



UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA
FACULTAD DE MEDICINA
POSGRADO CIRUGÍA DE TRASPLANTE DE ÓRGANOS SÓLIDOS

**FENÓMENOS DEL PROCESO ISQUEMIA-REPERFUSIÓN EN EL CONTEXTO DEL
TRASPLANTE DE ÓRGANOS SÓLIDOS ABDOMINALES**

Presentado por: Juliana Buitrago Jaramillo, MD., MSc.
Residente Primer Año
Cirugía de Trasplantes de Órganos Sólidos

ASIGNATURA: INMUNOLOGÍA

Medellín, Abril 1 de 2016

ÍNDICE

	Página
I. INTRODUCCIÓN	3
II. EL PROCESO ISQUEMIA-REPERFUSIÓN	4
II.1. El procuramiento de órganos	4
II.2. Isquemia-reperfusión. Definición	10
II.3. Isquemia	10
II.4. Reperfusión	11
III. INJURIA POR ISQUEMIA-REPERFUSIÓN	11
III.1. Importancia de la isquemia-reperfusión	11
III.2. Consecuencias Clínicas	12
III.3. Consecuencias a nivel celular	13
III.4. Consecuencias a nivel molecular	14
III.4.a. Fase isquémica	14
III.4.b. Fase de Reperfusión	21
III.5. Cambios Moleculares	29
IV. INJURIA POR ISQUEMIA-REPERFUSIÓN. UNA MIRADA INMUNOLÓGICA	31
IV.1. Toll-like receptors	32
IV.2. DAMPs	33
V. MODELOS EXPERIMENTALES	43
V.1. Modelo experimental 1	43
V.2. Modelo experimental 2	57
V.3. Modelo experimental 3	66
VI. CONCLUSIONES	74
VII. BIBLIOGRAFÍA	75
VIII. LISTA DE FIGURAS	76
IX. LISTA DE TABLAS	79

FENÓMENOS DEL PROCESO ISQUEMIA-REPERFUSIÓN EN EL CONTEXTO DEL TRASPLANTE DE ÓRGANOS SÓLIDOS ABDOMINALES

I. INTRODUCCIÓN

“La oscuridad nos envuelve a todos, pero mientras el sabio tropieza en alguna pared, el ignorante permanece tranquilo en el centro de la estancia”

Anatole François Thibault, 1844-1924

Según la tradición cristiana, en el siglo XII, dos gemelos, Cosme y Damián en su afán de ayudar a otro ser humano, tuvieron la osadía de trasplantar un tejido (extremidad) de un donante fallecido a un receptor a quien le amputaron su extremidad. Desde entonces y a través de los siglos, han sido numerosos los personajes que, se han negado a aceptar la muerte de sus pacientes y han innovado y desafiado los conocimientos médicos al intentar implantar un tejido o un órgano a partir de un ser humano fallecido (donante), en otro ser humano que lo requiere (receptor) porque curse con una enfermedad que ha conducido alguno de sus órganos a una falla terminal que implica un carácter irreversible (trasplante).

El primer trasplante de órgano (riñón) fue realizado por el ruso Yu Yu Voronov en 1933 (Starzl, 1993) y desde entonces con el perfeccionamiento de la técnica, el avance en los conocimientos científicos, una mejor comprensión de la respuesta del cuerpo humano a este proceso y la perseverancia de muchos inconformes, los trasplantes son, actualmente, procedimientos estandarizados y exitosos en el mayor porcentaje de los casos.

Pese a todos los avances, dos aspectos siguen impactando de manera negativa y colectiva, la sobrevida de los injertos y son: la injuria por isquemia-reperfusión (IIR) y el rechazo; ciertamente y como lo veremos a lo largo de este documento, estos dos aspectos se encuentran claramente relacionados entre sí.

Este documento revisará las consecuencias clínicas, celulares y moleculares del proceso isquemia-reperfusión con especial énfasis en la manera cómo estos eventos se conectan con la parte inmunológica.

II. EL PROCESO ISQUEMIA-REPERFUSIÓN

II. 1. EL PROCURAMIENTO DE ÓRGANOS EN EL DONANTE FALLECIDO:

La muerte encefálica, condición *sine qua non* en el procuramiento de órganos del donante fallecido, se asocia con isquemia generalizada debido a hiperactividad del sistema simpático en un intento por mantener una presión de perfusión cerebral; adicionalmente, la mayoría de los donantes cursan con hipotensión severa que requiere la administración de agentes vasoconstrictores lo que empeora la isquemia y la hipoperfusión renal. También puede haber injuria mecánica durante la extracción y la injuria cerebral puede llevar a liberación masiva de citocinas y factores de crecimiento que pueden agravar la isquemia renal. Otra consecuencia de la muerte cerebral es la regulación positiva y activación del complemento y la reperfusión empeora el estado de oxidación e inflamación (Ponticelli, 2013).

De manera inevitable y como una consecuencia técnica, el proceso isquemia-reperfusión se inicia durante la operación que realizamos en un paciente con muerte encefálica, para obtener los órganos que van a ser trasplantados. Por eso, revisaremos muy brevemente y de manera específica y didáctica, algunos aspectos del procuramiento de órganos que nos permitan entender por qué se produce la injuria por isquemia-reperfusión en los órganos obtenidos de donantes fallecidos, aunque la severidad de la injuria puede variar de órgano a órgano y de procedimiento a procedimiento dependiendo de diversos factores.

Sea lo primero aclarar que el procuramiento de órganos es una cirugía mayor, realizada por cirujanos debidamente capacitados para tal propósito y en un ambiente adecuado de asepsia y antisepsia como un quirófano o cuarto de operaciones que se encuentra administrado bajo protocolos de desinfección y esterilización. Implica la presencia de personal especializado para atender todos los requerimientos de esta cirugía y entre ellos, de un anestesiólogo que esté tratando de manera constante y vigilante al paciente en muerte encefálica (donante) para que, conserve todos sus parámetros hemodinámicos en límites fisiológicos hasta el momento en que el corazón se detenga durante la cirugía (parada cardíaca).

La preservación y funcionamiento de los órganos depende de que el flujo sanguíneo que es el que transporta oxígeno y nutrientes no se detenga, pues unos cuantos minutos sin flujo sanguíneo (hipoxia) iniciarán el proceso de muerte celular por falta de oxígeno y se perderán los órganos.

Así, entendemos claramente que no existen bancos de órganos en donde estos puedan ser depositados y conservados indefinidamente, y que el proceso de embalaje y transporte de los órganos mientras son llevados al lugar en donde se encuentran los receptores y en donde se llevará a cabo el trasplante, sucede bajo estrictas técnicas de asepsia, antisepsia, enfriamiento e infusión de soluciones especiales de preservación a 4 grados centígrados.

El enfriamiento de los órganos es la base de la preservación ya que enlentece el metabolismo, disminuye los requerimientos celulares de oxígeno y detiene numerosas enzimas catabólicas que en otras condiciones iniciarían procesos de muerte celular minimizando la actividad enzimática y minimiza el consumo de sustratos energéticos (Hauet et al., 2001). Sin embargo, es fundamental tener presente que, si bien es necesaria la hipotermia para la preservación y transporte de los órganos ya que a temperatura ambiente el rápido daño irreversible de la isquemia se produciría en minutos, el frío es deletéreo para los tejidos y puede causar cambios semejantes a los de la isquemia en caliente aun en normoxia tales como edema mitocondrial, edema intra y extracelular, disturbios en la homeostasis iónica, etc.

Estudios en las células hepáticas han mostrado que el enfriamiento y recalentamiento sin isquemia puede producir apoptosis (muerte celular programada). A nivel renal, hay diferencia en la tolerancia a la isquemia entre los más de 26 tipos celulares de un riñón. Se sabe que las células más afectadas son las endoteliales y las epiteliales tubulares (Chatauret et al., 2014).

Para conseguir la hipotermia se infunden líquidos a 4 grados centígrados y se coloca hielo alrededor de los órganos. Adicionalmente, se realiza un lavado intravascular de los órganos con arrastre total de elementos formes de la sangre, isoaglutininas y factores de coagulación que, de no ser removidos, obstruirían la microcirculación. Para el lavado se emplean soluciones de preservación que están compuestas por aditivos que protegen al órgano a nivel celular al prevenir la acidosis, minimizar el edema celular, y aportar precursores de adenosín tri-fosfato (ATP) (Escalante & Rio, 2009).

Por su extremada simpleza, la conservación en frío estática es el método de preservación más utilizado y es el que explicaré a continuación.

La cirugía se inicia con una incisión xifo-púbica o esternolaparotomía (Figura 1). Se separan los tejidos hasta acceder a las diferentes estructuras vasculares que conectan los órganos (Figura 2).

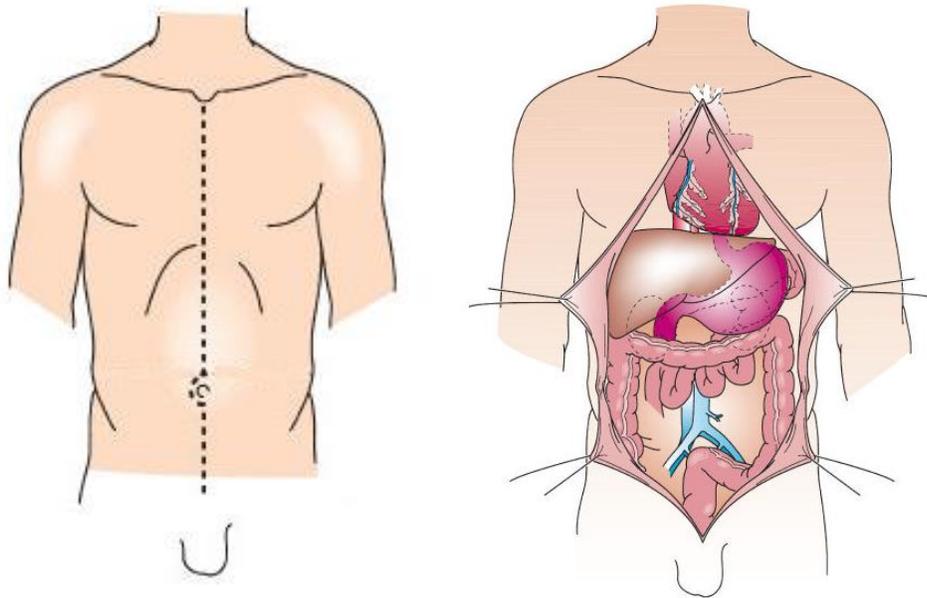


Figura 1. Cirugía de procuramiento de órganos abdominales. El procedimiento requiere una incisión esterno-púbica cuando se va a obtener hígado y riñones con propósitos de trasplante. Modificado de: ACSn Surgery: Principles and Practices, 2008.

Se canula (inserta una sonda) la arteria aorta y la vena mesentérica inferior con la finalidad de infundir las soluciones de preservación a una temperatura de 4 grados centígrados, a través de la aorta abdominal y de la vena mesentérica inferior para lavar y enfriar el hígado y los riñones. Simultáneamente, se exanguina el paciente a través de la vena cava.

La infusión y exanguinación se realiza una vez se ha colocado un clamp en la aorta torácica (pinzamiento o cierre de la aorta con suspensión del flujo sanguíneo). Este es el momento en que el corazón cesa la contracción.

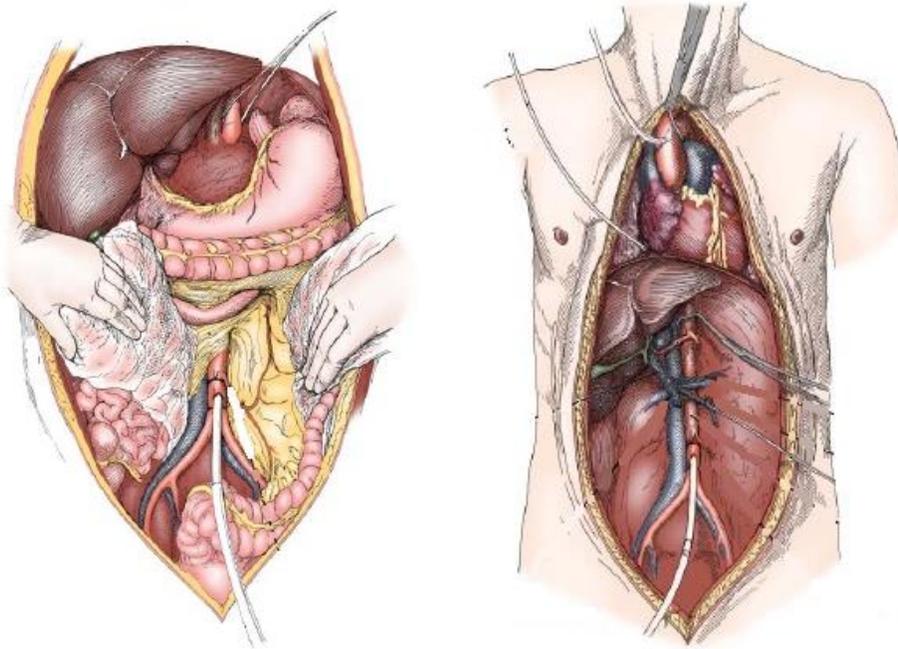


Figura 2. Canulación de la aorta y la vena mesentérica inferior para la infusión de soluciones de preservación a 4 grados centígrados una vez se ha realizado el clampaje de la aorta. Modificado de: ACS Surgery, Principles and Practices, 2008.

Simultáneamente, se coloca hielo estéril en toda la cavidad abdominal para contribuir al rápido enfriamiento de los órganos (Figura 3).

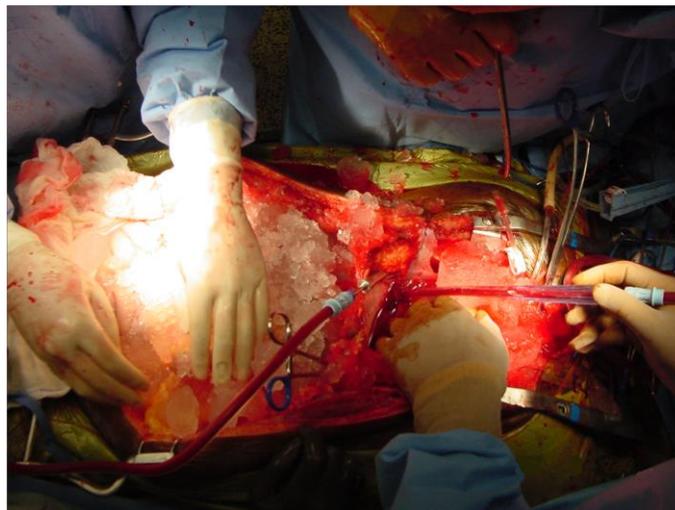


Figura 3. Colocación de hielo con los órganos in situ en el donante para el enfriamiento y preservación hipotérmica de los mismos.

A partir del momento en que se coloca el clamp (pinzamiento) en la aorta, se suspende el flujo sanguíneo y de oxígeno a los órganos y se inicia el proceso de hipotermia. Esto se denomina *isquemia en frío* y predominará por las siguientes horas hasta el momento en que los órganos sean reconectados vascularmente en el receptor.

Una vez se han enfriado y lavado los órganos, se terminan de separar de sus ligamentos y adherencias y se extraen para colocarlos en recipientes o bolsas plásticas estériles, embebidos en soluciones de preservación a 4 grados centígrados y rodeados de hielo; seguidamente se realiza el embalaje al colocarlos en neveras que conserven el hielo en su estado y la temperatura. Y ahora están listos para el transporte al centro asistencial de salud y ciudad en donde se realizará el trasplante (Figura 4).



Figura 4. Embalaje de los órganos para el transporte y conservación en frío estática. Izquierda: riñones; centro y derecha: hígado.

En el centro asistencial en donde se llevará a cabo el trasplante, se realiza también la cirugía de banco o “back table” que es el procedimiento quirúrgico en el cual se prepara el órgano para el trasplante por retirar tejido redundante, independizar las estructuras vasculares y examinar detalladamente el órgano. Esta cirugía, paso previo al trasplante, se realiza con el órgano sumergido en solución de preservación y rodeado de hielo tratando de conservar la temperatura a 4 grados centígrados (Figura 5).



Figura 5. Cirugía de banco o “back table”: Preparación del órgano para el trasplante (en este caso, páncreas).

Una vez se tiene el receptor (el paciente que será trasplantado) listo en cirugía y ya hemos realizado la disección hasta el lugar anatómico en el cual se colocará el órgano y hemos preparado las estructuras necesarias para reconectar el órgano, se retira el órgano de la nevera y de la solución de preservación. Al entrar a temperatura ambiente, se inicia el proceso de calentamiento del órgano y este período comprendido entre el retiro del hielo y el reinicio de flujo sanguíneo y oxígeno es lo que se denomina la *isquemia en caliente*.

Una vez ingresa nuevamente la sangre caliente al órgano ya implantado en el receptor, se inicia la *reperusión* y paradójicamente, al retornar la sangre y el oxígeno, y por consiguiente la temperatura, se suceden una serie de fenómenos a nivel molecular que son más lesivos que la misma isquemia o hipoxia y que influyen claramente en la sobrevivencia del órgano implantado objeto de esta revisión.

EN SUMA:

Dependiendo de la magnitud y duración de la isquemia, un órgano sufrirá injuria celular irreversible o se recuperará completamente una vez la duración de la isquemia crítica exceda los límites. Estos límites varían dependiendo de la temperatura y del órgano en cuestión. A temperatura corporal, la isquemia crítica varía de unos pocos minutos para el cerebro, hasta unos 30 minutos para el riñón. Mayor tiempo de exposición a la hipoxia, acarreará consecuencias deletéreas en el metabolismo celular. A 4 grados centígrados (en preservación hipotérmica) la isquemia crítica va desde cuatro horas para el corazón hasta 24 horas para el riñón.

La extracción, almacenamiento y trasplante de un órgano alteran la homeostasis del órgano y sus efectos se manifiestan tras el trasplante; la isquemia y posterior reperfusión del órgano genera la injuria por isquemia-reperfusión que se manifiesta con función retardada del injerto y menor supervivencia del mismo.

El fundamento de la preservación de órganos se halla en el enlentecimiento de la actividad enzimática disminuyendo la necesidad de oxígeno mediante la hipotermia. La preservación hipotérmica minimiza el daño por isquemia-reperfusión, haciendo posible conservar la función y vitalidad de los órganos; así, el enfriamiento se inicia desde el mismo momento en que se suspende el flujo sanguíneo y va hasta el momento en que se han realizado las anastomosis vasculares de ese órgano en el receptor y se permite de nuevo el flujo sanguíneo a temperatura corporal dentro del órgano con la recuperación del oxígeno tisular, el pH y la temperatura.

II. 2. ISQUEMIA-REPERFUSIÓN. DEFINICIÓN:

De una manera sencilla puede definirse a la isquemia-reperfusión como el *daño causado por la suspensión y subsecuente retorno de suplencia sanguínea a los tejidos*. La isquemia-reperfusión (IR) cursa con una secuencia compleja de eventos que involucra la depleción de ATP celular, la entrada de calcio, sodio y agua a las células y la activación de las células endoteliales e infiltración de neutrófilos en los tejidos isquémicos (Hauet et al., 2001). Cursa con dos etapas: primero, las células se ven sometidas a deprivación combinada de oxígeno y nutrientes; segundo, re-oxigenación (Hu et al, 2015).

II. 3. ISQUEMIA:

Déficit de flujo sanguíneo tisular que puede resultar en daño reversible, siempre y cuando se restablezca el flujo a tiempo (reperfusión). Este período de tiempo es variable para los diferentes órganos; por ejemplo, para el corazón se estima en 4 horas, para el hígado en 12 horas y para el riñón en 24 horas. Una vez pasado este tiempo si no se restaura el flujo sanguíneo, el daño se empieza a hacer irreversible y se perderá el órgano.

Durante la isquemia, disminuye el oxígeno y hay pérdida de sustratos energéticos, cambio de metabolismo aerobio a anaerobio y acumulación de hipoxantina en las células isquémicas (Hauet et al., 2001).

La disminución de sustratos energéticos afecta la membrana iónica de la bomba Na^+/ATP así resultando en acumulación de Ca^{++} , Na^+ y agua en el interior de la célula con edema celular como veremos más en detalle en las consecuencias celulares de la isquemia-reperfusión (Hauet et al., 2001).

II. 4. REPERFUSIÓN:

Restauración del flujo sanguíneo luego de un período de isquemia. Aunque la restauración de flujo sanguíneo a un órgano isquémico es esencial para prevenir el daño celular irreversible, la perfusión por se incrementa la injuria celular y paradójicamente, el daño es mucho mayor durante la perfusión que durante la isquemia. A este daño se le ha denominado *injuria por isquemia-reperfusión* y afecta la función del órgano trasplantado.

III. INJURIA POR ISQUEMIA-REPERFUSIÓN

Daño celular luego de la perfusión de tejidos isquémicos, previamente viables, colocando a los órganos en un riesgo mayor de necrosis celular. La injuria por isquemia-reperfusión es importante por sus consecuencias.

III. 1. IMPORTANCIA DE LA ISQUEMIA-REPERFUSIÓN:

El donante fallecido a que nos referimos en esta revisión es aquel con muerte encefálica. Una vez ha fallecido, tenemos unas horas para soportar el corazón con líquidos, nutrientes y oxígeno, de manera que siga bombeando la sangre y manteniendo el flujo sanguíneo a los demás órganos, antes de que se detenga finalmente (parada cardíaca), ya sea de manera espontánea como consecuencia de la falta de comando cerebral en todas las funciones del organismo, o durante la cirugía de procuramiento en el momento en que se realiza el pinzamiento o clampaje de la aorta.

Debido a la muerte encefálica, el donante fallecido puede cursar con severos disturbios hemodinámicos y neuroendocrinos, que pueden activar el sistema del complemento y también el sistema inmune innato, incluso antes del período de isquemia-reperfusión (Salvadori et al., 2015).

La injuria por isquemia-reperfusión es relevante por sus consecuencias que pueden mencionarse a tres niveles: consecuencias clínicas, consecuencias celulares y consecuencias moleculares.

INJURIA POR ISQUEMIA REPERFUSIÓN CONSECUENCIAS
<ul style="list-style-type: none">• Consecuencias clínicas• Consecuencias Celulares• Consecuencias Moleculares

Tabla 1. Las consecuencias de la isquemia-reperfusión pueden explorarse desde tres puntos de vista: clínico, celular y molecular.

III. 2. CONSECUENCIAS CLÍNICAS:

La injuria por isquemia-reperfusión compromete primero a las células endoteliales y epiteliales tubulares y la lesión puede ser tan severa que conduzca a injuria renal aguda y función retardada del injerto, las cuales afectan la sobrevida del mismo y el impacto es peor cuando se asocia a rechazo agudo (Ponticelli, 2013).

La duración de la isquemia, ya sea a temperatura corporal en el donante mientras la extracción, o en el almacenaje a 4 grados centígrados, determinará la extensión de la injuria tisular y puede no manifestarse clínicamente o incluso presentarse como **Injuria Renal Aguda**. No debe interpretarse la no presencia de síntomas clínicos como ausencia de injuria; solamente, que sucede en menor grado y no alcanza a expresarse clínicamente.

La Injuria Renal Aguda se ha definido como la rápida disminución de la función renal medida por un incremento en los niveles séricos de creatinina (Chatauret et al., 2014).

La injuria renal aguda es un factor asociado de manera independiente con incremento en la estancia hospitalaria, la morbilidad y la mortalidad de los pacientes con trasplante renal y también se acepta su asociación con consecuencias crónicas, sea desarrollar enfermedad renal crónica o exacerbar una enfermedad renal crónica pre-existente que progrese a enfermedad renal terminal (Chatauret et al., 2014).

En el trasplante renal, la injuria por isquemia-reperfusión, se asocia con: función retardada del injerto, función lenta del injerto o disfunción primaria.

La función retardada del injerto (FRI) tiene varias definiciones, pero una de las más empleadas es: Requerimiento de al menos una sesión de diálisis durante la primera semana pos-trasplante, mientras que la Función Lenta del Injerto (FLI) se diagnostica frente a la reducción en la creatinina sérica menos del 70% de la basal en la primera semana pos-trasplante. Se considera disfunción primaria o NO función primaria del injerto si el nivel sérico de creatinina no defiende debido a lesión celular irreversible (Chatauret et al., 2014).

INJURIA POR ISQUEMIA REPERFUSIÓN CONSECUENCIAS CLÍNICAS EN TRASPLANTE RENAL
<ul style="list-style-type: none">• Injuria Renal Aguda• Función retardada del injerto renal• Función lenta del injerto renal• No Función primaria del injerto• Enfermedad Renal Crónica• Enfermedad Renal Terminal• Nefropatía crónica del injerto

Tabla 2. Consecuencias clínicas identificadas asociadas a la injuria por isquemia-reperfusión en el trasplante renal.

La FRI y la FLI se asocian con nefropatía crónica del injerto y fibrosis. La injuria renal aguda ocasionada por isquemia reperfusión en los riñones nativos o la FRI en los riñones trasplantados comparten cambios celulares y moleculares similares y serán revisadas a continuación (Chatauret et al., 2014).

CONSECUENCIAS A NIVEL CELULAR:

En cualquier órgano, la suspensión del flujo sanguíneo, necesariamente llevará a las 3 situaciones claramente definidas en la tabla 3 y que serán el inicio de todos los cambios celulares y moleculares (Chatauret et al., 2014).

INJURIA POR ISQUEMIA REPERFUSIÓN CONSECUENCIAS CELULARES
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Disminución del nivel y disponibilidad de oxígeno celular ➤ Disminución de la disponibilidad de nutrientes y sustratos ➤ Disminución de la remoción de productos de desecho

Tabla 3. Consecuencias celulares de la isquemia-reperfusión en cualquier órgano sometido a este insulto.

III. 4. CONSECUENCIAS A NIVEL MOLECULAR:

III. 4. a. FASE ISQUÉMICA:

NIVELES Y DISPONIBILIDAD DE OXÍGENO DISMINUIDA:

La disminución en la disponibilidad de oxígeno induce un cambio de metabolismo aeróbico a **metabolismo anaeróbico**.

