

Mecanismos moleculares en el daño por isquemia-reperfusión hepática y en el preacondicionamiento isquémico

Pamela Romanque U^{1,2}, Mario Uribe M¹, Luis A Videla^{2,a}.

Molecular mechanisms in liver ischemic-reperfusion injury and ischemic preconditioning

Ischemia-reperfusion (IR) liver injury is associated with temporary clamping of hepatoduodenal ligament during liver surgery, hypoperfusion shock and graft failure after liver transplantation. Mechanisms of IR liver injury include: i) loss of calcium homeostasis, ii) reactive oxygen and nitrogen species generation, iii) changes in microcirculation, iv) Kupffer cell activation, and (v) complement activation. Pre-exposure of the liver to transient ischemia increases the tolerance to IR injury, a phenomenon known as hepatic ischemic preconditioning (IP). IP involves: i) recovery of the energy supply and calcium, sodium and pH homeostasis, ii) enhancement in the antioxidant potential, and iii) expression of multiple stress-response proteins, including acute phase proteins, heat shock proteins, and heme oxygenase. These observations and preliminary studies in humans give a rationale for the assessment of IP in minimizing or preventing IR injury during surgery and non surgical conditions of tissue hypoperfusion (Rev Méd Chile 2005; 133: 469-76).

(Key Words: *Ischemia-reperfusion injury; Liver transplantation; Shock, surgical)*

Recibido el 1 de julio, 2004. Aceptado el 8 de octubre, 2004.

Trabajo financiado por el Proyecto FONDECYT #1030499.

¹Unidad de Cirugía e Investigación Experimental, Hospital del Salvador. ²Laboratorio de Estrés Oxidativo y Hepatotoxicidad, Programa de Farmacología Molecular y Clínica, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Santiago de Chile.

^aBioquímico, Magíster en Ciencias

Correspondencia a: Dra. Pamela Romanque U. Programa de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Casilla 70000, Santiago 7, Chile. Fono: 6786256, promanque@med.uchile.cl

MECANISMOS DEL DAÑO HEPÁTICO
POR ISQUEMIA-REPERFUSIÓN (IR)

Existen numerosas situaciones en las que puede ocurrir isquemia de un órgano, con falta o disminución del flujo sanguíneo y del aporte de O_2 y nutrientes al órgano. El daño por IR es un fenómeno de acentuación del daño celular en un órgano isquémico después del reestablecimiento del flujo de O_2 ¹. El conocimiento de los mecanismos del daño en IR es de gran interés, ya que participan en la fisiopatología de varias situaciones clínicas como el infarto miocárdico, accidente cerebrovascular, traumatismos mayores, algunas cirugías y shock de diverso origen². En el hígado, el daño por IR está asociado al trasplante, cirugía hepática resectiva o de reconstrucción vascular y trauma².

En condiciones de isquemia prolongada ocurren cambios funcionales que incluyen: i) la disminución de la fosforilación oxidativa y de las bombas de membrana dependientes de ATP, con la consiguiente entrada de calcio, sodio y agua a la célula; ii) el catabolismo del ATP que lleva a la acumulación de hipoxantina con generación de especies reactivas del O_2 (EROS) con la reentrada del O_2 ; iii) la promoción de la expresión de productos génicos proinflamatorios (moléculas de adhesión de leucocitos, citoquinas) y agentes bioactivos (endotelina, tromboxano A_2) a nivel endotelial; y iv) la represión de los productos de

algunos genes protectores [óxido nítrico sintasa (NOS) constitutiva, trombomodulina] y agentes bioactivos [prostaciclina, óxido nítrico ($\cdot NO$)]. Así, la isquemia induce un estado proinflamatorio que aumenta la vulnerabilidad del tejido durante la reperfusión³.

