

Tesi doctoral presentada per En/Na

Gemma SUGRAÑES NAVAL

amb el títol

**"Trasplante hepático experimental en el cerdo con hígado de donante a corazón parado.
Efecto de la administración simultánea de sustancias citoprotectoras sobre la lesión por isquemia-reperfusión"**

per a l'obtenció del títol de Doctor/a en

MEDICINA I CIRURGIA

Barcelona, 13 de febrer de 2004.

Facultat de Medicina
Departament de Cirurgia i Especialitats Quirúrgiques



UNIVERSITAT DE BARCELONA



AGRADECIMIENTOS

Al Doctor García Valdecasas, por dirigir esta tesis doctoral.

Al Doctor Ricard Valero, por su enorme e interminable espíritu científico, su ayuda incondicional y por las muchas horas dedicadas a la corrección de esta tesis.

Al Doctor Marc Net, por todas las horas compartidas en el estabulario de la Facultad de Medicina, por su ayuda científica y rigor, por su amistad.

Al Doctor Pablo Barros, por su amistad, por su constancia, y por ayudarme a trasplantar hígados en cerdos. Sin su ayuda quirúrgica y su empeño, nunca hubiese sido capaz de realizar un trasplante. Él me hizo sentir capaz de trasplantar un cerdito iiiiiiiiii y que viviera hasta el 5º día !!!!!!!!.

A Lluís Capdevila, gran veterinario y amigo. Por su empuje y su practicidad, por su dinamismo y capacidad de relativizar los percances. Por ayudarme a anestesiarse cerditos. Sin él, no hubiese podido trasplantar ninguno.

A Ángel Ruiz, por su puntualidad y capacidad de trabajo. Por ayudarme en la recirculación normotérmica y enseñarme a hacer funcionar la bomba de bypass cardiopulmonar. Sin él, el experimento hubiese sido imposible.

A Florencia Suárez, por su sacrificio constante, su orden y su constancia hasta obtener todos los resultados de bioquímica. Por su amistad. Gracias también a Bautista (su hijo) por las horas que dejó de estar con su madre.

Al Doctor y cirujano Miguel Ángel López Boado, amigo y maestro, por enseñarme a operar cerditos los lunes. Sin su paciencia interminable, nunca hubiese aprendido a hacer anastomosis vasculares. Y, sobre todo, por su constante y agradable buen humor.

A los Doctores y cirujanos Ramón Rull y Javier González, por su paciencia al enseñarme a operar trasplantes de hígado en cerditos. Por su grata compañía durante las horas compartidas en el estabulario.

Al Doctor Raúl Almenara, por enseñarme a operar cerditos, (aunque no me dejase hacerlo a mí). Por su energía interminable.

A Pilar Santos, por colaborar en la última etapa de mi tesis, por su sacrificio. Gracias por dormir tantos cerditos. Por las horas empleadas en las determinaciones bioquímicas.

A Ernest Bombuy, por ayudarme a operar cerditos y a sacrificarlos. Por su enorme espíritu de sacrificio y su disponibilidad. Sin él, no hubiese podido operar ni llevar a cabo las labores más engorrosas que conlleva un trabajo experimental.

A la Doctora Pilar Taurá, por su sabiduría y capacidad de trabajo incansable. Por todo lo que me enseñó.

A todos aquellos anestelistas que vinieron a dormir cerditos y colaboraron en la bomba (Alberto Fuentes, Ramón Adalia, Mercè Agustí, Anabel Blasi...).

A la Doctora Rosa Miquel, por su aportación laboriosa en el laboratorio de Anatomía Patológica, sin la cual esta tesis no tendría sentido. Siempre estuvo dispuesta a ayudarme hasta el final.

Al Doctor Ramón Deulofeu y a la Doctora Montse Elena, por ayudarme en todo momento con su constante buen humor y apoyarme en las tareas del laboratorio de Bioquímica.

A Loli Jaén, sin la cual no tendría los resultados de Bioquímica.

A todos los residentes que se lavaron en el quirófano del estabulario para hacer campo en el trasplante (Esther Mans, Joana Ferrer y Javier Morales). Por su grata compañía y su ayuda manual.

A Meri y Vicenç y a todo el personal del estabulario, por colaborar en las tareas organizativas y logísticas que comporta comprar, alimentar y cuidar a los cerditos operados.

A mi madre, que en paz descanse, por apoyarme siempre en todo lo que decidí hacer, por su amor, su amistad y su cariño. Por todo lo que me enseñó.

A mi hermana Mónica, por defenderme en todo lo que he necesitado, por su fuerza y empeño, por su infinita amistad y por comprenderme en todas mis inquietudes científicas.

A mi Ignasi, por su amor y amistad que me dan fuerza cada día para seguir trabajando, por dejarme el ordenador cuando él también lo necesitaba. Por el impulso que me ofrece cada día para terminar de escribir la tesis. Por sacrificar un cerdito el mismo día en que falleció mi madre (yo no fui capaz). Por todo lo que compartimos.

A mis hijos Eduard y Albert, por todo el tiempo que he dejado de dedicarles mientras realizaba esta tesis doctoral.

A mi próximo hijo, por todas las horas delante del ordenador haciéndome compañía y dándome pataditas.

A José Naval y a Paco Navarro, por su apoyo moral.

A la Doctora Edith Pomarol, quien me hizo sentir que escribir una tesis doctoral era fácil (aunque se equivocaba).

Al Doctor Raymond Salvador, por su ayuda en el análisis estadístico.

A mi suegro Pere, por estimularme e interesarse por mi tesis mostrándome la suya, y a mi suegra María por ayudarme en la encuadernación.

A Jaime González, por hacerme creer que soy capaz de todo en esta vida. Por darme ánimos. Por valorarme tanto.

A todas estas personas que forman parte de mi vida, sin las cuales esta tesis nunca se hubiese llevado a cabo.