METABOLISMO AERÓBICO Y METABOLISMO ANAERÓBICO:

Recordemos que el metabolismo aeróbico es el que se realiza en condiciones fisiológicas con la finalidad de producir, a partir de una molécula de glucosa, aproximadamente 36 moléculas de ATP vía del ciclo del ácido tricarboxílico, también llamado ciclo del ácido cítrico o ciclo de Krebs, siendo el ATP el combustible energético fundamental para todas las funciones celulares.

En presencia de oxígeno, el piruvato, obtenido a partir de glucosa mediante la glicólisis, (Figura 6) puede pasar al ciclo del ácido tricarboxílico en la mitocontria (Descarboxilación oxidativa) y el ATP producido puede usarse como fuente de energía; el NADH + H y el FADH pasan, desde la matriz mitocondrial en donde se lleva a cabo el ciclo del ácido tricarboxílico, y descargan los e⁻ a la cadena transportadora de electrones en la membrana interna de la mitocondria para generar más ATP (Figura 7).

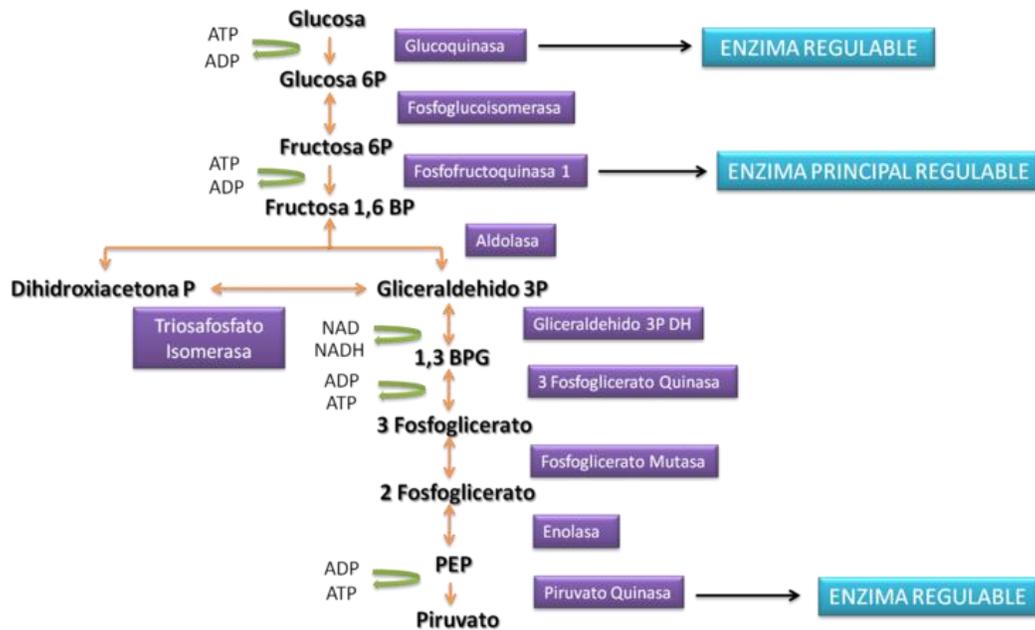


Figura 6. Glicólisis. Metabolismo celular en condiciones de disponibilidad normal de oxígeno. El producto final de la glicólisis, dos piruvatos pasan al ciclo del ácido tricarboxílico para terminar produciendo alrededor de 36 ATPs, sustrato energético fundamental para el funcionamiento celular. Tomado de: Arévalo, 2016.

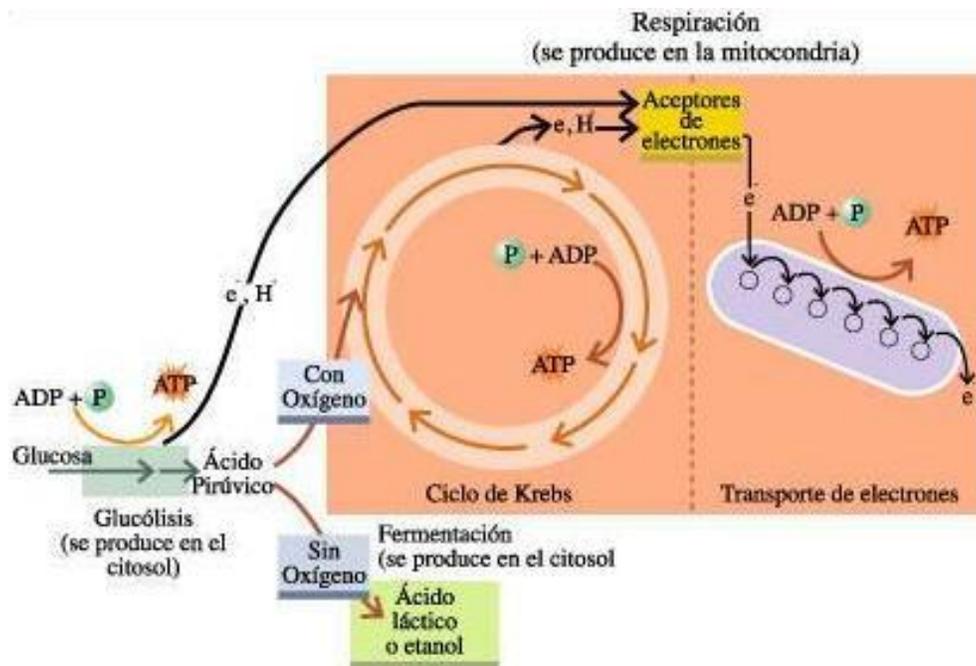


Figura 7. Metabolismo celular aeróbico y anaeróbico. En presencia de oxígeno, el piruvato o ácido pirúvico producto de la glicólisis, pasa al ciclo del ácido tricarboxílico en la matriz

mitocondrial para producir ATP, NADH + H y FADH. El ATP, como principal sustrato energético para todas las funciones de la célula y el NAD y el FAD reducidos (donadores de electrones), pasan a la cadena de transporte de electrones para oxidarse, entregar sus electrones y contribuyen con el reingreso de los electrones a través de la ATP sintasa, a la fosforilación oxidativa, paso final de la respiración celular en la que se produce más ATP. El receptor final de electrones es una molécula de oxígeno que se reduce a agua. Tomado de: Arévalo, 2016.

En el metabolismo anaeróbico, los dos piruvatos, producto de la glicólisis, en vez de pasar al ciclo del ácido tricarboxílico o de Krebs, pasan a formar lactato con producción de ATP como puede verse en la Figuras 7 y 8 y el NADH es usado para reducir el piruvato (Figura 8).

La producción de lactato ocasiona **acidosis intracelular** por acumulación del ácido láctico en la célula y en el intersticio porque recordemos que en la isquemia no es removido por el flujo sanguíneo.

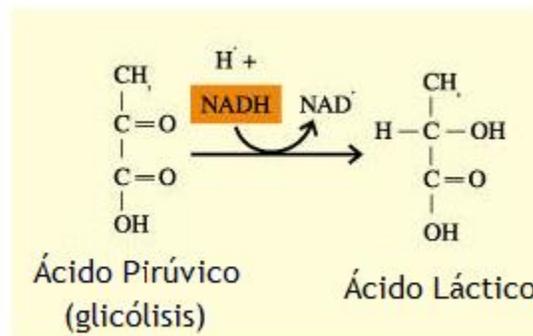


Figura 8. Degradación del piruvato en ausencia de oxígeno a lactato. La producción de lactato ocasiona acidosis intracelular por acumulación del ácido láctico en la célula y en el intersticio porque recordemos que en la isquemia no es removido por el flujo sanguíneo.

Este tipo de metabolismo es insuficiente para las demandas energéticas de la célula y esto generará un **incremento en el consumo de ATP** por la mitocondria por reversar a la F1F0 ATP sintasa, la cual en vez de sintetizar ATP lo hidroliza para tratar de mantener el potencial de membrana mitocondrial comprometido por la inhibición de la cadena de transferencia de electrones. Consecuentemente, los niveles de ATP caerán rápidamente y esta caída estará directamente relacionada a la duración de la isquemia (Chatauret et al., 2014).

RESPIRACIÓN CELULAR, CADENA DE TRASPORTE DE ELECTRONES Y FOSFORILACIÓN OXIDATIVA:

La respiración celular o respiración interna es el conjunto de reacciones bioquímicas por las cuales determinados compuestos orgánicos son degradados completamente, por oxidación, hasta convertirse en sustancias inorgánicas, proceso que proporciona energía aprovechable por la célula en forma de ATP.

En la respiración aeróbica, el aceptor final de electrones es el oxígeno molecular, que es reducido para formar agua. Si el oxígeno es prematuramente e incompletamente reducido, se produce un **radical superóxido**. Las reacciones bioquímicas de la respiración celular, se suceden en la cadena de transporte de electrones en la membrana interna mitocondrial (Figura 9), la cual consta de cuatro complejos: Complejo I o NADH deshidrogenasa, Complejo II o Succinato deshidrogenasa, Complejo III o citocromo bc1, Complejo IV o citocromo C oxidasa. Estos complejos son proteínas que transportan electrones por medio de un gradiente electroquímico generado por el flujo de electrones. La cadena actúa por medio de reacciones de reducción- oxidación (reacciones químicas en las cuales los electrones son transferidos desde una molécula donadora hacia una molécula aceptor).

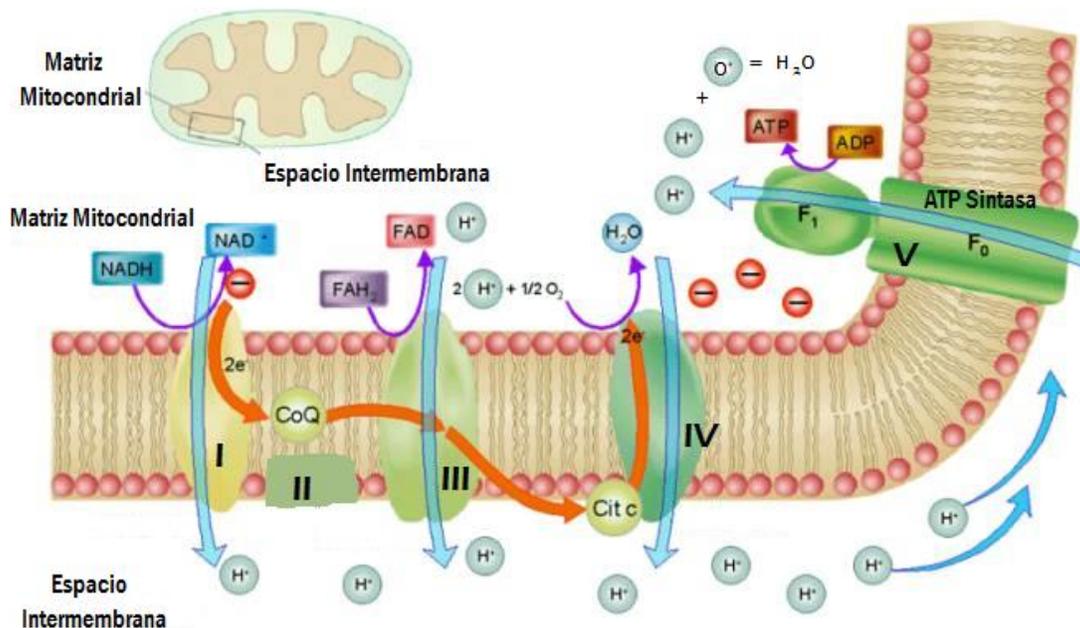


Figura 9. Cadena de Transporte de Electrones y Fosforilación Oxidativa. Modificado de: Carrión M, 2016. Nótese que el complejo II es el único que no entrega electrones.

La F₀F₁ ATP sintasa, también llamada F-type ATPase en inglés o simplemente ATP sintasa es una proteína de la membrana interna de la mitocondria involucrada en la síntesis de ATP. En el proceso de la fosforilación oxidativa, último paso de la cadena respiratoria o de transporte de electrones que se sucede en la membrana, la ATP sintasa es conocida como el complejo V. Su nombre F₀F₁ ATP sintasa se debe a que consta de dos dominios. El dominio F₀ y el dominio F₁. El dominio es simplemente una zona de la proteína donde hay mayor densidad por tener más plegamientos en su cadena polipeptídica. El dominio F₀ se ubica integral en la membrana, pero el dominio F₁ está periférico en el lado de la membrana en donde se mueven los electrones.

La ATP sintasa usa un gradiente de electrones para dirigir la síntesis de ATP y permite el flujo pasivo de electrones a través de la membrana hacia el menor gradiente electroquímico y con la energía liberada por la reacción de transporte convierte ADP en ATP (Figura 9).

Como no hay disponibilidad de oxígeno y hay un incremento en el consumo de ATP con alteración de la producción del mismo en la fosforilación oxidativa, los **niveles de ATP se encuentran disminuídos** y la caída está ligada directamente a la duración de la isquemia (Chatauret et al., 2014).

EFFECTOS DE LA DISMINUCIÓN DE ATP Y EL PH INTRACELULAR:

Lo anteriormente explicado altera de manera importante todos los mecanismos fisiológicos a nivel celular. La disminución en la producción de ATP y la acidosis intracelular por la producción de lactato generan las siguientes situaciones a nivel celular:

- ✓ Desestabilización de la membrana lisosomal, la cual filtra varias hidrolasas llevando a disrupción de la estructura celular.
- ✓ Inhibición de las bombas iónicas y en particular la Na⁺K⁺ATPasa interrumpiendo la homeostasis de los electrolitos e involucrando una entrada masiva de iones de Na⁺ y de agua, generando edema intracelular.
- ✓ Los niveles de Na⁺ se incrementan más por la acción del intercambiador Na⁺/H⁺ que bombeará protones afuera de la célula e iones sodio adentro de la célula en un intento por corregir el pH intracelular.
- ✓ Como los iones sodio se encuentran dentro de la célula, el detoxificador Na⁺/Ca⁺⁺ detiene la bomba que expulsa calcio fuera de la célula y comienza a trabajar en dirección inversa.

- ✓ Los niveles de Ca^{++} intracelular se aumentan por la inhibición de la retoma de calcio en el retículo endoplásmico debido a la depleción de ATP. De gran relevancia es esta **sobrecarga de calcio** como veremos seguidamente.

SOBRECARGA DE CALCIO INTRACELULAR:

La sobrecarga de calcio intracelular prepara para activación a las proteasas dependientes de calcio como las **calpaínas** que son inhibidas por el bajo Ph intracelular presente durante la fase isquémica pero luego se activan cuando el pH se normalice durante la fase de reperfusión. Las calpaínas son tiolproteasas no lisosomales dependientes del calcio. Son enzimas responsables de la proteólisis neutra calcio-dependiente, en virtud de un dominio de unión al calcio (Chatauret et al., 2014).

SOBRECARGA DE CALCIO MITOCONDRIAL:

La sobrecarga de Ca^{++} a nivel mitocondrial está involucrada en la generación de **especies reactivas de oxígeno (ROS)** durante la isquemia debido al desalojo del citocromo C de la membrana interna de la mitocondria que sucede durante la apertura del **poro de transición mitocondrial (mPTP)**.

A pH fisiológico, el exceso de calcio mitocondrial está involucrado en la apertura del poro de transición mitocondrial, un evento asociado a la **muerte celular y la apoptosis**. Durante la isquemia, la apertura del poro mPTP inducido por el calcio, es prevenido por el bajo pH intracelular, pero ocurrirá cuando el pH vuelva a lo normal durante la reperfusión (Chatauret et al., 2014)..

ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO: ROS:

Las especies reactivas de oxígeno se producen en la mitocondria. La generación de ROS mitocondrial tiene lugar en la cadena de transporte de electrones localizada en la membrana interna mitocondrial durante el proceso de fosforilación oxidativa. La fuga de electrones en los complejos I y III de la cadena lleva a reducción parcial del oxígeno para formar superóxido. El superóxido es rápidamente dismutado a peróxido de hidrógeno por dos dismutasas; la superóxido dismutasa 1 actuando en el espacio intermembrana y la superóxido dismutasa 2 actuando en la matriz mitocondrial. Ambos, peróxido de hidrógeno y superóxido son ROS mitocondriales (Figura 10).

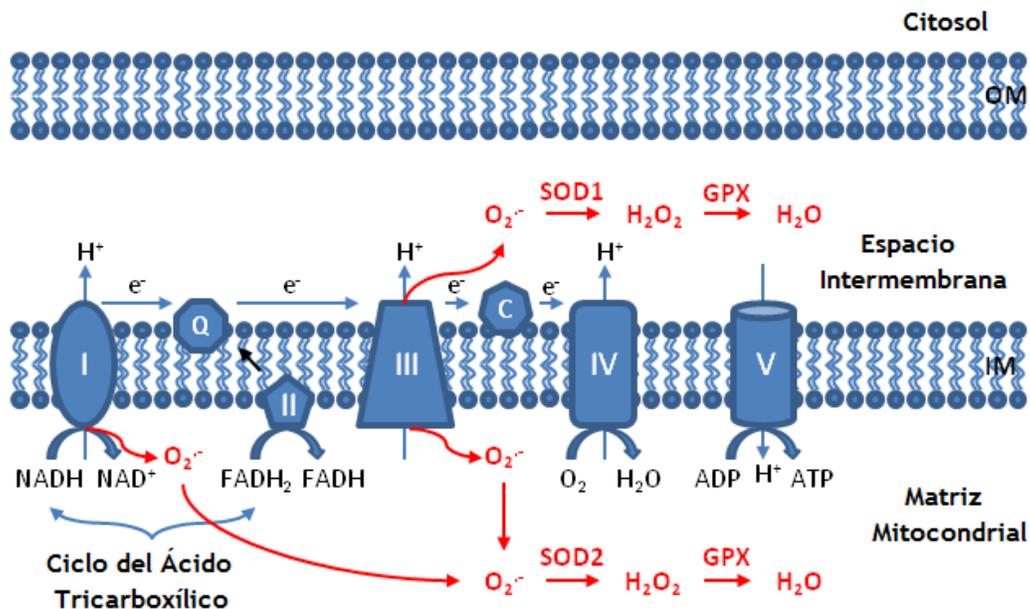


Figura 10. Producción de ROS a nivel mitocondrial. Se sucede en la cadena de transporte de electrones. La fuga de electrones en los complejos I y III de la cadena lleva a reducción parcial del oxígeno para formar superóxido ($O_2^{\cdot-}$). El superóxido es rápidamente dismutado a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) por dos dismutasas; la superóxido dismutasa 1 (SOD1) actuando en el espacio intermembrana y la superóxido dismutasa 2 (SOD2) actuando en la matriz mitocondrial. Ambos, peróxido de hidrógeno y superóxido son ROS mitocondriales Modificado de: By Xinyuan Li - <http://www.jhoonline.org/content/6/1/19>, CC BY 1.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=25192262>.

Los ROS mitocondriales son considerados moléculas de señalización. A bajos niveles, son importantes como adaptación metabólica vista en la hipoxia. A moderados niveles, estimulados por los DAMPs están involucrados en regular la respuesta inflamatoria. A altos niveles, activan las vías capaces de inducir muerte celular (apoptosis, necrosis, piroptosis).

La producción de ROS tiene importantes consecuencias como sigue:

- ✓ Redox-Reducción de los citocromos permitiéndoles a ellos transferir directamente electrones al oxígeno.
- ✓ Desacoplamiento del óxido nítrico sintasa (ONs) la cual reduce la arginina para producir óxido nítrico (ON) en la presencia de tetrahydrobiopterina y oxígeno.
- ✓ Activación de la Xantina Oxidasa y la NADPH oxidasa

- ✓ Aumento del estrés oxidativo por la disminución de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa y glutatión peroxidasa relacionadas directamente con la hipoxia.
- ✓ Los ROS también inician la producción de prostaglandinas generando un aumento de la adherencia de los leucocitos al endotelio vascular

REPROGRAMACIÓN TRANSCRIPCIONAL:

En el período isquémico se presentan alteraciones en el control de transcripción de expresión de genes. Las enzimas proilhidroxilasas sensoras de oxígeno y que requieren oxígeno como un co-factor, se inhiben lo que ocasiona activación pos-translacional de la cascada de señalización de la inflamación que controla la estabilidad del factor de transcripción nuclear $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$) y por la hipoxia del factor HIF (Factor inducible de hipoxia).

En condiciones hipóxicas, HIF se mueve al núcleo donde se une al elemento promotor de respuesta a la hipoxia (HRE: hipoxia response promoter element), induciendo la transcripción de numerosos genes como los que inducen a NF- $\kappa\beta$ y a los TLRs (Toll-like receptors).

III. 4. b. FASE DE REPERFUSIÓN:

La reperfusión produce un daño mucho mayor que la isquemia porque básicamente en la reperfusión se agrava el estado de oxidación e inflamación creado por la isquemia (Ponticelli, 2013). En la reperfusión hay restablecimiento del flujo sanguíneo con recuperación del aporte de oxígeno y eliminación de los metabolitos tóxicos acumulados que pasan a la circulación sistémica (Escalante & Rio, 2009).

Los radicales libres de oxígeno son los mediadores más importantes de la lesión por reperfusión. Trabajos experimentales han demostrado que inmediatamente después de iniciar la reperfusión hay una liberación masiva de oxidantes que dura de 2 a 5 minutos (Koyama et al., 1985).

Los productos de degradación del ATP se metabolizan habitualmente convirtiéndose en urea por la acción de la xantina-deshidrogenasa. En el medio ácido, la xantina deshidrogenasa se convierte en **xantina-oxidasa** y esta xantina-oxidasa una vez retorna el oxígeno y el pH intracelular normal, convierte los productos de desecho acumulados en xantina más un anión superóxido que reacciona consigo mismo de manera rápida para formar peróxido de hidrógeno,

un potente oxidante capaz de lesionar la célula por oxidación de las membranas lipídicas y de las proteínas celulares. El peróxido de hidrógeno produce una cascada de radicales libres de oxígeno, incluidos el radical hidroxilo y el oxígeno singulete, que son incluso más potentes que los otros. Finalmente, se produce alteración de la respiración mitocondrial y peroxidación lipídica con destrucción celular (Escalante & Rio, 2009).

La producción de radicales de oxígeno también inicia la producción de prostaglandinas (mediante la activación directa de la fosfolipasa), incluido leucotrieno B₄, y del factor activador de los trombocitos. Estas sustancias producen un aumento de la adherencia de los leucocitos al endotelio vascular. Estos neutrófilos pueden contribuir a la lesión local mediante el taponamiento de la microcirculación y la desgranulación que resulta en daños proteolíticos al órgano.

La isquemia-reperfusión se asocia a la liberación marcada del factor de necrosis tumoral alfa, interferón gamma, interleucina 1 e interleucina 8. Estas citocinas causan una sobrerregulación de las moléculas de adhesión, y producen adherencia leucocitaria y tapones plaquetarios tras la revascularización, lo que resulta en fallo del injerto y rechazo del órgano (Escalante & Rio, 2009).

La capa vascular endotelial modula el tono del músculo liso del vaso mediante la liberación de varias hormonas locales o autacoides. La producción de uno de ellos, el óxido nítrico, inducida por citocinas inflamatorias, se correlaciona con la aparición de rechazo agudo (Escalante & Rio, 2009).

Al final de la isquemia el pH intracelular se encuentra bajo, hay injuria mitocondrial por sobrecarga de calcio y hay regulación negativa de las defensas antioxidantes con inhibición del complejo IV citocromo C en la cadena de transporte de electrones.

Cuando se restaura el flujo sanguíneo, los niveles de oxígeno y el pH extracelular se normalizan. Esto ocasiona un gradiente extremo de H⁺ a través de la membrana plasmática que dispara el intercambio Na⁺/H⁺ y genera un masivo influjo de Na⁺⁺.

El aumento de sodio intracelular reversará el intercambiador Na⁺/Ca⁺⁺ llevando a fomento de la sobrecarga de calcio mitocondrial y citoplasmático que ha inducido la apertura del mPTP y preparado la activación de las calpaínas durante la isquemia. La normalización del pH activará las calpaínas y participará en la apertura del mPTP (Chatauret et al., 2014).

Las Calpaínas hidrolizan las proteínas blanco llevando a daño estructural, disfunción mitocondrial y manejo del calcio alterado. Así, la activación de las calpaínas lleva a muerte celular.

ROS: ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO:

La célula normalmente tiene un entorno reductor que es preservado por las enzimas que mantienen este estado reducido a través de un constante aporte de energía metabólica. El **estrés oxidativo** es causado por un desequilibrio entre la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) y la capacidad de un sistema biológico de decodificar rápidamente los reactivos intermedios o reparar el daño resultante. Los desbalances en este estado normal redox pueden causar efectos tóxicos a través de la producción de peróxidos y radicales libres que dañan a todos los componentes de la célula, incluyendo las proteínas, los lípidos y el ADN.

Los ROS son moléculas reactivas químicamente conteniendo oxígeno. Son formados como un bioproducto natural del metabolismo del oxígeno y tiene importante papel en señalización celular y homeostasis. Ejemplos de ROS son: peróxidos, superóxido (precursor de la mayoría de especies reactivas de oxígeno), radical hidroxilo y oxígeno singulete (un átomo de oxígeno en un estado excitado; no confundir con el oxígeno triplete que es el oxígeno normal).

Productores profesionales de ROS son la NADPH oxidasa (NOX), que son 7 complejos o isoformas en la membrana celular, la mitocondria, los peroxisomas (organelas involucradas en el catabolismo de los ácidos grasos de cadena muy larga, de cadena ramificada, D aminoácidos, poliaminas y reducción de ROS específicamente hidrógeno peróxido) y el retículo endoplásmico.

Los ROS generarán daño en las siguientes macromoléculas:

- Membrana
- Lípidos (peroxidación de lípidos)
- DNA
- Oxidación de aminoácidos en proteínas
- Enzimas

En la fase de reperfusión hay excesiva producción de ROS (Hauet et al., 2001).

La apertura del PORO permitirá que agua y soluto ingresen a la matriz mitocondrial generando edema y ruptura de la membrana externa. Al romperse la membrana externa, se libera el citocromo C y pasa al citosol en donde activa a la **caspasa pro-apoptótica**.

Al abrirse el poro también se equilibra la concentración de sodio en ambos lados de la membrana interna aboliendo la fuerza que dirige la ATP sintasa. Una vez abierto el poro hay muerte celular (Chatauret et al., 2014).

TIPOS DE MUERTE CELULAR:

Por mecanismo independientes y redundantes se genera apoptosis, necrosis y autofagia.