El daño hepático secundario a la IR involucra dos fases bien caracterizadas. La fase temprana, que comprende desde el inicio de la reperfusión hasta la tercera o cuarta hora, está asociada a la activación de las células de Kupffer con producción de EROS, la activación de factores del complemento y el reclutamiento y activación de linfocitos residentes (Figura 1)³⁻⁵. La fase tardía comprende desde la sexta hasta las 24 h posteriores y es dependiente de la llegada, infiltración y activación de linfocitos polimorfonucleares (PMN)⁵. En esta fase, las citoquinas proinflamatorias, principalmente el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), la interleuquina (IL)-6 e IL-1, quimioquinas y factores del complemento liberados durante la reperfusión temprana son los responsables del reclutamiento de PMN (Figura 2)³. La infiltración de PMN en el hígado perpetúa y amplifica el daño por la liberación adicional de mediadores como EROS, TNF- α y proteasas⁶. Si el daño endotelial es severo, la migración transendotelial de los neutrófilos ocurre fácilmente, sin embargo, ella requiere de la participación de moléculas de adhesión como ICAM-1 si el daño es de menor magnitud, cuya expresión aumenta en

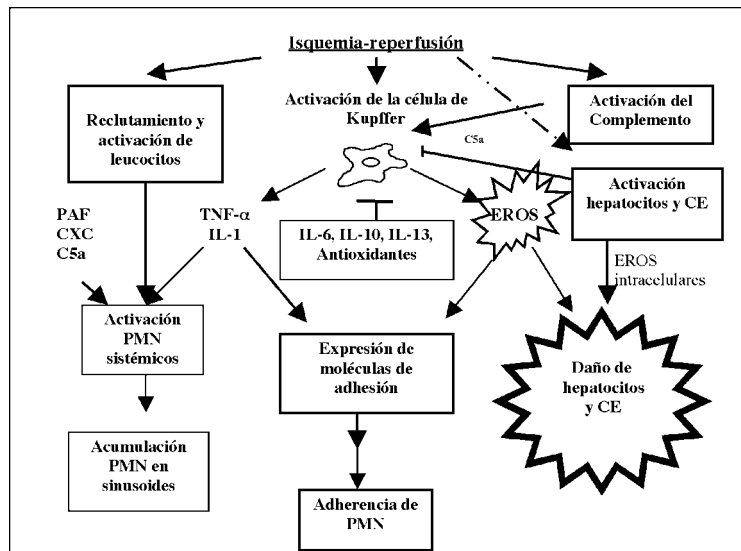


Figura 1. Fase temprana del daño por isquemia-reperfusión mediada principalmente por las células de Kupffer. Abreviaturas: CE: células endoteliales; TNF- α , factor de necrosis tumoral- α ; IL: Interleuquina; CXC: quimioquinas; PAF: Factor activador de plaquetas [Adaptada de (3)].

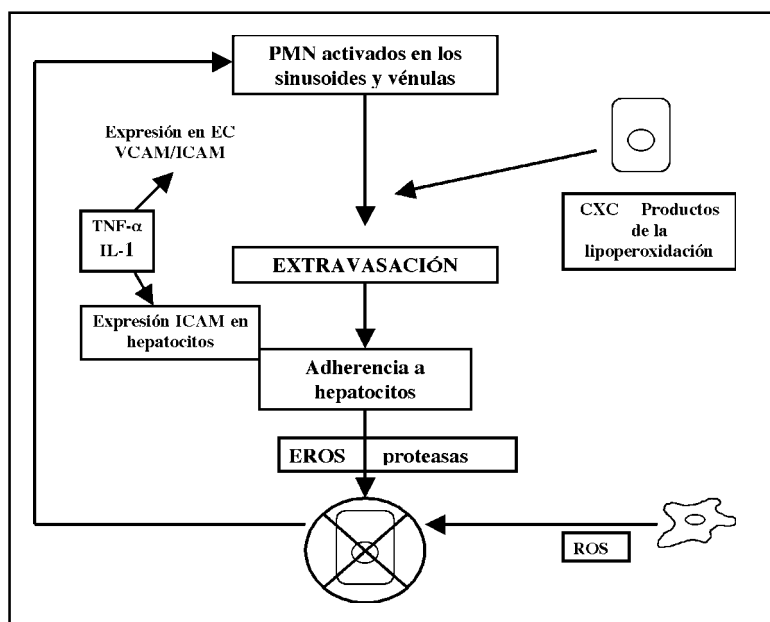


Figura 2. Fase tardía del daño por isquemia-reperfusión mediada principalmente por la llegada, activación e infiltración de neutrófilos. PMN: polimorfonucleares; ICAM: Molécula de adhesión intercelular; VCAM: Molécula de adhesión celular vascular. Ver Figura 1 para otras abreviaturas [Adaptada de (3)].

los hepatocitos en respuesta al TNF- α , IL-1 e interferón- γ (INF- γ)⁶.