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 9 |
| 1.1.- Conceptos fundamentales en el estudio del trasplante hepático..... | 9 |
| 1.1.1.- Recuerdo histórico del trasplante hepático..... | 9 |
| 1.1.1.1.- Aparición de la inmunosupresión..... | 11 |
| 1.1.1.2.- Periodos cronológicos según la supervivencia..... | 11 |
| 1.1.1.3.- Evolución del trasplante hepático en España..... | 13 |
| 1.2.- Problemática de la donación de órganos. Concepto de muerte encefálica..... | 16 |
| 1.3.- Soluciones al problema de la donación de órganos..... | 17 |
| 1.3.1.- Ampliación de los criterios de selección..... | 18 |
| 1.3.1.1.- Aumento en la edad de los donantes..... | 19 |
| 1.3.1.2.- Donantes con patologías crónicas..... | 19 |
| 1.3.2.- Bipartición hepática o "split liver"..... | 20 |
| 1.3.3.- Donante vivo..... | 21 |
| 1.3.4.- Donante a corazón parado..... | 23 |
| 1.3.4.1.- Definición..... | 25 |
| 1.3.4.2.- Clasificación de Maastricht..... | 25 |
| 1.3.4.3.- Resultados en riñón e hígado..... | 30 |
| 1.3.4.4.- Técnicas de obtención de órganos..... | 32 |
| 1.3.4.4.1.- Bomba de by-pass cardiopulmonar..... | 32 |
| 1.3.4.4.2.- Enfriamiento in situ..... | 35 |
| 1.3.4.4.3.- Enfriamiento corporal total..... | 36 |
| 1.4.- Lesión por isquemia-reperfusión..... | 37 |
| 1.4.1.- Concepto..... | 38 |

| | |
|--|----|
| 1.4.2.- Lesiones por isquemia caliente..... | 40 |
| 1.4.3.- Lesiones por preservación..... | 42 |
| 1.4.4.- Lesiones por reperfusión..... | 43 |
| 1.4.4.1.- Fundamentos etiopatogénicos..... | 43 |
| 1.4.4.2.- Endotelio vascular..... | 44 |
| 1.4.4.3.- Calcio..... | 45 |
| 1.4.4.4.- Neutrófilos..... | 46 |
| 1.4.4.5.- Activación del complemento..... | 48 |
| 1.4.4.6.- Metales pesados..... | 49 |
| 1.4.4.7.- Radicales libres de oxígeno..... | 50 |
| 1.4.4.7.1.- Complejo enzimático de la xantino-oxidasa..... | 52 |
| 1.4.4.7.2.- Lipoperoxidación..... | 56 |
| 1.4.4.7.3.- Scavengers..... | 57 |
| 1.4.4.8.- Oxido nítrico..... | 58 |
| 1.4.5.- Mecanismos celulares de defensa..... | 59 |
| 1.4.5.1.- Antioxidantes. Superóxido dismutasa..... | 60 |
| 1.5.- Sustancias citoprotectoras..... | 64 |
| 1.5.1.- Glicina..... | 64 |
| 1.5.2.- Arginina..... | 67 |
| 1.5.3.- S-Adenosil metionina..... | 69 |
| 1.6.- Justificación de la tesis..... | 74 |
| | |
| 2.- HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS..... | 79 |
| | |
| 3.- MATERIAL Y MÉTODOS..... | 81 |
| 3.1.- Sujetos de estudio y definición de los grupos..... | 81 |
| 3.2.- Anestesia en el donante y en el receptor..... | 85 |

| | |
|---|-----|
| 3.2.1.- Monitorización del donante..... | 85 |
| 3.2.2.- Accesos vasculares del by-pass cardiopulmonar..... | 86 |
| 3.2.3.- Monitorización del receptor..... | 89 |
| 3.3.- Técnica quirúrgica..... | 90 |
| 3.3.1.- Extracción en el donante..... | 90 |
| 3.3.2.- Implante en el receptor..... | 90 |
| 3.4.- Determinaciones analíticas del estudio..... | 92 |
| 3.4.1.- Transaminasas (ASAT, ALAT y GST)..... | 92 |
| 3.4.2.- Acido hialurónico..... | 94 |
| 3.4.3.- Histología..... | 95 |
| 3.5.- Marcadores hemodinámicos durante la recirculación normotérmica..... | 97 |
| 3.5.1.- Flujos sanguíneos hepáticos y de bomba..... | 97 |
| 3.5.2.- Metabolismo hepático del oxígeno..... | 97 |
| 3.6.- Marcadores del estado energético..... | 99 |
| 3.6.1.- Nucleótidos de adenosina..... | 99 |
| 3.6.2.- Carga energética..... | 100 |
| 3.7.- Análisis estadístico..... | 102 |
| 3.8.- Control, seguimiento y sacrificio del animal..... | 102 |
| | |
| 4. RESULTADOS..... | 104 |
| 4.1.- Análisis de la supervivencia..... | 104 |
| 4.2.- Efecto de los distintos tratamientos sobre la lesión del parénquima hepático..... | 105 |
| 4.2.1.- Niveles séricos de aspartato aminotransferasa (ASAT)..... | 105 |
| 4.2.2.- Niveles séricos de alanin aminotransferasa (ALAT)..... | 107 |
| 4.2.3.- Niveles séricos de alfa glutation-S-transferasa (GST)..... | 108 |
| 4.3.- Efecto de los distintos tratamientos sobre el endotelio sinusoidal hepático..... | 109 |
| 4.4.- Histología..... | 111 |

