

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Cirugía



TESIS DOCTORAL

Evaluación del impacto del “Precondicionamiento regenerativo” en el perfil molecular y energético del síndrome de “Small-For-Flow” en un modelo porcino.

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Maitane I. Orue-Echebarria González

Directores:

José Manuel Asencio Pascual

Elena Vara Ameigeiras

Luis Olmedilla Arnal

Madrid, 2020

© Maitane I. Orue-Echebarria González, 2020

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Programa de Doctorado en Investigación

en Ciencias Médico-Quirúrgicas

Departamento de Cirugía



Evaluación del impacto del “Precondicionamiento regenerativo” en el perfil molecular y energético del síndrome de “Small-For-Flow” en un modelo porcino.

TESIS DOCTORAL

Maitane I. Orue-Echebarria González

Madrid, 2020

Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Medicina

Investigación en Ciencias Médico-Quirúrgicas

Departamento de Cirugía



Título: *"Evaluación del impacto del "Precondicionamiento regenerativo" en el perfil molecular y energético del síndrome de "Small-For-Flow" en un modelo porcino."*

Autor:

Maitane I. Orue-Echebarria González

Directores:

José Manuel Asencio Pascual

Elena Vara Ameigeiras

Luis Olmedilla Arnal

Tutor:

Javier Arias Díaz

Madrid 2020

Directores:

Profesor José Manuel Asencio Pascual

- Médico Adjunto del Servicio de Cirugía General y del Aparato Digestivo.
Hospital General Universitario Gregorio Marañón
- Profesor Asociado del Departamento de Cirugía de la Facultad de Medicina.
Universidad Complutense de Madrid.

Profesora Elena Vara Ameigeiras

- Catedrática de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad Complutense de Madrid

Doctor Luis Olmedilla Arnal

- Médico Adjunto y Jefe de Sección del Servicio de Anestesiología y Reanimación.
Hospital General Universitario Gregorio Marañón

Tutor:

Profesor Javier Arias Díaz

- Catedrático de Cirugía. Universidad Complutense de Madrid
- Decano. Universidad Complutense de Madrid.

*“En general puede afirmarse que no hay cuestiones agotadas,
sino hombres agotados en las cuestiones.”*

Santiago Ramón y Cajal

Agradecimientos

Con estas palabras quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que, de un modo u otro, han contribuido a la realización de esta Tesis Doctoral y las que me han formado como médico y como persona.

En primer lugar, a los directores de esta Tesis. Al Dr. José Manuel Asencio, por ofrecerme la gran oportunidad de desarrollar este proyecto, por su incansable afán de trabajo e investigación. Sin duda, sin él, no hubiera sido posible este trabajo. A la Dra. Elena Vara, por introducirme en el mundo de la Bioquímica, hasta ahora desconocida para mí y por estar siempre dispuesta a reunirse para resolver mis dudas. Y al Dr. Luis Olmedilla, por su rapidez en la revisión de cada documento y de cada artículo. Y por las palabras de ánimo que acompañaban esas correcciones.

Al Dr. Javier Vaquero, por las interminables horas en la banqueta de su despacho donde me ha enseñado desde cómo preparar un documento para una revista científica, hasta cómo etiquetar los botes del laboratorio. Sin su paciencia y sus correcciones no habría podido terminar este trabajo.

Al Profesor José Luis García Sabrido por inculcarme que la inquietud investigadora está en las preguntas, no en las respuestas.

Al Profesor Javier Arias, por aceptar tutorizarme este proyecto, y por validar cada uno de los trámites burocráticos que se necesitan para el desarrollo de una Tesis Doctoral.

A toda la gente que forma parte de la Unidad de Medicina y Cirugía Experimental. A veterinarios, enfermeras, auxiliares...por su ayuda incondicional cada vez que me encontraba perdida en lo que era un mundo nuevo para mí.

A los residentes del Servicio de Cirugía General del Hospital Gregorio Marañón. Mención especial a mis residentes pequeñas Lorena, María y Mariluz, por hacerme querer ser mejor para conseguir ser su ejemplo. A mi residente mayor Pablo, por transmitirme pasión por la cirugía y la investigación. Y a mi equipo desde el principio, Ana y Clara, sin duda lo mejor de estos años, porque compartir las penas divide el sufrimiento, y compartir las alegrías las duplica.

Y, por último, no puedo olvidarme de mi familia, sin duda el pilar más importante en este trabajo. A mis padres, por enseñarme los valores que han hecho que hoy sea quien soy y por su apoyo incondicional en cada uno de mis proyectos desde que decidí estudiar Medicina. Cada uno de mis logros, se lo debo a ellos. A mis hermanos, Pablo y Amaia, por sus mensajes de ánimo y de admiración. Y a Alejandro, mi marido, por ayudarme a levantarme en mis momentos de flaqueza, y animarme a realizar esta tesis a pesar de todas las horas que le ha robado a nuestro tiempo juntos. Gracias por tu apoyo sin límites.

ABREVIATURAS Y

ACRÓNIMOS

Abreviaturas y Acrónimos

%FA/FHT	Porcentaje del flujo arterial respecto al flujo hepático total
%FP/FHT	Porcentaje del flujo portal respecto al flujo hepático total
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ADP	Adenosín difosfato
ALPPS	Asociación de transección hepática y ligadura portal para hepatectomía en dos tiempos. (<i>Del inglés: Associating Liver Partition and Portal Vein Ligation for Staged Hepatectomy</i>).
ALT	Alanina aminotransferasa
AMP	Adenosín monofosfato
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
AST	Aspartato aminotransferasa
ATP	Adenosín trifosfato
Bas	Basal. Momento antes de comenzar la hepatectomía.
CCMIJU	Centro de Cirugía Mínimamente Invasiva Jesús Usón
CCR	Cáncer Colorrectal
CFI	Índice de función cardíaca
CMH	Células madre hematopoyéticas
CON	Grupo control
CSF	Factor estimulante de colonias
DAMP	Patrones moleculares asociados al daño celular. (<i>Del inglés: “damage associated molecular pattern”</i>)

DpMax	Índice de contractilidad del ventrículo izquierdo
ECG	Electrocardiograma
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
ELWI	Índice de agua pulmonar extravascular
eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial
F	Frenchs (medida de calibre)
FA	Flujo arteria hepática
FA100g	Flujo arteria hepática corregido por 100 gramos de peso
Fase G	Fase de crecimiento (<i>Del inglés: growing</i>) o progresión del ciclo celular
Fase M	Fase de mitosis del ciclo celular
Fase S	Fase de síntesis de ADN del ciclo celular.
FC	Frecuencia cardiaca
FHT	Flujo hepático total
FIO2	Fracción inspirada de oxígeno
FP	Flujo portal
FP100g	Flujo portal corregido por 100 gramos de peso
FRH	Futuro remanente hepático
FT	Factores de transcripción
G	Gauges (medida de calibre)
GEDI	Índice de volumen telediastólico global
GF	Factores de crecimiento (<i>Del inglés: "growing factor"</i>)
GGT	Gamma glutamil transpeptidasa
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos
GPPS	Gradiente de presión portosistémico
H15'	15 minutos tras la realización de la hepatectomía

H24h	24 horas tras la realización de la hepatectomía
HGF	Factor de crecimiento de los hepatocitos
HGUGM	Hospital General Universitario Gregorio Marañón
I/R	Isquemia-Reperfusión
IC	Índice cardiaco
ICAM	Molécula de adhesión intercelular
ICE	Enzima convertidora de interleucina
ICG	Verde indocianina (<i>Del inglés: Indocyanine Green</i>)
IFN	Interferón
IHPH	Insuficiencia hepática post-hepatectomía
IiSGM	Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón
IL	Interleucina
IL-1	Interleucina-1
IL-10	Interleucina-10
IL-4	Interleucina-4
IL-5	Interleucina-5
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
LDH	Lactato deshidrogenasa
LLD	Lóbulo lateral derecho (hepático)
LLI	Lóbulo lateral izquierdo (hepático)
LMD	Lóbulo medial derecho (hepático)
LMI	Lóbulo medial izquierdo (hepático)
MCP-1	Proteína quimioatrayente de monocitos-1

MHCCR	Metástasis hepáticas de cáncer colorrectal
NASH	Esteatohepatitis no alcohólica (<i>Del inglés: “Non-alcoholic steatohepatitis”</i>)
NKT	Células asesinas naturales (<i>Del inglés: “natural killers”</i>)
nNOS	Óxido nítrico sintasa neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintasa
PA	Presión arterial
PAM	Presión arterial media
PAMP	Patrones moleculares asociados a microorganismos patógenos. (<i>Del inglés: “pathogen-associated molecular pattern”</i>)
PCNA	Antígeno nuclear de células en proliferación
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa. (<i>Del inglés: polymerase chain reaction</i>)
PDGF	Factor de crecimiento plaquetario
PDR	Tasa de aclaramiento plasmático del verde indocianina. (<i>Del inglés: plasma disappearance rate</i>)
PIa	Índice de pulsatilidad arterial
PIC	Presión intracraneal
PIp	Índice de pulsatilidad portal
PP	Presión portal
PREC	Grupo experimental o de “Precondicionamiento regenerativo”
PT	Tiempo de protrombina
PVC	Presión venosa central
PVE	Embolización de la vena porta. (<i>Del inglés: portal vein embolization</i>)

PVL	Ligadura de la vena porta. (<i>Del inglés: portal vein ligation</i>)
PVSH	Presión de la vena suprahepática
R15	Retención plasmática del verde indocianina a los 15 minutos
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (<i>Del inglés: reverse transcription polymerase chain reaction</i>)
RTT	Receptores tipo Toll
SFFS	Síndrome de “Small-For-Flow” “Pequeño para el Flujo”. (<i>Del inglés: Small For Flow Syndrome</i>)
SFSS	Síndrome de “Small-For-Size” o “pequeño para su tamaño”. (<i>Del inglés: “Small-For-Size” Syndrome</i>)
SVI	Índice de volumen sistólico
SVRI	Índice de resistencias vasculares sistémicas
SVV	Variación de volumen sistólico
TC	Tomografía computarizada
TGF	Factor de crecimiento transformante (alfa y beta).
TNF	Factor de necrosis tumoral. (<i>Del inglés: tumoral necrosis factor</i>)
VCAM	Molécula de adhesión a células vasculares
VEGF	Factor de crecimiento endotelio-vascular.
VFRH	Volumen del futuro remanente hepático
VHR	Volumen Hepático Remanente
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana

ÍNDICE

Índice

1. RESUMEN	28
1.1. Resumen en castellano	30
1.2. Abstract (Resumen en inglés).....	35
2. INTRODUCCIÓN	40
2.1. Situación actual en el manejo de las metástasis hepáticas de cáncer colorrectal.....	42
2.1.1. Trasplante hepático como tratamiento de las metástasis hepáticas de cáncer colorrectal	45
2.2. Insuficiencia Hepática Posthepatectomía y Síndrome de “Small-For-Flow”.	48
2.3. Estrategias para aumentar el volumen hepático remanente.....	50
2.3.1. Embolización y ligadura portal	51
2.3.2. Hepatectomía en dos tiempos.....	53
2.3.3. ALPPS	56
2.3.4. Embolización de venas suprahepáticas.....	59
2.4. “Precondicionamiento regenerativo”.....	61
2.5. Regeneración hepática	69
2.5.1. Historia de la regeneración hepática.....	69
2.5.2. Características de la regeneración hepática	74
2.5.3. Fases de la regeneración hepática	79
2.5.4. Hepatectomía parcial: el modelo ideal de la regeneración hepática.....	83
2.6. Mediadores moleculares del proceso de la regeneración hepática.....	85
2.6.1. Citocinas	85
2.6.2. Caspasas	91
2.6.3. Metabolismo del óxido nítrico	93
2.6.4. Metabolismo energético.....	95
2.7. Cirugía hepática en modelo porcino.....	96
2.7.1. Anatomía comparada del hígado porcino y humano	97
2.7.2. Nomenclatura estandarizada para las resecciones hepáticas en modelo porcino.....	99
3. JUSTIFICACIÓN	102
4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	106
4.1. Hipótesis	108
4.2. Objetivos.....	108
5. MATERIAL Y MÉTODOS	110
5.1. Resumen	112

5.2. Material.....	112
5.2.1 Material biológico: animales.....	112
5.2.2 Instalaciones: quirófanos y laboratorios	113
5.3. Métodos	117
5.3.1 Diseño experimental.....	117
5.3.2. Protocolo anestésico	118
5.3.3. Monitorización de la hemodinámica sistémica	119
5.3.4. Monitorización de la hemodinámica y función hepática.....	120
5.3.5. Protocolo de medición de la presión intracraneal	122
5.3.6. Volumetría	123
5.3.7. Embolización.....	123
5.3.8. Protocolo quirúrgico	124
5.3.9. Protocolo para la toma de muestras y mediciones	126
5.3.10. Estudio histológico y evaluación de la proliferación celular	127
5.3.11. Estudio molecular.....	129
5.3.12. Estudio del metabolismo energético.....	133
5.3.13. Análisis estadístico	134
6. RESULTADOS	136
6.1. Citocinas en el Síndrome de “Small-For-Flow” y el “Precondicionamiento regenerativo”	141
6.2. Caspasas en el Síndrome de “Small-For-Flow” y el “Precondicionamiento regenerativo”	158
6.3. Metabolismo del óxido nítrico en el Síndrome de “Small-For-Flow” y el “Precondicionamiento regenerativo”	161
6.4. Metabolismo energético en el Síndrome de “Small-For-Flow” y el “Precondicionamiento regenerativo”	167
7. DISCUSIÓN	174
7.1. Citocinas en el Síndrome de “Small-For-Flow” y el “Precondicionamiento regenerativo”	176
7.2. Caspasas en el Síndrome de “Small-For-Flow” y el “Precondicionamiento regenerativo”	185
7.3. Metabolismo del óxido nítrico en el Síndrome de “Small-For-Flow” y el “Precondicionamiento regenerativo”	192
7.4. Metabolismo energético en el Síndrome de “Small-For-Flow” y el “Precondicionamiento regenerativo”	197
8. LIMITACIONES DEL ESTUDIO	202
9. CONCLUSIONES	206
10. BIBLIOGRAFÍA	210
11. ANEXOS	226

11.1 Publicaciones	228
11.2 Participación en congresos	240
11.3 Tablas	242
11.4 Informes directores Tesis Doctoral	248

1. RESUMEN

1.1. Resumen en castellano

TÍTULO:

Evaluación del impacto del “Precondicionamiento regenerativo” en el perfil molecular y energético del síndrome de “Small-For-Flow” en un modelo porcino.

INTRODUCCIÓN:

Actualmente, los límites de resección en la cirugía hepática están establecidos por la posibilidad de desarrollar insuficiencia hepática posthepatectomía. Esto impide en ocasiones, intervenir a pacientes para los que la cirugía hepática es el único tratamiento potencialmente curativo, como es el caso de numerosos pacientes con metástasis hepáticas de cáncer colorrectal. Y es por eso, que conseguir un volumen hepático remanente suficiente para mantener la función hepática, es en nuestros días, uno de los temas más relevantes en el ámbito de la cirugía hepatobiliar.

Por otro lado, a día de hoy, se llevan a cabo de rutina, distintas estrategias para aumentar el volumen del futuro remanente como la embolización portal o la hepatectomía en dos tiempos. Nuestro grupo evalúa una estrategia diferente, el “Precondicionamiento regenerativo”, que se basa en aplicar un estímulo regenerativo antes de la resección hepática. Se trata de una técnica de estimulación de la regeneración hepatocitaria, que consiste en realizar una ligadura o embolización portal del área de parénquima hepático que va a ser resecado, seguida de una hepatectomía precoz, entre 1 y 4 días después. A diferencia de la técnica clásica, que espera unas 4 semanas, no buscamos un aumento del volumen del remanente hepático sino un aumento de su tolerancia a la resección.. Estudios previos sobre esta técnica han demostrado resultados favorables en modelos

animales. Obteniendo mejorías en la función hepática y en la tolerancia del hígado al hiperaflujo portal que tiene lugar tras resecciones extendidas, conocido como síndrome de “Small-For-Flow”.

Sabemos que la regeneración hepática es un proceso muy complejo, que implica la activación de numerosas vías celulares y moleculares. Entender el papel del “Precondicionamiento regenerativo” en este proceso es un paso más en el conocimiento del síndrome de “Small-For-Flow”, y puede permitirnos la expansión de los límites establecidos actualmente en la cirugía hepática.

OBJETIVOS:

- Describir el perfil molecular y el metabolismo energético del Síndrome de “Small-For-Flow” en un modelo porcino.
- Evaluar la influencia del “Precondicionamiento regenerativo” en el perfil molecular y en el metabolismo energético del Síndrome de “Small-For-Flow” en un modelo porcino.

MATERIAL Y METODOS:

Realizamos un estudio experimental en un modelo porcino de “Small-for-Flow”. Se estudiaron dos grupos de diez cerdos que fueron sometidos a una hepatectomía subtotal (90%). Los animales del grupo experimental, fueron tratados con “Precondicionamiento regenerativo” mediante la embolización portal del 90% del parénquima hepático 24 horas antes de la resección hepática.

Antes del procedimiento, inmediatamente tras la resección, y las 24 horas se analizaron diferentes parámetros moleculares con la finalidad de estudiar la respuesta del hígado a una hepatectomía subtotal, y la posible protección ofrecida por el “Precondicionamiento regenerativo”.

Los parámetros analizados en el presente estudio fueron:

- La expresión del ARNm del TNF- α , la MCP-1, la IL-1, la IL-10, la iNOS y la eNOS se obtuvo mediante el aislamiento del ARN y la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa.
- La expresión proteica del TNF- α , de la MCP-1, de la IL-1, la IL-4, la IL-5, la IL-6, la IL-8 y la IL-10, de la eNOS y la iNOS y de la Caspasa-3 y Caspasa-3-activada se obtuvo mediante el análisis Western Blot.
- El metabolismo energético (ATP, ADP y AMP) se analizó mediante espectrofotometría.

En el análisis estadístico se utilizó el programa informático SPSS versión 23.0 para Mac (IBM Corporation, Armonk, NY). Para realizar el análisis de los datos se utilizó el modelo lineal mixto, un test paramétrico para comparar tanto las diferencias intragrupo e intergrupo.

RESULTADOS:

Los resultados de nuestro estudio muestran que el síndrome de “Small-For-Flow” se asoció a un aumento de la expresión proteica y del ARNm de las citocinas proinflamatorias TNF- α , MCP-1 e IL-1. Los animales sometidos al “Precondicionamiento regenerativo” no mostraron dicho aumento. La expresión proteica

de la IL-5 y de la IL-6 no mostró cambios significativos a lo largo del procedimiento, obteniendo valores similares en los dos grupos. Se apreció un descenso significativo de la expresión proteica de las citocinas antiinflamatorias IL-4 e IL-10 a las 24 horas del procedimiento, sin encontrar diferencias entre ambos grupos. El síndrome de “Small-For-Flow” se asoció a un aumento de la expresión proteica de la quimiocina IL-8. Los animales sometidos al “Precondicionamiento regenerativo” no mostraron dicho aumento de IL-8.

No se encontraron diferencias significativas respecto a la expresión de la Caspasa-3 en su forma inactiva. Sin embargo, los valores de la Caspasa-3-activada aumentaron de forma significativa en los animales del modelo del síndrome de “Small-For-Flow”. La embolización portal preoperatoria se asoció a una disminución en dicho aumento.

El síndrome de “Small-For-Flow” se asoció a una disminución de la expresión proteica y del ARNm de la eNOS, que no se objetivó en el grupo de “Precondicionamiento regenerativo”. En nuestro estudio no se encontraron diferencias significativas respecto a la expresión de la iNOS en ambos grupos.

Respecto al metabolismo energético, en el síndrome de “Small-For-Flow” se observó una disminución de los valores de ATP y un aumento de los valores de ADP y AMP, lo que conllevó a una disminución del ratio ATP:ADP y de la carga energética. El “Precondicionamiento regenerativo” atenuó tanto el descenso en el ATP, como el ascenso de los valores de ADP y AMP, consiguiendo un mayor ratio ATP:ADP y una mayor carga energética.

CONCLUSIÓN:

En nuestro modelo experimental, el síndrome de “Small-For-Flow” se expresa a nivel molecular con un estado proinflamatorio, un aumento de la apoptosis, una disminución del óxido nítrico y una disminución de la carga energética.

Nuestro estudio sugiere que el “Precondicionamiento regenerativo” reduce la respuesta inflamatoria y apoptótica, aumenta el óxido nítrico y mejora la carga energética.

1.2. Abstract (Resumen en inglés)

TITLE

Evaluation of the "Regenerative Preconditioning" impact on the molecular and energy profile of the "Small-For-Flow" syndrome in a swine model.

INTRODUCTION

Nowadays, the limits of resection in liver surgery are established by the possibility of developing the posthepatectomy liver failure. This prevents, on numerous occasions, to operate patients for whom liver surgery is the only potentially curative treatment, as in some cases of colorectal cancer liver metastases. And that is why, reaching an adequate remaining liver volume for keeping a good liver function, is today one of the most relevant issues in the field of hepatobiliary surgery.

On the other hand, currently, different strategies to increase the volume of the remaining liver are routinely carried out, such as portal embolization or two-stage hepatectomy. Our investigation group evaluated a different strategy, the "Regenerative preconditioning", based on a regenerative stimulus applied before liver resection. It is a hepatocyte regeneration stimulation technique, which consists of performing a portal vein ligation or embolization at the liver parenchyma that is going to be resected, followed by an early hepatectomy, between 1 and 4 days later. Unlike the classical technique, that is postponed around 4 weeks, we do not seek an increase in the volume of the liver remnant but an increase in its tolerance to resection. Previous studies on this technique have shown satisfactory results in animal models. Getting improvements in liver function and in liver

tolerance to the portal hyperflux that occurs after extended resections, known as the "Small-For-Flow" syndrome.

It is known that liver regeneration is a very complex process, which involves the activation of several cellular and molecular pathways. Understanding how "Regenerative Preconditioning" participates in this process is another step against the "Small-For-Flow" syndrome, and towards the expansion of the established limits in liver surgery.

OBJECTIVES

- To describe the molecular and energy profile of the Small-For-Flow Syndrome in a swine model.
- To assess the influence of the "Regenerative Preconditioning" on the molecular and energy profile of the "Small-For-Flow Syndrome" in a porcine model.

MATERIALS AND METHODS

We conducted an experimental study on a swine model of "Small-for-Flow" syndrome. Two groups of ten pigs that underwent a subtotal hepatectomy (90%) were studied. The animals of the experimental group were treated with the "Regenerative Preconditioning", by a portal vein embolization of 90% of the hepatic parenchyma, 24 hours before the liver resection.

Before the procedure, immediately after resection, and 24 hours later, different molecular parameters were analyzed in order to study the liver's response to a subtotal hepatectomy, and the possible protection offered by the "Regenerative Preconditioning."

The parameters analyzed in this study were:

- TNF- α , MCP-1, IL-1, IL-10, iNOS and eNOS ARNm expressions, were analyzed by reverse transcription-polymerase chain reaction.
- TNF- α , MCP-1, IL-1, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, eNOS, iNOS, Caspasa-3 and cleaved-Caspasa-3 protein expressions were gathered through Western blot analysis.
- Energy metabolism (ATP, ADP and AMP) was analyzed by a spectrophotometric method

The SPSS version 23.0 software for Mac (IBM Corporation, Armonk, NY) was used in the statistical analysis. To perform the data analysis, the mixed error-component model was used. A parametric test to compare both the differences between moments in one group and also between the two groups.

RESULTS

The results of our study identified that "Small-For-Flow" syndrome was associated with an increase in protein and mRNA expression of the proinflammatory cytokines TNF- α , MCP-1 and IL-1. Animals subjected to "Regenerative Preconditioning" had no increase. The protein expression of IL-5 and IL-6 had no specific changes throughout the procedure, obtaining similar values in the two groups. A significant decrease in the protein expression of the anti-inflammatory cytokines IL-4 and IL-10 was observed 24 hours after the procedure, without finding differences between the two groups. The "Small-For-Flow" syndrome was associated with an increase in the protein expression of chemokine IL-8. Animals subjected to "Regenerative Preconditioning" did not have such an increase in IL-8.

No significant differences were found regarding the expression of Caspase-3 in its inactive form. However, activated-Caspase-3 values increased significantly in the animals of the “Small-For-Flow” syndrome model. Preoperative portal vein embolization prevented this rise.

The "Small-For-Flow" syndrome induced a decrease in the protein expression and mRNA of eNOS, that was not objectified in the group of the "Regenerative preconditioning". In our study, no significant differences were found regarding the expression of the iNOS in both groups.

Regarding the energy metabolism, in the “Small-For-Flow” syndrome, a decrease in ATP values and an increase in ADP and AMP values were observed, which led to a decrease in the ATP:ADP ratio and in the energy load. The "Regenerative preconditioning" reduced both the decrease in ATP and the rise in ADP and AMP values, achieving a higher ATP:ADP ratio and a better energy load.

CONCLUSIONS

In our experimental model, the “Small-For-Flow” syndrome is expressed at the molecular level with a proinflammatory state, an increase in apoptosis, a decrease in nitric oxide and a decrease in the energy load.

Our study suggests that “Regenerative Preconditioning” reduces the inflammatory and apoptotic responses, increases nitric oxide and improves the energy load.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Situación actual en el manejo de las metástasis hepáticas de cáncer colorrectal

A nivel mundial, el cáncer colorrectal (CCR) se ha convertido en el tercer tipo de cáncer más frecuente, en el más común de los del aparato digestivo, y en la segunda causa más frecuente de mortalidad relacionada con el cáncer. Siendo hasta hace unos años, la 4ª causa de mortalidad relacionada con el cáncer. (1-3)

Sabemos que el cáncer más frecuente a nivel mundial y teniendo en cuenta ambos sexos es el de pulmón (11'6%), seguido del de mama (11'6%), del CCR (10%) y del de próstata (7'1%). Respecto a la mortalidad, el orden de mayor a menor importancia sería el de pulmón (18'4%), el CCR (9%), el de estómago (8'2%) y en el 4º puesto, el de hígado (8'2%). (3)

Si analizamos los datos de nuestro país por ambos sexos, vemos cómo el CCR es el cáncer con mayor incidencia. Si separamos los datos por sexos: los hombres tienen más cáncer de próstata, seguido por el CCR y en tercer lugar el de pulmón; el tumor maligno más frecuente en las mujeres es el de mama, seguido también por el CCR. En España el CCR es el segundo cáncer que más muertes causa, si analizamos los datos en global o sólo en hombres. Pero a día de hoy, el CCR presenta la principal causa de mortalidad relacionada con cáncer en mujeres en España. (3)

La tasa de metástasis del CCR ha aumentado hasta el 20-25%, y alrededor del 75% de estos casos ocurren en el hígado. (1,4) El hígado es la localización más frecuente de

metástasis del CCR debido a la diseminación celular por el sistema portal. (5–8) Según las series vemos cómo ya al diagnóstico entre un 15% y un 30% de los pacientes de CCR tienen metástasis hepáticas, y alrededor de otro 25% de los pacientes las desarrollarán posteriormente. Es decir, los pacientes con CCR tienen más de un 50% de posibilidades de desarrollar metástasis hepáticas a lo largo de su vida. (1,8–14)(15)

A diferencia de otros tipos de tumores, la presencia de diseminación a distancia en el CCR no excluye necesariamente del tratamiento curativo. De hecho, los avances quirúrgicos y el desarrollo de nuevas terapias sistémicas como la inmunoterapia, junto con la implementación de equipos multidisciplinares, ha demostrado un aumento en la supervivencia de estos pacientes.(16)

Actualmente, la resección hepática es el único tratamiento potencialmente curativo para las metástasis hepáticas del CCR (MHCCR) (4,8,16–21).

Sin embargo, incluso cuando la resección se combina con regímenes de tratamiento sistémicos adyuvantes que mejoran la supervivencia, el tratamiento es sólo curativo en el 20% de los pacientes, con una supervivencia a los 5 años del 50%, y con aproximadamente un 70% de recurrencias, principalmente en el hígado (9,16,18,22,23).

En pacientes con MHCCR que se someten a una resección hepática con intención curativa, se estima que aproximadamente el 75% de todas las recurrencias, tanto intrahepáticas como extrahepáticas, ocurren dentro de los primeros 2 años después de la cirugía.(18) Sin embargo, existe evidencia de que la resección repetida durante el

desarrollo de la enfermedad de estas metástasis hepáticas es segura y efectiva en pacientes seleccionados, aumentando además su supervivencia. (24)(25)

La presencia de enfermedad metastásica en el CCR es el factor pronóstico que va a empeorar la supervivencia de forma más significativa. Por esta razón, y teniendo en cuenta que la mayoría de las metástasis se desarrollan en el hígado, la resección quirúrgica de las mismas es el pilar de su tratamiento. (8)

En el pasado, la cirugía se ofrecía únicamente a aquellos casos en los que había una clara reseccabilidad. Los criterios de reseccabilidad eran: ausencia de diseminación extrahepática, no más de 3 nódulos metastásicos y metástasis limitadas a un lóbulo del hígado. Con esta estricta selección, solo el 10% de los pacientes con MHCCR podía definirse como reseccable (11,20,26,27).

A día de hoy, los criterios exactos sobre la reseccabilidad siguen siendo controvertidos. Dependen de la experiencia y las habilidades del cirujano, la calidad de la gestión y atención perioperatorias, así como de las posibilidades de un amplio enfoque multidisciplinario, característico de los centros con gran volumen de pacientes y que poseen Comités de Tumores Multidisciplinares (16,19,20).

Los criterios actuales respecto a la reseccabilidad local se centran en: alcanzar márgenes de resección negativos (R0), obtener un volumen hepático remanente (VHR) con una funcionalidad adecuada, asegurar una correcta hemodinámica hepática con flujos de entrada (*inflow*) y salida vascular (*outflow*) adecuados, así como un buen drenaje biliar. Gracias al continuo desarrollo en la tecnología quirúrgica, las terapias sistémicas y el

tratamiento multimodal, la definición de reseabilidad continuará evolucionando y expandiéndose para cubrir enfermedades avanzadas que una vez se consideraron no reseables. (8,22,28)(15) El VHR necesario para un paciente concreto depende principalmente del estado del hígado antes de la operación. Es decir, en un paciente sano, se puede llevar a cabo la resección de hasta el 75% del hígado, sin embargo, los pacientes con enfermedad hepática crónica no cirróticos o los pacientes que han recibido un número importante de ciclos de quimioterapia, requieren un VHR de al menos el 30%, mientras que los pacientes con cirrosis requieren como mínimo un 40% de parénquima hepático residual (4,19,22,29–35)(15). La quimioterapia neoadyuvante puede inducir cambios en el hígado, como esteatohepatitis, obstrucción sinusoidal e inflamación periportal, aumentando así el riesgo de insuficiencia hepática y con ello la morbimortalidad después de una resección hepática mayor (36,37).

Además, se recomienda que todos los pacientes con MHCCR sean valorados en un comité multidisciplinar para seleccionar la mejor estrategia (cirugía de colon seguida de quimioterapia y luego cirugía hepática, realizar primeramente la resección hepática o “liver-first”, solamente quimioterapia...). En el futuro, los nuevos procedimientos de tratamiento (como la inmunoterapia o el trasplante hepático) pueden contribuir a mejorar el pronóstico; por lo tanto, la necesidad del abordaje multidisciplinar cobrará más importancia aún.(38)

2.1.1. Trasplante hepático como tratamiento de las metástasis hepáticas de cáncer colorrectal

El trasplante hepático sin duda ofrece dos ventajas importantes frente a la cirugía radical en las metástasis hepáticas múltiples. Por un lado, consigue un R0 y evita el riesgo de

dejar residuo tumoral en caso de existir metástasis indetectables en las pruebas de imagen, y por otro, reseca todo el volumen tumoral sin afectar de forma negativa al VFRH. A pesar de que el trasplante es una opción potencial para pacientes con MHCCR, el hecho de que los órganos sean limitados, y que la mortalidad en la lista de espera no sea desdeñable, supone que ampliar las indicaciones actuales para el trasplante hepático represente un dilema ético. (39)(40)

Aunque el riesgo quirúrgico de estos pacientes es menor que el de los pacientes cirróticos, el riesgo de recurrencia es alto, y puede aumentar con la inmunosupresión postrasplante y, por lo tanto, anular la utilidad del trasplante hepático.(41) Si bien los primeros casos de trasplante por MHCCR se llevaron a cabo antes del año 2000. La baja supervivencia y la alta tasa de recurrencia, hicieron que el CCR pasara a formar parte de una clara contraindicación para el trasplante hepático. Sin embargo, a día de hoy, gracias a los protocolos establecidos de inmunosupresión, al desarrollo técnico quirúrgico y de la quimioterapia, a una mejor experiencia en el manejo del trasplante, a mejores técnicas de imagen para la selección adecuada de los casos, y a la instauración de criterios estrictos para elegir los candidatos, el trasplante hepático en pacientes con MHCCR vuelve a ser una realidad en algunos países.(38)(39)(40)(41)

Los factores que se han visto se asocian a una recidiva más precoz, y a una mortalidad más alta son: el marcador tumoral CEA >80 mg/L, enfermedad que progresa a pesar de la quimioterapia, lesión con diámetro mayor de 5,5 cm, y menos de 2 años desde la cirugía del tumor primario hasta el trasplante. También se ha visto, que la mayoría de los pacientes que recidivan después del trasplante, desarrollan metástasis pulmonares como

el primer o único sitio de enfermedad metastásica, siendo muchas de ellas operables.(42)(43)

Un punto muy controvertido, es si administrar quimioterapia o no después del trasplante. En la mayoría de estudios prospectivos descritos en la literatura los pacientes no recibieron quimioterapia. Esto se debe a que la mayoría de los pacientes ya habían recibido numerosos ciclos de quimioterapia previamente, incluso en 2ª o 3ª línea, experimentando muchos de ellos los efectos adversos de este tratamiento sistémico. Además, la quimioterapia posterior al trasplante podría dificultar la regeneración hepática.(43)

Actualmente hay distintos ensayos clínicos en curso para analizar el potencial del trasplante en las MHCCR, aunque todavía es pronto para dilucidar resultados. Sin embargo, la creciente evidencia sobre el beneficio del trasplante hepático para pacientes con MHCCR puede impulsar a las sociedades médicas internacionales a aceptar (como ya ocurrió con el hepatocarcinoma) las MHCCR como indicación de trasplante, incluso antes de que los resultados de los ensayos clínicos en curso sean definitivos. (40)

En este contexto tienen mucha importancia los estudios realizados en Noruega, ya que es un país con más donantes que receptores potenciales, y el tiempo medio en lista de espera es menos de un mes. El estudio prospectivo SECA-II, de la Universidad de Oslo, se ha realizado en pacientes con MHCCR irresecables. Ha mostrado, en pacientes de bajo riesgo y minuciosamente seleccionados, una supervivencia global a los 5 años similar a la obtenida para pacientes con hepatocarcinoma que reciben el trasplante hepático como tratamiento estándar.(15)(42)(43) Además, el grupo de Oslo ha descrito recientemente la

técnica RAPID que consiste en realizar una hepatectomía izquierda al receptor, y un trasplante auxiliar del lóbulo lateral izquierdo (trasplante tipo “Split”, es decir, injerto dividido de un donante fallecido) además de una ligadura de la porta derecha en función de la hemodinámica hepática. Completando la hepatectomía nativa cuando el injerto trasplantado haya adquirido el volumen suficiente. Esta técnica forma parte de un ensayo clínico. En este abordaje podría ser de utilidad también el donante vivo. Por otro lado, en Francia están reclutando pacientes para el ensayo clínico TRANSMET, donde los pacientes con MHCCR irresecables serán aleatorizados para recibir el tratamiento estándar con quimioterapia o un trasplante hepático más quimioterapia. Los resultados que se espera salgan a la luz en los próximos 10 años, de éstos y otros ensayos clínicos, probablemente cambiarán la gestión del CCR metastásico. (41)(43)

2.2. Insuficiencia Hepática Posthepatectomía y Síndrome de “Small-For-Flow”

Actualmente, obtener un volumen del futuro remanente hepático (VFRH) suficiente es el principal factor que nos delimita la extensión de la resección hepática. La insuficiencia hepática post-hepatectomía (IHPH), que se produce tras resecciones hepáticas extensas y el síndrome "Small-For-Size" (SFSS) como resultado de trasplantes de hígado con injertos pequeños, son dos entidades clínicas con similar fisiopatología, y que se caracterizan por el desarrollo de insuficiencia hepática tras la intervención quirúrgica. Esta IHPH se manifiesta con colestasis, coagulopatía, encefalopatía y ascitis refractaria, que puede llevar a la sepsis e incluso la muerte. (44)

En la literatura encontramos una incidencia de IHPH entre el 5-15% de las cirugías hepáticas. Por este motivo es necesaria una evaluación precisa preoperatoria de la función hepática. Se debe evaluar tanto la cantidad del hígado como la calidad del mismo. Entre las técnicas cualitativas para medir la función hepática las más utilizadas son: los parámetros analíticos convencionales (alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST), gamma glutamil transpeptidasa (GGT), Fosfatasa Alcalina, lactato deshidrogenasa (LDH), INR y PT), las clasificaciones de Child-Pugh y de MELD, la tasa de retención de verde indocianina a los 15 minutos (R15), y el test de LiMAx. La técnica cuantitativa de elección es la volumetría medida por tomografía computarizada (TC), para calcular el VFRH. La TC también puede dar información sobre la calidad del parénquima. Por otro lado, la resonancia magnética puede ayudar a medir el grado de esteatosis. (44)(45)

El estudio anatomopatológico y hemodinámico de la IHPH y del SFSS, puso de manifiesto la similitud fisiopatológica de ambos. Siendo por ello hoy día considerados como una misma entidad que habitualmente se engloba en el término de SFSS.

Sin embargo, algunos pacientes desarrollan el SFSS a pesar de cumplir con los límites de seguridad establecidos, mientras que otros pacientes que superan el umbral no lo desarrollan. Por ello, se piensa que la aparición de este síndrome está directamente relacionada, además de con el VHR, con el hiperaflujo portal al que se ve sometida la masa hepática remanente. Parece que es esa diferencia entre la masa hepática y el flujo portal la responsable de los daños que desencadena el SFSS. Por este motivo, nuestro grupo acuñó el término síndrome de “Small-For-Flow” (SFFS) o “pequeño para el flujo” como un término más preciso para referirse tanto a la IHPH como al SFSS. (46)(47)

El SFFS se define por criterios intraoperatorios determinados por las medidas del flujo y la presión portal. Se considera SFFS una presión portal mayor de 20mmHg o un flujo portal mayor a 250ml/min/100gr. El objetivo es que al diagnosticarse de manera intraoperatoria, se detecta precozmente y se puede tratar durante la cirugía, con técnicas de modulación portal. Comprobando en tiempo real la eficacia de dichas medidas. (48)(49)(50)

2.3. Estrategias para aumentar el volumen hepático remanente

La resección hepática radical de las metástasis hepáticas colorrectales (MHCCR) es, actualmente, el único tratamiento potencialmente curativo. La principal causa de irresecabilidad de las lesiones hoy en día es la imposibilidad de obtener un VFRH suficiente para mantener el metabolismo del paciente. Esto hace que la resecabilidad primaria de las MHCCR oscile entre el 15-20%. Con el objetivo de aumentar el porcentaje de pacientes resecables se han implementado distintas estrategias que actualmente permiten aumentar el VFRH.(51)

Las técnicas más clásicas para incrementar el volumen hepático remanente son: la hepatectomía en dos tiempos (“two-stage hepatectomy”), la ligadura portal (PVL) y la embolización portal (PVE). Son técnicas que se realizan de forma rutinaria hoy en día en centros con gran volumen de cirugía hepatobiliar, con unas tasas de morbi-mortalidad relativamente bajas. Su principal inconveniente es el tiempo que pasa hasta que se realiza la cirugía definitiva, tiempo durante el cual el paciente puede desarrollar progresión

tumoral pasando a ser irreseccable. Además, en un número significativo de pacientes no se produce el crecimiento óptimo del VFRH. Algunos de estos pacientes se pueden rescatar con la embolización de las venas suprahepáticas. (51)(52)(53)

En los últimos años se describió una nueva técnica que produce un aumento del volumen hepático mayor y en menor tiempo. Se denominó “*Associating Liver Partition and Portal Vein Ligation for Staged Hepatectomy*”, es decir, la asociación de transección hepática más ligadura portal para una hepatectomía en dos tiempos (ALPPS), la cual desarrolla una hipertrofia hepática mucho más rápida que con las técnicas clásicas. El problema es que este procedimiento se asocia con una alta morbi-mortalidad mortalidad y una elevada tasa de recurrencia tumoral precoz. También se han realizado otros estudios como la PVE asociada a la aplicación de células madre hematopoyéticas, lo que produce un aumento del VFRH más rápido que con la PVE clásica, disminuyendo así el intervalo de tiempo hasta la segunda intervención. Aunque el papel de las células madre y sus posibles complicaciones, como la posible proliferación de micrometástasis, están aun sin definir claramente. (51)(53)

2.3.1. Embolización y ligadura portal

La oclusión de la vena porta a través de PVE o PVL ofrece la posibilidad de aumentar el VFRH y por lo tanto, reducir el riesgo de IHPH tras una cirugía hepática mayor.(54)

El hecho de que la oclusión selectiva de una rama principal de la vena porta, llevaba a la atrofia ipsilateral con hipertrofia contralateral, se demostró por primera vez en un modelo animal en 1920. Sin embargo, no fue hasta la década de los 80 cuando Makuuchi, gracias

al estudio del colangiocarcinoma hiliar, describió por primera vez la PVE en la práctica clínica como técnica para aumentar el VFRH.(51)

La PVE se trata de un procedimiento percutáneo guiado por imagen, que consiste en embolizar las ramas portales de la región de hígado enferma. De esta manera se produce un estímulo al remanente que consigue hipertrofiar el hígado sano y aumentar el VFRH. Consigue entre unas 3 y 6 semanas una hipertrofia del 30-40% en alrededor del 80% de los pacientes, que podrán ser sometidos a cirugía. Se trata de un método seguro con resultados a largo plazo similares a los de la cirugía hepática en un solo tiempo. (45)(51)(54)

El aumento del VFRH se basa en los cambios en la hemodinámica hepática. El hígado recibe aproximadamente el 80% de su sangre de la vena porta y el 20% de la arteria hepática. La oclusión del flujo sanguíneo venoso portal hacia determinados segmentos del hígado dirige todo el flujo portal hacia el lóbulo/segmentos contralaterales no ocluidos y promueve la hipertrofia. Esto resulta en un aumento del VFRH y en la atrofia del lóbulo hepático embolizado. Junto con los cambios hemodinámicos, existe una regulación molecular positiva de distintas citoquinas y factores de crecimiento, lo que estimula aún más el crecimiento del remanente hepático. Además del aumento del VFRH, este procedimiento implica también una mejoría en la función hepática después de la hepatectomía en comparación con los pacientes en los que se realizó una hepatectomía sin PVE previa. (51)(54)

La presencia de enfermedad en el lóbulo contralateral es una contraindicación relativa en la PVE. Esto se debe a que el flujo venoso portal que se dirige hacia el futuro remanente

hepático (FRH) para conseguir la hipertrofia del mismo, podría promover a su vez el crecimiento de las metástasis hepáticas.(54)

La PVL está basada en el mismo mecanismo fisiopatológico de la PVE, pero se requiere de una cirugía (abierta o laparoscópica) para realizar la ligadura portal. En la literatura encontramos múltiples estudios que comparan la eficacia de la PVE con la PVL, mostrando similares resultados en ambas técnicas. Sin embargo, la PVE ofrece un abordaje transhepático percutáneo, sin la necesidad de una laparotomía o una laparoscopia, siendo un método menos invasivo, con menos complicaciones, menos estancia hospitalaria, y con un menor intervalo de tiempo hasta la hepatectomía, siendo el método por tanto de elección en la mayoría de los casos. La PVL tiene cierta ventaja en dos situaciones: cuando se realiza una laparotomía para reseccionar el tumor primario, y en los pacientes con MHCCR bilobar, cuando se asocia a la hepatectomía en dos tiempos como se explicará en el siguiente apartado. (51) (54)

2.3.2. Hepatectomía en dos tiempos

La hepatectomía en dos tiempos, también conocida como “Two-stage”, del inglés “two-stage hepatectomy” es un procedimiento diseñado para tumores hepáticos múltiples bilobares que en caso de plantearse la intervención en un solo tiempo se considerarían irresecables o con un elevado riesgo de desarrollar IHPH.(55,56)(57)(58)

Esta estrategia consiste en la resección completa de los nódulos tumorales en dos cirugías consecutivas. En el protocolo que describió inicialmente René Adam, en “el primer tiempo” se realiza la resección quirúrgica de las lesiones de uno de los lóbulos hepáticos con el objetivo de hacer que la segunda hepatectomía sea potencialmente curativa.

Durante la hepatectomía de la primera etapa, se realiza la menor disección posible del hígado que se reseca en la segunda etapa, para evitar la aparición de adherencias. Unas 3 semanas después de la primera cirugía, se reanuda la quimioterapia para controlar el crecimiento de los nódulos tumorales remanentes. Posteriormente se lleva a cabo la segunda cirugía donde se completa la resección hepática, consiguiendo eliminar toda la enfermedad hepática (**Fig.1**). El momento de la segunda hepatectomía, que suele ser a los 3-6 meses de la primera intervención, se selecciona en función de la regeneración hepática, el control del remanente del hígado hepático mediante quimioterapia y la probabilidad de que la segunda hepatectomía sea curativa.(55)

PATIENT	1st HEPATECTOMY	2nd HEPATECTOMY	REMNANT LIVER AFTER 2-STAGE HEPATECTOMY
Patient 1	 4+3*	 5+6+7+8	 1, 2, 3, 4, 5
Patient 2	 5+6+7+8	 2+3	 1, 2, 3, 4, 5
Patient 3	 2+3+8*	 5+8*	 1, 2, 3, 4, 5
Patient 4	 5+6+7+8	 3*	 1, 2, 3, 4, 5
Patient 5	 3*	 5+6+7+8	 1, 2, 3, 4, 5
Patient 6	 5+6+7+8+3*	 3	 1, 2, 3, 4, 5

Fig.1.- Algunos de los primeros pacientes intervenidos de hepatectomía en dos tiempos por el equipo de R.Adam. Las imágenes muestran el estado del hígado tras la primera hepatectomía, tras la segunda y el hígado remanente después de las dos etapas. Las áreas grises representan las partes del hígado resecadas. (55)

El problema más importante de esta técnica es el crecimiento de las metástasis hepáticas no resecadas en la primera intervención, durante el tiempo de espera a la regeneración hepática. Para evitar esto Homayounfar describió la hepatectomía en dos tiempos con ligadura de la vena porta. De tal manera que, en la primera cirugía se realiza la resección

de las lesiones del lóbulo menos afecto, y además la ligadura de la vena porta que irriga el lóbulo hepático contralateral, el más afectado por las metástasis. Y una vez conseguido el crecimiento del VFRH en el 79% de los pacientes, se lleva a cabo la segunda cirugía donde se completa la resección. Sin administrar quimioterapia entre ambos tiempos quirúrgicos (56).

Con la hepatectomía en dos tiempos se han descrito buenos resultados oncológicos, y además menos complicaciones postoperatorias que con la hepatectomía en un solo tiempo (57). Su problema más importante es la posibilidad del crecimiento o aparición de nuevas metástasis hepáticas y/o extrahepáticas, durante el tiempo que transcurre hasta que se realiza “el segundo tiempo”, lo que contraindicaría realizar la segunda cirugía. Otro inconveniente es la formación de adherencias después de la primera cirugía, lo que puede dificultar la hepatectomía final. A pesar de estas desventajas, los resultados oncológicos a largo plazo de este método son muy buenos. (51)(56)

2.3.3. ALPPS

En el año 2007 se describió por primera vez la técnica actualmente conocida como ALPPS. (59)(60) Definida en 2012 por Schnitzbauer, el ALPPS es otra estrategia para aumentar el VFRH que al igual que las mencionadas previamente se lleva a cabo en dos tiempos. En el primer paso, se realiza una laparotomía, la disección y movilización del hígado, la ligadura de la vena porta derecha y la división in situ del parénquima hepático **(Fig.2)**. Con la transección hepática se logra eliminar los vasos que comunican ambos lóbulos, consiguiendo así mayor flujo sanguíneo en el futuro hígado remanente, y menor flujo en el lóbulo que va a ser resecado. Una vez que el parénquima se ha hipertrofiado, alrededor de los 9 días (frente a las 3-4 semanas de la PVE) se completa la hepatectomía

derecha extendida. La combinación de dos procedimientos en la primera etapa, ligadura portal + transección parenquimatosa, induce un estímulo de crecimiento mucho mayor, consiguiendo una rápida e importante hipertrofia. (60)

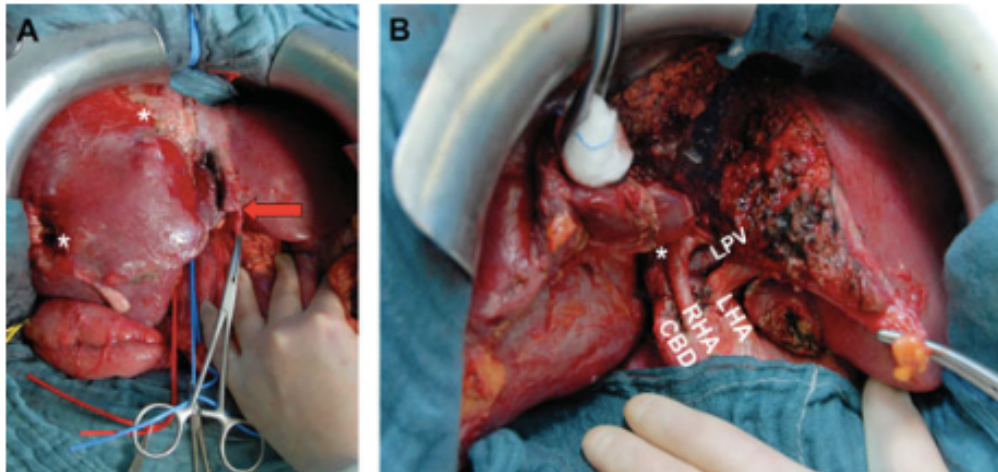


Fig.2.- A) hígado en la primera etapa del ALPPS antes de la ligadura de la vena porta derecha y sección a lo largo del ligamento redondo. El * señala un tumor dentro del lóbulo hepático derecho y otro en el segmento IV. B) Hígado tras la transección parenquimatosa in situ prácticamente totalizada y con la vena porta derecha ligada indicada con un *. CBD=conducto biliar común; LHA=arteria hepática izquierda; LPV=vena porta izquierda; RHA=arteria hepática derecha. (60)

Al inducir un crecimiento hepático rápido y extenso el ALPPS se situó como uno de los avances más prometedores en la cirugía oncológica hepatobiliar del momento. Sin embargo, la revisión de la bibliografía muestra el ALPPS como una técnica con una morbi-mortalidad considerable, y nos obliga a ser más cautos respecto a las expectativas que se habían depositado en ella, y por tanto también con la indicación de la misma. Apareciendo así multitud de opiniones a favor y en detrimento de esta técnica(59).

Los detractores del ALPPS declaran que es una técnica con una morbi-mortalidad preocupante, con tasas publicadas de hasta el 70% y el 20% respectivamente. Además, según los datos analizados en el registro internacional de ALPPS, esta técnica se ha realizado a pacientes en los que no estaba indicada, sometiéndoles a un gran riesgo. En concreto, el 25% de los pacientes no habían recibido quimioterapia, y un tercio de los pacientes intervenidos tenían un VFRH suficiente como para poder realizar la resección hepática en un solo tiempo.(61)(62) Otra de las desventajas que encontramos en el ALPPS, es que el aumento de volumen hepático no se correlaciona con una mejoría de la función hepática, algo que sí ocurre con la PVE.(59)

Los que están a favor afirman que el ALPPS consigue un mayor y más rápido crecimiento del hígado con el que se consigue operar a pacientes, que de otro modo serían irresecables. Apuntan que los informes sobre la alta morbi-mortalidad de la técnica son los típicos de una técnica nueva, compleja, y que son similares a los que aparecieron cuando se comenzó a realizar la hepatectomía en dos tiempos, la cual hoy está completamente aceptada. Señalan que es una técnica compleja, que se debe llevar a cabo por cirujanos expertos en centros de alto volumen, pero que con una mejor selección de los pacientes y una indicación quirúrgica más conservadora se consiguen resultados mucho más satisfactorios. Además, la descripción de técnicas menos invasivas en el primer tiempo como el ALPPS laparoscópico o el ALPPS-parcial (transección hepática del 50-80% respecto al ALPPS clásico); y de dejar un intervalo de tiempo ligeramente mayor antes de realizar el segundo tiempo (ALPPS-retrasado) alcanzarán una mejoría sobre los resultados actualmente publicados.(63)

Recientemente se ha publicado el primer ensayo clínico multicéntrico, prospectivo y randomizado (LIGRO trial) que compara el ALPPS con la hepatectomía en dos tiempos. Con resultados favorables para el ALPPS mostrando una tasa de resección completa del 92% frente al 57%. Y con una tasa de complicaciones, de márgenes de resección libres, y de mortalidad a corto plazo similar en ambos grupos (64). Vemos datos similares en el metaanálisis del grupo chino de Shen(65).