APOPTOSIS:

Muerte celular programada. Característicamente requiere ATP y cursa con completa eliminación de células sin inducción de inflamación. Tiene una vía intrínseca y una vía extrínseca o **cascada de las caspasas**.

VÍA EXTRÍNSECA DE LA APOPTOSIS:

Se da porque los ROS se generan por FAS ligando como un evento de regulación positiva, y por activación de FAS vía fosforilación; esto es necesario para el reclutamiento de la proteína asociada a FAS con dominio “muerte” y caspasa 8 así como inducción de la apoptosis (Hauet et al., 2001).

VÍA INTRÍNSECA DE LA APOPTOSIS:

ROS facilita que el citocromo C se libere por activar las **proteínas estabilizantes del poro BD-2 y Bcl-XL** así como por inhibir las **proteínas desestabilizantes del poro: proteína X asociada a Bcl-2 y la proteína asesina homóloga de Bcl-2**.

La vía intrínseca también es conocida como la cascada de las caspasas y es inducida por daño mitocondrial que inicia la liberación del citocromo C. El daño en el DNA, el estrés oxidativo y la pérdida del potencial de membrana mitocondrial llevan a liberación de las proteínas pro-apoptóticas y por consiguiente a la apoptosis (Hauet et al., 2001).

NECROSIS:

Mediada por el edema celular y disrupción de la membrana plasmática con fuga de los componentes intracelulares llevando a **Inflamación**.

AUTOFAGIA:

Es un proceso autocatabólico que involucra el secuestro de contenido citoplasmático, agregados intracelulares y organelas, para degradarlos en los lisosomas. Puede ser inducida por los niveles de ROS y se inicia con la despolarización de la membrana mitocondrial; provee sustratos generando energía bajo condiciones de limitaciones de nutrientes (Hauet et al., 2001). Sin embargo, es altamente dependiente de la disponibilidad de ATP.

La incidencia de apoptosis es menor que la de necrosis luego de isquemia-reperfusión y la vía de la muerte celular de las células por-isquémica parece depender de su estado de energía pos-reperfusión (Chatauret et al., 2014).

PIROPTOSIS:

La piroptosis es una forma de muerte celular programada altamente inflamatoria que ocurre más frecuentemente en la infección por patógenos intracelulares. En este proceso, las células inmunes reconocen las señales de peligro dentro de ellas mismas, liberan citocinas pro-inflamatorias, se edematizan, estallan y mueren. La liberación de citocinas atrae a otras células del sistema inmune y contribuye a la inflamación en los tejidos.

En contraste a la apoptosis, la piroptosis requiere la función de la enzima caspasa-1 activada por el inflammasoma o piroptosoma que está compuesto por dímeros de la proteína adaptadora con partícula asociada a la apoptosis que contiene un dominio de reclutamiento y activación de la caspasa (ASC: “apoptosis-associated speck protein containing a CARD o caspase activation and recruitment domain”).

A diferencia de la apoptosis, la muerte celular por piroptosis resulta en ruptura de la membrana plasmática y liberación de moléculas DAMP tales como ATP, DNA y ASC en el ambiente extracelular, incluyendo citocinas que reclutan más células inmunes y perpetúan la cascada inflamatoria en los tejidos. Esto contrasta con el empaquetamiento del contenido intracelular de los cuerpos apoptóticos que se eliminan por fagocitosis no inflamatoria.

NECROPTOSIS:

Forma de muerte celular inflamatoria o forma de necrosis. Tiene una naturaleza inmunogénica y es independiente de la caspasa. Es uno de los mecanismos de defensa que se presenta en infecciones virales en que la célula sufre “suicidio celular” al verse infectada por virus inhibidores de la caspasa, ya que es un tipo de muerte celular independiente de la caspasa y en su intento por frenar la diseminación del virus.

La tabla 4 ilustra, para un mejor entendimiento, de manera comparativa los aspectos relacionados a los diferentes tipos de muerte celular.

TIPOS DE MUERTE CELULAR COMPARACIÓN DE CARACTERÍSTICAS				
	CARACTERÍSTICA	APOPTOSIS	PIROPTOSIS	NECROSIS
MORFOLOGÍA	Lisis celular	NO	SI	SI
	Edema celular	NO	SI	SI
	Formación de poro	NO	SI	SI
	Formación de vesículas en la membrana celular	SI	NO	NO
	Fragmentación del DNA	SI	SI	SI
MECANISMO	Caspasa-1	NO	SI	NO
	Caspasa-3	SI	NO	NO
	Liberación del Citocromo-c	SI	NO	NO
RESULTADO	Inflamación	NO (anti)	SI	SI
	Muerte celular programada	SI	SI	NO
	Inmunogenicidad	NO	SI	SI

Tabla 4. Cuadro comparativo de los diferentes tipos de muerte celular y sus aspectos más relevantes. Construido con características tomadas de: Fink & Cookson, 2006; Duprez et al., 2009.

EFECTOS DEPENDIENTES DEL ENDOTELIO:

A nivel endotelial hay vasoconstricción y expresión de genes vaso-activos regulados por la hipoxia.

INJURIA VASCULAR:

La injuria vascular se genera por una serie de mecanismos que enumero a continuación:

- Edema de las células endoteliales
- La luz capilar se disminuye
- Pérdida del glicocálix
- Disrupción del citoesqueleto de actina
- Alteración de contacto célula a célula endotelial
- Ruptura de la matriz perivascular
- Permeabilidad microvascular incrementada
- Disminución de líquido en el intersticio
- Modificación de niveles de expresión de proteínas derivadas del endotelio
- Aumento en la producción endotelial de vasoconstrictores: Factor β de crecimiento derivado de las plaquetas y endotelina
- Disminución de la producción de óxido nítrico (ON) por regulación negativa de la proteína eNOSy esto induce la expresión de moléculas de adhesión a nivel de la membrana plasmática endotelial: ICAM-1 Molécula 1 de adhesión intercelular, VCAM-1 o molécula 1 de adhesión vascular las selectinas P y E. Esto lleva a aumento en la adherencia de las plaquetas y los polimorfonucleares con congestión capilar y no reflujo que para efectos del riñón se traduce en flujo sanguíneo total reducido y reducida tasa de filtración glomerular.

La disfunción vascular con que cursa la isquemia-reperfusión se caracteriza por permeabilidad vascular incrementada e inflamación celular endotelial. Hay reclutamiento de polimorfonucleares y activación de la coagulación y el sistema del complemento.

Los leucocitos interactúan con el endotelio vascular en diferentes pasos que se han descrito como: 1. “Rolling”, 2. Firme adherencia de los leucocitos al endotelio y, finalmente 3. trans migración de leucocitos (Figura 11).

El “Rolling” de leucocitos es inducido por la expresión de superficie endotelial de la P-selectina (CD62P), que interactúa con la glicoproteína 1 P-selectina (PSGL-1) localizada en los leucocitos. La firme adherencia de los leucocitos es una consecuencia de la interacción de las β 2-integrinas CD11a/CD18 y CD11b/CD18 con la molécula 1 de adhesión intercelular endotelial. La trans migración de leucocitos al compartimento intersticial es facilitada por la molécula 1 de adhesión celular endotelial plaquetaria.

En el compartimento intersticial, los leucocitos activados liberan ROS, proteasas y elastasas causando injuria como permeabilidad microvascular incrementada, edema, trombosis y muerte celular parenquimatosa. La acumulación de polimorfonucleares en el compartimento extravascular es facilitada por la IL-8 liberada por los tejidos hipóxicos. La IL-8 genera un gradiente quimiotáctico que facilita que los neutrófilos se muevan desde el espacio intravascular al intersticio hipóxico.

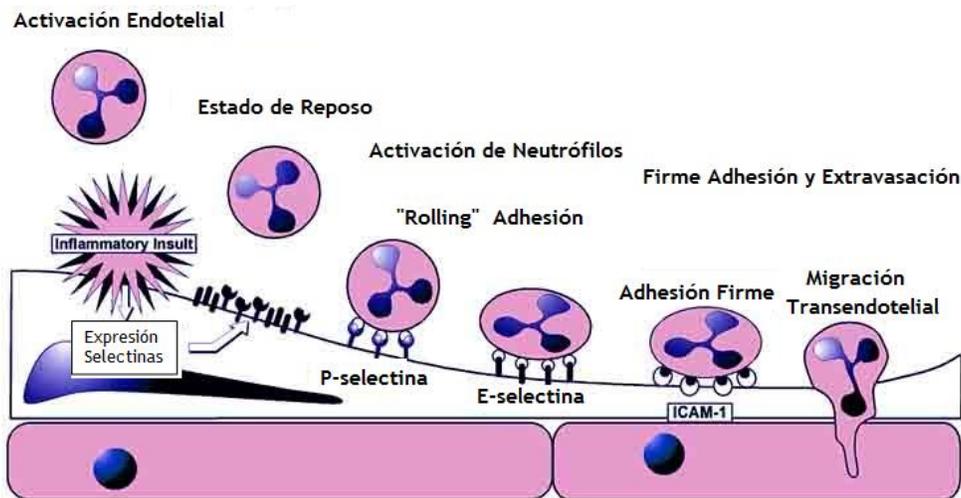


Figura 11. Disfunción vascular en la isquemia-reperfusión: “Rolling”, firme adhesión y diapédesis de leucocitos en el endotelio vascular. Modificado de: Getdomainvids, 2016.

La vasoconstricción se incrementa por una producción reducida de Oxido nítrico en la fase de reperfusión, asociada con una reducción en la producción de eNOS (óxido nítrico sintasa endotelial) y otras sustancias vasodilatadoras que el endotelio lesionado ya no produce. Se han implicado también otras sustancias vasoconstrictoras como la angiotensina II, el tromboxano A2, la prostaglandina H2, los leucotrienos C4 y D4 y la adenosina.

Luego de la reperfusión, las células endoteliales activadas producen la molécula 1 de adhesión vascular, así como las selectinas P y E. Mecánicamente, la activación por la E-selectina y el

ligando 1 de la E-selectina inducen los grupos de integrinas polarizados, activados generando adherencia incrementada de los eritrocitos, leucocitos y plaquetas circulantes.

Se presenta entonces un estado de relajación vascular atenuada y contracción de pericitos sostenida en la reperfusión, que resultan en un fenómeno que se ha denominado de “no reflujo” caracterizado por impedancia incrementada del flujo sanguíneo microvascular después de la restauración de las condiciones de flujo normal (Salvadori et al., 2015).

FIBROGÉNESIS RENAL:

Si la isquemia-reperfusión es leve, la función se recuperará completamente, pero si es extensa, el proceso de reparación será anormal llevando a atrofia tubular y fibrosis responsables de enfermedad renal crónica. La injuria renal aguda isquémica cursa con reparo tubular incompleto, inflamación crónica e hipoxia llevando a proliferación de fibroblastos y excesivo depósito de matriz extracelular (Chatauret et al., 2014).

Hay una asociación entre la injuria por isquemia-reperfusión y fibrosis intersticial (Hauet et al., 2001).

La fibrogénesis renal sigue al proceso de reparo inicial por activación de células residentes con producción de citocinas pro-inflamatorias. Estas citocinas atraen monocitos, macrófagos y células T a los sitios lesionados donde ellas son activadas y producen ROS, factor de crecimiento transformador β y citocinas inflamatorias. Luego las citocinas estimulan a las células mesangiales, los fibroblastos y TEC para sufrir activación fenotípica o transición de epitelial a mesenquimal en la cual estas células producen grandes cantidades de matriz extracelular. La matriz extracelular se acumulará y formará una cicatriz fibrosa dañando la función renal (Chatauret et al., 2014).

III. 5. CAMBIOS MOLECULARES:

La organela clave en donde se suceden todos los cambios que conducen a la muerte celular es **la mitocondria**. La mitocondria juega un papel crucial en la síntesis de ATP; adicionalmente, actúa como transductor y efector en múltiples procesos incluyendo la señalización de la muerte celular, la señalización oxidativa, señalización en procesos del sistema inmune innato, la homeostasis del calcio, la síntesis de ácidos grasos y la autofagia (Hu et al., 2015).

La mitocondria es fundamental porque, es por excelencia, la organela biosintética y bioenergética, contribuye a las decisiones críticas de la célula como la proliferación, la diferenciación y la muerte celular. La mitocondria puede, rápidamente, cambiar de organela catabólica generando ATP a organela anabólica para generar ATP y también aportar para la síntesis de macromoléculas (Weinberg et al., 2015).

La mitocondria tiene múltiples mecanismos que le permiten activar las vías de señalización en el citosol incluyendo alterar la tasa AMP/ATP, la liberación de ROS y metabolitos del ácido tricarbóxico, así como la colocación de proteínas regulatorias del sistema inmune en la membrana externa de la mitocondria (Weinberg et al., 2015).

La mitocondria es fundamental también para establecer el fenotipo inmune de la célula y su función; adicionalmente, permite a la célula inmune suplir las demandas metabólicas adecuadamente (Weinberg et al., 2015).

Como mencioné anteriormente, el mayor papel de la mitocondria es la producción de energía por medio de la oxidación de metabolitos a través del ciclo del ácido tricarbóxico o ciclo de Krebs y la producción de ATP por medio de la cadena de transporte de electrones explicada anteriormente. En condiciones de metabolismo anaerobio, la disponibilidad de ATP cae y esto trae una serie de consecuencias que se generan seguidamente a la muerte celular y de gran relevancia desde el punto de vista inmunológico, ya que se activa el sistema inmune innato y posteriormente el adaptativo.

INFLAMACIÓN:

El inicio del proceso inflamatorio no específico, inicia y modula la inmunidad específica de antígeno (Hauet et al., 2001).

La respuesta a la IR semeja una respuesta inmune e induce la regulación positiva de los antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y de las moléculas de adhesión y la producción de citocinas y quimiocinas llevando a infiltrados inflamatorios.

IV. INJURIA POR ISQUEMIA-REPERFUSIÓN. UNA MIRADA INMUNOLÓGICA:

La respuesta del sistema inmune innato desarrollada como un mecanismo de defensa contra patógenos letales y necesaria para la supervivencia en este contexto, es estimulada por señales fisiológicas de daño durante el proceso isquemia-reperfusión con consecuencias de estimulación y activación del sistema inmune e innato e interacción con el sistema inmune adaptativo que genera una respuesta alo-inmune con impacto negativo significativo en la función y sobrevida del injerto trasplantado.

INJURIA POR ISQUEMIA REPERFUSIÓN CONSECUENCIAS INMUNOLÓGICAS
<ul style="list-style-type: none">• Inflamación• Activación del complemento• Activación de los mediadores inflamatorios• Secreción de interferones• Secreción de citocinas pro-inflamatorias• Activación de la inmunidad innata• Inducción de apoptosis y necrosis

Tabla 5. Consecuencias inmunológicas de la injuria por isquemia-reperfusión.

Los eventos anteriormente descritos desencadenan procesos inflamatorios que son un estímulo directo para la inmunidad del receptor (Escalante & Rio, 2009).

Numerosos mecanismos se ven involucrados en la respuesta inmune, así como diversas células del Sistema inmune. Luego de la reperfusión, los neutrófilos se adhieren al endotelio y transmigran en el tejido, liberan proteasas, ROS y citocinas pro-inflamatorias como la IL-4, IL-6, interferon γ y factor de necrosis tumoral α . Los macrófagos producen también citocinas pro-inflamatorias y pueden ser encontrados en el tejido que ha sufrido isquemia-reperfusión desde etapas tempranas. Las células natural Killer, NK, juegan un papel central y la muerte de células tubulares renales por la perforina producida por las NK es un mecanismo mayor de daño a nivel renal. Las células dendríticas sufren un proceso de maduración independiente de antígeno, e inducido por los DAMPs o proteínas moleculares asociadas a daño; es importante recordar que estas células dendríticas son la conexión entre el Sistema inmune innato y la activación del Sistema inmune adaptativo. En el trasplante renal, las células dendríticas del

donante se activan, con la subsecuente activación de las células T del receptor (mecanismo directo) (Salvadori et al., 2015).

IV. 1. TLRs: TOLL-LIKE RECEPTORS:

Los TLRs son pequeñas proteínas localizadas en la membrana celular o en el citoplasma, hábiles de reconocer DAMPs y PAMPs (moléculas asociadas a daño o a patógenos). Una vez activados, los TLRs reclutan moléculas adaptadoras dentro del citoplasma hábiles para activar cinasas que a su vez, activan factores de transcripción como NF- κ B. Los factores de transcripción inducen una respuesta inflamatoria.

El papel de los TLRs es crucial. Por ejemplo; en los donantes fallecidos, el TLR-4 es regulado positivamente por HMGB-1 (un DAMP) de las células tubulares. Su papel es crucial. Los TLR-4 de los leucocitos, las células vasculares endoteliales y las células epiteliales tubulares llevan a producción incrementada de citocinas pro-inflamatorias y moléculas de adhesión que generan una respuesta inflamatoria tanto en la microvasculatura renal como en el espacio intersticial. Esto intensifica el daño renal por citotoxicidad y esto acelera el procesamiento y presentación de antígenos, incrementando la inmunogenicidad y generando la reacción inmune. Los túbulos y la vasculature severamente dañados promueven la fibrosis y todo esto predispone a falla crónica del aloinjerto (Salvadori et al., 2015)..

Estrechamente conectado con los TLRs están los **inflamomas**, que son complejos multiproteicos que responden a DAMPs y que se activan por daño celular. Por ejemplo, el NOD leucine-rich repeat pyrin domain conteniendo NLRP denominado el NLRP1 activa la cascada de la caspasa-1 produciendo citocinas pro-inflamatorias. Más Adelante, ampliaré el concepto de los inflamomas y la manera como por ejemplo, el NLRP3 puede ser protector por inducir apoptosis en vez de necrosis (Salvadori et al., 2015).

COMPLEMENTO:

Un papel central en la inmunidad innata lo ejerce el complemento. Los DAMPs también activan el complement y por las tres vías ligando a C1q, C3 o lectina-manosa. Cuando las vías del complemento son activadas, las anafilatoxinas C3a y C5a son liberadas y el complejo de ataque de membrana (MAC), se forma. Esto induce la liberación de quimiocinas y la activación e infiltración de neutrófilos que llevan a injuria celular, apoptosis y necrosis (Salvadori et al., 2015)..

También se ha descrito una relación estrecha entre los TLRs y el complemento. La muerte encefálica puede activar el complemento y el componente C5a, generado por el cerebro del donante fallecido, actúa directamente sobre el receptor de C5a expresado en las células dendríticas, resulta en activación celular e incrementa subsecuentemente su capacidad para la estimulación alo-específica de las células T. También se ha postulado que C3 ligado a la superficie interactúa con los receptores del complemento de las células T alo-reativas o con las células presentadoras de antígeno para incrementar la estimulación alo-inmune (Salvadori et al., 2015)..

Una consecuencia de la injuria por isquemia-reperfusión es la activación de la inmunidad innata. Las señales de peligro (Danger Associated Molecular Patterns: DAMPs) liberadas por las células muriendo alertan a los Toll-like receptors (TLRs), los cuales a través de moléculas adaptadoras y una cadena de cinasas, transmiten la señal a los factores de transcripción que codifican genes que regulan las células inflamatorias y los mediadores (Ponticelli, 2013).

IV. 2. DAMPs: DAMAGE-ASSOCIATED MOLECULAR PATTERNS:

Los Damage-Associated Molecular Patterns o DAMPs fueron descritos como tal, por primera vez, por Seong y Matzinger en el año 2004, como señales de peligro que podían iniciar la respuesta inmune innata. Previo a este artículo científico, se consideraba que la respuesta inmune era iniciada por los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) o por las señales de alarma o peligro derivadas de los tejidos. En su artículo, Seong y Matzinger propusieron que los dos grupos de moléculas podían no ser mutuamente excluyentes, sino ser parte de un sistema de alerta, antiguo evolutivamente, en el cual las porciones hidrofóbicas de las moléculas biológicas actúan como un patrón molecular universal asociado a daño que inicia la reparación, la remodelación y la inmunidad (Seong & Matzinger, 2004).

En términos más simples, los DAMPs son moléculas del huésped que pueden iniciar y perpetuar una respuesta inflamatoria no infecciosa. Cuando son liberadas fuera de la célula o son expuestas en la superficie celular luego de la injuria tisular, se mueven de un medio reducido a un medio oxidado lo cual resulta en su desnaturalización. Ejemplos de DAMPs son: proteínas citosólicas o nucleares y proteínas derivadas de la matriz extracelular luego de injuria como fragmentos de hialuronato, ATP, ácido úrico, DNA, RNA, metabolitos de purina, adenosina, las moléculas S100 (familia multigénica de proteínas moduladas por calcio e involucradas en actividades regulatorias intra y extracelulares) y la HMGB1 o proteína asociada a la cromatina “high mobility group box 1” secretada por las células hematopoyéticas a través de una vía mediada por lisosomas.

Los DAMPs surgen luego de la necrosis celular y son sensados por una serie de receptores especializados en la detección de señales de peligro generadas por los pathogen associated molecular pattern, PAMPs y DAMPs. En el caso del trasplante de órganos sólidos lo que desencadena la respuesta inmunológica son los DAMPs y la inflamación que contribuye a esta respuesta es una inflamación estéril.

Los DAMPs y los PAMPs se unen a receptores específicos denominados los PRRs: “pattern recognition receptors” de los cuales existen varios tipos; algunos se mencionan en la Figura 12.

Los PRRs son proteínas presentes en las células del sistema inmunitario para identificar moléculas asociadas con patógenos microbianos o con estrés celular. Existen diversos tipos clasificados de acuerdo con su afinidad al ligando, función o relación evolutiva. Sobre la base de la función pueden ser clasificados en **PRR Secretados**: muchos de estos receptores se unen a los PAMP del patógeno actuando como opsoninas. Un ejemplo es la lectina de unión a manosas que activa el sistema del complemento.

- **PRR señalizadores:** incluyen la gran familia de receptores tipo Toll (unidos a la membrana celular) y receptores tipo NOD del citoplasma. Son receptores que se localizan en la superficie celular y que tras reconocer el PAMP o DAMP activan vías de señalización en las que interviene el factor de transcripción NF- κ B que culminan con la expresión de citocinas y moléculas co-estimuladoras de gran importancia en la activación y alerta del sistema inmune.
-
- **PRR endocíticos:** Permiten la unión, absorción y destrucción de los microorganismos por los fagocitos, sin la transmisión de señales intracelulares. Estos PRR reconocen carbohidratos e incluyen los receptores de manosa de los macrófagos, los receptores de glucano presente en todos los fagocitos y los receptores barreneros que reconocen ligandos cargados, son encontrados en los fagocitos y están encargados de la eliminación de células apoptóticas.

Los PAMPs y los DAMPs se unen a receptores específicos como los RLRs, NLRs y los TLRs para generar citocinas esenciales para eliminar patógenos o reparar tejido lesionado. El DNA mitocondrial y los N-formil péptidos representan dos fuentes de DAMPs mitocondriales que activan los PRRs. Los N-formil péptidos de la mitocondria actúan como DAMPs activando el receptor FPR-1 para estimular la secreción de citocinas. El DNA mitocondrial es similar al bacteriano en que ambos comparten motivos CpG hipometilados que activan el TLR-9. Se sabe que el DNA mitocondrial es liberado sistemáticamente durante la injuria para inducir inflamación (Weinberg et al., 2015).

PRRs o PATTERN RECOGNITION RECEPTORS

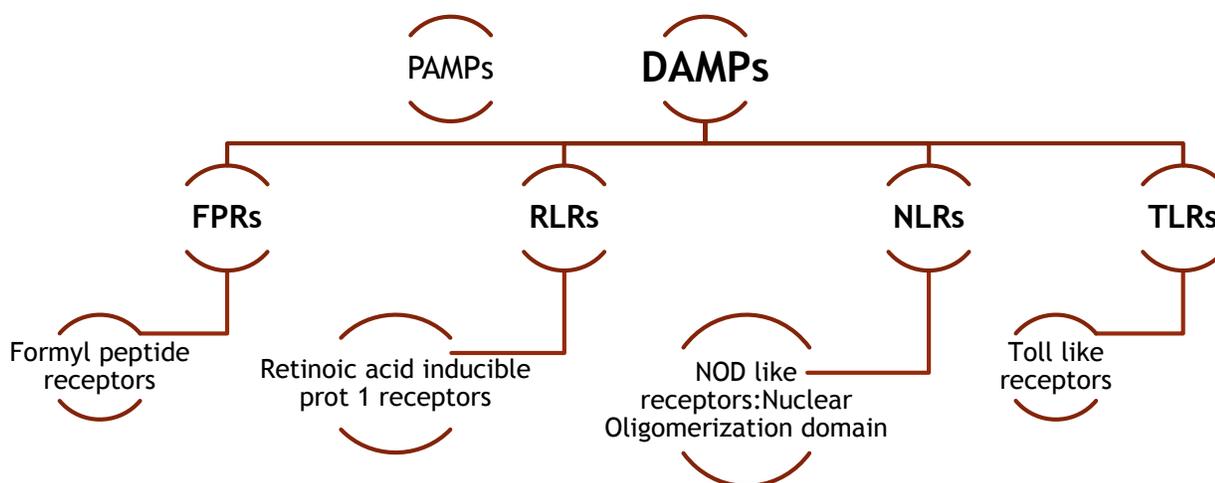


Figura 12. Algunos Receptores de Reconocimiento de Patrón y las siglas como son conocidos derivadas de su nombre en el idioma inglés. Estos receptores responden a las señales de peligro, sea a los PAMPs o patrones moleculares de los patógenos o a los DAMPs o patrones moleculares de daño que son secretados cuando hay moléculas liberadas por la muerte celular tal como el DNA, RNA, adenosina, ácido úrico, entre otros. Es decir, que responden a tejido endógeno derivado de la injuria.

Así, los DAMPs mitocondriales dirigen la hiperactivación del sistema inmune innato en ausencia de infección, la llamada **“inflamación estéril”**.

Estudios previos han confirmado que la mitocondria actúa como organela de señalización de la inmunidad innata; por ejemplo, si disminuye la producción de ROS mitocondrial, disminuyen también las múltiples vías iniciadas por los TLRs y la actividad bactericida de los macrófagos (West et al., 2011).