FACTORES QUE PARTICIPAN EN EL DAÑO SECUNDARIO A IR

Si bien los mecanismos precisos que conducen al daño por IR no han sido elucidados, existe evidencia sustancial respecto de la participación de diversos factores.

Pérdida de la homeostasis del calcio (Ca^{+2}). Uno de los primeros factores implicados en la patogenia de la lesión por IR fue el nivel de Ca^{+2} , ya que él se acumula en los tejidos postisquémicos y el uso de bloqueadores de los canales de Ca^{+2} disminuye la lesión⁷. El mecanismo a través del cual se relaciona el aumento del Ca^{+2} intracelular con el daño, involucra tanto la activación de enzimas hidrolíticas dependientes de Ca^{+2} (fosfolipasas, proteasas, nucleasas), como el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa mitocondrial con la consecuente disminución del nivel de ATP⁷.

Generación de EROS. Las EROS se generan normalmente durante el metabolismo aeróbico celular y son neutralizadas por diversos mecanismos antioxidantes. La inflamación, hiperoxia, radiacio-

nes, metales pesados y diversos xenobióticos aumentan la generación de EROS, condiciones que al lograr el desbalance entre los procesos antioxidantes y prooxidantes, favoreciendo estos últimos, inducen el fenómeno de estrés oxidativo que puede inducir citotoxicidad⁸.

Durante la IR se ha detectado la formación de EROS en forma directa e indirecta. Ellas han sido relacionadas con el daño generado en las fases temprana y tardía del proceso⁹, ya que el uso de antioxidantes como α -tocoferol¹⁰, alopurinol¹¹ y las enzimas superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT)¹², atenúan el daño.

Entre las potenciales fuentes generadoras de EROS en el hígado se cuentan: i) La transformación, mediada por proteasas dependientes de Ca^{+2} , de la xantina deshidrogenasa en xantina oxidasa, que en presencia de O_2 durante la reperfusión oxida a la hipoxantina a ácido úrico con generación del anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2)¹³; ii) La actividad NADPH oxidasa presente en las células de Kupffer y fagocitos hepáticos, cuya inhibición bloquea la generación de EROS y la patología hepática asociada a la ingesta de alcohol¹⁴; iii) La producción de $\cdot NO$ por las NOS hepáticas y su posible conversión en peroxinitrito, ambas especies reactivas del nitrógeno (ERNs)⁸.

Cambios en la microcirculación. Habitualmente el flujo vascular a un órgano isquémico no se reestablece completamente después de liberar una oclusión vascular⁴. Los cambios que ocurren en la microcirculación durante la isquemia o reperfusión inicial del tejido llevan a áreas que no se perfunden, aun después del reestablecimiento del flujo al órgano, fenómeno que se conoce como no-reflujo (*no-reflow*)¹⁵. Estos cambios incluyen aumento del volumen celular con protrusión al lumen de los vasos, adherencia de los leucocitos al endotelio, agregación plaquetaria, acumulación de fluido intracelular y vasoconstricción⁴.

La falla microcirculatoria podría ser el fenómeno inicial que llevaría al no-reflujo, con la liberación de citoquinas proinflamatorias, formación de tapones sinusoidales con neutrófilos y otras células, e inducción de un estado de estrés oxidativo. Este fenómeno parece estar mediado por la lesión del endotelio sinusoidal y desbalance entre las moléculas vasodilatadoras y vasoconstrictoras, como endotelina (ET) y •NO que se producen en el proceso de IR⁵.

Activación de las células de Kupffer. Durante la reperfusión temprana, las células de Kupffer se activan¹⁶, exhibiendo cambios morfológicos como protrusión a los sinusoides y citoplasma vacuolado, lo que contribuye a estrechar el lumen sinusoidal y, con esto, al no-reflujo¹⁵. La célula de Kupffer activada libera mediadores proinflamatorios como el TNF- α , IL-6, IL-1 y prostaglandinas, agentes antiinflamatorios como la IL-10 e IL-13 y EROS, principalmente O₂⁻ y H₂O₂^{5,14}.