Como ya hemos dicho, y a pesar de los estudios favorecedores más recientes, es una técnica extraordinariamente controvertida y sobre la que se necesitan nuevos estudios con más evidencia científica, más número de pacientes, mayor tiempo de seguimiento, y menos sesgos de publicación.(59)(64)(65)

2.3.4. Embolización de venas suprahepáticas

La oclusión del flujo sanguíneo de entrada al hígado a través del flujo portal, se emplea en distintas técnicas para promover la regeneración hepática. Sin embargo, el papel de la modulación del flujo de salida no se ha estudiado tan profundamente. (66)

En este campo, una estrategia más novedosa es la embolización de las venas suprahepáticas junto a la embolización portal. Esta técnica se basa en que una reducción importante del flujo de salida de parte del parénquima hepático, induce la inversión del flujo portal en el territorio comprometido, siendo mayor el aflujo sanguíneo al resto del hígado. En consecuencia, la congestión hepática severa disminuye la tasa de hipertrofia o puede incluso inducir atrofia del sector hepático concreto. Al mismo tiempo, la redirección del flujo portal debería aumentar la perfusión del área donde se necesita hipertrofia. Por otro lado, el mantenimiento de la función hepática en el área

congestionada es imprescindible para evitar el desarrollo de IHPH. Es decir, el flujo sanguíneo al área congestionada debe ser lo suficientemente bajo como para evitar la hipertrofia pero lo suficientemente alto como para mantener una correcta función hepatocelular (66)(67).

La modulación de flujo de salida hepático puede ser útil tanto mediante cirugía abierta como laparoscópica o mediante radiología intervencionista. Si bien es cierto, que esta última, mostraría beneficios en cuanto a su menor agresividad, y por su mayor capacidad de tratamiento en las eventuales variaciones anatómicas de drenaje de los distintos segmentos. (66)

La embolización de las venas suprahepáticas combinada con la embolización portal, conocida también como biembolización o deprivación venosa total hepática, consiste en además de embolizar la vena porta derecha para aumentar el VFRH, embolizar las venas suprahepáticas derecha y/o media. Consiguiendo un aumento del VFRH de alrededor del 50% según las series, si bien todas ellas presentan un número reducido de casos realizados mediante esta técnica. Parte de estos conocimientos se han desarrollado a raíz del trasplante hepático, en especial del donante vivo. Ya que en este tipo de trasplante se ha visto cómo la presión portal y la regeneración pueden verse influidas por las variaciones de la presión de las venas suprahepáticas a través de un mecanismo postsinusoidal. En concreto cuando la falta de la vena suprahepática media puede empeorar la regeneración del segmento 4. (67)

En 2009, el equipo coreano de Hwang realizó un estudio prospectivo en el que llevaron a cabo la embolización de la vena suprahepática derecha en los pacientes que tras 2 semanas

de una PVE derecha, permanecieron con un VFRH menor del 40%. Demostrando que la embolización de la vena suprahepática ipsilateral tras la PVE, induce más daño al parénquima embolizado, facilitando la regeneración compensatoria del lóbulo contralateral. (52)

Actualmente, este procedimiento que primeramente se describió de forma secuencial, se puede llevar a cabo de una vez. Realizando en un mismo momento la PVE y la embolización de las venas suprahepáticas. (67)(68)

Los estudios que existen publicados hasta el momento, muestran que la embolización de las venas suprahepáticas sumada a la embolización portal induce un crecimiento seguro, reproducible y efectivo del VFRH. (67)

2.4. “Precondicionamiento regenerativo”

Según el concepto de “regenerating liver” (hígado en proliferación) acuñado en 2002 por Nagano, el parénquima hepático tolera mejor la resección si está constituido por hepatocitos que ya han iniciado el ciclo proliferativo.(69)

Nagano reseñaba que los estudios realizados hasta el momento para evitar la IHPH se centraban únicamente en el volumen, es decir, se basaban en aumentar el tamaño del FRH, sin analizar la capacidad funcional del mismo. Debido a eso diseñó un experimento en el que analizaba la reserva funcional hepática en dos grupos de ratas con el mismo volumen de parénquima hepático tras una hepatectomía de 90%, con la diferencia de que

a uno de los grupos le había realizado una ligadura portal 4 días antes y al otro grupo, una laparotomía en blanco (sham laparotomy) **(Fig.3)**.(69)

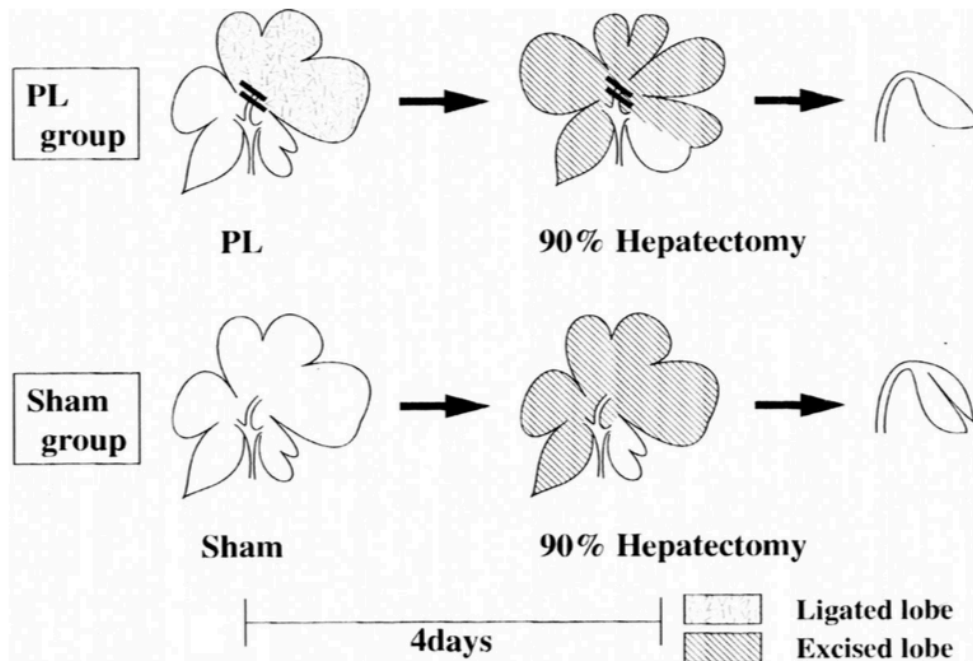


Fig.3.- En la imagen vemos representados los dos grupos de animales. El grupo experimental, o del a ligadura portal (PL group) y el grupo control (Sham group), al que se le realiza la laparotomía en blanco o sham 4 días antes de la hepatectomía. (69)

En el grupo experimental, 4 días antes de la hepatectomía se realizó la ligadura portal de las ramas que irrigaban los lóbulos izquierdo y mediano. A los 4 días, el volumen hepático del lóbulo caudado posterior (5%) se había duplicado, pasando a constituir el 10% de hígado. Ahí se realizó una hepatectomía del 90%, dejando únicamente este lóbulo. Las ratas del grupo control, 4 días después de la laparotomía en blanco, fueron sometidas también a una hepatectomía del 90%, para lo que se dejó de remanente los lóbulos caudados anterior (5%) y posterior (5%) normales, que representaban el 10% del parénquima hepático. (69)

La tasa de supervivencia para el grupo experimental fue significativamente mayor que para el grupo control a las 96 horas de la hepatectomía. A favor del grupo de la ligadura portal también encontró un menor pico de bilirrubina tras la hepatectomía, un mayor ratio de regeneración, un mayor índice del antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA) y una mayor carga de adenosín trifosfato (ATP). Por todo ello, Nagano concluyó que el hígado hipertrofiado a los 4 días después de la ligadura portal mostraba una regeneración hepática activa, y que esta misma además proporcionaba al tejido una mayor tolerancia a la resección extendida comparada con el mismo volumen de un hígado normal.(69)

En la misma línea, el grupo de Eshkenazy afirmaba en 2014 que además del tamaño del hígado en hepatectomías extendidas, había que tener en cuenta el flujo y la presión portal y los potenciales efectos de la PVE como “Precondicionamiento regenerativo”, una estrategia prometedora que podría llevar a expandir las indicaciones de la cirugía hepática.(70)

Estos hallazgos, corroboraban lo que años antes había señalado Pardee, quien sugirió, que el hepatocito activado o cebado requería de menos tiempo para someterse a la replicación del ácido desoxirribonucleico (ADN), que el mismo volumen hepatocitario quiescente, porque la fase inicial de la replicación ya había tenido lugar.(71)

Y es que los hepatocitos pueden permanecer largos periodos de tiempo en un estado de no-proliferación o de quiescencia, es decir en la fase G0 del ciclo celular (**Fig.4**). Durante este periodo, las células disminuyen su tamaño ya que se degradan el ácido ribonucleico (ARN) y las proteínas, además, la síntesis de macromoléculas es mucho más lenta que en la fase G1 o de crecimiento.(71)

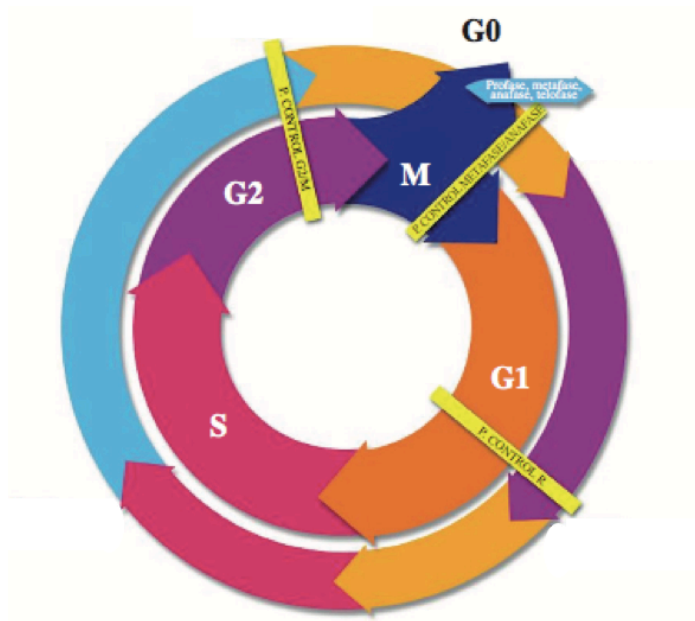


Fig.4.- Representación de las fases del ciclo celular: fase G1, de crecimiento; fase S, síntesis, cuando ocurre la replicación del ADN; fase G2, crecimiento; y fase M, la mitosis. Se incluye el estado quiescente, o fase G0. (Se ha eliminado de la imagen lo relacionado a las ciclinas para mayor comprensión).(72)

Esta hipótesis se materializa en el modelo de regeneración hepática elaborado por Furchtgott en el que muestra cómo las hepatectomías parciales más grandes darán como resultado cargas metabólicas más grandes y respuestas regenerativas más rápidas. (73)

El modelo de Furchtgott reproduce con éxito las características significativas de la regeneración hepática después de distintos grados de hepatectomía (**Fig.5**). Las hepatectomías >75% producen una IHPH letal. Las hepatectomías parciales entre el 40% y el 70% tienen una respuesta regenerativa rápida. Las hepatectomías entre el 10% y el 40% presentan una actividad proliferativa mucho más lenta. Y las hepatectomías <10%, manifiestan una respuesta regenerativa imperceptible. Esto se correlaciona con “el umbral

mínimo de resección“ que MacDonald y colaboradores describieron años antes, ya que para que se produzca un aumento significativo de la síntesis de ADN, la resección hepática debe incluir al menos al 9-12% del parénquima hepático.(73)

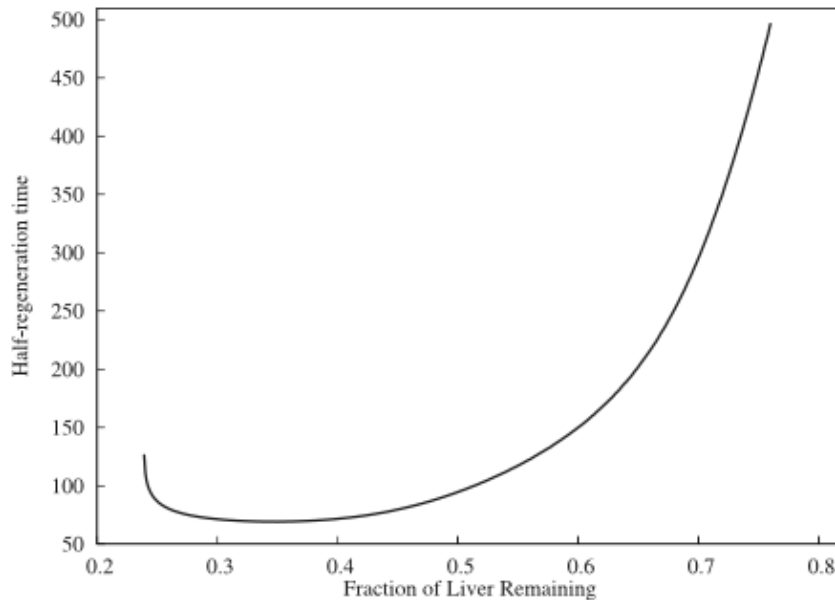


Fig.5.- En la imagen vemos el tiempo necesario para recuperar la mitad de la masa perdida en función de la fracción de hígado que queda después de la hepatectomía. En general, a mayor resección, es decir, menor remanente hepático, mayor velocidad de replicación. Además, vemos como los remanentes de menos del 25% resultaron en IHPH; y por otro lado aquellos remanentes mayores del 80% no recuperaron la mitad de la masa perdida en 500 h (unas 3 semanas). (73)

En los pacientes a los que se les realizan hepatectomías sucesivas, el parénquima remanente se replica más rápidamente. Es decir, si a un hígado le realizamos una resección parcial, y después de 48 horas, realizamos una nueva resección, el hígado recobra su parénquima en menos tiempo. La recuperación después de la segunda

resección es más rápida que la posterior a la primera, a pesar de que ambas comiencen con el mismo número de células, porque la segunda recuperación comienza con grandes poblaciones de células cebadas o activadas y en replicación, así como con un mayor número de genes de replicación y factores de crecimiento (GF) activos.(73)

El modelo de Furchtgott predice además que el aumento de la carga metabólica antes de la hepatectomía parcial conducirá a una recuperación más rápida. Por ejemplo, duplicar la carga metabólica 48 horas antes de una hepatectomía del 75% (**Fig.6**). conduce a una recuperación completa y rápida, en comparación con una recuperación extremadamente lenta en condiciones normales. Esto se debe a que el aumento de la carga metabólica conduce a un mayor número de células cebadas y en proliferación, lo que coloca a los hepatocitos en un momento diferente del ciclo de replicación, conduciendo a una recuperación mucho más rápida.(73)

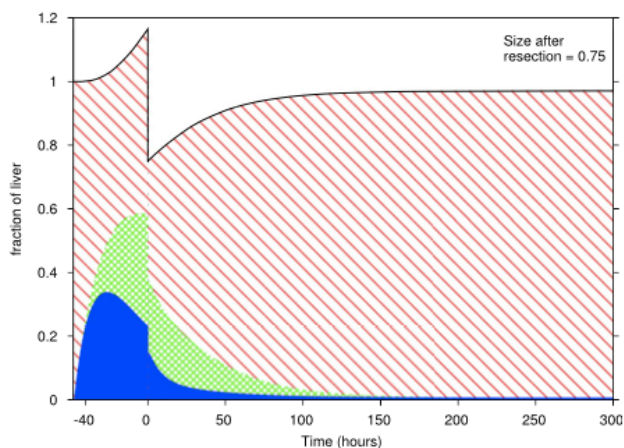


Fig.6.- En la imagen vemos la regeneración hepática en respuesta al aumento de la carga metabólica seguida de una hepatectomía del 75%. La carga metabólica se duplicó durante 48 h antes de la hepatectomía, aumentando de forma substancial las células activadas y las células en replicación. La hepatectomía parcial, el momento 0, afecta a

todos los tipos de células por igual. Las áreas rayada, punteada y lisa representan las células quiescentes, cebadas y en replicación respectivamente.(73)

El estallido inicial de citoquinas producido tras una hepatectomía parcial, y que depende de la carga metabólica, lleva a las células desde el estado de quiescente a la activación o cebado. Las células activadas pueden pasar a la fase de replicación o regresar a la fase de reposo o quiescencia. Ante niveles elevados de GF, las células cebadas continúan con la fase de replicación; si por el contrario los niveles de GF son bajos, vuelven al reposo. Una vez que los hepatocitos vuelven al estado quiescente o de reposo, ya no pueden entrar en el ciclo celular nuevamente. La cantidad de GF es directamente proporcional a la carga metabólica del hígado, y la inactivación de estos GF es proporcional al tamaño de la matriz extracelular, la cual aumenta a medida que disminuye la carga metabólica.(73)

La hipótesis que sustenta el trabajo de investigación desarrollado en la presente Tesis Doctoral, cuya línea se inició en la Tesis Doctoral del Dr. Asencio, (74) es que la PVE actúa de “Precondicionamiento regenerativo” consiguiendo estimular la regeneración hepática mediante la activación de diferentes genes, GF, hormonas y nutrientes. Si realizamos una hepatectomía subtotal a las 24 horas del “Precondicionamiento regenerativo”, el parénquima hepático tendrá un mayor volumen de hepatocitos en estado activado y replicativo, mayor carga de ATP y presentará una mayor tolerancia a la resección que el mismo volumen de hepatocitos normales.(75)

Esta hipótesis se sustenta también en el trabajo que Yokoyama y colaboradores publicaron en 2007 en el que demostraban cómo el proceso de la regeneración hepática es básicamente el mismo después de una PVE o de una hepatectomía parcial, a pesar de

las diferencias hemodinámicas ya que en la PVE se mantiene el flujo arterial. Distintos mediadores (citoquinas, GF, hormonas, genes...) participan en la regeneración inducida tanto por la PVE o la hepatectomía, mediante la activación de una compleja red de transducción de señales que promueve la regeneración hepática.(76)

Tras la PVE, como se aprecia en la **Fig.7**, aumentan los niveles de la interleucina-6 (IL-6) y del factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α). Estas citoquinas proinflamatorias, de las cuales hablaremos más extensamente en el **capítulo 2.5**, preparan los hepatocitos para su desarrollo. Además, distintos GF estimulan la síntesis de ADN mediante la activación de factores de transcripción (TF) y la expresión de genes tempranos. Se ha descrito también la participación positiva en la regeneración hepática de otros mediadores como el óxido nítrico (NO), las prostaglandinas, los estrógenos o la insulina, a diferencia del glucagón, los corticoides o el TGF- β los cuales inhiben la regeneración.(76)

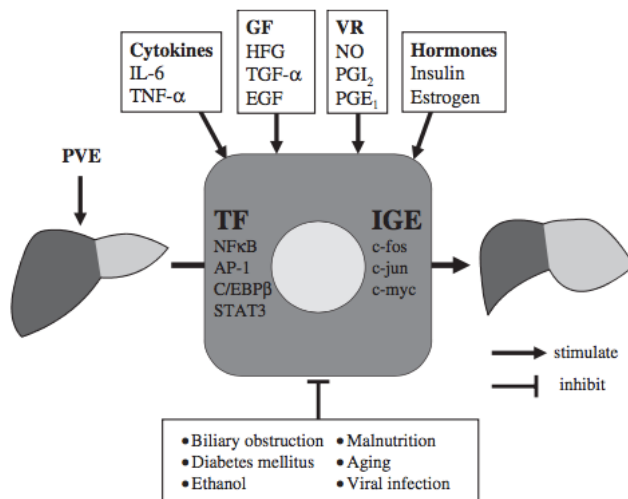


Fig.7.- Distintos factores que estimulan o inhiben la regeneración hepática. (76)

La PVE produce un estímulo regenerativo (“Precondicionamiento regenerativo”) antes de la resección aumentando el número de hepatocitos activados. Sin embargo, si tras la PVE esperamos a que se produzca la hipertrofia hepática, como se realiza en la PVE clásica, en la segunda resección no tendremos el beneficio de contar con los hepatocitos activados y el consiguiente aumento en la tolerancia a la resección.(75)

2.5. Regeneración hepática

A continuación, vamos a profundizar en la regeneración hepática, desde sus orígenes hasta la descripción de sus distintas características a nivel molecular que se conocen a día de hoy.

2.5.1. Historia de la regeneración hepática

Los primeros datos sobre la regeneración hepática los encontramos reflejados en la mitología griega, concretamente en los mitos sobre los titanes Ticio y Prometeo. (77)(78)(79)(80)

El gigante Ticio, fue castigado eternamente por el intento de violación a Hera, legítima esposa y una de las tres hermanas del dios Zeus. Cuando ésta viajaba de Panopeo a Pito, Ticio la asaltó, rasgando sus vestidos e intentando violarla. Sus gritos atrajeron a las divinidades griegas, y Zeus lo fulminó con un rayo. Siendo inmortal, fue arrojado al

Tártaro, condenado a yacer con las extremidades atadas y estiradas, donde dos buitres comerían eternamente su hígado (**Fig. 8**). (77)(78)(81)



Fig.8.- Tiziano, Ticio, 1548-1549, óleo sobre lienzo, 253 x 217 cm, museo del Prado.

El mito de Prometeo hace referencia a cómo Prometeo fue condenado por robar el “fuego” de los dioses para dar la luz a los hombres, que hasta entonces habían vivido en la oscuridad intelectual. “Lo mandó Zeus capturar para ser encadenado por Hefesto, dios del fuego y de los metales forjados, a una alta montaña donde, cada jornada, un águila hambrienta le devoraría el hígado. Como era inmortal, el órgano le crecía de nuevo, así

que cada noche volvía tan cruel depredador a comérselo, con lo cual el sufrimiento era inimaginable y eterno”. (Figs. 9-10) Hasta que fue salvado por Hércules. (79,80)



Fig.9.- Prometeo encadenado



Fig.10.- El castigo de Prometeo

No es posible saber hoy si los griegos clásicos, y más que nadie Esquilo quien en su Prometeo encadenado da detalles de estos hechos, conocían ya entonces que de todas las vísceras del hombre, el hígado es el único órgano con capacidad para auto-regenerarse.

Aunque, la capacidad regenerativa del hígado ya estaba reflejada en la mitología griega, no fue hasta 1879 cuando el alemán Tillmanns realizó la primera descripción científica de la regeneración hepática, tras realizar un estudio experimental sobre la cicatrización de heridas hepáticas y renales.(82)

El modelo experimental que muestra con más claridad el fenómeno de la regeneración hepática es el que se obtiene por hepatectomía parcial, descrito por Higgins y Anderson en 1931. En este modelo se resecan dos tercios del hígado de roedores, y se comprueba cómo la porción del hígado remanente, crece hasta restaurar la masa hepática original. Una vez restaurada, aproximadamente en unos 7-10 días tras la resección quirúrgica, el proceso regenerativo se detiene.(83)

El cirujano americano Pack vio una clara oportunidad para estudiar la regeneración hepática. Sus trabajos en 1962 fueron los primeros en describir y documentar la capacidad de regeneración del hígado en humanos después de una resección mayor. Las conclusiones de sus estudios establecieron que la regeneración completa ocurría de 3 a 6 meses después de la cirugía.(84) Posteriormente, Lin y Chen en 1965 basaron sus estudios en evaluar la función metabólica y la regeneración del hígado cirrótico sin encontrar regeneración alguna después de la resección.(85)

Parker y Siemsen en 1967 consideraron que la regeneración hepática se consolidaba en menor tiempo, a los 2 meses, y que se conseguía a través de la excrecencia de nuevos

lóbulos. (86) En 1970 y a través de un intenso seguimiento postoperatorio con distintas pruebas de imagen: colangiografía, arteriografía y portografía, Aronsen y colaboradores contradijeron a Parker, demostrando que el crecimiento hepático era a partir del crecimiento de los lóbulos remanentes (87), algo que ya habían afirmado previamente otros como Pack y Lin.(84,85)

Blumgart en 1971 estableció la velocidad de regeneración hepática estudiando pacientes sometidos a hepatectomía mayor por trauma, describiendo cómo el hígado recuperaba su tamaño inicial a los 10-11 días de la cirugía.(88)

En los últimos 50 años, se ha aprendido mucho sobre la regeneración hepática, qué la inicia, cómo se mantiene y qué la inhibe. El hecho de que hoy en día las resecciones hepáticas parciales y los trasplantes de donante vivo se realicen de forma más o menos rutinaria y segura, dependen de la capacidad del hígado para recuperar la mayor parte de su masa funcional en unas 2 semanas. (89,90)(91)(92)

Como ya hemos comentado, el primer modelo de regeneración hepática consistió en una hepatectomía parcial.(83) Otros modelos se asocian con lesiones tisulares extensas e inflamación: incluyen el uso de toxinas hepáticas, como el tetracloruro de carbono (93) y la galactosamina (94); la ligadura de la vena porta (95); y la lesión por isquemia-reperfusión (96). En los modelos de lesión hepática a través de una toxina, diferentes agentes tóxicos lesionan subpoblaciones de células hepáticas específicas, por lo que la hepatectomía parcial es el modelo preferido para estudiar la respuesta regenerativa hepática.

Modelos más nuevos incluyen el estudio de las vías de señalización moleculares como por ejemplo Kan y colaboradores en 2009 tras analizar la hepatectomía en el pez Zebra.(97)

2.5.2. Características de la regeneración hepática

Como hemos mencionado en el apartado anterior, la capacidad del hígado para regenerarse se conoce desde la antigüedad y ha sido objeto de numerosos estudios científicos desde principios del siglo XX. Después de una hepatectomía parcial, los hepatocitos inactivos o quiescentes se reincorporan al ciclo celular y comienzan a replicarse hasta que el hígado recupera su masa perdida, mediante un proceso de hiperplasia compensatoria, con una precisión de alrededor del 10%.(36,73,83)

La hiperplasia compensatoria es un fenómeno totalmente diferente al de la regeneración epimórfica, a partir de un blastema, como ocurre en los vertebrados inferiores que son capaces de regenerar determinadas estructuras amputadas, como por ejemplo la cola de una lagartija.(36,72)

Esta hiperplasia es la base de distintas aplicaciones clínicas: las resecciones hepáticas extensas, o las hepatectomías secuenciales, el trasplante dividido o segmentario de cadáver (split) o el trasplante de donante vivo, y la embolización portal entre otros. (72)

La regeneración hepática es un proceso sumamente complejo, y rigurosamente regulado, que implica la activación de numerosas vías celulares y moleculares. Este proceso cumple las características de los sistemas biológicos más evolucionados, lo cual explica la dificultad de interferir en ella con usos terapéuticos. De hecho, las investigaciones

experimentales realizadas hasta el momento que se basan en eliminar un gen en particular (animales knock-out), no han conseguido frenar la regeneración hepática, sino únicamente enlentecer la misma. De la misma manera, los intentos de suplir sus funciones de forma temporal o definitiva en determinadas hepatopatías han sido fallidos. Y cuya única alternativa definitiva es, a día de hoy, el trasplante hepático. (73)(72)

La regeneración hepática reproduce el modelo fisiológico de respuesta al daño con una fase primera de preparación o “cebado” de los hepatocitos (transición de G0 a G1 en el ciclo celular) y una fase posterior de proliferación (fases S y M del ciclo) que termina con la recuperación de la masa hepática. Dicho proceso se ha relacionado con los mediadores de la respuesta biológica al daño tisular: hormonas, sistema del complemento, plaquetas, citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1 β , IL-6), factores de crecimiento (factor de crecimiento de los hepatocitos (HGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), etc.) y factores antiinflamatorios (IL-10, TGF- β). (72)

Las características de la regeneración del hígado se pueden resumir en las siguientes particularidades:

1. **Común**: Se trata de un fenómeno presente en todos los vertebrados, desde el pez Zebra hasta el ser humano. (72)
2. **Controlada**: La regeneración hepática es una respuesta controlada. Las secuencias replicativas de las distintas células hepáticas, la morfogénesis y el control del volumen final hepático, están regulados genéticamente. (72)(98)

3. **Rápida:** Es un proceso muy rápido que se inicia en segundos y termina en pocos días, alrededor de una semana dependiendo de la especie que estemos estudiando. La regeneración se inicia con el reconocimiento de los patrones moleculares asociados a microorganismos patógenos (PAMP) o de los patrones moleculares asociados al daño celular (DAMP), generando una respuesta inmune innata (activación de las fracciones C3a y C5a del complemento, producción de TNF- α , síntesis de IL-6, IL-1 β) que estimula la división de los hepatocitos mediante la transición del estado basal G0 a la primera fase del ciclo celular G1 y que ocurre en las primeras 4 horas tras una hepatectomía. (36)(72)
4. **Ordenada:** La proliferación celular se sucede en un orden cronológico y secuencial; primero se dividen los hepatocitos y posteriormente las células de Kupffer y endoteliales, seguido de la neoformación de vasos y de los canalículos biliares, hasta reproducir la estructura hepática en su totalidad (Fig.11). (72)(99)

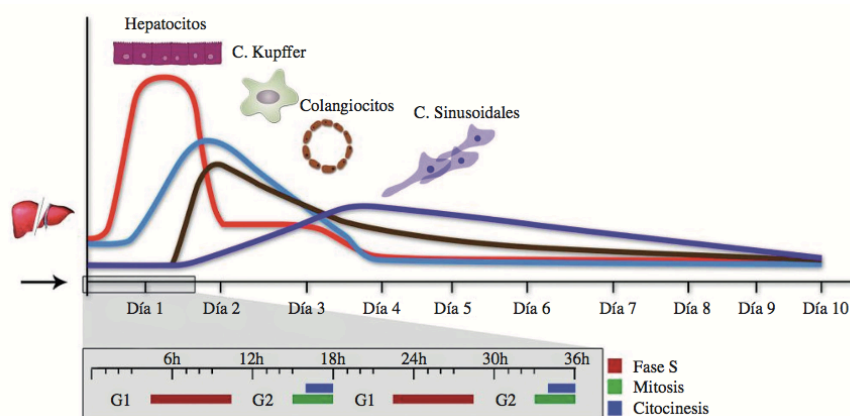


Fig.11.-Representación esquemática de las secuencias replicativas de las células epiteliales –hepatocitos, colangiocitos– y mesenquimales tras una hepatectomía parcial. En el eje de abscisas se muestra la correlación con las fases del ciclo celular de los hepatocitos. (72)

5. **Ciclo celular:** Tras una hepatectomía del 70 %, el 95 % de los hepatocitos pasan en 4 horas de la fase G0 a la fase G1 del ciclo celular, al término de la cual existe el punto crítico de control, llamado de restricción (“R”), que determina si las células se dividen de forma irreversible. Hasta entonces el proceso es reversible y los hepatocitos podrían regresar a su estado previo (G0) si no se dieran las condiciones idóneas (factores de crecimiento, citocinas, etc.). Posteriormente continúan por las fases del ciclo celular hasta la división celular o citocinesis de los hepatocitos (**Fig.4**). A las 72 horas de la hepatectomía en humanos, una subpoblación de los hepatocitos retornan al estado basal G0, mientras que otros reinician la mitosis hasta conseguir la restauración total de la masa hepática, momento en el que retornarán a su estado previo, G0. Una vez reestablecido el volumen inicial se producen fenómenos de apoptosis y remodelación tisular. (72)

6. **División de los hepatocitos maduros:** A diferencia de otros órganos sólidos, la regeneración del hígado se debe a la proliferación de los hepatocitos maduros y de las células mesenquimales, y no a la proliferación y diferenciación de las células madre pluripotenciales. Si bien se ha descrito su proliferación cuando la regeneración hepática es insuficiente, como en las hepatopatías crónicas. (72)(98)(100)

7. **Ilimitada:** La capacidad regenerativa del hígado es casi ilimitada. Pudiendo realizarse hepatectomías secuenciales, sin provocar insuficiencia hepática ni disminuir su potencial regenerativo. (72)

8. **Redundancia:** Existe una importante redundancia dentro de cada circuito que participa en la regeneración, existiendo además interacciones complejas entre ellos. Por ello, la pérdida de función de un solo gen no provoca el bloqueo completo de la regeneración hepática. Por ejemplo, se ha calculado que casi el 40% de los genes tempranos inmediatos expresados en el hígado en regeneración, son dependientes de la IL-6.(36)

9. **Hepatostato:** Existe una regulación estricta entre el volumen hepático y la superficie corporal, expresado como índice hepático (peso hígado/peso total x 100 \approx 2,5 %), conocida como regulación “hepatostática” o “Hepatostato”. El concepto surgió de experimentos con trasplante de hígado en los que los hígados de animales pequeños (babuinos a humanos o perros pequeños a perros grandes) se agrandaban después del trasplante para alcanzar un tamaño proporcional al animal receptor. Esta teoría se vio posteriormente apoyada al ver cómo la regeneración después de una hepatectomía parcial, finaliza cuando el hígado alcanza el tamaño original previo a la resección. (99)

10. **Proporcional:** Cuanto más severo es el daño hepático, como en una resección hepática extrema, más intensa es la respuesta proliferativa, y viceversa.(73)

11. **Continúa con sus funciones:** Durante la regeneración el hígado mantiene sus funciones homeostáticas: síntesis de proteínas, factores de coagulación, anti-proteasas, detoxificación de xenobióticos, etc. (72)

12. **Fortaleza:** El hígado es, junto con el cerebro, el órgano con mayor capacidad de mantener su integridad (morfológica y funcional) y responder a las distintas alteraciones del medio interno. Dicha propiedad se ha denominado “robustness” (fortaleza, en inglés), y se basa en el pleomorfismo, la redundancia y los mecanismos de bio-feedback o retroalimentación. Esto hace que su comprensión sea difícil y que, todavía, no se haya podido intervenir en la regeneración hepática con fines terapéuticos. (72)

2.5.3. Fases de la regeneración hepática

La regeneración hepática requiere la activación de múltiples vías, pero estas vías no son independientes unas de otras, sino que interactúan entre sí de forma muy compleja. Esta interacción puede llevarse a cabo de forma secuencial o simultánea, en distintos tipos de células del hígado, y en determinados momentos de la regeneración.(36)

La regeneración hepática puede dividirse en tres etapas que a continuación vamos a describir más extensamente: una fase inicial de preparación o “cebado”, que corresponde al paso de los hepatocitos quiescentes de la fase G0 a la fase G1 del ciclo celular, y que como hemos comentado anteriormente, ocurre en las primeras 4 horas tras la hepatectomía. Una segunda fase, o fase de progresión, que pertenece a la transición desde la fase G1, por las fases S (síntesis de ADN) y G2 hasta completar la mitosis, fase M; y una fase final de apoptosis, que consiste en la remodelación tisular y retorno a la fase G0 (Fig.4).(72)

1. Fase de preparación o “cebado” de los hepatocitos:

La primera fase de la regeneración comienza con la activación del sistema inmune. El sistema inmune, además de reconocer gérmenes patógenos, los PAMP, reconoce y responde a ligandos endógenos derivados del daño celular, los DAMP, y de la necrosis, lo que se ha llamado “respuesta inflamatoria estéril”. Estos ligandos o patrones, estimulan el sistema del complemento y los receptores tipo Toll (RTT), que se expresan en los macrófagos, las células endoteliales, las plaquetas, y los hepatocitos entre otros. (72)

La unión de los RTT con sus ligandos, estimula varias cascadas de señalización (**Fig.12**) que culminan con la expresión de IL-6, TNF- α e IL- β , y la activación de factores de transcripción citosólicos –NF- κ β , STAT-3, AP-1– que se traslocan al núcleo y ejercen efectos proliferativos, como la expresión de los genes de respuesta precoz inmediata: c-fos, c-jun y c-myc, responsables de que los hepatocitos abandonen el estado basal G0 y comiencen el ciclo celular. (36)(72)

Los DAMP también son reconocidos por los receptores NLRP (un receptor tipo-NOD) que una vez estimulados forman el complejo denominado “inflammasoma” y activan la liberación de las interleucinas 1 β y 18, las cuales tienen efectos proinflamatorios y promitóticos. La regeneración del hígado también se ha relacionado con ligandos tipo DAMP presentes en la circulación enterohepática, como los ácidos biliares y distintos componentes de la matriz extracelular derivados de la lesión tisular en intervenciones quirúrgicas. El sistema del complemento (C3 y C5), es el componente humoral más rápido para reconocer el daño tisular a través de los DAMP e iniciar la respuesta de reparación tisular. (72)

Con técnicas de manipulación genética en animales knock-out y knock-down se ha confirmado la participación de las moléculas mencionadas anteriormente como la IL-6, STAT-3, NF- κ B, C3 y C5 en la regeneración hepática. Además de los mediadores inflamatorios (TNF- α , IL-6, C3a, C3b, LPS...) los factores de crecimiento como el HGF, el factor de crecimiento plaquetario (PDGF) y el EGF también estimulan el paso de G0 a G1. (36)(72)

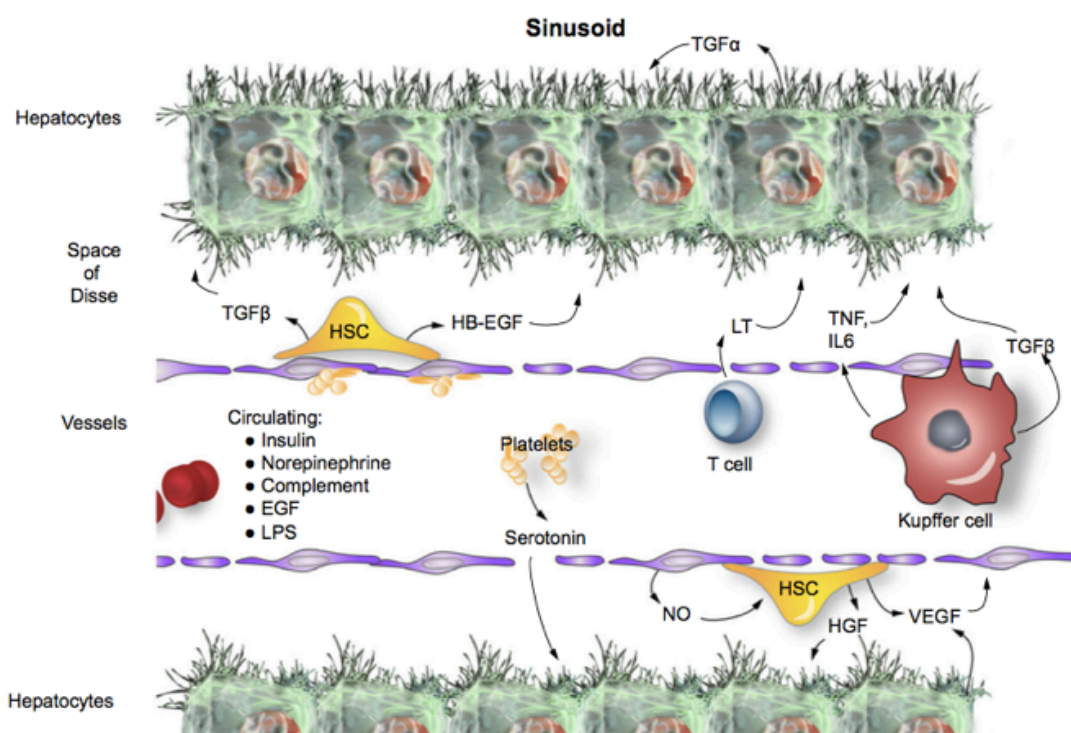


Fig.12.-Factores hematogénos e interacciones intercelulares durante la regeneración hepática, que representan señales entre los hepatocitos, las células de Kupffer, los linfocitos T, las células estrelladas hepáticas (HSC), las células endoteliales sinusoidales y las plaquetas.(98)

En esta fase de la regeneración, habría que nombrar una proteína descrita hace más de 40 años y que ahora se conoce como “Augmenter of Liver Regeneration”

(ALR). De ella ya habló el Profesor Starzl, padre del trasplante hepático, en su último artículo (obra póstuma). Esta proteína promueve la expresión del TNF- α , la IL-6 y la iNOS después de una hepatectomía parcial para promover la regeneración hepática, aunque su acción no está aún completamente definida. (101)(102)

2. Fase de progresión:

Aunque no existe un límite nítido entre las fases de la regeneración hepática, la fase de progresión comprende desde la fase G1 hasta la división celular. Esta fase está regulada por los factores de crecimiento (HGF, EGF, el factor de crecimiento endotelio-vascular (VEGF) y TGF- α), que tienen efectos mitógenos, tróficos y antiapoptóticos. La función primordial de los factores de crecimiento es activar los complejos ciclina-quinasa que promueven la cascada de las quinasas y con ello la expresión de los genes de respuesta precoz inmediata, y así la duplicación del huso mitótico y la replicación del ADN en la fase S. Estos genes de respuesta precoz, codifican otros factores (FosM1b y Myc) los cuales estimulan la expresión de los genes de respuesta tardía (a las 48 horas tras la hepatectomía) y la transición de la fase G2 a la fase M del ciclo celular. (36)(72)

3. Fase de apoptosis:

La regeneración termina con la restauración de la masa hepática inicial, necesaria para realizar las funciones hepáticas. La regulación del índice hepático representa un control estricto del cese del ciclo celular y una remodelación del tejido “neoformado”. El cese de la regeneración se ha relacionado con citocinas antiinflamatorias, proapoptóticas y con factores “hepatostáticos” como la IL-10 y

el TGF- β . Diversos estudios han confirmado que a la sobreexpresión inicial de genes pro-mitóticos le sucede una suplantación por genes metabólicos y posteriormente por los relacionados con el cese de la proliferación y el retorno al estadio previo quiescente. El gen p53 es el más conocido en la apoptosis celular, y es necesario para revertir el alto grado de ploidía y aneuploidía observadas durante la regeneración hepática. Este gen se activa en situaciones de estrés celular o ante un estímulo mitogénico excesivo. (72)

2.5.4. Hepatectomía parcial: el modelo ideal de la regeneración hepática

La hepatectomía parcial, fue el primer modelo diseñado de regeneración hepática. Y a día de hoy, la resección de 2/3 del hígado de roedores, se ha convertido en el paradigma ideal para el estudio de la regeneración hepática. La popularidad del modelo se basa en los aspectos siguientes. En primer lugar, la extirpación del hígado no se asocia con necrosis, lesiones tisulares extensas e inflamación, como otros modelos de regeneración de hígado por citotoxicidad o isquemia, lo que provoca una eliminación “limpia” del hígado, sin que la necrosis o la inflamación intervengan. Además, la hepatectomía elimina todos los tipos celulares al mismo tiempo y todos ellos intervendrán posteriormente en la regeneración, a diferencia de los modelos de lesión hepática por toxinas, donde éstas lesionan células hepáticas concretas. Y, por último, debido a que la hepatectomía parcial estimula el inicio inmediato de la regeneración hepática, los fenómenos regenerativos pueden cronometrarse con precisión. (83)(103)

Basado tanto en los estudios de hepatectomía en animales, como en los estudios sobre cultivos de hepatocitos, se ha demostrado que las señales asociadas con el inicio y el control de los eventos proliferativos después de la hepatectomía parcial se pueden dividir en dos grupos: mitógenos completos y mitógenos auxiliares. Los mitógenos completos son moléculas mitogénicas tanto en caldos de cultivos, como cuando se inyectan a animales, y provocan síntesis de ADN de hepatocitos e hipertrofia del parénquima hepático. En esta categoría encontramos: el HGF, el receptor c-Met y los ligandos del receptor de EGF. Por otro lado, los mitógenos auxiliares no son mitogénicos por sí mismos en medios de cultivo, y la ablación de las vías de señalización asociadas con ellos provoca un retraso en la regeneración hepática, pero no la anula. Entre los mitógenos auxiliares destacan: la norepinefrina, el TNF, la IL-6, el VEGF, la serotonina, los ácidos biliares, y la insulina (**Fig.13**). (103)(99)

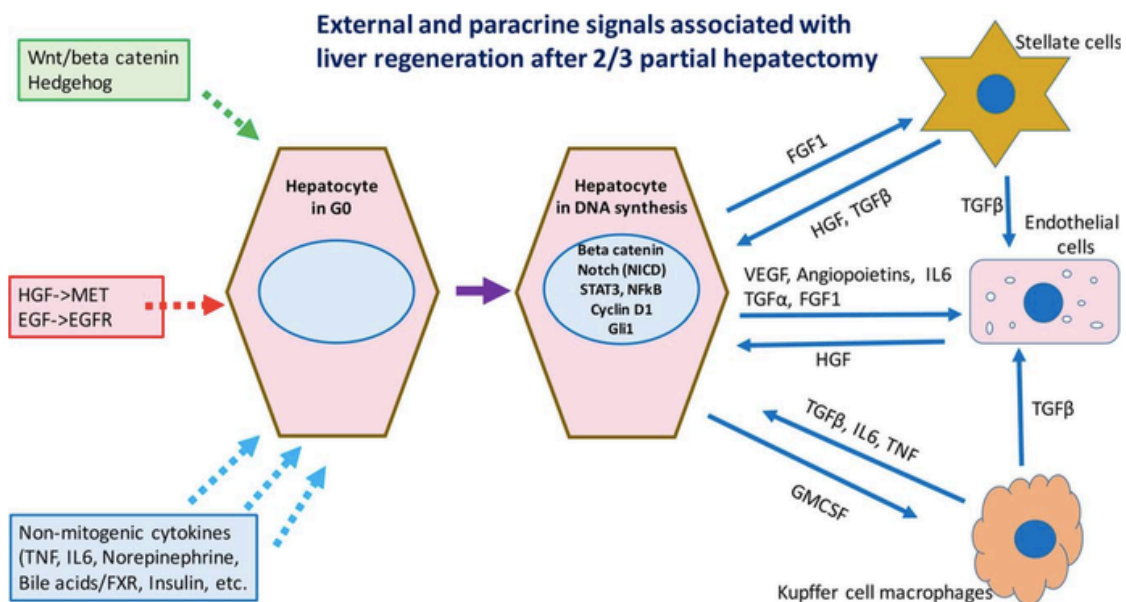


Fig.13.- Esquema de la señalización que activa la regeneración hepática tras una hepatectomía parcial y las distintas señales reguladoras del crecimiento entre los hepatocitos y las células no parenquimatosas.

2.6. Mediadores moleculares del proceso de la regeneración hepática

Los circuitos esenciales requeridos para el proceso de la regeneración hepática se pueden clasificar en tres redes: la de las citoquinas, la de los factores de crecimiento y la metabólica.(36)

El parénquima hepático postisquémico, como es el caso del hígado después de la embolización portal, y el parénquima hepático tras una resección, generan mediadores inflamatorios induciendo la activación de distintas moléculas y células.

De entre los mediadores pro- y antiinflamatorios, destacan las citoquinas, el sistema del complemento, las caspasas, las moléculas de adhesión y el metabolismo del óxido nítrico. Su cuantificación en los tejidos intervenidos, servirá para medir el nivel de respuesta inflamatoria.

2.6.1. Citocinas

Las citocinas o citoquinas son péptidos solubles que son liberadas por muchos tipos de células y facilitan la comunicación entre las células, para colaborar en la regulación de la respuesta inmune, de la inflamación y de la diferenciación celular. (104)

El término citocina abarca las interleucinas (IL), las quimiocinas, las adipocinas, las linfocinas, los factores estimulantes de colonias (CSF), los interferones (IFN) y la familia del factor de necrosis tumoral (TNF). (104)

La familia de las citocinas es marcadamente extensa: habiéndose identificado más de 100 miembros conocidos. Ante la ausencia de un sistema unificado de clasificación, las citocinas se identifican de diferentes maneras, superponiéndose algunas de ellas: según el orden numérico de descubrimiento (IL-1, IL-2...IL-7, IL-8...IL-38...), según la actividad funcional (como el factor de necrosis tumoral o los factor estimulantes de colonias), según la célula primaria de origen (las monocinas derivadas de los monocitos, las linfocinas de los linfocitos y las adipocinas de los adipocitos) y, más recientemente, según la homología estructural compartida con moléculas relacionadas. (104,105)

Se trata de proteínas producidas principalmente por los linfocitos y los macrófagos activados, también por neutrófilos, células endoteliales, células epiteliales o adipocitos entre otras.(106)

Las citocinas actúan uniéndose a un receptor que envía una señal a una célula receptora, produciendo un cambio en su función. Se trata de complejas cascadas de señales en las que intervienen múltiples factores. (105)

El uso de las citocinas como diana terapéutica se ha mostrado eficaz en muchas enfermedades reumáticas, sobre todo para inhibir el TNF o la IL-6. En estos momentos, se investigan muchas más citocinas como dianas o sustancias terapéuticas. (105)

A continuación, vamos a describir más detalladamente algunas citocinas y sus funciones. La mayoría de las citocinas desempeñan un papel decisivo en las respuestas inflamatorias

(ya sean innatas o adaptativas), al potenciarlas (proinflamatorias) o al inhibirlas (antiinflamatorias), según sea el balance neto entre los efectos de ambos tipos. (106)

CITOCINAS PROINFLAMATORIAS:

Las principales citocinas de este grupo son la IL-1, la IL-6 y el TNF- α . Los macrófagos activados constituyen la principal fuente productora de estas citocinas, aunque también pueden producirlas linfocitos activados y otras células ajenas al sistema inmunitario, como células endoteliales y fibroblastos.

- La **interleucina-1 (IL-1)**, es codificada en el cromosoma 2, e históricamente fue una de las primeras citocinas descubiertas. Se presenta en dos formas: IL-1 α , asociada a la superficie celular, e IL-1 β , secretada. Se sintetiza principalmente en células mononucleares, inducida por microorganismos patógenos o la cascada inflamatoria. Entre sus funciones más importantes destacan: la activación endotelial, la función protrombótica y la síntesis de proteínas de fase aguda (proteína C reactiva, amiloide A sérico). Es cofactor en la estimulación de linfocitos y además un pirógeno endógeno. (106,107)
- La **interleucina-6 (IL-6)** es una citoquina pleiotrópica formada por 212 aminoácidos y codificada por un gen del cromosoma 7, que desempeña un papel central en la hematopoyesis, la defensa del huésped y la inflamación. Induce la síntesis de reactantes de fase aguda tales como la proteína C reactiva, el amiloide A sérico, el fibrinógeno y la hepcidina en los hepatocitos, mientras que inhibe la producción de la albúmina. También juega un papel importante en la respuesta inmune adquirida mediante la estimulación de la producción de anticuerpos y el desarrollo de células T efectoras. Asimismo modula la regeneración hepática y

protege al hígado de la lesión por isquemia-reperfusión. Debido a su actividad pleiotrópica, la producción continua e irregular de IL-6 conduce a la aparición o desarrollo de diversas enfermedades. (108–111)

- El **factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α)** es una citoquina formada por 157 aminoácidos, secretada por una amplia variedad de células. Es un mediador inflamatorio local, pero a nivel sistémico se considera el principal efector del shock séptico. Produce la activación del endotelio a nivel local mediante la expresión de moléculas de adhesión endotelial (como la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1), ICAM-2 y la molécula de adhesión a células vasculares-1 (VCAM-1)), a la vez que estimula la producción de la quimiocina IL-8, y la liberación de óxido nítrico con vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular. En vista de su conocida acción proinflamatoria, el TNF- α ha sido identificado como diana terapéutica para el tratamiento de enfermedades inflamatorias. Es por ello que bloqueantes del TNF- α como el infliximab, el adalimumab o el etanercept, se usan en el tratamiento de patologías como la artritis reumatoide, la artritis psoriásica y la enfermedad de Crohn.(106,112,113)

CITOCINAS ANTIINFLAMATORIAS:

Las citocinas antiinflamatorias e inmunodepresoras contrarrestan los efectos de citocinas proinflamatorias. Las principales son la IL-4, la IL-10 y el TGF- β .