Además de los TLRs, se sabe que otros PRRs dependen de la señalización de ROS mitocondrial, incluyendo los NOD-like receptors o NLRs. En relación con la activación, los NLRs forman complejos proteicos de múltiples sub-unidades llamados **inflamasomas** que activan la caspasa 1, resultando en escisión proteolítica y maduración de la citocina pro-inflamatoria IL-1 β (Figura 13). El inflamasoma es responsable de la activación de los procesos inflamatorios, y se ha demostrado que induce la piroptosis celular, un proceso de muerte programada distinto a

la apoptosis y a la necrosis (Weinberg et al., 2015). Los NLRs reconocen a los DAMPs. El inflamasoma NLRP3, por ejemplo, puede ser activado por moléculas derivadas del huésped que son detectadas por el sistema inmune innato, incluyendo el ATP extracelular y el hialuronano, liberados por las células injuriadas. El ácido úrico puede también ser liberado durante la injuria celular y las vías dependientes del ácido úrico también activan el inflamasoma (Schroder & Tschopp, 2010).

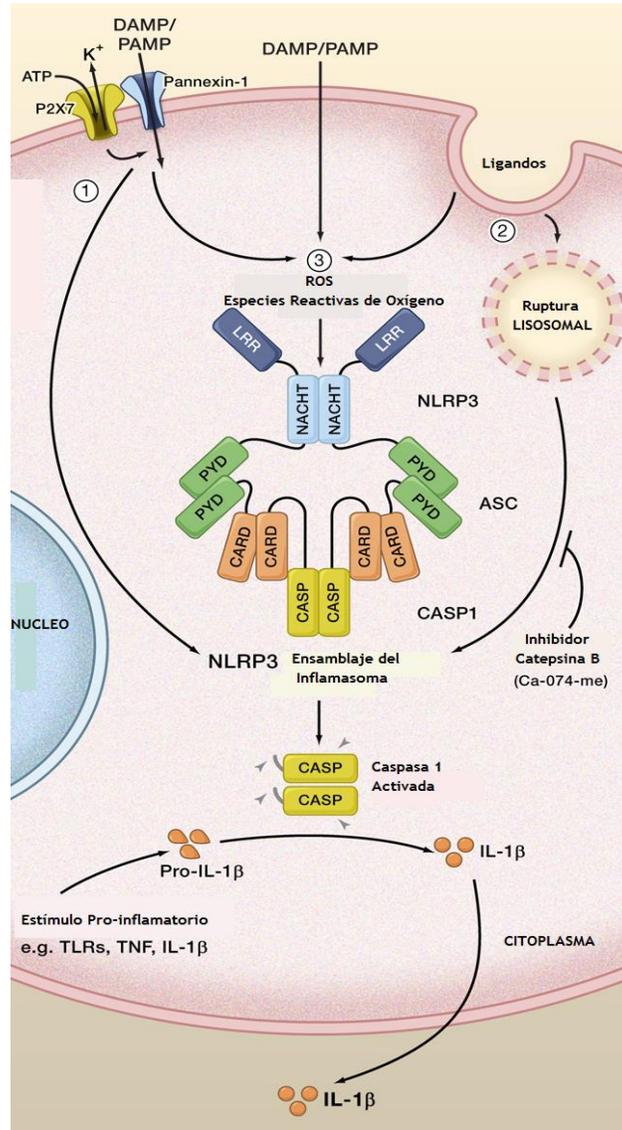


Figura 13. Activación del inflamasoma NLRP3. Los DAMPs incluyendo el ATP inician la generación de especies reactivas de oxígeno, ROS. Una vía dependiente de ROS inicia la formación del complejo inflamasoma NLRP3, y la maduración dependiente de la caspasa 1. La agrupación caspasa-1 induce la autoactivación, maduración y secreción de citocinas pro-inflamatorias como la IL-1 β y la IL-18. Modificado de: (Schroder & Tschopp, 2010).

La actividad de la caspasa-1 dependiente del inflamasoma, también puede resultar en una forma de muerte celular altamente inflamatoria denominada **piroptosis**, que se ha descrito más frecuentemente asociada a infección con patógenos intracelulares. La piroptosis es, por definición, dependiente de la caspasa 1 y ocurre independientemente de las caspasas proapoptóticas. La piroptosis también es considerada una forma de muerte celular programada; sin embargo, es muy diferente de la muerte celular que se presenta en la apoptosis, la cual es inmunológicamente silente y controlada. En estos casos, al inflamasoma también se le ha llamado “**piroptosoma**” (Schroder & Tschopp, 2010).

La liberación de ROS mitocondrial lleva a permeabilización de la membrana lisosomal necesaria para activación del inflamasoma NLRP3. Una consecuencia de la activación de NLRP3 es la inducción de daño mitocondrial con bloqueo de la mitofagia que removería la mitocondria dañada. El DNA mitocondrial también activa el NLRP3. El influjo de calcio y el eflujo de potasio también son reguladores mayores del inflamasoma NLRP3.

NECROPTOSIS EN LA ISQUEMIA-REPERFUSIÓN:

Es claro que el trasplante se asocia invariablemente con injuria por isquemia-reperfusión y hemos descrito algunos mecanismos asociados a esta injuria, la importancia de la inflamación estéril y la relación con el rechazo.

La muerte celular resultante en la isquemia reperfusión tiene rasgos morfológicos de necrosis regulada, específicamente de **necroptosis**. La necroptosis se genera al perturbarse la apoptosis mediada por la caspasa 8 y depende de las proteínas cinasas 1 y 3, interactuando con el receptor, así como el MLKL (mixed lineage kinase domain like) para formar el **necroptosoma**. La liberación del contenido citosólico y de los DAMPs generan respuestas inmunes innatas y promueven también la respuesta inmune adaptativa influyendo en la aloinmunidad y en la sobrevida del injerto (Linkermann et al., 2013).

La necroptosis ha sido identificada como un elemento clave de la injuria por isquemia-reperfusión y abre nuevos horizontes a la manipulación farmacológica con inhibidores específicos de la necrosis regulada como los que causan interferencia a RIPK1, denominada necostatina-1 (Nec-1), que ha mostrado proteger al riñón, al corazón y al cerebro (Degterev et al., 2005; Degterev et al., 2008; Hitomi et al., 2008). Incluso, ya hay disponible una segunda generación de inhibidores de RIPK1 y RIPK3 que tendrán que probar su beneficio clínicamente en ensayos controlados.

FORMACIÓN DEL NECROPTOSOMA:

La vía de señalización que se ha identificado y responsable por la necroptosis se inicia con la trimerización del receptor muerte que resulta en el reclutamiento de proteínas adaptadoras a nivel intracelular como la molécula con dominio muerte asociada al receptor del factor de necrosis tumoral (TRADD: Tumor necrosis factor Receptor type 1-Associated DEATH Domain protein).

La proteína cinasa interactuando con el receptor (receptor-interacting protein kinase 1: RIPK1) está involucrada en el proceso de decisión de cómo las células responden a la unión del receptor muerte.

En el caso del receptor del factor de necrosis tumoral 1 (TNFR1) u otros receptores muerte, RIPK1 es poliubiquitinada a través de dos mecanismos independientes. Primero, los inhibidores celulares de la señalización de la apoptosis (ciAPs) vinculan a las cadenas poli-ubs Lys-63. Segundo, la cadena linear ubiquitina ensambla el complejo (LUBAC) adicionando cadenas lin-ub a RIPK1. Estas cadenas ub previenen a moléculas como la caspasa 8 o a RIPK3 de interactuar con RIPK1 para inducir las señales de muerte celular y consecuentemente llevar a la supervivencia de la célula, un proceso que es mediado a través del factor de transcripción nuclear NF- κ B en el complejo I (Figura). En el caso de la desubiquitinación de RIPK1 por desubiquitinasas (DUBs) como CYLD (cilindromatosis), un supresor tumoral de la familia de las desubiquitinasas y otras desubiquitinasas, el dominio muerte asociado a Fas y la pro-caspasa 8 son reclutadas en el complejo de señalización induciendo la muerte DISC (DISC: death-inducing signaling complex) y el complejo eventualmente se disocia de la membrana plasmática, ahora denominado Complejo II.

En este proceso, la Caspasa 8 se activa autocatalíticamente a través de proximidad forzada dentro de DISC y lleva a la escisión de las caspasas efectoras como la caspasa 3, la caspasa 6 y la caspasa 7 que finalmente ejecutan la apoptosis. La función más importante de la **caspasa 8** activa, es la prevención de la señalización de la necroptosis, la cual es alcanzada cuando se escinden RIPK1 y RIPK3, previniendo el ensamblaje del necroptosoma que se compone de RIPK1, RIPK3 y MLKL (MLKL: mixed-lineage kinase like domain).

La fosforilación de MLKL por el ripoptosoma dirige la oligomerización de MLKL, permitiendo que MLKL se inserte y permeabilice la membrana plasmática y las organelas. La integración de MLKL lleva al fenotipo inflamatorio y liberación de DAMPs que generan la respuesta inmune. De ahí que solo en condiciones en las que la caspasa 8 está ausente, no es funcional (mutada) o está inhibida (en caso de isquemia precisamente), permite el ensamblaje del necroptosoma,

el cual rápidamente lleva a muerte celular por necrosis, liberando los DAMPs (Linkermann et al., 2013).

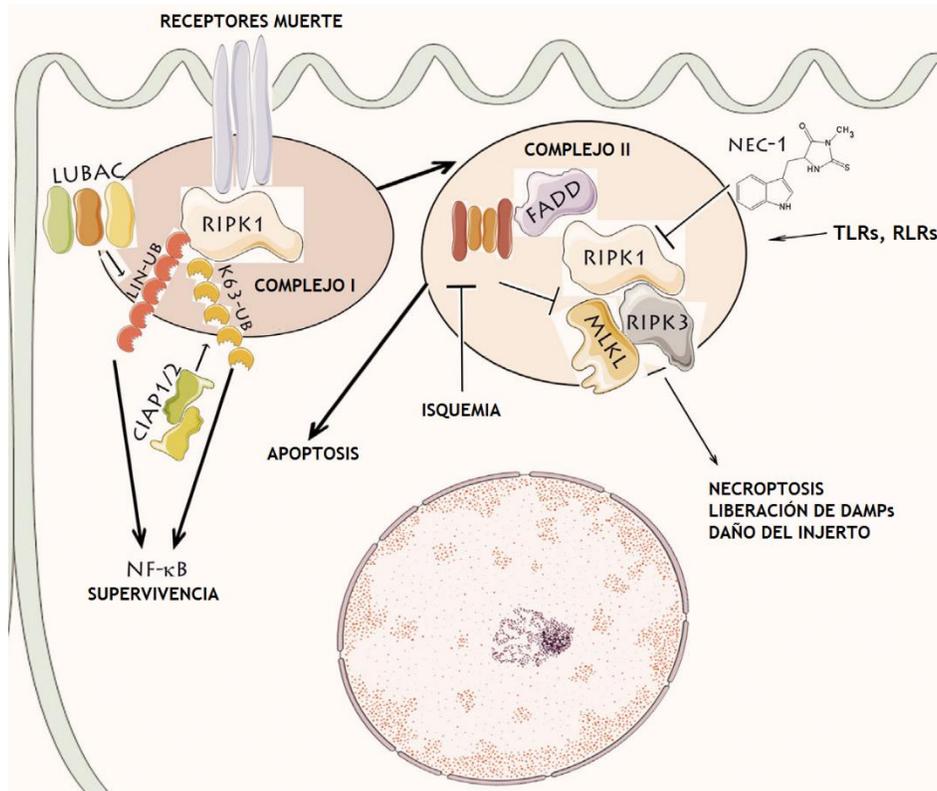


Figura 14. Formación del Necroptosoma. Secuencia de eventos: Trimerización del receptor muerte→reclutamiento de proteínas adaptadoras a nivel intracelular → poliubiquitinación de RIPK1 vinculando la cadena K63-UB y LIN-UB y ensamblando el complejo LUBAC → RIPK1 recluta RIPK3 → fosforilación de MLKL → ensamblaje del necroptosoma.

El proceso de respuesta inmunológica que es lesiva al injerto se presenta por mecanismos mucho más complejos que, simplemente, los DAMPs. Actualmente, hay especial interés en la necroptosis y en RIPK3 que es el mediador crítico de la necroptosis; no obstante, los diana corriente abajo del necroptosoma no están claramente indentificados. Un reporte sugiere que hay trasducción de la señal necroptótica dentro de la mitocondria vía la proteína atípica cinasa PGAM5 por formación del complejo mitocondrial III que llevaría a procesar el factor de fisión mitocondrial Drp-1.

Lo que si se ha demostrado es que en el mismo órgano pueden co-existir diferentes tipos de muerte celular luego de la injuria-reperfusión evidenciando la complejidad de las múltiples vías de muerte celular necrótica.

Previamente, he mencionado ejemplos de los diferentes tipos de DAMPs. Pues bien, la muerte celular necrótica y necroptótica lleva a la liberación de moléculas endógenas incluyendo proteínas de choque de calor, HMGB1, el ácido úrico, la fibronectina y otras que actúan como DAMPs en el proceso de isquemia-reperfusión protagonizando la injuria temprana del órgano. Estos DAMPs perpetúan la respuesta inmune adaptativa por promover la inflamación a través de la interacción con los TLRs y otros receptores del sistema inmune innato que expresan las células dendríticas y otras células del sistema inmune.

Es importante entonces entender que, la apoptosis, tiene influencia tolerogénica del huésped con el injerto, ya que una función importante de las caspasas es procesar las moléculas a un estado no inmunogénico, mientras que las células necróticas tienen una gran capacidad de promover la respuesta inmune tal como lo había hecho notar en el cuadro comparativo de tipos de muerte celular (Tabla 4). HMGB1 es convertido a una forma oxidada menos inmunogénica siguiendo a la apoptosis en contraste a la necroptosis. El DNA, que clásicamente, es degradado en fragmentos más pequeños, que son menos inmunogénicos, por la DNasa activada por la caspasa. Igual sucede con la citocina IL-33, otro DAMP liberado de las células necroptóticas, que se degrada en presencia de las caspasas activas. En contraste, la respuesta inmune no se encuentra atenuada después de que se pierde la integridad de la membrana plasmática en la muerte celular necrótica y esta respuesta exagerada, se magnifica en el trasplante de órganos sólidos en que la apoptosis es bloqueada y la necrosis se incrementa secundario a la iquemia-reperfusión y a la aloinmunidad.

Por todo esto es que se considera hoy que tanto la apoptosis como la necrosis son formas de muerte celular regulada que, de manera diferencial, dirigen la inflamación.

HÍGADO:

Una respuesta inflamatoria excesiva es claramente reconocida como un mecanismo clave de injuria durante la isquemia-reperfusión. La isquemia activa las células de Kupffer que son la principal fuente de formación de ROS vasculares durante el período inicial de reperfusion. Con el estrés oxidativo en las células de Kupffer, se generan ROS por la xantina oxidasa y en particular en la mitocondria. Recientemente, se ha identificado a la NADPH oxidasa como una fuente mayor de formación de superóxido en las células endoteliales y los hepatocitos (Jaeschke, 2003). Esta NADPH oxidasa es regulada por Rac1, un miembro de la familia Rho de GTPasas.

Las citocinas y quimiocinas pro-inflamatorias y los factores del complemento activados, son responsables por el reclutamiento de neutrófilos y el subsecuente estrés oxidativo inducido por neutrófilos durante la fase de reperfusión.

La injuria por isquemia-reperfusión es un contribuyente mayor a la disfunción del injerto postrasplante y por ende a la morbilidad y mortalidad pues recordemos que para la falla hepática no existe ninguna terapia alterativa disponible como si lo hay para la falla renal; siendo el hígado un órgano vital, la falla hepática acarrea consigo nefastas consecuencias. Adicionalmente, no hay a la fecha, una intervención terapéutica efectiva para prevenir o controlar la injuria por isquemia-reperfusión, lo que le confiere mayor relevancia al entendimiento de los fenómenos que suceden al inevitable período de isquemia-reperfusión en el hígado.

El hígado es un órgano con alto requerimiento energético debido a su tamaño (el segundo órgano más grande del cuerpo humano) y a sus funciones y es altamente dependiente de la suplencia de oxígeno y también susceptible a la hipoxia. Por su único modelo de suplencia sanguínea dual (sangre arterial y venosa) y la alta concentración de mitocondrias por célula individual es particularmente susceptible a la isquemia.

En el proceso de procuramiento, el hígado se ve sometido a períodos alternados de isquemia en frío e isquemia caliente puesto que es removido de la preservación isquémica en frío cuando se extrae de la nevera, es luego colocado en el receptor y mientras se realizan todas las anastomosis vasculares está sometido a isquemia caliente; con frecuencia, es irrigado y lavado con solución salina fría antes de la reperfusión y luego, una vez se sueltan los clamps es reperfundido por la vena porta sin tener aporte de sangre oxigenada mientras se realiza la anastomosis de la arteria hepática que entregaría sangre adecuadamente oxigenada. Adicionalmente, si técnicamente hay que solucionar fugas en las anastomosis venosas, puede ser necesario realizar de nuevo el pinzamiento de los vasos del flujo sanguíneo de ingreso y de egreso, mientras se realiza el cierre hermético de las anastomosis venosas (porto-portal, venas suprahepáticas a vena cava, cavo-cava, derivación porto-cava dependiendo de la técnica y del caso particular).

La isquemia en frío induce injuria primordialmente a las células del endotelio sinusoidal y a las no parenquimatosas, mientras que los hepatocitos son los principales afectados en la isquemia caliente (Cursio et al., 2015).

El hígado no está exento a todos los fenómenos que hemos descrito. Siendo estos, fenómenos a nivel celular y molecular, también se suceden en el hígado por lo que solo mencionaré aspectos complementarios y propios de este órgano durante la fase de isquemia-reperfusión.

Los cambios endoteliales son idénticos a los ya descritos; sin embargo, en el hígado, son las células de Kupffer las que se activan y reclutan neutrófilos potenciando la muerte de los hepatocitos que sufren tres cambios mayores: anoxia, depleción nutricional y acidosis citosólica. Los cambios celulares y moleculares se suceden, como se describió previamente.

En la isquemia-reperfusión del hígado hay daño celular directo, necrosis y apoptosis de los hepatocitos que pueden llevar a disfunción del órgano. La necrosis es el tipo predominante de muerte celular en el hígado. Este daño celular se presenta por activación del sistema inmune y propagación de la respuesta inflamatoria.

Los hepatocitos poseen cientos de mitocondrias (organelas de doble membrana) y cuando son expuestos al estrés oxidativo, se presenta una permeabilidad transicional en la mitocondria iniciada por las alteraciones en el calcio, el fofato, el pH, y los ROS. Una vez se inicia este período, la membrana interna mitocondrial colapsa y los solutos pueden difundirse libremente a través de la membrana interna mitocondrial; la mitocondria se despolariza, edematiza y la membrana externa mitocondrial se rompe liberando al citocromo C que normalmente se encuentra en el espacio intermembrana. El citocromo c es una proteína del apoptosoma. Su liberación activa la apoptosis dependiente de caspasa y ATP. Sin embargo, como las células están depletadas de ATP desarrollan muerte celular necrótica aun en presencia de señales pro-apoptóticas. Así, la disponibilidad de ATP es clave en el cambio de necrosis a apoptosis y viceversa. En la necrosis se presenta la liberación de los DAMPs.

La depleción de nutrientes es uno de los más poderosos estímulos para la autofagia que como explicamos en los tipos de muerte celular, es una vía intracelular controlada para digerir y remover organelas y proteínas mediante la formación del autosoma que envuelve los constituyentes celulares antes de fusionarse con el lisosoma para producir un autolisosoma en donde estos constituyentes son degradados a aminoácidos. La autofagia entonces, es silenciosa desde el punto de vista inmunológico. No genera inmunogenicidad y es totalmente controlada.

En los períodos cortos de isquemia, y durante la fase de perfusión en cambio, la mitocondria se repolariza transitoriamente y la cadena de transporte de electrones se restablece llevando a la generación de ATP. Así, se sucede autofagia para eliminar proteínas anormales y organelas producidas durante la isquemia. Esto en el caso de que la isquemia sea corta; en la isquemia prolongada, la casi completa pérdida de ATP celular impide la autofagia que requiere energía

de manera importante. El mecanismo se explica porque la sobrecarga de calcio activa las *calpaínas* que hidrolizan a las proteínas claves de la autofagia, ATG7 y BECN1.

La inhibición de la autofagia falla para eliminar la mitocondria disfuncional y se incrementa la producción de ROS que induce la necrosis de los hepatocitos con liberación de DAMPs.

Un claro protagonista de la respuesta son los DAMPs como lo hemos establecido previamente, liberados de las células necróticas y de los tejidos lesionados. Numerosos estudios han demostrado ya, que los DAMPs juegan un papel dominante en la patogénesis de la injuria por isquemia-reperfusión y que, son considerados hoy en día, un biomarcador de injuria luego de la isquemia-reperfusión.

v. **MODELOS EXPERIMENTALES**

v. 1. **MODELO EXPERIMENTAL 1:**

PATRONES MOLECULARES ASOCIADOS A DAÑO MITOCONDRIAL LIBERADOS DURANTE LA ISQUEMIA-REPERFUSIÓN HEPÁTICA E INDUCE LA RESPUESTA INFLAMATORIA

La isquemia-reperfusión a que se ven sometidos los órganos con propósito de trasplante, genera inmunogenicidad e impacta el resultado global de injertos y receptores. Los fenómenos celulares y moleculares descritos, incrementan la inmunogenicidad del aloinjerto a partir de un proceso de inflamación estéril que activa al sistema inmune y propicia el daño de los órganos a partir de un intermediario clave que son los patrones moleculares asociados al daño (DAMPs).

Numerosos modelos experimentales han investigado el papel de los DAMPs y han ilustrado su importancia. A manera de ejemplo, tomaremos una publicación de una investigación que empleó modelos murinos *in vitro* e *in vivo* que permitieron confirmar los elevados niveles sugiriendo que pueden incluso servir como marcadores de injuria por isquemia-reperfusión.

Hu et al (2015), se enfocaron en entender el papel de los DAMPs mitocondriales en la patogénesis de la injuria por isquemia-reperfusión hepática, particularmente en sus dos DAMPs característicos que son el DNA mitocondrial y los formil péptidos que actúan sobre los *Formyl peptide receptors* (FPRs) y *Toll-like receptors* (TRLs) respectivamente.

El **primer objetivo** de este modelo fue determinar si los DAMPs son liberados durante la isquemia-reperfusión hepática empleando modelos *in vitro* de isquemia en frío y en caliente y una vez demostrado, confirmaron este hallazgo en un modelo *in vivo*.

El **Segundo objetivo** fue investigar si los DAMPs podían producir daño hepático independiente de la isquemia-reperfusión.

METODOLOGÍA:

MODELO IN VITRO:

Para este modelo, se emplearon dos líneas de hepatocitos: la *McA-RH7777 rat hepatocyte cell line* y la *Hep G2 human hepatocyte*. Para simular la isquemia en frío, se cultivaron en una cámara hipóxica y en solución de preservación de la Universidad de Wisconsin (UW) a 4°C por 6 horas. La perfusión fue simulada por cambiar la UW a un medio DMEM tibio en una cámara normóxica, humidificada por 1 hora. Para simular la isquemia en caliente, las células fueron cultivadas en DMEM en la cámara hipóxica a 37°C por 2 horas y reoxigenadas de la misma manera descrita. Así, pudieron obtenerse 3 grupos: grupo control, grupo isquemia y grupo isquemia-reperfusión.

MODELO IN VIVO:

A ratas Lewis les realizaron laparotomía y una maniobra de Pringle, es decir un pinzamiento atraumático de la tríada portal, para suprimir totalmente el flujo sanguíneo al hígado durante 1 hora, al cabo de la cual se removió el pinzamiento permitiendo la perfusión. Los animales fueron aleatoriamente asignados a dos grupos de 3 sujetos cada uno: Grupo control, en el que se realizó laparotomía, pero no se realizó pinzamiento (sin isquemia-reperfusión), Grupo Experimental como se describió. Al final fueron sacrificados para los análisis.

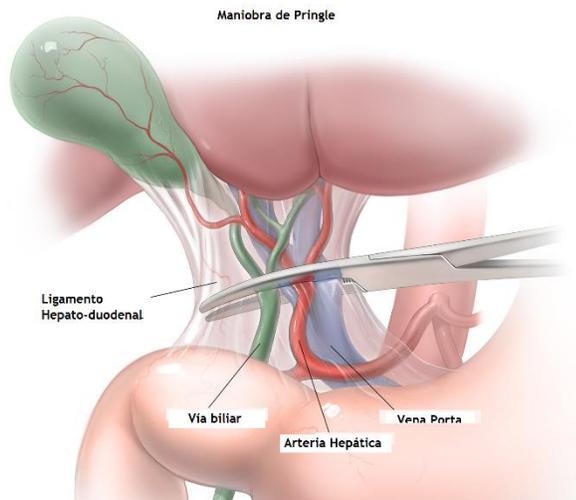


Figura 15 . Metodología modelo experimental 1. Izquierda: rata Lewis, desarrollada por el Dr. Lewis en 1950s; es una rata albina, de comportamiento dócil y baja fertilidad que sufre de patología espontáneas como alta incidencia de neoplasias; muy empleada actualmente en el campo de la investigación experimental de los trasplantes. Derecha: Maniobra de Pringle: Obsérvese el pinzamiento de todas las estructuras del ligamento hepato-duodenal en donde se encuentra la suplenencia sanguínea del hígado generando una isquemia importante.

EVALUACIÓN HISTOPATOLÓGICA:

las muestras de tejido hepático fueron procesadas y coloreadas como se hace tradicionalmente en formalina y parafina y con hematoxilina-eosina y evaluadas para daños celulares y conteo celular con microscopía de luz de alto poder.

INMUNOHISTOQUÍMICA:

Los hepatocitos apoptóticos fueron identificados usando inmunohistoquímica para pro-caspasa-3 y caspasa 3 escindida o activa.

ASLAMIENTO DE MITOCONDRIAS:

Realizado con el kit de aislamiento de mitocondrias Pierce tanto de las ratas como de los hepatocitos humanos (McA RH-7777) y de las células Hep G2.

ENSAYO PARA APOPTOSIS:

Los hepatocitos de rata, humanos y las Hep G2 fueron marcados con isotiocianato de fluoresceína marcado con anexina V y propidium yodo empleando el kit de detección de apoptosis Annexin V-FITC. La fluorescencia se detectó a la hora siguiente usando citometría de flujo.