Activación de factores del complemento. El sistema del complemento también se activa en IR, siendo particularmente importantes los factores C3a, C5a, iC3b y C5b-9. C5a, además de estimular los leucocitos y la quimiotaxis, amplifica la respuesta inflamatoria al inducir la producción de MCP-1 (*methyl-accepting chemotaxis proteins*), TNF- α , IL-6 e IL-1⁴. C5b e iC3b también pueden alterar la homeostasis vascular. iC3b se forma por fragmentación de C3 y es un ligando específico para la adhesión de los leucocitos al endotelio vascular vía integrina β_2 , CD11b-CD18 (Mac-1)⁴. De esta manera, la activación del sistema del complemento contribuiría a amplificar el daño de manera

directa, por formación del complejo de ataque de membrana, e indirecta, estimulando la producción de citoquinas proinflamatorias y la migración y adhesión de leucocitos⁴.

El óxido nítrico (•NO). El •NO se forma a partir de L-arginina por la acción de las NOS, incluyendo una isoforma inducible que se expresa principalmente bajo condiciones patológicas (iNOS o NOS2), y dos constitutivas, la eNOS (NOS3) y nNOS (NOS1) que se expresan en el endotelio y en el sistema nervioso, respectivamente¹⁷. El •NO cumple múltiples funciones fisiológicas y patológicas como mediador intra e intercelular en procesos de inmunomodulación, neurotransmisión y regulación del tono vascular¹⁷.

La modificación del diámetro de los vasos sanguíneos está regulado por agentes vasoconstrictores, como las aminas biogénicas y vasodilatadores, como •NO, producidos en las células endoteliales¹⁸. La acción del •NO sobre el tono vascular, se ejerce a través del cGMP que desencadena una cascada de eventos que llevan a la reducción del tono muscular¹⁸. Las acciones del •NO pueden mediar el daño, ya sea por una acción relajadora a nivel de células estrelladas o participación en la adhesión de los neutrófilos al endotelio y en la agregación plaquetaria¹⁹.

Además, el •NO se asocia a la apoptosis de forma dual. En concentraciones fisiológicas, la apoptosis se inhibe por nitrosilación de caspasa 3, efecto asociado a inhibición de la liberación del citocromo C por bloqueo del clivaje de Bcl-2 (caspasa 3-dependiente). En niveles altos, el •NO actúa induciendo apoptosis, lo que podría estar mediado por peroxinitrito, el cual provocaría un cambio en la permeabilidad mitocondrial con la consecuente liberación de citocromo C, como también por daño al ADN y la consiguiente activación de PARS [*poly (ADP-ribose) synthase*]¹⁹.

En la IR, el •NO endógeno o exógeno protege a los hepatocitos y células endoteliales contra la lesión, efecto que parece estar mediado por la vasodilatación inducida y represión de la expresión de moléculas de adhesión y selectina-E a nivel endotelial^{18,19}. Sin embargo, niveles elevados de •NO, así como la expresión de iNOS en el injerto hepático, se han correlacionado con el rechazo post trasplante hepático ortotópico (THO)²⁰. Pese a esto, en estudios de monitoreo de

los niveles de $\cdot\text{NO}$ en humanos, intra y postoperatorio de THO, se observaron incrementos de $\cdot\text{NO}$ que no se asociaron con patología postoperatoria²¹.

Otros genes cuya activación o modulación por EROS ha sido descrita, y que podrían participar en la respuesta a la IR, incluyen los de la heme oxigenasa, endotelina-1, eNOS y del factor de estrés térmico (*Heat shock factor*, HSF)²⁶.

FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN Y REPROGRAMACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

En situaciones de estrés oxidativo el hígado puede: i) alcanzar un punto de no retorno en el que se induce muerte celular por la incapacidad de compensar en forma adecuada las alteraciones inducidas, o ii) reprogramar la expresión génica de las células sobrevivientes, con remodelación o regeneración celular²². Las células regulan varias etapas de la secuencia ADN-proteína. La iniciación de la transcripción génica vía factores de transcripción que reconocen secuencias específicas en las regiones reguladoras de los genes blanco, constituye uno de los mecanismos de control más importantes^{14,23}. Si bien el estrés oxidativo es citotóxico en forma directa^{8,22}, algunos EROS, como el H_2O_2 , pueden activar factores de transcripción que regulan una amplia variedad de genes involucrados en la promoción de señales de muerte o supervivencia^{14,23}.