- La **interleucina-4 (IL-4)** es la mejor caracterizada en la regulación de la respuesta inmune humoral, induciendo la secreción de IgG y de IgE. Además, inhibe la diferenciación de linfocitos Th1 y la síntesis de IL-6 e incrementa la síntesis del antagonista del receptor de IL-1. El amplio rango de células en las que la IL-4

actúa resalta su naturaleza pleiotrópica. El gen de la IL-4 se encuentra en el cromosoma 5, junto con los genes de otras citocinas relacionadas como la IL-5, la IL-13 o el factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF). Numerosos estudios han demostrado la función reguladora clave de la IL-4 en las respuestas alérgicas, así como sus efectos antitumorales y antiinflamatorios.(106,114–116)

- La **interleucina-10 (IL-10)**, es una importante citoquina inmunoreguladora pleiotrópica cuyo gen se encuentra en el cromosoma 1. Fue denominada originalmente CSIF (factor inhibidor de síntesis de citoquinas), por su habilidad para inhibir la producción de numerosas citocinas como la IL-1, la IL-6, la IL-8 y el TNF- α . Como potente citoquina inmunosupresora, la IL-10 bloquea la respuesta inmune a diferentes niveles actuando tanto directa como indirectamente en la inmunidad innata y adaptativa. (106,117,118)

CITOCINAS REGULADORAS DE LA INMUNIDAD:

Como consecuencia del estímulo antigénico, los linfocitos T vírgenes o naïve se diferencian en linfocitos efectores (Th1, Th2...) o reguladores. Esto va a depender de tipo de antígeno, de la célula presentadora del antígeno y del microambiente de citocinas que se haya generado. Algunas citocinas tienen predominancia sobre la inmunidad celular, como la IL-2, la IL-15 o el IFN- γ , y otras sobre la inmunidad humoral como las IL-4, IL-5 e IL-6.(106)

- La **interleucina-5 (IL-5)** es la citocina con rango de acción más reducido, ya que induce la producción de IgA y eosinófilos. El gen que la codifica está localizado en el cromosoma 5. Es producida por Linfocitos Th2, mastocitos y eosinófilos, y

sus principales funciones son la diferenciación y la activación de los eosinófilos, y el crecimiento y la diferenciación de los linfocitos B.(106,116)

QUIMIOCINAS:

Las quimiocinas o citocinas quimiotácticas, son pequeñas proteínas secretadas por muchos tipos de células en respuesta al daño tisular. Durante las reacciones inflamatorias, los leucocitos migran a través de las paredes de los vasos sanguíneos hacia el tejido extravascular donde ejercen gran variedad de funciones biológicas, esta migración está regulada por las quimiocinas.(119,120)

A día de hoy, en humanos se conocen alrededor de 50 quimiocinas, las cuales están agrupadas en cuatro subfamilias (CC, CXC, CX3C y C) en base a sus diferencias estructurales (secuencias de aminoácidos) y fisiológicas. (119)

Su función fundamental es la de activar, atraer y dirigir diversas familias de leucocitos hacia los sitios de inflamación o lesión, por lo cual son consideradas citocinas proinflamatorias. (119) Es por ello que se conoce su papel en distintas enfermedades como el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), la glomerulonefritis, el síndrome de distrés respiratorio agudo, donde destaca el papel de la IL-8, y la artritis reumatoide, donde tiene una función importante la proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1). (119)(120)

- La **interleucina-8 (IL-8)** es una quimiciona proinflamatoria de la subfamilia CXC, también conocida como proteína quimioatrayente de neutrófilos-1 (NAP-1). Es una proteína apenas detectable en tejidos sanos, pero que se induce rápidamente en respuesta a citoquinas proinflamatorias

como el TNF- α o la IL-1. El aumento de sus niveles séricos puede conducir a condiciones inflamatorias crónicas, como la artritis reumatoide, la psoriasis, o la enfermedad inflamatoria intestinal. Además, la IL-8 juega un papel importante durante la angiogénesis, el crecimiento tumoral, y el desarrollo de metástasis en algunos cánceres como el de colon, el gástrico o de páncreas.(121,122)

- La **proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1)** también conocida como CCL2 (ligando de quimioquinas 2) es un miembro de la familia de quimioquinas C-C y un potente factor quimiotáctico para monocitos. El MCP-1 fue la primera quimiocina CC humana descubierta. Está localizado en el cromosoma 17, está compuesta por 76 aminoácidos y tiene un tamaño de 13 kDa. MCP pertenece a una familia compuesta de al menos cuatro miembros (MCP-1, -2, -3 y -4). El reclutamiento de monocitos/macrófagos en un órgano concreto, en respuesta a la inflamación, es una respuesta vital para eliminar los patógenos invasores a través de la fagocitosis. Aunque clásicamente se ha asociado a patologías como la enfermedad cardiovascular, la esclerosis múltiple o la artritis reumatoide, desempeña también un papel importante en la modulación inmune y en la eliminación de infecciones víricas agudas. (123)

2.6.2. Caspasas

Las caspasas son una familia de enzimas perteneciente al grupo de las cisteín-proteasas, las cuales se caracterizan por presentar un residuo de cisteína que media la ruptura de

otras proteínas. El nombre de caspasas, deriva de cisteinil-aspartato-proteasas, ya que el corte se produce en concreto a nivel de un residuo de aspartato. (124)(125)(126)

Se encuentran en el entorno intracelular de todos los organismos multicelulares estudiados hasta el momento.(125)(126) La primera en descubrirse fue la enzima convertidora de interleucina-1- β (ICE), conocida desde entonces como caspasa-1 y responsable de la maduración de la pro-interleucina-1- β mediante un proceso proteolítico, a su forma biológicamente activa, la interleucina-1- β . (124)(125)

El descubrimiento de la ICE o caspasa-1 no evidenció el papel de estas proteasas en la muerte celular. La importancia de las caspasas como responsables de los procesos de apoptosis fue establecida por Yuan y colaboradores en 1993 al encontrar que el producto del gen *ced-3*, una cisteín-proteasa análoga de ICE, estaba implicado en los procesos de muerte celular durante el desarrollo del nematodo *C. elegans*. (125)(126)(127)

Podemos clasificar las caspasas de diferentes maneras: filogenéticamente (caspasa-1, caspasa-2, ... caspasa-9...) y según su función en caspasas inflamatorias y caspasas apoptóticas. El grupo inflamatorio está formado por los homólogos de la ICE como la caspasas-1, -4 y -11, que participan en el procesamiento de citoquinas proinflamatorias, y el grupo apoptótico, está formado por las caspasas relacionadas con la proteína CED-3, cuya función es necesaria para iniciar y ejecutar la respuesta apoptótica durante la muerte celular programada. Estas caspasas apoptóticas se subdividen a su vez en dos subgrupos, las caspasas iniciadoras o activadoras de la apoptosis, como las caspasas-2 y -9 y las caspasas efectoras o ejecutoras de la apoptosis, como las caspasas-3 y -7. (124)(125)(126)(128)

Todas las caspasas se sintetizan como pro-caspasas, es decir, precursores inactivos o zimógenos. Estas formas inactivas carecen de actividad proteolítica. Las caspasas efectoras se activan proteolíticamente por las caspasas iniciadoras. Una vez activadas procesan a su vez otros sustratos proteicos que mediarán en las distintas vías de apoptosis. (125)(126) Tanto antes como después de su activación, las caspasas pueden ser reguladas a través de distintos mecanismos, incluyendo modificaciones post-translacionales e interacciones proteína-proteína. (128)

- La **caspasa-3** es la caspasa apoptótica efectora mejor caracterizada. Su acción se puede regular mediante modificaciones post-translacionales, e inhibirse mediante fosforilización. Tiene funciones tanto distintas como superpuestas a las otras dos caspasas efectoras, las caspasas-6 y -7. (128)(129) Además de la apoptosis, participa en otras funciones como la inhibición de los linfocitos B, la maduración de las células dendríticas, y la proliferación de queratinocitos y células neuronales. (126)

2.6.3. Metabolismo del óxido nítrico

La formación endógena de óxido nítrico está controlada por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), que cataliza la conversión de L-arginina a L-citrulina produciendo óxido nítrico. (130)

El óxido de nitrógeno (II), óxido nítrico o monóxido de nitrógeno (NO) es un gas incoloro, con función vasodilatadora. Hay dos fuentes del mismo en los organismos: una es

derivada de la degradación o transformación de sustancias químicas inorgánicas nitrogenadas en el cuerpo y los alimentos; y la otra es la mediada por la enzima NOS mediante una reacción de oxidación-reducción.(131)

La NOS presenta 3 subtipos, dos constitutivas la NOS neuronal (nNOS) y la NOS endotelial (eNOS) y una inducible (iNOS). Las NOS constitutivas son dependientes del calcio y de la calmodulina. La nNOS actúa como un neurotransmisor periférico e induce vasodilatación cerebral, y la eNOS se encuentra en el endotelio vascular y produce vasodilatación. La iNOS es independiente del calcio y de la calmodulina y se induce por citocinas, sobre todo en células inflamatorias (macrófagos, granulocitos), pero también en miocitos lisos vasculares. La iNOS aumenta la respuesta a la infección y estimula la inflamación y la cicatrización de las heridas. En sepsis graves participa en la vasodilatación sistémica característica del síndrome de respuesta inflamatoria sistémica. (130)

El NO se produce principalmente por catálisis de la eNOS, y también por la regulación positiva de la expresión de iNOS durante la isquemia hepática aguda. Se ha descrito que la iNOS es inducida a producir grandes cantidades de NO por el lipopolisacárido, la IL-1 y el TNF, los cuales como ya hemos mencionado previamente (**capítulo 2.5.1**) desempeñan un papel importante en distintos procesos inflamatorios y reacciones inmunes, y en algunas enfermedades. (131)

El NO posee un papel hepato-protector, el cual ha sido demostrado por diversos mecanismos: como la inhibición de la apoptosis de los hepatocitos, el enlentecimiento de la infiltración de macrófagos, la disminución de citocinas inflamatorias, el mantenimiento

de la microcirculación del hígado, la aceleración de la oxigenación tisular hepática, estabilizando los niveles de ATP, y disminuyendo la lesión por estrés oxidativo entre otros. (131)

2.6.4. Metabolismo energético

La señalización purinérgica es una forma de señalización extracelular mediada por nucleósidos y nucleótidos de purina como la adenosina y el ATP. La señalización purinérgica regula distintos procesos hepáticos como la secreción de ácidos biliares o el metabolismo del glucógeno, tanto en el hígado sano como en el enfermo. El estrés biológico puede conducir a la alteración de la señalización purinérgica, lo que conlleva un aumento de procesos inflamatorios, resistencia a la insulina, alteraciones vasculares y una regeneración anormal de las células hepáticas.(132)

El ATP es un metabolito central que desempeña funciones fundamentales como molécula de transferencia de energía. Es a su vez, un donante de fosfato y una molécula de señalización dentro de las células. Mediante la hidrólisis del ATP, se obtiene adenosín difosfato (ADP), fosfato inorgánico y energía. Por ello, la relación ATP:ADP es un importante parámetro de control fisiológico. Este ratio es directamente proporcional a la carga de energía celular.(133)

El hígado sintetiza la mayoría de los nucleótidos del cuerpo, y además es uno de los órganos con mayor actividad ATPasa y ADPasa. La señalización purinérgica es uno de los mecanismos de regulación de la respuesta inmune en el hígado. El ATP participa en la glucogenolisis, en la vasodilatación hepática, y en la activación de mitógenos vía

protein-quinasas. Además, induce la expresión de citoquinas proinflamatorias como la IL-1 β y el TNF- α .(132)(134)

Está claramente establecida la implicación del ATP en la regeneración hepática, ya que ésta requiere un enorme suministro de energía. El ATP activa la señalización de la quinasa c-jun y la progresión del ciclo celular en los hepatocitos, participando en el inicio de la regeneración, y en el crecimiento y el desarrollo del hígado. La regeneración hepática tras una hepatectomía parcial requiere un gran suministro de energía, necesario para evitar la IHPH. Por otro lado, el aumento del metabolismo del ATP se asocia con una regeneración más rápida.(132)(135)

La carga energética también se ha estudiado en el trasplante hepático, demostrando que conservar la carga energética es crítico en el período peritrasplante, y cómo los niveles de nucleótidos de adenina cambian rápidamente después de la reperfusión, así como los ratios entre ATP, ADP y adenosín monofosfato (AMP), correlacionándose además significativamente con la función de injerto.(136)

2.7. Cirugía hepática en modelo porcino

Los cerdos domésticos son comúnmente utilizados en cirugía experimental debido a las numerosas similitudes entre la anatomía y la fisiología porcina y humana. El hígado porcino es un órgano sólido con doble aporte sanguíneo, portal y arterial, y un drenaje venoso a través de las venas suprahepáticas. Su estructura microvascular es también similar a la humana. Su tamaño comparable al humano permite mayor trascendencia en

los procedimientos quirúrgicos, que en los casos de modelos experimentales de animales pequeños. Además, los cerdos son animales fácilmente disponibles y generalmente robustos para su uso como modelo quirúrgico. (137)(138)(139)

Para realizar una resección hepática o un trasplante en un modelo porcino, se requiere un conocimiento detallado de la anatomía del hígado.

2.7.1. Anatomía comparada del hígado porcino y humano

El hígado de cerdo se puede dividir en cinco lóbulos o en ocho segmentos más o menos similares a los descritos en el hígado humano por Couinaud en 1954.(140) Cada segmento tiene su propio suministro arterial, drenaje venoso y biliar. Como se aprecia en la **Fig.14(A)** el lóbulo lateral izquierdo (LLI) se puede dividir en los segmentos II y III, el lóbulo medial izquierdo (LMI) se compone del segmento IV, el lóbulo medial derecho (LMD) está formado por los segmentos V y VIII, el lóbulo lateral derecho (LLD) por los segmentos VI, VII y el lóbulo caudado corresponde al segmento I. (137)(141)

Esta segmentación es casi idéntica a la del ser humano, con la excepción del segmento I, o lóbulo caudado, que en el cerdo está adyacente al LLD y contiene la vena cava dentro del su parénquima. También hay una marcada diferencia en los volúmenes relativos de los segmentos en comparación con los de los humanos. (141)

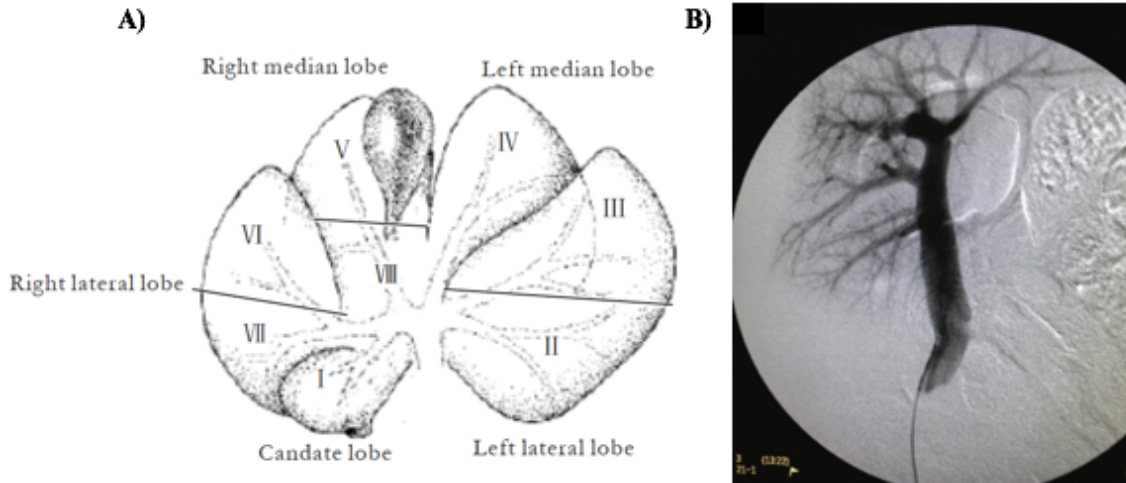


Fig.14.- Anatomía del hígado porcino: (A) disposición lobar y segmentaria (141); y (B) vasculatura portal (142).

La aplicación práctica de la clasificación anatómica porcina en segmentos es compleja, y es por ello que en nuestro modelo hemos utilizado la división del parénquima hepático porcino en cinco lóbulos.(141)

En cuanto a la anatomía vascular del hígado porcino, a diferencia de humano que la porta tiene dos troncos principales y una rama para cada segmento, la porta porcina tiene un eje común que recorre de derecha a izquierda la placa hiliar y a lo largo de su recorrido va dando distintas ramas para cada uno de los diferentes lóbulos **Fig.14(B)**. La irrigación arterial del hígado tiene un recorrido similar al de la vena porta. La arteria hepática principal se divide en un número variable de ramas, pero más comúnmente hay tres o cuatro ramas visibles anteriores al tronco portal, antes de ingresar al parénquima hepático. (137)(138)(142)

El drenaje venoso en el hígado de cerdo se lleva a cabo de forma similar al humano, a través de 4 venas suprahepáticas que drenan los LLI, LMI, LMD y LLD. La única

excepción es el segmento I, que drena directamente en la vena cava inferior. Es necesario tener en cuenta que la vena cava inferior y la confluencia de las venas suprahepáticas en el cerdo son intraparenquimatosas, lo que puede dificultar la resección hepática. (137)

A su vez, el sistema biliar tiene una distribución paralela al árbol vascular. Esta distribución segmentaria de los conductos biliares tanto humanos como porcinos, idéntica a la de la vena porta, se debe a que ambas estructuras se encuentran juntas dentro de las vainas glissonianas. (137)(138)

2.7.2. Nomenclatura estandarizada para las resecciones hepáticas en modelo porcino

El modelo porcino, como ya hemos comentado previamente, se ha convertido en un modelo óptimo para estudios en el ámbito hepatobiliar, y en concreto un modelo ideal para estudiar el SFSS y los distintos tipos de modulación de flujo portal. Sin embargo, existe una considerable heterogeneidad en los estudios experimentales en términos del tipo de modelo utilizado, lo que hace difícil sacar conclusiones firmes. Por ello en 2016, el grupo francés de Mohkam describió una nomenclatura anatómica estandarizada, para contribuir a la comprensión del SFSS.(143)

En la **Fig.15** apreciamos los distintos tipos de hepatectomía, el % de hígado resecado y cuáles son los lóbulos hepáticos remanentes.

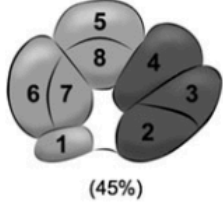
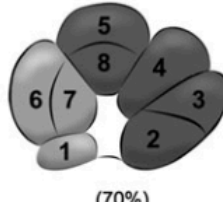
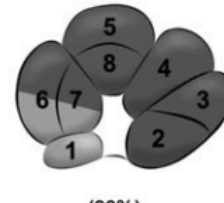
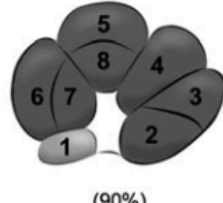
Segment	Section or lobe	Type of hepatectomy (estimated percentage of resected volume)			
1	Caudate lobe	} Liver remnant	} Liver remnant	} Liver remnant	} Liver remnant
7	Right lateral section				
6	Right lateral section				
5	Right medial section				
8	Right medial section				
4	Left medial section	Left hemi-hepatectomy  (45%)	Left trisectionectomy  (70%)	Left trisectionectomy + partial right lateral sectionectomy  (80%)	Subtotal hepatectomy  (90%)
3	Left lateral section				
2	Left lateral section				

Fig.15.- Nomenclatura estandarizada propuesta para los diferentes modelos de hepatectomía porcina.(143)

El modelo utilizado en nuestro experimento consiste en una hepatectomía del 90%, es decir, que consiste en la resección de los LLI, LMI, LMD y LLD, dejando como único remanente el lóbulo caudado. En publicaciones previas nos habíamos referido a este tipo de resección como “hepatectomía hiperextendida”. En el presente trabajo, y sucesivos, lo denominaremos hepatectomía subtotal para ajustarnos a la nomenclatura estándar.
(143)(48)

3. JUSTIFICACIÓN

Justificación:

Actualmente, hay una limitación en la extensión de las resecciones hepáticas debido al volumen del remanente hepático. Por ello conseguir expandir estos límites establecidos, es una de las mayores áreas de investigación y debate de la cirugía hepatobiliar.

El Precondicionamiento Regenerativo, ya ha mostrado resultados favorables. Nuestro equipo de investigación ha desarrollado previamente estudios en modelo porcino sobre hepatectomías subtotales, a las que se aplicó el estímulo regenerativo de la embolización portal preoperatoria, mostrando beneficios en cuanto a la tolerancia al hiperaflujo portal y al mantenimiento de la función hepática.

El presente estudio pretende profundizar en el conocimiento de los mecanismos moleculares que se asocian al “Precondicionamiento regenerativo” y son responsables de esa mejor tolerancia y del mantenimiento de la función hepática. Gracias a esta estrategia podríamos aumentar el número de pacientes resecables, al hacer más seguras las resecciones hepáticas mayores.

4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

4.1. Hipótesis

El “Precondicionamiento regenerativo” con embolización portal 24 horas antes de una hepatectomía subtotal (90%), produce una serie de cambios en el ambiente microvascular hepático que provocan una mejor tolerancia a una resección hepática subtotal.

4.2. Objetivos

1. Describir el perfil molecular y el metabolismo energético del Síndrome de “Small-For-Flow” en un modelo porcino.
2. Evaluar la influencia del “Precondicionamiento regenerativo” en el perfil molecular del Síndrome de “Small-For-Flow” en un modelo porcino, estudiando distintos mediadores moleculares del proceso de la regeneración hepática.
3. Evaluar la influencia del “Precondicionamiento regenerativo” en el metabolismo energético del Síndrome de “Small-For-Flow” en un modelo porcino.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Resumen

Se ha realizado un estudio experimental agudo sobre un modelo porcino de “Small for flow”. Dos grupos de diez cerdos fueron sometidos a una hepatectomía del 90%. Los animales del grupo experimental, fueron sometidos a embolización portal 24 horas antes de la resección hepática.

Antes, durante y después del procedimiento, se analizaron diferentes parámetros hemodinámicos, bioquímicos, histológicos y moleculares con la finalidad de estudiar la respuesta hepática a una hepatectomía mayor, y la posible protección ofrecida por el “Precondicionamiento regenerativo”.

5.2. Material

5.2.1 Material biológico: animales

Para desarrollar el presente estudio se emplearon 20 cerdos hembras de las razas Large-White y Minipig. Los animales tenían un peso comprendido entre 28 y 60 kilogramos, con una media de 42 ± 8.8 kilogramos, y una altura comprendida entre 105 y 150 centímetros, con una media de 132 ± 16 centímetros.

El Large-White, o gran cerdo blanco inglés, es una raza de cerdo originaria de Inglaterra (Condado de Yorkshire). Es un cerdo uniformemente blanco, de orejas tiesas y patas largas. Son cerdos adaptados tanto a la crianza al aire libre como en cautividad, constituyendo en la actualidad una de las razas porcinas más extendidas.(144)

El Minipig o minicerdo, es una variedad de cerdo doméstico de pequeño tamaño. Existen diversas razas de cerdo de esta variedad. Está establecido que la talla del minipig adulto debe ser menor de 50 centímetros y de 60 kilogramos para ser clasificado como tal. En un principio fueron utilizados para la experimentación y la investigación, aunque actualmente se han popularizado también como animales de compañía.(145)

Los procedimientos realizados con animales en este Proyecto de Investigación fueron aprobados por el Comité de Ética en Experimentación Animal (CEEAA) del Hospital General Universitario Gregorio Marañón (HGUGM) en Madrid, y por el Comité Ético de Experimentación Animal del Centro de Cirugía Mínimamente Invasiva Jesús Usón (CCMIJU) en Cáceres. Los experimentos se practicaron cumpliendo la normativa en vigor relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos (Directiva 2010/63/UE y RD 53/2013) y el personal que participó en los experimentos estaba previamente capacitado según el RD 53/2013 y la Orden ECC 566/2015, con las actuales Categorías C (Realización de los Procedimientos) y/o D (Diseño de los Proyectos y Procedimientos) en experimentación animal. En la dirección y el diseño del proyecto, se han seguido los principios de las “3 erres” en experimentación animal: reducción, reemplazo y refinamiento.

5.2.2 Instalaciones: quirófanos y laboratorios

Los protocolos quirúrgicos y anestésicos de este estudio se desarrollaron en el área quirúrgica de la Unidad de Medicina y Cirugía Experimental del HGUGM (**Fig.16**) y en los quirófanos y la sala de radiología intervencionista del CCMIJU (**Fig.17-18**).

El quirófano experimental del HGUGM está ubicado en el edificio de Medicina Experimental y Cirugía de IISGM (Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón). Consta de 97 m² divididos en un quirófano, un antequirófano, una sala de limpieza con autoclave para esterilización, un área sucia para instrumentos de lavado y cofres para los cadáveres de los animales, además de laboratorios de microcirugía, despachos y vestuarios. Las instalaciones del área quirúrgica incluyen material necesario para realizar dos intervenciones quirúrgicas a la vez. Consta de dos mesas y cuatro lámparas quirúrgicas de alta intensidad. Además de instrumental quirúrgico estándar para laparotomía, y material específico de cirugía hepatobiliar. Respecto al equipamiento anestésico, el quirófano dispone de respiradores modelo Dräger SA 1 (Dräger Medical, Lübeck, Alemania), capnógrafos Ohmeda 5250 RGM (General Electric Health Care, USA), un analizador de gases GEM Premiere 5000, un monitor de Swan-Ganz de gasto continuo (Edwards, Irving, California, USA) y un desfibrilador con palas externas e internas Life Pulse (HVE, Miami, USA).

El CCMIJU es una institución multidisciplinar dedicada a la investigación, formación e innovación en el ámbito sanitario. Con una dilatada experiencia en investigación traslacional en distintos campos de especialización. Dispone de una superficie de más de 20.000 m² dividido en cuatro zonas diferenciadas: área quirúrgica, área administrativa, área de eventos y congresos, y área residencial. El área quirúrgica cuenta con diez salas experimentales (TAC, RNM, dos quirófanos integrados, tres quirófanos temáticos de laparoscopia, microcirugía y radiología intervencionista y tres quirófanos de apoyo) con un equipamiento completo de última generación. Además, cuenta con una unidad de cuidados intensivos para los animales, donde pueden permanecer intubados tras la

intervención en caso de ser necesario. Y también con una zona de laboratorios y un animalario de más de 2.000m².

El análisis de las muestras, tanto sanguíneas como de tejido, que se obtuvieron en los experimentos, se analizaron en el Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón y en el Laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid.



Fig.16.- Imagen del quirófano de cirugía experimental del HGUGM



Fig.17.- Imagen del quirófano del CCMIJU



Fig.18.-Imagen de la sala de radiología intervencionista del CCMIJU

5.3. Métodos

5.3.1 Diseño experimental

Se diseñó un estudio experimental prospectivo agudo sobre un modelo porcino, veinte cerdos hembras de las razas large-white (n=8) y minipig (n=12).

La investigación se realizó en dos grupos de estudio (**Fig.19**): un grupo experimental (precondicionamiento) y un grupo control (n = 10 / grupo).

Se realizó una hepatectomía subtotal (hepatectomía del 90%) en ambos grupos de cerdos.

- **Grupo precondicionamiento (PREC):** los animales del grupo experimental fueron sometidos al “Precondicionamiento regenerativo” mediante embolización portal 24 horas antes de la cirugía
- **Grupo control (CON):** estos animales no experimentaron la embolización de las ramas portales previo a la hepatectomía.

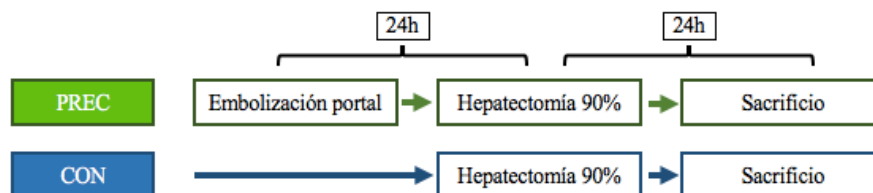


Fig.19.-Esquema de los tratamientos realizados en los dos grupos de animales del estudio.

Los datos hemodinámicos, analíticos, moleculares e histológicos de ambos grupos fueron comparados para evaluar la eficacia de la embolización portal

5.3.2. Protocolo anestésico

Todos los animales fueron sometidos a cirugía bajo anestesia general siguiendo un protocolo estándar.

Inicialmente, los animales fueron estabulados 24 horas antes de la operación. Permanecieron en ayunas, pero con acceso libre al agua. Se les colocó un parche de fentanilo 12 horas antes de la intervención, para su absorción percutánea.

A la mañana siguiente, todos los cerdos fueron premedicados con ketamina intramuscular 15 mg / kg de peso. Una vez conseguida una correcta sedación, se trasladó al animal al quirófano. Se registró el peso y la longitud, se colocó una manta térmica para evitar la hipotermia y se canalizó una vía periférica de calibre 20-22G en la oreja.

Después de la preoxigenación con oxígeno al 100%, se indujo anestesia general con fentanilo (3 mcg / kg i.v.), propofol (2-4 mg / kg i.v.) y atracurio (0,6 mg / kg i.v.). Posteriormente, se intubó al animal y se colocó una sonda nasogástrica para facilitar el procedimiento quirúrgico. El tubo se conectó a un respirador Dräger modelo SA1 y se realizó ventilación controlada por volumen con volumen corriente de 6-10 ml/kg, 10-14 respiraciones por minuto, relación inspiración:expiración de 1:2, PEEP de 5 y con FiO₂

de 0.5-0.6. Se mantuvo con perfusión continua de remifentanilo (0.05-0.3 mcg/kg/min) y atracurio (0.3-0.6 mg/kg/h), y se realizó el mantenimiento anestésico.

La fluidoterapia se realizó con una perfusión intravenosa de 6-8 ml / kg / h de cristaloides. El coloide hidroxietil almidón (Voluven®) se añadió cuando fue necesario para mantener la estabilidad hemodinámica. Si se produjo hipotensión (PAM <60 mmHg) a pesar de la fluidoterapia, se agregaron bolos intravenosos de fármacos vasoactivos, efedrina 5 mg o fenilefrina 0,1 mg para mantener la PAM igual o superior a 60 mmHg. Después de la hepatectomía, se midió la glucemia por hora y se administró una solución glucosada al 10% para mantener la glucemia por encima de 100 mg / dl.

5.3.3. Monitorización de la hemodinámica sistémica

La monitorización inicial consistió en electrocardiograma (ECG) de una derivación, pulsioximetría, capnografía, y FiO₂. A continuación, y una vez el animal fue anestesiado, se procedió a la canalización de las distintas vías.

De forma percutánea y guiada por ecografía, se canalizaron la arteria y la vena femoral. La arteria femoral se canalizó con catéter de PiCCO®, y mediante el monitor PiCCO2® se midieron las siguientes variables hemodinámicas: temperatura, índice cardiaco (CI), índice de función cardiaca (CFI), índice de volumen telediastólico global (GEDI), índice de agua pulmonar extravascular (ELWI), presión arterial (PA), índice de resistencias vasculares sistémicas (SVRI), frecuencia cardiaca (FC), índice de volumen sistólico (SVI), variación de volumen sistólico (SVV), índice de contractilidad del ventrículo izquierdo (DpMax). Se canalizó la vena femoral con un introductor de 7F y se introdujo

un catéter de Swan-Ganz hasta la desembocadura de las venas suprahepáticas en la vena cava inferior bajo control directo por palpación por parte del equipo quirúrgico para medir la presión suprahepática (PVSH). Además, se canalizó la vena yugular interna con un catéter bilumen, mediante disección abierta por parte del equipo quirúrgico, y se midió así la presión venosa central (PVC).

5.3.4. Monitorización de la hemodinámica y función hepática

5.3.4.1. Hemodinámica hepática:

La medición de la presión suprahepática se llevó a cabo con el catéter de Swan-Ganz colocado en las venas suprahepáticas a través de la femoral como se ha explicado en el punto anterior.

Los flujos sanguíneos de la vena porta (FP) y de la arteria hepática (FA) se midieron con un flujómetro similar al utilizado en el trasplante hepático, es decir, un medidor de flujo por tiempo de tránsito (MedieStim® AS, Oslo, Norway). Las sondas que se utilizaron fueron de 4mm para la arteria hepática y de 8mm para la vena porta. De esta manera se obtuvieron también los índices de pulsatilidad arterial (PIa) y portal (PIp).

El flujo hepático total (FHT) se calculó mediante la siguiente fórmula.

$$FHT = FA + FP$$

Los flujos sanguíneos fueron corregidos por peso, obteniendo el flujo arterial corregido por 100 gramos de peso (FA100g) y el flujo portal corregido por 100 gramos de peso (FP100g), los cuales se calcularon a través las siguientes ecuaciones:

$$FA100g = \frac{FA}{\text{peso del hígado remanente en gramos} / 100}$$

$$FP100g = \frac{FP}{\text{peso del hígado remanente en gramos} / 100}$$

El porcentaje que suponen el FA respecto al FHT (%FA/FHT) y el FP respecto al FHT (%FP/FHT) fueron calculados de la siguiente manera:

$$\% FA/FHT = \frac{FA}{FHT} \times 100$$

$$\% FP/FHT = \frac{FP}{FHT} \times 100$$

Como luego se explicará más detalladamente en el protocolo quirúrgico (punto 5.3.8), la presión de la vena porta (PP) se midió a través de un catéter que se introdujo en la misma a través de una vena gastroduodenal.

El gradiente de presión portosistémico (GPPS), es la diferencia de presión entre la vena porta y la vena cava, por lo que se estableció de la siguiente manera:

$$GPPS = PP - PVSH$$

5.3.4.2. Función hepática:

La función hepática se monitorizó mediante la medición del aclaramiento del verde de indocianina (ICG) con un monitor PiCCO2® (Pulsion Medical System AG, Munich, Germany). El aclaramiento del ICG se expresa utilizando dos parámetros después de la inyección intravenosa de 0,5mg/kg de ICG. Con los datos de la curva de concentración de ICG el monitor proporciona dos resultados: la tasa de desaparición en el plasma (PDR) y el R15.

La coagulación y la bioquímica hepática, obtenidas de las muestras de sangre periférica se utilizaron para medir la capacidad de síntesis hepática. De la coagulación se estudiaron los siguientes parámetros: INR, APTT y tiempo de protrombina; y de la bioquímica hepática, las enzimas hepáticas: GOT, GPT, GGT y Fosfatasa Alcalina.

5.3.5. Protocolo de medición de la presión intracraneal

La monitorización de la presión intracraneal (PIC) se realizó mediante la introducción de un sensor cerebral intraparenquimal (Camino® Integra®) antes de la cirugía. (146) La PIC se monitorizó antes de la cirugía, después de la resección a los, y a las 3 horas, 6 horas, 12 horas y 24 horas después de la intervención.

Antes y después de la cirugía, se realizó un TC craneal para evaluar la posición del sensor y la presencia de signos de edema cerebral. (147)(148)

Cuando la PIC aumentó más de 20 mm Hg después de la hepatectomía, se administraron bolos de pentotal (1-4 mg / kg) o manitol 20% (0,25 a 1 gr / kg / 2-6 h).

5.3.6. Volumetría

Se realizó un TC abdominal con contraste intravenoso, antes de la embolización en el grupo control, y antes y después de la hepatectomía en todos los animales (Philips CT Scanner Brilliance 6 slice). El cálculo de los volúmenes hepáticos total y remanente se realizó con un programa de segmentación hepática (Philips Intellispace Portal).

En los TC que se hicieron antes de la embolización portal y antes de la hepatectomía, se calculó el porcentaje del volumen total que correspondía al volumen remanente estimado.

En los TAC que se hicieron tras la hepatectomía, se comprobó como el remanente hepático era del 10%, y con ello la hepatectomía, efectivamente del 90%.

5.3.7. Embolización

A través de una vena yeyunal, y con control fluoroscópico se introdujo un introductor para embolizar la vena porta con partículas de Gelfoam.

Se embolizó el 90% del árbol portal intrahepático, quedando sin embolizar únicamente las ramas portales que irrigaban el lóbulo caudado.

5.3.8. Protocolo quirúrgico

5.3.8.1. Protocolo quirúrgico para la embolización portal:

El día de la embolización portal, se realizó una laparotomía media por encima del receso urinario de unos 15 cm. Se procedió a la canulación de una vena yeyunal y a la colocación de un catéter introductor a través de la vena yeyunal para acceder a la vena porta.

A través de dicho catéter se procede a la embolización portal del parénquima a resecar con partículas de Gelfoam.

Una vez completada la embolización, se extrajo el catéter y se realizó el cierre de la laparotomía media con sutura irreabsorbible. Posteriormente se despertó al animal.

5.3.8.2. Protocolo quirúrgico para la hepatectomía del 90%:

Para la resección hepática del 90%, los animales se colocaron en decúbito supino, se cubrieron de manera estéril y se realizaron los siguientes pasos:

- Laparotomía en J o de Makuuchi
- Movilización hepática seccionando el ligamento falciforme, el triangular izquierdo y el ligamento de fijación retrohepático.
- Disección de la vena porta e introducción de un catéter de vía central a la misma a través de una vena gastroduodenal. El catéter, que va conectado a un sistema de presión, queda fijado durante la cirugía para la monitorización de la presión portal.
- Disección de la arteria hepática y aislamiento de la misma con un vessel loop para facilitar su identificación durante la cirugía.

- Medición de los distintos parámetros hemodinámicos, y toma de biopsias y muestras sanguíneas (Bas).
- La resección hepática consistió en una hepatectomía del 90%. Fue una resección en bloque de los lóbulos lateral izquierdo (LLI), lóbulo medial izquierdo (LMI), lóbulo medial derecho (LMD) y lóbulo lateral derecho (LLD). La transección parenquimatosa se realizó después de la colocación de un torniquete (cinta de algodón) alrededor del parénquima que se fijó con puntos sueltos de prolene de 1/0, y de la realización de una sutura de hemostasia con hilos de prolene de 0/0, sobre la cinta del torniquete. (137)(149)
- Revisión de la hemostasia y lavado.
- Una vez estabilizado el animal, se procedió de nuevo a la medición de los distintos parámetros hemodinámicos sistémicos y hepáticos, y a la toma de biopsias y muestras sanguíneas (H15').
- Después de confirmar una hemostasia adecuada, la cavidad abdominal se lavó con solución salina estéril al 0,9%
- Retirada del catéter portal.
- Cierre de la laparotomía en J en dos planos con sutura irreabsorbible.

5.3.8.3. Protocolo quirúrgico para la realización de biopsias hepáticas:

Las biopsias hepáticas se realizaron de la siguiente manera. Una vez se realizó la laparotomía y el hígado estaba expuesto, se procedió a la exéresis en cuña de una biopsia hepática. Se llevó a cabo en un borde del hígado, realizando dos cortes con el bisturí frío en forma de triángulo o cuña. Posteriormente se dio un punto hemostático con una sutura de goretex del 0. En caso de sangrado a pesar de la sutura, se completó la hemostasia con el bisturí eléctrico.

5.3.9. Protocolo para la toma de muestras y mediciones

La medición de los distintos parámetros hemodinámicos y de función hepática, la extracción de las muestras de sangre y la obtención de las biopsias hepáticas se realizaron en tres momentos:

- Al principio de la intervención, lo que denominamos como momento basal (Bas).
- Una vez pasados 15 minutos de la realización de la hepatectomía subtotal (H15') cuando los animales ya estaban estabilizados
- Previo al sacrificio del animal, 24 horas después de la intervención quirúrgica (H24h).

En la **Fig.20**. vemos un “flow-chart” o diagrama de flujo con los diferentes pasos que se llevan a cabo antes y durante la intervención y el seguimiento postoperatorio.

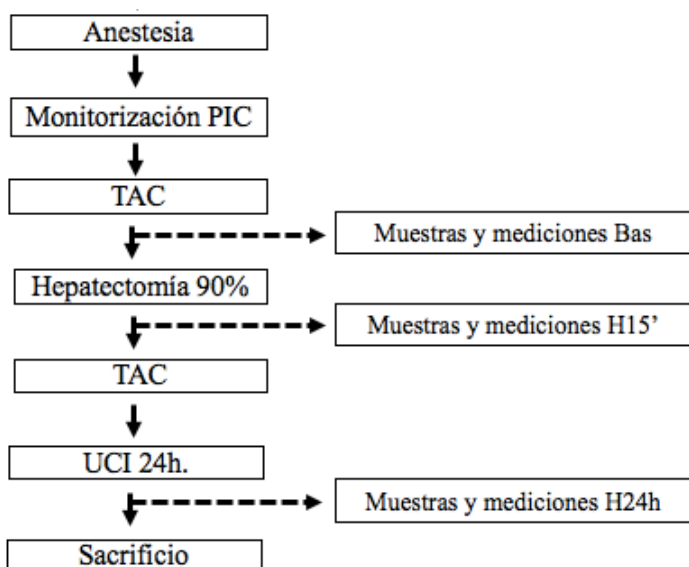


Fig.20.-Esquema de la toma de muestras durante el desarrollo del procedimiento.

Las muestras y mediciones fueron las siguientes:

- Muestras sanguíneas para determinación de hemograma, coagulación y perfil hepático
- Muestras sanguíneas para análisis inmunohistoquímico y genómico
- Medición de PDR mediante el Test ICG
- Hemodinámica: gasto cardíaco, presión venosa central, presión venas suprahepáticas, presión arterial sistólica y diastólica, presión portal, flujo portal y de la arteria hepática, y gradiente de presión portosistémico
- Biopsias. Se procedió a la obtención de una cuña hepática del remanente para estudio de anatomía patológica

5.3.10. Estudio histológico y evaluación de la proliferación celular

El procesamiento histológico de las muestras fue el habitual de un laboratorio general de histología.

Las muestras de tejido hepático se fijaron en solución de formalina tamponada al 10% durante 18-24 horas, fueron deshidratadas, aclaradas y embebidas en parafina y cortadas

(6 µm de espesor) con un micrótomo. Las secciones histológicas se tiñeron con hematoxilina-eosina y tricrómico de Masson, y se evaluaron por dos patólogos diferentes. Se elaboró una puntuación de daño histológico a partir de siete parámetros (**tabla.1**): congestión, hemorragia, edema periportal, edema septal, desprendimiento endotelial, necrosis y apoptosis. Cada variable se calificó: sin daño (0), bajo (1), moderado (2), severo (3).

	Sin	Bajo	Moderado	Severo
Congestión	0	1	2	3
Hemorragia	0	1	2	3
Edema periportal	0	1	2	3
Edema septal	0	1	2	3
Desprendimiento endotelial	0	1	2	3
Necrosis	0	1	2	3
Apoptosis	0	1	2	3

Tabla.1.-Las variables histológicas que se evaluaron y la puntuación posible.

En el score histológico final se estableció que algunas variables consideradas como propias de un daño más grave tuvieran un valor doble: la hemorragia, el desprendimiento endotelial, la necrosis y la apoptosis. Calculando la puntuación final con la siguiente fórmula:

$$\text{Daño histológico} = \Sigma (\text{congestión} + 2 \times \text{hemorragia} + \text{edema periportal} + \text{edema septal} + 2 \times \text{desprendimiento endotelial} + 2 \times \text{necrosis} + 2 \times \text{apoptosis})$$

De tal manera, la puntuación final variaba de 0 a 33 puntos. Se consideró daño histológico a partir de una puntuación de 3 puntos.(142,150)

El estudio de la proliferación celular de los hepatocitos se evaluó mediante estudio inmunohistoquímico de Ki-67 usando un anticuerpo monoclonal de conejo prediluido (IgG) que se une al extremo C-terminal del antígeno Ki-67 (Clon 30-9, Ventana, Tucson, AZ, EE. UU.) a una concentración de 2 microgramos / ml. Las secciones de tejido se tiñeron en el colorante automático ULTRA Benchmark de Ventana, utilizando el kit de detección Optiview DAB (Ventana). El anticuerpo Ki-67 se utilizó para evaluar la actividad proliferativa de los tejidos encontrándose en las células en proliferación una tinción nuclear positiva. (149–151)

5.3.11. Estudio molecular

5.3.11.1. Estudio molecular mediante la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa.

La expresión del ARN mensajero (ARNm) del TNF- α , la MCP-1, la IL-1, la IL-10, la iNOS y la eNOS, y se obtuvo mediante el aislamiento del ARN y la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una de las técnicas que más han revolucionado la investigación biomédica. A día de hoy, es una tecnología bien establecida que facilita la manipulación de genes, ayudando en la medicina forense, en la

clonación, y en el diagnóstico de distintas enfermedades, tanto genéticas, como infecciosas u oncológicas.(152)(153)(154)

Aunque descrita por primera vez en la década de 1970, la PCR fue desarrollada por Mullis en 1980, quien años después se llevaría el Premio Nobel de Química por este trabajo. (152)(153) (154)

La PCR consiste en la amplificación (millones de veces) de regiones específicas de ADN, permitiendo después su manipulación. Para ello, requiere de 4 componentes: la muestra de ADN a amplificar, una ADN-polimerasa termoestable (Taq polimerasa) para resistir los ciclos de calentamiento y enfriamiento que se llevan a cabo durante el proceso de la PCR, nucleótidos trifosfatos y los primers o cebadores específicos de genes. (152) (153) (154)

Esta técnica se compone de repeticiones de ciclos, cada uno de los cuales tiene 3 fases que requieren distintas condiciones de temperatura. Cada fase está dedicada a un proceso específico, que en última instancia conduce a la generación de más copias del gen elegido. El primer paso es la separación del ADN bicatenario mediante el calentamiento de la muestra a unos 90°-95°C. En el segundo paso, la muestra se enfría (alrededor de 50°C) lo que permite la unión de los primers o cebadores a las cadenas de ADN de una sola cadena. En el tercer y último paso, la mezcla se calienta de nuevo, esta vez hasta unos 70°-80°C, temperatura a la cual la ADN-polimerasa sintetiza nuevas cadenas de ADN utilizando los cebadores como punto de partida y usando los nucleótidos trifosfatos presentes en la mezcla para generar la cadena complementaria específica de la secuencia, en un proceso denominado elongación. La repetición de estos 3 pasos sucesivamente da como resultado

la duplicación del número de copias en cada ciclo (número de copias = 2^n , donde “n” es el número del ciclo). La generación de productos de PCR sigue, por tanto, un patrón exponencial, alcanzando una meseta tras aproximadamente 30 a 40 ciclos, cuando la mayoría de los reactivos se han utilizado. (152) (153) (154)

El inconveniente de usar ADN como punto de partida para la amplificación por PCR es que no puede indicar si el gen detectado se expresa realmente en una célula, por lo que no nos permite comparar la diferente expresión genética entre dos individuos, momentos o condiciones. Para ello se usa la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR). Este método convierte el ARNm en ADN complementario (ADNc) in vitro antes de la amplificación mediante PCR. La transcriptasa inversa o retrotranscriptasa es una enzima de tipo ADN-polimerasa, que tiene como función sintetizar ADN de doble cadena utilizando como molde ARN monocatenario. (152) (154)

Estas reacciones se llevan a cabo con un termociclador, un aparato que realiza cambios de temperatura rápidos y controlados para las diferentes fases del proceso de amplificación. (152) (153)

Es importante mencionar también la PCR en tiempo real o Q-PCR. Se trata de una técnica de PCR que, añadiendo fluorescencia, permite obtener datos cuantitativos sensibles de la amplificación del ADN. (152)

5.3.11.2. Estudio molecular mediante el análisis Western Blot.

La expresión proteica del TNF- α , de la MCP-1, de la IL-1, la IL-4, la IL-5, la IL-6, IL-8 y la IL-10, de la eNOS y la iNOS y de la Caspasa-3 se obtuvo mediante el análisis Western Blot.

El Western Blot, también conocido como Inmunoblot, es una técnica para identificar proteínas. En concreto se trata de técnicas de detección de antígenos en las que las proteínas de una suspensión complejas son separadas mediante electroforesis, utilizando un gel de poliacrilamida que las separa en función de su tamaño o peso molecular. Posteriormente el contenido del gel se transfiere a una matriz superpuesta de papel de nitrocelulosa o una sustancia similar en la que quedan fijadas las proteínas en idéntica disposición a la que tenían en el gel. La matriz de nitrocelulosa se incuba con anticuerpos específicos de una proteína y a continuación se revela con una reacción enzimática que permite visualizar o no, la banda de interés que aparece en el peso molecular correspondiente.(155)(156)

Esta técnica proporciona una herramienta eficaz para el estudio analítico de proteínas presentes en bajas concentraciones en cultivos celulares o fluidos corporales. Pudiendo detectar concentraciones de antígeno tan bajas como 500ng/ml o 2.5ng/banda en el gel. Esta técnica es análoga al Southern Blot que describe las técnicas realizadas para identificar ADN mediante electroforesis, y al Northern Blot, la electroforesis para el ARN.(157)

5.3.12. Estudio del metabolismo energético

Se analizaron el ATP, el ADP y el AMP. Las muestras de tejido se congelaron inmediatamente tras la obtención de las mismas en la hepatectomía utilizando nitrógeno líquido. Posteriormente se procederá a la liofilización y al almacenado a -80°C hasta el momento de la determinación bioquímica.

El ATP se midió mediante un método espectrofotométrico basado en el acoplamiento del ATP que requiere la fosforilación de 3-fosfoglicerato con un sistema de oxidación-reducción (1,3-difosfoglicerato / gliceraldehído-3-P) que involucra una enzima unida a NAD⁺. El ATP se determinó midiendo la disminución de la absorbancia a 340 nm. El AMP se convirtió enzimáticamente en ADP, y el ADP en ATP, por medio de la mioquinasa y el piruvato quinasa, respectivamente.

Adicionalmente, también usamos como medidas del metabolismo energético el ratio ATP:ADP y la carga energética. La fórmula utilizada para analizar la carga energética fue la siguiente. Su valor oscila entre 0 (todos los AMP) y 1 (todos los ATP).

$$Carga\ energética = \left(ATP + \frac{ADP}{2} \right) \div (ATP + ADP + AMP)$$

5.3.13. Análisis estadístico

Para realizar el análisis estadístico de los datos se utilizó el programa informático SPSS versión 23.0 para Mac (IBM Corporation, Armonk, NY). Con todos los datos clínicos y de laboratorio registrados se confeccionó una base de datos con el programa SPSS. Los resultados se expresaron como media \pm error estándar de la media.

Para estudiar tanto las diferencias tanto intragrupo como intergrupo se utilizó el modelo lineal mixto. Un test paramétrico complejo que analiza las diferencias entre los grupos y las diferencias en el tiempo y la combinación de ambos factores. De tal forma que tenemos una diferencia estadística global entre el comportamiento de ambos grupos a lo largo del tiempo; la diferencia estadística entre ambos grupos en cada momento del procedimiento (Bas, H15' y H24h); y las diferencias en los valores de cada grupo a lo largo del tiempo, comparando Bas con H15' y Bas con H24h.

Se consideró como estadísticamente significativo un valor P menor de 0,05 con un nivel del 95% de confianza.

6. RESULTADOS

Resultados:

Los resultados del análisis de las variables generales, hemodinámicas sistémicas, hemodinámicas hepáticas, analíticas, histológicas y de volumen y función hepática han sido previamente descritas en la Tesis Doctoral del Dr. JM Asencio, director de este trabajo. En primer lugar, resumiré los datos obtenidos en dicha Tesis Doctoral para así poder entender mejor los resultados del presente trabajo. (74)(142)

Los parámetros bioquímicos y hemodinámicos sistémicos basales preoperatorias fueron similares en ambos grupos. Todos los animales toleraron correctamente la cirugía, y permanecieron estables como para iniciar el periodo de 24 horas de vigilancia postoperatoria. Ni la PVE, ni la hepatectomía al 90% indujeron cambios significativos en los parámetros hemodinámicos sistémicos. Presentando ambos grupos valores similares de FC y PAM, al finalizar la cirugía. Las volumetrías realizadas mediante TC mostraron que la resección realizada correspondía al 90% del parénquima hepático. (74)(142)

Respecto a la hemodinámica hepática, la resección del 90% de la masa hepática estuvo acompañada de importantes aumentos del FP, con una magnitud similar en ambos grupos. El acondicionamiento tuvo un impacto importante en los cambios de la PP inducida por la hepatectomía. Todos los animales en el grupo CON mostraron aumentos de la PP después de la resección, nueve de ellos por encima de 20mmHg, cumpliendo criterios de SFFS. Mientras que estos cambios fueron marcadamente atenuados en los cerdos del grupo PREC, con una diferencia estadísticamente significativa. A pesar de que los cerdos sometidos a PVE tendieron a mostrar un FP más bajo al comienzo de la operación, ambos grupos tuvieron aumentos similares de flujo después de la resección hepática. Por lo tanto, la prevención de la hipertensión portal no fue atribuible a una prevención del hiperaflujo

portal, sino más bien a una mayor tolerancia del hígado remanente para acomodar aumentos del FP. El FA disminuyó en todos los animales después de la hepatectomía como consecuencia del aumento concomitante del flujo portal. Sin embargo, los cerdos en el grupo PREC mostraron al finalizar la cirugía, un mayor flujo de la arteria hepática medido tanto por 100 gramos de peso de tejido, como en % respecto al FHT. (74)(142)

El “Precondicionamiento regenerativo” mejoró la preservación de la función hepática después de la hepatectomía. Ya que los cerdos del grupo PREC presentaron valores de PDR mejores al final de la cirugía en comparación con los animales del grupo CON, siendo estas diferencias estadísticamente significativas. Además, la puntuación de diversas características histológicas en las biopsias hepáticas obtenidas después de la hepatectomía evidenció los cambios patológicos característicos de la IHPH. Siendo el daño histológico menor, en el grupo PREC. (74)(142)

Como vemos, los animales del grupo CON desarrollaron características que definen al modelo de SFPS, y por otro lado el grupo PREC, presentó mayor tolerancia a la hepatectomía subtotal, así como una mejor función hepática al finalizar el procedimiento. A continuación, voy a profundizar en las variables bioquímicas que son el objeto de la presente Tesis Doctoral.