NIVELES DE ENZIMAS HEPÁTICAS:

Se recolectó suero una hora después de la reperfusión y se midieron los niveles de transaminasas.

DETECCIÓN DE CITOCINAS:

Con ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) se midieron niveles de factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interleucina 6 (IL-6) e interleucina 10 (IL-10) en ratas.

Adicionalmente, se realizó PCR en tiempo real para el análisis del DNA mitocondrial con primers para el citocromo B, la subunidad C del citocromo oxidasa, la NADH deshidrogenasa, la β actina humana, la glicer-aldeído fosfato deshidrogenasa (GAPDH) de rata, y las expresiones de RNA mensajero de los TLR2, TLR4, TLR9, MyD88, y NF- κ B.

RESULTADOS:

Las células que experimentaron isquemia-reperfusión *in vitro* mostraron significativamente más altos niveles de DAMP mitocondrial comparadas con los controles normóxicos (Figura 16).

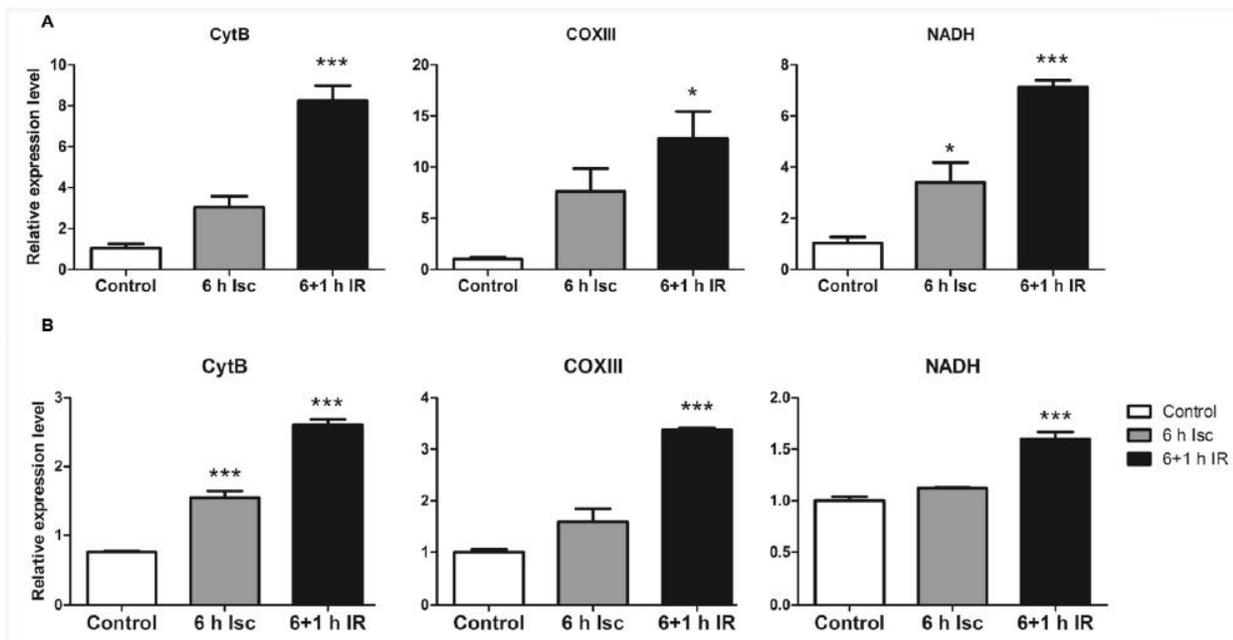


Figura 16. Isquemia en frío y reperfusión caliente *in vitro* eleva los niveles de DNA mitocondrial en hepatocitos de rata y humanas. (A) 6 horas de isquemia y 1 hora de reperfusión incrementaron significativamente los niveles de DNA mitocondrial en la línea

celular de los hepatocitos de rata McA RH7777. (B) 6 horas isquemia y una hora de reperfusion significativamente incrementaron los niveles de DNA mitocondrial en la linea celular de hepatocitos Isc=Isquemia: Células cultivadas en isquemia en frio, IR: Células cultivadas x 6 horas en isquemia en frio seguidas de una hora de reperfusion caliente. CytB: Citocromo B, COXIII: citocromo C oxidasa subunidad III, NADH: NADH deshidrogenasa. **:p=0,01; ***:p=0,0001. Tomado de: Hu et al., 2015.

En un segundo set de experimentos, las lineas celulares fueron expuestas a isquemia caliente por cuatro horas y reperfusion una hora. Ambos, hepatocitos humanos y de rata mostraron tendencias similares con niveles significativamente incrementados de DAMPs mitocondriales luego de la isquemia y despues de la reperfusion (Figura 17), indicando que tanto la isquemia en frio como la caliente *in vitro* se asociaron con niveles elevados de DAMPs mitocondriales.

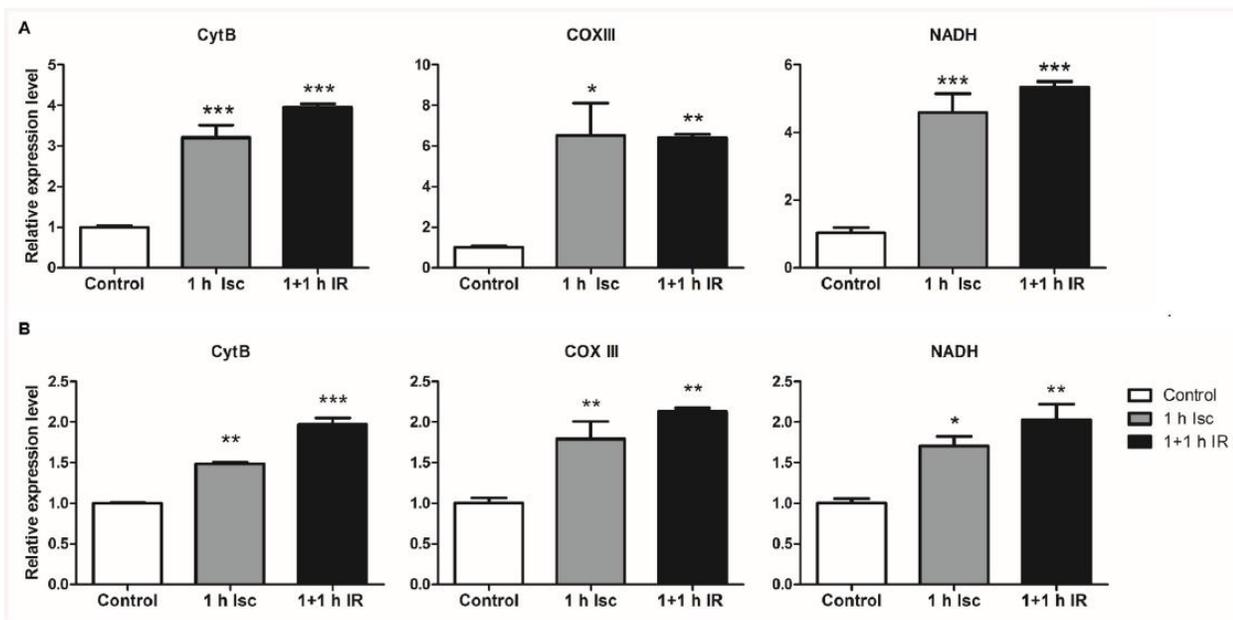


Figura 17. Isquemia y reperfusion calientes *in vitro* eleva los niveles de DNA mitocondrial en hepatocitos de rata y humanos. (A) Isquemia caliente de una hora y dos horas de isquemia-reperfusion significativamente incrementaron los niveles de DNA mitocondrial en el hepatocito de ratas McA RH7777. (B) Una hora de isquemia caliente y dos horas de isquemia-reperfusion caliente significativamente incrementó los niveles de DNA mitocondrial en hepatocitos humanos HepG2. Controles: Las células fueron cultivadas de manera tradicional en incubadora por dos horas. 1 h Isc: Una hora de incubación en isquemia caliente. 1 + 1 IR: una hora de incubación de isquemia caliente seguida por una hora de reperfusion caliente. CytB:citocromo B, COXIII: citocromo c oxidasa subunidad III; NADH: NADH deshidrogenasa. *:p=0,01; **:p=0,001; ***:p=0,0001.

OBJETIVO 2. RESULTADOS:

Para explorar el papel de los DAMPs, los investigadores co-cultivaron células en un medio ambiente normal, de normoxia y normotermia con DAMPs extraídos de hepatocitos. Con el kit de detección de apoptosis The Annexin V-FITC apoptosis detection kit (eBioscience) se detectó la apoptosis o necrosis luego de exposición exponer los hepatocitos normales a los DAMPs y de comparar células sufriendo isquemia-reperfusión con células control.

La muerte celular se generó en las células con isquemia sola y también con isquemia-reperfusión *in vitro* pero de una extensión diferente. Los DAMPs indujeron un patrón de muerte celular similar a las células tratadas con isquemia-reperfusión *in vitro* (Figura 18).

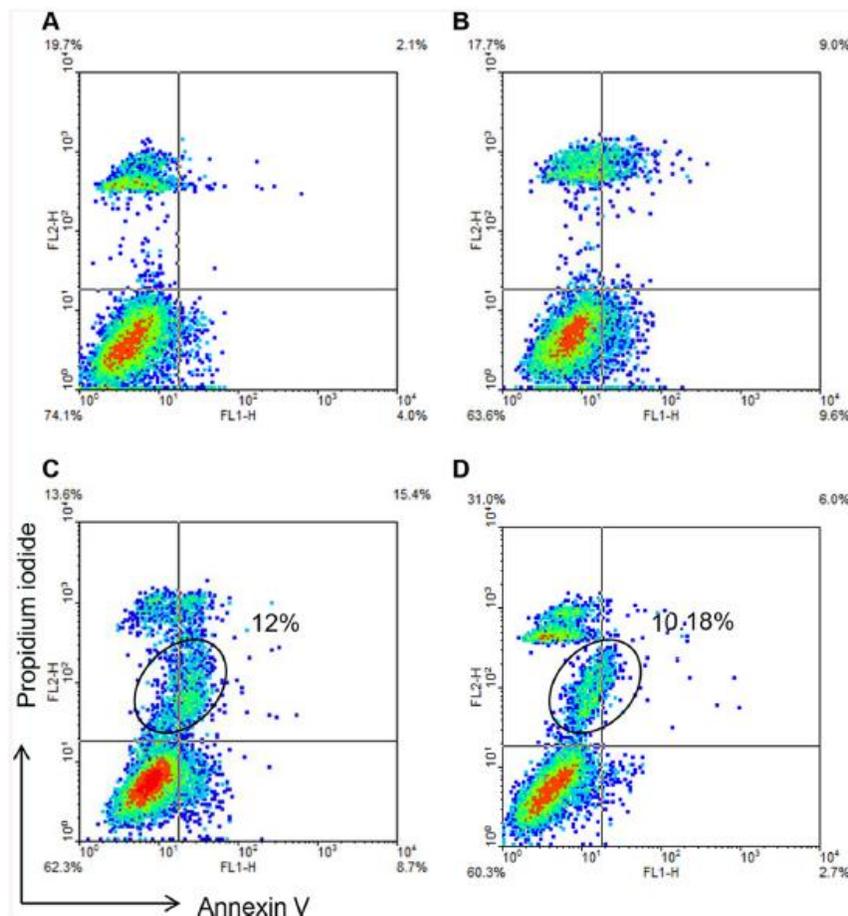


Figura 18. Los DAMPs inducen un patrón similar de muerte celular comparado con el de las células sufriendo isquemia y perfusión en caliente *in vitro*. La apoptosis en los hepatocitos HepG2 *in vitro* sufriendo isquemia-reperfusión e incubación con DAMPs. (A) control: Hepatocitos HepG2 fueron cultivados en medio ambiente normal. (B) Grupo isquemia: hepatocitos HepG2 que fueron mantenidos en medio ambiente hipóxico por 6 horas *in vitro* demostraron apoptosis incrementada cuando se compararon a las células control. (C) Grupo

isquemia-reperfusión: Hepatocitos HepG2 incubado en medio ambiente hipóxico por 6 horas y subsecuentemente transferido a una incubación normóxica 24 horas presentaron un porcentaje incrementado de apoptosis y necrosis. Adicionalmente, estas condiciones indujeron una sub-población de células PI-positivas (en el círculo). (D) Grupo de incubación con los DAMPs: Hepatocitos HepG2 que fueron co-cultivados con DAMPs en un medio ambiente normal por 24 horas demostraron un porcentaje incrementado de apoptosis y necrosis con una subpoblación incrementada de células PI-positivas (en el círculo), similar al grupo isquemia-reperfusión (C). Esta figura es representativa de tres experimentos con resultados similares. La población PI positiva es el nivel basal de muerte celular.

Estos resultados sugieren que los DAMPs podrían exacerbar la injuria del órgano después de la isquemia-reperfusión. También reportan los autores que incubaron hepatocitos con diferentes concentraciones de DAMPs y observaron que estos generan muerte celular de una manera dosis-dependiente en ambas líneas celulares (Figura 19).

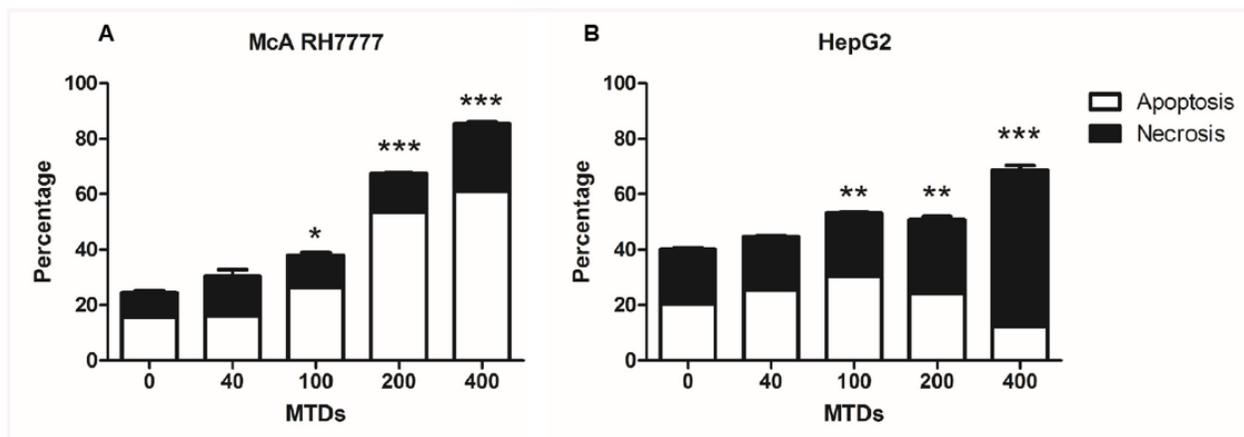


Figura 19. Los DAMPs causan muerte celular *in vitro* de una manera dosis-dependiente. (A) DAMPs indujeron significativamente la muerte celular en concentraciones por encima de 100 ug/ml, en McA RH7777 co-cultivadas con diferentes concentraciones de DAMPs por 24 horas. (B) Los DAMPs indujeron significativamente muerte celular en los hepatocitos en concentraciones por encima de 100 ug/ml en los hepatocitos HepG2 co-cultivados con diferentes concentraciones de DAMPs por 24 horas. La barra blanca indica células positivas para Anexina I, la barra negra indica células PI positivas. *:p=0,01, **:p=0,001, ***:p=0,0001 (n=3 en cada grupo).

DAMPs CIRCULANTES SE INCREMENTARON EN LAS RATAS CON ISQUEMIA-REPERFUSIÓN *IN VIVO*:

Para investigar si estos resultados *in vitro* podrían ser replicados *in vivo*, los investigadores evaluaron los niveles de DAMPs en sangre periférica de ratas que fueron sometidas a isquemia-

reperfusión hepática vs. Ratas a las que se les practicó la misma cirugía excepto por la isquemia-reperfusión.

En el modelo *in vivo*, el grupo isquemia-reperfusión mostró un incremento significativo de DAMPs en el tiempo, comparado al grupo control (Figura 20).

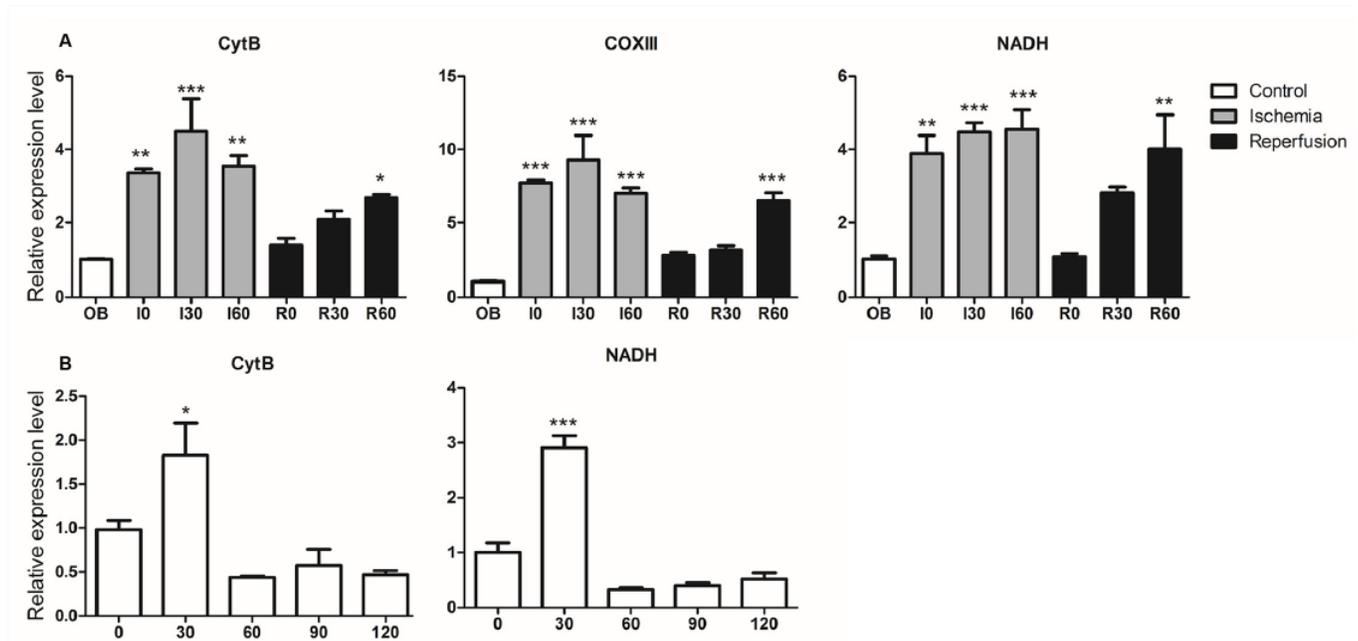


Figura 20 . Incremento en los niveles circulantes de DAMPs *in vivo* en el grupo de isquemia-reperfusión hepática. (A) Una hora de isquemia caliente y una hora de reperfusión caliente *in vivo* incrementaron significativamente los niveles de DAMPs mitocondriales tanto durante la isquemia como durante la isquemia-reperfusión. OB: recolección de sangre inmediatamente después de la laparotomía; I: isquemia: el clamp atraumático fue colocado en la triada portal durante 60 minutos; R:reperfusión; reperfusión fue iniciada por remoción del clamp atraumático y observado por otros 60 minutos; I0, I30, I60: isquemia por 0/30/60 minutos; R0, R30, R60: después de 60 minutos del pinzamiento de la triada portal y el clamp fue removido para alcanzar la perfusión por 0/30/60 minutos. (B) los niveles de DNA mitocondrial no fueron alterados luego de 2 horas después de la operación sin pinzamiento. 0, 30, 60, 90, 120 indican los minutos de tiempo de cirugía sin isquemia-reperfusión, es decir, sin pinzamiento de la triada portal. *:p=0,01, **:p=0,001, ***p=0,0001 (n=3 en cada grupo).

Estos resultados indican que la isquemia-reperfusión hepática total puede generar un incremento significativo de DAMPs circulantes en sangre, los cuales servirían como un marcador para isquemia-reperfusión hepática.

LA ISQUEMIA-REPERFUSION GENERA INJURIA HEPATICA *IN VIVO*:

Para confirmar que la isquemia-reperfusión lleva a injuria de los hepatocitos *in vivo*, los investigadores midieron las células necróticas con disrupción de membrana. Se encontró más injuria en el grupo con isquemia-reperfusión que en el grupo intervenido sin isquemia-reperfusión (Figura 21).

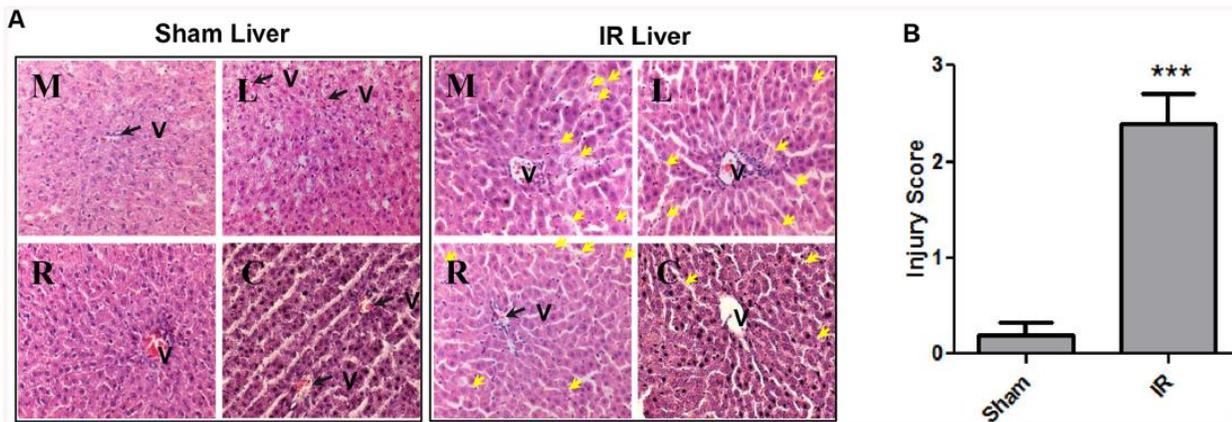


Figura 21. Histopatología de la injuria hepática después de la isquemia-reperfusión. Las secciones de hígado se obtuvieron a los 120 minutos. (A) Isquemia-reperfusión indujo injuria hepática evaluada por coloración con hematoxilina-eosina (H&E) de diferentes lóbulos hepáticos así: medio (M), izquierdo (L), derecho (R) y caudado (C) de los grupos sin isquemia-reperfusión y con isquemia-reperfusión. La flecha negra y la letra V apuntan a la vena porta, la flecha amarilla indica células necróticas. (B) la isquemia-reperfusión induce significativa injuria hepática evaluada por el índice de injuria de Suzuki. ***:p=0,0001 (n=3 en cada grupo).

ÍNDICE DE SUZUKI PARA EVALUAR DAÑO HEPÁTICO LUEGO DE ISQUEMIA-REPERFUSIÓN			
ÍNDICE	CONGESTIÓN	VACUOLIZACIÓN	NECROSIS
0	Ninguna	Ninguna	Ninguna
1	Mínima	Mínima	Necrosis celular
2	Leve	Leve	< 30%
3	Moderada	Moderada	< 60%
4	Severa	Severa	> 60%

Tabla 6. Índice de Suzuki para evaluar el daño hepático luego del proceso de isquemia-reperfusión. Tomado de: Suzuki et al., 1991.

Las enzimas hepáticas permanecieron dentro del rango normal en el control pero se halló diferencia estadísticamente significativa en los niveles de las transaminasas luego de isquemia-reperfusión (Figura 22).

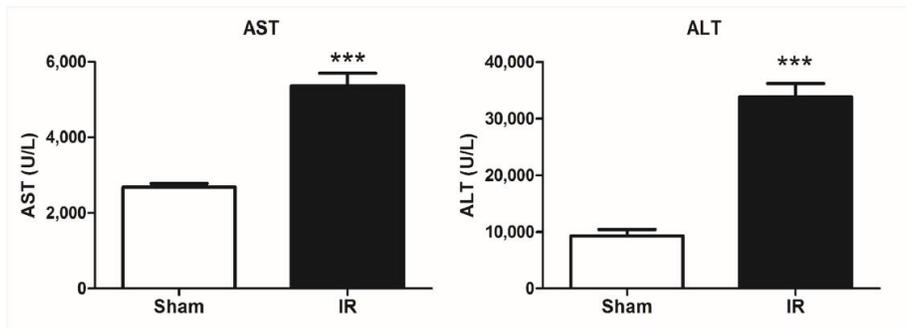


Figura 22. **Injuria hepatocelular evaluada por AST y ALT.** La isquemia-reperfusión indujo significativa injuria hepática como lo demostraron los niveles elevados de AST y ALT. Las muestras de suero fueron obtenidas de las ratas a los 120 minutos pos-reperfusión. Una diferencia estadísticamente significativa fue notada en el nivel sérico promedio de ALT y AST luego de la inducción de la isquemia-reperfusión, comparado con las ratas operadas pero en las que no se indujo isquemia-reperfusión *in vivo*. ***:p=0,0001 (n=3 en cada grupo).

La pro-caspasa 3 es una proteína intrínseca que es escindida en fragmentos cuando la célula sufre apoptosis y es usada comúnmente como un marcador de apoptosis. Se evaluó apoptosis en los grupos con inmunohistoquímica para la caspasa 3 escindida y la pro- caspasa 3. Las secciones hepáticas del grupo isquemia-reperfusión fueron altamente positivas para la forma escindida de caspasa 3 comparado con el grupo de cirugía sin isquemia-reperfusión (Figura 23).

