münch S, Heger M, Kirschfink M, Klar E, Post S. Impact of inhibition of complement by sCR1 on hepatic microcirculation after warm ischemia. Microvasc. Res. 2001;62:284-292.
66. Lehmann TG, Lehmann TG, Koeppel TA, Kirschfink M, Gebhard MM, Herfarth C, Otto G, Post S. Complement inhibition by soluble complement receptor type 1 improves microcirculation after rat liver transplantation. Transplantation. 1998;66:717-722.
67. Arumugam TV, Woodruff TM, Stocks SZ, Proctor LM, Pollitt S, Shiels IA, Reid RC, Fairlie DP, Taylor SM. Protective effect of a human C5a receptor antagonist against hepatic ischaemia-reperfusion injury in rats. J. Hepatol.

2004;40:934-941.

68. Fondevila C, Shen XD, Tsuchihashi S, Uchida Y, Freitas MC, Ke B, Busuttill RW, Kupiec-Weglinski JW. The membrane attack complex (C5b-9) in liver cold ischemia and reperfusion injury. *Liver Transpl.* 2008;14:1133-1141.
69. Markiewski MM, Mastellos D, Tudoran R, DeAngelis RA, Strey CW, Franchini S, Wetsel RA, Erdei A, Lambris JD. C3a and C3b activation products of the third component of complement (C3) are critical for normal liver recovery after toxic injury. *J. Immunol.* 2004;173:747-754.
70. Strey CW, Markiewski M, Mastellos D, Tudoran R, Spruce LA, Greenbaum LE, Lambris JD. The proinflammatory mediators C3a and C5a are essential for liver regeneration. *J. Exp. Med.* 2003;198:913-923.
71. Mastellos D, Papadimitriou JC, Franchini S, Tsonis PA, Lambris JD. A novel role of complement: mice deficient in the fifth component of complement (C5) exhibit impaired liver regeneration. *J. Immunol.* 2001;166:2479-2486.
72. Clark A. Evidence for non-traditional activation of complement factor C3 during murine liver regeneration. *Mol. Immunol.* 2008;45:3125-3132.
73. Fausto N. Involvement of the innate immune system in liver regeneration and injury. *J. Hepatol.* 2006;45:347-349.
74. Camargo C, Madden J, Gao W, et al. Interleukin-6 Protects Liver Against Warm Ischemia/Reperfusion Injury and Promotes Hepatocyte Proliferation in the Rodent. *Hepatology.* 1997;26:1513-1520.
75. Streetz KL, Luedde T, Manns MP, Trautwein C. Interleukin 6 and liver regeneration. *Gut* 2000;47:309-312.
76. Yamada Y, Kirillova I, Peschon JJ, Fausto N. Initiation of liver growth by tumor necrosis factor: deficient liver regeneration in mice lacking type I tumor necrosis factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:1441-1446.
77. Kovalovich K, Li W, DeAngelis R, Greenbaum LE, Ciliberto G, Taub R. Interleukin-6 protects against Fas-mediated death by establishing a critical level of anti-apoptotic hepatic proteins FLIP, Bcl-2, and Bcl-xL. *J Biol Chem.* 2001;276:26605-26613.
78. Sakamoto T, Liu Z, Murase N, Ezure T, Yokomuro S, Poli V, Demetris AJ. Mitosis and apoptosis in the liver of interleukin-6-deficient mice after partial hepatectomy. *HEPATOLOGY.* 1999;29:403-411.
79. Hong F, Kim WH, Tian Z, Jaruga B, Ishac E, Shen X, et al. Elevated interleukin-

- 6 during ethanol consumption acts as a potential endogenous protective cytokine against ethanol-induced apoptosis in the liver: involvement of induction of Bcl-2 and Bcl-x(L) proteins. *Oncogene*. 2002;21:32-43.
80. Zimmers TA, McKillop IH, Pierce RH, Yoo JY, Koniaris LG. Massive liver growth in mice induced by systemic interleukin 6 administration. *HEPATOLOGY*. 2003;38:326-334.
81. Zimmers TA, Pierce RH, McKillop IH, Koniaris LG. Resolving the role of IL-6 in liver regeneration. *HEPATOLOGY*. 2003;38:1590-1591.
82. Selzner N, Selzner M, Tian Y, Kadry Z, Clavien PA. Cold ischemia decreases liver regeneration after partial liver transplantation in the rat: A TNF-alpha/IL-6-dependent mechanism. *HEPATOLOGY*. 2002;36:812-818.
83. Hong F, Radaeva S, Pan HN, Tian Z, Veech R, Gao B. Interleukin 6 alleviates hepatic steatosis and ischemia/reperfusion injury in mice with fatty liver disease. *HEPATOLOGY*. 2004;40:933-941.
84. Ehrmann J Jr., Galuszkova D, Ehrmann J, Krc I, Jezdinska V, Vojtesek B, et al. Apoptosis-related proteins, BCL-2, BAX, FAS, FAS-L and PCNA in liver biopsies of patients with chronic hepatitis B virus infection. *Pathol Oncol Res*. 2000;6:130-135.
85. Ben-Ari Z, Hochhauser E, Burstein I, et al. Role of Anti-tumor necrosis factor- $\alpha$  in ischemia/reperfusion injury in isolated rat liver in a blood-free environment. *Transplantation*. 2002;73:1875-1880.
86. Kobayashi Y, Yoshimura N, Nakamura K, et al. Expression of Tissue Factor in Hepatic ischemic-reperfusion injury of the Rat. *Transplantation*. 1998;66(6):708-716.
87. Zotos D, Coquet JM, Zhang Y, Light A, D'Costa K, Kallies A, Corcoran LM, Godfrey DI, Toellner KM, Smyth MJ, Nutt SL, Tarlinton DM. IL-21 regulates germinal center B cell differentiation and proliferation through a B cell-intrinsic mechanism. *J Exp Med*. 2010;15;207(2):365-378.
88. Linterman MA, Beaton L, Yu D, Ramiscal RR, Srivastava M, Hogan JJ, Verma NK, Smyth MJ, Rigby RJ, Vinuesa CG. IL-21 acts directly on B cells to regulate Bcl-6 expression and germinal center responses. *J Exp Med*. 2010;15;207(2):353-363.
89. Spolski R, Leonard WJ. IL-21 and T follicular helper cells. *Int Immunol*. 2010;22(1):7-12.