Primeramente, se analizan los resultados que obtuvimos estudiando la expresión de los siguientes mediadores moleculares de la regeneración hepática: TNF- α , MCP-1, IL-1, IL-10, eNOS e INOS y de sus respectivos ARNm mediante las técnicas de Western Blot y RT-PCR respectivamente. También analizamos mediante la técnica de Western Blot la Caspasa-3 y la Caspasa-3-activada, la IL-4, la IL-5, la IL-6 y la IL-8. El metabolismo

energético, se midió mediante espectrofotometría, obteniendo los datos de ATP, ADP y AMP. Posteriormente se calculó el ratio ATP:ADP y la carga energética según la fórmula previamente descrita. Todas estas variables se analizaron en el grupo CON, y se compararon posteriormente con los resultados de grupo PREC.

6.1. Citocinas en el Síndrome de “Small-For-Flow” y el “Precondicionamiento regenerativo”

6.1.1. Expresión del ARNm del factor de necrosis tumoral alpha (ARNm TNF- α)

Respecto a los cambios que se producen en el TNF- α a lo largo del procedimiento al aplicar el modelo del SFFS, vemos cómo el TNF- α aumenta después de la hepatectomía en H15 ($p=0,019$) y lo hace aún más en H24h ($p<0,001$).

Al estudiar las variaciones del ARNm del TNF- α a lo largo del procedimiento dentro de ambos grupos, vemos como en ambos aumenta su expresión progresivamente tras la cirugía. En global, los dos grupos tienden a comportarse de forma distinta, aunque la diferencia no alcanza significación estadística ($p=0,064$). Si analizamos las diferencias en cada uno de los tres momentos del experimento, a las 24 horas tras la hepatectomía sí encontramos una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo CON, $1,877\pm 0,229$, frente a $1,070\pm 0,049$ en el grupo PREC ($p=0,030$) (**Fig.21. Tabla.2**).

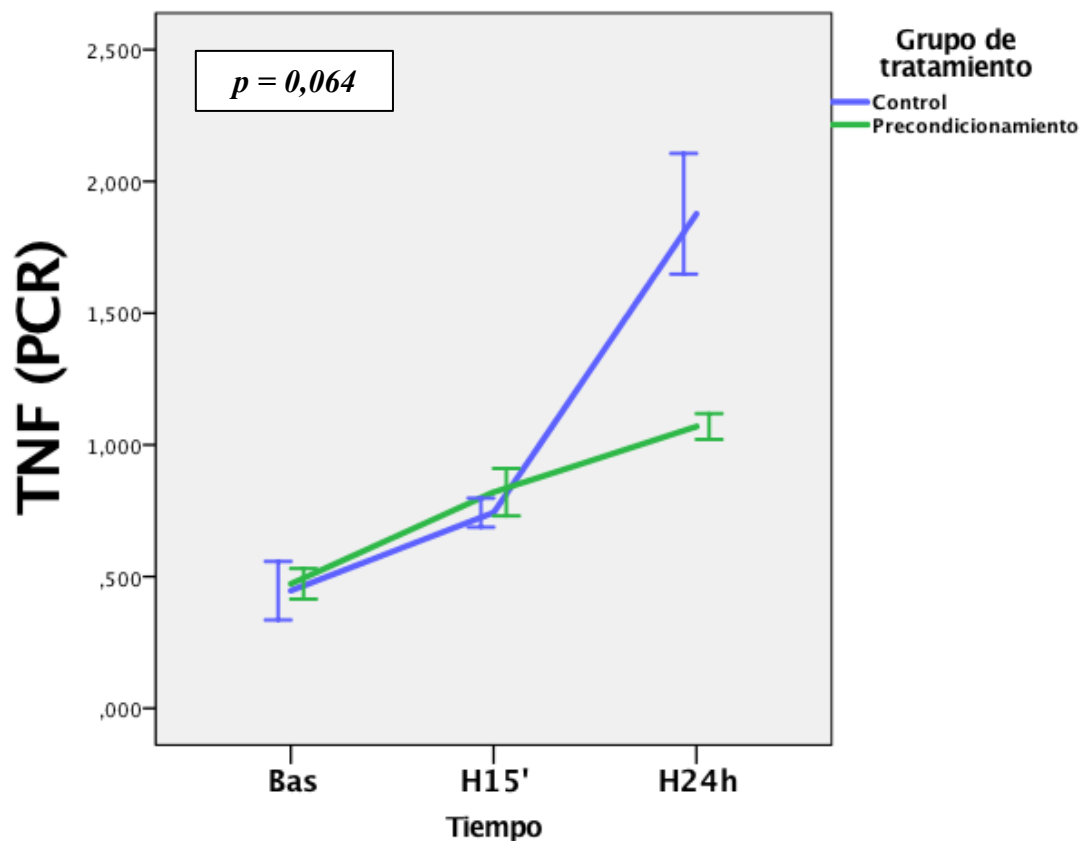


Fig.21.-Evolución del TNF de ambos grupos en los tres momentos del procedimiento, analizado con la técnica de PCR (los resultados aparecen expresados como media (línea) y error estándar de la media (barras de error)).

6.1.2. Análisis Western Blot del factor de necrosis tumoral alpha (TNF- α)

Al analizar los cambios que se producen en el TNF- α del grupo CON, vemos cómo el TNF- α aumenta después de la hepatectomía en H15' ($p < 0,001$) y con una pendiente más pronunciada en H24h ($p < 0,001$). Siguiendo un patrón similar al que obtenemos al medir el TNF- α con PCR.

Según el análisis de modelos mixtos ambos grupos obtuvieron diferencias en cuanto a la expresión del TNF- α ($p = 0,012$) a lo largo del procedimiento. El “Precondicionamiento regenerativo” indujo un descenso, estadísticamente significativo, en la expresión de la

citoquina TNF- α en los animales del grupo PREC a las 24 horas de la cirugía $0,569\pm 0,036$, frente al grupo CON $1,772\pm 0,232$ ($p=0,006$) (**Fig.22. Tabla.2**).

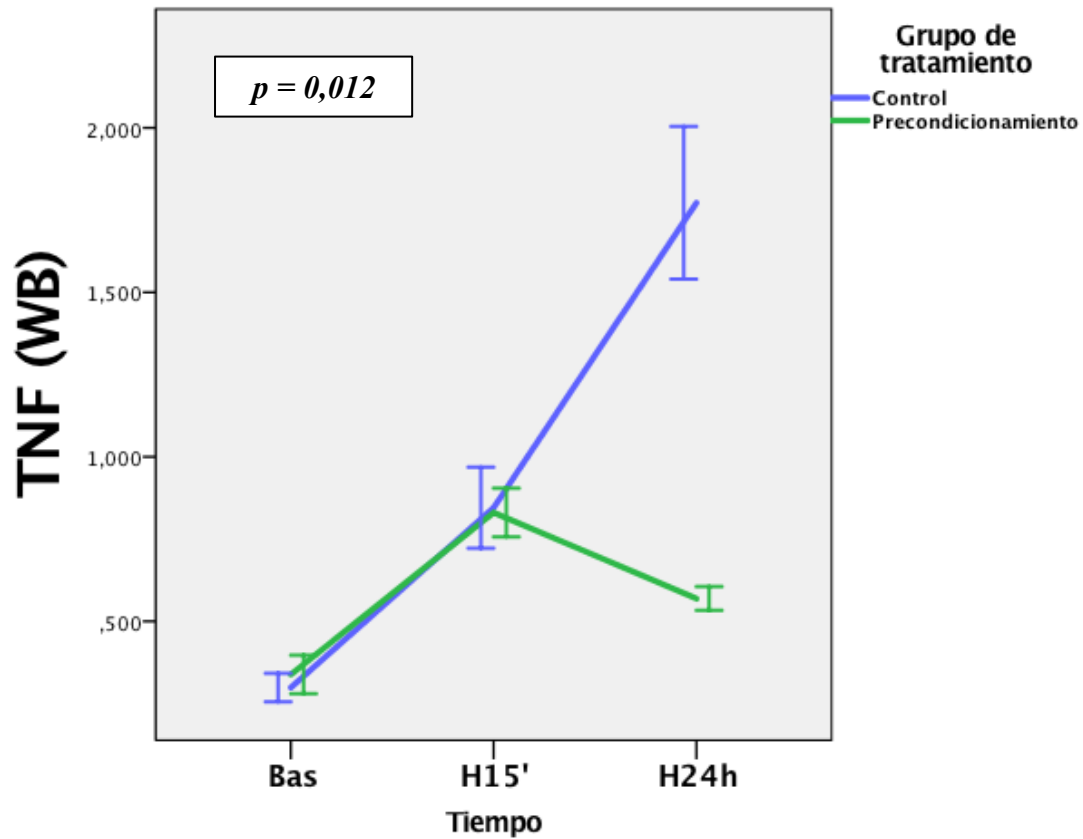


Fig.22.-Evolución del TNF de ambos grupos en los tres momentos del procedimiento, analizado con la técnica de WB (los resultados aparecen expresados como media (línea) y error estándar de la media (barras de error)).

6.1.3. Expresión del ARNm de la proteína quimioatravente de monocitos 1 (ARNm MCP-1)

Si analizamos el comportamiento de la MCP-1 respecto al SFFS, vemos como aumenta levemente en H15', sin obtener diferencias significativas ($p=0,517$), pero sí crece de forma importante en H24h ($p=0,002$).

La expresión del ARNm del MCP-1 no obtuvo diferencias en ambos grupos ($p=0,135$), tampoco al analizar los distintos momentos de la intervención por separado (Bas, $p=0,585$; H15', $p=0,893$; H24h, $p=0,083$) (**Fig.23. Tabla.2**).

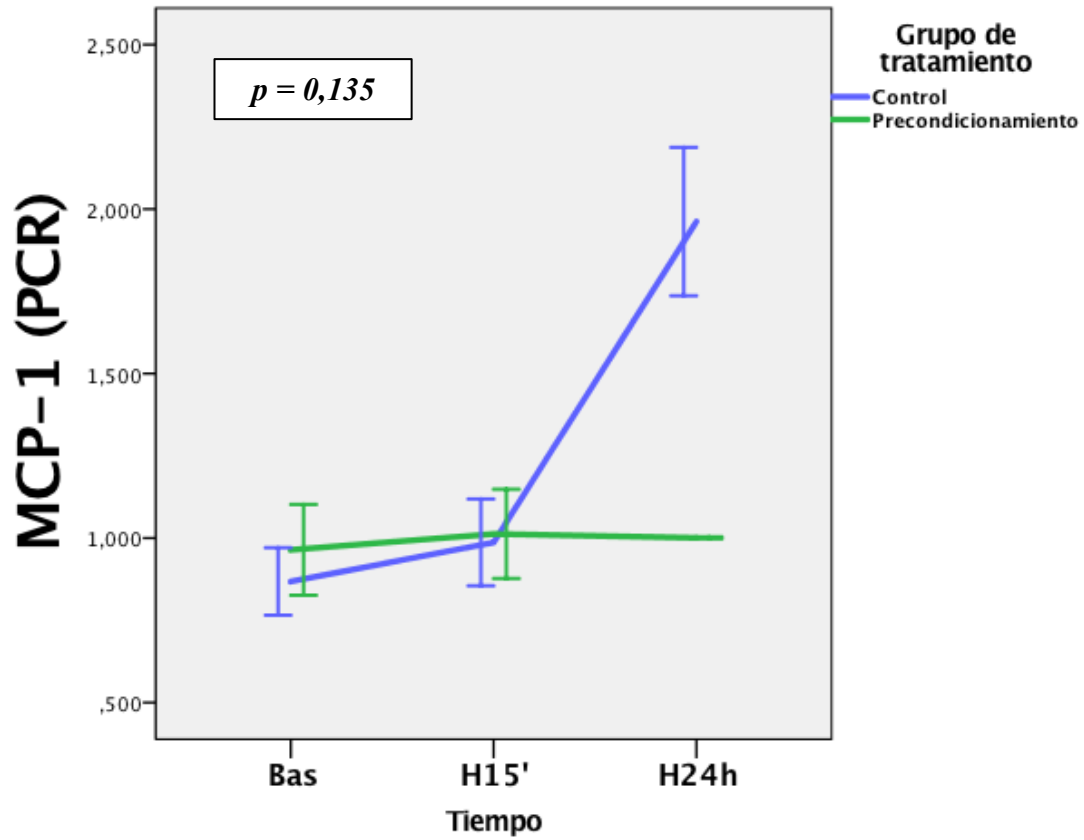


Fig.23.-Evolución del MCP-1 de ambos grupos en los tres momentos del procedimiento, analizado con la técnica de PCR (los resultados aparecen expresados como media (línea) y error estándar de la media (barras de error)).

6.1.4. Análisis Western Blot de la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1)

1)

Si analizamos el comportamiento de la MCP-1 respecto al SFFS con la técnica de WB, vemos como de nuevo, los valores ascienden levemente en H15', sin obtener diferencias significativas ($p=0,260$), pero sí crecen de forma importante en H24h ($p<0,001$).

Sin embargo, las diferencias obtenidas intergrupo en el MCP-1 analizado con la técnica de Western-Blot sí fueron significativas ($p=0,002$). Destacando la diferencia a las 24 horas, grupo CON $1,705\pm 0,104$, frente a grupo PREC $0,648\pm 0,084$ ($p<0,001$) (**Fig.24.**

Tabla.2).

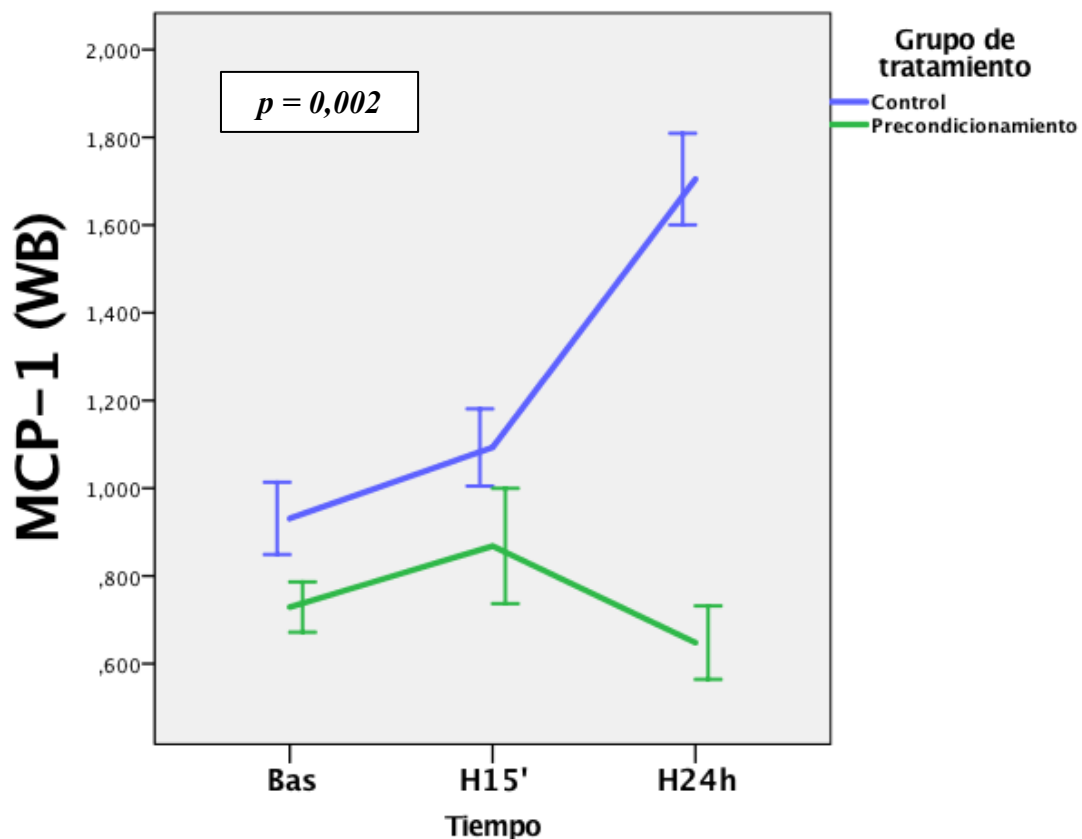


Fig.24.-Evolución del MCP-1 de ambos grupos en los tres momentos del procedimiento, analizado con la técnica de WB (los resultados aparecen expresados como media (línea) y error estándar de la media (barras de error)).

6.1.5. Expresión del ARNm de la interleucina-1 (ARNm IL-1)

Al estudiar la IL-1 respecto al modelo de SFFS, vemos cómo también aumenta progresivamente a lo largo del procedimiento. Encontramos un pico importante en H15' ($p < 0,001$), hasta el máximo de sus niveles en H24h ($p < 0,001$).

La expresión del ARNm de la IL-1 fue diferente en ambos grupos durante el experimento ($p < 0,001$). Al analizar los distintos momentos por separado, encontramos como las diferencias se acentúan inmediatamente tras la hepatectomía ($p = 0,010$) y a las 24 horas de la misma ($p < 0,001$) (**Fig.25. Tabla.2**).

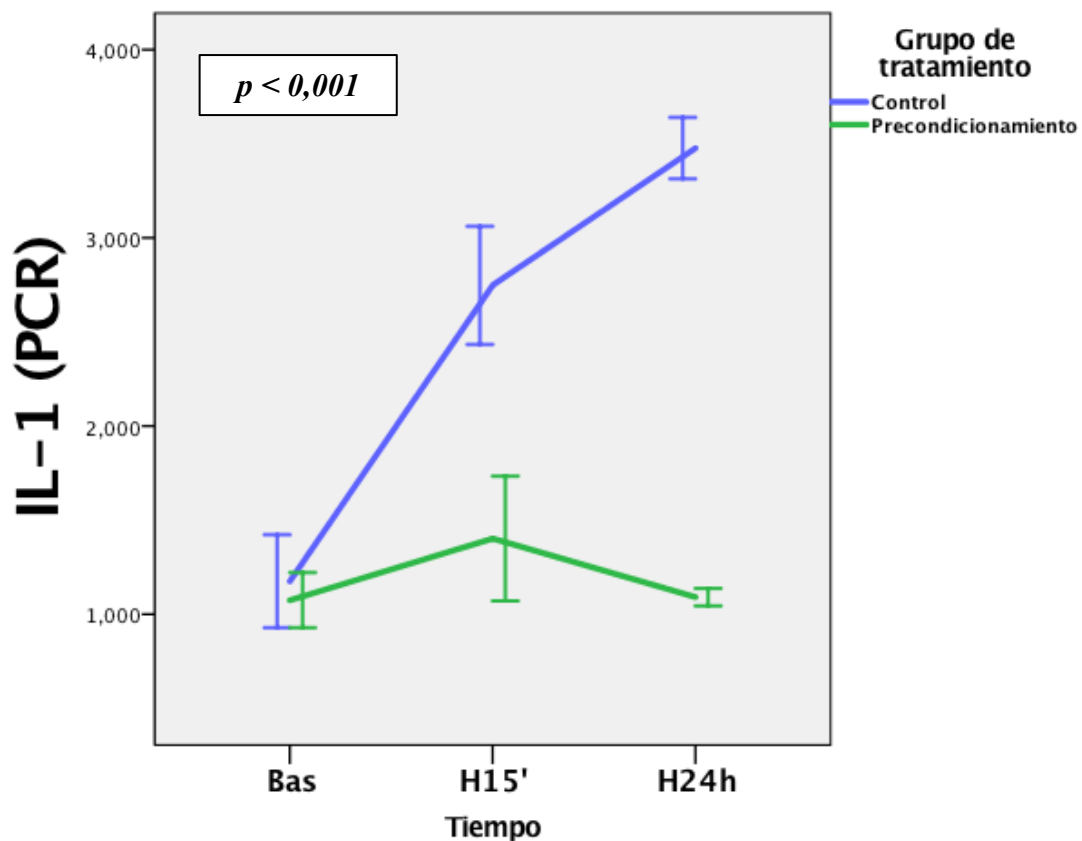


Fig.25.-Evolución de la IL-1 de ambos grupos en los tres momentos del procedimiento, analizado con la técnica de PCR (los resultados aparecen expresados como media (línea) y error estándar de la media (barras de error)).

6.1.6. Análisis Western Blot de la interleucina-1 (IL-1)

Al estudiar la IL-1 respecto al modelo de SFFS, vemos cómo presenta un patrón similar tanto si lo medimos con PCR como con WB. Encontramos un pico importante en H15' ($p < 0,001$), hasta el máximo de sus niveles en H24h ($p < 0,001$).

Sin embargo, las diferencias entre ambos grupos obtenidas en la IL-1 analizada con la técnica de Western-Blot no fueron significativas ($p = 0,131$). Tampoco encontramos diferencias significativas al analizar los distintos momentos de la intervención por separado (Bas, $p = 0,794$; H15', $p = 0,480$; H24h, $p = 0,119$) (**Fig.26. Tabla.2**).

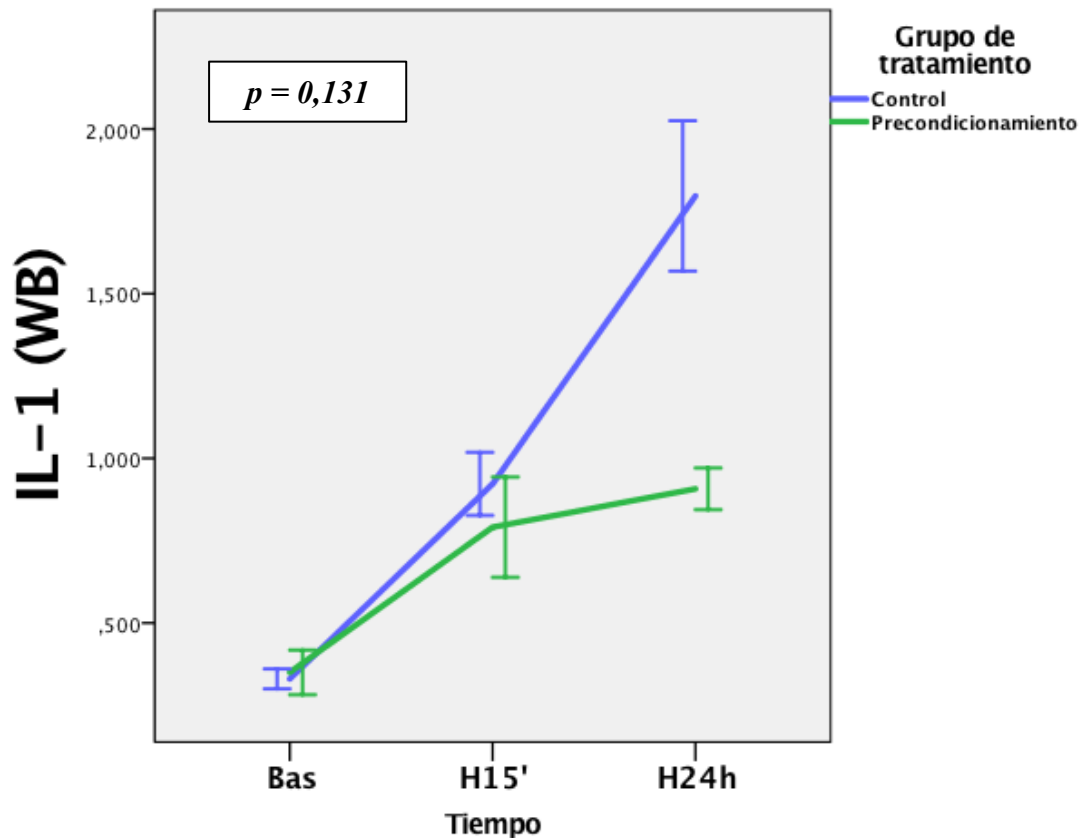


Fig.26.- Evolución de la IL-1 de ambos grupos en los tres momentos del procedimiento, analizado con la técnica de WB (los resultados aparecen expresados como media (línea) y error estándar de la media (barras de error)).

6.1.7. Expresión del ARNm de la interleucina-10 (ARNm IL-10)

Si analizamos la evolución de la IL-10 en el grupo CON, vemos cómo se mantiene estable durante todo el procedimiento, sin encontrar diferencias estadísticamente significativas entre los distintos momentos, con unos valores similares en todos ellos ($p=0,845$ y $p=0,887$).

La expresión del ARNm de la IL-10 no fue diferente en ambos grupos durante el experimento ($p=0,550$). Al analizar los distintos momentos por separado, encontramos

diferencias a las 24 horas de la cirugía ($p=0,039$), con un valor de ARNm de IL-10 menor en el grupo PREC $1,003\pm 0,012$, que en el grupo CON $1,204\pm 0,059$. (Fig.27. Tabla.2).

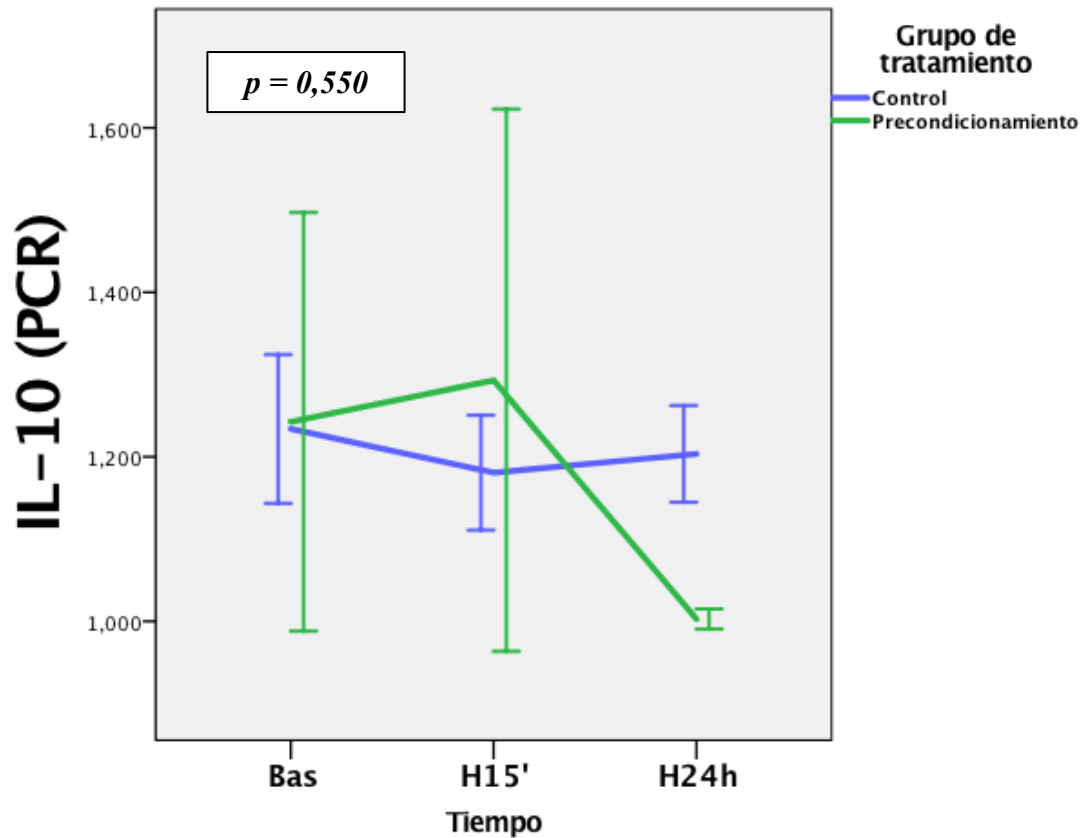


Fig.27.-Evolución de la IL-10 de ambos grupos en los tres momentos del procedimiento, analizado con la técnica de PCR (los resultados aparecen expresados como media (línea) y error estándar de la media (barras de error)).

6.1.8. Análisis Western Blot de la interleucina-10 (IL-10)

Al analizar la influencia del SFFS en la IL-10 medida con la técnica WB apreciamos una disminución progresiva en sus valores, tanto en H15' ($p=0,099$), como en H24h, siendo a las 24 horas de la hepatectomía, estadísticamente significativo ($p=0,001$).

Las diferencias entre el grupo CON y el grupo PREC obtenidas en la IL-10 analizadas con la técnica de Western-Blot, tampoco fueron significativas a lo largo de experimento ($p=0,919$). Tampoco encontramos diferencias significativas al analizar los distintos momentos de la intervención por separado (Bas, $p=0,811$; H15', $p=0,981$; H24h, $p=0,344$) (Fig.28. Tabla 2).

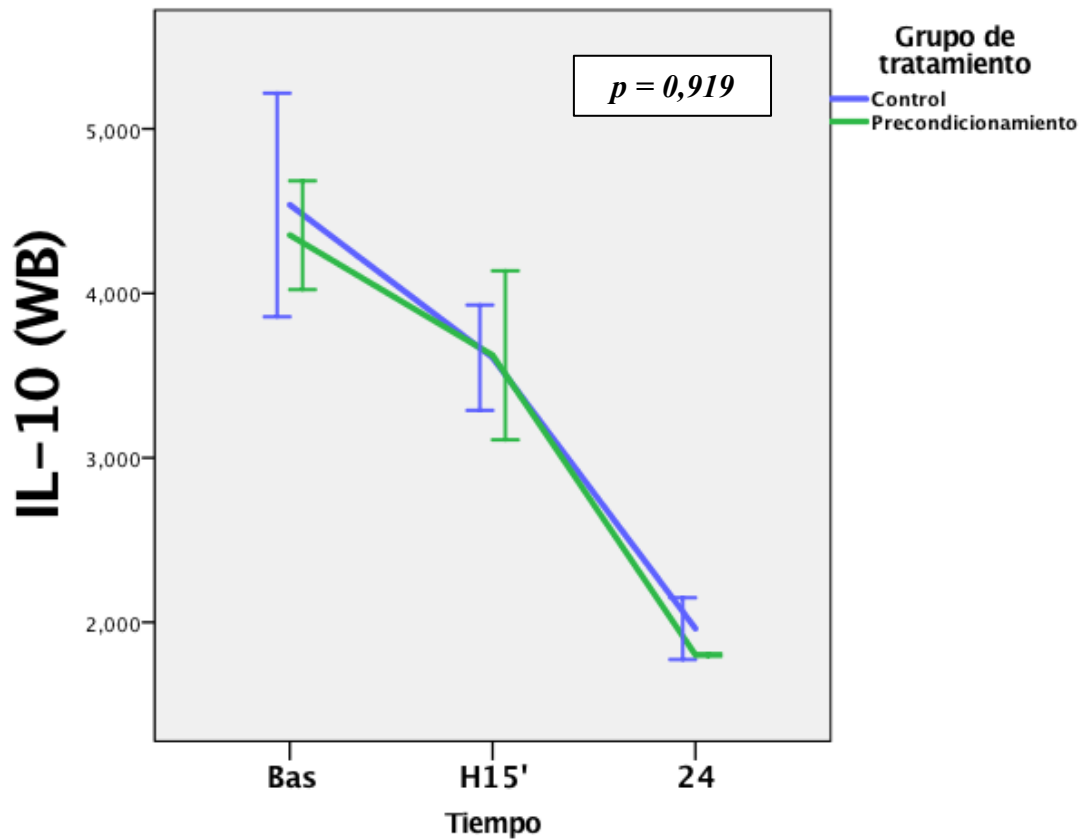


Fig.28.-Evolución de la IL-10 de ambos grupos en los tres momentos del procedimiento, analizado con la técnica de WB (los resultados aparecen expresados como media (línea) y error estándar de la media (barras de error)).

6.1.9. Análisis Western Blot de la interleucina-4 (IL-4).

Respecto a la acción del SFFS en la IL-4, vemos cómo esta citoquina disminuye progresivamente en el grupo CON tanto en H15' como en H24h, siendo en este último momento estadísticamente significativo el descenso ($p=0,042$).

Del mismo modo, la IL-4 disminuyó según avanzaba el procedimiento de forma similar en ambos grupos ($p=0,816$), sin encontrar diferencias estadísticas en ninguno de los momentos del procedimiento (**Fig.29. Tabla 2**).

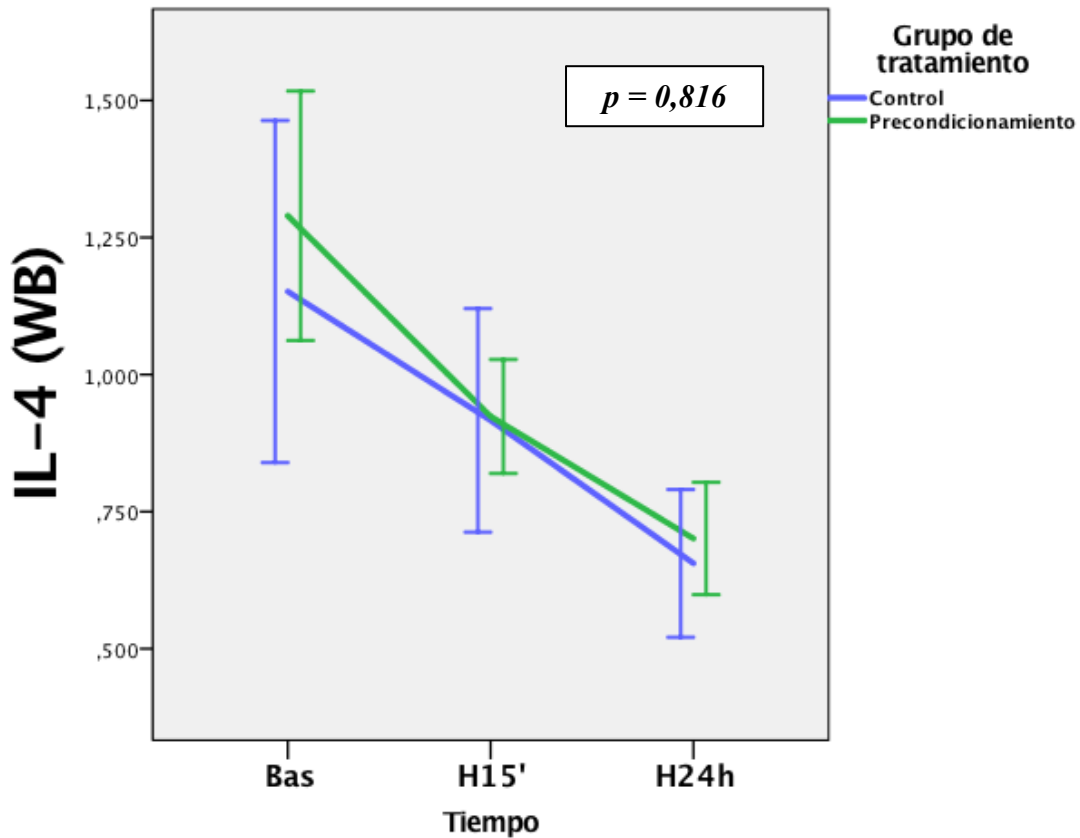


Fig.29.-Evolución de la IL-4 de ambos grupos en los tres momentos del procedimiento, analizado con la técnica de WB (los resultados aparecen expresados como media (línea) y error estándar de la media (barras de error)).

6.1.10. Análisis Western Blot de la interleucina-5 (IL-5).

Al aplicar el modelo del SFFS, vemos cómo la IL-5 disminuye inicialmente, para luego presentar un ligero aumento, aunque sin alcanzar los valores iniciales. No hubo diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los dos momentos.

La IL-5 presentó un comportamiento similar en ambos grupos a lo largo del procedimiento ($p=0,916$), sin encontrar diferencias estadísticas en ninguno de los momentos del procedimiento (**Fig.30. Tabla 2**).

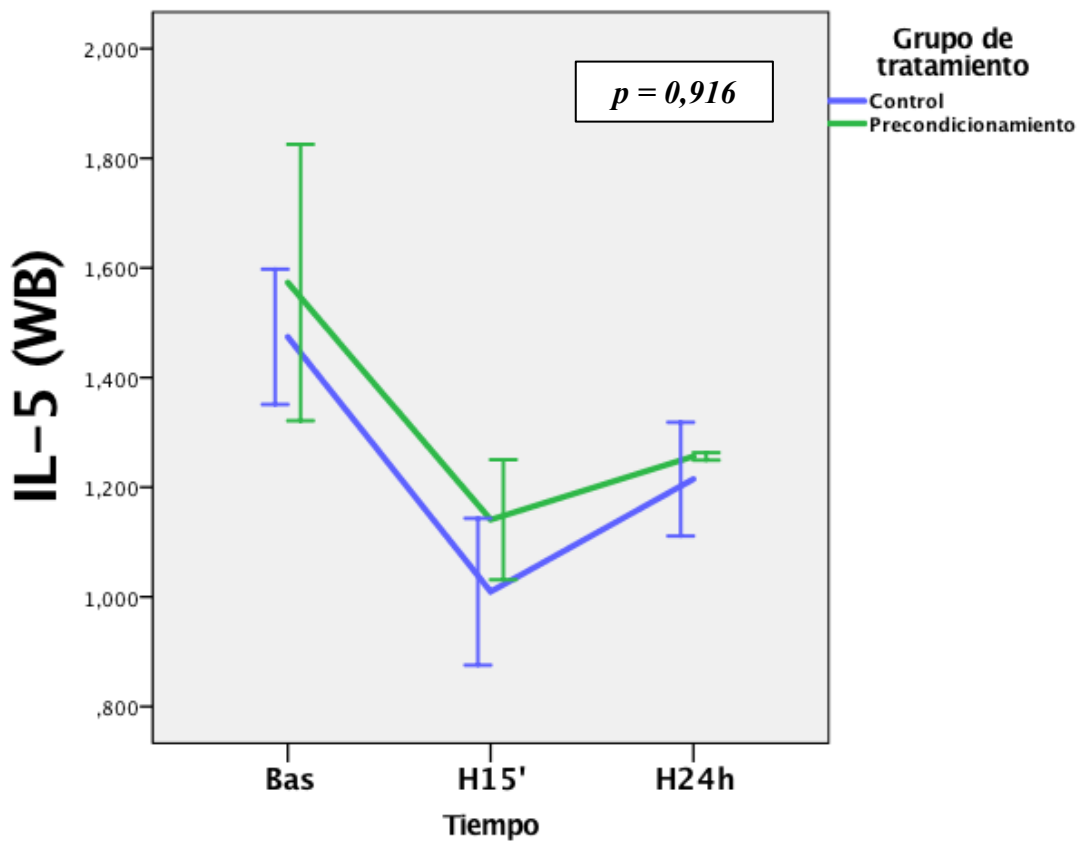


Fig.30.-Evolución de la IL-5 de ambos grupos en los tres momentos del procedimiento, analizado con la técnica de WB (los resultados aparecen expresados como media (línea) y error estándar de la media (barras de error)).

6.1.11. Análisis Western Blot de la interleucina-6 (IL-6).

Al analizar la gráfica que crea el SFFS en la IL-6, vemos cómo aumenta moderadamente en H15', permaneciendo estable en el seguimiento, sin encontrar diferencias estadísticamente significativas.

La IL-6 presentó también, un comportamiento similar en ambos grupos a lo largo del procedimiento ($p=0,886$), sin encontrar diferencias estadísticas en ninguno de los momentos del procedimiento (**Fig.31. Tabla 2**).

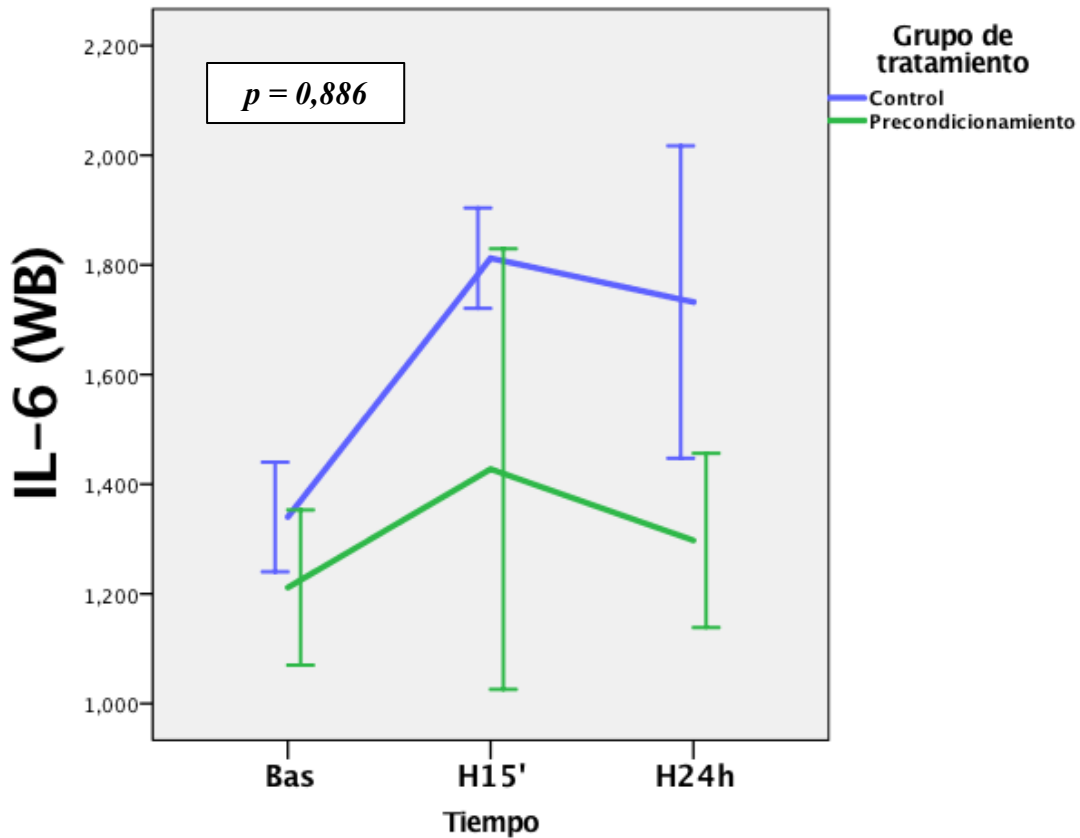


Fig.31.-Evolución de la IL-6 de ambos grupos en los tres momentos del procedimiento, analizado con la técnica de WB (los resultados aparecen expresados como media (línea) y error estándar de la media (barras de error)).

6.1.12. Análisis Western Blot de la interleucina-8 (IL-8).

Al analizar el comportamiento de la IL-8, encontramos en el grupo CON un rápido crecimiento en H15' ($p < 0,001$), que continúa, aunque de menor envergadura, en H24' ($p < 0,001$).

La IL-8 sí presentó diferencias estadísticas en ambos grupos a lo largo del procedimiento ($p < 0,001$), siendo las diferencias patentes tanto una vez terminada la hepatectomía ($p < 0,001$), como a las 24 horas de la cirugía ($p = 0,022$). En estos dos momentos, vemos como el grupo CON presenta un aumento progresivo de la IL-8, mientras que el “Precondicionamiento regenerativo” atenúa de forma significativa este aumento, por lo que el grupo PREC presenta valores similares a lo largo de todo el procedimiento (**Fig.32. Tabla 2**).

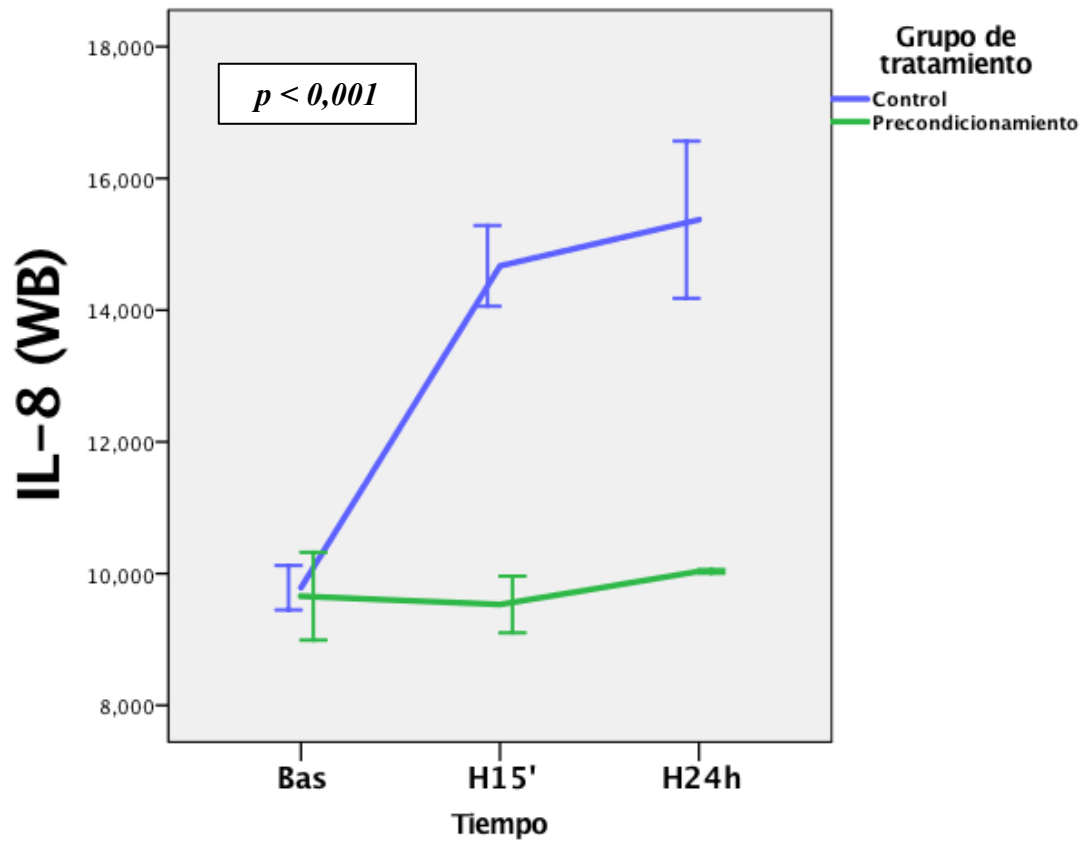


Fig.32.-Evolución de la IL-8 de ambos grupos en los tres momentos del procedimiento, analizado con la técnica de WB (los resultados aparecen expresados como media (línea) y error estándar de la media (barras de error)).

Variable	Grupo	Momento					P'
		Bas	P* (Bas-H15')	H15'	P* (Bas-H24h)	H24h	
TNF α (PCR) (arbit. units)	CON	0,447 \pm 0,111	0,019	0,743 \pm 0,055	<0,001	1,877 \pm 0,229	0'064
	PREC	0,472 \pm 0,058	0,007	0,820 \pm 0,090	0,051	1,070 \pm 0,049	
	P''	0'840		0'473		0'030	
TNF α (WB) (DO/mm ²)	CON	0,299 \pm 0,043	<0,001	0,845 \pm 0,123	<0,001	1,772 \pm 0,232	0'012
	PREC	0,338 \pm 0,058	0,001	0,831 \pm 0,074	0,373	0,569 \pm 0,036	
	P''	0'593		0'919		0'006	
MCP-1 (PCR) (arbit. units)	CON	0,868 \pm 0,103	0,517	0,987 \pm 0,132	0,002	1,962 \pm 0,225	0'135
	PREC	0,964 \pm 0,138	0,79	1,013 \pm 0,136	0,279	1,001 \pm 0,003	
	P''	0'585		0'893		0'083	
MCP-1 (WB) (DO/mm ²)	CON	0,931 \pm 0,082	0,26	1,093 \pm 0,087	<0,001	1,705 \pm 0,104	0'002
	PREC	0,729 \pm 0,058	0,329	0,868 \pm 0,131	0,613	0,648 \pm 0,084	
	P''	0'067		0'180		<0'001	
IL-1 (PCR) (arbit. units)	CON	1,175 \pm 0,247	<0,001	2,748 \pm 0,314	<0,001	3,477 \pm 0,163	<0'001
	PREC	1,074 \pm 0,146	0,3	1,402 \pm 0,332	0,899	1,091 \pm 0,047	
	P''	0'724		0'010		<0'001	
IL-1 (WB) (DO/mm ²)	CON	0,330 \pm 0,030	<0,001	0,922 \pm 0,956	<0,001	1,797 \pm 0,228	0'131
	PREC	0,350 \pm 0,068	0,002	0,791 \pm 0,152	0,029	0,907 \pm 0,063	
	P''	0'794		0'480		0'119	
IL-10 (PCR) (arbit. units)	CON	1,234 \pm 0,091	0,845	1,181 \pm 0,070	0,887	1,204 \pm 0,059	0'550
	PREC	1,243 \pm 0,255	0,853	1,293 \pm 0,330	0,25	1,003 \pm 0,012	
	P''	0'975		0'743		0'039	
IL-10 (WB) (DO/mm ²)	CON	4,538 \pm 0,680	0,099	3,609 \pm 0,320	0,001	1,962 \pm 0,188	0'919
	PREC	4,353 \pm 0,331	0,185	3,623 \pm 0,514	0,001	1,802 \pm 0,008	
	P''	0'811		0'981		0'344	
IL-4 (WB) (DO/mm ²)	CON	1,152 \pm 0,312	0,224	0,917 \pm 0,204	0,042	0,656 \pm 0,135	0'816
	PREC	1,289 \pm 0,227	0,069	0,924 \pm 0,104	0,011	0,701 \pm 0,103	
	P''	0'727		0'976		0'746	
IL-5 (WB) (DO/mm ²)	CON	1,474 \pm 0,123	0,053	1,009 \pm 0,134	0,24	1,215 \pm 0,104	0'916
	PREC	1,573 \pm 0,252	0,069	1,141 \pm 0,110	0,169	1,256 \pm 0,007	
	P''	0'730		0'462		0'881	
IL-6 (WB) (DO/mm ²)	CON	1,340 \pm 0,100	0,221	1,812 \pm 0,091	0,087	1,732 \pm 0,284	0'886
	PREC	1,211 \pm 0,142	0,566	1,428 \pm 0,402	0,208	1,298 \pm 0,159	
	P''	0'473		0'369		0'800	
IL-8 (WB) (DO/mm ²)	CON	9,786 \pm 0,339	<0,001	14,671 \pm 0,612	<0,001	15,372 \pm 1,193	<0'001
	PREC	9,657 \pm 0,666	0,821	9,530 \pm 0,430	0,678	10,034 \pm 0,027	
	P''	0'866		<0'001		0'022	

Tabla 2: Los datos de los diferentes valores de TNF- α , MCP-1, IL-1, IL-10, IL-4, IL-5, IL-6 e IL-8 aparecen expresados como media +/- error estándar de la media, en los tres momentos del procedimiento: Bas, H15 y H24h. Para cada variable aparece la diferencia global entre ambos grupos comparada con el modelo lineal mixto (P'), la diferencia intergrupo en cada momento concreto del procedimiento (P'') y las diferencias intragrupo (P*), comparando según indican las columnas los momentos Bas con H15' y Bas con H24h. En cursiva aparecen todos los valores de P, y en negrita, a su vez, aquellos que son estadísticamente significativos.

6.2. Caspasas en el Síndrome de “Small-For-Flow” y el “Precondicionamiento regenerativo”

La Caspasa-3 la analizamos mediante la técnica de WB tanto en su forma de pro-caspasa, es decir, el precursor inactivo, como en su forma activada.

Analizamos primeramente los cambios que se producen en estas moléculas a lo largo del procedimiento al aplicar el modelo de SFFS (grupo CON). Vemos cómo tanto la Caspasa-3 como la Caspasa-3-activada, presentan en H15' unos valores similares que al inicio del procedimiento (Bas), y cómo se produce un pico en H24'. Sin ser estas diferencias estadísticamente significativas para la Caspasa-3 ($p=0,143$), pero sí siéndolo para la Caspasa-3-activada ($p=0,011$).