NF- κB es un factor de transcripción dimérico que se encuentra en el citoplasma retenido por la proteína inhibidora I κB ²³. Diferentes vías de transducción de señales activan a NF- κB , vía degradación de I κB , liberación del dímero p50p65 activo y su traslocación al núcleo, con la activación de los genes que contienen los sitios de unión a proteínas Rel (sitios κB)²³. La relación entre el estrés oxidativo y la estimulación de la expresión génica está apoyada por la activación del NF- κB , evidenciada por el aumento significativo en su capacidad de unión al ADN en situaciones de estrés oxidativo^{23,24}.

En IR fría se ha demostrado que NF- κB tiene un patrón de activación bifásico, con un pico temprano entre los 30 min y 3 h de reperfusión y un segundo pico a las 9-12 h de reperfusión. Durante la fase temprana, la activación de NF- κB se asocia al aumento en la expresión de las citoquinas proinflamatorias IL-1 β , IL-6 y TNF- α , lo que no ocurre en la fase tardía de la activación donde, por otra parte, la inhibición de la activación de NF- κB resulta en un mayor daño en el tejido, lo que sugiere un rol dual para NF- κB ²⁵.

PREACONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO

Varios órganos responden a la exposición a períodos breves de isquemia u otros estímulos citotóxicos, aumentando su resistencia a un estímulo citotóxico posterior de mayor duración o severidad, fenómeno denominado "preacondicionamiento". El preacondicionamiento isquémico (PI) se ha descrito en el miocardio, cerebro, intestino e hígado⁵. Consiste en breves períodos de isquemia, seguidos de reperfusión, previo al insulto isquémico prolongado^{1,3,5}.

El PI hepático se evidencia con períodos de isquemia de a lo menos 90 min y un período único de IR breve es suficiente para inducir hepatoprotección²⁷. La duración de las fases del ciclo de PI es relevante en el gatillamiento de los mecanismos que median la protección, ya que períodos de isquemia de 2, 15, 20 y 30 min no son efectivos, mientras que períodos de isquemia de 5 a 10 min sí lo son^{1,27}.

En seres humanos el PI se ha utilizado limitadamente. En hepatectomías parciales, con isquemia de 30 min y evaluación a los 30 min de reperfusión, se observó una disminución en los índices de apoptosis y cierta tendencia a mayor hepatoprotección en pacientes con patología hepática previa (esteatosis)²⁸. En donantes de órganos que han sufrido de paro cardiorrespiratorio, que podría considerarse como PI involuntario, la sobrevivencia y función de los injertos son comparables a aquellos provenientes de donantes hemodinámicamente estables. Más aún, los niveles de transaminasas fueron menores en los pacientes que recibieron órganos de donantes con antecedentes de paro²⁹.

Así como el daño secundario a la IR cursa en una etapa temprana y una tardía, el PI otorga dos marcos temporales de protección, que difieren en sus mecanismos. La ventana temprana de protección transcurre desde los primeros minutos de reperfusión hasta 2 a 3 h posteriores⁵. La ventana tardía, descrita claramente en el corazón, se hace evidente a las 12-24 h y dura por 2 a 3 días³⁰. En el hígado, los

estudios se han realizado con distintos períodos de reperfusión, desde 1,5³¹ hasta 44 h³². Aun en los trabajos en los que se ha hecho reperfusión prolongada, no se ha estudiado la fase tardía del PI.

En la hepatoprotección por el PI pueden concurrir varios mecanismos posibles: i) la preservación del nivel de ATP por activación de la quinasa dependiente de AMP³³; ii) la inducción de sistemas antioxidantes [efecto protector simulado por glutatión reducido³³]; iii) el aumento moderado en los niveles de TNF- α ³²; iv) la liberación de \cdot NO [efecto protector eliminado por la inhibición de NOS y simulado por donantes de \cdot NO o L-arginina³⁴]; y v) mayores niveles de adenosina³⁴. Este último mecanismo es dependiente de la síntesis de \cdot NO y ocurriría por activación del receptor A₂ predominantemente, ya que la administración de un antagonista competitivo revierte los efectos protectores³⁵.

RESPUESTAS HEPATOPROTECTORAS GATILLADAS POR EL PI

Dentro de las respuestas que se pueden postular como responsables de la hepatoprotección que otorga el PI en el hígado, están las señales de supervivencia mediadas por TNF- α . Si bien la activación del receptor del TNF- α 1 (TNFR1) se asocia a la apoptosis mediada por caspasas, también induce la activación de los factores de transcripción NF- κ B y AP-1¹⁴. Entre los genes regulados por NF- κ B, algunos codifican productos necesarios para la supervivencia celular, como las proteínas antiapoptóticas Bcl-2, la iNOS que contribuye a la inhibición de la caspasa 3 vía nitrosilación³⁶ y la SOD mitocondrial que bloquea la citotoxicidad inducida por TNF- α y la activación de la caspasa 3³⁷.