90. Spolski R, Kim HP, Zhu W, Levy DE, Leonard WJ. IL-21 mediates suppressive effects via its induction of IL-10. *J Immunol.* 2009;1;182(5):2859-2867.
91. De Nitto D, Sarra M, Pallone F, Monteleone G. Interleukin-21 triggers effector cell responses in the gut. *World J Gastroenterol.* 2010;7;16(29):3638-3641.
92. Colletti LM, Burtch GD, Remick DG, et al. The Production of tumor necrosis factor alpha and the development of a pulmonary capillary injury following hepatic ischemia-reperfusion. *Transplantation.* 1990;49:268-272.
93. Clavien P, Camargo C, Gorczynski R, et al. Acute reactant Cytokines and Neutrophil Adhesion After Warm Ischemia in Cirrhotic and Noncirrhotic Human Livers. *Hepatology.* 1996;23(6)1456-1463.
94. Matsumoto T, O'Malley K, Efron PA et al. Interleukin-6 and STAT3 protect the liver from hepatic ischemia and reperfusion injury during ischemic preconditioning. *Surgery* 2006;140:793-802.
95. Mizunuma K, Ohdan H, Tashiro H, et al. ROCK inhibitor Y-27632 prevents primary graft non-function caused by warm ischemia/reperfusion in rat liver transplantation. *Transplant Int.* 2002;15:623-629.
96. Gao W, Bentley R, Madden J, et al. Apoptosis of Sinusoidal Endothelial Cells Is a Critical Mechanism of Preservation Injury in Rat Liver transplantation. *Hepatology.* 1998;24:1652-1060.
97. Massip-Salcedo M, Casillas-Ramirez A, Franco-Gou R, et al. Heat Shock Proteins and Mitogen-activated Protein Kinases in Steatotic Livers Undergoing Ischemia-Reperfusion: Some Answers. *Am J Pathol.* 2006;168(5):1474-1485.
98. Kuboki S, Schuster R, Blanchard J, et al. Role of heat shock protein 70 in hepatic ischemia-reperfusion injury in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2007;292(4):G1141-1149.
99. Glantzounis GK, Yang W, Koti RS, Mikhailidis DP, Seifalian AM, Davidson BR. The role of thiols in liver ischemia-reperfusion injury. *Curr Pharm Des.* 2006;12:2891-2901.
100. Kiang JG, Tsokos GC. Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology. *Pharmacol Ther.* 1998;80:183-201.
101. Kuboki S, Okaya T, Schuster R, Blanchard J, Denenberg A, Wong H, Lentsch AB. Hepatocyte NF-B activation is hepatoprotective during ischemia/reperfusion injury and is augmented by ischemic hypothermia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2007;292:G201-G207.

102. Luedde T, Assmus U, Wustefeld T, et al. Deletion of IKK2 in hepatocytes does not sensitize these cells to TNF-induced apoptosis but protects from ischemia/reperfusion injury. *J Clin Invest.* 2005;115:849-859.
103. Tsuchihashi S, Fondevila C, Kupiec-Weglinski JW. Heme oxygenase system in ischemia and reperfusion injury. *Ann Transplant.* 2004;9:84-87.
104. Choukèr A, Schachtner T, Schauer R, et al. Effects of Pringle manoeuvre and ischaemic preconditioning on haemodynamic stability in patients undergoing elective hepatectomy: a randomized trial. *Br J Anaesth.* 2004;93:204-211.
105. Heizmann O, Meimarakis G, Volk A, et al. Ischemic preconditioning-induced hyperperfusion correlates with hepatoprotection after liver resection. *World J Gastroenterol.* 2010;16(15):1871-1878.
106. Clavien PA, Selzner M, Rudiger HA, et al. A prospective randomized study in 100 consecutive patients undergoing major liver resection with versus without ischemic preconditioning. *Ann Surg.* 2003;238:843-850.
107. Heizmann O, Meimarakis G, Volk A, et al. Ischemic preconditioning-induced hyperperfusion correlates with hepatoprotection after liver resection. *World J Gastroenterol.* 2010;16(15):1871-1878.
108. Jin LM, Liu YX, Zhou L, et al. Ischemic Preconditioning Attenuates Morphological and Biochemical Changes in Hepatic Ischemia/Reperfusion in Rats. *Pathobiology.* 2010;77(3):136-146.
109. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation.* 1986;74:1124-1136.
110. Pang CY, Yang RZ, Zhong A, et al. Acute ischemic preconditioning protects against skeletal muscle infarction in the pig. *Cardiovasc Res.* 1995;29:782-788.
111. Glazier SS, O'Rourke DM, Graham DI, Welsh FA. Induction of ischemic tolerance following brief focal ischemia in rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1994;14:545-553.
112. Sakurai M, Hayashi T, Abe K, et al. Enhancement of heat shock protein expression after transient ischemia in the preconditioned spinal cord of rabbits. *J Vasc Surg.* 1998;27:720-725.
113. Turman MA, Bates CM. Susceptibility of human proximal tubular cells to hypoxia: effect of hypoxic preconditioning and comparison to glomerular cells. *Ren Fail.* 1997;19:47-60.