| | |
|--|-----|
| 4.4.1.- Dilatación sinusoidal..... | 111 |
| 4.4.2.-Infiltración sinusoidal por polimorfonucleares..... | 112 |
| 4.4.3.- Infiltración sinusoidal por linfocitos..... | 113 |
| 4.4.4.- Inflamación portal..... | 115 |
| 4.4.5.- Endotelitis..... | 116 |
| 4.4.6.- Disociación hepatocitaria..... | 117 |
| 4.4.7.- Colangitis isquémica..... | 118 |
| 4.4.8.- Edema portal..... | 119 |
| 4.4.9.- Infarto..... | 120 |
| 4.4.10.- Necrosis..... | 122 |
| 4.4.11.- Area necrótica media o porcentaje de necrosis..... | 123 |
| 4.4.12.- Imágenes de la histología al 5º día..... | 126 |
| 4.5.- Estudio de los flujos sanguíneos hepáticos durante la recirculación normotérmica. | |
| 4.5.1.- Efecto de los tratamientos sobre los flujos sanguíneos hepáticos durante la recirculación extracorpórea..... | 131 |
| 4.5.1.1.- Flujo sanguíneo arterial..... | 131 |
| 4.5.1.2.- Flujo sanguíneo portal..... | 134 |
| 4.5.1.3.- Flujo sanguíneo hepático total..... | 136 |
| 4.5.1.4.- Flujo sanguíneo en la bomba..... | 138 |
| 4.5.2.- Diferencias en los flujos sanguíneos durante la RN entre los animales supervivientes..... | 140 |
| 4.5.2.1.- Flujo sanguíneo arterial..... | 140 |
| 4.5.2.2.- Flujo sanguíneo portal..... | 141 |
| 4.5.2.3.- Flujo sanguíneo hepático total..... | 142 |
| 4.5.2.4.- Flujo sanguíneo de bomba..... | 143 |
| 4.6.- Metabolismo hepático del oxígeno durante la RN..... | 144 |
| 4.6.1.- Diferencias en la extracción hepática de oxígeno durante la RN entre los | |

| | |
|--|-----|
| animales supervivientes..... | 146 |
| 4.7.- Estudio de la carga energética y los niveles hepáticos de xantina..... | 147 |
| 4.7.1.- Carga energética..... | 147 |
| 4.7.2.- Xantina..... | 148 |
| | |
| 5.-DISCUSIÓN..... | 150 |
| | |
| 6.- RESUMEN Y CONCLUSIONES..... | 169 |
| | |
| 7.- BIBLIOGRAFÍA..... | 171 |

1.- INTRODUCCIÓN

1.1. Conceptos fundamentales en el estudio del trasplante hepático.

1.1.1. Recuerdo histórico del trasplante hepático.

Los primeros trasplantes de órganos datan de **principios del siglo XX**, cuando en 1902, Ullmann autotrasplantó el riñón de un perro a los vasos de su cuello. Diversos estudios experimentales fueron realizados posteriormente, pero no fue hasta los años cincuenta, en que se realizó el primer trasplante exitoso. De modo que en la década de los cincuenta se iniciaron las bases científicas del trasplante. Hasta esa época, el desarrollo de la cirugía vascular con Jaboulay y Carrel permitió poner a punto una correcta técnica de anastomosis vascular con el imperativo de garantizar una buena revascularización del órgano. El **desarrollo de la cirugía vascular** permitió iniciar el trasplante de un órgano de un animal a otro mediante la extracción en el primero e implante en el segundo, respetando las estructuras vasculares para su posterior anastomosis, revascularización y funcionamiento del órgano. Así, en 1955 Cannon realizó el **primer trasplante heterotópico de hígado**, seguido de Goodrich en 1956. En 1959, Welch y Moore en Boston y Starzl en Chicago realizaron **trasplantes ortotópicos de hígado** en perros obteniendo una supervivencia entre cuatro días y dos semanas.

El primer intento de trasplante hepático humano fue realizado en Denver (USA) en 1963 por Thomas E. Starzl (1), pero no fue hasta 1967 en que el mismo grupo obtuvo una supervivencia prolongada gracias al trasplante hepático en una niña de dos años afecta de hepatocarcinoma (2). En Europa, Calne llevó a cabo el primer

trasplante en 1968 en Cambridge (Gran Bretaña) con una supervivencia de once semanas (3). En España, los **doctores Margarit y Jaurrieta realizaron el primer trasplante hepático** en el Hospital de Bellvitge (Barcelona) en el año **1984** (4), y desde ese momento hasta finales del 2000 se han llevado a cabo más de 7700 trasplantes hepáticos en todo el país (5).

Después de varias decenas de trasplantes hepáticos en todo el mundo, los primeros resultados obtenidos eran desalentadores, con una supervivencia global al año entre 17% y 30% según los grupos. Los problemas más destacados en aquella época, que explicaban la alta incidencia de mortalidad operatoria, eran la elevada frecuencia de infecciones, sobre todo septicemias, neumonías e infecciones intraperitoneales, y las complicaciones biliares secundarias a anastomosis biliodigestivas o biliobiliares poco seguras. Sin embargo, algunas supervivencias prolongadas demostraron que la operación era practicable y tenía un valor clínico. Las indicaciones para el trasplante eran entonces las siguientes: la atresia de vías biliares en los niños pequeños y lactantes, la insuficiencia hepatocelular crónica terminal, las lesiones hepáticas malignas y la insuficiencia hepatocelular aguda grave debida a una hepatitis vírica o tóxica. Sin embargo, algunas de estas indicaciones eran discutidas, como la difícil situación de la cirrosis, con los grandes trastornos de la coagulación y la presencia ineludible de hipertensión portal, o se ponía en duda si la lesión maligna podía recidivar con el tratamiento antirrechazo. Además, era necesario progresar en las técnicas quirúrgicas y en las medicaciones inmunosupresoras para que el trasplante hepático tuviera una amplia aplicación clínica.