Otro posible factor hepatoprotector es la respuesta de fase aguda, en la cual IL-1 β , TNF- α e IL-6 inducen la síntesis de proteínas de fase aguda en los hepatocitos, proceso que puede ser amplificado por la generación de estas citoquinas por las células endoteliales y las células de Kupffer³⁸. Durante el período de recuperación postisquémico el patrón de proteínas que se expresa es similar al de la respuesta de fase aguda inducida por un foco inflamatorio extrahepático, sin embargo, en el periodo temprano luego del reestablecimiento de la circulación, el hígado sintetiza preferentemente hsp 70 y hsp 89³⁹.

La enzima heme oxigenasa (HO) cataliza el corte del α -mesocarbono de la Fe-protoporfirina-IX dando como productos biliverdina, hierro libre divalente y monóxido de carbono (CO). La HO-2 se expresa en el hígado normal y no parece ser inducida por estrés oxidativo, mientras que HO-1 se expresa en situaciones de estrés y tiene sitios de unión en su ADN para AP-1, NF- κ B y elementos de respuesta para hipoxia, estrés térmico, metales pesados e IL-6. La HO-1 puede ser hepatoprotectora en la IR a través de varias de sus acciones: i) controla los niveles intracelulares de heme libre (prooxidante); ii) produce biliverdina (antioxidante); iii) mejora la perfusión vía liberación de CO; y iv) induce la síntesis de ferritina⁴⁰. En este contexto, se ha demostrado que el daño mediado por linfocitos T depende de la sobreexpresión de HO-1 en el modelo de trasplante hepático⁴¹, y que la sobreexpresión lograda por la transferencia del gen de HO-1 protege al riñón y al hígado de la injuria por IR en el trasplante⁴².

CONCLUSIONES

La diversidad de mecanismos que median la hepatotoxicidad, que varían de acuerdo al agente citotóxico, plantean un desafío permanente para dilucidar estas vías y desarrollar nuevos fármacos o técnicas que minimicen el daño. En el caso del estrés oxidativo, al concepto clásico establecido de que las especies reactivas participan en vías que desencadenan daño, se agrega el nuevo concepto que propone que el nivel de estrés oxidativo alcanzado es el que determina los eventos ulteriores, sean de supervivencia o muerte celular (Figura 3)⁴³.

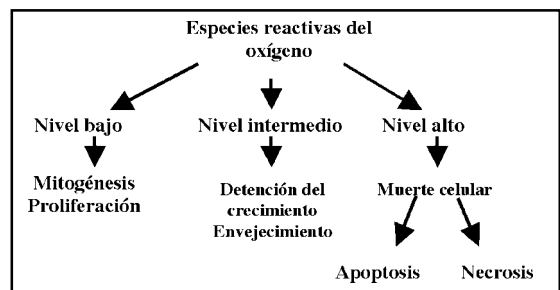


Figura 3. Respuestas celulares inducidas por las especies reactivas del oxígeno [Adaptada de (43)].

El objetivo final del PI es generar una baja cantidad de EROS que posteriormente determine el gatillamiento de señales de sobrevivencia celular. La identificación de tales señales puede llevar a desarrollar maniobras terapéuticas que impidan

o minimicen el daño, cuando la isquemia es inevitable, como en el caso de cirugía o trasplante, o para mejorar las condiciones de injertos que actualmente son descartados por daño previo (esteatosis inicial o PCR prolongado)⁴⁴.