114. Roth S, Li B, Rosenbaum PS, Gupta H, et al. Preconditioning provides complete protection against retinal ischemic injury in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1998;39:777-785.
115. Du ZY, Hicks M, Winlaw D, et al. Ischemic preconditioning enhances donor lung preservation in the rat. *J Heart Lung Transplant.* 1996;15:1258-1267.
116. Hotter G, Closa D, Prados M, Fernandez-Cruz L, et al. Intestinal preconditioning is mediated by a transient increase in nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996;222:27-32.
117. Hardy KJ, McClure DN, Subwongcharoen S. Ischaemic preconditioning of the liver: a preliminary study. *Aust N Z J Surg.* 1996;66:707-710.
118. Peralta C, Closa D, Hotter G, et al. Liver ischemic preconditioning is mediated by the inhibitory action of nitric oxide on endothelin. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996;229:264-270.
119. Clavien PA, Yadav S, Sindram D, Bentley RC. Protective effects of ischemic preconditioning for liver resection performed under inflow occlusion in humans. *Ann Surg.* 2000;232:155-162.
120. Yadav SS, Sindram D, Perry DK, Clavien PA. Ischemic preconditioning protects the mouse liver by inhibition of apoptosis through a caspase-dependent pathway. *Hepatology.* 1999;30:1223-1231.
121. Peralta C, Hotter G, Closa D, et al. Protective effect of preconditioning on the injury associated to hepatic ischemia-reperfusion in the rat: role of nitric oxide and adenosine. *Hepatology.* 1997;25:934-937.
122. Redaelli CA, Tian YH, Schaffner T, et al. Extended preservation of rat liver graft by induction of heme oxygenase-1. *Hepatology.* 2002;35:1082-1092.
123. Peralta C, Fernandez L, Panes J, et al. Preconditioning protects against systemic disorders associated with hepatic ischemia-reperfusion through blockade of tumor necrosis factor-induced P-selectin up-regulation in the rat. *Hepatology.* 2001;33:100-113.
124. Koneru B, Fisher A, He Y, et al. Ischemic preconditioning in deceased donor liver transplantation: a prospective randomized clinical trial of safety and efficacy. *Liver Transpl.* 2005;11:196-202.
125. Koneru B, Shareef A, Dikdan G, et al. The ischemic preconditioning paradox in deceased donor liver transplantation - evidence from a prospective randomized single blind clinical trial. *Am J Transplant.* 2007;7:2788-2796.

126. Rudiger HA, Kang KJ, Sindram D, et al. Comparison of ischemic preconditioning, intermittent and continuous inflow occlusion in the murine liver. *Ann Surg.* 2002;235:400-407.
127. Makuuchi M, Mori T, Gunven P, et al. Safety of hemihepatic vascular occlusion during resection of the liver. *Surg Gynecol Obstet.* 1987;164:155-158.
128. Belghiti J, Noun R, Malafosse R, et al. Continuous versus intermittent portal triad clamping for liver resection: a controlled study. *Ann Surg.* 1999; 229:369-375.
129. Vogel T, Brockmann JG, Friend PJ. Ex-vivo normothermic liver perfusion: an update. *Curr Opin Organ Transplant.* 2010;15(2):167-172.
130. St Peter S, Imber C, Lopez I, et al. Extended preservation of non- heart-beating donor livers with normothermic machine perfusion. *Br J Surg.* 2002;89:609-616.
131. Imber C, St Peter S, Lopez de Cenarruzabeitia I, et al. Advantages of normothermic perfusion over cold storage in liver preservation. *Transplantation.* 2002;73:701-709.
132. Monbaliu D, Brassil J. Machine perfusion of the liver: past, present and future. *Curr Opin Organ Transplant.* 2010;15(2):160-166.
133. de Rougemont O, Breitenstein S, Leskosek B, et al. One hour hypothermic oxygenated perfusion (HOPE) protects nonviable liver allografts donated after cardiac death. *Ann Surg.* 2009;250(5):674-683.
134. Wagner A, Weber H, Jonas L, et al. Hyperthermia induces heat shock protein expression and protection against cerulein-induced pancreatitis in rats. *Gastroenterology.* 1996;111:1333-1342.
135. Matsumoto K, Honda K, Kobayashi N. Protective effect of heat preconditioning of rat liver graft resulting in improved transplant survival. *Transplantation.* 2001;71:862-868.
136. Coito AJ, Buelow R, Shen XD, et al. Heme-oxygenase-1 gene transfer inhibits inducible nitric oxide synthase expression and protects genetically fat Zucker rat livers from ischemia reperfusion injury. *Transplantation.* 2002;74:96-102.
137. Redaelli CA, Tian YH, Schaffner T, et al. Extended preservation of rat liver graft by induction of heme oxygenase-1. *Hepatology.* 2002;35:1082-1092.
138. Wheeler M, Katuna M, Smutney O, et al. Comparison of the effect of adenoviral delivery of three superoxide dismutase genes against hepatic ischemia-reperfusion injury. *Hum Gene Ther.* 2001;12:2167-2177.

139. Schneider MP, Sullivan JC, Wach PF, et al. Protective role of extracellular superoxide dismutase in renal ischemia/reperfusion injury. *Kidney Int.* 2010;78(4):374-81.
140. Ushitora M, Sakurai F, Yamaguchi T, et al. Prevention of hepatic ischemia-reperfusion injury by pre-administration of catalase-expressing adenovirus vectors. *J Control Release.* 2010;142(3):431-7.
141. Seshadri G, Sy JC, Brown M, Dikalov S, et al. The delivery of superoxide dismutase encapsulated in polyketal microparticles to rat myocardium and protection from myocardial ischemia-reperfusion injury. *Biomaterials.* 2010;31(6):1372-9.
142. Baumann J, Ghosh S, Szakmany T, et al. Short-term effects of N-acetylcysteine and ischemic preconditioning in a canine model of hepatic ischemia-reperfusion injury. *Eur Surg Res.* 2008;41(2):226-230.
143. Jin X, Wang L, Wu HS, et al. N-acetylcysteine inhibits activation of toll-like receptor 2 and 4 gene expression in the liver and lung after partial hepatic ischemia-reperfusion injury in mice. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2007;6(3):284-289.
144. Weigand MA, Plachky J, Thies JC, et al. N-Acetylcysteine attenuates the increase in a-glutathione S-transferase and circulating ICAM-1 and VCAM-1 after reperfusion in humans undergoing liver transplantation. *Transplantation.* 2001;72:694.
145. Polat KY, Aydinli B, Polat O, et al. The protective effect of aprotinin and alpha-tocopherol on ischemia-reperfusion injury of the rat liver. *Transplant Proc.* 2008;40(1):63-68.
146. Giakoustidis D, Papageorgiou G, Iliadis S, et al. Intramuscular administration of very high dose of alpha-tocopherol protects liver from severe ischemia/reperfusion injury. *World J Surg.* 2002;26:872-877.
147. Giakoustidis D, Papageorgiou G, Iliadis S, et al. The Protective Effect of a-Tocopherol and GdCl<sub>3</sub> Against Hepatic Ischemia/Reperfusion Injury. *Surg Today.* 2006;36:450-456.
148. Giakoustidis D, Kontos N, Iliadis S, et al. Severe total hepatic ischemia and reperfusion: relationship between very high alpha-tocopherol uptake and lipid peroxidation. *Free Radic Res.* 2001;35(2):103-109.