1.1.1.1. Aparición de la inmunosupresión.

Los obstáculos más importantes para el desarrollo exitoso del trasplante fueron: las dificultades de la técnica quirúrgica, la necesidad de hallar líquidos de preservación más eficaces que permitieran aumentar el tiempo disponible para preparar el receptor y realizar la intervención en condiciones óptimas, el difícil manejo anestésico intraoperatorio, la aparición constante del rechazo del injerto en el postoperatorio y las complicaciones infecciosas. El constante progreso en los aspectos quirúrgicos y anestésicos, pero sobre todo el descubrimiento en 1976 de la **ciclosporina** (agente inmunosupresor potente y selectivo que bloquea la respuesta inmunológica al rechazo), constituyen las razones fundamentales de la mejoría de los resultados (6). La introducción de la ciclosporina en la práctica clínica por Calne y White en 1978 demuestra la gran utilidad de esta nueva droga inmunosupresora en la **profilaxis y tratamiento del rechazo**. A partir de 1982, se incorporó en todos los protocolos de inmunosupresión a escala mundial como terapéutica única o asociada a otras drogas inmunosupresoras, lo que permitió que el trasplante hepático se convirtiera en un elemento terapéutico aceptado mundialmente a partir de 1983 en el Consensus Development Conference (National Institute of Health, USA) (7) y definitivo en el tratamiento de las enfermedades hepáticas terminales.

1.1.1.2. Periodos cronológicos según la supervivencia.

A partir de 1988 fueron obtenidos los mejores resultados en los diferentes centros, alcanzando una supervivencia al año que oscilaba entre el 80 y el 90%. Estas cifras contrastaban con las obtenidas antes de

esa fecha con una supervivencia alrededor del 30% al año del trasplante. Además, la calidad de vida de los pacientes en general era buena, pudiendo realizar una vida estrictamente normal en más de dos terceras partes de los pacientes (8, 9).

En Europa, según el informe del European Liver Transplant Registry publicado en 1997 (10), se analizaron los resultados de 24.564 trasplantes hepáticos en dos períodos separados:

- **De 1968 a 1987**, la supervivencia en 2007 pacientes trasplantados es del 53% a un año y del 42% a los cinco años. La supervivencia del injerto (sobre 2207 injertos) es de 48% al año y 37% a los 5 años del trasplante.

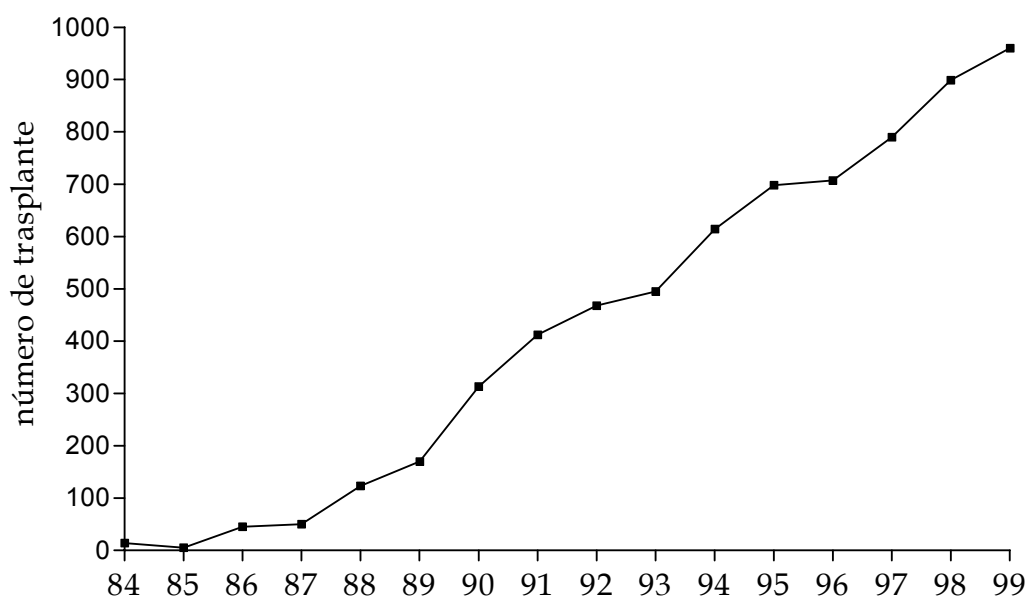
- **De 1988 a 1996**, el porcentaje de supervivencia de 19.381 pacientes al año del trasplante se cifra en 76% y a los cinco años en 65%. Paralelamente la supervivencia del injerto (22.036 injertos) al año es de 67% y a los cinco años de 56%.

Estos buenos resultados del trasplante hepático derivan en el **aumento de las indicaciones médicas** del trasplante, lo que condiciona a su vez el **aumento de las listas de espera**; los riesgos principales para un candidato se han centrado básicamente en: sufrir una recidiva de la enfermedad inicial en el injerto, bien sea una enfermedad maligna o una cirrosis posthepatítica, o fallecer debido al agravamiento de la enfermedad antes de poder ser trasplantado. Esta última situación se debe al aumento del número de pacientes en lista de espera para recibir un órgano, que no ha sido seguida de un aumento de la oferta de órganos. En este contexto, se discuten las situaciones "límite" tales como los trasplantes en pacientes con cirrosis de origen etílico o con una enfermedad maligna, o se intenta indicar de forma muy precisa el momento óptimo para el trasplante en las enfermedades hepáticas crónicas.

1.1.1.3.- Evolución del trasplante hepático en España.