REFERENCIAS

1. TEOH N, DELA PENA A, FARELL G. Hepatic ischemic preconditioning in mice is associated with activation of NF- κ B, p38 kinase, and cell cycle entry. *Hepatology* 2002; 36: 94-102.
2. RAMÍREZ P, MARÍN JM, PIÑERO A, CHÁVEZ-CARTAYA R, PARRILLA P. Investigación experimental aplicada a la clínica: isquemia-reperfusión hepática. *Cir Esp* 2000; 67: 281-91.
3. JAESCHKE H. Molecular mechanism of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; 284: G15-G26.
4. COLLARD CD, LEKOWSKI R, JORDAN JE, AGAH A, STAHL GL. Complement activation following oxidative stress. *Mol Immunol* 1999; 36: 941-8.
5. CUTRÍN JC, PERRELLI MG, CAVALIERI B, PERALTA C, ROSELLÓ-CATAFAU J, POLI G. Microvascular dysfunction induced by reperfusion injury and protective effect of ischemic preconditioning. *Free Radical Biol Med* 2002; 33: 1200-8.
6. LICHTMAN SN, LEMASTERS JJ. Role of cytokines and cytokine-producing cells in reperfusion injury to the liver. *Sem Liver Dis* 1999; 19: 171-204.
7. NAUTA RJ, TSIMOYIANNIS E, URIBE M, WALSH DB, MILLER D, BUTTERFIELD A. The role of calcium ions and calcium channel entry blockers in experimental ischemia-reperfusion-induced liver injury. *Ann Surg* 1991; 213: 137-42.
8. VIDELA L, FERNÁNDEZ V. Biochemical aspects of cellular oxidative stress. *Arch Biol Med Exp* 1988; 21: 85-92.
9. NAUTA R, TSIMOYIANNIS E, URIBE M, WALSH D, MILLER D, BUTTERFIELD A. Oxygen-derived free radicals in hepatic ischemia and reperfusion injury in the rat. *Surg Gynecol Obst* 1990; 171: 120-5.
10. MARUBAYASHI S, KIYOHICO D, OCHI K, KAWASAKI T. Role of free radicals in ischemic rat liver cell injury: Prevention of damage by α -tocopherol administration. *Surgery* 1986; 99: 184-91.
11. NORDSTRÖM G, SEEMAN T, HASSELGREN P. Beneficial effect of allopurinol in liver ischemia. *Surgery* 1985; 97: 679-83.
12. YOUNES M, STRUBELT O. The involvement of reactive oxygen species in hypoxic injury to rat liver. *Res Comm Chem Pathol Pharmacol* 1988; 59: 369-81.
13. MCCORD JM. Oxygen-derived radicals: a link between reperfusion injury and inflammation. *Federation Proc* 1987; 46: 2402-6.
14. TSUKAMOTO H. Redox regulation of cytokine expression in Kupffer cells. *Antioxidants and Redox Signaling* 2002; 4: 741-8.
15. PRETTO JR EA. Reperfusion injury of the liver. *Transplantation Proc* 1991; 23: 1912-4.
16. LEMASTERS JJ, Ji S, THURMAN RG. Centrilobular injury following hypoxia in isolated perfused rat liver. *Science* 1981; 213: 661-3.
17. KNOWLES RG, MONCADA S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 1994; 298: 249-58.
18. IGNARRO LJ. Physiology and pathophysiology of nitric oxide. *Kidney Internat* 1996; 55 (Suppl): S2-S5.
19. CLEMENS MG. Nitric oxide in liver injury. *Hepatology* 1999; 30: 1-5.
20. YAMAGUCHI Y, OKABE K, MATSUMURA F, AKISUKI E, MATSUDA T, OHSHIRO H ET AL. Peroxynitrite formation during hepatic allograft rejection. *Hepatology* 1999; 29: 777-84.
21. BATTISTA S, MENGIOZZI G, BAR F, CERUTTI E, POLLET C, TORCHIO ET AL. Nitric oxide level profile in human liver transplantation. *Digestive Dis Sci* 2002; 47: 528-34.
22. VIDELA LA, FERNÁNDEZ V, CARRIÓN Y, AZZALIS LA, BAINY ACD, JUNQUEIRA VBC. Biochemical mechanism in hepatotoxicity: oxidative stress induced by xenobiotics and hormonal changes. *J Braz Assoc Adv Sci* 1995; 47: 385-94.
23. BAUERLE PA, BALTIMORE D. NF- κ B: ten years after. *Cell* 1996; 87: 13-20.
24. TAPIA G, FERNÁNDEZ V, VARELA P, GUERRERO J, VIDELA LA. Thyroid hormone-induced oxidative stress