149. Gondolesi GE, Semplici AM, Luna MS, et al. Alfa Tocoferol Reduces Hepatocyte Ischemia-Reperfusion Injury in an Isolated Rat Liver Model. *Transpl.Proc.* 1998;30:2885-2888.
150. Taha MO, Simões MJ, Noguerol EC, et al. Effects of allopurinol on ischemia and reperfusion in rabbit livers. *Transplant Proc.* 2009;41(3):820-823.
151. Liu PG, He SQ, Zhang YH, Wu J. Protective effects of apocynin and allopurinol on ischemia/reperfusion-induced liver injury in mice. *World J Gastroenterol.* 2008;14(18):2832-2837.
152. Lee WY, Lee SM. Synergistic protective effect of ischemic preconditioning and allopurinol on ischemia/reperfusion injury in rat liver. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;349(3):1087-1093.
153. Olsson R. Changes in content of purine nucleoside in canine myocardium during coronary occlusion. *Circ Res.* 1970;26:301-306.
154. Parrat J. Protection of the heart by ischemic preconditioning: mechanisms and possibilities for pharmacological exploitation. *TIPS.* 1994;15:19-25.
155. Peralta C, Hotter G, Closa D, et al. Protective effect of preconditioning on the injury associated to hepatic ischemia-reperfusion in the rat: role of nitric oxide and adenosine. *Hepatology.* 1997;25:934-937.
156. Peralta C, Hotter G, Closa D, et al. The protective role of adenosine in inducing nitric oxide synthesis in rat liver ischemia preconditioning is mediated by activation of adenosine A2 receptors. *Hepatology.* 1999;29:126-132.
157. Peralta C, Closa D, Xaus C, et al. Hepatic preconditioning in rats is defined by a balance of adenosine and xanthine. *Hepatology.* 1998;28:768-773.
158. Giovanardi RO, Rhoden EL, Cerski CT, et al. Pharmacological preconditioning using intraportal infusion of L-arginine protects against hepatic ischemia reperfusion injury. *J Surg Res.* 2009;155(2):244-253.
159. Krauss H, Jablecka A, Sosnowski P, Bogdanski P. Influence of L-arginine on the nitric oxide concentration and level of oxidative stress during ischemia-reperfusion injury in a rat model. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 2009;47(8):533-538.
160. Yuzawa H, Fujioka H, Mizoe A, et al. Inhibitory effects of safe and novel SOD derivatives, galactosylated-SOD, on hepatic warm ischemia/reperfusion injury in pigs. *Hepatogastroenterology.* 2005;52(63):839-843.

161. Chen CF, Hsueh CW, Tang TS, et al. Reperfusion liver injury-induced superoxide dismutase and catalase expressions and the protective effects of N-acetyl cysteine. *Transplant Proc.* 2007;39(4):858-860.
162. Rao J, Zhang C, Wang P, et al. All-trans retinoic acid alleviates hepatic ischemia/reperfusion injury by enhancing manganese superoxide dismutase in rats. *Biol Pharm Bull.* 2010;33(5):869-875.
163. Zhu DJ, Xia B, Bi Q, Zhang SJ, et al. Functional protection of pentoxifylline against spinal cord ischemia/reperfusion injury in rabbits: necrosis and apoptosis effects. *Chin Med J.* 2008;121(23):2444-2449.
164. Freire Cerqueira N, Hussni CA, Bonetti Yoshida W, et al. Effects of pentoxifylline and n-acetylcysteine on injuries caused by ischemia and reperfusion of splanchnic organs in rats. *Angiol.* 2008;27(6):512-521.
165. El-Ghoneimi A, Cursio R, Schmid-Alliana A, et al. Pentoxifylline inhibits liver expression of tumor necrosis factor alpha mRNA following normothermic ischemia-reperfusion. *HPB (Oxford).* 2007;9(2):112-119.
166. El-Ghoneimi A, Cursio R, Schmid-Alliana A, et al. Inhibition of tumor necrosis factor alpha gene transcription by pentoxifylline reduces normothermic liver ischemia-reperfusion injury in rats. *Transplant Proc.* 2007;39(6):1761-1764.
167. Maksan S, Maksan M, Gebhard M, et al. Reduction of Hepatic reperfusion injury by antithrombin III and aprotinin. *Transpl Int.* 2000;13(1):562-564.
168. Duru S, Koca U, Oztekin S, et al. Antithrombin III pretreatment reduces neutrophil recruitment into the lung and skeletal muscle tissues in the rat model of bilateral lower limb ischemia and reperfusion: a pilot study. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2005;49(8):1142-1148.
169. Harada N, Okajima K, Kurihara H, Nakagata N. Antithrombin prevents reperfusion-induced hepatic apoptosis by enhancing insulin-like growth factor-I production in mice. *Crit Care Med.* 2008;36(3):971-974.
170. Harada N, Okajima K, Uchiba M, et al. Antithrombin reduces reperfusion-induced liver injury in mice by enhancing sensory neuron activation. *Thromb Haemost.* 2006;95(5):788-795. *Transplant Proc.* 2009;41(3):812-815.
171. Taha MO, Gonçalves PF, Vidigal RO, et al. Protective effects of heparin on hepatic ischemia and reperfusion lesions in rabbits. *Transplant Proc.* 2009;41(3):812-815.