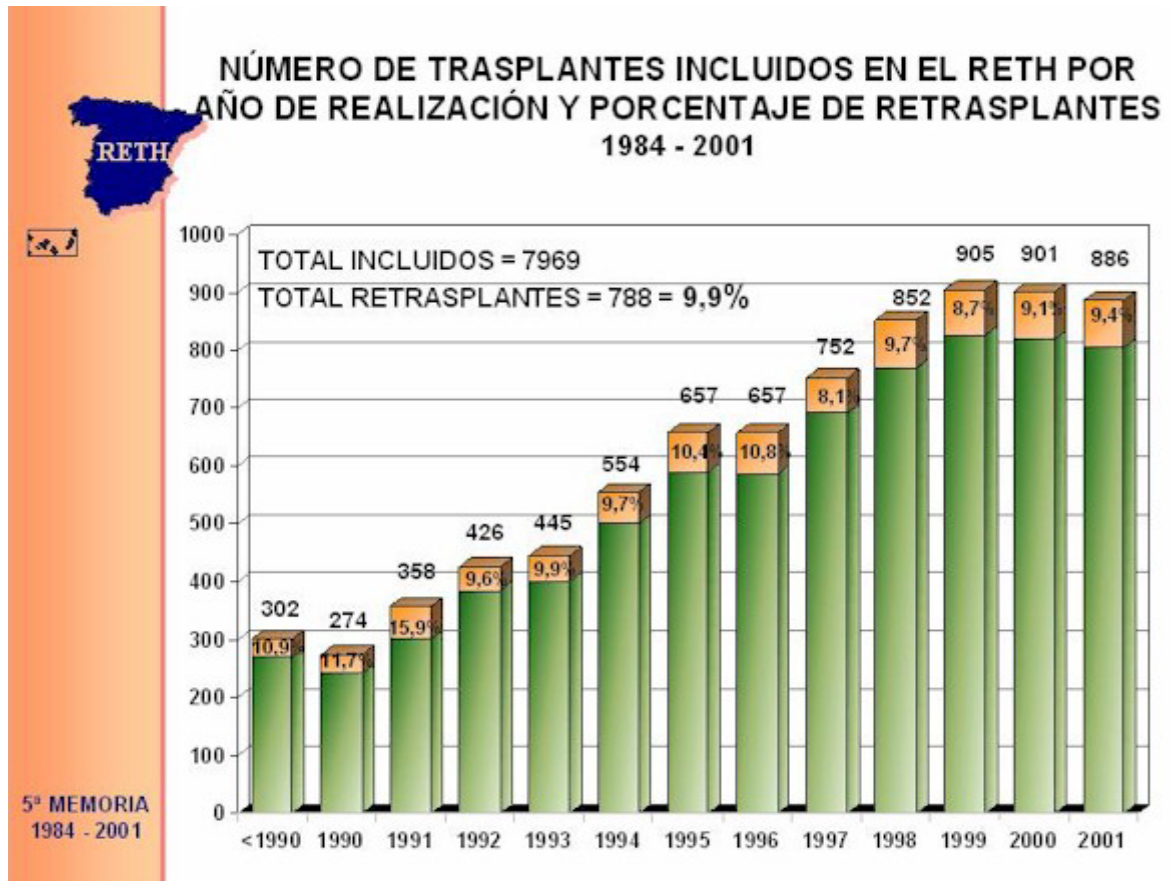
El **número de trasplantes hepáticos realizados en España ha aumentado** considerablemente desde principios de 1990 hasta la fecha. Desde 1984 hasta el año 1990, por ejemplo, se han realizado 407 trasplantes de hígado, mientras que durante el año 1990 se realizaron 313 trasplantes hepáticos y a partir de ese momento se presentó un aumento paulatino y sostenido de la actividad trasplantadora llegándose a transplantar casi 1000 hígados en 1999.

Figura 1: Evolución de los trasplantes hepáticos en España desde 1984 hasta 1999.



Según el Registro Español de Trasplante Hepático, desde 1999 hasta finales del 2001 el número de trasplantes realizados en España se mantiene constante e incluso desciende, siendo el año 1999 el pico máximo de actividad, en números absolutos.

Figura 2: Evolución de los trasplantes hepáticos en España desde 1990 hasta el 2001, incluyendo los retrasplantes.



Durante los últimos años **España ha ocupado un privilegiado lugar** dentro del concierto internacional en lo referente a la donación de órganos. En 1989 la tasa de donantes por millón de población (p.m.p.) de España era del 14.3, aumentando en 1995 a 27 donantes p.m.p. y en el año 2000 llegó hasta 33.9 donantes p.m.p. (11).

Junto con el aumento del número de donantes se ha producido un aumento de pacientes que ingresan en las listas de espera (figura 3), que podemos ver reflejado en el tiempo que están los pacientes en ellas, ya que durante el año 1991 más del 75 % de los pacientes fueron

trasplantados antes de los tres meses y en la actualidad solamente el 48 % de los pacientes son trasplantados antes de ese período de tiempo.

Figura 3: Porcentaje de pacientes en lista de espera hepática trasplantados antes de tres meses.

| 1991 | 1992 | 1993 | 1994 | 1995 | 1996 | 1997 | 1998 | 1999 | 2000 | 2001 | 2002 |
|-------|------|-------|-------|------|------|-------|-------|-------|-------|------|-------|
| 76,4% | 79% | 72,5% | 73,5% | 71% | 69% | 63,6% | 66,6% | 61,3% | 55,1% | 46% | 48,6% |

Referente a la **mortalidad en listas de espera**, durante el año 2000 se ha mantenido la **tendencia estable** de los últimos años, cifrándose el porcentaje de muerte en lista de espera, para pacientes que esperan un injerto hepático, en un 7,6 % para el año 2000 y dicho porcentaje aumenta hasta un 9,5 % para el año 2002. A este porcentaje de pacientes, no debemos olvidar de sumarle aquellos pacientes que son retirados de las listas de espera por no cumplir los requisitos necesarios para ser candidatos a recibir un trasplante hepático, hecho que aumentaría el porcentaje total de pacientes que necesitan un trasplante y no llegan a él por diferentes causas (muerte, exclusión de lista).

Figura 4: Porcentaje de éxitos en lista de espera para trasplante hepático.

| 89 | 90 | 91 | 92 | 93 | 94 | 95 | 96 | 97 | 98 | 99 | 2000 | 2001 | 2002 |
|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 7,0% | 8,5% | 6,4% | 4,2% | 6,2% | 4,2% | 8,1% | 7,5% | 7,4% | 6,9% | 7,6% | 7,6% | 9% | 9,5% |

1.2. Problemática de la donación de órganos. Concepto de muerte encefálica.

En los inicios de los programas de trasplante, el método habitual de obtención de órganos era a partir de donantes cuyo corazón dejaba de latir justo antes de la extracción, pues el diagnóstico de muerte de una persona se basaba en la ausencia de latidos cardíacos y de respiración espontánea. Con el **desarrollo de las técnicas de reanimación y de la ventilación artificial**, se hizo posible el diagnóstico de la muerte del individuo, previa a la parada cardiorrespiratoria, por el cese de las funciones encefálicas. De esta forma nació el concepto de "muerte encefálica" y con él, la posibilidad de extracción de órganos para trasplante sin tener que esperar que se produzca la asistolia, es decir con el corazón latiendo, logrando así aumentar la calidad de los órganos extraídos.