- triggers nuclear factor- κ B activation and cytokine gene expression in rat liver. *Free Rad Biol Med* 2003; 35: 257-65.
25. TAKAHASHI Y, GANSTER RW, GAMBOTTO A, SHAO L, KAIZU T, WU T ET AL. Role of NF- κ B on liver cold ischemia-reperfusion injury. *Am J Gastrointest Liver Physiol* 2002; 283: G1175-G1184.
 26. ALLEN RG, TRESINI M. Oxidative stress and gene regulation. *Free Radical Biol Med* 2000; 28: 463-99.
 27. PERALTA C, PRATS N, XAUS C, GELPÍ E, ROSELLÓ-CATAFAU J. Protective effect of liver ischemic preconditioning on liver and lung injury induced by hepatic ischemia-reperfusion in the rat. *Hepatology* 1999; 30: 1481-9.
 28. CLAVIEN PA, YADAV S, SINDRAM D, BENTLEY RC. Protective effects of ischemic preconditioning for liver resection performed under inflow occlusion in humans. *Ann Surgery* 2000; 232: 155-62.
 29. TOTSUKA E, FUNG JJ, URAKAMI A, MORAS N, ISHII T, TAKAHASHI K ET AL. Influence of donor cardiopulmonary arrest in human liver transplantation: possible role of ischemic preconditioning. *Hepatology* 2000; 31: 577-80.
 30. BOLLI R. The late phase of preconditioning. *Circulation Res* 2000; 87: 972-83.
 31. PERALTA C, FERNÁNDEZ L, PANES J, PRATS N, SANS M, PIQUE JM 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: 100-13.
 32. TEOH N, LECLERCQ I, DELA PENA A, FARELL G. Low-dose TNF- α protects against hepatic ischemia-reperfusion injury in mice: implications for preconditioning. *Hepatology* 2003; 37: 118-28.
 33. CARINI R, ALBANO E. Recent insights on the mechanisms of liver preconditioning. *Gastroenterology* 2003; 125: 1480-91.
 34. PERALTA C, HOTTER G, CLOSA D, GELPÍ E, BULBENA O, ROSELLÓ-CATAFAU J. Protective effect of preconditioning on the injury associated to hepatic ischemia-reperfusion in the rat: Role of nitric oxide and adenosine. *Hepatology* 1997; 35: 934-7.
 35. PERALTA C, HOTTER G, CLOSA D, PRATS N, XAUS C, GELPÍ E 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: 126-32.
 36. DE NADAI C, SESTILI P, CANTONI O, LIÈVREMONT J, SCIORATI C, BARSACCHI R ET AL. Nitric oxide inhibits tumor necrosis- α -induced apoptosis by reducing the generation of ceramide. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 2000; 97: 5480-5.
 37. MANNA SK, ZHANG HJ, YAN T, OBERLEY LW, AGARWAL BB. Overexpression of manganese superoxide dismutase suppresses tumor necrosis factor-induced apoptosis and activation of nuclear transcription factor- κ B and activated protein-1. *J Biol Chem* 1998; 273: 13245-54.
 38. RAMADORI G, CHRIST B. Cytokines and the hepatic acute-phase response. *Semin Liver Dis* 1999; 19: 141-55.
 39. BERNELLI-ZAZZERA A, CAIRO G, SCHIAFFONATI L, TACCHINI L. Stress proteins and reperfusion stress in the liver. *Ann NY Acad Sci* 1992; 21: 120-4.
 40. BAUER M, BAUER I. Heme oxygenase-1: redox regulation and role in the hepatic response to oxidative stress. *Antioxidants Redox Sign* 2002; 4: 749-67.
 41. SHEN XD, KE B, ZHAI Y, AMERSI F, GAO F, ANSELMO DM ET AL. CD154-CD40 T-cell costimulation pathway is required in the mechanism of hepatic ischemia/reperfusion injury, and its blockade facilitates and depends on heme oxygenase-1 mediated cytoprotection. *Transplantation* 2002; 74: 315-9.
 42. BLYDT-HANSEN TD, KATORI M, LASSMAN C, KE B, COITO AJ, IYER S ET AL. Gene transfer-induced local Heme Oxygenase 1 overexpression protects rat kidney transplants from ischemia/reperfusion injury. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 1-13.
 43. MARTINDALE JL, HOLBROOK NJ. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol* 2002; 192: 1-15.
 44. DUFOUR JF, REDAELLI C. Survival pathways and preconditioning in liver transplantation. *Transplant Immunol* 2002; 9: 281-93.