La Caspasa-3, en su forma inactiva, no mostró diferencias entre ambos grupos a lo largo del procedimiento ($p=0,887$). Sin embargo, la Caspasa-3-activada mostró diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos ($p=0,038$), basadas especialmente en la diferencia a las 24 horas de ambos grupos ($p=0,022$). Ya que en este momento comprobamos cómo frente al importante ascenso de la Caspasa-3-activada en el grupo CON, en el grupo PREC estos valores permanecen estables a lo largo de todo el procedimiento, siendo en H24h muy similares tanto al momento H15' como al Bas (**Fig.33. Tabla 3**).

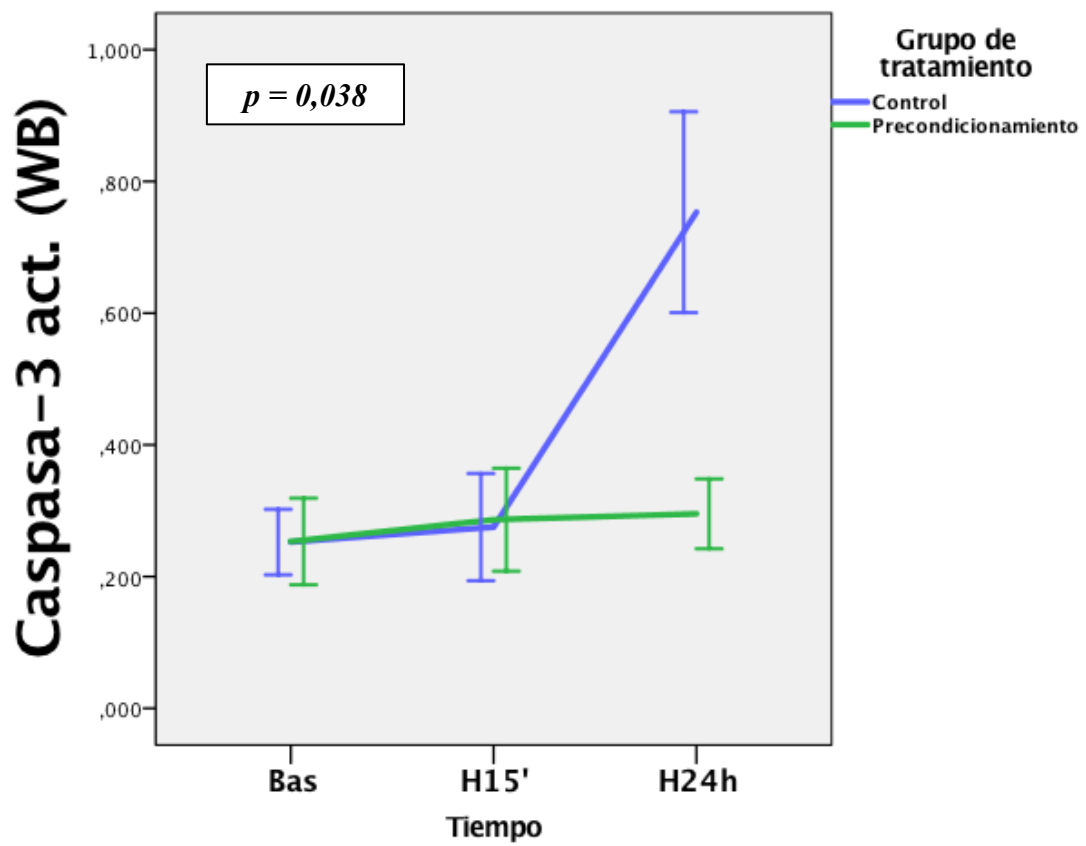
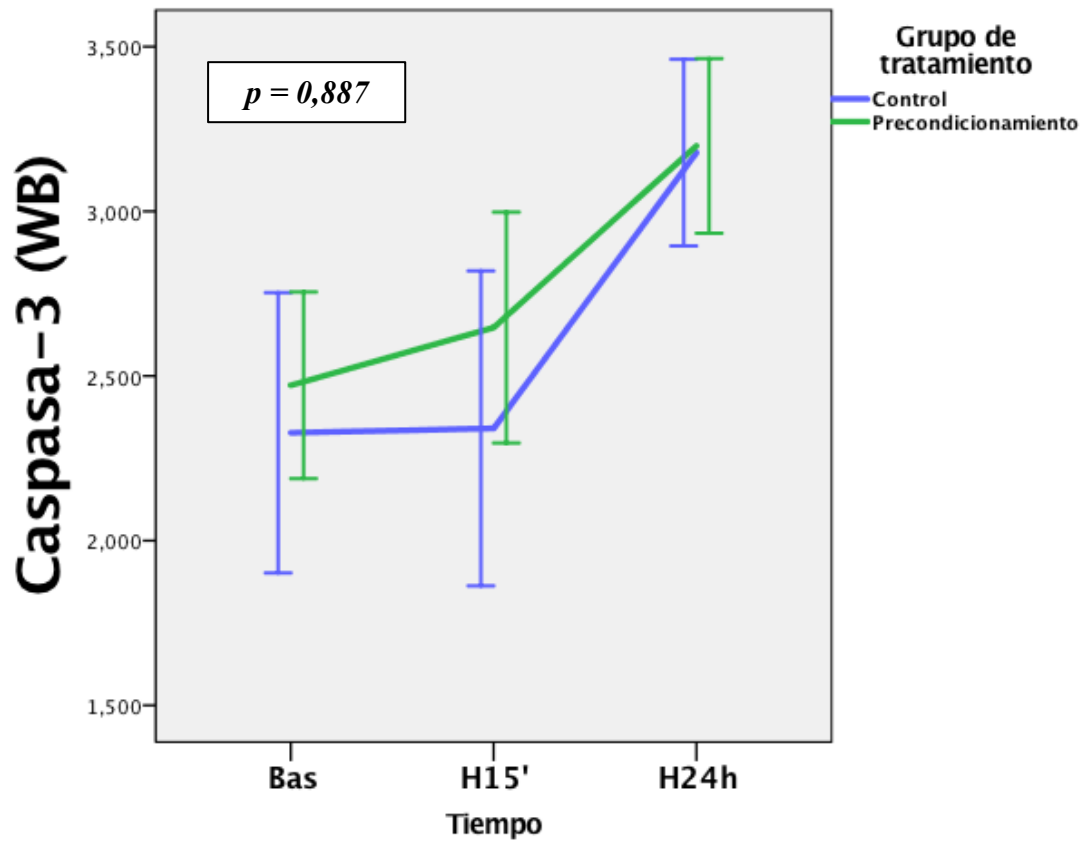


Fig.33.-Evolución de la Caspasa-3 y la Caspasa-3-activada de ambos grupos en los tres momentos del procedimiento, analizado con la técnica de WB (los resultados aparecen expresados como media (línea) y error estándar de la media (barras de error)).

Variable	Grupo	Momento					P'
		Bas	<i>P*</i> (Bas-H15')	H15'	<i>P*</i> (Bas-H24h)	H24h	
Casp 3 (WB) (DO/mm2)	CON	2,328 ± 0,425	<i>0,982</i>	2,341 ± 0,478	<i>0,143</i>	3,178 ± 0,283	<i>0'887</i>
	PREC	2,472 ± 0,283	<i>0,769</i>	2,647 ± 0,350	<i>0,202</i>	3,199 ± 0,265	
	<i>P''</i>	<i>0'785</i>		<i>0'619</i>		<i>0'959</i>	
Casp 3 act (WB) (DO/mm2)	CON	0,252 ± 0,050	<i>0,837</i>	0,275 ± 0,081	<i>0,011</i>	0,753 ± 0,152	<i>0'038</i>
	PREC	0,253 ± 0,066	<i>0,766</i>	0,286 ± 0,078	<i>0,788</i>	0,295 ± 0,053	
	<i>P''</i>	<i>0'991</i>		<i>0'923</i>		<i>0'022</i>	

Tabla3: Los datos de los diferentes valores de la Caspasa 3 y la Caspasa 3 activada aparecen expresados como media +/- error estándar de la media, en los tres momentos del procedimiento: Bas, H15' y H24h. Para cada variable aparece la diferencia global entre ambos grupos comparada con el modelo lineal mixto (*P'*), la diferencia intergrupo en cada momento concreto del procedimiento (*P''*) y las diferencias intragrupo (*P**), comparando según indican las columnas los momentos Bas con H15' y Bas con H24h. En cursiva aparecen todos los valores de *P*, y en negrita, a su vez, aquellos que son estadísticamente significativos.

6.3. Metabolismo del óxido nítrico en el Síndrome de “Small-For-Flow” y el “Precondicionamiento regenerativo”

6.3.1. Expresión del ARNm de la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (ARNm eNOS)

Los valores del ARNm de la enzima eNOS en el grupo CON, presentan un leve ascenso no significativo en H15' y a las 24 horas disminuyen de forma importante ($p=0,001$).

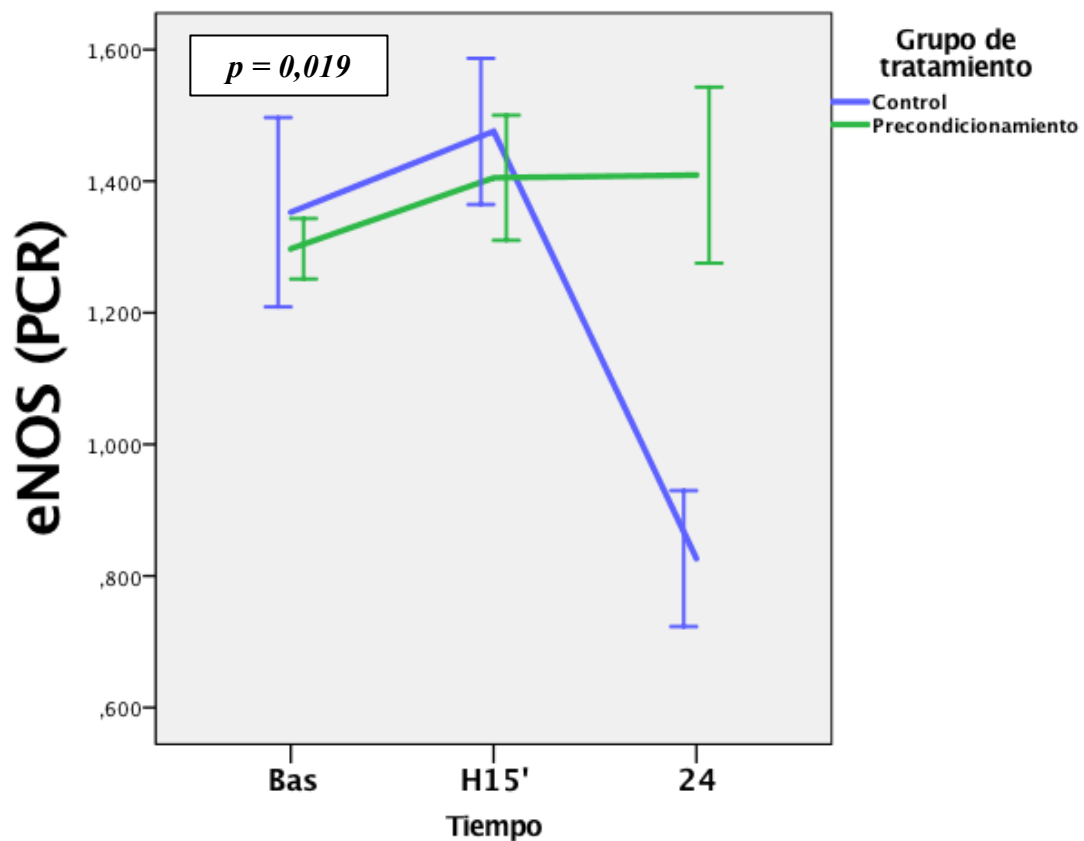


Fig.34.-Evolución de la eNOS de ambos grupos en los tres momentos del procedimiento, analizado con la técnica de PCR (los resultados aparecen expresados como media (línea) y error estándar de la media (barras de error)).

La expresión del ARNm de la eNOS presenta diferencias significativas en ambos grupos ($p=0,019$), siendo las diferencias especialmente notables a las 24 horas de la cirugía ($p=0,008$), donde vemos cómo el grupo PREC obtiene unos valores similares a H15', y sin embargo en el grupo CON estos valores descienden de forma significativa (**Fig.34. Tabla 4**).

6.3.2. Análisis Western Blot de la enzima óxido nítrico sintasa (eNOS)

Respecto al análisis por WB de la eNOS, la imagen en el gráfico es similar a la de su expresión de ARNm. El SFFS produce un descenso progresivo de los valores de eNOS, con una diferencia significativa en H24h ($p=0,001$).

Existe una diferencia muy significativa entre grupos comparándolos mediante el análisis de modelos mixtos ($p<0,001$). La diferencia se debe principalmente a la diferencia intragrupo a las 24 horas tras la intervención (Bas, $p=0,803$; H15', $p=0,568$; H24h, $p<0,001$) (**Fig.35. Tabla 4**).

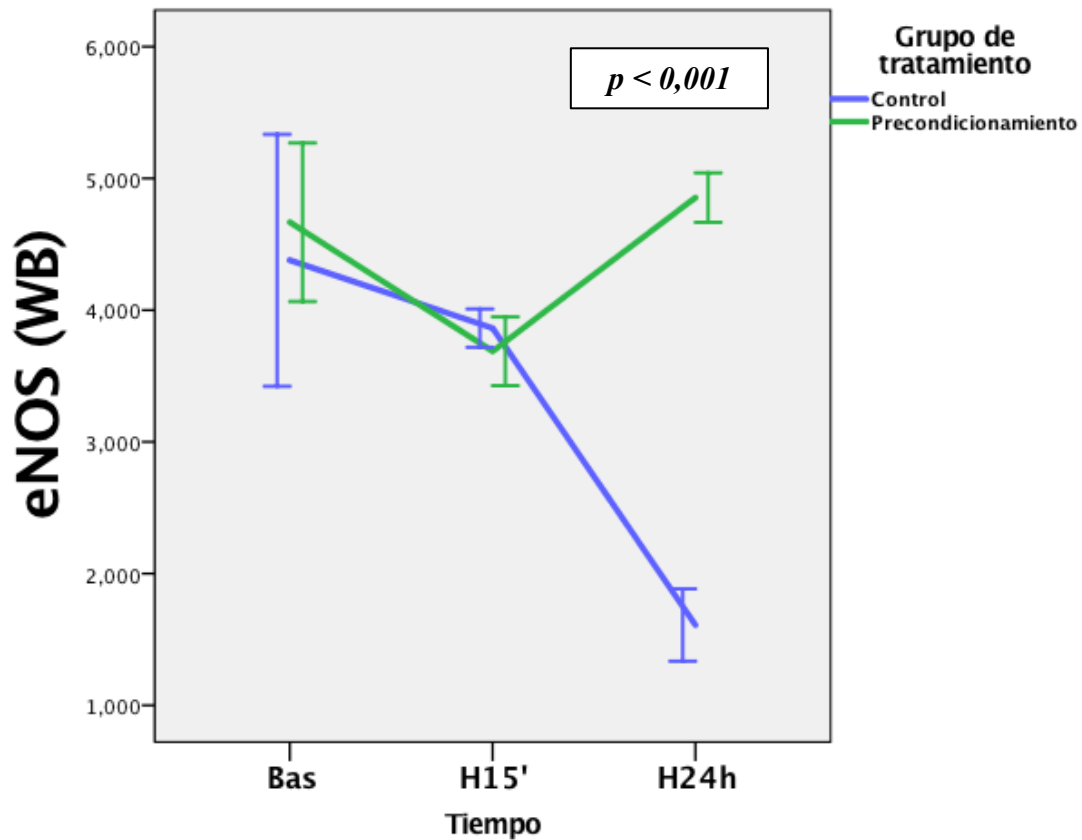


Fig.35.-Evolución de la eNOS de ambos grupos en los tres momentos del procedimiento, analizado con la técnica de WB (los resultados aparecen expresados como media (línea) y error estándar de la media (barras de error)).

6.3.3. Expresión del ARNm de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (ARNm iNOS)

El SFFS produjo un aumento de los valores en H15' ($p=0,023$), que posteriormente descienden hasta ser similares a los niveles iniciales ($p=0,477$).

La expresión del ARNm de la enzima iNOS no mostró diferencias en ambos grupos ($p=0,187$), tampoco si analizamos los 3 momentos del procedimiento de forma individual (Bas, $p=0,374$; H15', $p=0,438$; H24h, $p=0,166$) (**Fig.36. Tabla 4**).

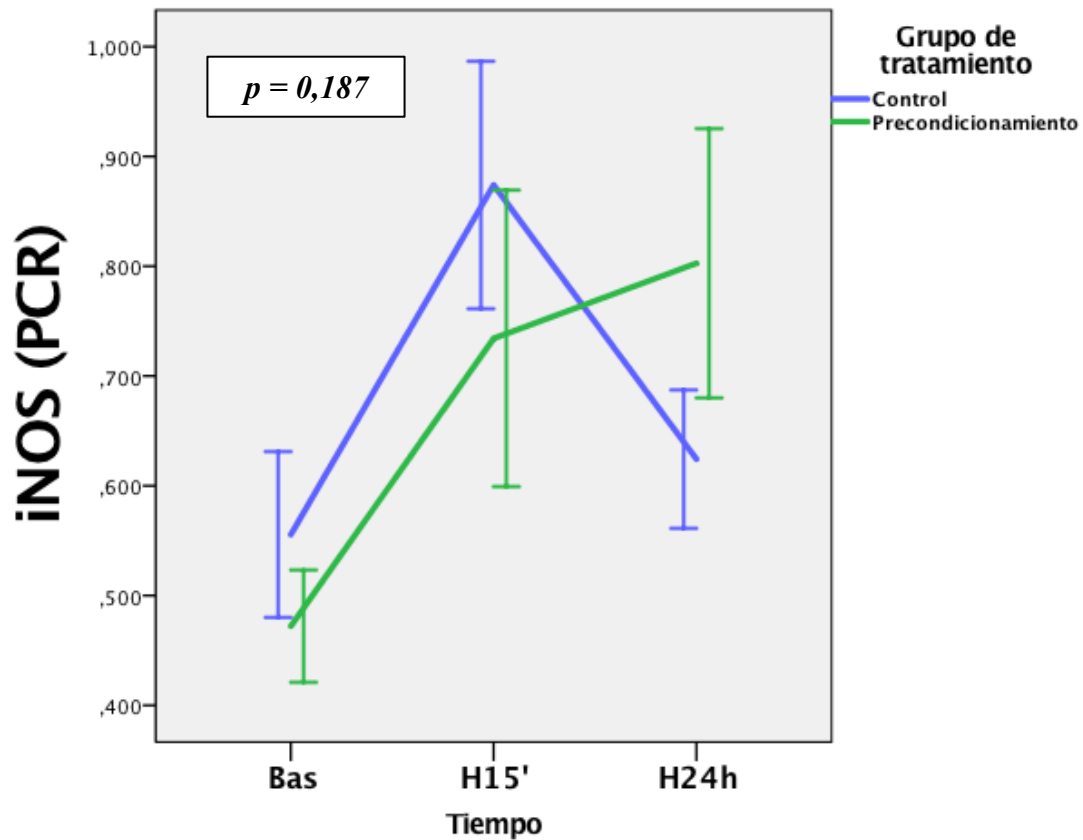


Fig.36.-Evolución de la iNOS de ambos grupos en los tres momentos del procedimiento, analizado con la técnica de PCR (los resultados aparecen expresados como media (línea) y error estándar de la media (barras de error)).

6.3.4. Análisis Western Blot de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS)

La iNOS medida con WB mostró un ascenso progresivo de sus valores en el grupo CON, con diferencias estadísticamente significativas en H24h ($p=0.038$).

La iNOS tampoco mostró diferencias durante el experimento en los dos grupos cuando la analizamos mediante WB ($p=0.127$). Y al igual que cuando la analizábamos con la PCR,

no mostró diferencias en ninguno de los momentos del procedimiento (Bas, $p=0,518$; H15', $p=0,259$; H24h, $p=0,166$) (Fig.37. Tabla 4).

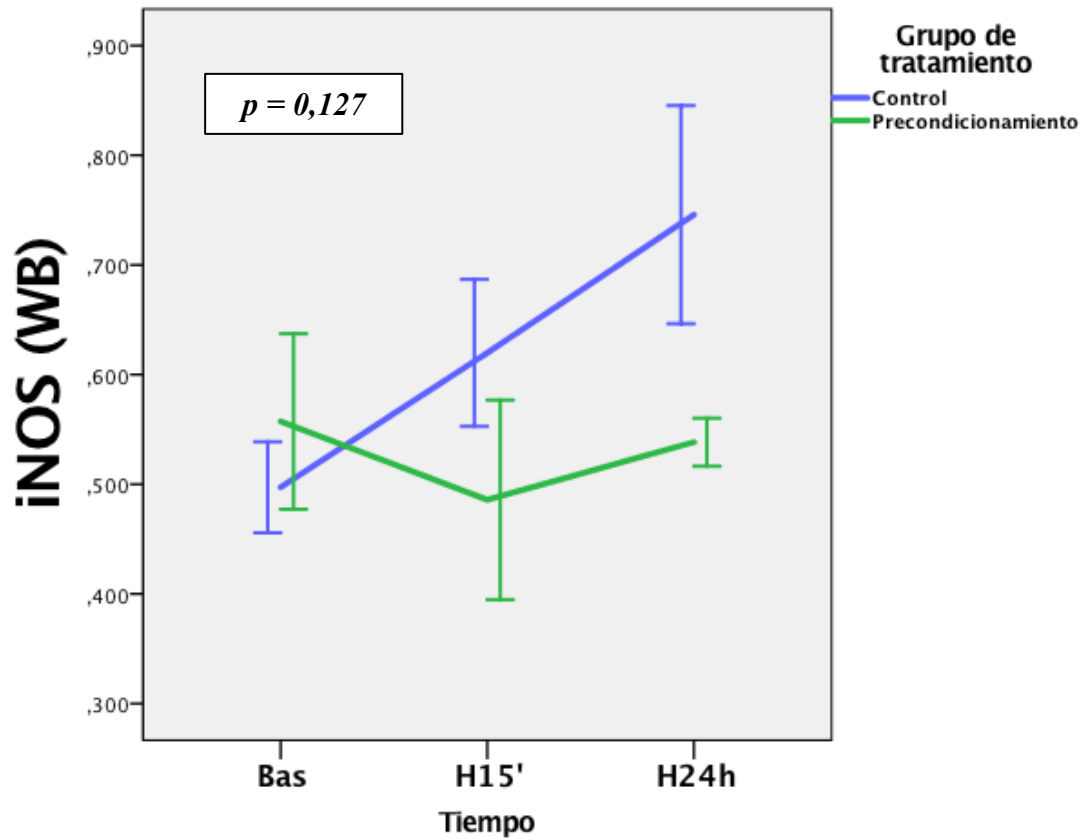


Fig.37.-Evolución de la iNOS de ambos grupos en los tres momentos del procedimiento, analizado con la técnica de WB (los resultados aparecen expresados como media (línea) y error estándar de la media (barras de error)).

Variable	Grupo	Momento					P'
		Bas	P* (Bas-H15')	H15'	P* (Bas-H24h)	H24h	
eNOS (PCR) (arbitrary units)	CON	1,353 ± 0,144	0,488	1,476 ± 0,111	0,001	0,826 ± 0,103	0'019
	PREC	1,297 ± 0,046	0,542	1,405 ± 0,095	0,588	1,409 ± 0,134	
	P''	0'718		0'636		0'008	
eNOS (WB) (DO/mm2)	CON	4,379 ± 0,956	0,52	3,863 ± 0,145	0,001	1,609 ± 0,274	<0'001
	PREC	4,667 ± 0,602	0,232	3,688 ± 0,261	0,867	4,854 ± 0,188	
	P''	0'803		0'568		<0'001	
iNOS (PCR) (arbitrary units)	CON	0,555 ± 0,075	0,023	0,874 ± 0,113	0,477	0,624 ± 0,063	0'187
	PREC	0,472 ± 0,051	0,055	0,734 ± 0,135	0,014	0,803 ± 0,123	
	P''	0'374		0'438		0'166	
iNOS (WB) (DO/mm2)	CON	0,497 ± 0,042	0,08	0,620 ± 0,067	0,038	0,746 ± 0,099	0'127
	PREC	0,557 ± 0,080	0,287	0,486 ± 0,091	0,883	0,538 ± 0,022	
	P''	0'518		0'259		0'166	

Tabla 4: Los datos de los diferentes valores de eNOS e iNOS medidos ambos con PCR y WB, aparecen expresados como media +/- error estándar de la media, en los tres momentos del procedimiento: Bas, H15' y H24h. Para cada variable aparece la diferencia global entre ambos grupos comparada con el modelo lineal mixto (P'), la diferencia intergrupo en cada momento concreto del procedimiento (P'') y las diferencias intragrupo (P*), comparando según indican las columnas los momentos Bas con H15' y Bas con H24h. En cursiva aparecen todos los valores de P, y en negrita, a su vez, aquellos que son estadísticamente significativos.

6.4. Metabolismo energético en el Síndrome de “Small-For-Flow” y el “Precondicionamiento regenerativo”

En el análisis del metabolismo energético comenzamos midiendo el ATP, el ADP y el AMP en los distintos momentos del procedimiento, Bas, H15' y H24h. Posteriormente el medimos el ratio ATP:ADP y la carga energética según la fórmula anteriormente mencionada.

Los valores de ATP descienden progresivamente en el grupo CON, de tal forma que vemos cómo el SFFS produce una bajada muy significativa de los valores de ATP en H15' ($p < 0,001$) y mayor aun en H24h ($p < 0,001$). Si comparamos estos datos con el grupo PREC, vemos cómo los valores del ATP descienden en ambos grupos según avanza el proceso, sin embargo, este descenso se ve atenuado en el grupo PREC, siendo la diferencia estadísticamente significativa ($p = 0,027$). Apreciamos un mayor valor de ATP tanto en H15' ($p < 0,001$) como en H24h ($p < 0,001$) (**Fig.38. Tabla 5**).

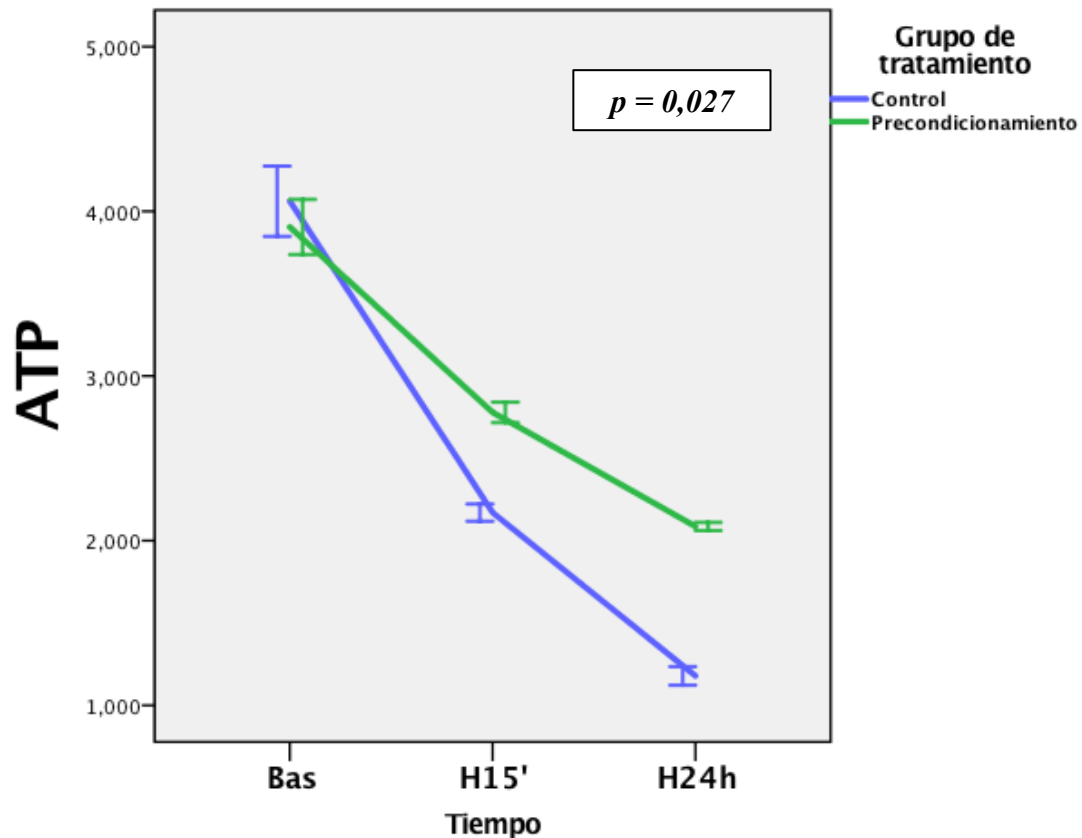


Fig.38.-Evolución del ATP de ambos grupos en los tres momentos del procedimiento (los resultados aparecen expresados como media (línea) y error estándar de la media (barras de error)).

Los valores de ADP, al contrario, aumentan según avanzan las horas tras la cirugía. El desarrollo del grupo CON muestra diferencias estadísticamente significativas en los distintos momentos del procedimiento ($p < 0,001$). Vemos además como al comparar ambos grupos, el aumento de los valores de ADP es menor en el grupo PREC ($p = 0,003$). Esta diferencia es estadísticamente significativa inmediatamente tras realizar la cirugía, en H15' ($p < 0,001$) (Fig.39. Tabla 5).

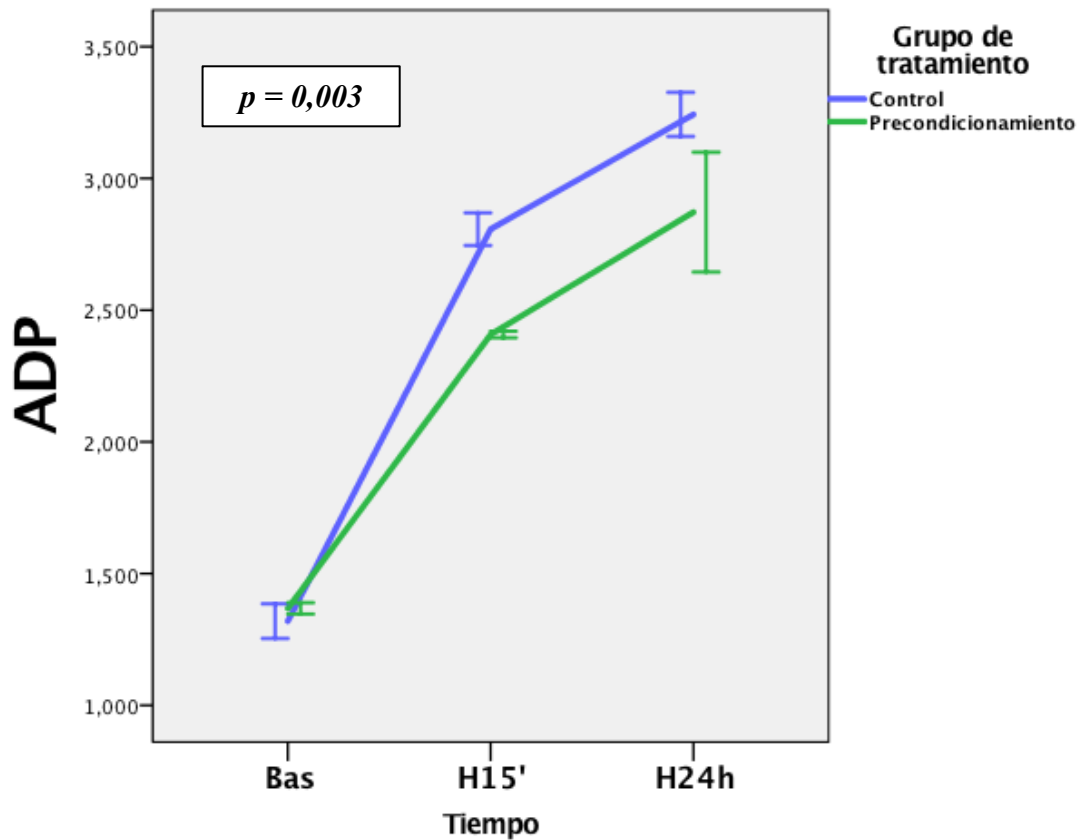


Fig.39.-Evolución del ADP de ambos grupos en los tres momentos del procedimiento (los resultados aparecen expresados como media (línea) y error estándar de la media (barras de error)).

El SFFS produce también un incremento de los niveles de AMP de forma progresiva y estadísticamente significativa según avanza el procedimiento ($p < 0,001$). El “Precondicionamiento regenerativo” atenúa ese aumento en los valores de AMP según avanza el tiempo, con una diferencia muy significativa entre ambos grupos ($p < 0,001$). Es importante reseñar, que encontramos diferencias respecto a los valores de AMP, en todos los momentos del procedimiento, Bas ($p = 0,009$), H15’ ($p = 0,001$) y H24h ($p = 0,001$) (Fig.40. Tabla 5).

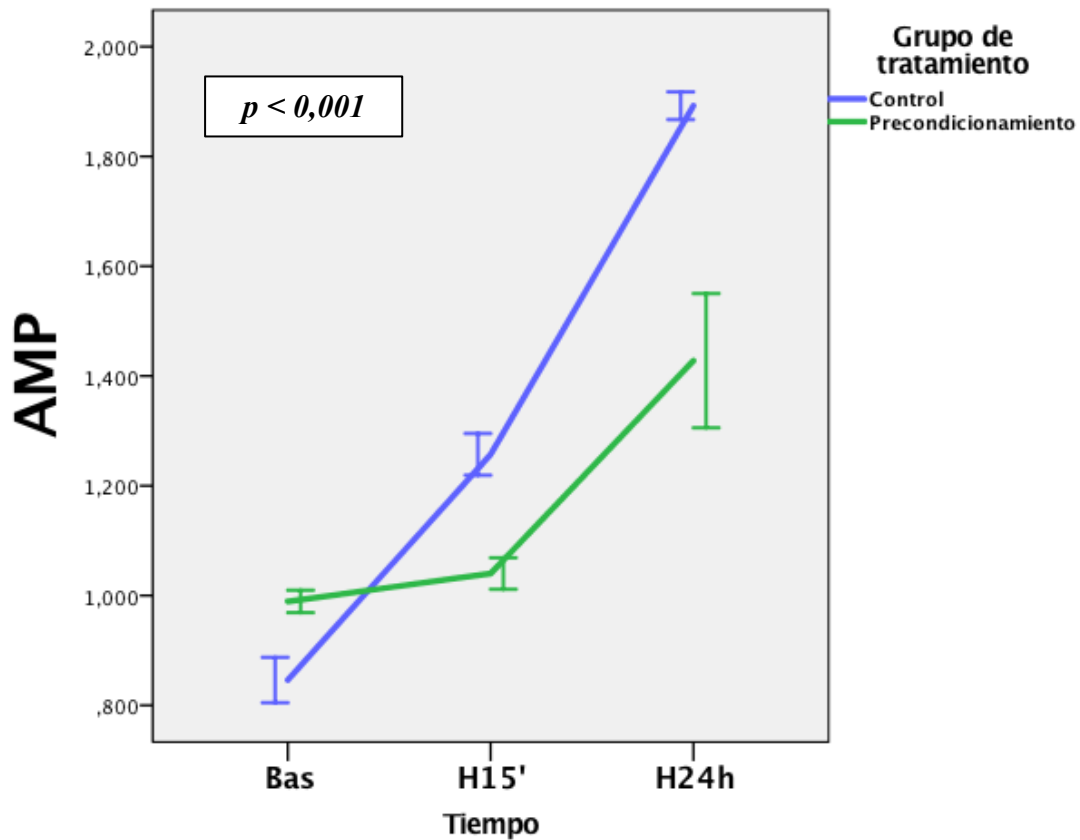


Fig.40.-Evolución del AMP de ambos grupos en los tres momentos del procedimiento (los resultados aparecen expresados como media (línea) y error estándar de la media (barras de error)).

A consecuencia de un descenso de ATP y un aumento de ADP según se desarrolla el procedimiento, como es lógico, el ratio ATP:ADP disminuirá. Al analizar el grupo CON, vemos cómo se produce un descenso progresivo y como los valores en H15' y en H24h son significativamente distintos del valor basal (Bas) ($p < 0,001$). Sin embargo, este descenso se ve atenuado en el grupo PREC. Siendo las diferencias estadísticamente significativas en H15' ($p < 0,001$) y en H24h ($p < 0,001$), pero no en el global del proceso ($p = 0,192$) (Fig.41. Tabla 5).

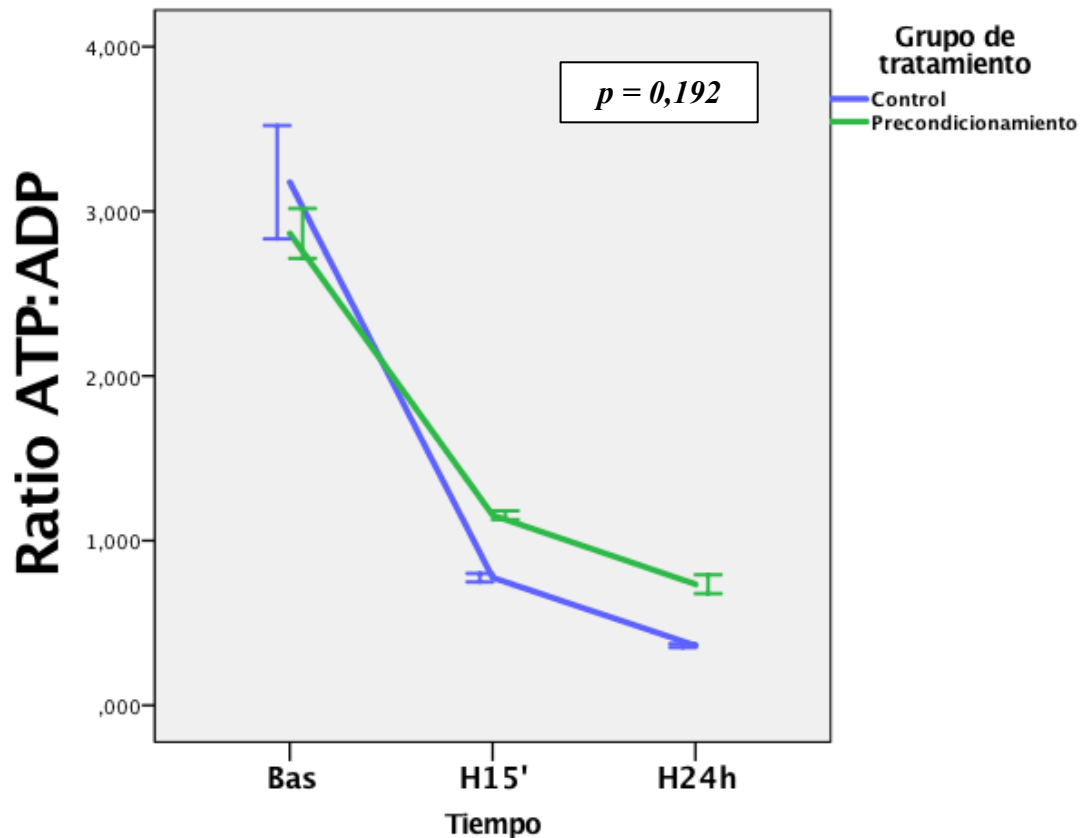


Fig.41.-Evolución del ratio ATP:ADP de ambos grupos en los tres momentos del procedimiento (los resultados aparecen expresados como media (línea) y error estándar de la media (barras de error)).

Al analizar la carga energética después de la hepatectomía de 90% en el grupo CON, apreciamos cómo el SFFS produce una decadencia progresiva de la misma ($p < 0,001$). En la gráfica de la **Fig.41** vemos cómo el “Precondicionamiento regenerativo” favorece un aumento de la carga energética con una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos ($p < 0,001$). Analizando los distintos momentos del procedimiento de forma individual, no encontramos diferencias en el momento Bas ($p = 0,142$), pero sí en H15’ ($p < 0,001$) y en H24h ($p < 0,001$) (**Fig.41. Tabla 5**).

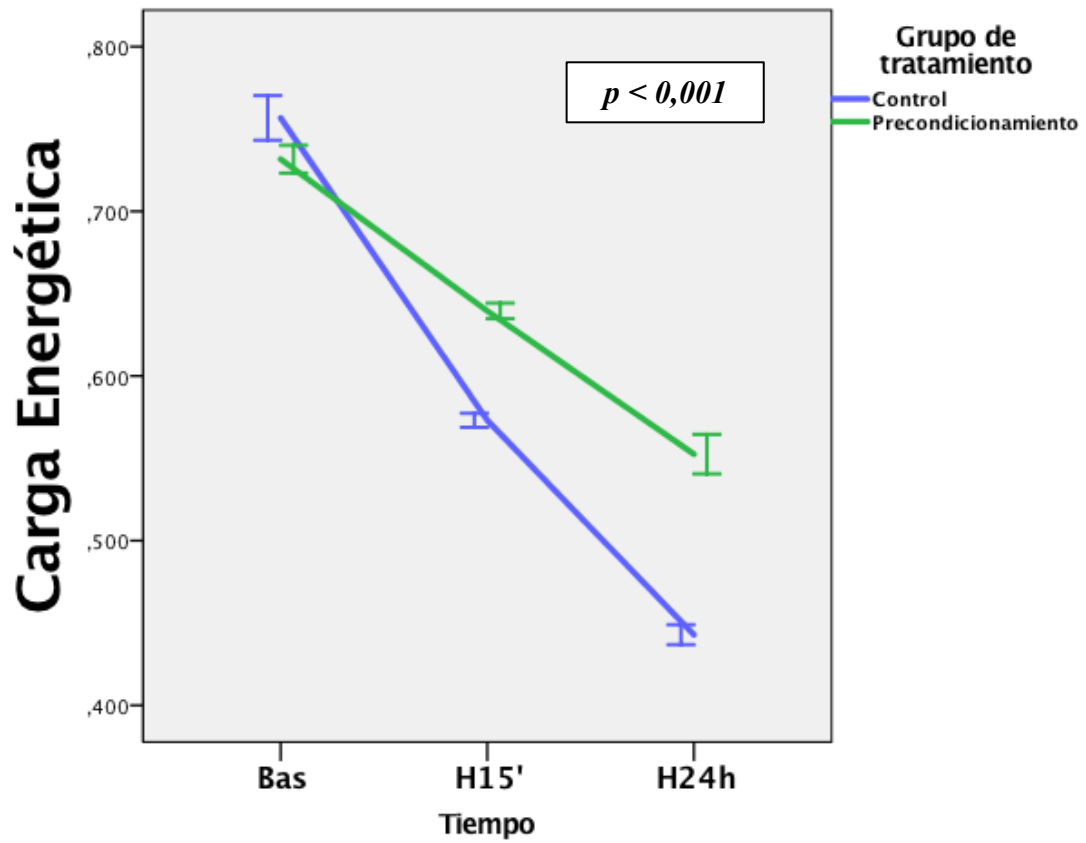


Fig.42.-Evolución de la carga energética de ambos grupos en los tres momentos del procedimiento (los resultados aparecen expresados como media (línea) y error estándar de la media (barras de error)).

Variable	Grupo	Momento					P'
		Bas	P* (Bas-H15')	H15'	P* (Bas-H24h)	H24h	
ATP	CON	4,062 ± 0,213	<0,001	2,170 ± 0,052	<0,001	1,179 ± 0,056	<i>0'027</i>
	PREC	3,904 ± 0,167	<0,001	2,779 ± 0,062	<0,001	2,086 ± 0,025	
	P''	0'573		<0'001		<0'001	
ADP	CON	1,320 ± 0,066	<0,001	2,807 ± 0,062	<0,001	3,243 ± 0,083	<i>0'003</i>
	PREC	1,368 ± 0,021	<0,001	2,407 ± 0,012	<0,001	2,872 ± 0,227	
	P''	0'499		<0'001		0'082	
AMP	CON	0,846 ± 0,041	<0,001	1,257 ± 0,038	<0,001	1,892 ± 0,025	<0'001
	PREC	0,989 ± 0,020	0,257	1,040 ± 0,029	<0,001	1,428 ± 0,122	
	P''	0'009		0'001		0'001	
Ratio ATP:ADP	CON	3,176 ± 0,344	<0,001	0,775 ± 0,026	<0,001	0,363 ± 0,012	<i>0'192</i>
	PREC	2,866 ± 0,151	<0,001	1,155 ± 0,027	<0,001	0,736 ± 0,058	
	P''	0'425		<0'001		<0'001	
Carga energética	CON	0,757 ± 0,014	<0,001	0,573 ± 0,004	<0,001	0,443 ± 0,006	<0'001
	PREC	0,732 ± 0,008	<0,001	0,640 ± 0,005	<0,001	0,553 ± 0,012	
	P''	0'142		<0'001		<0'001	

Tabla 5: Los datos de los diferentes valores de ATP, ADP, AMP, Ratio ATP:ADP y carga energética aparecen expresados como media +/- error estándar de la media, en los tres momentos del procedimiento: Bas, H15' y H24h. Para cada variable aparece la diferencia global entre ambos grupos comparada con el modelo lineal mixto (P'), la diferencia intergrupo en cada momento concreto del procedimiento (P'') y las diferencias intragrupo (P*), comparando según indican las columnas los momentos Bas con H15' y Bas con H24h. En cursiva aparecen todos los valores de P, y en negrita, a su vez, aquellos que son estadísticamente significativos.

7. DISCUSIÓN

7.1. Citocinas en el Síndrome de “Small-For-Flow” y el “Precondicionamiento regenerativo”

La regeneración hepática después de una hepatectomía parcial ha sido ampliamente descrita desde distintos puntos de vista, tanto de la hemodinámica sistémica y hepática, como a nivel analítico y molecular. El “Precondicionamiento regenerativo”, a su vez, ha sido descrito en la literatura a nivel hemodinámico, histológico y analítico. (69)(142) Sin embargo, hasta donde conocemos, el impacto a nivel molecular del “Precondicionamiento regenerativo” no había sido descrito hasta este momento. Consideramos de gran importancia estudiar y entender los mecanismos moleculares de la regeneración hepática después de una hepatectomía precedida de una técnica de “Precondicionamiento regenerativo”, pudiendo de esta manera seguir investigando y avanzando para tratar el SFFS. Esto es relevante, ya que sabemos que la IHPH es la complicación más temida después de una hepatectomía mayor, y aparece desde el 1’2% hasta el 32% de los casos según las series.(158)

Lo que demuestran los resultados de nuestro estudio es que el SFFS se asocia a una potente situación pro-inflamatoria. A este estado inflamatorio se llega mediante un aumento importante en las citocinas pro-inflamatorias (TNF- α , MCP-1, IL-1 e IL-8) y una disminución en las citocinas anti-inflamatorias (IL-10 e IL-4). Ante esta situación, nuestros resultados muestran cómo el preconditionamiento causa una reducción significativa en la mayoría de las citoquinas proinflamatorias estudiadas. Vemos a su vez, como la disminución en los valores de esas citoquinas es mucho mayor 24 horas después de la hepatectomía subtotal, llegando así a reducir el estado inflamatorio causado por la resección.

En nuestro modelo hemos diseñado dos grupos de animales, realizando a los dos una hepatectomía subtotal. Careciendo, por tanto, de un grupo “sham” o con laparotomía en blanco. Sin embargo, estudios previos que compararon hepatectomías con laparotomías en blanco (“sham”), demostraron que el patrón de secreción de citoquinas después de una hepatectomía parcial es específico del proceso de regeneración hepática y no debido al insulto producido únicamente por someter al animal a un procedimiento quirúrgico. (159)

La IL-1 y el TNF- α representan las citocinas pro-inflamatorias características que se liberan rápidamente en respuesta al daño tisular.(160)(161) Son de hecho, estas dos citocinas, las que muestran un aumento más significativo después de la hepatectomía del 90% en nuestro estudio, obteniendo en ambas valores estadísticos de $p < 0,001$

7.1.1. TNF- α

Distintos estudios han demostrado que el aumento de los niveles de TNF- α se produce en situaciones de hepatotoxicidad. Esto puede ser llevado a cabo por fármacos como el paracetamol (162)(163), por situaciones de colestasis como la ligadura de la vía biliar (164), por fibrosis causadas por infecciones por virus hepatotropos (165), por daño de I/R (112) o por hepatectomías del 85% en roedores frente hepatectomías del 70% o laparotomías sham(166). Considerando como hepatoprotectores, los productos anti-inflamatorios que logran la reducción de estos valores, como son las plantas medicinales Curcuma y Nigella Sativa (162)(163). Por otro lado, sabemos que el preconditionamiento isquémico ha demostrado beneficios en resecciones hepáticas, protegiendo al parénquima hepático frente al daño por I/R. (167) Este tipo de preconditionamiento se asocia con una disminución de los valores de TNF- α . Sabemos

que el TNF- α es un factor importante en facilitar que los hepatocitos del parénquima remanente entren en el ciclo proliferativo, pero dosis muy altas del mismo producen hepatotoxicidad. Es decir, que dosis bajas de TNF- α protegen contra el daño de I/R, y favorecen la replicación hepatocitaria, pero dosis altas son perjudiciales. (168) Y, por tanto, el “Precondicionamiento regenerativo” como se demuestra en los resultados de nuestro estudio, podría conseguir su efecto hepatoprotector atenuando el aumento de los valores del TNF- α .

Aunque una excesiva sobreexpresión del TNF- α parece que es perjudicial para el desarrollo hepatocitario, se necesitan unos niveles mínimos de esta citocina para garantizar una correcta regeneración hepática. Esto se ha comprobado en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal a los que se les administran tratamientos anti-TNF- α como el Infliximab. Como efectos secundarios se han descrito hipertransaminasemia transitoria y autolimitada, enfermedad colestásica o hepatitis. Algunos de estos pacientes, han desarrollado daño hepático grave, requiriendo incluso hasta trasplante hepático.(113)

7.1.2. IL-1

Una de las hepatopatías en las que más se han estudiado los mediadores de la inflamación es la esteatohepatitis no alcohólica (NASH). La cascada de señales intracelulares que se desarrollan para llevar a la muerte celular en la NASH no siempre resulta en apoptosis, sino que estímulos sub-letales pueden conducir a la supervivencia de las células, presentando estas importantes signos pro-inflamatorios. Se ha demostrado, que los ácidos grasos libres ocasionan una cascada de señales en los hepatocitos que conducen a un aumento en la producción de IL-1 e IL-6. (169) Este aumento en las citoquinas pro-

inflamatorias debido a los ácidos grasos, representa el daño hepatocitario, y es un patrón molecular similar a lo que vemos con nuestro modelo de hepatectomía subtotal en el SFFS. Otros estudios muestran también una situación proinflamatoria después de una hepatectomía mayor en humanos, con un pico en el primer día postoperatorio de los niveles de IL-6 y de cortisol. (170)

Otro tipo de situaciones en las que vemos la participación de la IL-1 son el daño hepático inducido por fármacos, específicamente el causado por el tetracloruro de carbono (CCl₄) y por la tioacetamida. Estas drogas hepatotóxicas producen una importante sobreexpresión de esta citoquina pro-inflamatoria. (171)(172) Al igual que con estas sustancias, con nuestro modelo de SFFS los valores de la IL-1 aumentan, pudiendo considerar por ello al “Precondicionamiento regenerativo” un factor hepatoprotector, ya que reduce de forma significativa los valores de esta IL.