172. Harada N, Okajima K, Uchiba M, et al. Dalteparin, a low molecular weight heparin, attenuates inflammatory responses and reduces ischemia-reperfusion-induced liver injury in rats. *Crit Care Med.* 2006;34(7):1883-1891.
173. Matsumoto T, Yamaguchi M, Kikuchi H, et al. Heparin reduces serum levels of endothelin-1 and hepatic ischemia reperfusion injury in rabbits. *Surg Today.* 2000;30(6):523-525.
174. Vollmar B, Menger MD. The hepatic microcirculation: mechanistic contributions and therapeutic targets in liver injury and repair. *Physiol Rev.* 2009;89(4):1269-1339.
175. Totsuka E, Todo S, Zhu Y, Ishizaki N, et al. Attenuation of ischemic liver injury by prostaglandin E1 analogue, misoprostol, and prostaglandin I2 analogue, OP-41483. *J Am Coll Surg.* 1998;187(3):276-286.
176. Salam OM, Sleem AA, Omara EA, Hassan NS. Hepatoprotective effects of misoprostol and silymarin on carbon tetrachloride-induced hepatic damage in rats. *Fundam Clin Pharmacol.* 2009;23(2):179-188.
177. Topcu I, Vatansever S, Var A, et al. The effect of Misoprostol, a prostaglandin E1 analog, on apoptosis in ischemia-reperfusion-induced intestinal injury. *Acta Histochem.* 2007;109(4):322-329.
178. Matsuo K, Togo S, Sekido H, et al. Pharmacologic preconditioning effects: prostaglandin E1 induces heat-shock proteins immediately after ischemia/reperfusion of the mouse liver. *J Gastrointest Surg.* 2005;9(6):758-768.
179. Uchida Y, Freitas MC, Zhao D, et al. The Inhibition of Neutrophil Elastase Ameliorates Mouse Liver Damage Due to Ischemia and Reperfusion. *Liver Transpl.* 2009;15:939-947.
180. Jaeschke H, Hasegawa T. Role of neutrophils in acute inflammatory liver injury. *Liver Int.* 2006;26:912-919.
181. Moll T, Dejana E, Vestweber D. In vitro degradation of endothelial catenins by a neutrophil protease. *J Cell Biol.* 1998;140:403-407.
182. Jaeschke H. Mechanisms of liver injury. II. Mechanisms of neutrophil-induced liver cell injury during hepatic ischemia-reperfusion and other acute inflammatory conditions. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2006;290:1083-1088.

183. Mainardi CL, Dixit SN, Kang AH. Degradation of type IV (basement membrane) collagen by a proteinase isolated from human polymorphonuclear leukocyte granules. *J Biol Chem.* 1980;255:5435-5441.
184. Mainardi CL, Hasty DL, Seyer JM, Kang AH. Specific cleavage of human type III collagen by human polymorphonuclear leukocyte elastase. *J Biol Chem.* 1980;255: 12006-12010.
185. Zhai Y, Qiao B, Shen XD, et al. Evidence for the pivotal role of endogenous toll-like receptor 4 ligands in liver ischemia and reperfusion injury. *Transplantation.* 2008;85:1016-1022.
186. Baskin-Bey ES, Washburn K, Feng S, et al. Clinical Trial of the Pan-Caspase Inhibitor, IDN-6556, in Human Liver Preservation Injury. *Am J Transplant.* 2007;7(1):218-825.
187. Belzer F, Southard J. Principles of solid organ preservation by cold storage. *Transplantation.* 1988;45:673.
188. Maathuis MH, Leuvenink HG, Ploeg RJ. Perspectives in organ preservation. *Transplantation.* 2007 27;83(10):1289-1298.
189. Ushitora M, Sakurai F, Yamaguchi T, et al. Prevention of hepatic ischemia-reperfusion injury by pre-administration of catalase-expressing adenovirus vectors. *J Control Release.* 2010;142(3):431-437.
190. Li JQ, Qi HZ, He ZJ, et al. Cytoprotective effects of human interleukin-10 gene transfer against necrosis and apoptosis induced by hepatic cold ischemia/reperfusion injury. *J Surg Res.* 2009;157(1):71-78.
191. Honda K, Tohyama T, Kotegawa H, et al. Protective effect of adeno-mediated human Bcl-xL gene transfer to the mouse liver in a partial ischemia/reperfusion model. *J Surg Res.* 2009;157(1):107-116.
192. Strubelt O, Younes M, Li Y. Protection by albumin against ischaemia- and hypoxia-induced hepatic injury. *Pharmacol Toxicol.* 1994;75:280-284.
193. Karwinski W, Soreide O. Allopurinol improves scavenging ability of the liver after ischemia/reperfusion injury. *Liver.* 1997;17:139-143.
194. Gerbes AL, Vollmar AM, Kiemer AK, Bilzer M. The guanylate cyclase-coupled natriuretic peptide receptor: a new target for prevention of cold ischemia-reperfusion damage of the rat liver. *Hepatology.* 1998;28:1309-1317.

195. Bilzer M, Jaeschke H, Vollmar AM, et al. Prevention of Kupffer cell-induced oxidant injury in rat liver by atrial natriuretic peptide. *Am J Physiol.* 1999;276:1137-1144.
196. Kierner AK, Gerbes AL, Bilzer M, Vollmar AM. The atrial natriuretic peptide and cGMP: novel activators of the heat shock response in rat livers. *Hepatology.* 2002;35:88-94.
197. Amersi F, Nelson SK, Shen XD, et al. Bucillamine, a thiol antioxidant, prevents transplantation-associated reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002;99:8915-8920.
198. Konukoglu D, Tasci I, Cetinkale O. Effects of cyclosporin A and ibuprofen on liver ischemia-reperfusion injury in the rat. *Clin Chim Acta.* 1998;275:1-8.
199. Ozaki M, Nakamura M, Teraoka S, Ota K. Ebselen, a novel anti-oxidant compound, protects the rat liver from ischemiareperfusion injury. *Transpl Int.* 1997;10:96-102.
200. Garcia Criado FJ, Palma Vargas JM, Valdunciel Garcia JJ, et al. Tacrolimus (FK506) down-regulates free radical tissue levels, serum cytokines, and neutrophil infiltration after severe liver ischemia. *Transplantation.* 1997;64:594-598.
201. Kobayashi H, Kurokawa T, Kitahara S, et al. The effects of gamma-glutamylcysteine ethyl ester, a prodrug of glutathione, on ischemia-reperfusion-induced liver injury in rats. *Transplantation.* 1992;54:414-418.
202. Zhong Z, Froh M, Connor HD, et al. Prevention of hepatic ischemiareperfusion injury by green tea extract. *Am J Physiol.* 2002;283:957-964.
203. Sewerynek E, Reiter RJ, Melchiorri D, et al. Oxidative damage in the liver induced by ischemia-reperfusion: protection by melatonin. *Hepatology.* 1996;43:898-905.
204. Yokota R, Fukai M, Shimamura T, et al. A novel hydroxyl radical scavenger, nicaraven, protects the liver from warm ischemia and reperfusion injury. *Surgery.* 2000;127:661-669.
205. Tanaka J, Malchesky PS, Omokawa S, et al. Effects of prostaglandin I<sub>2</sub>, superoxide dismutase, and catalase on ischemia-reperfusion injury in liver transplantation. *ASAIO Trans.* 1990;36:600-603.