En España, con el progresivo aumento de los pacientes en lista de espera y los esfuerzos de profesionales y Asociaciones de enfermos para sensibilizar a la Administración Central, se consiguió la promulgación de la **Ley española de Trasplantes en el año 1979**, desarrollada en el Real Decreto de 1980, que derogaba la antigua ley de 1950. Esta ley permitía regular todo el procedimiento de la donación, extracción y trasplante, de donante vivo y de cadáver, indicando los criterios médicos para el diagnóstico clínico de la muerte cerebral.

Los **órganos obtenidos de donantes en muerte encefálica fueron de indiscutible mejor calidad**, demostrándose que los resultados obtenidos podían igualarse a los de donantes vivos. Todo ello derivó en el abandono casi total de la extracción de cadáver en parada cardíaca.

Por otro lado, con la entrada en vigor de la **Ley de Seguridad Vial** en 1992, que obliga al uso de los cinturones de seguridad de los automóviles y del casco protector en las motocicletas, el número de traumatismos craneoencefálicos en accidentes de tráfico y de víctimas mortales descendió, afortunadamente, añadiéndose este punto al **déficit crónico de donantes de órganos**.

1.3.- Soluciones al problema de la donación de órganos.

Actualmente España (tabla 1) es el país que presenta la **mayor tasa de donantes por millón de habitantes a nivel mundial**: 33.9 por millón de habitantes (datos del año 2000). Sin embargo, esto no soluciona el problema de la falta de órganos para trasplante, ya que el número de pacientes que ingresan a las listas de espera es mayor que el número de donantes existentes.

Tabla 1: Tasas de donantes por millón de población (p.m.p.) de diferentes países.

| | <i>España</i> | <i>U.S.A.</i> | <i>Francia</i> | <i>R. Unido</i> | <i>Canadá</i> |
|------------------------|---------------|---------------|----------------|-----------------|---------------|
| <i>Donantes p.m.p.</i> | 33,9 | 22,9 | 16,2 | 13 | 12,5 |

Se deduce que, hoy por hoy, existe una problemática de desequilibrio entre la oferta de órganos para trasplante y la demanda creciente de los mismos. La **falta persistente de órganos** aptos para el trasplante obliga a la utilización de todos los medios humanos y técnicos en la investigación de soluciones alternativas para aumentar al máximo el número de órganos generados.

1.3.1.- Ampliación de los criterios de selección.

La selección de los donantes de órganos se rige por unos criterios clásicamente bien establecidos con el objeto de obtener órganos "óptimos" o de calidad asegurada. Sin embargo, como consecuencia de la escasa disponibilidad de donantes, se ha optado por ir ampliando cada vez más los criterios de selección de los cadáveres donantes de órganos (12, 13) con el objetivo único de aumentar en lo posible el número de órganos disponibles (tabla 2).

Tabla 2: Diferentes soluciones ante la falta de órganos para trasplantes.

- | |
|--|
| <ul style="list-style-type: none">◆ <i>Aumento en la edad de los donantes</i>◆ <i>Donantes con patologías crónicas</i>◆ <i>Split o bipartición hepática</i>◆ <i>Donantes vivos</i>◆ <i>Donantes a corazón parado</i> |
|--|

1.3.1.1.- Aumento en la edad de los donantes.

Esta política ha significado la aceptación progresiva de donantes de edad más avanzada (**>60 años**) al comprobarse que este punto no influía en la supervivencia posterior del paciente; ello también se debe a que la primera causa de muerte en los donantes de órganos pasó de ser el **traumatismo craneoencefálico a ser la hemorragia intracraneal** espontánea, cambiando así el grupo de edad de los donantes (de 20-30 a 50-69 años). En el año 1990 se consideraba como edad límite para ser donante los 55 años, mientras que en la actualidad no existe un límite máximo fijado para la edad del donante (14).

1.3.1.2.- Donantes con patologías crónicas.

Una estancia prolongada en una unidad de cuidados intensivos con la posibilidad de presentar infecciones secundarias, las alteraciones hemodinámicas severas que precisan del uso de drogas vasoactivas para su control, la presentación de patología previa en el donante (hipertensión arterial, diabetes mellitus, corticoterapia), e incluso la existencia de un cierto grado de esteatosis objetivada en la evaluación por parte del cirujano en la mesa de quirófano, son factores que podrían comprometer la viabilidad del potencial injerto y que caracterizan al donante como **“subóptimo” o “marginal”**. Pero estos donantes se están utilizando con una frecuencia creciente hasta tal punto que se han convertido en los donantes habituales.

1.3.2. Bipartición hepática o “split liver”.

En un momento histórico en donde la disponibilidad de órganos se ha convertido en un obstáculo para el desarrollo del trasplante de hígado y en donde un gran porcentaje de niños moría en las listas de espera por falta de un órgano de medida apropiada, las innovaciones quirúrgicas contribuyeron cada vez más al aumento del número de órganos (o de parte de esos órganos) para candidatos diferentes. Entre ellas se encuentra la técnica de la bipartición hepática o “split liver”.