7.1.3. IL-6

La IL-6 es probablemente la citoquina más estudiada, debido a sus propiedades pleiotrópicas y a las múltiples funciones en las que está implicada. De hecho, se expresa en casi todas las circunstancias que producen perturbación homeostática, por lo que su producción se termina cuando se restablece la homeostasis tisular. El papel de la IL-6 en el hígado se atribuye principalmente a la inducción de la respuesta de la fase aguda y a la activación de la transición de la fase G₀/G₁ de los hepatocitos después de una hepatectomía parcial. (161)(173)(72) Las vías de señalización activadas por la IL-6 son importantes para el inicio de la proliferación de los hepatocitos después de hepatectomías

parciales. Se ha visto, que la regeneración se afecta y la supervivencia se reduce en ratones deficientes en IL-6. (174)

En estudios con hepatectomías parciales en roedores, se demuestra que si bien los niveles de IL-6 aumentan tras una laparotomía en blanco (tipo sham), estos aumentan de manera mucho más significativa tras una hepatectomía parcial. Estos datos, llevan a la conclusión de que la IL-6 está efectivamente implicada en la regeneración hepática, y no sólo en los fenómenos de inflamación o alteración de la homeostasis como podría corresponder a los animales del grupo “sham”. (110)

Además, aparte de su papel conocido en la inflamación, la IL-6 modula también la regeneración del hígado y protege al mismo de la lesión por I/R. En este contexto, Matsumoto et al demostraron un aumento de la IL-6 tras aplicar la técnica de preconditionamiento isquémico previo a una hepatectomía. Los niveles elevados de IL-6 se correlacionaron inversamente con los niveles séricos de ALT, lo que apoya que la expresión de esta IL esté asociada con la protección hepatocelular. (108) Sin embargo, estos resultados se contradicen con los publicados por Cui et al, en los que analizaron el preconditionamiento isquémico en trasplante hepático en ratas, y obtuvieron en el grupo del preconditionamiento menores niveles de AST y ALT y a su vez, niveles más bajos de IL-6. Afirmando que el preconditionamiento isquémico reduce la expresión de la IL-6 para proteger al hígado del daño producido por citoquinas pro-inflamatorias. (175)

También se ha visto un efecto dosis-dependiente de la IL-6 sobre la proliferación de los hepatocitos. Esto significa que, a diferencia de las dosis fisiológicas de IL-6 las cuales son necesarias para la proliferación de los hepatocitos, la hiperestimulación de esta citoquina en ratones después de una hepatectomía parcial desencadena un retraso en la

regeneración hepática. Esto se parece a lo que encontramos en nuestro estudio, la IL-6 aumenta con el desarrollo del SFFS y disminuye con la aplicación del “Precondicionamiento regenerativo”. Si bien ninguno de estos cambios es estadísticamente significativo.(173)

En nuestro estudio no obtuvimos cambios significativos en la expresión de la IL-6 en ninguno de los dos grupos durante el procedimiento, ni comparando los dos grupos entre sí. Esto probablemente se deba al doble papel que puede desarrollar esta citoquina en la inflamación. Y es que, la IL-6 típicamente conocida por su actividad pro-inflamatoria, puede desarrollar también actividad anti-inflamatoria, dependiendo de la ruta de señalización molecular que tome. Las actividades anti-inflamatorias o regenerativas están mediadas por la “señalización clásica”, mientras que las respuestas pro-inflamatorias están mediadas por la “señalización trans”. Por lo tanto, la actividad que lleve a cabo la IL-6 está influenciada por el contexto específico en el que se encuentre. (176)(177)(178)(179)(180)

7.1.4. IL-8

La IL-8 es una quimiocina apenas detectable en tejidos sanos, pero rápidamente inducible en respuesta a citoquinas pro-inflamatorias como el TNF- α o la IL-1.(121)(122) En nuestro estudio, después de la hepatectomía, y con el consiguiente aumento de la IL-1 y del TNF- α , esta quimiocina aumenta sus niveles de forma muy significativa ($p < 0,001$). Además, es también una de las citoquinas estudiadas en nuestro modelo en las que el “Precondicionamiento regenerativo” tiene un mayor efecto ($p < 0'001$). El precondicionamiento consigue mantener estables los niveles de IL-8, siendo así en H24h similares al momento Bas.

7.1.5. MCP-1

Diferentes estímulos conllevan a la expresión de la MCP-1, incluyendo el TNF- α y la IL-1, así como también algunos fármacos hepatotóxicos. Su expresión aumenta también durante los procesos de inflamación y fibrosis que conducen a una hepatitis crónica. Además, se ha descrito que la inactivación de la MCP-1 en un modelo animal protege contra la lesión hepática aguda grave producida por fármacos hepatotóxicos. De forma similar, el “Precondicionamiento regenerativo” que consigue disminuir los niveles de MCP-1 podría proteger contra el daño hepático (174)(181)

7.1.6. IL-4

Al igual que en otros estudios, como el de Zamara et al, la IL-4 no mostró diferencias en su expresión a lo largo del experimento. (181) En nuestro estudio, la IL-4 tiende a disminuir progresivamente después de la hepatectomía, aunque sin diferencias estadísticamente significativas. Además, no encontramos diferencias en la expresión de la IL-4 comparando el grupo CON y el grupo PREC.

La contribución del sistema inmunitario a la regeneración hepática aún no se conoce bien, sin embargo, parece que es en este aspecto donde participan la IL-4 y la IL-5. DeAngelis et al, establecieron que después de una hepatectomía parcial se activa el sistema del complemento. Esta activación, lleva al reclutamiento de “células asesinas naturales” o natural killer (NKT) al hígado y a la consiguiente expresión de IL-4 por parte de estas células. A su vez, la IL-4 estimula más aun la activación del complemento, lo que lleva a la producción de IL-6, una citoquina que, como ya hemos comentado anteriormente, es

necesaria para una adecuada regeneración hepática.(159) Goh et al, demostraron otra vía de producción de IL-4 en la regeneración hepática, mediada por eosinófilos.(182) Además, se ha demostrado que la IL-4 suprime la producción de citoquinas pro-inflamatorias, como el TNF- α y la IL-1, y protege a los hepatocitos frente al daño por I/R. (183)

7.1.7. IL-5

Al igual que en la IL-4, no encontramos tampoco cambios significativos en la expresión de la IL-5 durante el procedimiento, ni en el grupo CON, ni en el grupo PREC, ni comparando ambos grupos entre sí.

La IL-5 participa en la regulación inmune. Su expresión está asociada con concentraciones elevadas de IgE y eosinofilia, es por eso que se observaron niveles elevados de IL-5 en pacientes con infecciones hepáticas parasitarias como la esquistosomiasis. Los niveles más altos de esta citoquina se observaron en pacientes con fibrosis más graves debido a estas infecciones. (184) También se han encontrado niveles más altos de IL-5 en modelos roedores de daño hepático agudo por paracetamol. (185) En la literatura, encontramos escasa información sobre la IL-5 en relación con la regeneración hepática.

7.1.8. IL-10

La IL-10 es una citoquina anti-inflamatoria relacionada con el cese de la regeneración hepática, junto con el TGF- β principalmente. (72) La IL-10 está regulada de forma negativa en las situaciones de daño hepático. Así, sus niveles disminuyen con sustancias hepatotóxicas como el CCl₄ (171) o la tioacetamida (172), también disminuyen frente al

virus de la hepatitis C (165), y también con el desarrollo del SFSS como se aprecia en los resultados de nuestro estudio ($p=0,034$). Por otro lado, son varios los estudios que han demostrado las acciones anti-fibróticas (disminución de las fibras de colágeno de la matriz extracelular) y anti-inflamatorias (regulación negativa de la IL-1, la IL-6 y el TNF- α) de la IL-10. Xu et al, demostraron estas propiedades en células dendríticas genéticamente modificadas (186), Choi et al, en las células madre mesenquimales que también modificaron genéticamente (187) y Mansour et al, con el fármaco tadalafilo (172). Demostrando de esta manera la propiedad protectora de esta IL en la fibrosis hepática. Yang et al, en vez de aplicar un modelo de fibrosis hepática para valorar el papel de la IL-10 como los autores anteriormente mencionados, administraron IL-10 exógena a un modelo de SFSS creado a partir de un trasplante hepático ortotópico con injerto reducido en ratas. En este estudio, la administración de IL-10 mejoró la función hepática y el daño histológico, inhibió el aumento de caspasas-activadas y de citoquinas proinflamatorias como el TNF- α , y aumentó la supervivencia de los animales de experimentación. (188) En nuestro estudio, el “Precondicionamiento regenerativo” no modificó los niveles de la IL-10 de forma significativa.

7.2. Caspasas en el Síndrome de “Small-For-Flow” y el “Precondicionamiento regenerativo”

Las caspasas se sintetizan de forma inactiva, como pro-caspasas. Siendo su forma activada, la que conlleva la actividad proteolítica. (128)

De los diferentes tipos de caspasas existentes, en nuestro estudio hemos analizado la caspasa-3. Se trata de la caspasa más estudiada en la literatura y su actividad principal es la apoptótica, tratándose en concreto de una caspasa efectora. La apoptosis juega un papel muy importante en la regulación de la homeostasis de los distintos tipos celulares, siendo parte fundamental del desarrollo normal y la fisiología de todos los órganos, incluido el hígado. Se pueden encontrar alteraciones en la apoptosis de los hepatocitos en distintas enfermedades hepáticas, como los tumores hepáticos, las hepatitis independientemente del origen y la hepatopatía alcohólica. (126)(129)(189)

Parece que las resecciones parciales hepáticas promueven una disminución en la expresión de los genes proapoptóticos y un aumento en la expresión de los antiapoptóticos, como el Bcl-2. Un aumento del ratio de los mecanismos antiapoptóticos:proapoptóticos favorece la supervivencia del tejido hepático durante su regeneración. De hecho, se ha llegado a describir cómo algunos roedores sometidos a hepatectomías, desarrollaron tumores en el parénquima hepático remanente, lo que probablemente se deba a una disminución en la apoptosis. (110)

La activación de las caspasas efectoras se considera la última etapa de la apoptosis. Así, la caspasa-3 es el punto de convergencia de distintas vías de señalización, y es además

indispensable para la condensación de la cromatina y la fragmentación del ADN, que son los pasos finales de la apoptosis. Es por ello un monitor sensible de la inducción de la apoptosis, siendo su estudio muy útil para analizar la misma, motivo por el que ha sido elegida como la caspasa a analizar en nuestro estudio. Un aumento en la expresión de la Caspasa-3 refleja un aumento en la apoptosis. (190)(169)

Numerosas investigaciones experimentales muestran cómo la Caspasa-3 activada aumenta con la administración de drogas hepatotóxicas, como son el paracetamol (162), el ácido valproico (162), el CCl₄ (191), o la gentamicina (163). También se eleva por alimentar a los animales de experimentación, con una dieta deficiente en metionina y colina, la cual está asociada con esteatohepatitis fibrosa (192). Y con la administración intraperitoneal de lipopolisacáridos, otro modelo típico de daño parenquimatoso hepático (193).

Por otro lado, los valores de la Caspasa-3 descienden de forma importante con sustancias potencialmente hepatoprotectoras como son la curcumina procedente de la cúrcuma, la timoquinona procedente de la nigella sativa y la teanina procedente de la planta del té, demostrando el papel de estas plantas como atenuantes de la apoptosis. Estas sustancias hepatoprotectoras, pueden ser administradas unos días o semanas antes, como realizaron Wang et al, y Mourad et al en sus experimentos, o a la vez que el fármaco hepatotóxico como hicieron Zaky et al y Galaly et al (162)(163)(191)(193).

Uno de los fenómenos patológicos hepáticos donde más se ha estudiado la apoptosis, y que nos puede ayudar a entender los mecanismos moleculares responsables de la activación de la Caspasa-3, es la NASH. La apoptosis de los hepatocitos inducida por los

ácidos grasos libres es característica de la NASH, formando parte importante de los fenómenos inflamatorios y fibróticos de la misma. (169)

La Caspasa-3 activada aumenta sus niveles de forma importante en el contexto de la NASH, correlacionándose sus niveles incluso con la gravedad de la enfermedad. (169)(194) Además, se ha demostrado que la inhibición farmacológica de la apoptosis hepática con un inhibidor de las caspasas, y a su vez, la depleción específica de la Caspasa-3 en ratones (knockout) reducen el daño hepatocelular y la apoptosis de los hepatocitos, pudiendo reducir el desarrollo de la fibrosis en ratones con NASH. (192)(194)

Por otro lado, las señales de la muerte celular en la NASH no siempre acaban en apoptosis, sino que pueden conducir a la supervivencia de células que presentarán signos fibróticos y pro-inflamatorios. (169) En este sentido, la supresión de la Caspasa-3, mediante modificación genética, se asociaría también con una disminución de la señal pro-inflamatoria. (192)

A pesar de lo que pueda parecer con los párrafos anteriores, las caspasas, y en consecuencia la apoptosis, no son exclusivas de situaciones de daño hepático. La apoptosis forma parte de la tercera fase de la regeneración hepática. Tras una hepatectomía parcial, una vez reestablecido el volumen inicial, se estimula la actividad del gen p53, el cual incrementa la expresión de las caspasas, causando así el fin del ciclo celular. (72)

En nuestro estudio, sin embargo, este aumento de los fenómenos de apoptosis no se da una vez finalizada la regeneración hepática, sino que tiene lugar de forma precoz. Esto lo apreciamos en el grupo CON, manifestándose con una elevación importante de la Caspasa-3 activada a las 24 horas de la hepatectomía. Los análisis volumétricos (74) (142) confirman que en ese momento la regeneración hepática aun no ha finalizado, sin embargo la apoptosis crece. Esto puede ser debido al fenómeno conocido como “respuesta al estrés hiperproliferativo”. Esto significa, que el exceso de señales mitógenas provocan la apoptosis celular mediante la activación del gen p53. Esto en ocasiones es beneficioso, ya que se trata de un mecanismo de protección tumoral, pero puede ser perjudicial en la cirugía hepática o en el trasplante con un injerto pequeño. (72) Como ya hemos comentado, la hepatectomía subtotal a la que sometemos a los animales, conlleva el desarrollo del SFFS.(50) Se trata de una resección del 90% de la masa hepática, lo que enfrenta al organismo a una situación de estrés celular. En este contexto, se produce una sobreexpresión del gen p53, lo que lleva a la activación de las caspasas y a la muerte celular. Este podría tratarse de uno de los mecanismos que conllevan a la SFFS tras la hepatectomía del 90%, ya que estaríamos sometiendo a los hepatocitos a un estímulo mitogénico excesivo, generando la “respuesta al estrés hiperproliferativo”, e induciendo por tanto la apoptosis celular.

El papel exacto de las caspasas después de una hepatectomía parcial no está claramente definido aún. Si bien se conoce su función y la fase de la regeneración hepática en la que toman parte, no está claro en la literatura cuáles son los niveles normales de esta molécula y a partir de qué momento es considerado normal el aumento de su actividad. Hayami et al y Ozen et al, describieron el aumento de la apoptosis, mediado por la Caspasa-3, en la regeneración hepática fisiológica después de una hepatectomía parcial (195)(196).

Paradójicamente, Joechle et al, encontraron niveles menores de Caspasa-3-activada en los pacientes a los que se les sometió a ALPPS, frente a los que les realizaron una resección hepática estándar. A pesar de que el ALPPS es un procedimiento más agresivo y con un mayor riesgo de IHPH, los menores niveles de Caspasa-3-activada nos podrían estar hablando que, al igual que nuestro procedimiento, el ALPPS funcionaría como un estímulo de la regeneración (197).

Ozen et al demuestran en su experimento que la expresión de la Caspasa-3 aumenta de manera tiempo-dependiente. Demuestran además como el óxido de boro, aumenta la expresión de la Caspasa-3, y lo hace también de forma tiempo-dependiente, mostrando el pico a las 6 horas tras la hepatectomía parcial. El boro es un compuesto químico previamente relacionado con la apoptosis, ya que ha demostrado un efecto anti-proliferativo en determinados tipos de células cancerígenas. (196)

Si analizamos detenidamente los resultados de Hayami, encontramos un aumento significativo de los niveles de Caspasa-3 a las 18 horas después de la hepatectomía parcial. Sin embargo, a las 24 horas, los niveles descienden hasta volver a prácticamente los basales, para volver a elevarse a las 36 y a las 48 horas. Este comportamiento en picos, es lo que nos puede explicar las diferencias entre los distintos artículos publicados. Además, el hecho de no realizar las medidas todos los grupos exactamente en el mismo momento postoperatorio, puede llevar a que los datos no sean comparables dado el comportamiento oscilante de la Caspasa-3 después de una hepatectomía parcial. (195)

Zhang et al también evaluaron la función apoptótica después de una hepatectomía parcial, pero en relación al daño I/R. Los fenómenos de I/R hepática promueven el estrés

oxidativo y la liberación de mediadores pro-inflamatorios. Esto acelera la muerte de los hepatocitos, desarrollando como consecuencia disfunción hepática. El grupo de Zhang demuestra como la administración de suero rico en hidrógeno antes de la hepatectomía disminuye la apoptosis. Esta disminución de la Caspasa-3 es concomitante a la mejoría de los datos analíticos de función hepática (ALT, AST, bilirrubina). Si relacionamos el “Precondicionamiento regenerativo” con esto, estaríamos de nuevo demostrando, el potencial hepatoprotector del preconditionamiento. Ya que éste consigue disminuir los niveles de Caspasa-3-activada después de una hepatectomía parcial. (198)

Una de las conclusiones que se han obtenido a lo largo a los años en el campo del trasplante hepático, es que los injertos de donantes más jóvenes conllevan mejor función hepática en el receptor, además de una menor morbi-mortalidad, y sin embargo hígados de donantes muy mayores conllevan más riesgo de desarrollar una malfunción primaria del injerto. También es mayor el riesgo en pacientes ancianos de desarrollar fallo hepático tras una hepatectomía. (44)(199). El grupo japonés de Enkhbold et al analizaron en un estudio experimental con ratones las diferencias tras una hepatectomía parcial en hígados jóvenes versus hígados de ratones de más edad. Demostraron un aumento de la Caspasa-3 en el grupo más anciano frente al grupo más joven en todos los momentos del seguimiento postoperatorio, siendo las diferencias estadísticamente significativas a las 48 y a las 72 horas tras la resección quirúrgica.(200)

Como hemos comentado, las caspasas activadas son las que tienen actividad proteolítica, y son por tanto quienes van a llevar a cabo la acción apoptótica, en este caso la Caspasa-3-activada. En las imágenes del apartado “Resultados” (**Fig.33**) apreciamos cómo el “Precondicionamiento regenerativo” no modifica el comportamiento de la Caspasa-3

inactiva o pro-Caspasa-3 a lo largo de todo el procedimiento, sin embargo, a diferencia del grupo CON consigue mantener unos niveles de Caspasa-3-activada similares antes y después de la resección hepática. Es decir, el “Precondicionamiento regenerativo” evita el pico de Caspasa-3-activada a las 24 horas de la cirugía ($p=0'022$) (**tabla 3**), evitando así el desarrollo de la muerte celular. Con esto mostraríamos como el preconditionamiento podría frenar ese hiperestímulo mitogénico al que se enfrenta el animal con SFFS, eliminando así el estrés celular y la apoptosis.

7.3. Metabolismo del óxido nítrico en el Síndrome de “Small-For-Flow” y el “Precondicionamiento regenerativo”

Como hemos comentado en la introducción (capítulo 2.5.3) la enzima NOS provoca la reacción química necesaria para la formación de NO. Ahora nos vamos a centrar en dos de sus subtipos, la iNOS y la eNOS, que son los que pueden tener relación con la regeneración hepática, ya que la nNOS tiene acción a nivel cerebral. (130)(131)

En condiciones normales, únicamente la eNOS está presente en el hígado, y la pequeña cantidad de NO que produce regula la distribución local de la perfusión sanguínea y con ello la presión portal. La iNOS, que es el subtipo inducible, se sobreexpresa en el hígado en distintas situaciones, incluyendo el shock hemorrágico, la hepatitis, el síndrome I/R y la regeneración hepática. (201)

La función del NO en la regeneración hepática ha sido estudiada de distintas maneras, sobre todo con estudios experimentales de hepatectomías parciales en modelos de roedores.

Con ratones modificados genéticamente (knock-out), Rai et al y Mei et al analizaron el papel de las enzimas iNOS y eNOS respectivamente, en la regeneración hepática.

Rai et al (202) estudiaron ratones deficientes en la enzima iNOS a los que se les sometió a una hepatectomía parcial. Estos animales mostraron menos hepatocitos entrando en el

ciclo celular y menos mitosis. A su vez, obtuvieron focos de daño hepático a nivel histológico, con aumento de la apoptosis, la esteatosis, la infiltración por polimorfonucleares y la necrosis. Lo que condujo a una regeneración de la masa hepática menor y más lenta que en el grupo control.

Mei et al realizaron una hepatectomía del 70% en ratones deficientes en eNOS. Estos animales presentaron alteraciones en la fase de progresión de la regeneración hepática, con menor activación de factores de crecimiento (HGF, EGF), de la cascada MAP-quinasa, de genes de respuesta precoz (c-jun), del factor de transcripción AP-1 (que estimula la expresión de los “genes de respuesta tardía”), del gen c-met y de las ciclinas A y E entre otros. Demostrando que la progresión en el ciclo celular de los hepatocitos y la proliferación de los mismos está mediada por la enzima eNOS. (203)

Carnavole demostró que la liberación del NO después de una resección hepática parcial en ratas modula distintos procesos en el remanente hepático, como la proliferación, la angiogénesis y la apoptosis. Esta última puede aumentarse de forma perjudicial en casos de sobreproducción del NO. Es decir, que en función de sus niveles y el contexto específico el NO puede tanto proteger de la apoptosis, como inducir la misma. (201)

Yu et al por otro lado, inhibieron todas las isoformas de NOS con la administración de nitroarginina a ratones a los que previamente se les había realizado una hepatectomía parcial. Estos animales, tuvieron un menor número de hepatocitos en replicación (mediante el método inmunohistoquímico de Brdu o Bromodeoxiuridina), unos niveles más bajos de IL-6, una mayor acumulación de lípidos en los hepatocitos, y un menor índice hepático (relación entre el peso del hígado y el peso corporal) que el grupo control,

y, por consiguiente, una peor supervivencia. Sus resultados demuestran un papel crucial del NO durante la regeneración hepática. Sugiriendo que la disminución de los niveles de la IL-6, frena la transición de los hepatocitos de G0 a G1, deteriorando así la regeneración hepática. (204)

Como vemos en los diferentes estudios, el NO tiene un papel transcendental en la regeneración hepática, de hecho, se llegó a proponer como desencadenante de la misma. (205) Actualmente, sabemos que esta molécula gaseosa participa en las distintas fases de la regeneración, ya que en condiciones normales participa en la fase de cebado, favorece la fase de progresión e inhibe la apoptosis. Regula además el flujo sanguíneo y favorece la angiogénesis. Asimismo, se ha descrito que protege frente al daño por I/R. Por otro lado, el NO inhibe algunas citoquinas pro-inflamatorias como el TNF- α , la IL-1 y la IL-12, inhibe también la expresión del gen p53, frenando así la cascada de las caspasas y la activación de la Caspasa-3 y con ello impidiendo la apoptosis. Demostrando todo esto el papel hepato-protector del NO. (131)

En nuestro estudio encontramos una disminución importante y estadísticamente significativa ($p=0'022$) en los valores de eNOS a las 24 horas de la hepatectomía en el grupo CON, tanto si medimos la enzima con PCR como con WB. Relacionando estos datos con la literatura, vemos como los animales que desarrollan el SFFS, expresan menores niveles de eNOS y con ello tendrán menor cantidad de NO en su organismo. Además, se ha descrito que el NO inhibe, entre otras, la IL-1, el TNF- α y la Caspasa-3-activada, por lo que la falta del mismo, se puede relacionar con el aumento de los niveles de estas tres moléculas, lo cual coincide con los resultados del grupo CON de nuestro experimento.

Al mismo tiempo, encontramos en nuestros resultados, unos mayores niveles de eNOS en el grupo PREC a las 24 horas de la hepatectomía. Con importante significación estadística, $p=0,008$ para las medidas con PCR, y $p<0,001$ para la técnica de WB. Esto indicaría que el “Precondicionamiento regenerativo” consigue impedir el descenso de los niveles constitutivos de eNOS en el organismo del paciente que se somete a la hepatectomía del 90%. Conservando así los niveles de NO, una molécula que como hemos constatado es hepato-protectora a dosis moderadas, y por ello el “Precondicionamiento regenerativo” estaría favoreciendo una mejor regeneración hepática.

Respecto a la iNOS, en nuestro estudio no encontramos diferencias especialmente interesantes en ella. Para el grupo CON, encontramos un pico de iNOS en H15 ($p=0,05$), pero los valores descienden a las 24 horas para establecer niveles similares a los basales. Además, si medimos esta enzima con la técnica de WB no encontramos diferencias en sus niveles a lo largo del experimento.

Por otro lado, el “Precondicionamiento regenerativo” no parece influir en la iNOS. Ya que no encontramos diferencias significativas en el comportamiento de los valores de iNOS en ambos grupos a lo largo del seguimiento de nuestro experimento.

De esto podríamos deducir que el SFPS disminuye los niveles de NO tras una hepatectomía del 90% en base a la inhibición de la acción de la eNOS. Por otro lado, el “Precondicionamiento regenerativo” parece tener un efecto hepato-protector, al conseguir evitar el descenso en los niveles de NO, mediante la regulación positiva de la eNOS.

Por otra parte, se ha estudiado el metabolismo del NO en el preacondicionamiento isquémico hepático, una maniobra para reducir la gravedad del daño por I/R. Esta técnica produce de manera casi inmediata la liberación de adenosina, la cual activa la eNOS y favorece la creación de NO. Se ha visto que esto provoca una mejora en la oxigenación tisular y en la microcirculación del hígado. Sin embargo, en este contexto, la iNOS tarda varias horas en generar el NO tras ser estimulada. Este retraso en la acción de la iNOS parece deberse a que su producción está determinada predominantemente a nivel transcripcional. Este dato sobre la relación temporal de la acción tanto de la eNOS como de la iNOS podría explicar la razón por la que en nuestro estudio solo veamos cambios en el comportamiento de la eNOS. (206)(207)(208)

7.4. Metabolismo energético en el Síndrome de “Small-For-Flow” y el “Precondicionamiento regenerativo”

Actualmente, el metabolismo energético es un tema en auge en la investigación. Se están desarrollando tratamientos con acción a nivel mitocondrial para mitigar el daño hepático, especialmente centrándose en el daño por I/R en el trasplante hepático. De hecho, podemos ya hablar de algunos fármacos con mecanismo de acción a nivel mitocondrial como son la ciclosporina, la minociclina o el remifentanilo (209)(210), e incluso mencionar el revolucionario trasplante mitocondrial (211)

Los cambios en la señalización purinérgica se producen en distintas condiciones fisiopatológicas, como el cáncer, la diabetes, la inflamación, la fibrosis hepática, la cirrosis, y en la regeneración del hígado después de una lesión o trasplante. (132)

La proliferación de los hepatocitos requiere una producción amplificada de energía y metabolitos esenciales, necesarios para la síntesis de todos los componentes celulares, que dependen fundamentalmente de las mitocondrias. De hecho, se ha demostrado que algunas alteraciones del desarrollo mitocondrial, con fármacos como la zidovudine (212), o a nivel genético inhiben, por ejemplo, el gen de la topoisomerasa-1 (213) o la proteína reguladora de la absorción de calcio mitocondrial-1 (MICU1) (214) retrasan la regeneración hepática.

Ya en 1991, Katoh et al, estudiaron en ratas la función mitocondrial en hepatectomías extendidas precedidas de PVL. Ellos sugirieron que la mejora de la función mitocondrial tras la PVL satisface los requerimientos energéticos necesarios para la regeneración hepática.(215)

Los parámetros bioenergéticos mitocondriales disminuyen significativamente durante la IHPH. De hecho, algunos estudios han vinculado los picos más altos de transaminasas, bilirrubina e INR después de una hepatectomía mayor con una peor función mitocondrial. Esto se debe al hecho de que la regeneración hepática necesita una gran cantidad de energía para poderse llevar a cabo de una manera rápida y eficaz, ya que de lo contrario, el paciente acabará con IHPH e incluso la muerte. (216)(135)(217)

Los animales del grupo CON de nuestro estudio desarrollaron SFFS.(50) En este sentido, y compatible con lo que se ha descrito anteriormente en la literatura, nuestro estudio muestra que el desarrollo del SFFS va acompañado de una disminución de los valores de ATP, de la relación ATP:ADP y de la carga energética. **(Tabla 5)**

El deterioro de la función mitocondrial se ha relacionado con hepatectomías del 70% y del 90% (218), con el ALPPS (216), con maniobras de Pringle prolongadas (clampajes del pedículo hepático mayores a 20 minutos) (135), y con el daño por isquemia-reperfusión (I/R) en el trasplante hepático (217).

Budai et al, describieron que aunque el número de mitocondrias sí aumenta después del ALPPS, éstas son inmaduras y disfuncionales debido a una biogénesis inadecuada.(216)

Algunos investigadores analizaron los parámetros de la bioenergética celular durante el trasplante hepático. En esta situación particular, los procesos de I/R inducen lesión celular y empeoramiento de la función mitocondrial, lo que contribuye a una mala función inicial del injerto, e incluso a la disfunción primaria que se puede observar en determinados casos en el postoperatorio de un trasplante hepático. Sin embargo, la disfunción mitocondrial relacionada con el daño por I/R también se puede encontrar en traumatismos hepáticos, en shocks hemorrágicos, en hepatectomías parciales y después de un paro cardíaco. (209)(210). Bruinsma et al, demostraron que los niveles de ATP disminuyen gradualmente durante la fase de isquemia, y cómo un trasplante exitoso depende entre otras cosas, de una recuperación significativa de los niveles de ATP durante la reperfusión. Es por ello que los hígados con disfunción primaria del injerto, mostraron menor recuperación de los niveles de ATP durante la fase de reperfusión. (136)

Si analizamos ese daño mitocondrial, lo encontramos representado a nivel molecular en la reducción del potencial de membrana mitocondrial, en un aumento en la fase de latencia y en una reducción en la síntesis de ATP, lo que condiciona un aumento simultáneo en los niveles de ADP y AMP. (217)

Por otro lado, un aumento en el metabolismo del ATP se asocia con una regeneración hepática más rápida.(132)(219) Las técnicas de PVE y PVL inducen la regeneración hepática en un proceso bien equilibrado, con suficiente suministro de energía proporcionado por el aumento de la función mitocondrial. (216) Con esa provisión de energía suficiente, la regeneración hepática se lleva a cabo correctamente, por lo que el hígado consigue hipertrofiarse. Con el “Precondicionamiento regenerativo” no

obtenemos esa hipertrofia, ni ese gran aumento en los niveles de ATP, sino una mejor condición energética del hígado remanente después de una resección hepática mayor.

El estado redox mitocondrial reducido después de hepatectomías extendidas, se ha demostrado que se debe a un hipermetabolismo relativo del remanente hepático. (216)(218) Con el “Precondicionamiento regenerativo” vemos cómo las curvas decrecientes de los niveles de ATP, la relación ATP:ADP y la carga de energía son más altas en los animales del grupo PREC, que en los animales del grupo CON, lo que implica una mayor actividad mitocondrial en la regeneración hepática. (**Fig.38, Fig.41 y Fig.42**) Y, por lo tanto, vemos las curvas crecientes de los datos de ADP y AMP, con valores más bajos en el grupo de PREC, en comparación con el grupo CON. (**Fig.39 y Fig.40**). Estos resultados concuerdan con lo descrito inicialmente por Nagano, el cuál en sus estudios con ratas sobre el “Precondicionamiento regenerativo”, demostró que los niveles de ATP eran significativamente más altos a las 24 horas en el grupo al que había aplicado el preconditionamiento que en el grupo control. (69)(219)

8. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Limitaciones del estudio:

La principal debilidad de nuestro estudio fue la falta de más tiempo de seguimiento después de 24 horas tras la hepatectomía. Realizamos una hepatectomía subtotal en un modelo porcino, la cual se trata de una cirugía extrema para estos animales. Por ello, la atención postoperatoria requiere un equipo multidisciplinario con una gran experiencia en cirugía hepatobiliar y en cuidados intensivos, que ofrezca una atención intensiva real similar a las que se aplican en una UCI humana. Esta limitación, sin embargo, no invalida el estudio, ya que la técnica utilizada, una hepatectomía del 90%, ha sido demostrada como modelo útil para reproducir las alteraciones de SFFS e investigar modificaciones en él.

Además, la mayoría de los estudios experimentales encontrados en la literatura para medir tanto las citoquinas, como las caspasas, el óxido nítrico o el metabolismo energético son realizados en ratones o ratas. Al tratarse de animales pequeños, es más fácil conseguir un mayor tamaño muestral, tanto desde el punto de vista ético, como desde el económico o del tiempo requerido para realizar la cirugía. Por otro lado, en roedores, se ha visto que el pico de regeneración hepática es a las 24 horas, sin embargo, en el modelo porcino este pico parece que se retrasa hacia las 48 horas. Por esta razón, si pudiéramos medir las citoquinas después del primer día postoperatorio, probablemente encontraríamos diferencias más significativas en las variables estudiadas.

En futuros estudios, sería de gran interés un tiempo mayor de seguimiento, importante para evaluar el impacto final de las potenciales intervenciones para el tratamiento del SFFS, como el “Precondicionamiento regenerativo”. Por otro lado, estudios de supervivencia, nos ayudarán también a poder acercar la técnica del “Precondicionamiento regenerativo” a la clínica.

Finalmente, creemos que, a pesar de las limitaciones expuestas, los resultados del presente estudio refuerzan el interés en el “Precondicionamiento regenerativo” como una herramienta hepatoprotectora en hepatectomías mayores con riesgo de IHPH.

9. CONCLUSIONES

Conclusiones:

1. El síndrome de “Small-For-Flow” se asoció a una respuesta inflamatoria caracterizada por un desequilibrio entre las citoquinas pro- y anti-inflamatorias.
2. En el síndrome de “Small-For-Flow, el aumento de los niveles de mediadores pro-inflamatorios se acompañó de un aumento en el grado de apoptosis, de una menor activación de la óxido nítrico sintasa y de un deterioro en el metabolismo energético.
3. El “Precondicionamiento regenerativo” atenuó la respuesta inflamatoria y apoptótica, aumentó los niveles de la óxido nítrico sintasa y mejoró la carga energética tras una hepatectomía subtotal.
4. Los resultados de nuestro estudio sugieren que el “Precondicionamiento regenerativo” podría proporcionar protección hepática, mediante la modulación de algunos mediadores moleculares implicados en la regeneración hepática.

10. BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía:

1. Manfredi S, Lepage C, Hatem C, Coatmeur O, Faivre J, Bouvier A-M. Epidemiology and Management of Liver Metastases From Colorectal Cancer: *Ann Surg*. 2006;244(2):254-9.
2. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018: *Cancer Statistics*, 2018. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(1):7-30.
3. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(6):394-424.
4. Al Bandar MH, Kim NK. Current status and future perspectives on treatment of liver metastasis in colorectal cancer. *Oncol Rep*. 2017;37(5):2553-64.
5. Holch JW, Demmer M, Lamersdorf C, Michl M, Schulz C, von Einem JC, et al. Pattern and Dynamics of Distant Metastases in Metastatic Colorectal Cancer. *Visc Med*. 2017;33(1):70-5.
6. Cooper GS, Yuan Z, Landefeld CS, Johanson JF, Rimtn AA. A national population-based study of incidence of colorectal cancer and age. Implications for screening in older Americans. *Cancer*. 1995;75(3):775-81.
7. Weiss L, Grudmann E, Torhorst J, Hartveit F, Moberg I, Eder M, et al. Haematogenous metastatic patterns in colonic carcinoma: an analysis of 1541 necropsies. *J Pathol*. 1986;150(3):195-203.
8. Fiorentini G, Sarti D, Aliberti C, Carandina R, Mambrini A, Guadagni S. Multidisciplinary approach of colorectal cancer liver metastases. *World J Clin Oncol*. 2017;8(3):190.
9. Tomlinson J, Jarnagin W, DeMatteo R, Fong Y, Kornprat P, Gonen M, et al. Actual 10-year survival after resection of colorectal liver metastases defines cure. *J Clin Oncol*. 2007;25(29):4575-80.
10. House MG, Kemeny NE, Gönen M, Fong Y, Allen PJ, Paty PB, et al. Comparison of Adjuvant Systemic Chemotherapy With or Without Hepatic Arterial Infusional Chemotherapy After Hepatic Resection for Metastatic Colorectal Cancer: *Ann Surg*. 2011;254(6):851-6.
11. Van der Geest L, Lam-Boer J, Koopman M, Verhoef C, Elferink M, de Wilt J. Nationwide trends in incidence, treatment and survival of colorectal cancer patients with synchronous metastases. *Clin Exp Metastasis*. 2015;32(5):457-65.
12. Renehan AG. Impact on survival of intensive follow up after curative resection for colorectal cancer: systematic review and meta-analysis of randomised trials. *BMJ*. 2002;324(7341):813-813.
13. Elferink M, de Jong K, Klaase J, Siemerink E, de Wilt J. Metachronous metastases from colorectal cancer: a population-based study in North-East Netherlands. *Int J Colorectal Dis*. 2015;30(2):205-12.
14. Lykoudis P, O'Reilly D, Nastos K, Fusai G. Systematic review of surgical management of synchronous colorectal liver metastases. *Br J Surg*. 2014;101(6):605-12.
15. Chow FC-L, Chok KS-H. Colorectal liver metastases: An update on multidisciplinary approach. *World J Hepatol*. 2019;11(2):150-72.
16. Schiergens TS, Einem J von, Thomas MN, Albertsmeier M, Giessen-Jung C, Dörsch M, et al. Multidisciplinary treatment of colorectal liver metastases. *Minerva Med*. 2017;108(6):527-46.

17. Bramhall S, Gur U, Coldham C, Gunson B, Mayer A, McMaster P, et al. Liver resection for colorectal metastases. *Ann R Coll Surg Engl.* 2003;85(5):334-9.
18. Zarour LR, Anand S, Billingsley KG, Bisson WH, Cercek A, Clarke MF, et al. Colorectal Cancer Liver Metastasis: Evolving Paradigms and Future Directions. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* 2017;3(2):163-73.
19. Ksienski D, Woods R, Speers C, Kennecke H. Patterns of referral and resection among patients with liver-only metastatic colorectal cancer (MCRC). *Ann Surg Oncol.* 2010;17(12):3085-93.
20. De Greef K, Rolfo C, Russo A, Chapelle T, Bronte G, Passiglia F, et al. Multidisciplinary management of patients with liver metastasis from colorectal cancer. *World J Gastroenterol.* 2016;22(32):7215.
21. Van Cutsem E, Cervantes A, Adam R, Sobrero A, Van Krieken JH, Aderka D, et al. ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol.* 2016;27(8):1386-422.
22. Mattar RE. Preoperative selection of patients with colorectal cancer liver metastasis for hepatic resection. *World J Gastroenterol.* 2016;22(2):567.
23. Jones R, Jackson R, Dunne D, Malik H, Fenwick S, Poston G, et al. Systematic review and meta-analysis of follow-up after hepatectomy for colorectal liver metastases. *Br J Surg.* 2012;99(4):477-86.
24. Adair R, Young A, Cockbain A, Malde D, Prasad KR, Lodge JP, et al. Repeat hepatic resection for colorectal liver metastases. *Br J Surg.* 2012;99(9):1278-83.
25. Lam V, Pang T, Laurence J, Johnston E, Hollands M, Pleass H, et al. A systematic review of repeat hepatectomy for recurrent colorectal liver metastases. *J Gastrointest Surg.* 2013;17(7):1312-21.
26. Fong Y, Fortner J, Sun RL, Brennan MF, Blumgart LH. Clinical Score for Predicting Recurrence After Hepatic Resection for Metastatic Colorectal Cancer: Analysis of 1001 Consecutive Cases. *Ann Surg.* 1999;230(3):309.
27. Cummings LC, Payes JD, Cooper GS. Survival after hepatic resection in metastatic colorectal cancer: A population-based study. *Cancer.* 2007;109(4):718-26.
28. van Dam RM, Lodewick TM, van den Broek MAJ, de Jong MC, Greve JW, Jansen RLH, et al. Outcomes of extended versus limited indications for patients undergoing a liver resection for colorectal cancer liver metastases. *HPB.* 2014;16(6):550-9.
29. Clavien P, Petrowsky H, DeOliveira M, Graf R. Strategies for safer liver surgery and partial liver transplantation. *N Engl J Med.* 2007;356(15):1545-59.
30. Hou W, Zhu X. Extra vascular interventional treatment of liver cancer, present and future. *Drug Discov Ther.* 2015;9(5):335-41.
31. Abdalla EK, Denys A, Chevalier P, Nemr RA, Vauthey J-N. Total and segmental liver volume variations: Implications for liver surgery. *Surgery.* 2004;135(4):404-10.
32. Bismuth H, Adam R, Lévi F, Farabos C, Waechter F, Castaing D, et al. Resection of Nonresectable Liver Metastases from Colorectal Cancer After Neoadjuvant Chemotherapy: *Ann Surg.* 1996;224(4):509-22.
33. Vauthey J-N, Nordlinger B, Kopetz S, Poston G. Sequenced chemotherapy and surgery for potentially resectable colorectal liver metastases: a debate over goals of research and an approach while the jury remains out. *Ann Surg Oncol.* 2010;17(8):1983-6.
34. Mullen JT, Ribero D, Reddy SK, Donadon M, Zorzi D, Gautam S, et al. Hepatic Insufficiency and Mortality in 1,059 Noncirrhotic Patients Undergoing Major Hepatectomy. *J Am Coll Surg.* 2007;204(5):854-62.
35. Zorzi D, Laurent A, Pawlik TM, Lauwers GY, Vauthey J-N, Abdalla EK.

- Chemotherapy-associated hepatotoxicity and surgery for colorectal liver metastases. *Br J Surg.* 2007;94(3):274-86.
36. Fausto N, Campbell JS, Riehle KJ. Liver regeneration. *Hepatology.* 2006;43(2):45-53.
37. Fernandez FG, Ritter J, Goodwin JW, Linehan DC, Hawkins WG, Strasberg SM. Effect of Steatohepatitis Associated with Irinotecan or Oxaliplatin Pretreatment on Resectability of Hepatic Colorectal Metastases. *J Am Coll Surg.* 2005;200(6):845-53.
38. Adam R, Kitano Y. Multidisciplinary approach of liver metastases from colorectal cancer. *Ann Gastroenterol Surg.* 2019;3(1):50-6.
39. Zhu J-Q, He Q, Li X-L. Liver transplantation benefits selected patients with hilar cholangiocarcinoma and colorectal liver metastases. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2018;17(5):385-6.
40. Gorgen A, Muaddi H, Zhang W, McGilvray I, Gallinger S, Sapisochin G. The New Era of Transplant Oncology: Liver Transplantation for Nonresectable Colorectal Cancer Liver Metastases. *Can J Gastroenterol Hepatol.* 2018;2018:1-7.
41. Herrero A, Nadalin S, Panaro F. Liver transplantation for irresectable colorectal liver metastases: still a contraindication? *HepatoBiliary Surg Nutr.* 2018;7(6):475-8.
42. Dueland S, Syversveen T, Solheim JM, Solberg S, Grut H, Bjørneth BA, et al. Survival Following Liver Transplantation for Patients With Nonresectable Liver-only Colorectal Metastases: *Ann Surg.* 2020;271(2):212-8.
43. Andres A, Oldani G, Berney T, Compagnon P, Line P-D, Toso C. Transplantation for colorectal metastases: on the edge of a revolution. *Transl Gastroenterol Hepatol.* 2018;26(3):74-74.
44. Lafaro K, Buettner S, Maqsood H, Wagner D, Bagante F, Spolverato G, et al. Defining Post Hepatectomy Liver Insufficiency: Where do We stand? *J Gastrointest Surg.* 2015;19(11):2079-92.
45. Alizai PH, Haelsig A, Bruners P, Ulmer F, Klink CD, Dejong CHC, et al. Impact of liver volume and liver function on posthepatectomy liver failure after portal vein embolization– A multivariable cohort analysis. *Ann Med Surg.* 2018;25:6-11.
46. Asencio JM, Vaquero J, Olmedilla L, García Sabrido JL. “Small-for-flow” syndrome: Shifting the “size” paradigm. *Med Hypotheses.* 2013;80(5):573-7.
47. Demetris AJ, Kelly DM, Eghtesad B, Fontes P, Wallis Marsh J, Tom K, et al. Pathophysiologic Observations and Histopathologic Recognition of the Portal Hyperperfusion or Small-for-Size Syndrome: *Am J Surg Pathol.* 2006;30(8):986-93.
48. Asencio J, Steiner M, García-Sabrido J, López-Baena JA, Ferreiroa J, Morales A, et al. Early Changes in Small-for-Flow Syndrome: An Experimental Model. *J Liver Dis Transplant.* 2013;03(01).
49. Golriz M, Majlesara A, El Sakka S, Ashrafi M, Arwin J, Fard N, et al. Small for Size and Flow (SFSF) syndrome: An alternative description for posthepatectomy liver failure. *Clin Res Hepatol Gastroenterol.* 2016;40(3):267-75.
50. Orue-Echebarria MI, Vaquero J, Lisbona CJ, Lozano P, Steiner MA, Morales Á, et al. Comprehensive Characterization of a Porcine Model of The “Small-for-Flow” Syndrome. *J Gastrointest Surg.* 2019;23(11):2174-83.
51. Treska V. Methods to Increase Future Liver Remnant Volume in Patients with Primarily Unresectable Colorectal Liver Metastases: Current State and Future Perspectives. *Anticancer Res.* 2016;36(5):2065-72.
52. Hwang S, Lee S-G, Ko G-Y, Kim B-S, Sung K-B, Kim M-H, et al. Sequential Preoperative Ipsilateral Hepatic Vein Embolization After Portal Vein Embolization to Induce Further Liver Regeneration in Patients With Hepatobiliary Malignancy: *Ann Surg.* 2009;249(4):608-16.

53. Le Roy B, Dupré A, Gallon A, Chabrot P, Gagnière J, Buc E. Liver hypertrophy: Underlying mechanisms and promoting procedures before major hepatectomy. *J Visc Surg.* 2018;155(5):393-401.
54. Vyas S, Markar S, Partelli S, Fotheringham T, Low D, Imber C, et al. Portal Vein Embolization and Ligation for Extended Hepatectomy. *Indian J Surg Oncol.* 2014;5(1):30-42.
55. Adam R, Laurent A, Azoulay D, Castaing D, Bismuth H. Two-Stage Hepatectomy: A Planned Strategy to Treat Irresectable Liver Tumors: *Ann Surg.* 2000;232(6):777-85.
56. Homayounfar K, Liersch T, Schuetze G, Niessner M, Goralczyk A, Meller J, et al. Two-stage hepatectomy (R0) with portal vein ligation—towards curing patients with extended bilobular colorectal liver metastases. *Int J Colorectal Dis.* 2009;24(4):409-18.
57. Maki H, Satou S, Nakajima K, Nagao A, Watanabe K, Satodate H, et al. Two-stage hepatectomy aiming for the development of intrahepatic venous collaterals for multiple colorectal liver metastases. *Surg Case Rep.* 2018;4(1).
58. Levi Sandri GB, Santoro R, Vennarecci G, Lepiane P, Colasanti M, Ettorre GM. Two-stage hepatectomy, a 10 years experience. *Updat Surg.* 2015;67(4):401-5.
59. Olthof PB, Schnitzbauer AA, Schadde E. The HPB controversy of the decade: 2007–2017 – Ten years of ALPPS. *Eur J Surg Oncol.* 2018;44(10):1624-7.
60. Schnitzbauer AA, Lang SA, Goessmann H, Nadalin S, Baumgart J, Farkas SA, et al. Right Portal Vein Ligation Combined With In Situ Splitting Induces Rapid Left Lateral Liver Lobe Hypertrophy Enabling 2-Stage Extended Right Hepatic Resection in Small-for-Size Settings: *Ann Surg.* 2012;255(3):405-14.
61. Wigmore SJ. ALPPS: The argument against. *Eur J Surg Oncol EJSO.* 2017;43(2):249-51.
62. Schnitzbauer AA, Schadde E, Linecker M, Machado MA, Adam R, Malago M, et al. Indicating ALPPS for Colorectal Liver Metastases: A Critical Analysis of Patients in the International ALPPS Registry. *Surgery.* 2018;164(3):387-94.
63. Lodge JPA. ALPPS: The argument for. *Eur J Surg Oncol EJSO.* 2017;43(2):246-8.
64. Sandström P, Røsok BI, Sparrelid E, Larsen PN, Larsson AL, Lindell G, et al. ALPPS Improves Resectability Compared With Conventional Two-stage Hepatectomy in Patients With Advanced Colorectal Liver Metastasis: Results From a Scandinavian Multicenter Randomized Controlled Trial (LIGRO Trial). *Ann Surg.* 2018;267(5):833-40.
65. Shen Y-N, Guo C-X, Wang L-Y, Pan Y, Chen Y-W, Bai X-L, et al. Associating liver partition and portal vein ligation versus 2-stage hepatectomy: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore).* 2018;97(35):e12082.
66. Balzan SMP, Gava VG, Magalhaes MA, Dotto ML. Outflow modulation to target liver regeneration: Something old, something new. *Eur J Surg Oncol EJSO.* 2014;40(2):140-3.
67. Le Roy B, Perrey A, Fontarensky M, Gagnière J, Abergel A, Pereira B, et al. Combined Preoperative Portal and Hepatic Vein Embolization (Biembolization) to Improve Liver Regeneration Before Major Liver Resection: A Preliminary Report. *World J Surg.* 2017;41(7):1848-56.
68. Guiu B, Chevallier P, Denys A, Delhom E, Pierredon-Foulongne M-A, Rouanet P, et al. Simultaneous trans-hepatic portal and hepatic vein embolization before major hepatectomy: the liver venous deprivation technique. *Eur Radiol.* 2016;26(12):4259-67.
69. Nagano Y, Nagahori K, Kamiyama M, Fujii Y, Kubota T, Endo I, et al. Improved functional reserve of hypertrophied contra lateral liver after portal vein ligation in rats. *J*

Hepatology. 2002;37(1):72-7.

70. Eshkenazy R, Dreznik Y, Lahat E, Zakai BB, Zendel A, Ariche A. Small for size liver remnant following resection: prevention and management. *HepatoBiliary Surg Nutr.* 2014;3(5):10.

71. Pardee A. G1 events and regulation of cell proliferation. *Science.* 1989;246(4930):603-8.

72. Cienfuegos JA, Rotellar F, Baixauli J, Martínez Reguein F, Pardo F, Hernandez Lizoain JL. Liver regeneration – The best kept secret. A model of tissue injury response. *Rev Esp Enfermedades Dig.* 2014;106(3):171-94.

73. Furchtgott LA, Chow CC, Periwal V. A Model of Liver Regeneration. *Biophys J.* 2009;96(10):3926-35.

74. Asencio JM. Síndrome de small for flow en un modelo porcino de hepatectomía extendida: descripción de los cambios precoces y evaluación del acondicionamiento regenerativo con embolización portal como estrategia de prevención. [Madrid]: Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Medicina. Departamento de Cirugía; 2014.

75. Asencio JM, García Sabrido JL, Olmedilla L. How to expand the safe limits in hepatic resections? *J Hepato-Biliary-Pancreat Sci.* 2014;21(6):399-404.

76. Yokoyama Y, Nagino M, Nimura Y. Mechanisms of Hepatic Regeneration Following Portal Vein Embolization and Partial Hepatectomy: A Review. *World J Surg.* 2007;31(2):367-74.

77. Tiniakos DG, Kandilis A, Geller SA. Tityus: A forgotten myth of liver regeneration. *J Hepatology.* 2010;53(2):357-61.

78. Smith W. A Dictionary of Greek and Roman biography and mythology. Boston: Little, Brown and company; 1867.

79. García Gual C. Prometeo: mito y literatura. Madrid: Fondo de cultura económica de España; 2009. 239 p.

80. Esquilo. Prometeo encadenado. En: Esquilo, Sófocles, Eurípides Obras Completas. Madrid: Cátedra; 2004. p. 85-126.

81. Slater PE. The glory of Hera: Greek mythology and the Greek family. Boston: Beacon Press; 1968.

82. Tillmanns H. Experimentelle und anatomische Untersuchungen über Wunden der Leber und Niere. Ein Beitrag zur Lehre von der antiseptischen Wundheilung. (Experimental and anatomical studies on wounds of the liver and kidney. a contribution to the study of antiseptic wound healing.). *Arch Pathol Anat Physiol Klin Med.* 1879;78(3):437-74.

83. Higgins G, Anderson R. Experimental pathology of the liver. I. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch Pathol.* 1931;12:186-202.

84. Pack G, et al. Regeneration of human liver after major hepatectomy. *Surgery.* 1962;52:617-23.

85. Lin T-Y, Chen C-C. Metabolic Function and Regeneration of Cirrhotic and Non-cirrhotic Livers after Hepatic Lobectomy in Man: *Ann Surg.* 1965;162(6):959-72.

86. Parker J, Siemsen J. Liver regeneration following hepatectomy, evaluated by scintillation scanning. *Radiology.* 1967;88(2):342-4.

87. Aronsen KF, Ericsson B, Nosslin B, Nylander G, Phil B, Waldskog B. Evaluation of Hepatic Regeneration by Scintillation Scanning, Cholangiography and Angiography in Man: *Ann Surg.* 1970;171(4):567-74.

88. Blumgart LH, Leach KG, Karran SJ. Observations on liver regeneration after right hepatic lobectomy. *Gut.* 1971;12(11):922-8.