206. Giakoustidis D, Papageorgiou G, Iliadis S, et al. Intramuscular administration of very high dose of alpha-tocopherol protects liver from severe ischemia/reperfusion injury. *World J Surg.* 2002; 26:872-877.
207. Soltys K, Dikdan G, Koneru B. Oxidative stress in fatty livers of obese Zucker rats: rapid amelioration and improved tolerance to warm ischemia with tocopherol. *Hepatology.* 2001;34:13-18.
208. Tsimoyiannis EC, Moutesidou KJ, Moschos CM, et al. Trimetazidine for prevention of hepatic injury induced by ischaemia and reperfusion in rats. *Eur J Surg.* 1993;159:89-93.
209. Chen CF, Wang D, Hwang CP, et al. The protective effect of niacinamide on ischemia-reperfusion-induced liver injury. *J Biomed Sci.* 2001;8:446-452.
210. Peralta C, Xaus C, Bartrons R, et al. Effect of ozone treatment on reactive oxygen species and adenosine production during hepatic ischemia-reperfusion. *Free Radic Res.* 2000;33:595-605.
211. Wang Y, Lawson JA, Jaeschke H. Differential effect of 2-aminoethyl-isothiourea, an inhibitor of the inducible nitric oxide synthase, on microvascular blood flow and organ injury in models of hepatic ischemia-reperfusion and endotoxemia. *Shock.* 1998;10:20-25.
212. Fiegen RJ, Rauen U, Hartmann M, et al. Decrease of ischemic injury to the isolated perfused rat liver by loop diuretics. *Hepatology.* 1997;25:1425-1431.
213. Lim SP, Andrews FJ, Christophi C, O'Brien PE. Microvascular changes in liver after ischemia-reperfusion injury. Protection with misoprostol. *Dig Dis Sci.* 1994;39:1683-1690.
214. Konrad T, Bloechle C, Haller G, et al. Verapamil and flunarizine protect the isolated perfused rat liver against warm ischemia and reperfusion injury. *Res Exp Med.* 1995;195:61-68.
215. Mehendale HM, Limaye PB. Calpain: a death protein that mediates progression of liver injury. *Trends Pharmacol Sci.* 2005;26(5):232-236.
216. Kohli V, Madden JF, Bentley RC, Clavien PA. Calpain mediates ischemic injury of the liver through modulation of apoptosis and necrosis. *Gastroenterology.* 1999;116:168-178.
217. Kim YI, Hwang YJ, Song KE, et al. Hepatocyte protection by a protease inhibitor against ischemia/ reperfusion injury of human liver. *J Am Coll Surg.* 2002;195:41-50.

218. Jung SE, Yun IJ, Youn YK, et al. Effect of protease inhibitor on ischemia-reperfusion injury to rat liver. *World J Surg.* 1999;23:1027-1031.
219. Okabe H, Takatsuki K. Role of granulocyte elastase in ischemia/reperfusion injury of rat liver. *Crit Care Med.* 1996;24:1908-1912.
220. Kwon AH, Qiu Z. Neutrophil elastase inhibitor prevents endotoxin-induced liver injury following experimental partial hepatectomy. *Br J Surg.* 2007;94(5):609-619.
221. Lentsch A, Yoshidome H, Warner R, et al. Secretory leukocyte protease inhibitor in mice regulates local and remote organ inflammatory injury induced by hepatic ischemia/reperfusion. *Gastroenterology.* 1999;117:953-961.
222. Jung SE, Yun IJ, Youn YK, et al. Effect of protease inhibitor on ischemia-reperfusion injury to rat liver. *World J Surg.* 1999;23(10):1027-1031.
223. Kobayashi A, Imamura H, Isobe M, et al. Mac-1 (CD11b/CD18) and intercellular adhesion molecule-1 in ischemia-reperfusion injury of rat liver. *Am J Physiol.* 2001;281:G577-G585.
224. Kobayashi M, Takeyoshi I, Kurabayashi M, et al. The effects of a cyclooxygenase-2 inhibitor, FK3311, on total hepatic ischemia-reperfusion injury of the rat. *Hepatogastroenterology.* 2007;54(74):522-6.
225. Takeichi T, Uemoto S, Minamiguchi S, et al. Effect of ONO-4057 and tacrolimus on ischemia-reperfusion injury of the liver. *World J Gastroenterol.* 2009;15(45):5712-5715.
226. Travis DL, Fabia R, Netto GG, et al. Protection by cyclosporine A against normothermic liver ischemia-reperfusion in pigs. *J Surg Res.* 1998;75(2):116-126.
227. Hong F, Radaeva S, Pan HN, et al. Interleukin 6 alleviates hepatic steatosis and ischemia/reperfusion injury in mice with fatty liver disease. *Hepatology.* 2004;40(4):933-41.
228. Le Moine O, Louis H, Demols A, et al. Cold liver ischemia-reperfusion injury critically depends on liver T cells and is improved by donor pretreatment with interleukin-10 in mice. *Hepatology.* 2000;31:1266-1274.
229. Sano T, Izuishi K, Hossain MA, et al. Protective effect of lipopolysaccharide preconditioning in hepatic ischaemia reperfusion injury. *HPB (Oxford).* 2010;12(8):538-545.