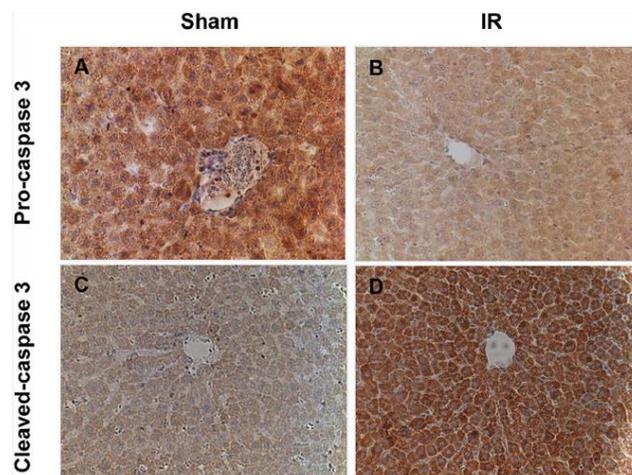


Figura 23. **La injuria-reperfusión hepática causa apoptosis *in vivo*.** Las secciones hepáticas fueron obtenidas a los 120 minutos pos-reperfusión. (A) y (B) La intensidad de la inmunocoloración de la caspasa 3 escindida significativamente se incrementó después de isquemia-reperfusión comparado con el grupo operado sin isquemia-reperfusión.

Adicionalmente, los investigadores observaron una tendencia que sugería que en los hígados del grupo isquemia-reperfusión había más células apoptóticas, porque la caspasa 3 escindida se acumuló mientras que la pro-caspasa 3 se encontró reducida.

LA ISQUEMIA-REPERFUSIÓN HEPÁTICA INDUJO LA PRODUCCIÓN DE CITOCINAS INFLAMATORIAS:

Los niveles séricos de TNF- α , IL-6, IL-10 se incrementaron marcadamente en el suero justo 1 hora después de la isquemia-reperfusión hepática mientras la producción de TNF- α mostró un leve incremento cuando se comparó con el grupo sin isquemia-reperfusión (Figura 24).

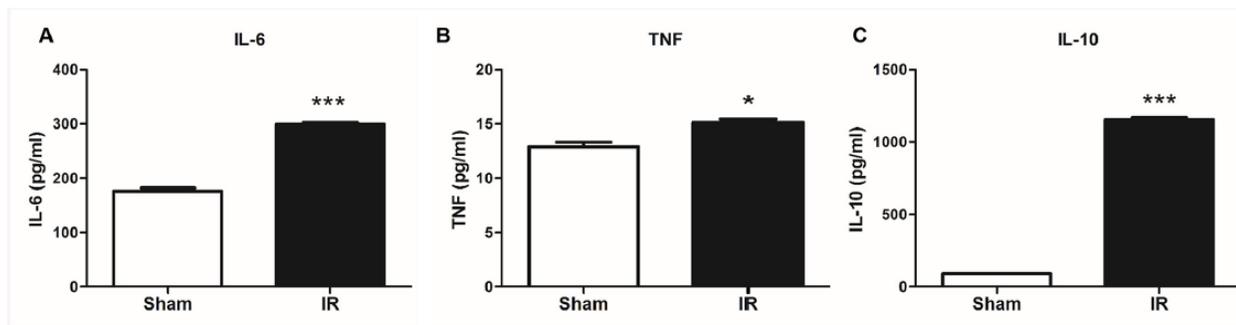


Figura 24. La isquemia-reperfusión hepática total causa inflamación sistémica *in vivo*. La isquemia-reperfusión total induce la liberación de citocinas IL-6 (A), TNF- α (B), y IL-10 (C) de manera significativa. Las muestras de suero fueron obtenidas a los 120 minutos pos-reperfusión. *:p=0,01, ***:p=0,0001 (n=3 en cada grupo).

Los incrementos en las IL-6, TNF- α , y IL-10 estuvieron asociadas con un incremento en los DAMPs circulatorios.

LOS DAMPs INDUCEN LA EXPRESIÓN DE MyD88 y NF- κ B Y UP-REGULAN LA EXPRESIÓN DE TLR2, TLR4 Y TLR9

La expresión de RNA mensajero para TLR2, TLR4, TLR9, MyD88 y NF- κ B fueron similares para los hepatocitos co-cultivados con DAMPs 400 ug/ml, isquemia-reperfusión caliente e isquemia-reperfusión en frío (Figura 25).

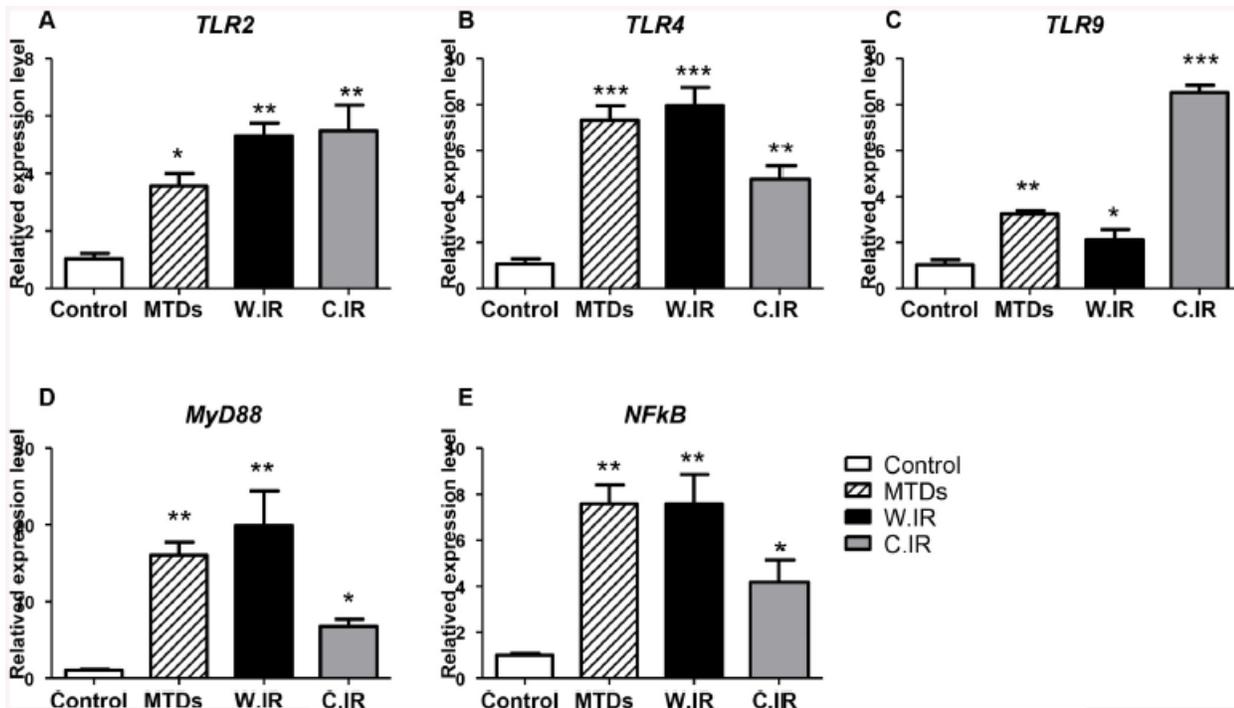


Figura 25. Cambios en los niveles de RNA mensajero de TLR2, TLR4, TLR9, MyD88 y NF-κB. Los DAMPs indujeron la expresión de MyD88 y NF-κB y la up-regulación de TLR2, TLR4 y TLR9 similar a la isquemia-reperfusión hepática caliente. (A)-(E) El nivel de expresión de TLR2, TLR4, TLR9, MyD88 y NF-κB significativamente se incrementó con el co-cultivo con los DAMPs, la isquemia-reperfusión en caliente y la isquemia-reperfusión en frío comparadas con los controles. MTDs:co-cultivo de DAMPs con hepatocitos McA RH7777 por 24 horas. W:IR: hepatocitos McA RH7777 sufriendo isquemia-reperfusión por 1 hora seguida por perfusión por 24 horas *in vitro*. C:IR: hepatocitos McA RH 7777 sufriendo isquemia en frío por 6 horas seguidas por perfusión por 24 horas *in vitro*. *:p=0,01, **:p=0,001, ***:p=0,0001 (n=3 en cada grupo).

Los niveles de expresión de todos estos genes fueron significativamente más altos en los hepatocitos co-cultivados con DAMPs así como en los con isquemia caliente y fría en comparación con el grupo control. Los niveles de expresión todos normalizados en el grupo control son como sigue: TLR2 (MTDs: $3,572 \pm 0,426$, $p < 0,01$; isquemia-reperfusión caliente: $5,302 \pm 0,462$, $p < 0,001$; isquemia-reperfusión en frío: $5,492 \pm 0,893$, $p < 0,001$), TLR4 (MTDs: $7,309 \pm 0,635$, $p < 0,0001$; isquemia-reperfusión caliente: $7,953 \pm 0,794$, $p < 0,0001$; isquemia-reperfusión en frío $4,753 \pm 0,594$, $p < 0,001$), TLR9 (MTDs: $3,246 \pm 0,145$, $p < 0,001$; warm IR: $2,129 \pm 0,430$, $p < 0,01$; cold IR: $8,528 \pm 0,303$, $p < 0,0001$), MyD88 (MTDs: $16,04 \pm 1,718$, $p < 0,001$; warm IR: $19,90 \pm 4,494$, $p < 0,001$; cold IR: $6,744 \pm 0,977$, $p < 0,01$), and NFκB (MTDs: $7,591 \pm 0,802$, $p < 0,001$; warm IR: $7,589 \pm 1,266$, $p < 0,001$; cold IR: $4,176 \pm 0,970$, $p < 0,01$).

LOS DAMPs INDUJERON LA UP-REGULAN LA EXPRESIÓN DE TNF α

Se realizó el ensayo de las citocinas pro-inflamatorias IL-6 y TNF α en el sobrenadante por ELISA. Los niveles de IL-6 no se incrementaron en el control, ni en los grupos co-cultivados con los DAMPs o con isquemia-reperfusión en caliente o en frío. Se encontró también un poco de TNF α en el sobrenadante de los hepatocitos co-cultivados con DAMPs (20.23 ± 6.971 pg/ml) y en las células sujetas a isquemia-reperfusión en caliente (6.799 ± 3.519 pg/ml) mientras estos niveles fueron detectables en el grupo control y las células sujetas a isquemia-reperfusión fría (Tabla 7).

	Control	MTDs*	Warm IR	Cold IR
TNF α	NA	20.23 ± 6.971	6.799 ± 3.519	NA

Tabla 7. TNF α fue liberado por los hepatocitos co-cultivados con DAMPs y los sometidos a isquemia-reperfusión en caliente. *MTDs: hepatocitos McA RH7777 co-cultivados con DAMPs 400 ug/ml por 24 horas; W.IR: hepatocitos McA RH7777 sufriendo isquemia en caliente por 1 hora seguido por la perfusión por 24 horas *in vitro*. NA, no disponible.

La expresión de TNF α fue significativamente up-regulada en los hepatocitos co-cultivados con DAMPs por qPCR (Figura 26), el cual fue $16,12 \pm 2,974$ veces más alta que el grupo control ($p < 0,001$).

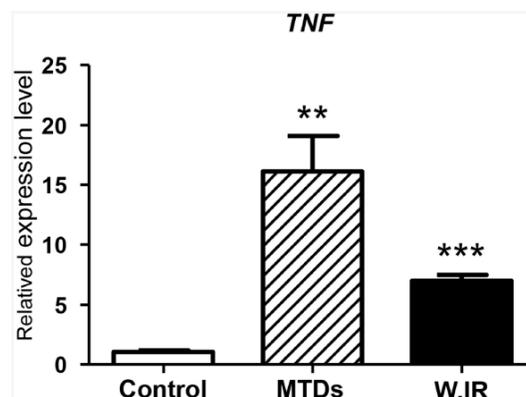


Figura 26. Cambios en los niveles del RNA mensajero del TNF α . La expresión up-regulada de TNF α , inducida por DAMPs fue similar en los hepatocitos con isquemia-reperfusión caliente y en los co-cultivados con DAMPs. MTDs: hepatocitos McA RH7777 co-cultivados con DAMPs 400 ug/ml por 24 horas; W.IR: hepatocitos McA RH 7777 que sufrieron isquemia en caliente por 1 hora y perfusión por 24 horas *in vitro*. **:p=0,001, ***:p=0,0001 (3 en cada grupo).

DISCUSIÓN:

Este es una de muchas investigaciones que aportan evidencia sobre el papel crítico de los DAMPs en la iniciación de la injuria por isquemia-reperfusión. Los DAMPs clásicos son el DNA mitocondrial y los formil péptidos que actúan sobre los receptores TLRs y FPRs, respectivamente. Este estudio confirma que los DAMPs se elevaron en los hepatocitos sufriendo isquemia-reperfusión *in vitro* y también *in vivo*; no obstante, los patrones de liberación de DAMPs fueron diferentes cuando las células fueron sometidas a isquemia relacionada a trasplante y a isquemia en caliente. La elevación fue mucho más alta en la isquemia-reperfusión comparado con la isquemia en frío sola. En contraste, en la isquemia caliente, los niveles de DAMPs se incrementaron inmediatamente tanto *in vitro* como *in vivo* y se mantuvieron altos en las fases de perfusión.

Todo esto indica que hay diferentes mecanismos de injuria en la isquemia en frío y en caliente y es consistente con otros estudios que también demuestran que durante la preservación en frío, los mediadores tóxicos no son liberados, mientras que en la isquemia en caliente son up-regulados.

También, por el elevando nivel de DAMPs luego de retirar el pinzamiento y reperfundir, se confirma que la perfusión libera DAMPs. Los DAMPs generan apoptosis y necrosis de una manera dosis-dependiente indicando que pueden servir como mediadores tóxicos participando en la patogénesis de la isquemia-reperfusión hepática.

La liberación de citocinas inflamatorias fue probablemente relacionada a la activación de las células dendríticas o macrófagos hepáticos por los DAMPs que también inducen las células inmunes llevando a muerte de los hepatocitos.

Todos estos hallazgos ratifican el papel fundamental de los DAMPs y que pueden ser empleados como un biomarcador de isquemia-reperfusión en el hígado.

V. 2. MODELO EXPERIMENTAL 2: EXPRESIÓN DE TLR2 Y TLR4 LUEGO DE ISQUEMIA-REPERFUSIÓN

La isquemia-reperfusión cursa con un proceso inflamatorio que causa daño celular. Luego de la isquemia-reperfusión la up-regulación de TLRs se incrementa. En este proceso, se estimula la up-regulación de los TLRs y las moléculas de adhesión y se secretan factores que se unen a los TLRs y generan una serie de eventos intracelulares culminando con el incremento en la expresión génica de citocinas inflamatorias.

Los TLRs son una familia de proteínas transmembrana que ligan una serie de productos microbianos y también los DAMPs. Particularmente, los TLR2 y TLR4 ligan proteínas de choque térmico (Heat Shock Protein=HSP=proteínas de respuesta al estrés), al high mobility group box 1 (HMGB1) y productos de fragmentación de fibronectina, heparan sulfato y ácido hialurónico. Después de la activación de los TLRs una cascada de eventos intracelulares ocurre resultando en liberación de NF- κ B que permite la translocación del citoplasma al núcleo donde este media el incremento de la expresión de citocinas inflamatorias. A nivel renal, TLR2 y TLR4 se expresan constitutivamente en los túbulos proximales y distales, el asa de Henle y los túbulos colectores.

FTY720 o fingolimod, es un componente inmuno-modulador de los receptores esfingosina 1 fosfato (S1P) que puede proteger al riñón trasplantado, durante la isquemia-reperfusión, aunque no es claro su mecanismo. No obstante, tiene efectos confirmados de atenuar el daño renal y disminuir las células que infiltran el riñón (Pedregosa et al., 2011).

En este modelo experimental, los investigadores tuvieron como **objetivo** evaluar si el efecto protector de la administración de FTY720 en ratones sometidos a pinzamiento del pedículo renal para generar isquemia-reperfusión se asocia con la modulación y expresión de TLR2 y TLR4.

METODOLOGÍA:

Para responder la pregunta de investigación, se emplearon ratones C57BL/6, a quienes, a través de una laparotomía, les realizaron pinzamiento del pedículo renal por 30 minutos (isquemia), confirmando nuevamente el retorno del flujo sanguíneo al retirar la pinza (reperfusión).



Figura 27. Metodología del modelo experimental 2. Izquierda: Ratón C57BL/6. Cepa de ratón de laboratorio creada por Clarence Cook Little en 1921 y tal vez el más estudiado y popular para propósitos de investigación genética. Derecha: Pinzamiento de los vasos renales para generar isquemia/Despinzamiento de los vasos renales para generar reperfusion.

En sangre periférica se midió creatinina, urea, óxido nítrico y porcentaje de linfocitos. El bazo fue removido para evaluación citométrica de TLR2 y TLR4. Los riñones también fueron removidos para evaluación histológica, citometría de flujo e inmunohistoquímica.

Se asignaron tres grupos de estudio:

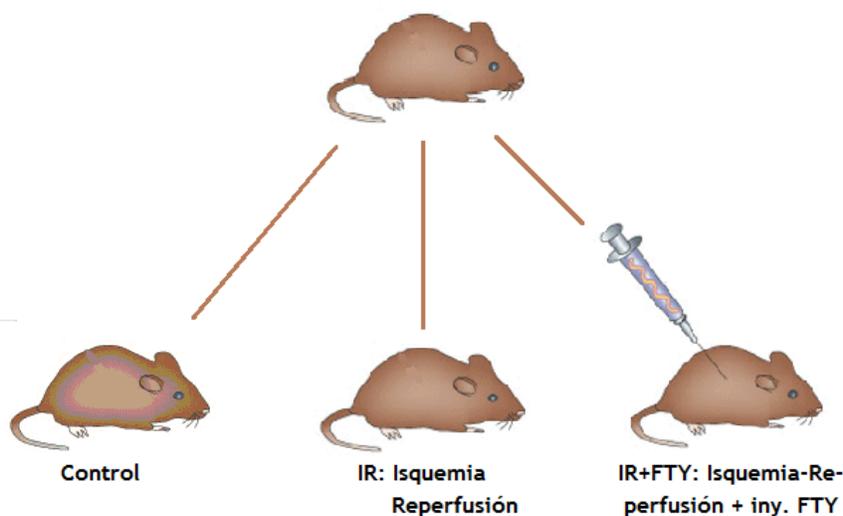


Figura 28. Asignación de los grupos de estudio de ratones C57BL6. **Grupo control:** Sin isquemia-reperfusion ni FTY720. **Grupo IR+FTY:** Ratones sometidos a laparotomía + pinzamiento/despinzamiento del pedículo vascular renal para generar isquemia/reperfusion con inyección intravenosa de FTY720 1 mg/Kg antes del pinzamiento del pedículo vascular renal. **Grupo IR:** Ratones sin aplicación de FTY720 pero con idéntica cirugía para generar isquemia/reperfusion.

RESULTADOS:

Las mediciones de creatinina sérica, urea y nitrito se incrementaron significativamente en el grupo isquemia-reperfusión (IR) en comparación con el grupo control. El tratamiento con FTY720 causó una disminución significativa en la creatinina y la urea aunque mayor el nivel que los del grupo control. El nitrito sérico fue más bajo de manera significativa en el grupo IR+FTY al compararlo con el grupo control (Figura 29).

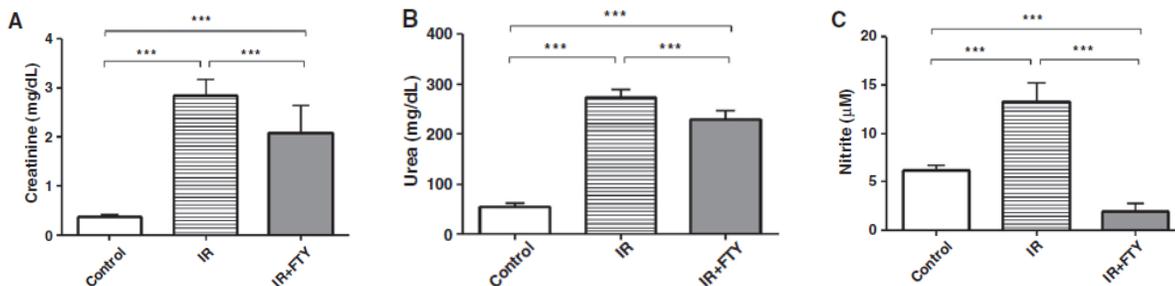


Figura 29. Niveles de creatinina sérica (A), urea sérica (B) y nitrito sérico (C) en grupos Control, isquemia-reperfusión sin tratamiento (IR) y ratones con isquemia-reperfusión tratados con FTY720 (IR+FTY720). ***: $p < 0,0001$.

En la histopatología, los cortes en la microscopía de luz mostraron necrosis tubular aguda, tanto en el grupo de IR como en el grupo de IR+FTY (Figura 30).

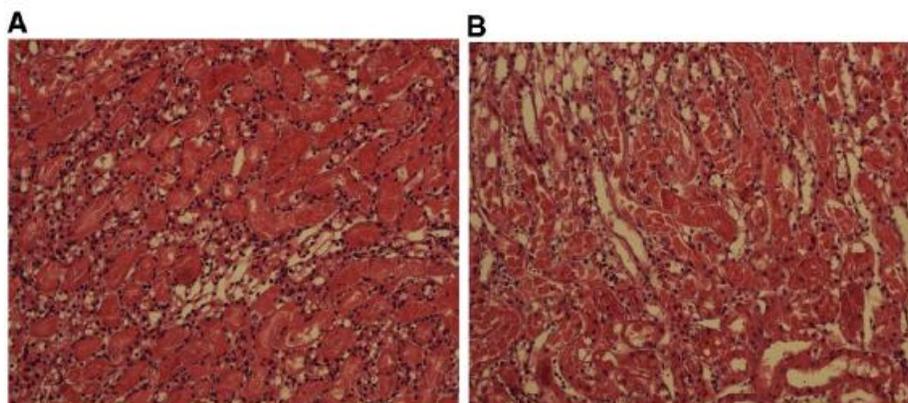


Figura 30. Histología renal luego de 24 horas de isquemia/reperfusión en los ratones no tratados (IR 200x; A) y en los ratones con isquemia-reperfusión y tratados con FTY720 (IR+FTY 200x; B).

La IR causó significativa linfopenia en ratones tratados y no tratados con FTY720 con una gran disminución en el número de linfocitos en los animales tratados, confirmando el efecto de linfopenia del fingolimod. De otro lado, no hubo diferencias significativas en el número de células del bazo cuando se compararon los 3 grupos (Figura 31).

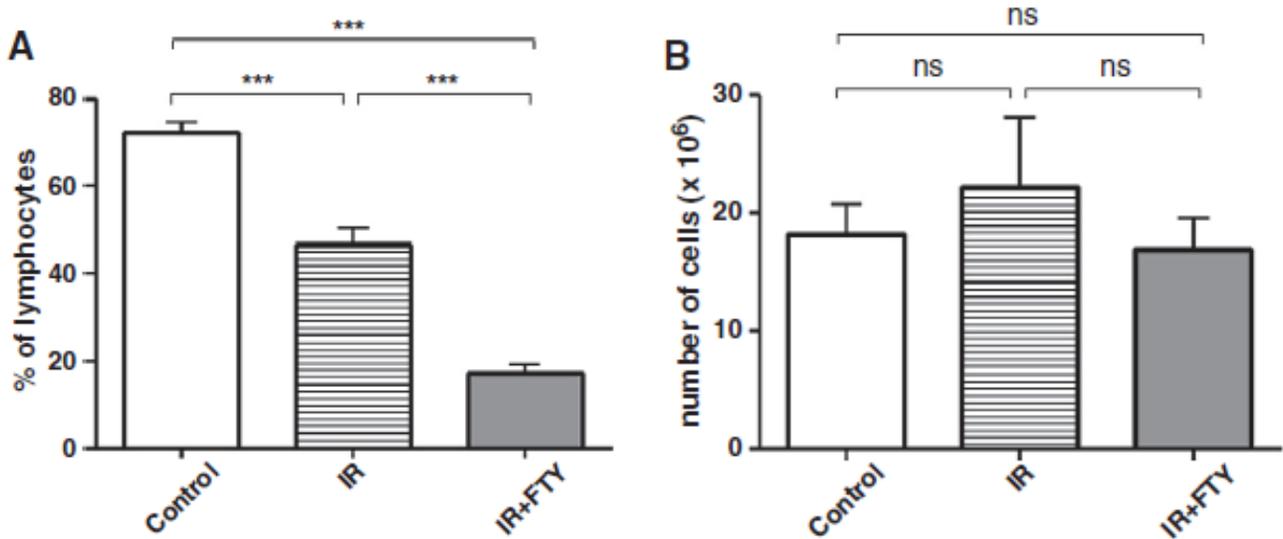


Figura 31. Porcentaje de linfocitos en sangre periférica (A) y número de células en el bazo (B) de los grupos control, con isquemia-reperfusión (IR) y con IR pero tratado con FTY720. ***:p<0,0001; ns=no significativa (p=0,256).

Luego de la isquemia-reperfusión se presentó un incremento significativo en la expresión de TLR2 en los linfocitos y en las células del bazo no linfocíticas. El tratamiento con FTY720 disminuyó la expresión de TLR2 a los niveles del grupo control. En los ratones con IR pero sin tratamiento, el porcentaje de expresión de TLR4 en las células del bazo también se incrementó (linfocitos y no linfocitos) y el tratamiento con FTY720 causó una expresión de TLR4 en los linfocitos similar a la del grupo control mientras el FTY720 en los no linfocitos llevó a disminución significativa en la expresión de TLR4 pero fue aún más alta que en el grupo control (Figura 32).