89. Marcos A, Fisher R, Ham J, Shiffman M, Sanyal A, Luketic V, et al. Liver

regeneration and function in donor and recipient after right lobe adult to adult living donor liver transplantation. *Transplantation*. 2000;69(7):1375-9.

90. Humar A, Kosari K, Sielaff TD, Glessing B, Gomes M, Dietz C, et al. Liver regeneration after adult living donor and deceased donor split-liver transplants. *Liver Transpl*. 2004;10(3):374-8.

91. Kamel I, Erbay N, Warmbrand G, Kruskal J, Pomfret E, Raptopoulos V. Liver regeneration after living adult right lobe transplantation. *Abdom Imaging*. 2003;28(1):53-7.

92. Pomfret E, Pomposelli J, Gordon F, Erbay N, Lyn Price L, Lewis W, et al. Liver regeneration and surgical outcome in donors of right-lobe liver grafts. *Transplantation*. 2003;76(1):5-10.

93. Reynolds ES. Liver parenchymal cell injury: I. Initial Alterations of the Cell Following Poisoning with Carbon Tetrachloride. *J Cell Biol*. 1963;19(1):139-57.

94. Dabeva MD, Shafritz DA. Activation, Proliferation, and Differentiation of Progenitor Cells into Hepatocytes in the D-Galactosamine Model of Liver Regeneration. 1993;143(6):15.

95. Bilodeau M, Aubry M-C, Houle R, Burnes PN, Éthier C. Evaluation of hepatocyte injury following partial ligation of the left portal vein. *J Hepatol*. 1999;30(1):29-37.

96. Jaeschke H. Mechanisms of reperfusion injury after warm ischemia of the liver. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*. 1998;5(4):402-8.

97. Kan NG, Junghans D, Belmonte JCI. Compensatory growth mechanisms regulated by BMP and FGF signaling mediate liver regeneration in zebrafish after partial hepatectomy. *FASEB J*. 2009;23(10):3516-25.

98. Fausto N, Campbell JS, Riehle KJ. Liver regeneration. *J Hepatol*. 2012;57(3):692-4.

99. Michalopoulos GK. Hepatostat: Liver regeneration and normal liver tissue maintenance. *Hepatology*. 2017;65(4):1384-92.

100. Alison MR, Lin W-R. Diverse routes to liver regeneration: Liver regeneration. *J Pathol*. 2016;238(3):371-4.

101. Gandhi CR. Augmenter of liver regeneration. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2012;5(1):10.

102. Nalesnik MA, Gandhi CR, Starzl TE. Augmenter of liver regeneration: A fundamental life protein. *Hepatology*. 2017;66(1):266-70.

103. Michalopoulos GK. Liver Regeneration after Partial Hepatectomy. *Am J Pathol*. 2010;176(1):2-13.

104. Jenny N, Huber S, Lewis M. Mediators of Inflammation: Cytokines and Adhesion Molecules. En: *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*. 22.^a ed. Elsevier; 2016. p. 944-54.

105. Firestein G, Budd R, Gabriel S, McInnes I, O'Dell J. Citocinas. En: *Tratado de reumatología*. 10.^a ed. Elsevier; 2018. p. 396-407. (Capítulo 26).

106. Juan M, Engel P, Lozano F, Jaraquemada D, García Zepeda E, Soldevilla M. Immune system: introduction, main elements and immune response./ Sistema inmunitario: introducción, principales elementos y respuesta inmunitaria. En: *Farreras Rozman Medicina Interna*. 18.^a ed. Elsevier; 2016. p. 2541-81.

107. Palomo J, Dietrich D, Martin P, Palmer G, Gabay C. The interleukin (IL)-1 cytokine family – Balance between agonists and antagonists in inflammatory diseases. *Cytokine*. 2015;76(1):25-37.

108. Matsumoto T, O'Malley K, Efron PA, Burger C, McAuliffe PF, Scumpia PO, et al. Interleukin-6 and STAT3 protect the liver from hepatic ischemia and reperfusion injury during ischemic preconditioning. *Surgery*. 2006;140(5):793-802.

109. Iwai M, Cui T-X, Kitamura H, Saito M, Shimazu T. Increased secretion of tumour necrosis factor and interleukin 6 from isolated, perfused liver of rats after partial hepatectomy. *Cytokine*. 2001;13(1):60-4.
110. Coelho MCM, Tannuri U, Tannuri ACA, Mello ES, dos Santos NASR. Expression of interleukin 6 and apoptosis-related genes in suckling and weaning rat models of hepatectomy and liver regeneration. *J Pediatr Surg*. 2007;42(4):613-9.
111. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014;6(10):a016295.
112. Li J, Ke W, Zhou Q, Wu Y, Luo H, Zhou H, et al. Tumour necrosis factor- α promotes liver ischaemia-reperfusion injury through the PGC-1 α /Mfn2 pathway. *J Cell Mol Med*. 2014;18(9):1863-73.
113. Rossi RE. Anti-tumour necrosis factor agent and liver injury: Literature review, recommendations for management. *World J Gastroenterol*. 2014;20(46):17352-9.
114. Dong C, Fu T, Ji J, Li Z, Gu Z. The role of interleukin-4 in rheumatic diseases. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2018;45(8):747-54.
115. Chomarat P, Banchereau J. An update on interleukin-4 and its receptor. *Eur Cytokine Netw*. 1997;8(4):333-44.
116. Van Leeuwen B, Martinson M, Webb G, Young I. Molecular organization of the cytokine gene cluster, involving the human IL-3, IL-4, IL-5 and GM-CSF on human chromosome 5. *Blood*. 1989;73(5):1142-8.
117. Saxena A, Khosraviani S, Noel S, Mohan D, Donner T, Hamad ARA. Interleukin-10 paradox: A potent immunoregulatory cytokine that has been difficult to harness for immunotherapy. *Cytokine*. 2015;74(1):27-34.
118. Trifunović J, Miller L, Debeljak Ž, Horvat V. Pathologic patterns of interleukin 10 expression – A review. *Biochem Medica*. 2015;36-48.
119. Lezama P. Rol de quimiocinas y sus receptores en la inflamación. 3:7.
120. Cano NF, Montoya CJ. Las quimioquinas: citoquinas proinflamatorias y reguladoras del tráfico celular. *Iatreia*. 2001;14(1):57-72.
121. Sung HJ, Choi S, Lee JW, Ok CY, Bae Y-S, Kim Y-H, et al. Inhibition of human neutrophil activity by an RNA aptamer bound to interleukin-8. *Biomaterials*. 2014;35(1):578-89.
122. Sun Q, Sun F, Wang B, Liu S, Niu W, Liu E, et al. Interleukin-8 promotes cell migration through integrin $\alpha\beta 6$ upregulation in colorectal cancer. *Cancer Lett*. 2014;354(2):245-53.
123. Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview. *J Interferon Cytokine Res*. 2009;29(6):313-26.
124. Chen M, Wang J. Initiator caspases in apoptosis signaling pathways. *Apoptosis*. 2002;7(4):313-5.
125. Denault J-B, Salvesen GS. Caspases. *Curr Protoc Protein Sci*. 2001;26(1):21.8.1-21.8.16.
126. Chowdhury I, Tharakan B, Bhat GK. Caspases — An update. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 2008;151(1):10-27.
127. Yuan J, Shaham S, Ledoux S, Ellis HM, Horvitz HR. The *C. elegans* Cell Death Gene *ted-3* Encodes a Protein Similar to Mammalian Interleukin-1 β -Converting Enzyme. *Cell*. 1993;75:641-52.
128. Parrish AB, Freel CD, Kornbluth S. Cellular Mechanisms Controlling Caspase Activation and Function. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013;5(6):a008672.
129. Lakhani SA. Caspases 3 and 7: Key Mediators of Mitochondrial Events of Apoptosis. *Science*. 2006;311(5762):847-51.
130. Mcilroy D, Sladen RN. Fisiología, fisiopatología y farmacología renales. En:

Miller Anesthesia. 8^a. Elsevier; 2016. p. 545-87.

131. Zhang Y-Q, Ding N, Zeng Y-F, Xiang Y-Y, Yang M-W, Hong F-F, et al. New progress in roles of nitric oxide during hepatic ischemia reperfusion injury. *World J Gastroenterol*. 2017;23(14):2505.

132. Burnstock G, Vaughn B, Robson SC. Purinergic signalling in the liver in health and disease. *Purinergic Signal*. 2014;10(1):51-70.

133. Tantama M, Yellen G. Imaging Changes in the Cytosolic ATP-to-ADP Ratio. *Methods Enzymol*. 2014;547:355-71.

134. Petrasek J, Iracheta-Vellve A, Saha B, Satishchandran A, Kodys K, Fitzgerald KA, et al. Metabolic danger signals, uric acid and ATP, mediate inflammatory cross-talk between hepatocytes and immune cells in alcoholic liver disease. *J Leukoc Biol*. 2015;98(2):249-56.

135. Alexandrino H, Varela AT, Teodoro JS, Martins MA, Rolo AP, Tralhão JG, et al. Mitochondrial bioenergetics and posthepatectomy liver dysfunction. *Eur J Clin Invest*. 2016;46(7):627-35.

136. Bruinsma BG, Avruch JH, Sridharan GV, Weeder PD, Jacobs ML, Crisalli K, et al. Peritransplant Energy Changes and Their Correlation to Outcome After Human Liver Transplantation: Transplantation. 2017;101(7):1637-44.

137. Court FG, Wemyss-Holden SA, Morrison CP, Teague BD, Laws PE, Kew J, et al. Segmental nature of the porcine liver and its potential as a model for experimental partial hepatectomy. *Br J Surg*. 2003;90(4):440-4.

138. Camprodon R, Solsona J, Guerrero J, Mendoza C, Segura J, Fabregat J. Intrahepatic vascular division in the pig. Basis for partial hepatectomies. *Arch Surg*. 1977;112(1):38-40.

139. Filipponi F, Leoncini G, Campatelli A, Bagnolesi A, Perri G, Romagnoli P, et al. Segmental organization of the pig liver. Anatomical basis of controlled partition for experimental grafting. *Eur Surg Res*. 1995;27:151-7.

140. Couinaud C. Liver lobes and segments: notes on the anatomical architecture and surgery of the liver. *Presse Médicale*. 1954;62(33):709-12.

141. Xia Q, Lu T-F, Zhou Z-H, Hu L-X, Ying J, Ding D-Z, et al. Extended hepatectomy with segments I and VII as resection remnant: a simple model for small-for-size injuries in pigs. *Hepatobiliary Pancreat Int*. 2008;7(6):601-7.

142. Asencio JM, García-Sabrido JL, López-Baena JA, Olmedilla L, Peligros I, Lozano P, et al. Preconditioning by portal vein embolization modulates hepatic hemodynamics and improves liver function in pigs with extended hepatectomy. *Surgery*. 2017;161(6):1489-501.

143. Mohkam K, Darnis B, Mabrut J-Y. Porcine models for the study of small-for-size syndrome and portal inflow modulation: literature review and proposal for a standardized nomenclature: Porcine models for the study of small-for-size syndrome and portal inflow modulation: literature review and proposal for a standardized nomenclature. *J Hepato-Biliary-Pancreat Sci*. 2016;23(11):668-80.

144. Rognon X. Les races porcines françaises. Race porcine Large White. *AgroParisTech*. 2007.

145. Köhn F, Sharifi AR, Simianer H. Modeling the growth of the Goettingen minipig. *J Anim Sci*. 2007;85(1):84-92.

146. Kaiser GM, Fruhauf N. Method of intracranial pressure monitoring and cerebrospinal fluid sampling in swine. *Lab Anim*. 2007;41(1):80-5.

147. Grözinger G, Schenk M, Morgalla MH, Thiel C, Thiel K, Schuhmann MU. The Values of Cerebrovascular Pressure Reactivity and Brain Tissue Oxygen Pressure Reactivity in Experimental Anhepatic Liver Failure. *Neurocrit Care*. 2012;17(2):271-80.

148. Frühauf NR, Radunz S, Grabellus F, Laube T, Uerschels AK, Kaiser GM. Neuromonitoring in a porcine model of acute hepatic failure. *Lab Anim.* 2011;45(3):174-8.
149. Croome KP, Mao SA, Glorioso JM, Krishna M, Nyberg SL, Nagorney DM. Characterization of a porcine model for associating liver partition and portal vein ligation for a staged hepatectomy. *HPB.* 2015;17(12):1130-6.
150. Eberhardt C, Wurnig MC, Wirsching A, Rossi C, Feldmane I, Lesurtel M, et al. Prediction of small for size syndrome after extended hepatectomy: Tissue characterization by relaxometry, diffusion weighted magnetic resonance imaging and magnetization transfer. *Bruns H, editor. PLOS ONE.* 2018;13(2):e0192847.
151. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: From the known and the unknown. *J Cell Physiol.* 2000;182(3):311-22.
152. Ishmael FT, Stellato C. Principles and applications of polymerase chain reaction: basic science for the practicing physician. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2008;101(4):437-43.
153. Lorenz TC. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. *J Vis Exp.* 2012;22(63):e3998.
154. Welch HM. The Polymerase Chain Reaction. *Dwek M, Brooks SA, Schumacher U, editores. Methods Mol Biol.* 2012;878:71-88.
155. Paz E, Muñoz C, Yuste JR, Melero I. Inmunidad mediada por células. Serología y diagnóstico inmunobiológico. En: *Balcells La clínica y el laboratorio.* 22.^a ed. Elsevier; 2015. p. 109-58.
156. Hnasko T, Hnasko R. The western blot. *Methods Mol Biol.* 2015;1318:87-96.
157. Kricka L, Park J. Immunochemical Techniques. En: *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics.* 7.^a ed. Elsevier; 2014. p. 348-67.
158. Qadan M, Garden OJ, Corvera CU, Visser BC. Management of Postoperative Hepatic Failure. *J Am Coll Surg.* 2016;222(2):195-208.
159. DeAngelis RA, Markiewski MM, Kourtzelis I, Rafail S, Syriga M, Sandor A, et al. A Complement-IL-4 Regulatory Circuit Controls Liver Regeneration. *J Immunol.* 2012;188(2):641-8.
160. Lawrence T. The Nuclear Factor NF- B Pathway in Inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009;1(6):a001651.
161. Elchaninov AV, Fatkhudinov TKh, Usman NYu, Arutyunyan IV, Makarov AV, Kananykhina EYu, et al. Expression of Cytokine Genes and Growth Factors in Rat Lungs and Kidneys after Subtotal Hepatectomy. *Bull Exp Biol Med.* 2016;161(3):395-9.
162. Zaky HS, Gad AM, Nemr E, Hassan W, Abd El-Raouf OM, Ali AA. Modulatory effects of some natural products on hepatotoxicity induced by combination of sodium valproate and paracetamol in rats. *J Biochem Mol Toxicol.* 2018;32(7):e22162.
163. Galaly SR, Ahmed OM, Mahmoud AM. Thymoquinone and curcumin prevent gentamicin-induced liver injury by attenuating oxidative stress, inflammation and apoptosis. *J Physiol Pharmacol.* 2014;65(6):823-32.
164. Olteanu D, Nagy A, Ducea M, Filip A, Muresan A, Catoi C, et al. Hepatic and systemic effects of rosvastatin on an experimental model of bile duct ligation in rats. *J Physiol Pharmacol.* 2012;63(5):483-96.
165. De Souza-Cruz S, Victória MB, Tarragô AM, Da Costa AG, Pimentel JPD, Pires EF, et al. Liver and blood cytokine microenvironment in HCV patients is associated to liver fibrosis score: a proinflammatory cytokine ensemble orchestrated by TNF and tuned by IL-10. *BMC Microbiol.* 2016;16(1):3.
166. Panis Y, McMullan DM, Emond JC. Progressive necrosis after hepatectomy and the pathophysiology of liver failure after massive resection. *Surgery.* 1997;121(2):142-9.

167. Lin J, Huang H, Yang S, Duan J, Xu W, Zeng Z. Protective Effects of Ischemic Preconditioning Protocols on Ischemia-Reperfusion Injury in Rat Liver. *J Invest Surg.* 2019;1-8.
168. Jin L-M, Jin S-F, Liu Y-X, Zhou L, Xie H-Y, Yan S, et al. Ischemic preconditioning enhances hepatocyte proliferation in the early phase after ischemia under hemi-hepatectomy in rats. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2012;11(5):521-6.
169. Akazawa Y, Nakao K. To die or not to die: death signaling in nonalcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol.* 2018;53(8):893-906.
170. Cata JP, Velasquez JF, Ramirez MF, Vauthey J-N, Gottumukkala V, Conrad C, et al. Inflammation and pro-resolution inflammation after hepatobiliary surgery. *World J Surg Oncol.* 2017;15(1):152.
171. Farid A, El Shemy M, Nafie E, Hegazy A, Abdelhiee E. Anti-inflammatory, antioxidant and hepatoprotective effects of lactoferrin in rats. *Drug Chem Toxicol.* 2019;2:1-8.
172. Mansour H, Salama A, Abdel-Salam R, Ahmed N, Yassen N, Zaki H. The anti-inflammatory and anti-fibrotic effects of tadalafil in thioacetamide-induced liver fibrosis in rats. *Can J Physiol Pharmacol.* 2018;96(12):1308-17.
173. Streetz KL. Interleukin 6 and liver regeneration. *Gut.* 2000;47(2):309-12.
174. Wyler SL, D'Ingillo SL, Lamb CL, Mitchell KA. Monocyte chemoattractant protein-1 is not required for liver regeneration after partial hepatectomy. *J Inflamm.* 2016;13(1):28.
175. Cui L-Z, Wang B, Chen L-Y, Zhou J. The effect of ischemic precondition to IL-6 on rat liver ischemia-reperfusion injury in transplantation. *Asian Pac J Trop Med.* 2013;6(5):395-9.
176. Naseem S, Hussain T, Manzoor S. Interleukin-6: A promising cytokine to support liver regeneration and adaptive immunity in liver pathologies. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2018;39:36-45.
177. Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res.* 2011;1813(5):878-88.
178. Tanaka T, Kishimoto T. The Biology and Medical Implications of Interleukin-6. *Cancer Immunol Res.* 2014;2(4):288-94.
179. Geier A, Jahn D, Hermanns HM. Interleukin-6: The dark side of liver regeneration in chronic liver disease: Correspondence. *Hepatology.* 2017;66(2):667-8.
180. Joseph Martin S, Evan Prince S. Comparative Modulation of Levels of Oxidative Stress in the Liver of Anti-Tuberculosis Drug Treated Wistar Rats by Vitamin B12, Beta-Carotene, and Spirulina fusiformis: Role of NF-kB, iNOS, IL-6, and IL-10. *J Cell Biochem.* 2017;118(11):3825-33.
181. Zamara E, Galastri S, Aleffi S, Petrai I, Aragno M, Mastrocola R, et al. Prevention of severe toxic liver injury and oxidative stress in MCP-1-deficient mice. *J Hepatol.* 2007;46(2):230-8.
182. Goh YPS, Henderson NC, Heredia JE, Red Eagle A, Odegaard JI, Lehwald N, et al. Eosinophils secrete IL-4 to facilitate liver regeneration. *Proc Natl Acad Sci.* 2013;110(24):9914-9.
183. Kato A, Yoshidome H, Edwards MJ, Lentsch AB. Reduced hepatic ischemia/reperfusion injury by IL-4: potential anti-inflammatory role of STAT6. *Inflamm Res.* 2000;49(6):275-9.
184. Xie H, Chen D, Luo X, Gao Z, Fang H, Huang J. Some characteristics of IL-5-producing T cells in mouse liver induced by *Schistosoma japonicum* infection. *Parasitol Res.* 2013;112(5):1945-51.

185. De León-Nava MA, Álvarez-Delgado C, Donis-Maturano L, Hernández-Ruiz J, Manjarrez-Reyna AN, Cruz-Avilés E, et al. A non-hepatotropic parasite infection increases mortality in the acetaminophen-induced acute liver failure murine model: possible roles for IL-5 and IL-6. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2016;111(12):757-64.
186. Xu Y, Tang X, Yang M, Zhang S, Li S, Chen Y, et al. Interleukin 10 Gene-Modified Bone Marrow-Derived Dendritic Cells Attenuate Liver Fibrosis in Mice by Inducing Regulatory T Cells and Inhibiting the TGF- β /Smad Signaling Pathway. *Mediators Inflamm*. 2019;4652596.
187. Choi J, Jeong I, Han J, Cheon S, Kim S. IL-10-secreting human MSCs generated by TALEN gene editing ameliorate liver fibrosis through enhanced anti-fibrotic activity. *Biomater Sci*. 2019;7(3):1078-87.
188. Yang ZF, Ho DWY, Ngai P, Lau CK, Zhao Y, Poon RTP, et al. Antiinflammatory properties of IL-10 rescue small-for-size liver grafts. *Liver Transpl*. 2007;13(4):558-65.
189. Fu Q, Duan X, Yan S, Wang L, Zhou Y, Jia S, et al. Bioluminescence imaging of caspase-3 activity in mouse liver. *Apoptosis*. 2013;18(8):998-1007.
190. Kurokawa M, Kornbluth S. Caspases and Kinases in a Death Grip. *Cell*. 2009;138(5):838-54.
191. Mourad GM, El-Din SGT, Radi SS, Ossman AS, Hassan MAA, Nouh HH. Curcumin Versus Nigella Sativa L. A Comparative Study of Their Possible Protective Effects on Experimentally Induced Liver Injury in Rats. *J Med Res Inst*. 2006;27(3):141-51.
192. Thapaliya S, Wree A, Povero D, Inzaugarat ME, Berk M, Dixon L, et al. Caspase 3 Inactivation Protects Against Hepatic Cell Death and Ameliorates Fibrogenesis in a Diet-Induced NASH Model. *Dig Dis Sci*. 2014;59(6):1197-206.
193. Wang D, Gao Q, Zhao G, Kan Z, Wang X, Wang H, et al. Protective Effect and Mechanism of Theanine on Lipopolysaccharide-Induced Inflammation and Acute Liver Injury in Mice. *J Agric Food Chem*. 2018;66(29):7674-83.
194. Kanda T, Matsuoka S, Yamazaki M, Shibata T, Nirei K, Takahashi H, et al. Apoptosis and non-alcoholic fatty liver diseases. *World J Gastroenterol*. 2018;24(25):2661-72.
195. Hayami S, Yaita M, Ogiri Y, Sun F, Nakata R, Kojo S. Change in caspase-3-like protease in the liver and plasma during rat liver regeneration following partial hepatectomy. *Biochem Pharmacol*. 2000;60(12):1883-6.
196. Ozen A, Canbek M. Apoptosis induced by boric anhydrite (B₂O₃) after partial hepatectomy in rat liver. *Bratisl Med J*. 2016;116(04):231-4.
197. Joechle K, Moser C, Ruemmele P, Schmidt KM, Werner JM, Geissler EK, et al. ALPPS (associating liver partition and portal vein ligation for staged hepatectomy) does not affect proliferation, apoptosis, or angiogenesis as compared to standard liver resection for colorectal liver metastases. *World J Surg Oncol*. 2017;15(1):57.
198. Zhang Q, Ge Y, Li H, Bai G, Jiao Z, Kong X, et al. Effect of hydrogen-rich saline on apoptosis induced by hepatic ischemia reperfusion upon laparoscopic hepatectomy in miniature pigs. *Res Vet Sci*. 2018;119:285-91.
199. Pratschke S, Bender A, Boesch F, Andrassy J, van Rosmalen M, Samuel U, et al. Association between donor age and risk of graft failure after liver transplantation: an analysis of the Eurotransplant database. *Transpl Int*. 2019;32(3):270-9.
200. Enkhbold C, Morine Y, Utsunomiya T, Imura S, Ikemoto T, Arakawa Y, et al. Dysfunction of liver regeneration in aged liver after partial hepatectomy: Aged liver regeneration after hepatectomy. *J Gastroenterol Hepatol*. 2015;30(7):1217-24.
201. Carnovale CE, Ronco MT. Role of nitric oxide in liver regeneration. *Ann Hepatol*. 2012;11(5):636-47.

202. Rai RM, Lee FYJ, Rosen A, Yang SQ, Lin HZ, Koteish A, et al. Impaired liver regeneration in inducible nitric oxide synthase deficient mice. *Proc Natl Acad Sci.* 1998;95(23):13829-34.
203. Mei Y, Thevananther S. Endothelial nitric oxide synthase is a key mediator of hepatocyte proliferation in response to partial hepatectomy in mice. *Hepatology.* 2011;54(5):1777-89.
204. Yu Y, Tamai M, Tagawa Y. Nitric oxide is critical for avoiding hepatic lipid overloading via IL-6 induction during liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *Exp Anim.* 2017;66(4):293-302.
205. Schoen JM, Wang HH, Minuk GY, Lauth WW. Shear Stress-Induced Nitric Oxide Release Triggers the Liver Regeneration Cascade. *Nitric Oxide.* 2001;5(5):453-64.
206. Grande L, Roselló-Catafau J, Peralta C. El preacondicionamiento isquémico del hígado: de las bases moleculares a la aplicación clínica. *Cir Esp.* 2006;80(5):275-82.
207. Gong J-P, Tu B, Wang W, Peng Y, Li S-B, Yan L-N. Protective effect of nitric oxide induced by ischemic preconditioning on reperfusion injury of rat liver graft. *World J Gastroenterol.* 2004;10(1):73.
208. Shah V. Nitric oxide in liver transplantation: Pathobiology and clinical implications. *Liver Transpl.* 2003;9(1):1-11.
209. Hu C, Li L. Pre-conditions for eliminating mitochondrial dysfunction and maintaining liver function after hepatic ischaemia reperfusion. *J Cell Mol Med.* 2017;21(9):1719-31.
210. Martins RM, Teodoro JS, Furtado E, Rolo AP, Palmeira CM, Tralhão JG. Recent insights into mitochondrial targeting strategies in liver transplantation. *Int J Med Sci.* 2018;15(3):248-56.
211. Roushandeh AM, Kuwahara Y, Roudkenar MH. Mitochondrial transplantation as a potential and novel master key for treatment of various incurable diseases. *Cytotechnology.* 2019;71(2):647-63.
212. Butanda-Ochoa A, Hernández-Espinosa DR, Olguín-Martínez M, Sánchez-Sevilla L, Rodríguez MR, Chávez-Rentería B, et al. A Single Zidovudine (AZT) Administration Delays Hepatic Cell Proliferation by Altering Oxidative State in the Regenerating Rat Liver. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017:1-13.
213. Khiati S, Baechler SA, Factor VM, Zhang H, Huang SN, Dalla Rosa I, et al. Lack of mitochondrial topoisomerase I (*TOP1mt*) impairs liver regeneration. *Proc Natl Acad Sci.* 2015;112(36):11282-7.
214. Guerra MT. Mitochondrial MISCUES in Liver Regeneration. *Hepatology.* 2016;64(5):1797-9.
215. Katoh T, Tanaka M, Nimura Y, Kanai M, Nagino M, Ozawa T. Enhancement of rat liver mitochondrial function by portal branch ligation secures subsequent extended hepatectomy. *Biochem Int.* 1991;24(1):107-16.
216. Budai A, Horváth G, Tretter L, Radák Z, Koltai E, Bori Z, et al. Mitochondrial function after associating liver partition and portal vein ligation for staged hepatectomy in an experimental model: Mitochondrial function after associating liver partition and portal vein ligation for staged hepatectomy. *Br J Surg.* 2019;106(1):120-31.
217. Martins RM, Teodoro JS, Furtado E, Rolo AP, Palmeira CM, Tralhão JG. Evaluation of bioenergetic and mitochondrial function in liver transplantation. *Clin Mol Hepatol.* 2019;25(2):190-8.
218. Dold S, Richter S, Kollmar O, von Heesen M, Scheuer C, Laschke MW, et al. Portal Hyperperfusion after Extended Hepatectomy Does Not Induce a Hepatic Arterial Buffer Response (HABR) but Impairs Mitochondrial Redox State and Hepatocellular Oxygenation. Gracia-Sancho J, editor. *PLOS ONE.* 2015;10(11):e0141877.

219. Nagano Y, Nagahori K, Yoshiro F, Hamaguchi Y, Ishikawa T, Ichikawa Y, et al. Gene expression profile analysis of regenerating liver after portal vein ligation in rats by a cDNA microarray system. *Liver Int.* 2004;24(3):253-8.

11. ANEXOS

11.1 Publicaciones

Artículo 1º:

Orue-Echebarria MI, Vaquero J, Lisbona CJ, Lozano P, Steiner MA, Morales A, López-Baena JÁ, Laso J, Hernández I, Olmedilla L, García Sabrido JL, Peligros I, Sola E, Carballal C, Vara E, Asencio JM.

Comprehensive Characterization of a Porcine Model of The "Small-for-Flow" Syndrome.


Journal of Gastrointestinal Surgery

J Gastrointest Surg. 2019 Feb 7. [Epub ahead of print]

PMID: 30734180

DOI: 10.1007/s11605-019-04130-2

Comprehensive Characterization of a Porcine Model of The “Small-for-Flow” Syndrome

Maitane I. Orue-Echebarria^{1,2}  · Javier Vaquero³ · Cristina J. Lisbona⁴ · Pablo Lozano¹ · Miguel A. Steiner¹ · Álvaro Morales¹ · José Á. López-Baena¹ · Juan Laso⁴ · Inmaculada Hemández⁴ · Luis Olmedilla⁴ · José L. García Sabrido¹ · Isabel Peligros⁵ · Emma Sola⁵ · Carlos Carballal⁶ · Elena Vara⁷ · J. M. Asencio^{1,2,8}

Received: 11 November 2018 / Accepted: 16 January 2019
© 2019 The Society for Surgery of the Alimentary Tract

Abstract

Introduction The term “Small-for-Flow” reflects the pathogenetic relevance of hepatic hemodynamics for the “Small-For-Size” syndrome and posthepatectomy liver failure. We aimed to characterize a large-animal model for studying the “Small-for-Flow” syndrome.

Methods We performed subtotal (90%) hepatectomies in 10 female MiniPigs using a simplified transection technique with a tourniquet. Blood tests, hepatic and systemic hemodynamics, and hepatic function and histology were assessed before (Bas), 15 min (t-15 min) and 24 h (t-24 h) after the operation. Some pigs underwent computed tomography (CT) scans for hepatic volumetry ($n = 4$) and intracranial pressure (ICP) monitoring ($n = 3$). Postoperative care was performed in an intensive care unit environment.

Results All hepatectomies were successfully performed, and hepatic volumetry confirmed liver remnant volumes of 9.2% [6.2–11.2]. The hepatectomy resulted in characteristic hepatic hemodynamic alterations, including portal hyperperfusion, relative decrease of hepatic arterial blood flow, and increased portal pressure (PP) and portal-systemic pressure gradient. The model reproduced major diagnostic features including the development of cholestasis, coagulopathy, encephalopathy with increased ICP, ascites, and renal failure, hyperdynamic circulation, and hyperlactatemia. Two animals (20%) died before t-24 h. Histological liver damage was observed at t-15 min and at t-24 h. The degree of histological damage at t-24 h correlated with intraoperative PP ($r = 0.689$, $p = 0.028$), hepatic arterial blood flow ($r = 0.655$, $p = 0.040$), and hepatic arterial pulsatility index ($r = 0.724$, $p = 0.066$). All animals with intraoperative PP > 20 mmHg presented liver damage at t-24 h.

Conclusion The present 90% hepatectomy porcine experimental model is a feasible and reproducible model for investigating the “Small-for-Flow” syndrome.

Keywords Small-for-Size · Hepatectomy · Pig · Small-For-Flow · Posthepatectomy liver failure

✉ J. M. Asencio
jmasencio@gmail.com

¹ Transplant and Hepatobiliarypancreatic Surgery Unit, Department of General and Digestive Surgery, Hospital General Universitario Gregorio Marañón - IISGM, Madrid, Spain

² Department of Surgery, School of Medicine, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

³ Research Laboratory in Hepatology and Gastroenterology, Hospital General Universitario Gregorio Marañón - IISGM – CIBERehd, Madrid, Spain

⁴ Department of Anaesthesiology and Resuscitation, Hospital General Universitario Gregorio Marañón - IISGM, Madrid, Spain

⁵ Department of Pathology, Hospital General Universitario Gregorio Marañón - IISGM, Madrid, Spain

⁶ Department of Neurosurgery, Hospital General Universitario Gregorio Marañón - IISGM, Madrid, Spain

⁷ Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Medicine, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

⁸ Department of General Surgery, Hospital General Universitario Gregorio Marañón - IISGM, c/ Doctor Esquerdo 46, 28007 Madrid, Spain

Introduction

The concept of “Small-for-Flow” syndrome arises from the observation that the determining factor of the appearance of the “Small-for-Size” syndrome (SFSS) and the posthepatectomy liver failure (PHLF) may be the increase of portal inflow against a reduced hepatic mass.^{1–6} The increase in portal blood flow (PBF) relative to the remnant liver leads to portal hypertension and to decreased hepatic arterial blood flow (HABF) due to the hepatic artery buffer response. The mismatch between PBF and sinusoidal mass induces a series of structural alterations that trigger subsequent changes in inflammatory mediators. These alterations impair the regenerative capacity of the liver parenchyma and reduce its energy load, ultimately impeding to fulfill metabolic and synthetic requirements.^{7,8}

Based on studies where hepatic hemodynamics were modulated in hepatic surgeries,^{9–12} the “Small-for-Flow” syndrome would be defined by the following intraoperative criteria: a portal pressure (PP) greater than 20 mmHg or a PBF greater than 250 ml/min/100 g.¹³ Surpassing of these thresholds would indicate the need to take measures for preventing the structural alterations caused by the inflow imbalance, setting a scenario for the future development of such interventions. In addition, this approach would allow the evaluation of the effectiveness of potential interventions in real time. Because clinical trials in this field are limited by high morbidity and mortality and by ethical considerations, it is necessary to establish experimental models that reproduce the human condition. Porcine models of subtotal hepatectomies are particularly valuable, as their anatomy and physiology are similar to humans.^{14,15} These large animals allow the measurement of portal and arterial blood flows and pressures intraoperatively,^{16,17} as well as the exploration of potential maneuvers to expand the safety limits in liver surgery.¹⁸

The aim of the present work was to characterize a large animal model in which all the features that characterize the “Small-for-Size” syndrome and the postoperative liver failure can be recapitulated, therefore providing relevant endpoints for studying its pathogenesis and testing therapeutic interventions.

Materials and Methods

Ten female MinPigs (body weight 42 kg [39.2–49.7], length 132 cm [119–150]) were anesthetized and underwent the following protocol (Fig. 1). Briefly, an intracranial pressure (ICP) measurement sensor was placed in three animals, and a cranial and abdominal computed tomography (CT) scan were then performed. An abdominal CT scan was also performed in a fourth animal without ICP monitoring. Back in the operating room, blood vessels were cannulated and a 90%

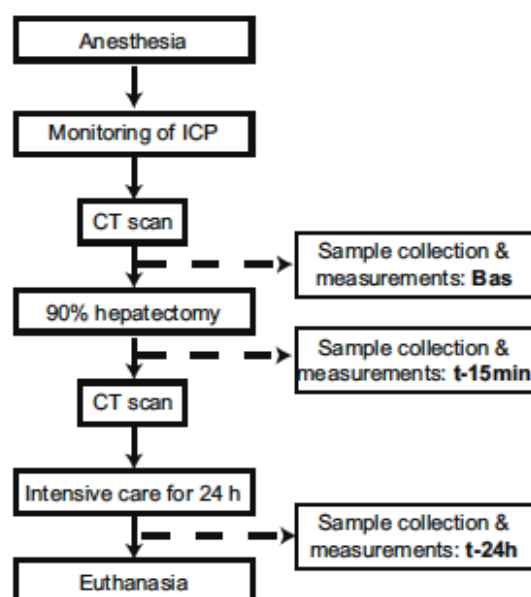


Fig. 1 Flow chart showing the experimental design and the timing of the main procedures carried out during the surgical intervention and the postoperative follow-up

hepatectomy with hemostatic control was performed.¹⁹ The laparotomy was closed, and the animal was transferred to the radiology room to perform a new cranial and abdominal CT scan if indicated. Once the studies were completed, the animals remained monitored under observation with invasive respiratory support until they were sacrificed 24 h later. The measurement of hemodynamic and liver function parameters, and the collection of blood samples and liver biopsies were performed at the beginning of the surgery (Bas), 15 min after the subtotal hepatectomy (t-15 min) when the animals were hemodynamically stable, and 24 h after surgery (t-24 h) (Fig. 1).

The study was approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation of the Minimally Invasive Surgery Center Jesús Usón (CCMIJU) in Cáceres, Spain. All experiments were performed in compliance with the “Guide for the care and use of laboratory animals” by the American Research Council, 2011 edition (<https://www.nap.edu/download/12910>) and the ARRIVE guidelines. At the end of the study protocol or when ethically indicated, the animals were sacrificed under deep anesthesia with intravenous injection of propofol (200 mg) followed by potassium chloride (2 mmol/kg). The specific clinical and behavioral signs used as endpoint criteria to indicate the euthanasia were the following: severe hepatic insufficiency, hyperactivity, and respiratory insufficiency with O₂ saturation < 85%.

Anesthesia Protocol

All animals underwent surgery under general anesthesia following a standard protocol. Briefly, animals received a patch of fentanyl and were fasted with free access to water 24 h before the operation. The next morning, pigs were first premedicated with ketamine 15 mg/kg i.m. Once sedated, they were transferred to the operating room, their weight and length were recorded, a thermal blanket was placed to avoid hypothermia and a peripheral vein in the ear was cannulated with a 20-22G tube. After preoxygenation with 100% oxygen, general anesthesia was induced with fentanyl (3 µg/kg i.v.), propofol (2–4 mg/kg i.v.), and atracurium (0.6 mg/kg i.v.). Subsequently, an intratracheal tube and a nasogastric tube were placed to facilitate the surgical procedure. Fluid therapy was performed with an i.v. infusion of 6–8 ml/kg/h of crystalloids. The colloid hydroxyethyl starch (Voluven®) was added when needed to maintain hemodynamic stability. If hypotension (MAP < 60 mmHg) occurred despite fluid therapy, intravenous boluses of ephedrine 5 mg or phenylephrine 0.1 mg were added to maintain MAP equal to or greater than 60 mmHg. After the hepatectomy, glycemia was hourly measured and a 10% glucose solution was administered to maintain glycemia over 100 mg/dl.

Measurement of Systemic and Hepatic Hemodynamics

Once anesthetized, the initial monitoring consisted of a one-lead electrocardiogram, pulse oximetry, capnography, and FiO₂. A femoral artery was cannalized with a PICCO® catheter, and the PiCCO2® monitor (Pulsion Medical System AG, Munich, Germany) was used for advanced hemodynamic monitoring. The central venous pressure (CVP) was measured through a bilumen catheter inserted into the jugular vein. The portal pressure (PP) was measured by direct puncture of the portal vein with a 25G needle connected to a pressure transducer (Fig. 2a), and the portal blood flow (PBF) and the hepatic arterial blood flow (HABF) were measured with a flow-meter per transit time probe (MediStim® AS, Oslo, Norway) (Fig. 2b). Portal-systemic pressure gradient (PSPG) was calculated as the difference between the CVP and PP. Other calculated variables included the HABF corrected by liver weight (HABF per 100 g), the PBF corrected by liver weight (PBF per 100 g), the total hepatic blood flow (THBF), the hepatic artery pulsatility index (PIa), the percentage of THBF that depends on the hepatic artery (HABF/THBF), and the percentage of THBF that depends on the portal vein (PBF/THBF).

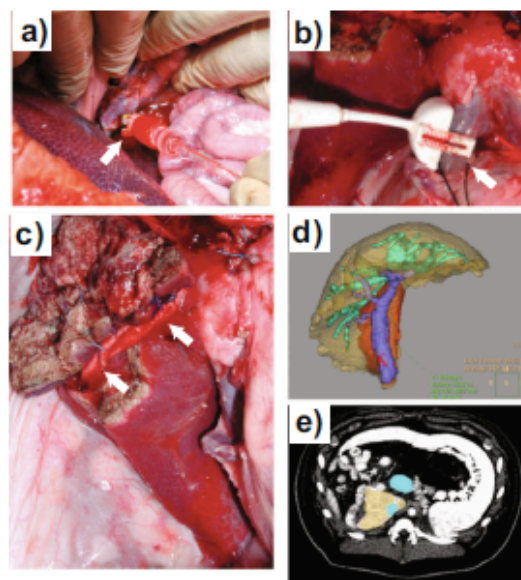


Fig. 2 Surgery and hepatic volumetry. The panels show representative images of the measurement of **a** the portal pressure (PP) (white arrow) and **b** the portal blood flow (PBF) (white arrow) before the hepatectomy using a flow-meter per transit time. **c** The hepatic remnant representing 10% of the initial liver mass, including the tourniquet used for the hepatic resection (white arrows), **d** reconstruction of the total hepatic volume including the liver mass planned to be resected (light brown), the estimated liver remnant (orange), and the volume occupied by vessels (light green) in a computerized tomography image used for hepatic volumetry, and **e** a computerized tomography image showing the liver remnant (light brown) and the big vessels (bright blue) after the hepatectomy

Surgical Procedure for Resecting 90% of Liver Mass

Animals were placed in supine position, draped in a sterile fashion and a J laparotomy was performed. After mobilization of the falciform ligament, dissection was carried out to expose the hepatic hilum. The portal vein and the hepatic artery were then dissected and isolated with a vessel loop to facilitate its identification during surgery, but no Pringle maneuver was performed. The hepatic resection consisted of a 90% hepatectomy following the technique described by Xia et al.,²⁰ except that a tourniquet was used to improve hemostasia as described by Kahn et al.²¹ Briefly, the falciform ligament, the left triangular ligament, and the lesser omentum were cut to allow the identification of hepatic veins and the mobilization of left liver lobes. Afterwards, an in-block resection of the left lateral (LLL), left medial (LML), and right medial (RML) lobes was performed by placing a tourniquet around the parenchyma at the origin of the three left lobes, which was fixed with interrupted prolene stitches of 1/0 and hemostasis suture with prolene threads of 0/0 resting on the tourniquet tape, and the transection was performed using Ligasure and EndoGIA

(Covidien, Minneapolis, MN), (Fig. 2c). Subsequently, the 90% hepatectomy was completed with the resection of the right lateral lobe (RLL). After confirming adequate hemostasis, the abdominal cavity was washed with sterile 0.9% saline, and the t-15 min measurements were taken. Finally, the laparotomy was closed in two levels with non-absorbable suture.

Measurement of Liver Function

Liver function was assessed by the indocyanine green (ICG) clearance test measured with the PiCCO2® monitor. It was expressed using the plasma disappearance rate per minute (PDR) and the retention rate at 15 min (R15) after an intravenous injection of 0.5 mg/kg of ICG.

Intracranial Pressure Monitoring

Intracranial pressure monitoring was performed by introducing an intraparenchymal brain sensor (Camino® Integra®) in three of the animals.²² Before and after surgery, a cranial CT scan was performed to assess the position of the sensor and the presence of signs of cerebral edema.²³ Boluses of pentothal (1–4 mg/kg) or mannitol 20% (0.25 a 1 g/kg/ 2–6 h) were administered when ICP increased over 20 mmHg.

Liver Volumetry

An abdominal CT scan with i.v. contrast was performed before and after the hepatectomy in four animals. The total hepatic volume and the estimated liver remnant volume were calculated on CT images (Philips CT Scanner Brilliance 6 slice). The calculation of the hepatic volumes was performed with a liver segmentation program (Philips Intellispace Portal) (Fig. 2d, e).

Histological Evaluation

Liver tissue samples were fixed in 10% buffered formalin and paraffin-embedded. Histological sections (6 µm thick) of liver tissue were stained with hematoxylin-eosin and Masson's trichrome, and evaluated blindly by two pathologists (IP, ES). A score of histological damage was elaborated from 7 parameters: congestion, hemorrhage, periportal edema, septal edema, endothelial detachment, necrosis, and apoptosis. Each parameter was scored no damage (0), low (1), moderate (2), and severe (3). The final Histological Damage Score was calculated as $\sum(\text{congestion} + 2 \times \text{hemorrhage} + \text{periportal edema} + \text{septal edema} + 2 \times \text{endothelial detachment} + 2 \times \text{necrosis} + 2 \times \text{apoptosis})$, in order to give more weight to the parameters reflecting more severe damage. Therefore, the score ranged from 0 to 33 points, considering histological damage a score ≥ 3 .

Statistical Analysis

Quantitative variables were expressed as median [interquartile range] and qualitative variables as percentage (%). Differences between time points (Bas vs. t-15 min, and Bas vs. t-24 h) were evaluated using paired *t* tests applying the Bonferroni correction for multiple comparisons. Correlations between two variables were assessed by Pearson test. A *p* value < 0.05 was considered statistically significant. The statistical analysis was performed using the SPSS version 20.0 (IBM Corporation, Armonk, NY) and Prism 7 for Windows (GraphPad Software, Inc).

Results

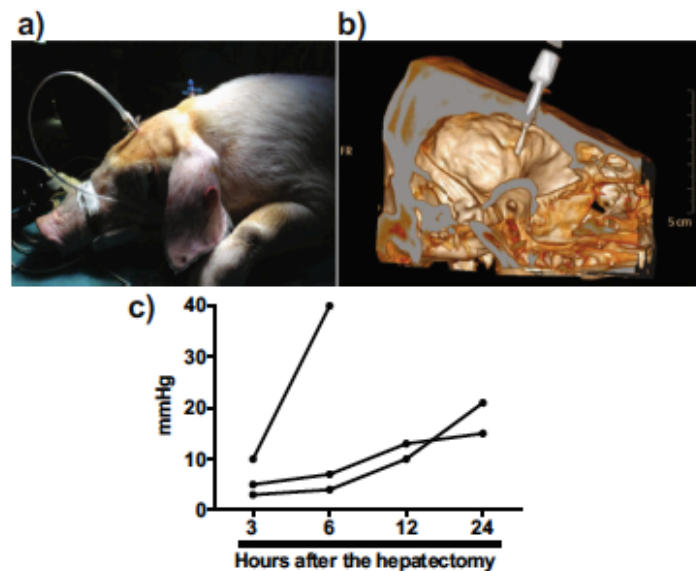
The 90% hepatectomy was completed successfully in all the animals, and all of them were hemodynamically stable at the end of the surgery. Body temperature slightly decreased during surgery (Bas, 36.9 °C [36.0–37.9] vs. t-15 min, 36.4 °C [35.0–37.1]; *p* = 0.004), but it recovered at 24 h (35.8 °C [35.2–37.5], *p* = 1.0 vs. Bas).

Surgery, Clinical Course, and Survival of Pigs Undergoing 90% Hepatectomy

The hepatectomy reduced the weight of the liver from 956 g [882–1019] (summing up the weights of the resected lobes, plus the liver remnant at sacrifice) to 168 g [140–182] (weight of the liver remnant at sacrifice) (*p* < 0.0001 Bas vs. t-24 h); calculated in this manner, the liver remnant represented 18.2% [14.3–19.1] of the total liver weight. Because the congestion and edema of the liver remnant may increase its weight when measured at 24 h, we performed CT scans in four animals before and immediately after the hepatectomy in order to determine the exact percentage of resection of liver mass. In these animals, the total liver volume was reduced from 1248 cc [1163–1474] at Bas to 129 cc [78–140] after the surgery (*p* = 0.0006), which represented 9.2% [6.2–11.2] of the initial liver volume (Fig. 2d, e).

Three animals underwent ICP monitoring, and in all of them ICP increased during the postoperative period (Fig. 3). One of the animals presented an increase of ICP from 10 mmHg at 3 h to 40 mmHg at 6 h, and died shortly thereafter. A second animal (without ICP monitoring) died at 12 h after the surgery due to a cardiac thrombotic complication. The remaining eight animals survived for 24 h. Of the ten animals, eight of them (80%) presented ascites at the necropsy.

Fig. 3 Measurement of intracranial pressure (ICP). The panels show representative images of a the placement of an intracranial pressure sensor in a pig, b a cranial computed tomography reconstruction verifying the position of the intracranial pressure sensor, and c the evolution of ICP after a 90% hepatectomy in the three animals undergoing ICP monitoring



Blood Laboratory Parameters

Compared with baseline measurements, the 90% hepatectomy resulted in some changes of blood laboratory parameters immediately after the surgery (t-15 min) and more extensive alterations 24 h later (t-24 h) (Table 1). The earliest alterations included decreases of the platelet count ($p = 0.006$), GGT ($p < 0.001$), and albumin ($p = 0.030$), and increases of glycemia ($p = 0.040$), AST ($p = 0.006$) and lactate ($p = 0.004$), which was associated with a trend to a lower pH ($p = 0.064$). At the 24-h time point, the animals presented decreases of hemoglobin ($p = 0.002$), hematocrit ($p = 0.003$), and albumin ($p = 0.023$), and increases of AST ($p = 0.035$), bilirubin ($p = 0.007$), AP ($p = 0.009$), and creatinine ($p = 0.017$). At this time point, the animals also presented coagulopathy (increase of prothrombin time ($p = 0.002$) and INR ($p < 0.001$)) and a persistent increase of blood lactate ($p = 0.042$).

Systemic Hemodynamic Parameters

All pigs remained hemodynamically stable early after the surgery (t-15 min), although they showed a trend to increase the heart rate (HR, $p = 0.080$) and the systolic volume index (SVI, $p = 0.067$) (Table 2). Twenty-four hours after the surgery, the pigs developed a hyperdynamic circulation with increased cardiac index (CI, $p = 0.039$) and HR ($p = 0.012$) and decreased mean arterial pressure (MAP, $p = 0.027$) and systemic vascular resistance index (SVRI, $p = 0.039$), as well as a trend to an increase of the cardiac function index (CFI, $p = 0.097$) (Table 2). Of note, no changes were observed at any time point

in other general hemodynamic parameters such as the central venous pressure (CVP), the global end-diastolic volume index (GEDV), the maximum rate of increase of arterial pressure (Dpmax), or the stroke volume variation (SVV), nor in hemodynamic parameters of the pulmonary circulation such as the extra vascular lung water index (ELWI).

Hepatic Hemodynamic Parameters

The 90% hepatectomy resulted in dramatic changes of hepatic hemodynamic parameters (Fig. 4). The resection of liver mass was accompanied by an immediate decrease of the THBF (Bas, 1030 mL/min [769–1165] vs. t-15 min, 398 mL/min [279–599]; $p < 0.001$), which resulted from a decrease of both the HABF (195 mL/min [171–490] vs. 45 mL/min [29–66], $p = 0.006$) and the PBF (585 mL/min [471–823] vs. 355 mL/min [240–566], $p = 0.044$). The changes of the HABF and the PBF, however, did not occur in the same proportion, resulting in a decrease of the HABF relative to the THBF (26% [21–46] vs. 10%, $p = 0.015$) with a corresponding relative increase of the PBF (Fig. 4a, b). Although the absolute values of hepatic blood flows were reduced, the hepatectomy resulted in relative hyperemia of the liver remnant, as shown by the marked increase of the PBF, but not of the HABF, relative to liver mass (PBF, Bas, 61 mL/min/100 g [53–87] vs. t-15 min, 204 mL/min/100 g [154–322]; $p = 0.003$; HABF, 21 mL/min/100 g [19–51] vs. 25 mL/min/100 g [21–40]; $p = 0.97$) (Fig. 4a, b). As a direct consequence of the relative hyperemia, the portal pressure (PP) increased immediately after the resection in all the animals (9.0 mmHg [7.0–13.5] vs. 22.0 mmHg

Table 1 Blood laboratory parameters at baseline (Bas), 15 min (t-15 min), and 24 h (t-24 h) after a 90% hepatectomy in pigs

	Baseline	t-15 min	<i>p</i> *	t-24 h	<i>p</i> #
Hemoglobin (g/dl)	9.9 [8.6–10.9]	8.7 [8.3–9.8]	0.144	7.1 [6.5–7.7]	0.002
Hematocrit (%)	30.3 [26.8–33.4]	26.3 [24.8–28.8]	0.184	22.6 [19.9–23.4]	0.003
Platelets (10 ³ μL)	350 [278–484]	311 [254–414]	0.006	241 [209–287]	0.188
Leukocytes (10 ³ μL)	19.0 [15.1–23.2]	14.6 [11.3–24.5]	1.0	28.5 [9.9–46.5]	0.206
PT (seg)	14.2 [9.5–14.9]	12.6 [9.8–14.9]	1.0	23.7 [19.7–26.4]	0.002
INR	0.93 [0.79–0.96]	0.93 [0.83–1.00]	0.304	1.96 [1.60–2.25]	< 0.001
APTT (seg)	18.2 [16.9–23.4]	16.6 [16.4–17.3]	0.106	21.3 [18.3–38.8]	0.320
Glucose (mg/dL)	110 [87–148]	186 [142–230]	0.040	147 [87–370]	0.426
ALT (U/L)	45 [34–55]	36 [28–51]	0.429	72 [41–115]	0.216
AST (U/L)	62 [53–81]	98 [74–149]	0.006	539 [321–717]	0.035
Bilirubin (mg/dL)	0.40 [0.15–0.55]	0.40 [0.25–0.70]	0.191	1.70 [1.40–2.10]	0.007
GGT (U/L)	42 [31–47]	34 [18–37]	< 0.001	40 [26–60]	0.381
AP (U/L)	265 [120–362]	258 [98–318]	0.714	611 [374–1133]	0.009
LDH (U/L)	1117 [681–1470]	1039 [574–1553]	1.0	2175 [1776–3446]	0.167
Albumin (g/dL)	2.40 [2.25–2.60]	1.95 [1.80–2.10]	0.030	2.05 [1.70–2.73]	0.023
Creatinine (mg/dL)	1.29 [0.68–2.13]	1.29 [0.79–2.14]	1.0	1.44 [1.09–3.97]	0.017
Urea (mg/dL)	30.5 [19.5–34.8]	24.0 [18.5–32.0]	0.352	22.0 [21.0–36.0]	1.0
Arterial pH	7.47 [7.45–7.55]	7.42 [7.35–7.47]	0.064	7.44 [7.37–7.46]	0.373
Lactate (mmol/L)	1.5 [1.1–1.6]	3.3 [3.1–3.7]	0.004	4.6 [3.4–7.4]	0.042

*t-15 min vs. Bas, #t-24 h vs. Bas. *P* values that are statistically significant or close to significance are shown in bold. ALT alanine aminotransferase, AP alkaline phosphatase, APTT activated partial thromboplastin time, AST aspartate aminotransferase, GGT gamma glutamyltransferase, INR international normalized ratio, LDH lactate dehydrogenase, PT prothrombin time

[17.3–24.0], *p* < 0.001), with most of them (*n* = 9, 90%) presenting a PP above 15 mmHg (Fig. 4c). The portal-systemic pressure gradient (PSPG) also increased accordingly (3.0 mmHg [3.0–4.5] vs. 15.0 mmHg [11.0–17.8], *p* < 0.001). Both the PP (*r* = -0.794, *p* = 0.006) and the PSPG (*r* = -0.732, *p* = 0.016) were negatively correlated with

the PBF. Interestingly, the PLa increased at this early time point (0.50 [0.38–0.90] vs. 4.30 [2.70–4.50], *p* = 0.001).