230. Natori S, Fujii Y, Kurosawa H, Nakano A, Shimada H. Prostaglandin E1 protects against ischemia-reperfusion injury of the liver by inhibition of neutrophil adherence to endothelial cells. *Transplantation*. 1997;64:1514-1520.
231. Okajima K, Harada N, Uchiba M. Ranitidine reduces ischemia/reperfusion-induced liver injury in rats by inhibiting neutrophil activation. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002;301:1157-1165.
232. Sakakura Y, Kaibori M, Oda M, et al. Recombinant human hepatocyte growth factor protects the liver against hepatic ischemia and reperfusion injury in rats. *J Surg Res*. 2000;92:261-266.
233. Dulkanchainun TS, Goss JA, Imagawa DK, et al. Reduction of hepatic ischemia/reperfusion injury by a soluble P-selectin glycoprotein ligand-1. *Ann Surg*. 1998;227:832-840.
234. Tsuchihashi S, Fondevila C, Shaw GD, et al. Molecular characterization of rat leukocyte P-selectin glycoprotein ligand-1 and effect of its blockade: protection from ischemia-reperfusion injury in liver transplantation. *J Immunol*. 2006;176(1):616-624.
235. Ruetsch YA, Böni T, Borgeat A. From Cocaine to Ropivacaine: The History of Local Anesthetic Drugs. *Curr Top Med Chem*. 2001;1(3):175-182.
236. dos Reis A Jr. Sigmund Freud (1856-1939) and Karl Köller (1857-1944) and the discovery of local anesthesia. *Rev Bras Anesthesiol*. 2009;59(2):244-257.
237. Ball C, Westhorpe R. Local anaesthesia-Freud, Koller and cocaine. *Anaesth Intensive Care*. 2003;31(3):249.
238. Wyklicky H. 100 years of local anesthesia. *Wien Klin Wochenschr*. 1985;97(10):449-450.
239. Appelboom T. Consumption of coca in history. *Verh K Acad Geneesk Belg*. 1991;53(5):497-505.
240. Smith G. Peripheral Nerve and Local Anaesthetic Drugs. *Br. J. Anaesth*. 1986;58:692-700.
241. Hondeghem L, Roden D. Agents Used in Cardiac Arrhythmias. *Katzung B. Basic and Clinical Pharmacology*. 2009;14:235-262.
242. Ronald D, Katzung B. Local Anesthetics. *Katzung, Basic and Clinical Pharmacology*. 2009;25:445-471.
243. William A. Mackie C. Local Anesthetics. *Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 2006.

244. Johnson SM, Saint John BE, Dine AP. Local anesthetics as antimicrobial agents: a review. *Surg Infect.* 2008;9(2):205-213.
245. de Klaver MJ, Weingart GS, Obrig TG, Rich GF. Local anesthetic-induced protection against lipopolysaccharide-induced injury in endothelial cells: the role of mitochondrial adenosine triphosphate-sensitive potassium channels. *Anesth Analg.* 2006;102(4):1108-1113.
246. Gallos G, Jones DR, Nasr SH, et al. Local Anesthetics Reduce Mortality and Protect against Renal and Hepatic Dysfunction in Murine Septic Peritonitis. *Anesthesiology.* 2004;101:902-911.
247. Cassuto J, Sinclair R, Bonderovic M. Anti-inflammatory properties of local anesthetics and their present and potential clinical implications. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2006;50(3):265-282.
248. Jonsson A, Mattsson U, Tarnow P, et al. Topical local anaesthetics (EMLA) inhibit burn-induced plasma extravasation as measured by digital image colour analysis. *Burns.* 1998;24:313-318.
249. Martinsson T, Haegerstrand A, Dalsgaard CJ. Effects of ropivacaine on eicosanoid release from human granulocytes and endothelial cells in vitro. *Inflamm Res.* 1997;46:398-403.
250. Pietruck C, Grond S, Xie G, et al. Local Anesthetics Differentially Inhibit Sympathetic Neuron-Mediated and C Fiber-Mediated Synovial Neurogenic Plasma Extravasation. *Anesth Analg.* 2003;96:1397-1402.
251. Sinclair R, Eriksson AS, Gretzer C, et al. Inhibitory effects of amide local anaesthetics on stimulus-induced human leukocyte metabolic activation, LTB<sub>4</sub> release and IL-1 secretion in vitro. *Acta Anaesthesiol Scand.* 1993;37:159-165.
252. Yanagi H, Sankawa H, Saito H, Iikura Y. Effect of lidocaine on histamine release and Ca<sup>2+</sup> mobilization from mast cells and basophils. *Acta Anaesthesiol Scand.* 1996;40:1138-1144.
253. MacGregor RR, Thorner RE, Wright DM. Lidocaine inhibits granulocyte adherence and prevents granulocyte delivery to inflammatory sites. *Blood.* 1980;56:203-209.
254. Rimbäck G, Cassuto J, Wallin G, Westlander G. Inhibition of peritonitis by amide local anesthetics. *Anesthesiology.* 1988;69:881-886.

255. Cassuto J, Sinclair R, Bonderovic M. Anti-inflammatory properties of local anesthetics and their present and potential clinical implications. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2006;50(3):265-282.
256. Lan W, Harmon D, Wang JH, et al. The effect of lidocaine on in vitro neutrophil and endothelial adhesion molecule expression induced by plasma obtained during tourniquet-induced ischaemia and reperfusion. *Eur J Anaesthesiol.* 2004;21(11):892-897.
257. Lan W, Harmon D, Wang JH, et al. The effect of lidocaine on neutrophil CD11b/CD18 and endothelial ICAM-1 expression and IL-1beta concentrations induced by hypoxia-reoxygenation. *Eur J Anaesthesiol.* 2004;21(12):967-972.
258. Swanton BJ, Shorten G. Anti-inflammatory effects of local anesthetic agents. *Int Anesthesiol Clin.* 2003;41(1):1-19.
259. Hollmann MW, Durieux ME. Local anesthetics and the inflammatory response: A new therapeutic indication? *Anesthesiology.* 2000; 93:858-875.
260. Beloeil H, Mazoit JX. Effect of local anesthetics on the postoperative inflammatory response. *Ann Fr Anesth Reanim.* 2009;28(3):231-237.
261. Zhang XW, Thorlacius H. Inhibitory actions of ropivacaine on tumor necrosis factor-alpha-induced leukocyte adhesion and tissue accumulation in vivo. *Eur J Pharmacol.* 2000; 24;392(1-2):1-3.
262. Fischer LG, Bremer M, Coleman EJ, et al. Local anesthetics attenuate lysophosphatidic acid-induced priming in human neutrophils. *Anesth Analg.* 2001; 92:1041-1047.
263. Li CY, Tsai CS, Hsu PC, et al. Lidocaine attenuates monocyte chemoattractant protein-1 production and chemotaxis in human monocytes: Possible mechanisms for its effect on inflammation. *Anesth Analg.* 2003; 97:1312-1316.
264. Lan W, Harmon DC, Wang JH, et al. Activated endothelial interleukin-1beta, -6, and -8 concentrations and intercellular adhesion molecule-1 expression are attenuated by lidocaine. *Anesth Analg.* 2005;100(2):409-412.
265. Lahav M, Levite M, Bassani L, et al. Lidocaine inhibits secretion of IL-8 and IL-1beta and stimulates secretion receptor antagonist by epithelial cells. *Clin Exp Immunol.* 2002;127:226-233.
266. Schmid RA, Yamashita M, Ando K, et al. Lidocaine reduces reperfusion injury and neutrophil migration in canine lung allografts. *Ann Thorac Surg.* 1996; 61:949-955.