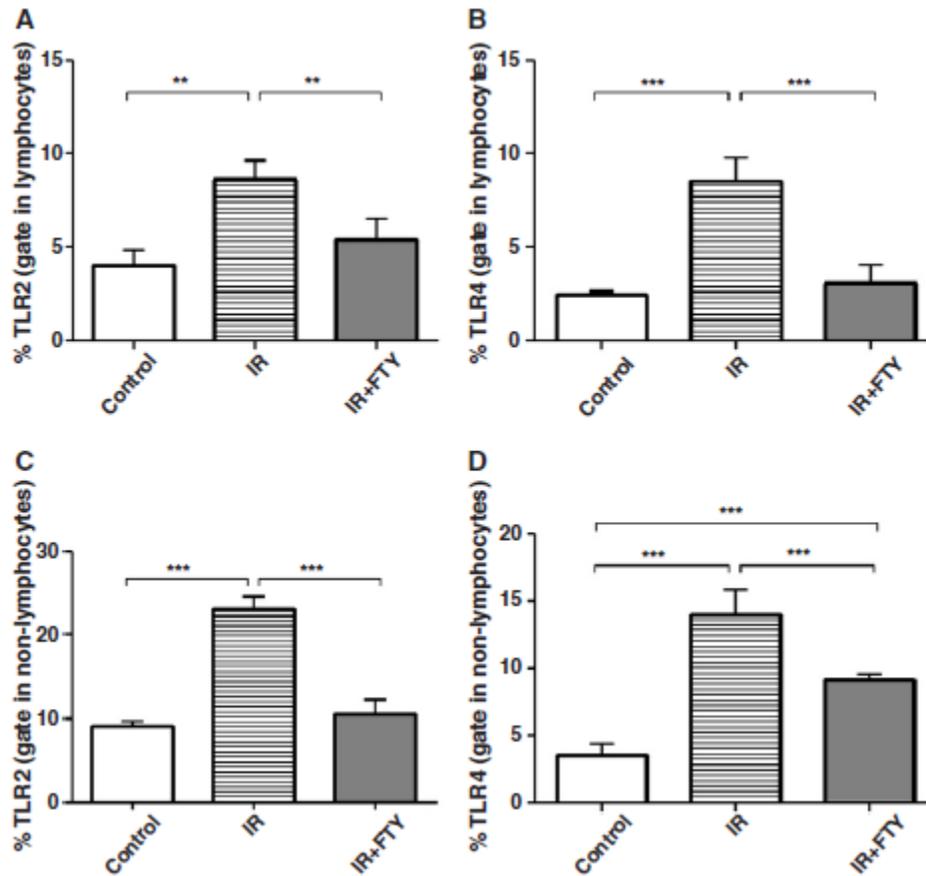


Figura 32. Porcentaje de TLR2 en linfocitos del bazo (A), TLR2 en células no linfocíticas del bazo (C), TLR4 en linfocitos del bazo (B) y TLR4 en células no linfocíticas del bazo (D) en los grupos control, grupo isquemia-reperfusión (IR) y grupo IR tratado con FTY720. **:p=0,001, ***:p<0,0001.

Las células infiltrando el riñón fueron similares en número cuando se compararon los grupos. Sin embargo, cuando el porcentaje de TLR2 se evaluó hubo un incremento significativo en los ratones con IR pero no tratados. El tratamiento con FTY720 causó una disminución significativa en la expresión de TLR2 en estas células. La expresión de TLR4 se incrementó significativamente luego de IR en los ratones no tratados en comparación con los controles y el tratamiento con FTY720 solo disminuyó de manera parcial el porcentaje de este marcador (Figura 33).

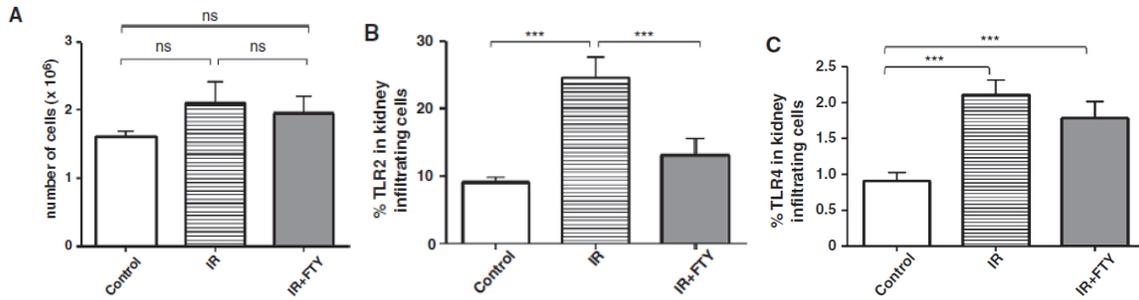


Figura 33. Número de células infiltrando el riñón (A), porcentaje de células infiltrantes con TLR2+ (B) y porcentaje de células infiltrantes con TLR4+ (C) en grupos control, grupo isquemia-reperfusion no tratado (IR) y grupo de ratones tratados (IR + FTY). Ns= No significativo ($p=0,069$); *** $p<0,0001$.

La evaluación de la expresión de TLR2 y TLR4 en las células residentes de riñón mostraron fuerte positividad para ambos marcadores en ratones con IR no tratados (Figura 34).

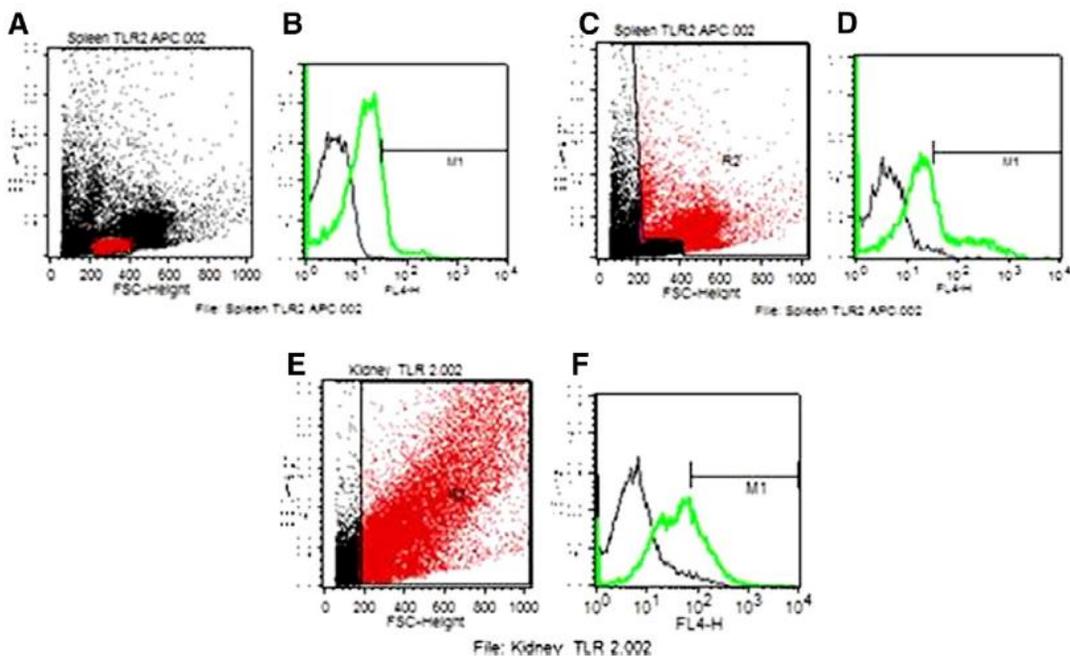


Figura 34. Células del bazo (linfocitos A, rojo) y expresión de TLR2 en los grupos control y el grupo IR no tratado (B, líneas gris y verdes respectivamente). Gráfico de puntos de las células del bazo (no linfocíticas, C, rojo) y expresión de TLR2 en los grupos control y el grupo IR no tratado (C, líneas gris y verde respectivamente). Gráfico de puntos de las células infiltrantes de riñón (E, FSC x SSC - R2) y expresión de TLR2 en los grupos control y grupo IR no tratado (F, líneas gris y verde respectivamente).

El tratamiento con FTY720 no previno la expresión de TLR2 y TLR4 en células residentes de riñones sometidos a IR (Figura 35).

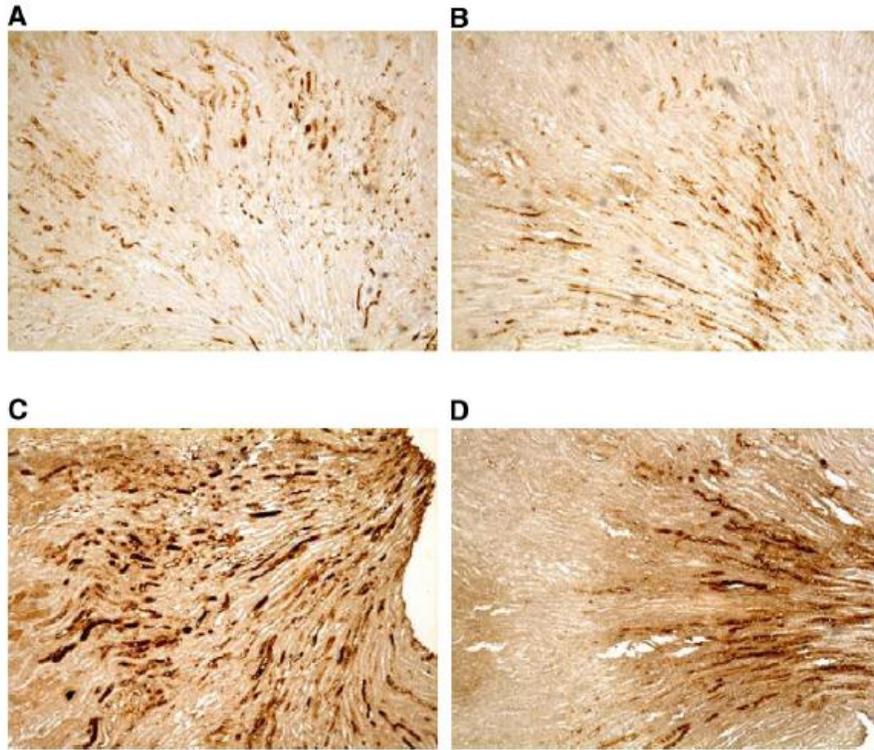


Figura 35. Secciones de riñones sometidos a IR y evaluados para TLR2 y TLR4 usando inmunohistoquímica. La expresión de TLR2 en ratones con isquemia-reperfusión no tratados (A, 40x), y en ratones tratados (B, 40x). La expresión de TLR4 en ratones con IR no tratados (C, 40x) y en ratones tratados con FTY720 (D, 40x).

El riñón expresó significativamente más altos niveles de IL-6 en los ratones no tratados en comparación con el grupo control. El tratamiento con FTY720 disminuyó la expresión de IL-6 a los niveles del grupo control (Figura 36).

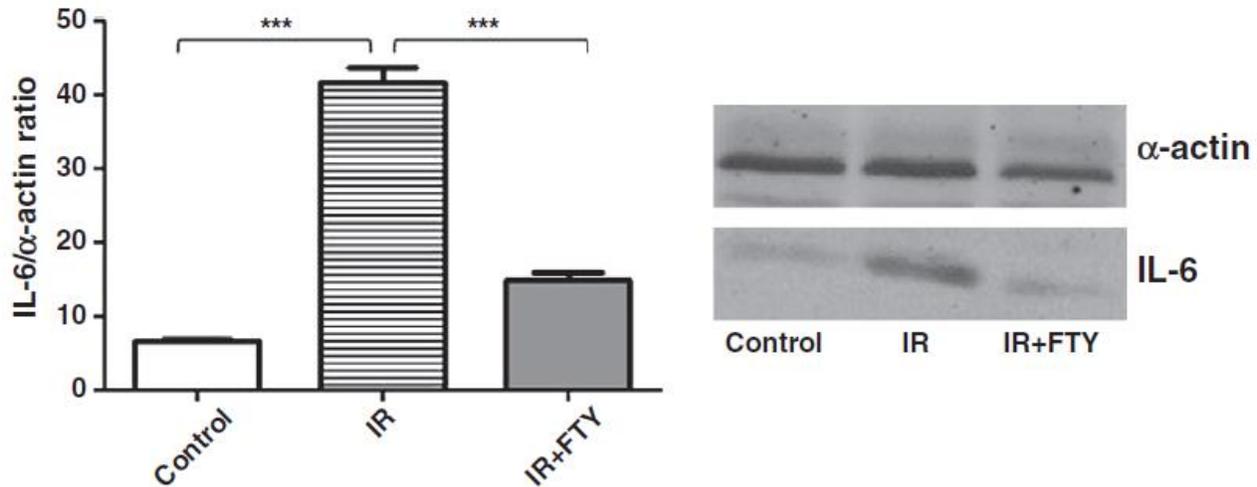


Figura 36. Ensayo Western blot de la tasa de IL-6/actina en tejido renal de ratones C57BL/6 sometidos a IR o IR+FTY o grupo control sin IR y sin FTY. Tomado 24 horas después del proceso. $P=0,0002$.

DISCUSIÓN:

La isquemia-reperfusión es un fenómeno que cursa con inflamación independiente de antígeno y causa daño tisular por lo que la manipulación del fenómeno con miras a disminuir la reacción y el proceso lesivo, es altamente relevante.

Este estudio confirma el daño generado por el proceso isquemia-reperfusión y también la mejoría en los parámetros de laboratorio cuando se trataron los ratones con FTY720 como una expresión de la atenuación del daño.

La disminución en los niveles circulantes de óxido nítrico (NO) como expresión de esa atenuación se correlaciona con estudios previos que han demostrado que los pacientes con injuria renal sostenida tienen altos niveles circulantes de NO cuando se comparan a pacientes en iguales condiciones pero que recuperaron la función y cuando se comparan con individuos saludables. Esto permite la hipótesis de que la protección dada por el FTY720 puede ocurrir por vía de la modulación del NO circulante.

La necrosis tubular aguda se presentó en ambos grupos con isquemia-reperfusión, tratados y no tratados, lo cual nos plantea que este análogo de la esfingomiocina no impide el daño por

isquemia, pero si atenua la reperfusión y las consecuencias funcionales del proceso ya que la función renal si mejoró con el uso de FTY720.

Es claro que todo este proceso inflamatorio de la IR, incluye la activación de receptores inmunológicos de membrana como los TLRs y subsecuente regulación de citocinas pro-inflamatorias y quimiocinas. Esta investigación confirma el incremento en la expresión de RNA mensajero de TLR2 y TLR4 especialmente a nivel de las células tubulares renales.

Los efectos del FTY720 no se limitan al riñón; Martin et al. (2010), lo emplearon en un modelo de isquemia hepática y no solo previno la acumulación de células T CD4+ en los sinusoides hepáticos, sino que también disminuyó la expresión de genes de TLR4 y IL-6 en el tejido hepático.

En este modelo de isquemia renal, los autores encontraron que FTY720 causó una reducción de TLR2 a niveles iguales a los del grupo control tanto en células del bazo como en células que estaban infiltrando el riñón y en menor intensidad en los niveles de TLR4.

La protección conferida por FTY720 a los riñones sometidos a isquemia-reperfusión se sucede por mecanismos dependientes e independientes de las células T. **El mecanismo dependiente** ocurre por linfopenia inducida por FTY720 vía de la directa activación del receptor de esfingocina 1 fosfato sobre los linfocitos. **El mecanismo independiente** de las células T está asociado con activación directa de S1P1R expresado sobre las células epiteliales tubulares renales.

La IL-6 ha sido considerada un marcador de severidad de la respuesta inflamatoria luego de isquemia-reperfusión. La expresión de la proteína IL-6 en el tejido renal estuvo significativamente incrementada luego de IR. El tratamiento con FTY720 redujo la expresión a niveles similares a los del grupo control.

CONCLUSIÓN:

El FTY720 causó una expresión reducida de TLR2 y TLR4 en las células del bazo y células infiltrantes en el riñón pero no previno la expresión en células residentes renales 24 horas luego de la injuria por isquemia-reperfusión. Los niveles circulantes de NO y la expresión renal disminuida de IL-6 en los ratones tratados con FTY720 sugieren que la droga actúa en varios pasos del proceso inflamatorio y así protege el riñón, al menos en parte, del daño causado por la IR. Sin embargo, se requieren más estudios para saber si podemos terapéuticamente emplear a TLR2 y TLR4 como blancos protectores de la función renal.

V. 3. MODELO EXPERIMENTAL 3:

LA INHIBICIÓN DE TLR2 PROMUEVE LA FUNCIÓN DEL INJERTO EN UN MODELO DE INJURIA REPERFUSION DE TRASPLANTE RENAL:

Farrar et al. (2012), desarrollaron una investigación experimental empleando un anticuerpo monoclonal contra el TLR2. Los TLRs juegan un papel central en la inducción de la respuesta inmune innata y el desarrollo de respuestas inmunes específicas de antígeno. Son expresados en una variedad de células tales como neutrófilos, macrófagos, células dendríticas y células B. También los expresan células no inmunes como los fibroblastos, miocitos, células epiteliales. Son capaces de reconocer ligandos endógenos del huésped expresados luego de injuria celular resultando en la inducción de respuesta pro-inflamatoria.

El receptor TLR2 es una proteína transmembrana que forman heterodímeros con TLR1 o TLR6 para formar un heterodímero de señalización. La activación de TLR2 lleva a la cascada de señalización involucrando las proteínas adaptadoras MAL y MyD88 y culmina en la translocación al núcleo del factor de transcripción NF- κ B, que a su vez, lleva a la inducción de citocinas pro-inflamatorias.

TLR2 es constitutivamente expresado en las células epiteliales tubulares renales y tanto TLR2 como TLR4 son up-regulados en casos de isquemia renal a nivel del RNA mensajero y a nivel protéico.

Está claramente establecido que tanto TLR2 como TLR4 expresados en las células parenquimatosas no vasculares juegan un importante papel en modelos renales de isquemia-reperfusión.

En la investigación de Farrar y colaboradores, que desarrollaré a continuación, se tuvo como **objetivo principal**, evaluar la contribución de TLR2 de donante y de receptor empleando un modelo relevante clínicamente de injuria isquémica asociada a trasplante renal y un novedoso anticuerpo anti TLR2.

METODOLOGÍA:

Se emplearon:

Ratones: Wild-type (WT) C57-Bl/6. Grupos de 4 ratones.

Células productoras de anticuerpo: NSO cells: Línea celular derivada del mieloma murino no secretante, conocidas por su capacidad de producir naturalmente anticuerpos. Se emplearon estas células expresando OPN 301 (Opsona Therapeutics)

OPN 301: Anticuerpo monoclonal que fue inyectado y medido en el suero de los ratones por medio de ELISA. Los controles fueron suero de los ratones antes de la inyección.

Pam3CSK4: Fue empleado para estimular los TLRs. Esta sustancia es un lipopéptido triacilado sintético que semeja el terminal amino acilado que tienen los lipopolisacáridos bacterianos. Es un potente activador de NF- κ B mediada a través de los TLR2 y TLR1 que reconocen los lipopolisacáridos bacterianos.

Los ratones fueron sometidos a cirugía, tanto los ratones donantes como los ratones receptores, pero una hora antes se les inyectó un solo bolo de 10 g/kg de anticuerpo antiTLR2. Se les realizó un trasplante renal ortotópico. En el día 5, a los receptores se les practicó nefrectomía del riñón nativo residual, de manera que la función renal dependiera exclusivamente del riñón trasplantado y en el día 6 fueron sacrificados.

RESULTADOS:

1. OPN 301 INHIBE LA PRODUCCIÓN DE CITOCINAS INDUCIDAS POR Pam3Csk4 EX VIVO

Sangre total de ratones saludables fue estimulada ex vivo con un lipopéptido sintético ligando específico del TLR2 en presencia y en ausencia de OPN 301 y se midió la concentración de IL-6 aproximadamente 12 horas después.

2. OPN 301 ESPECÍFICAMENTE ATENUÓ A LAS CITOCINAS INDUCIDAS POR TLR2 IN VIVO:

El tratamiento con el ligando Pam3Csk4 indujo altas concentraciones de citocinas pro-inflamatorias. También se empleó alternativamente lipopolisacáridos de E Coli y también indujo las citocinas; sin embargo, el pretratamiento con OPN 301 inhibió el ligando Pam3Csk4, pero no el LPS de E Coli. De esta manera confirmaron los autores que una dosis rango de OPN 301 en el modelo del Pam3Csk4, completamente abatió la respuesta pro-inflamatoria y dada la probabilidad de que en el trasplante renal haya un mayor número de TLR2 y DAMPs, se empleó una dosis mayor para el estudio (Figura 37).

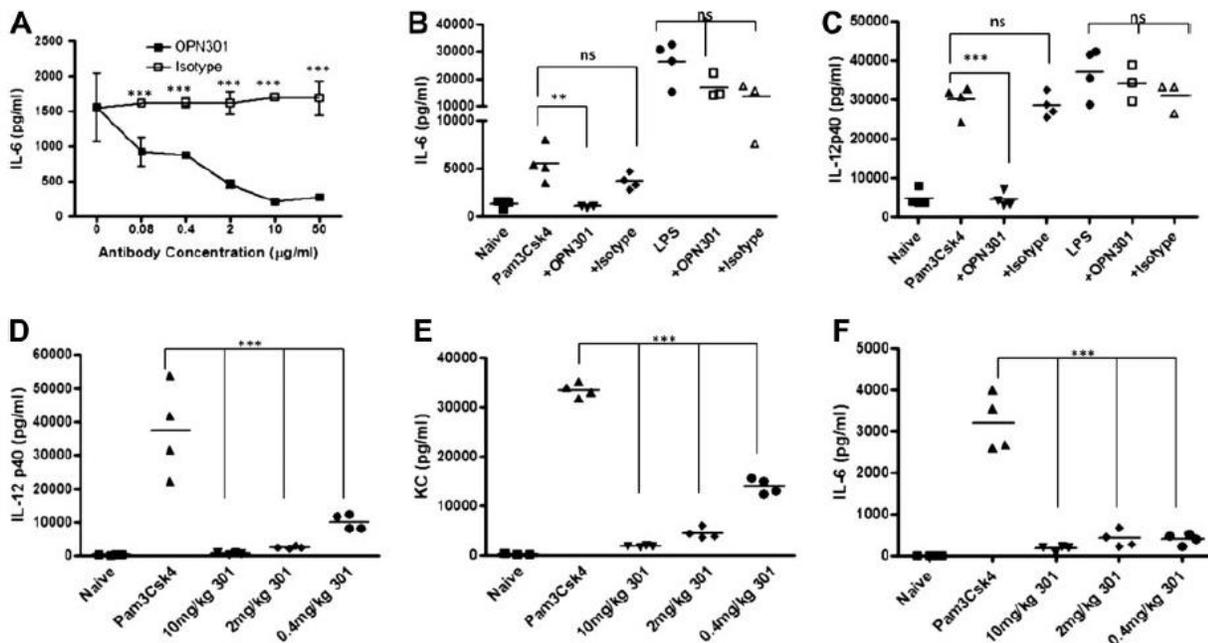


Figura 37. (A) Sangre fue tratada ex vivo con 1 µg/ml Pam3Csk4 y una dosis rango de OPN 301 vs. un isotipo murino de Ig G. OPN 301 inhibió la IL-6. ***:p>0,001. (B y C) Ratones fueron inyectados iv con OPN 301. Después de 30 minutos fueron desafiados con 100 µg de Pam3Csk4 o 50 µg de LPS. Después de 4 horas los ratones fueron sacrificados para análisis e citocinas. OPN 301 es específica para TLR2; obsérvese que no inhibe IL-6 inducida por lipopolisacáridos (LPS) (B) o IL-12p40 (C). (D a F): Pam3Csk4 indujo altas concentraciones de IL-12p40 (D), KC, IL-6 (E) y (F) que fueron suprimidos cuando los ratones fueron tratados con OPN 301. ns=no significativa, **:p>0,01, ***:p>0,001; ANOVA.

3. INHIBICIÓN DE TLRs DE DONANTE Y RECEPTOR REDUCE LA FALLA RENAL POS-ISQUÉMICA

Luego de pretratar donantes y receptores con OPN 301, los órganos de los donantes fueron expuestos a 30 minutos de isquemia en frío y luego trasplantados en receptores singénicos. Luego de cinco días, el riñón nativo fue removido y la función se midió el día 6 reflejando la función del riñón trasplantado.

Los receptores no tratados mostraron evidencia de función renal deteriorada que no se recuperó por el 6 día postrasplante. El tratamiento de donante y receptor con OPN 301, significativamente mejoró la función renal cuando se comparó con ambos, el control (media: 19.8±5.9 vs. 33.9±10.1 mM; P<0.01) y el grupo de tratamiento de anticuerpo

(media: 19.8 ± 5.9 vs. 35.0 ± 9.5 mM; $P < 0.01$). El tratamiento con OPN 301 equipara al menos el tratamiento con anticuerpo anti-p-selectina, también dado a ambos, donantes y receptores. El tratamiento con anti-P-selectina fue considerado un adecuado control positivo en previos estudios en que demostró un efecto protector luego de su administración (Figura 38).

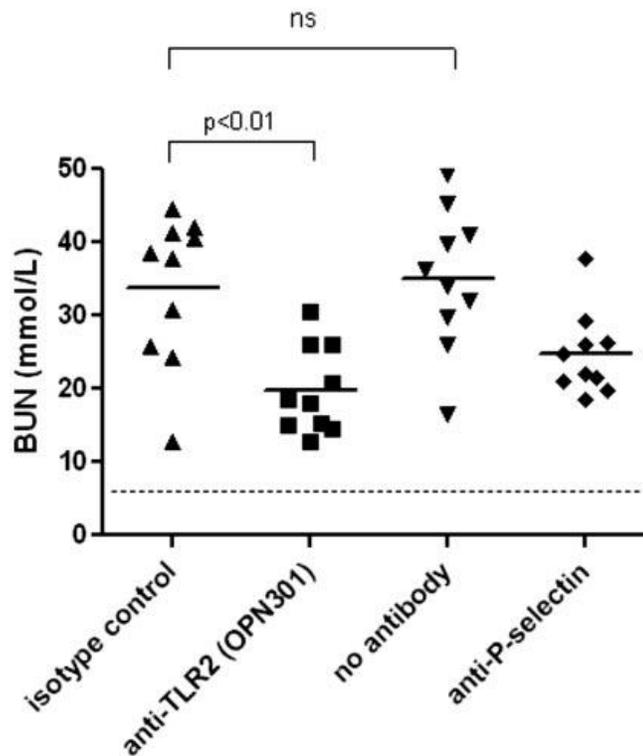


Figura 38. La inhibición de los TLR2 de donantes y receptores redujo la falla renal pos-isquémica. Los ratones trasplantados con isoinjerto fueron nefrectomizados de sus dos riñones. Uno en el momento del trasplante y el otro nativo en el día 5. Las mediciones de NU sérico fueron determinadas en muestras sanguíneas 24 horas después de la nefrectomía. Los resultados mostrados son para 4 grupos experimentales diferentes con 10 integrantes por grupo y con los valores p mostrados. La línea punteada representa la medición de NU en animales normales.