Most hepatic hemodynamic alterations, but not all, persisted at 24 h. Thus, THBF recovered (800 ml/min [502–1041], *p* = 0.488 vs. Bas), mostly due to the recovery of PBF (690 ml/min [443–1000], *p* = 1.0), while HABF tended to

Table 2 Systemic hemodynamic parameters at baseline (Bas), 15 min (t-15 min), and 24 h (t-24 h) after a 90% hepatectomy in pigs

	Baseline	t-15 min	<i>p</i> *	t-24 h	<i>p</i> #
HR (bpm)	85 [73–112]	124 [98–133]	0.080	140 [103–144]	0.012
MAP (mmHg)	86 [68–112]	81 [68–90]	0.353	66 [35–83]	0.027
CVP (mmHg)	5.0 [3.5–7.8]	5.5 [2.8–10.5]	1.0	7.0 [5.0–10.0]	1.0
CI (l/min/m ²)	2.98 [2.64–3.41]	2.76 [1.78–3.26]	1.0	3.44 [3.11–4.76]	0.039
CFI (l/min)	6.60 [4.38–7.53]	7.60 [6.95–8.85]	0.348	8.80 [6.45–13.35]	0.097
SVRI (dyn*s*cm ⁻⁵ m ²)	2368 [1633–2784]	2424 [1958–2806]	1.0	1302 [1090–1664]	0.039
GEDV (ml/m ²)	539 [448–749]	425 [297–480]	1.0	458 [330–516]	0.482
SVI (ml/m ²)	34.0 [27.5–47.0]	21.0 [11.5–29.0]	0.067	29.0 [25.3–45.0]	0.597
SVV (%)	24.5 [16.3–30.5]	20.5 [16.3–24.8]	0.282	23.0 [10.5–27.8]	1.0
Dpmax (mmHg/seg)	532 [310–623]	624 [275–831]	0.457	595 [380–960]	1.0
ELWI (ml/Kg)	12.00 [8.50–16.50]	11.00 [9.00–25.00]	0.655	13.00 [11.00–15.00]	1.0

*t-15 min vs. Bas, #t-24 h vs. Bas. *P* values that are statistically significant or close to significance are shown in bold. CI cardiac index, CFI cardiac function index, Dpmax maximum rate of increase in arterial pressure, ELWI extra vascular lung water index, GEDV global end-diastolic volume index, HR heart rate, MAP mean arterial pressure, SVRI systemic vascular resistance index, SVV stroke volume variation, SVI systolic volume index

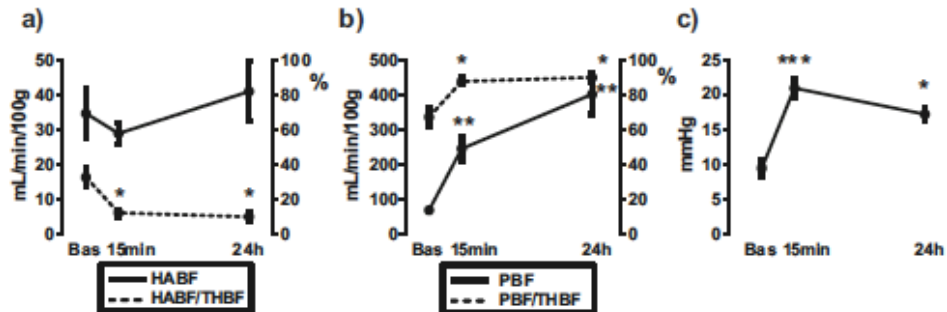


Fig. 4 Hepatic hemodynamics in pigs undergoing a 90% hepatectomy. The graphs show the values at baseline (Bas), 15 min, and 24 h after the surgery of **a** the hepatic arterial blood flow relative to liver weight (HABF, solid line, left axis) and as percentage of the total hepatic blood flow

(HABF/THBF, dotted line, right axis), **b** the portal blood flow relative to liver weight (PBF, solid line, left axis) and as percentage of the THBF (PBF/THBF, dotted line, right axis), and **c** the portal pressure. Mean \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ vs. Bas

remain decreased (59 ml/min [42–105], $p = 0.069$ vs. Bas). Still, the relative contributions of the HABF and the PBF to the THBF remained below (11% [4–13]) and above (89% [87–96]), respectively, compared with baseline values (both $p = 0.035$ vs. Bas) (Fig. 4a, b). Consequently, the relative portal hyperemia of the liver remnant further increased 24 h after the surgery (PBF, 399 ml/min/100 g [257–550], $p = 0.005$ vs. Bas) (Fig. 4b), and the PP (17.5 mmHg [15.5–18.5], $p = 0.014$ vs. Bas) (Fig. 4c) and the PSPG (10.0 mmHg [7.5–14.3], $p = 0.004$ vs. Bas) also remained elevated.

Liver Function

Liver function markedly worsened immediately after the hepatectomy, as shown by the decrease of PDR (Bas, 10.0 [8.1–16.5] vs. t-15 min, 4.2 [2.8–5.4]; $p = 0.027$) and the increase of R15 (Bas, 20.8 [4.7–26.0] vs. t-15 min, 53.3 [44.5–65.7]; $p = 0.003$) (Fig. 5a, b). Importantly, liver dysfunction persisted at the 24 h time point (PDR, 3.7 [3.2–4.6], $p = 0.018$ vs. Bas; R15, 57.4 [50.2–61.9], $p = 0.002$ vs. Bas).

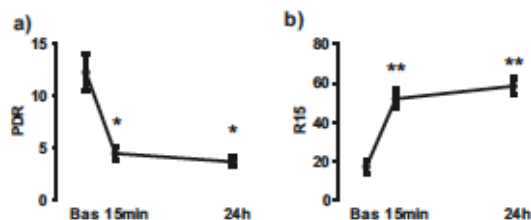


Fig. 5 Liver function in pigs undergoing a 90% hepatectomy. The graphs show the evolution of liver function at baseline (Bas), 15 min, and 24 h after the surgery evaluated by using the indocyanine green test to determine: **a** the plasma disappearance rate (PDR) and **b** the retention-15 (R15) parameter. Mean \pm SEM. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs. Bas

Histological Examination

Hepatic damage, as assessed by the Histological Damage Score, increased from 0.0 [0.0–1.25] to 5.5 [3–7.25] at t-15 min ($p = 0.002$ vs. Bas) and to 3.0 [1–6.75] at t-24 h ($p = 0.028$ vs. Bas). The histological changes at 24 h after surgery were positively correlated with the PP ($r = 0.689$ [0.105, 0.920], $p = 0.028$, Fig. 6a) and the HABF per 100 g of liver tissue ($r = 0.655$ [0.042, 0.909], $p = 0.040$, Fig. 6b) and inversely with the Pla ($r = -0.724$ [-0.956, 0.065], $p = 0.066$, Fig. 6c), all of them measured immediately after the resection of liver mass. Noteworthy, all animals with a PP above 20 mmHg early after the surgery showed histological damage (score ≥ 3) 24 h later (Fig. 6a).

Discussion

Establishing a preclinical model in a large experimental animal is crucial for increasing the understanding of the underlying mechanisms of the “Small-for-Size” syndrome and the posthepatectomy liver failure. In the present study, we characterized a model consisting of the resection of 90% of the hepatic parenchyma in pigs using a simplified and reproducible surgical technique and a comprehensive monitoring protocol. Remarkably, the model replicated the major analytical, hemodynamic, functional, and histological features of the “Small-for-Size” syndrome and posthepatectomy liver failure, as well as their extra-hepatic complications and mortality.

The “Small-for-Size” syndrome, resulting from the transplantation of liver grafts that are too small, and the posthepatectomy liver failure, resulting from excessive resections of liver mass, are both clinical entities characterized by the development of liver failure manifested as cholestasis, coagulopathy, encephalopathy, and ascites, frequently leading

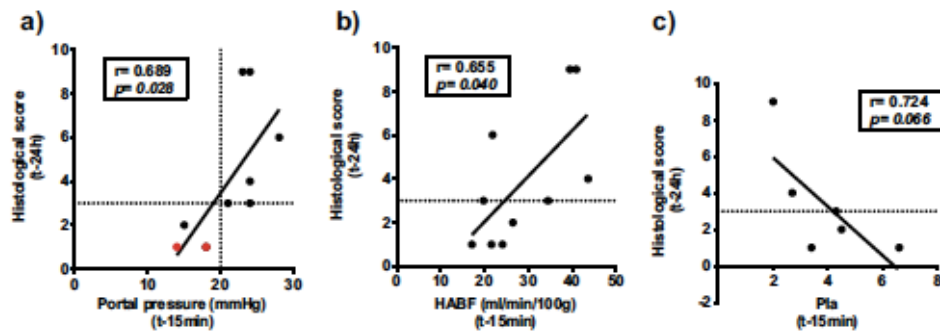


Fig. 6 Hepatic hemodynamic determinants of liver damage. The graphs show the relationship of the histological damage score evaluated 24 h after the surgery with **a** the portal pressure, **b** the hepatic arterial blood flow (HABF) relative to liver weight, and **c** the pulsatility index of the hepatic artery (Pla), all of them measured immediately after the hepatic

resection (t-15 min). **a-c** The dotted lines at $y = 3$ represent the value above which animals were considered to have histological damage. In **a**, a dotted line is also shown at $x = 20$ mmHg. The correlation between variables was evaluated by Pearson's test, and the solid lines represent the linear regression lines

to multi-organ failure and death.^{24–26} Here, we confirmed that pigs undergoing a 90% hepatectomy developed liver damage and dysfunction, as well as alterations in other organs such as the brain and kidneys. The development of liver damage was reflected analytically by early increases of transaminases in plasma accompanied by cholestasis (increased bilirubin and AP) 24 h after the surgery. The peak of liver enzymes was lower in comparison with the reported in a porcine model of transplantation of small-size grafts, probably because of the additional deleterious effects of ischemia-reperfusion damage in the later.¹⁶ Liver damage was also confirmed histologically by the presence of characteristic alterations, which included sinusoidal congestion, periportal and periseptal edema, and perisinusoidal hemorrhage.^{27,28} The development of liver dysfunction was supported by the appearance of coagulopathy (increased INR and PT) and hypoalbuminemia, and by the decrease of PDR and increase R15 of indocyanine green, which have been similarly reported in pigs undergoing transplantation of small-size liver grafts.¹⁶ The decrease of liver function was observed almost immediately after the resection of liver mass and it persisted at the 24-h time point, when ascites was also noted in most of the animals. Finally, we also observed the following extra-hepatic alterations: (i) the increase of creatinine suggestive of kidney failure, (ii) the progressive increases of ICP refractory to mannitol and pentothal in the 3 individual animals undergoing ICP monitoring (leading to early death by brain herniation in one of them), resembling findings reported in pigs undergoing total hepatectomies,²³ and (iii) the development of hyperdynamic circulation (increased heart rate, CI and CFI, and decreased MAP and SVRI) and hyperlactatemia, which are commonly observed in patients with acute liver failure. In summary, the present model reproduced the most common alterations that define the syndromes of “Small-for-Size” and posthepatectomy liver failure.

Rather than renaming the previous clinical entities, the term “Small-for-Flow” syndrome aims to reflect the crucial role of hepatic hemodynamics for the development of liver failure in hepatic surgeries. A major strength of the present model was the reproduction of such alterations, which included the portal hyperperfusion of the liver remnant, the relative decrease of HABF, and the increase of PP and PSPG. Of note, these alterations developed in the setting of stable physiological parameters (glycemia, arterial blood gases) and of the hyperdynamic circulation that frequently accompanies liver failure. These observations enhance the preclinical value of the model, which allows a thorough evaluation of the effects of potential interventions for preventing/treating the “Small-for-Size” syndrome and the postoperative liver failure. Both the PBF and the PP (or the PSPG) are important parameters to assess the hemodynamic stress of the liver remnant or liver graft. Although PSPG avoids the influence of central venous pressure in the calculation and has been reported to correlate better with PBF than PP,²⁹ both PP and PSPG were significantly correlated with PBF in our study. Importantly, our results suggest that “pressure” parameters are preferable to “flow” parameters for predicting the extent of the liver damage. Of note, absolute blood flow (ml/min) is not fully informative because the normal value varies with the body mass of the individual and, therefore, a specific threshold is unlikely to be universally valid for all patients. Additionally, blood flow per liver mass (ml/min/100 g) is only available in the case of liver grafts, but not in the case of hepatic resections as the weight of the liver remnant is unknown. As revealed in the present study by the discordance with the volumetric evaluation, the weight of the liver remnant several hours after the surgery did not reflect the original weight, probably due to the influence of ongoing edema and congestion. Because of this reason, the values of blood flow per 100 g of liver tissue in the present study were probably slightly underestimated. Contrary to “flow”

parameters, the “pressure” parameters (PP or PSPG) may directly reflect the adequacy of blood flow and the accommodating capacity of the liver remnant regardless of the remaining liver mass or the body mass of the individual. In agreement with this notion, PP was directly correlated with the histological damage score, and all animals presenting PP above 20 mmHg immediately after the resection developed liver injury 24 h later. Finally, the HABF per 100 g and the Pfa, an indicator of the difficulty of the arterial blood to cross the sinusoid, were also correlated with the degree of histological damage. These measurements, which can be easily measured with a flow-meter probe, could thus be helpful for improving the prediction of liver injury in hepatic surgery.

The main weakness of our study was the lack of follow-up after 24 h, which was difficult to implement due to the highly demanding postoperative care. In our experience, the model requires a multidisciplinary team with high experience in hepatobiliary surgery and critical care, as these animals need to be sedated and managed in an intensive care unit similar to what is performed in humans. This limitation, however, does not diminish the validity of the study, as it is important to emphasize that the “Small-for-Flow” syndrome is defined by intraoperative parameters and the present model reproduced all the characteristic hemodynamic alterations and allowed the assessment of relevant clinical and hemodynamic endpoints. Nonetheless, additional studies with a longer follow up will be important to assess the final impact of potential interventions, such as splenic embolization, regenerative preconditioning, and somatostatin infusion.

Conclusion

The porcine hepatectomy model reported here was feasible and reproducible, and it faithfully recreated the pathophysiology of the “Small-for-Size” syndrome and the postoperative liver failure, representing a useful tool for studying their prediction, prevention, diagnosis, and management. The study also suggested that PP is preferable to PBF for prognosis and therapeutic guidance. Importantly, the adequate performance of the model required a multidisciplinary team and the combined evaluation of clinical, laboratory, hemodynamic, and histopathological findings.

Authors Contribution Acquisition of data and drafting the work and final approval and agreement to be accountable for the work: Pablo Lozano, Miguel A. Steiner, Álvaro Morales, Juan Laso, Inma Hernández, Isabel Peligros, Emma Sola, Carlos Carballeda, Elena Vara

Acquisition, analysis, and interpretation of data and drafting and revising and final approval and agreement to be accountable for the work: Maitane I. Orue-Echebarria, Javier Vaquero, Cristina J. Lisbona

Conception, design, acquisition, analysis, and interpretation and revising and final approval and agreement to be accountable for the work: José M. Asencio, José A. López-Baena, José L. García Sabrido, Luis Olmedilla

Funding Information This study is supported by a grant of the Sociedad Española de Trasplante Hepático (SETH) to J.M.A. J.V. was supported by a grant from ISCIII-Fondos FEDER “Una manera de hacer Europa” (PI15/1083) from Spain.

Compliance with Ethical Standards

Conflict of Interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

References

- Allard M-A, Adam R, Bucur P-O, Termos S, Cunha AS, Bismuth H, et al. Posthepatectomy portal vein pressure predicts liver failure and mortality after major liver resection on noncirrhotic liver. *Ann Surg*. 2013; 258: 822–829.
- Selzner M, Kashfi A, Cattral MS, Selzner N, Greig PD, Lilly L, et al. A graft to body weight ratio less than 0.8 does not exclude adult-to-adult right-lobe living donor liver transplantation. *Liver Transpl*. 2009; 15: 1776–1782.
- Kaido T, Mori A, Ogura Y, Hata K, Yoshizawa A, Iida T, et al. Lower limit of the graft-to-recipient weight ratio can be safely reduced to 0.6% in adult-to-adult living donor liver transplantation in combination with portal pressure control. *Transplant. Proc*. 2011; 43: 2391–2393.
- Sato Y, Yamamoto S, Oya H, Nakatsuka H, Tsukahara A, Kobayashi T, et al. Splenectomy for reduction of excessive portal hypertension after adult living-related donor liver transplantation. *Hepato-gastroenterology*. 2002; 49: 1652–1655.
- Shoreem H, Gad EH, Soliman H, Hegazy O, Saleh S, Zakaria H, et al. Small for size syndrome difficult dilemma: lessons from 10 years single centre experience in living donor liver transplantation. *World J Hepatol*. 2017; 9: 930–944.
- Nguyen JH, Harnois DM. Incidence and outcome of small-for-size liver grafts transplanted in adult recipients. *Transplant. Proc*. 2018; 50: 198–201.
- Nagano Y, Nagahori K, Kamiyama M, Fujii Y, Kubota T, Endo I, et al. Improved functional reserve of hypertrophied contra lateral liver after portal vein ligation in rats. *J Hepatol*. 2002; 37: 72–77.
- Sethi P, Thillai M, Thankamonyamma BS, Mallik S, Gopalakrishnan U, Balakrishnan D, et al. Living donor liver transplantation using small-for-size grafts: does size really matter? *J Clin Exp Hepatol*. 2018; 8: 125–131.
- Boillot O, Delafosse B, Méchet I, Boucaud C, Pouyet M. Small-for-size partial liver graft in an adult recipient; a new transplant technique. *Lancet*. 2002; 359: 406–407.
- Yagi S, Iida T, Hori T, Taniguchi K, Yamamoto C, Yamagiwa K, et al. Optimal portal venous circulation for liver graft function after living-donor liver transplantation. *Transplantation*. 2006; 81: 373–378.
- Troisi R, de Hemptinne B. Clinical relevance of adapting portal vein flow in living donor liver transplantation in adult patients. *Liver Transpl*. 2003; 9: S36–41.
- Troisi R, Ricciardi S, Smeets P, Petrovic M, Van Maele G, Colle I, et al. Effects of hemi-portocaval shunts for inflow modulation on the outcome of small-for-size grafts in living donor liver transplantation. *Am. J. Transplant*. 2005; 5: 1397–1404.
- Asencio JM, Vaquero J, Olmedilla L, García Sabrido JL. “Small-for-flow” syndrome: shifting the “size” paradigm. *Med. Hypotheses*. 2013; 80: 573–577.

14. Court FG, Wemyss-Holden SA, Morrison CP, Teague BD, Laws PE, Kew J, et al. Segmental nature of the porcine liver and its potential as a model for experimental partial hepatectomy. *Br J Surg.* 2003; 90: 440–444.
15. Golriz M, Fonouni H, Nickkholgh A, Hafezi M, Garoussi C, Mehrabi A. Pig kidney transplantation: an up-to-date guideline. *Eur Surg Res.* 2012; 49: 121–129.
16. Fondevila C, Hesseimer AJ, Taurá P, Sánchez O, Calstayud D, de Riva N, et al. Portal hyperperfusion: mechanism of injury and stimulus for regeneration in porcine small-for-size transplantation. *Liver Transpl.* 2010; 16: 364–374.
17. Asencio JM, García-Sabrido JL, López-Baena JA, Olmedilla L, Peligros I, Lozano P, et al. Preconditioning by portal vein embolization modulates hepatic hemodynamics and improves liver function in pigs with extended hepatectomy. *Surgery.* 2017; 161: 1489–1501.
18. Asencio JM, García Sabrido JL, Olmedilla L. How to expand the safe limits in hepatic resections? *J Hepatobiliary Pancreat Sci.* 2014; 21: 399–404.
19. Molikam K, Darnis B, Mabrut J-Y. Porcine models for the study of small-for-size syndrome and portal inflow modulation: literature review and proposal for a standardized nomenclature. *J Hepatobiliary Pancreat Sci.* 2016; 23: 668–680.
20. Xia Q, Lu T-F, Zhou Z-H, Hu L-X, Ying J, Ding D-Z, et al. Extended hepatectomy with segments I and VII as resection remnant: a simple model for small-for-size injuries in pigs. *HBPDI NT.* 2008; 7: 601–607.
21. Kahn D, Hickman R, Terblanche J, von Sommoggy S. Partial hepatectomy and liver regeneration in pigs—the response to different resection sizes. *J. Surg. Res.* 1988; 45: 176–180.
22. Kaiser GM, Frühauf NR. Method of intracranial pressure monitoring and cerebrospinal fluid sampling in swine. *Lab. Anim.* 2007; 41: 80–85.
23. Frühauf NR, Radunz S, Grabelius F, Laube T, Uerschels AK, Kaiser GM. Neuromonitoring in a porcine model of acute hepatic failure. *Lab. Anim.* 2011; 45: 174–178.
24. Dahm F, Georgiev P, Clavien P-A. Small-for-size syndrome after partial liver transplantation: definition, mechanisms of disease and clinical implications. *Am. J. Transplant.* 2005; 5: 2605–2610.
25. Rahbari NN, Garden OJ, Padbury R, Brooke-Smith M, Crawford M, Adam R, et al. Posthepatectomy liver failure: a definition and grading by the International Study Group of Liver Surgery (ISGLS). *Surgery.* 2011; 149: 713–724.
26. Qadan M, Garden OJ, Corvera CU, Visser BC. Management of postoperative hepatic failure. *J. Am. Coll. Surg.* 2016; 222: 195–208.
27. Demetris AJ, Kelly DM, Eghtesad B, Fontes P, Wallis Marsh J, Tom K, et al. Pathophysiologic observations and histopathologic recognition of the portal hyperperfusion or small-for-size syndrome. *Am. J. Surg. Pathol.* 2006; 30: 986–993.
28. Kelly DM, Demetris AJ, Fung JJ, Marcos A, Zhu Y, Subbotin V, et al. Porcine partial liver transplantation: a novel model of the “small-for-size” liver graft. *Liver Transpl.* 2004; 10: 253–263.
29. Sainz-Barriga M, Scudeller L, Costa MG, de Hemptinne B, Troisi RI. Lack of a correlation between portal vein flow and pressure: toward a shared interpretation of hemodynamic stress governing inflow modulation in liver transplantation. *Liver Transpl.* 2011; 17: 836–848.

11.2 Participación en congresos

COMUNICACIONES ORALES EN CONGRESOS NACIONALES

- “Precondicionamiento regenerativo hepático en un modelo porcino: una estrategia para incrementar los límites de resección hepática máxima”. En la XXI Reunión Nacional de Cirugía del 18-20 de octubre de 2017 en Málaga. **(1º autor)**

COMUNICACIONES ORALES EN CONGRESOS INTERNACIONALES

- “Preconditioning by portal vein embolization an hepato-protective strategy for extended hepatic resections”. En el 53rd Congress of the European Society for Surgical Research (ESSR 2018) en Madrid del 30 de mayo al 2 de junio de 2018. **(1º autor) – En la sesión de mejores Comunicaciones orales del congreso**
- “Preconditioning by portal vein embolization an hepato-protective strategy for extended hepatic resections”. En el 14th Annual Academic Surgical Congress (ASC) en Houston (Texas, USA) del 5 al 7 de febrero de 2019. **(1º autor) – Como invitada especial por el premio Walter Brendel.**

COMUNICACIONES TIPO PÓSTER EN CONGRESOS INTERNACIONALES

- “Establishing a porcine model of Small for Flow Syndrome”. En el 27th International Congress of The Transplantation Society (TTS) en Madrid del 30 de junio al 5 de julio de 2018. **(1º autor)**

COMUNICACIONES EN CONGRESOS PUBLICADAS EN REVISTAS NACIONALES:

- Orue-Echebarria, M; Asencio, JM; Lozano, P; Moreno, A; Olmedilla, L; Carballal, C; Hermes, L; López-Baena, JA. “Precondicionamiento regenerativo hepático en un modelo porcino: una estrategia para incrementar los límites de resección hepática máxima”. CIR ESP. 2017;95(Espec Congr):60

COMUNICACIONES EN CONGRESOS PUBLICADAS EN REVISTAS INTERNACIONALES:

- Orue-Echebarria, M; Lozano, P; Olmedilla, L; Carballal, C; Peligros, I; Sola, E; Laso, J; Lisbona, C; Vaquero, J; Asencio, JA. “Establishing a porcine model of “Small for Flow Syndrome””. Transplantation: July 2018 - Volume 102 - Issue - p S914. doi: 10.1097/01.tp.0000544024.78018.c7

COMUNICACIONES PREMIADAS:

- **2018 Walter Brendel Award of the European Society for Surgical Research.**
Por la comunicación oral “Preconditioning by portal vein embolization an hepatoprotective strategy for extended hepatic resections” del 53rd Congress of the European Society for Surgical Research (ESSR 2018).

11.3 Tablas

En el siguiente apartado se exponen datos intermedios y tablas de menor relevancia para los resultados del presente trabajo. El orden se corresponde con la aparición de los resultados en el texto.

En estas tablas aparece la palabra Bas, para el momento Bas; la cifra 90, para referirse al momento H15', haciendo relación a la hepatectomía del 90%; y la cifra 24, para referirse al momento H24h.

Además, que la variable bioquímica vaya seguida de WB significa que ha sido medida mediante la técnica de Western Blot, y que aparezca PCR, que ha sido medida mediante la reacción en cadena de la polimerasa.

GRUPO CONTROL

Tabla 6.	Error estándar de la media						
	Media	Mediana	Desviación estándar	Rango	Mínimo	Máximo	
TNF_PCR_Bas	,44660	,11124	,354058871	,314646664	,886503341	,141610486	1,02811383
TNF_PCR_90	,74270	,05500	,759745811	,155558801	,503017258	,495686544	,998703802
TNF_PCR_24	1,8770	,22875	1,84623888	,646997836	1,53425585	1,21682778	2,75108364
TNF_WB_Bas	,29863	,04321	,313003772	,114319288	,324276411	,151171968	,475448379
TNF_WB_90	,84542	,12294	,779608936	,325269437	,857930251	,457140582	1,31507083
TNF_WB_24	1,7721	,23204	1,55100000	,613920770	1,83069645	1,05085116	2,88154761
MCP1_PCR_Bas	,86809	,10251	,962925000	,307542897	,976275533	,136313467	1,11258900
MCP1_PCR_90	,98678	,13178	1,08971099	,395353352	1,23234780	,308676309	1,54102411
MCP1_PCR_24	1,9622	,22540	1,73679632	,676191726	2,25001349	1,29656671	3,54658020
MCP1_WB_Bas	,93127	,08241	,927472628	,218041211	,655606358	,500101567	1,15570793
MCP1_WB_90	1,0930	,08785	1,10662441	,232424528	,594112353	,776144126	1,37025648
MCP1_WB_24	1,7049	,10436	1,58603031	,276111326	,800992248	1,41185476	2,21284701
IL1_PCR_Bas	1,1753	,24687	1,05834900	,698266459	1,85247014	,305130860	2,15760100
IL1_PCR_90	2,7478	,31383	2,58246274	,887658214	2,68180268	1,87072146	4,55252414
IL1_PCR_24	3,4765	,16299	3,58238869	,461002202	1,34074318	2,66522173	4,00596490
IL1_WB_Bas	,33040	,03008	,318637231	,079583400	,215334879	,235691121	,451026000
IL1_WB_90	,92230	,09578	,896815906	,253408833	,741746903	,694304111	1,43605101
IL1_WB_24	1,7966	,22829	1,68845780	,603997339	1,83541173	1,02066880	1,11258900
IL10_PCR_Bas	1,2339	,09052	1,23194827	,271551615	,939730768	,595376837	1,53510761
IL10_PCR_90	1,1807	,06979	1,18870004	,209382446	,689789109	,964089222	1,65387833
IL10_PCR_24	1,2035	,05874	1,20488900	,176216685	,482232403	,980374001	1,46260640
IL10_WB_Bas	4,5377	,67968	4,41637173	1,79827077	5,28583402	1,79931139	7,08514541
IL10_WB_90	3,6085	,32036	3,95813762	,847602565	2,41274896	2,03156704	4,44431600
IL10_WB_24	1,9615	,18788	1,90120466	,497077338	1,67762843	1,26596686	2,94359529
eNOS_PCR_Bas	1,3529	,14396	1,35254641	,431869138	1,56216942	,379915374	1,94208479
eNOS_PCR_90	1,4758	,11105	1,33456670	,333163081	,998416770	1,21816000	2,21657677
eNOS_PCR_24	,82635	,10339	,746824436	,310167253	1,07724068	,509646825	1,58688750
eNOS_WB_Bas	4,3787	,95632	4,64591700	2,53018330	6,27562847	,904520833	7,18014930
eNOS_WB_90	3,8634	,14501	3,80126120	,383657692	1,18300985	3,46164542	4,64465527
eNOS_WB_24	1,6095	,27419	1,49141599	,725439360	2,01613310	,628581032	2,64471413
iNOS_PCR_Bas	,55553	,07547	,605521462	,226420050	,678329745	,172091769	,850421514
iNOS_PCR_90	,87393	,11261	,788946841	,337836230	,984094903	,458877735	1,44297264
iNOS_PCR_24	,62423	,06303	,670930000	,189101189	,586085501	,386444552	,972530053
iNOS_WB_Bas	,49725	,04152	,503595600	,109840316	,337699736	,293396039	,631095775
iNOS_WB_90	,61985	,06698	,546554000	,177214695	,520319107	,440732938	,961052045
iNOS_WB_24	,74577	,09946	,787665400	,263142085	,802289863	,188221810	,990511673
Casp3_WB_Bas	2,3275	,42546	2,42453724	,951366932	2,53553765	,758779426	3,29431708
Casp3_WB_90	2,3408	,47807	2,34594132	1,06899673	2,90808871	,731487366	3,63957608
Casp3_WB_24	3,1781	,28347	3,28452343	,633852566	1,67516523	2,10670134	3,78186657
Casp3act_WB_Bas	,25237	,04973	,313003772	,111201628	,249261155	,115671271	,364932426
Casp3act_WB_90	,27515	,08133	,275151395	,181858693	,476304200	,077960894	,554265094
Casp3act_WB_24	,75318	,15248	,706329155	,340947810	,856906819	,457140582	1,31404740

GRUPO CONTROL

Tabla 7.	Error estándar de la media						
	Media	Mediana	Desviación estándar	Rango	Mínimo	Máximo	
IL4_WB_Bas	1,15152280	,311994271	1,16572863	,825459252	2,48018131	,369391268	2,84957258
IL4_WB_90	,916517230	,203922073	,789275355	,539527091	1,70162509	,330604648	2,03222974
IL4_WB_24	,655785888	,134711213	,682327695	,356412368	,890455072	,178547122	1,06900219
IL5_WB_Bas	1,47430501	,123297928	1,49905200	,326215655	1,05462988	,940369451	1,99499933
IL5_WB_90	1,00942939	,133807442	1,00977310	,354021215	1,06407745	,500756723	1,56483417
IL5_WB_24	1,21485684	,103697690	1,15084047	,274358299	,609910265	,912296763	1,52220703
IL6_WB_Bas	1,34016168	,099980720	1,24715385	,264524121	,726302803	1,06837448	1,79467728
IL6_WB_90	1,81235352	,091623305	1,92279868	,242412480	,579178535	1,45194216	2,03112069
IL6_WB_24	1,73229018	,284862135	1,75066372	,753674367	2,38445573	,523096342	2,90755207
IL8_WB_Bas	9,78590032	,338848513	9,78708960	,896508897	2,78818057	8,71961606	11,5077966
IL8_WB_90	14,6708855	,612004089	14,2593127	1,61921062	4,68449288	12,6265424	17,3110352
IL8_WB_24	15,3722564	1,19300095	15,5356078	3,15638381	8,60651258	11,0957419	19,7022545
ATP_Bas	4,06151120	,213234754	3,91333300	,564166129	1,74696992	3,26104808	5,00801800
ATP_90	2,17017143	,051903930	2,11010000	,137324891	,348500000	2,06520000	2,41370000
ATP_24	1,17877143	,056477748	1,11540000	,149426077	,392700000	1,00820000	1,40090000
ADP_Bas	1,31955714	,065843917	1,37510000	,174206629	,482900000	1,00880000	1,49170000
ADP_90	2,80741429	,061851949	2,86140000	,163644874	,409100000	2,57140000	2,98050000
ADP_24	3,24277143	,083330980	3,21870000	,220473050	,563200000	2,96190000	3,52510000
AMP_Bas	,846242857	,041278259	,881800000	,109212009	,313000000	,667800000	,980800000
AMP_90	1,25712857	,037968525	1,25160000	,100455276	,337000000	1,09210000	1,42910000
AMP_24	1,89237143	,025221738	1,87210000	,066730446	,191500000	1,79390000	1,98540000
Bas_Ratio ATP:ADP	3,17639763	,344213134	2,93507313	,910702351	2,76211140	2,20220248	4,96433188
90_Ratio ATP:ADP	,775451975	,026067575	,778556888	,068968321	,198684800	,694715652	,893400452
24_Ratio ATP:ADP	,362947625	,011806120	,358418583	,031236058	,088406050	,321501487	,409907537
CargaEnergética_Bas	,756724718	,013563401	,753982137	,035885387	,099831052	,699230151	,799061203
CargaEnergética_90	,573084588	,004322429	,573231371	,011436072	,036289927	,55722842	,592012770
CargaEnergética_24	,442868855	,006072230	,440920476	,016065611	,037800124	,425047645	,462847769

GRUPO PRECONDICIONAMIENTO

Tabla 8.	Error estándar de la media						
	Media	Mediana	Desviación estándar	Rango	Mínimo	Máximo	
TNF_PCR_Bas	,47234	,05802	,477454052	,164108457	,50945964	,243163737	,752623374
TNF_PCR_90	,82047	,09010	,834636753	,254840879	,69778868	,428725163	1,12651384
TNF_PCR_24	1,0697	,04903	1,03330386	,098052483	,21200000	1,00000000	1,21200000
TNF_WB_Bas	,33848	,05840	,334022884	,154509207	,52143194	,104996166	,626428103
TNF_WB_90	,83057	,07395	,873316000	,195649296	,63367877	,426305527	1,05998429
TNF_WB_24	,56936	,03625	,579356836	,062784837	,12437064	,502179357	,626550000
MCP1_PCR_Bas	,96403	,13814	1,17367289	,414422846	1,0811443	,303431853	1,38457619
MCP1_PCR_90	1,0126	,13579	1,06529279	,407361032	1,1737927	,396735665	1,57052837
MCP1_PCR_24	1,0007	,00288	1,00142262	,005762878	,01386306	,993092495	1,00695555
MCP1_WB_Bas	,72906	,05751	,699540034	,152163449	,41572428	,496337463	,912061745
MCP1_WB_90	,86817	,13134	,675619500	,347495505	,96629187	,644258496	1,61055037
MCP1_WB_24	,64811	,08383	,569343337	,145205571	,25636991	,559310093	,815680000
IL1_PCR_Bas	1,0747	,14623	1,19262794	,438675453	1,4115478	,316195532	1,72774331
IL1_PCR_90	1,4021	,33162	1,33503263	,994850697	3,4130785	,073652331	3,48673084
IL1_PCR_24	1,0910	,04653	1,05144450	,093060029	,19689000	1,03221000	1,22910000
IL1_WB_Bas	,35015	,06772	,289341034	,179161722	,54250855	,179722603	,722231148
IL1_WB_90	,79101	,15248	,798154700	,403426086	1,1356618	,250178718	1,38584055
IL1_WB_24	,90729	,06317	,906658400	,109415849	,21882900	,798185832	1,01701483
IL10_PCR_Bas	1,2427	,25450	1,06724314	,763510220	2,3358011	,229074518	2,56487566
IL10_PCR_90	1,2931	,32957	,808741192	,988695631	3,2789241	,298075561	3,57699971
IL10_PCR_24	1,0028	,01226	1,00512747	,024510041	,05892603	,970970924	1,02989696
IL10_WB_Bas	4,3533	,33073	4,57008200	,875037995	2,5055091	2,87944023	5,38494936
IL10_WB_90	3,6234	,51417	3,90544870	1,36036980	3,4256698	1,82392943	5,24959919
IL10_WB_24	1,8016	,00762	1,79808842	,013193297	,02566451	1,79056549	1,81623000
eNOS_PCR_Bas	1,2974	,04592	1,28544329	,137767489	,42089331	1,07891419	1,49980750
eNOS_PCR_90	1,4052	,09514	1,30676000	,285412655	,86713784	1,00423985	1,87137769
eNOS_PCR_24	1,4092	,13385	1,43398038	,267701740	1,65012046	1,05944122	1,70956168
eNOS_WB_Bas	4,6670	,60160	4,30655780	1,59169057	4,5147946	2,65259198	7,16738660
eNOS_WB_90	3,6878	,26146	3,81444246	,691752642	1,6593680	2,96138104	4,62074900
eNOS_WB_24	4,8541	,18775	4,83108800	,325200862	,64918082	4,54099400	5,19017482
iNOS_PCR_Bas	,47217	,05117	,470820000	,153510236	,50945964	,243163737	,752623374
iNOS_PCR_90	,73421	,13502	,639063070	,405057932	1,3905129	,131784262	1,52229715
iNOS_PCR_24	,80272	,12263	,851190534	,245268978	,50191554	,503296604	1,00521214
iNOS_WB_Bas	,55727	,08002	,519797000	,211722717	,65699182	,331752397	,988744217
iNOS_WB_90	,48584	,09100	,462267788	,240771018	,77041461	,164595487	,935010100
iNOS_WB_24	,53841	,02189	,523853940	,037907787	,07150000	,509940000	,581440000
Casp3_WB_Bas	2,4716	,28316	2,69926881	,633171785	1,5539832	1,52912545	3,08310867
Casp3_WB_90	2,6471	,35036	2,65431900	,783438166	1,9362606	1,70042214	3,63668275
Casp3_WB_24	3,1988	,26510	3,03688000	,592781879	1,5153242	2,70275000	4,21807420
Casp3act_WB_Bas	,25334	,06571	,243830519	,146931857	,36974407	,105704307	,475448379
Casp3act_WB_90	,28640	,07813	,312491799	,174707022	,44511495	,038001145	,483116091
Casp3act_WB_24	,29533	,05315	,297000000	,118850681	,31497307	,104996166	,419969233

GRUPO PRECONDICIONAMIENTO

Tabla 9.	Error estándar de la media						
	Media	Mediana	Desviación estándar	Rango	Mínimo	Máximo	
IL4_WB_Bas	1,28953605	,227431028	1,27742000	,601725940	1,76469849	,500430248	2,26512874
IL4_WB_90	,923681881	,103842516	,981800100	,274741473	,811813689	,422967611	1,23478130
IL4_WB_24	,701030453	,102628959	,699872000	,177758571	,355511479	,523853940	,879365419
IL5_WB_Bas	1,57332560	,252034252	1,54933000	,666819952	2,18044041	,587362897	2,76780331
IL5_WB_90	1,14084829	,109546505	1,12246000	,289832810	,937406380	,626134350	1,56354073
IL5_WB_24	1,25615935	,006920267	1,25684163	,011986253	,023943361	1,24384653	1,26778989
IL6_WB_Bas	1,21163424	,141593553	1,24605951	,374621328	1,17102558	,636299456	1,80732504
IL6_WB_90	1,42761188	,401803331	1,30113000	1,06307169	3,34331274	,317645204	3,66095794
IL6_WB_24	1,29755356	,158895716	1,35517590	,275215454	,541306919	,998088927	1,53939585
IL8_WB_Bas	9,65682706	,666289012	9,65887553	1,76283503	5,56845826	6,83702922	12,4054875
IL8_WB_90	9,53031321	,430004567	9,64577400	1,13768515	3,53198956	7,76117964	11,2931692
IL8_WB_24	10,0338620	,026885101	10,0244510	,046566362	,091695150	9,99272000	10,0844152
ATP_Bas	3,90427143	,167250983	3,94730000	,442504507	1,28310000	3,22200000	4,50510000
ATP_90	2,77900000	,062382648	2,79710000	,165048973	,418200000	2,57790000	2,99610000
ATP_24	2,08630000	,024697638	2,06550000	,042777564	,077600000	2,05790000	2,13550000
ADP_Bas	1,36787143	,021478314	1,34540000	,056826277	,135500000	1,30560000	1,44110000
ADP_90	2,40741429	,012279414	2,40910000	,032488276	,100900000	2,35700000	2,45790000
ADP_24	2,87176667	,227532425	3,06550000	,394097721	,713200000	2,41830000	3,13150000
AMP_Bas	,989342857	,020537061	1,01410000	,054335957	,149200000	,904200000	1,05340000
AMP_90	1,04010000	,028701518	1,06820000	,075937079	,210700000	,901900000	1,11260000
AMP_24	1,42796667	,122404049	1,36050000	,212010031	,407600000	1,25790000	1,66550000
Bas_Ratio ATP:ADP	2,86561773	,151176028	2,98455067	,399974175	1,11272878	2,23579210	3,34852089
90_Ratio ATP:ADP	1,15463111	,027134305	1,17028576	,071790623	,194837293	1,04882217	1,24365946
24_Ratio ATP:ADP	,735566731	,057749454	,681941562	,100024989	,177180748	,673788941	,850969689
CargaEnergética_Bas	,731654066	,008421778	,739556037	,022281930	,071135624	,689678999	,760814623
CargaEnergética_90	,639521544	,004689399	,636634010	,012406985	,038506338	,622940224	,661446561
CargaEnergética_24	,552551176	,012012668	,558468502	,020806551	,040331203	,529426911	,569758114

Tablas 6 y 7: Los datos del grupo CON de los diferentes valores de TNF- α , MCP-1, IL-1, IL-10, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, Caspasa-3, Caspasa-3-activada, eNOS, iNOS, ATP, ADP, AMP, ratio ATP:ADP y carga energética, aparecen expresados como media, error estándar de la media, mediana, desviación estándar, rango, mínimo y máximo.

Tablas 8 y 9: Los datos del grupo PREC de los diferentes valores de TNF- α , MCP-1, IL-1, IL-10, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, Caspasa-3, Caspasa-3-activada, eNOS, iNOS, ATP, ADP, AMP, ratio ATP:ADP y carga energética, aparecen expresados como media, error estándar de la media, mediana, desviación estándar, rango, mínimo y máximo.

11.4 Informes directores Tesis Doctoral

A continuación, se adjuntan los informes de evaluación de los directores de la presente Tesis Doctoral.



Informe del Director de la Tesis Doctoral

DATOS DE LA TESIS DOCTORAL	
Nombre del Doctorando	Maitane I. Orue-Echebarria González
Título de la Tesis	Evaluación del impacto del "Precondicionamiento regenerativo" en el perfil molecular y energético del síndrome de "Small-For-Flow" en un modelo porcino.
Facultad o Centro	Programa de Doctorado en Investigación en Ciencias Médico-Quirúrgicas. Departamento de Cirugía. Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid.

DATOS DEL DIRECTOR DE LA TESIS DOCTORAL			
Nombre Completo	José Manuel Asencio Pascual		
Centro al que pertenece y dirección	H. Gregorio Marañón de Madrid. U. Complutense de Madrid		
D.N.I./Pasaporte	05434113-H	Nacionalidad	Español
e-mail			

	VALORACIÓN DE LA TESIS			
	Muy Buena	Buena	Suficiente	Deficiente
Originalidad	X			
Definición Objetivos	X			
Metodología	X			
Relevancia Resultados	X			
Discusión / Conclusiones	X			

INFORME (en caso necesario se podrán añadir más hojas):

El trabajo se engloba dentro de una línea de investigación multidisciplinar consolidada, propia de un centro académico. Se trata de un estudio original en el que la doctoranda investiga las bases moleculares que justifican el beneficio que proporciona el precondicionamiento regenerativo, en el tratamiento del síndrome de small for flow. Los hallazgos son muy relevantes puesto que muestran como esta estrategia terapéutica se asocia a un descenso de la actividad inflamatoria y apoptótica y a un incremento de la energía.

La hipótesis está bien planteada y la metodología para conseguir los objetivos es la adecuada para un trabajo de investigación. Los resultados están expuestos de manera correcta y la discusión es brillante relacionando los hallazgos del estudio con lo publicado en la literatura y con las posibles aplicaciones clínicas.

La doctoranda Orue-Echebarria muestra una excelente capacidad investigadora plasmada en el presente trabajo de Tesis doctoral, en un artículo original donde describe el modelo experimental, y en otros dos trabajos que está pendientes de ser aceptados.

Madrid, a 4 de febrero de 2020

Fdo.: Dr. JM Asencio

Este impreso deberá entregarse al Departamento/Órgano responsable del Posgrado/ Comisión Académica del Programa de Doctorado, para su estudio y aprobación en la admisión a trámite de la tesis doctoral. Asimismo, deberá incluirse entre la documentación enviada a la Comisión de Doctorado para la designación del Tribunal y aprobación de la defensa de la Tesis Doctoral.



Informe del Director de la Tesis Doctoral

DATOS DE LA TESIS DOCTORAL	
Nombre del Doctorando	Maitane I. Orue-Echebarria González
Título de la Tesis	Evaluación del impacto del "Precondicionamiento regenerativo" en el perfil molecular y energético del síndrome de "Small-For-Flow" en un modelo porcino.
Facultad o Centro	Programa de Doctorado en Investigación en Ciencias Médico-Quirúrgicas. Departamento de Cirugía. Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid.

DATOS DEL DIRECTOR DE LA TESIS DOCTORAL			
Nombre Completo	Luis OLMEDILLA ARNAL		
Centro al que pertenece y dirección	H. Gregorio Marañón de Madrid. U. Complutense de Madrid		
D.N.I./Pasaporte	05.222.418-S	Nacionalidad	Española
e-mail			

	VALORACIÓN DE LA TESIS			
	Muy Buena	Buena	Suficiente	Deficiente
Originalidad	X			
Definición Objetivos	X			
Metodología	X			
Relevancia Resultados	X			
Discusión / Conclusiones	X			

INFORME (en caso necesario se podrán añadir más hojas):

Este trabajo ha sido uno de los que se están realizando en el HGU Gregorio Marañón dentro de la línea de investigación sobre la modulación de la evolución tras una hepatectomía en la que participan los servicios de Cirugía General y Anestesiología de dicho centro y por otra parte el Departamento de Bioquímica de la UCM. En esta línea la tesinanda Maitane Orue-Echebarria González ha participado con gran interés y aprovechamiento desde su inicio hasta la actualidad.

Se trata de un estudio experimental prospectivo aleatorizado para analizar las posibles ventajas que puede proporcionar una embolización portal antes de realizar una hepatectomía subtotal en un modelo porcino. Se analiza la evolución del perfil molecular y el metabolismo energético en el hígado restante durante las primeras 24 horas de evolución.

La resección subtotal tiene un riesgo importante de fracaso hepático postoperatorio que se podría modular si se consigue mejorar la situación metabólica del hígado remanente por lo que el estudio es muy relevante.

Los resultados con mayor importancia clínica indican que el "Precondicionamiento regenerativo" mediante embolización portal podría contribuir a la protección hepática ya que reduce la respuesta inflamatoria y apoptótica, aumenta el óxido nítrico y mejora la carga energética.

Madrid, a 4 de febrero de 2020

Fdo.: Dr. L. Olmedilla

Este impreso deberá entregarse al Departamento/Órgano responsable del Posgrado/ Comisión Académica del Programa de Doctorado, para su estudio y aprobación en la admisión o trámite de la tesis doctoral. Asimismo, deberá incluirse entre la documentación enviada a la Comisión de Doctorado para la designación del Tribunal y aprobación de la defensa de la Tesis Doctoral.



Informe del Director de la Tesis Doctoral

DATOS DE LA TESIS DOCTORAL	
Nombre del Doctorando	Maitane I. Orue-Echebarria González
Título de la Tesis	Evaluación del impacto del "Precondicionamiento regenerativo" en el perfil molecular y energético del síndrome de "Small-For-Flow" en un modelo porcino.
Facultad o Centro	Programa de Doctorado en Investigación en Ciencias Médico-Quirúrgicas. Departamento de Cirugía. Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid.

DATOS DEL DIRECTOR DE LA TESIS DOCTORAL			
Nombre Completo	Elena Vara		
Centro al que pertenece y dirección	D Bioquímica y Biología Molecular. F. medicina, UCM		
D.N.I/Pasaporte	33202901	Nacionalidad	Española
e-mail	evaraami@ucm.es		

	VALORACIÓN DE LA TESIS			
	Muy Buena	Buena	Suficiente	Deficiente
Originalidad	x			
Definición Objetivos	x			
Metodología	x			
Relevancia Resultados	x			
Discusión / Conclusiones	x			

INFORME (en caso necesario se podrán añadir más hojas):

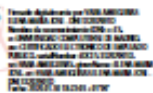
D^a Maitane I. Orue-Echebarria González ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo titulado *Evaluación del impacto del "Precondicionamiento regenerativo" en el perfil molecular y energético del síndrome de "Small-For-Flow" en un modelo porcino* con la codirección de los Dres José Manuel Asencio Pascual y Luis Olmedilla Arnal. Maitane ha participado activamente con nosotros como investigador en diferentes proyectos de investigación subvencionados enfocados en el impacto del "Precondicionamiento regenerativo" en el perfil molecular y energético del síndrome de "Small-For-Flow", participando de forma muy activa en todos los procesos.

Su participación en estos proyectos le ha permitido realizar una serie de actividades experimentales, conducentes a la obtención del Grado Académico de Doctor. En este período ha obtenido una serie de logros y resultados que se han materializado en una serie de publicaciones en revistas con alto FI, así como la participación en diversos congresos científicos tanto nacionales como internacionales (algunos de ellos premiados), donde se han presentado los resultados de su trabajo. Por todo ello, considero que el trabajo realizado reúne las características necesarias de originalidad, planteamiento adecuado de la hipótesis de trabajo, desarrollo metodológico adecuado y discusión crítica de los resultados para ser defendida como tesis doctoral.

Madrid, a

Fdo.:

VARA AMEIGEIRAS
ELENA MARIA
JOSE - DNI
33202901D



Este impreso deberá entregarse al Departamento/Órgano responsable del Posgrado/ Comisión Académica del Programa de Doctorado, para su estudio y aprobación en la admisión a trámite de la tesis doctoral. Asimismo, deberá incluirse entre la documentación enviada a la Comisión de Doctorado para la designación del Tribunal y aprobación de la defensa de la Tesis Doctoral.