267. Cook VL, Jones Shults J, McDowell M, et al. Attenuation of ischaemic injury in the equine jejunum by administration of systemic lidocaine. *Equine Vet J.* 2008;40:353-357.
268. Hahnenkamp K, Theilmeyer G, Van Aken HK, Hoenemann CW. The effects of local anesthetics on perioperative coagulation, inflammation, and microcirculation. *Anesth Analg.* 2002; 94:1441-1447.
269. Tuman KJ, McCarthy RJ, March RJ, et al. Effects of epidural anesthesia and analgesia on coagulation and outcome after major vascular surgery. *Anesth Analg.* 1991;73:696-704.
270. Modig J, Borg T, Bagge L, Saldeen T. Role of extradural and general anaesthesia in fibrinolysis and coagulation after total hip replacement. *Br J Anaesth.* 1983;55:625-629.
271. Henny CP, Odoom JA, Ten Cate JW, et al. Effects of extradural bupivacaine on the haemostatic system. *Br J Anaesth.* 1986;58:301-305.
272. Odoom JA, Dokter PW, Sturk A, et al. The influence of epidural analgesia on platelet function and correlation with plasma bupivacaine concentrations. *Eur J Anaesthesiol.* 1988;5:305-312.
273. Cooke ED, Bowcock SA, Lloyd MJ, Pilcher MF. Intravenous lignocaine in prevention of deep venous thrombosis after elective hip surgery. *Lancet.* 1977;15:797-799.
274. Luostarinen V, Evers H, Lyytikainen MT, et al. Antithrombotic effects of lidocaine and related compounds on laser-induced microvascular injury. *Acta Anaesthesiol Scand.* 1981;25:9-11.
275. Haljamae H, Frid H, Holm J, Akerstrom G. Epidural versus general anesthesia and leg blood flow in patients with occlusive atherosclerotic disease. *Eur J Vasc Surg.* 1988;2:395-400.
276. Scott GR, Rothkopf DM, Walton RL. Efficacy of epidural anesthesia in free flaps to the lower extremity. *Plast Reconstr Surg.* 1993;91:673-677.
277. Strohm C, Barancik T, Bruhl ML, et al. Inhibition of the ER-kinase cascade by PD98059 and UO126 counteracts ischemic preconditioning in pig myocardium. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2000; 36:218-229.
278. Eskitascioglu T, Karaci S, Canoz O, et al. The Impact of Lidocaine on Flap Survival Following Reperfusion Injury. *J Surg Res.* 2009

279. Dias RR, Stolf NA, Dalva M, et al. Inclusion of lidocaine in cardioplegic solutions provides additional myocardial protection. *J Cardiovasc Surg.* 2004;45(6):551-555.
280. Lee R, Nitta T, Schmid RA, et al. Retrograde infusion of lidocaine or L-arginine before reperfusion reduces myocardial infarct size. *Ann Thorac Surg.* 1998;65:1353-1359.
281. Yamaguchi S, Watanabe G, Tomita S, Tabata S. Lidocaine-magnesium blood cardioplegia was equivalent to potassium blood cardioplegia in left ventricular function of canine heart. *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 2007;6(2):172-176.
282. Das KC, Misra HP. Prevention of reperfusion lung injury by lidocaine in isolated rat lung ventilated with higher oxygen levels. *J Postgrad Med.* 2003;49:17-20.
283. Tomori H, Shiraishi M, Koga H, et al. Protective effects of lidocaine in hepatic ischemia/reperfusion injury in vitro. *Transplant Proc.* 1998;30:3740-3742.
284. Kaczmarek DJ, Herzog C, Larmann J, et al. Lidocaine Protects from Myocardial Damage due to Ischemia and Reperfusion in Mice by Its Antiapoptotic Effects. *Anesthesiology.* 2009;110:1041-1049.
285. Gallos G, Jones DR, Nasr SH, et al. Local anesthetics reduce mortality and protect against renal and hepatic dysfunction in murine septic peritonitis. *Anesthesiology.* 2004;101:902-911.
286. Canyon SJ, Dobson GP. Pretreatment with an adenosine A1 receptor agonist and lidocaine: a possible alternative to myocardial ischemic preconditioning. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2005;130(2):371-377.
287. Wright JL, Durieux ME, Groves DS. A brief review of innovative uses for local anesthetics. *Curr Opin Anaesthesiol.* 2008;21(5):651-656.
288. Cao H, Kass IS, Cottrell JE, Bergold PJ. Pre- or postinsult administration of lidocaine or thiopental attenuates cell death in rat hippocampal slice cultures caused by oxygen-glucose deprivation. *Anesth Analg.* 2005;101(4):1163-1169.
289. Kaczmarek DJ, Herzog C, Larmann J, Gillmann HJ, Hildebrand R, Schmitz M, Westermann A, Harendza T, Werdehausen R, Osthaus AW, Echtermeyer F, Hahnenkamp K, Wollert KC, Theilmeier G. Lidocaine protects from myocardial damage due to ischemia and reperfusion in mice by its antiapoptotic effects. *Anesthesiology.* 2009;110(5):1041-1049.

290. Esposito E, Cuzzocrea S. TNF-alpha as a therapeutic target in inflammatory diseases, ischemia-reperfusion injury and trauma. *Curr Med Chem.* 2009;16(24):3152-3167.
291. Wiedmann MW, Mössner J, Baerwald C, Pierer M. TNF alpha inhibition as treatment modality for certain rheumatologic and gastrointestinal diseases. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets.* 2009;9(3):295-314.
292. Tobin AM, Kirby B. TNF alpha inhibitors in the treatment of psoriasis and psoriatic arthritis. *BioDrugs.* 2005;19(1):47-57.