El desarrollo de la técnica de división del injerto hepático adulto en **dos mitades ex vivo** fue una solución aportada a la vez por Pichlmayr y Bismuth a partir de 1988 y posteriormente adoptada por otros grupos (Broelsch, Houssin) en respuesta a la escasez existente de injertos pediátricos. La técnica resultaba atractiva, pues permitía el trasplante hepático de **dos receptores, generalmente un adulto y un niño**, a partir de un solo órgano. Sin embargo, los resultados iniciales (15) (supervivencia del paciente de 60% y del injerto de 43%) y después los publicados por varios grupos (16, 17 y 18) (Otte en 1990, Merion en 1991 y Houssin en 1993) eran inferiores a los del trasplante del órgano entero, contando con una alta incidencia de **complicaciones biliares** y la necrosis isquémica del segmento medial izquierdo.

Basándose en la experiencia previa y con la finalidad doble de evitar un tiempo de isquemia fría más largo y mantener la integridad anatómica de los injertos para mejorar los resultados, el grupo de Broelsch en Hamburgo realizó el **“split liver” en el donante a corazón latiendo, es decir “in situ”** (34). De esta manera, podían observar la vascularización de los dos injertos confirmando la viabilidad del segmento medio izquierdo y realizar una correcta hemostasia evitando la devascularización del conducto biliar. Sus buenos resultados

(supervivencia de los pacientes a los 6 meses del trasplante de 92,8% y del injerto de 85,7% con ausencia de complicaciones biliares) les permitieron concluir que la técnica de reducción simple del órgano quedaba obsoleta, abriéndose una puerta más al aumento del número de órganos para trasplante.

1.3.3.- Donante vivo.

El trasplante hepático de donante vivo se inició para solucionar la falta de donantes apropiados para niños, lo que motivaba una mortalidad en lista de espera del 30-40% (19-25). El primer trasplante con éxito de este tipo se realizó en **Australia** (26), y la primera experiencia piloto en **Chicago**, por Broelsch (27). Sin embargo, el trasplante hepático infantil a partir de donante vivo se ha desarrollado principalmente en **Japón** debido a las peculiares características culturales de este país, donde no se admitía la muerte cerebral como indicativa del fallecimiento del individuo. Los resultados han permitido comprobar la eficacia de esta alternativa en cuanto a la consecución de una buena supervivencia, así como en la casi **eliminación de la mortalidad en lista de espera**.

La donación en vivo en la edad infantil no sólo permitió iniciar programas de trasplantes en los países asiáticos y reducir ostensiblemente la mortalidad en lista de espera en los países occidentales, sino también el desarrollo de técnicas de división del hígado de donante cadáver, de tal forma que un mismo hígado era útil para una persona adulta y una en edad infantil (24, 28).

Con la experiencia adquirida con las divisiones y las resecciones hepáticas y ante los resultados iniciales del "split liver", el grupo de Broelsch en Europa llegó a la conclusión de que era necesario buscar

otro método de mejorar las posibilidades de aumentar el pool de órganos (29). La obtención de órganos a partir de donante vivo, generalmente emparentado con el receptor o "living related donor", constituía un paso lógico y fue una posibilidad más que se introdujo, a partir de las consideraciones éticas y la experiencia de la Universidad de Chicago (30).

La técnica consistía en la realización de una **hepatectomía izquierda** para posterior implante del segmento lateral izquierdo (segmentos II y III) en el receptor. Era una técnica muy utilizada en centros con un activo programa de **trasplante pediátrico** (31, 34). Tras la buena experiencia obtenida en el trasplante pediátrico, se comenzaron a realizar trasplantes hepáticos con donantes vivos en adultos, realizándose al principio con segmentos laterales izquierdos, en receptores más bien pequeños, y en **1994 Yamaoka reportó el primer caso de trasplante utilizando el lóbulo derecho hepático** de un donante vivo (32). Esta técnica fue muy aceptada por los diferentes grupos trasplantadores, ya que el lóbulo hepático derecho representa aproximadamente el 60% de la masa hepática, lo que supone un buen tamaño de hígado para poder asegurar la buena función del injerto en un receptor adulto. Actualmente, este tipo de trasplantes ha llegado a representar hasta el 25 % del total de los trasplantes que se realizan en algunos centros (33).

El beneficio real consiste en la utilización de un órgano de excelente calidad y la posibilidad de elegir el **momento óptimo** según las condiciones del receptor para la realización del trasplante. Los resultados son comparables a los mejores obtenidos con los trasplantes de cadáver (35).

El grupo de Rogiers en Hamburgo (36) compara 92 pacientes trasplantados (49 mediante "split liver" y 43 a partir de donante vivo) y

concluye que los resultados a corto y a largo plazo no son significativamente diferentes. Por ello, el "split liver" sigue siendo la primera línea terapéutica en pediatría en países donde existe la donación cadavérica, reservando así la donación en vivo (que siempre implica un riesgo para el donante) para los casos urgentes, en los que el receptor encuentra comprometida su supervivencia debido a la espera en lista. La combinación del **"split"** (sea ex-situ o in-situ) y la donación de vivo relacionado (**"living related donor"**) **ha abolido las muertes en lista de espera en la población pediátrica**. La técnica del "in-situ split" presenta la oportunidad de transplantar a niños con un órgano de medida apropiada, sin reducir el pool de donantes cadavéricos para los adultos (37).

En un estudio realizado en la Universidad de California-Los Angeles (UCLA) se compara la función precoz y tardía del injerto hepático en niños, entre el "split in-situ" y el injerto de donante vivo. Se observa que en los hígados "split", la función hepática precoz se encuentra más comprometida que en los hígados de donante vivo, así como un mayor tiempo de isquemia en los "split". Sin embargo, la función hepática desde el 7º al 30º día del trasplante no difirió en ambos grupos, ni tampoco fueron distintas la supervivencia del injerto ni del receptor (38).

1.3.4.- Donante a corazón parado.

Una solución alternativa al problema de la escasez de órganos fue la emprendida a mediados de la década de los ochenta: varios equipos de trasplante decidieron reconsiderar la obtención de órganos a partir de los donantes a corazón parado. Se calcula que el número de **donantes potenciales podría aumentar así en un 20%**.