4. LA ABLACIÓN DE LOS TLRs DE DONANTES Y RECEPTORES, PRESERVA LA ESTRUCTURA RENAL TUBULAR Y DISMINUYE EL DEPÓSITO DE COMPLEMENTO RENAL:

La evaluación de la injuria estructural fue realizada con microscopía de luz y mostró estrecha correlación con las medidas funcionales. La integridad tubular estaba bien preservada, con solo escasa necrosis luego del tratamiento con OPN 301 en ambos, el donante y el receptor. Cuando se comparó con el grupo control tratado o con el grupo control no tratado (índice de

injuría: 1.9 ± 0.62 vs. 3.1 ± 0.35 ; $P < 0.05$), mostrando extenso adelgazamiento con degeneración epitelial, desprendimiento y necrosis ampliamente diseminada (Figura 39).

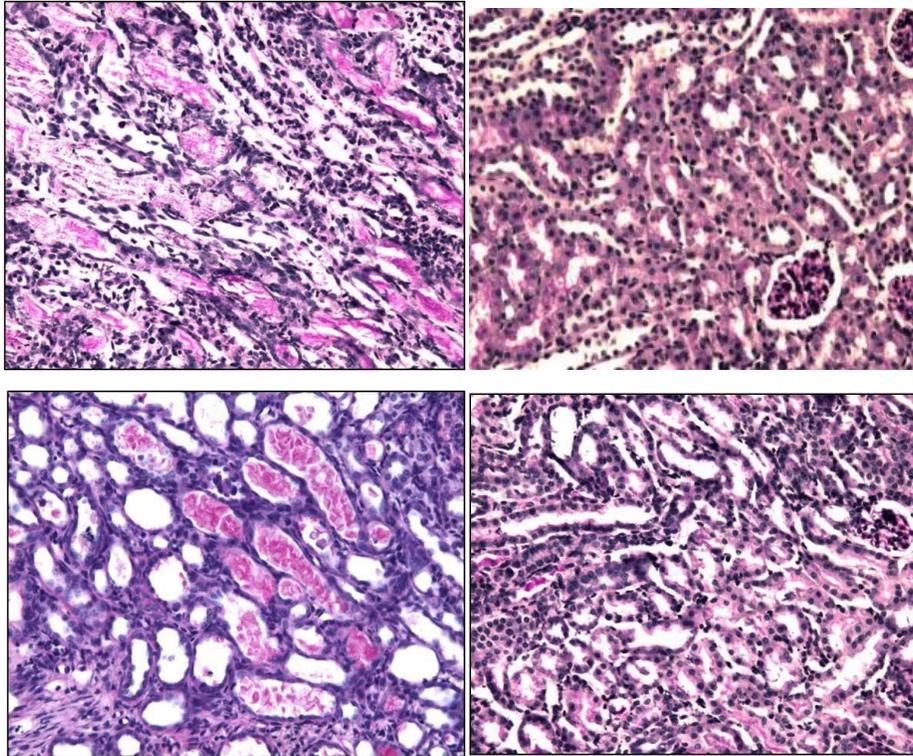


Figura 39. Ablación de TLR2 en donante y receptor preserva la estructura tubular. Los resultados son coloración PAS (Periodic acid-Schiff) para el día 6 del trasplante. Las flechas rojas indican adelgazamiento, desprendimiento o denudación y necrosis de los túbulos renales en la unión cortico-medular. Las flechas negras muestran los túbulos renales normales y permeables en la unión cortico-medular. Las imágenes son representativas de 10 ratones examinados en cada grupo (view: x 200)

La ablación de TLR2 redujo el depósito de C3d en la unión cortico-medular sensible a la hipoxia. El C3d positivo puede ser observado en la superficie basolateral de los túbulos proximales. El patrón de depósito de C3d observado en el grupo tratado con OPN 301 fue marcadamente reducido en comparación con el grupo control tratado. Esta observación demuestra una clara relación entre la reducción de la inflamación renal inducida por OPN 301 y el depósito del complemento dentro del intersticio renal (Figura 40).

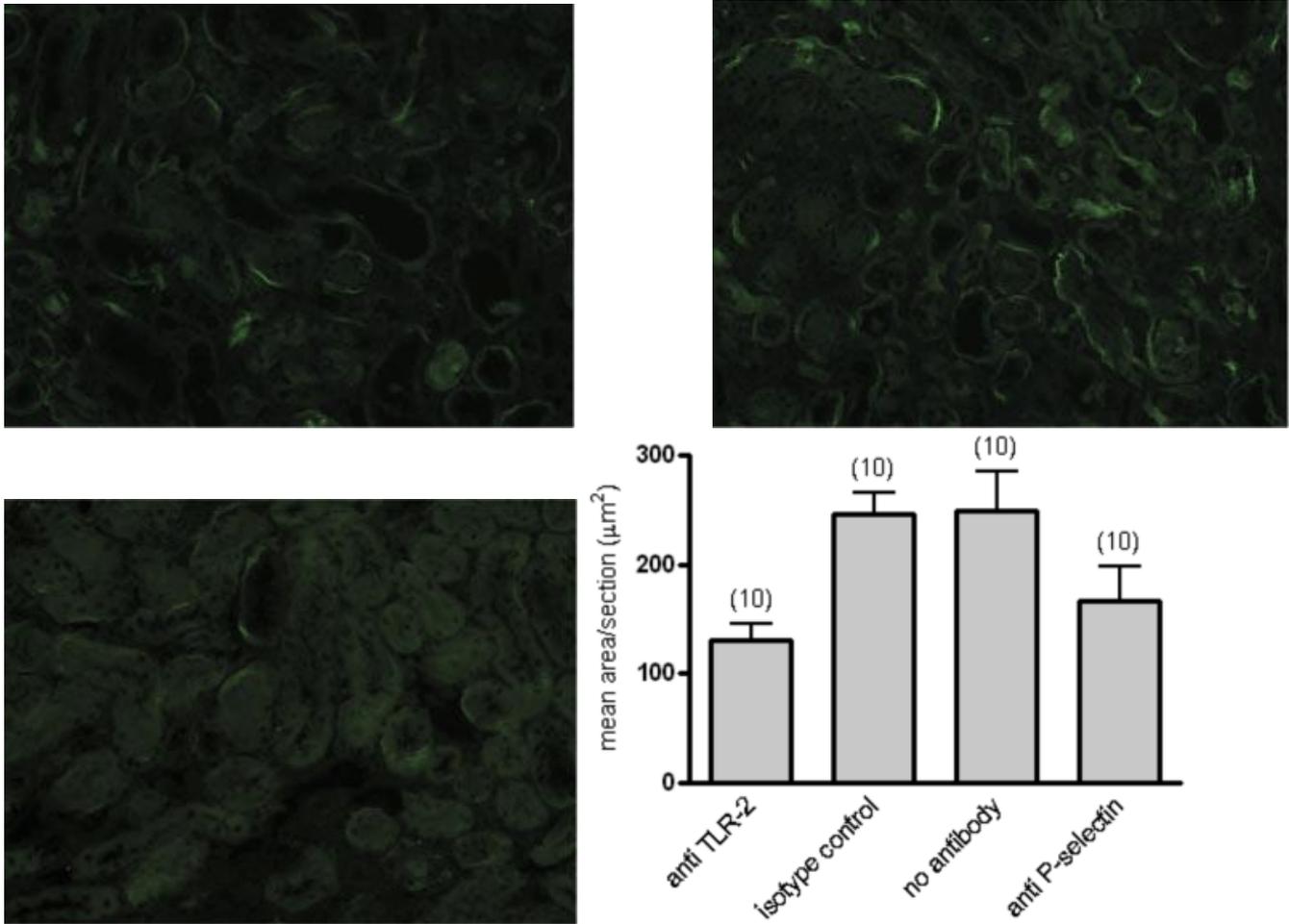


Figura 40. Inmunofluorescencia para complemento. Arriba izquierda: Anti TLR2, Arriba derecha: Isotipo control, Abajo izquierda: Normal. Efecto del bloqueo de TLR2 sobre el depósito de complemento. Las fotografías ilustran depósito de complemento en los tratados con OPN 301, el isotipo control tratado y los animales normales. La flecha muestra la coloración positiva, la cual es abundante en los animales isotipo de control tratados. El gráfico de barras muestra depósito de complemento determinado dentro de 20 campos de alto poder por animal (vista: x 200) en cada uno de los grupos experimentales. Los números en paréntesis representan los animales estudiados en cada punto.

5. TRATAMIENTO ANTI-TLR2 EN EL RECEPTOR SOLO REDUCE LA FALLA RENAL POS-ISQUÉMICA:

Desde que los TLR2 pueden ser expresados por células del donante y del receptor, los investigadores quisieron evaluar la suficiencia del tratamiento si se suministra únicamente a los receptores. Así, realizaron trasplantes en un nuevo grupo al que trataron con solución

salina como grupo control de los receptores ya descritos. Después de tratar un grupo de ratones con OPN 301, los receptores fueron trasplantados con donantes de riñón sinérgicos expuestos los órganos por 30 minutos a la isquemia en frío.

El pretratamiento del receptor solo, mejoró significativamente la función renal comparado con el grupo solución salina (control). Mientras el efecto combinado de donante y receptor pre-tratados llevó a una mejoría en el NU de 39% (Figura 41), el bloqueo de los TLR2 en los receptores llevó a una mejoría de un 33% al compararlos con sus respectivos controles. Así, el tratamiento del receptor solo, fue comparable en eficacia a tratar el donante y el receptor.

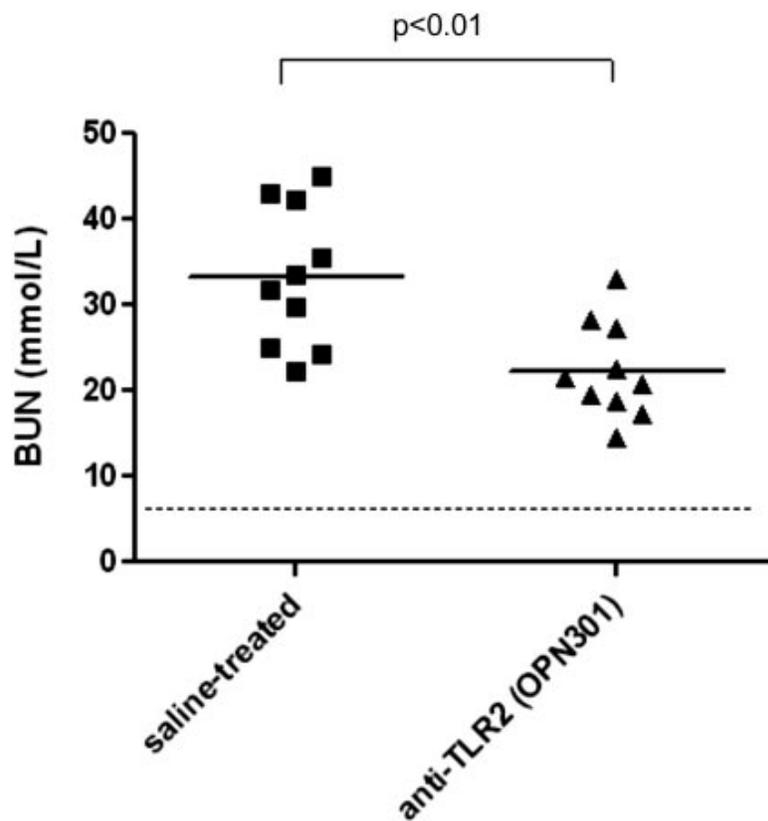


Figura 41. Inhibición exclusiva de los TLR2 de los receptores redujo suficientemente la falla renal pos-isquémica. Los riñones trasplantados con isoinjertos tuvieron su riñón escindido al 5 día pos-trasplante. Las mediciones de creatinina sérica fueron determinadas en muestras sanguíneas 24 horas después. Los resultados mostrados son para OPN 301 y para el grupo experimental tratado con salina (n=10 por grupo), con el valor p relevante expresado. La línea punteada representa la medición de NU en animales normales.

Los resultados histopatológicos incluyendo el índice de injuria tubular reflejaron la medición del NU. Se confirmó un efecto protector significativo del OPN 301 en el receptor cuyo donante no fue tratado, en términos de reducción de injuria tubular, denudación epitelial y expansión de la necrosis comparado con el grupo de receptores tratado con solución salina (índice injuria: 1.7 ± 0.41 vs. 2.9 ± 0.21 ; $P < 0.05$) (Figura 42).

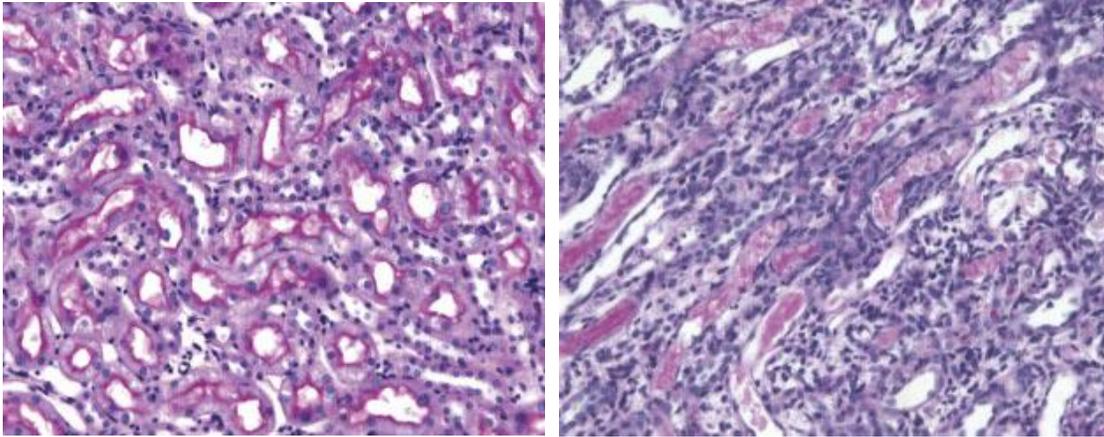


Figura 42. Histología renal día 6 pos-trasplante. Izquierda: Anti TLR2; Derecha: Control con salina. Ablación de los TLR2 en los receptores preserva la estructura tubular. Los resultados mostrados son coloración PAS en el día 6 pos-trasplante. Las imágenes son representativas de 10 ratones examinados en cada grupo. Magnificación x 200.

DISCUSIÓN:

El principal aporte de esta investigación es la demostración de una posibilidad terapéutica efectiva para atenuar la injuria por isquemia-reperfusión. Adicionalmente, la confirmación de su efecto en un modelo murino de trasplante renal que no es igual al modelo isquemia-reperfusión sin trasplante o en órganos nativos.

El bloqueo de los TLRs con el anticuerpo monoclonal OPN 301, no solo limitó la inflamación tisular pos-isquémica y la destrucción tubular dentro del riñón trasplantado, sino que además bloquea la liberación de citocinas pro-inflamatorias. Esto sugiere que el bloqueo de TLR2 tiene múltiples efectos downstream de la cascada inflamatoria.

De otro lado, estos resultados mostraron un enlace entre el sistema TLR y el sistema del complemento en el contexto del trasplante renal. Los dos sistemas pueden ser activados por ligandos comunes.

VI. CONCLUSIONES:

Los órganos sólidos para trasplante, invariablemente, sufren injuria durante el proceso mecánico del procuramiento y por la isquemia-reperfusión.

El entendimiento de los eventos y mecanismos a nivel celular y molecular son fundamentales para el desarrollo de estrategias terapéuticas que puedan disminuir el impacto de la injuria por isquemia-reperfusión.

La respuesta a la hipoxia incluye la integración de mecanismos a nivel genómico, celular, molecular e inmunológico.

Un claro protagonista de la respuesta son los DAMPs como lo hemos establecido previamente, liberados de las células necróticas y de los tejidos lesionados. Numerosos estudios han demostrado ya, que los DAMPs juegan un papel dominante en la patogénesis de la injuria por isquemia-reperfusión y que, son considerados hoy en día, un bio-marcador de injuria luego de la isquemia-reperfusión.

Las señales de peligro liberadas por las células que mueren (DAMPs) alertan a los TLRs que codifican genes regulando mediadores y células inflamatorias.

En el medio ambiente inflamatorio, las células dendríticas interceptan el antígeno, migran a los ganglios linfáticos y presentan el antígeno a las células inmunocompetentes activando la inmunidad adaptativa y favoreciendo el rechazo.

La amplia variedad de injuria citotóxicas que se suceden, involucran a la necroptosis. La habilidad de bloquear esta necroptosis es tal vez, el foco de mayor atención en este campo actualmente. El problema persiste por la complejidad de los eventos y porque aun no se ha identificado el receptor de la vía de la necroptosis ya que TNFR1, considerado como el inductor primario de necroptosis, requiere confirmación *in vivo*. Esto ampliaría las posibilidades al tener una sustancia similar a Nec1 que, simplemente, se adicionara a las soluciones de preservación, disminuyendo el gran impacto que la injuria por isquemia-reperfusión genera en la función y la sobrevida del injerto, así como en la fibrogénesis y el rechazo.

Los modelos experimentales como los que se citaron en este documento, presentan resultados prometedores, que sin duda cambiarán favorablemente el pronóstico y sobrevida de los trasplantes de órganos sólidos.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Aragón J**, (2016). Consultada el día 14 de marzo de 2014 en: <http://iescarin.educa.aragon.es/estatica/depart/biogeno/varios/BiologiaCurtis/Seccion%202/2%20-%20Capitulo%208.htm>)
- Arévalo, M.A.** (2016) Glicolisis. <http://bioquiwik1.wikispaces.com/Rutas+Metabolicas> consultada el día 20 de marzo de 2016.
- Baker TB, Skaro AI, Alvord P, Chaudhury P.** (2008). Chapter 6 Organ Procurement in: ACS Surgery: Principles and Practices. Souba WW, Fink MP, Jurkovich GJ, Kaiser L, Pearce W, Pemberton JH, Soper NJ. American College of Surgeons, 6th Edition.
- Carrión M** (2016). Consultado el día 20 de marzo de 2016 en: <http://agustinasnaturales.webnode.es/biologia%20%C2%BA%20bto/imagenes-como-articulos/>
- Chatauret N, Badet L, Barrou B, Hauet T** (2014). Ischemia-reperfusion: From cell biology to acute kidney injury. *Prog Urol*, 2014, 24, S4-S12, Suppl. 1.
- Cursio R, Colosetti P, Gugenheim J** (2015). Autophagy and liver ischemia-reperfusion injury. *BioMed Research International*, Vol. 2015 (2015). Article ID 417590, 16 pages, 2015. En: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2015/417590/>, consultada el día 20 de marzo de 2016.
- Degterev A, Huang Z, Boyce M, Li Y, Jagtap P, Mizushima N, Cuny GD, Mitchison TJ, Moskowitz MA, Yuan J** (2005). Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat Chem Biol* 2005; 1: 112-119.
- Degterev A, Hitomi J, Germscheid M, Ch'en IL, Korkina O, Teng X, Abbott D, Cuny GD, Yuan C, Wagner G, Hedrick SM, Gerber SA, Lugovskoy A, Yuan J** (2008). Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins. *Nat Chem Biol* 2008; 4: 313-321.
- Duprez L, Wirawan E, Vandern Berghe T, Vandenabeele P** (2009). "Major cell death pathways at a glance". *Microbes and Infection* 2009, 11 (13): 1050-1062.
- Escalante, JL & Rio, F.** (2009). Preservación de órganos. *Med. Intensiva* [online]. 2009, vol.33, n.6, pp. 282-292. ISSN 0210-5691.
- Farrar CA, Keogh B, McCormack W, O'Shaughnessy A, Parker A, Reilly M, Sacks SH** (2012). Inhibition of TLR2 promotes graft function in a murine model of renal transplant ischemia-reperfusion injury. *The FASEB Journal*, Vol. 26 February 2012; 799-807.
- Fink SL, Cookson BT** (2006). "Caspase-1-dependent pore formation during pyroptosis leads to osmotic lysis of infected host macrophages". *Cellular Microbiology* 8 (11): 1812-1825.
- Hauet T, Goujo JM, Vandewalle A** (2001). To what extent can limiting cold ischaemia/reperfusion injury prevent delayed graft function? *Nephrol Dial Transplant* (2001) 16: 1982-1985.
- Hitomi J, Christofferson DE, Ng A, Yao J, Degterev A, Xavier RJ, Yuan J.** Identification of a molecular signaling network that regulates a cellular necrotic cell death pathway. *Cell* 2008; 135: 1311-1323.

- Hu Q, Wood CR, Cimen S, Venkatachalam AB, Alwayn IPJ (2015).** Mitochondrial Damage-Associated Molecular Patterns (MTDs) Are Released during Hepatic Ischemia Reperfusion and Induce Inflammatory Responses. *PLoS ONE* 10(10): e0140105, Octubre 9, 2015.
- Jaeschke H (2003).** Molecular mechanisms of hepatic ischemia reperfusion injury and preconditioning. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 284: G15-G26, 2003
- Koyama I, Bulkley GB, Williams GM, Im MJ.** The role of oxygen free radicals in mediating the reperfusion injury of cold-preserved ischemic kidneys. *Transplantation*. 1985;40:590-5.
- Linkermann A, Hackl MJ, Kunzendorf U, Walczak H, Krautwald S, Jevnikar AM (2013).** Necroptosis in Immunity and Ischemia-Reperfusion. *Am J Transplant* 2013; 13: 2797-2804.
- Pedregosa JF, Haidar AA, Hirata AE, Franco M, Gomes GN, Bueno V (2011).** TLR2 and TLR4 expression after kidney ischemia and reperfusion injury in mice treated with FTY720. *International Immunopharmacology* 11 (2011) 1311-1318.
- Ponticelli C (2013).** Ischaemia-reperfusion injury: a major protagonist in kidney transplantation. *Nephrol Dial Transplant* (2013) 0:1-8.
- Salvadori M, Rosso G, Bertoni E (2015).** Update on ischemia-reperfusion injury in kidney transplantation: Pathogenesis and treatment. *World J Transplant* 2015 June 24; 5(2): 52-67.
- Schroder K & Tschopp J (2010).** The inflammasomes. *Cell* 140, 821-832, March 19, 2010
- Seung YS & Polly M (2004).** Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses. *Nature Reviews Immunology* 4, 469-478 (June 2004).
- Starzl TE (1993).** The French Heritage in Clinical Kidney Transplantation. *Transplant Rev (Orlando)*. 1993 Apr; 7(2): 65-71.
- Suzuki S, Nakamura S, Koizumi T, Sakaguchi S, Baba S, Muro H, Fujise Y (1991).** The beneficial effect of a prostaglandin I2 analog on ischemic rat liver. *Transplantation* 1991; 52:979-983.
- Weinberg SE, Sena LA, Navdeep SC (2015).** Mitochondria in the Regulation of Innate and Adaptive Immunity. *Immunity* 42, March 17, 2015.
- West AP, Brodsky IE, Rahner C, Woo DK, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Walsh MC, Choi Y, Shadel GS and Ghosh S (2011).** TRL signaling augments macrophage bactericidal activity through mitochondrial ROS. *Nature* 472, 476-480.

LISTA DE FIGURAS

Página

Fig. 1. Cirugía de procuramiento de órganos abdominales	6
Fig. 2. Canulación Aorta y Vena Mesentérica Inferior	7
Fig. 3. Colocación de hielo para preservación en frío	7
Fig. 4. Embalaje de los órganos para transporte	8
Fig. 5. Cirugía de banco del órgano	9
Fig. 6. Glicólisis	15
Fig. 7. Metabolismo Aerobio y Anaerobio	15
Fig. 8- Degradación de piruvato a lactate en ausencia de O ₂	16
Fig. 9. Cadena de Transporte de Electrones	17
Fig. 10. Producción de ROS Mitocondrial	20
Fig. 11. Disfunción vascular de la isquemia-reperfusión	28
Fig. 12. Pattern Recognition Receptors	35
Fig. 13. Activación del inflamasoma NLRP3	36
Fig. 14. Formación del Necroptosoma	39
Fig. 15. Metodología Modelo experimental 1	45
Fig. 16. Isquemia y Reperfusión en caliente <i>in vitro</i>	46
Fig. 17. Isquemia y Reperfusión en caliente <i>in vitro</i>	47
Fig. 18. Los DAMPs inducen un patron de muerte celular	48
Fig. 19. Los DAMPs causan muerte cel. <i>In vitro</i> dosis-dependiente	49
Fig. 20. Incremento en los niveles circulantes de DAMPs	50
Fig. 21. Histopatología de la injuria hepatica después de la IR	51
Fig. 22. Injuria hepatocelular evaluada por transaminasas	52
Fig. 23. La IR hepatica causa apoptosis <i>in vivo</i>	52

Fig. 24. La IR hepática causa inflamación sistémica <i>in vivo</i>	53
Fig. 25. Niveles de RNAm de TLR2, TLR4, MyD88 y NF- κ B	54
Fig. 26. Niveles de RNAm de TNF α	55
Fig. 27. Metodología del modelo experimental 2	58
Fig. 28. Ratones C57BL6. Asignación de grupos de estudio	58
Fig. 29. Niveles de creatinina sérica, urea sérica y nitrito sérico	59
Fig. 30. Histología renal	59
Fig. 31. Porcentaje de linfocitos en sangre periférica	60
Fig. 32. Porcentaje de TLR2	61
Fig. 33. Número de células infiltrando el riñón	62
Fig. 34. Células de bazo y expresión de TLR2	62
Fig. 35. Inmunohistoquímica renal para TLR2 y TLR4	63
Fig. 36. Tasa de IL-6 en tejido renal	64
Fig. 37. OPN 301 atenuó citocinas mediadas por inducción de TLR2	68
Fig. 38. Inhibición de TLR2 redujo la falla renal	69
Fig. 39. Ablación de TLR2 preserva la estructura tubular renal	70
Fig. 40. Inmunofluorescencia para complement	71
Fig. 41. Inhibición exclusiva de TLR2	72
Fig. 42. Histología renal día 6 pos-trasplante	73

LISTA DE TABLAS

Página

Tabla 1. Consecuencias de la isquemia-reperfusión	12
Tabla 2. Consecuencias clínicas	13
Tabla 3. Consecuencias Celulares	14
Tabla 4. Tipos de muerte celular	26
Tabla 5. Injuria por IR. Consecuencias Inmunológicas	31
Tabla 6. Índice de Suzuki	51
Tabla 7. TNF α en hepatocitos co-cultivados con DAMP y con IR	55