En nuestro ámbito, la donación de órganos basada en la muerte encefálica del cadáver está regulada por el Real Decreto 426/1980, de 22 de febrero, que desarrolla la Ley 30/1979, de 27 de octubre, sobre Extracción y Trasplante de Órganos; La Ley 30/1979 establece que la extracción de órganos u otras piezas anatómicas de fallecidos podrá hacerse, previa comprobación de la muerte. Según se recoge en los Criterios de Muerte del **Dictamen de Candanchú de la Sociedad Española de Neurología** de 1993, la muerte puede ser secundaria a procesos que conduzcan primariamente a un daño completo e irreversible de las funciones encefálicas (muerte encefálica) o a procesos que conduzcan a un paro cardiorrespiratorio. Sin embargo, el Real Decreto 426/1980 reglamenta tan sólo la obtención de órganos viables para trasplante por fallecimiento en situación de muerte cerebral.

No es hasta 1999 en que se regula la obtención de órganos a partir de donantes en parada cardiorrespiratoria en el **Real Decreto 2070/1999**, de 30 de diciembre (BOE de 04-01-2000, pág. 179-190). En ese tipo de donaciones, y para mantener la viabilidad de los órganos, resulta imprescindible realizar precozmente técnicas de preservación de los órganos, encaminadas a disminuir el daño secundario a la isquemia que sufren los órganos en el tiempo que transcurre desde el diagnóstico de muerte hasta la extracción. Por tanto, ha de articularse un mecanismo eficaz y de suficiente agilidad que permita la inmediata autorización judicial para la obtención de los órganos en los casos en que ésta sea necesaria.

1.3.4.1.- Definición de donante a corazón parado.

Son pacientes en situación de **parada cardiorrespiratoria irrecuperable**, fallecidos con un tiempo de isquemia caliente (fase entre la parada cardíaca y el inicio de la perfusión fría) lo suficientemente corto que permita la extracción de órganos viables para ser utilizados para trasplante.

Según la Sociedad Española de Medicina Intensiva y Unidades Coronarias, la **parada cardíaca** es irreversible cuando el paciente presenta "ausencia de actividad eléctrica cardíaca efectiva tras al menos 30 minutos de reanimación cardiopulmonar avanzada y en ausencia de drogas depresoras o hipotermia inducida". Es en ese momento cuando se realiza el diagnóstico de la muerte. Pero este diagnóstico también puede ser determinado por criterios neurológicos (39), es decir, por el **cese total e irreversible de la actividad cerebral**, que en general es consecuencia de un paro cardiorrespiratorio previo.

1.3.4.2.- Clasificación de Maastricht.

Dado el auge creciente de esta técnica, la comunidad internacional estimó oportuno la realización de un documento de consenso (40) en el **First International Workshop on Non Heart-Beating Donors** celebrado en Maastricht en Marzo de 1995. Allí se establecieron una serie de recomendaciones y se pusieron a punto definiciones y características de lo que debían ser los donantes a corazón parado. Propusieron una clasificación en 4 categorías que permitiese mayor coherencia.

En España, este documento se ha debatido por amplios grupos de profesionales y expertos con el fin de adaptarlo a la realidad de

nuestro país, plasmando las conclusiones en un Documento de Consenso Español emitido por la Organización Nacional de Trasplantes en Noviembre de 1995 (41).

Categoría I: Paciente que ingresa en parada cardíaca de tiempo indeterminado.

El paciente sufre una parada cardíaca y es trasladado al hospital sin habersele practicado maniobras de reanimación cardiopulmonar. En este donante se desconoce por completo el tiempo de parada cardíaca, y por tanto, el tiempo total de isquemia caliente.

Categoría II: Parada cardíaca con maniobras de reanimación inefectivas.

El paciente se encuentra ingresado en el hospital y sufre una parada cardíaca que no se resuelve con las maniobras de reanimación. Los datos de este donante sí se conocen, y el objetivo es minimizar el tiempo de isquemia caliente.

Categoría III: Paciente en el cual se espera la parada cardíaca.

Paciente en muerte cerebral o con lesión neurológica irreversible secundaria a traumatismo craneal, por ejemplo, al que, de acuerdo con la familia, se le retira la ventilación mecánica o el soporte terapéutico, generalmente estando ya en quirófano. Este tipo de donante se da en países como Holanda o Estados Unidos: son los llamados donantes "controlados" frente a los de otras categorías que se califican de "no controlados"; es decir que en ellos, bajo esas circunstancias, el tiempo de isquemia es muy corto y permite realizar la extracción de varios órganos para trasplante. En España, en el

documento de consenso sobre este tema, no se considera esta categoría de donante hasta que no exista un marco legal o socio-cultural adecuado.

Categoría IV: Donante en muerte cerebral que sufre una parada cardíaca antes del procedimiento de extracción.

Se calcula que un 9% de donantes presentan una parada cardíaca antes de proceder a la extracción de los órganos. Generalmente, debido a la inestabilidad hemodinámica previa del donante, se puede prever la parada con antelación.

De la clasificación anterior podemos diferenciar dos grupos de donantes a corazón parado: los no controlados, que corresponden a los grupos 1 y 2, y los controlados, representados por los grupos 3 y 4.

SITUACIÓN EN ESPAÑA

En los últimos años algunos grupos españoles han retomado el interés en promocionar esta fuente de obtención de órganos, como complemento a los donantes convencionales y considerando que obtener el mayor número posible de donantes de órganos forma parte de las obligaciones de los coordinadores de trasplante o profesionales de la donación.

Durante 1994 hubo en España un total de 28 donantes de estas características, que suponen el 2,9% del total de donantes, pero si tenemos en cuenta sólo los donantes de aquellas Comunidades Autónomas que tienen programas funcionantes de donación a corazón parado supone el 6,9% (rango entre 4,7 y 8,4%) (Figuras 5 y 6).

Figura 5: Donantes a corazón parado. España, 1994.

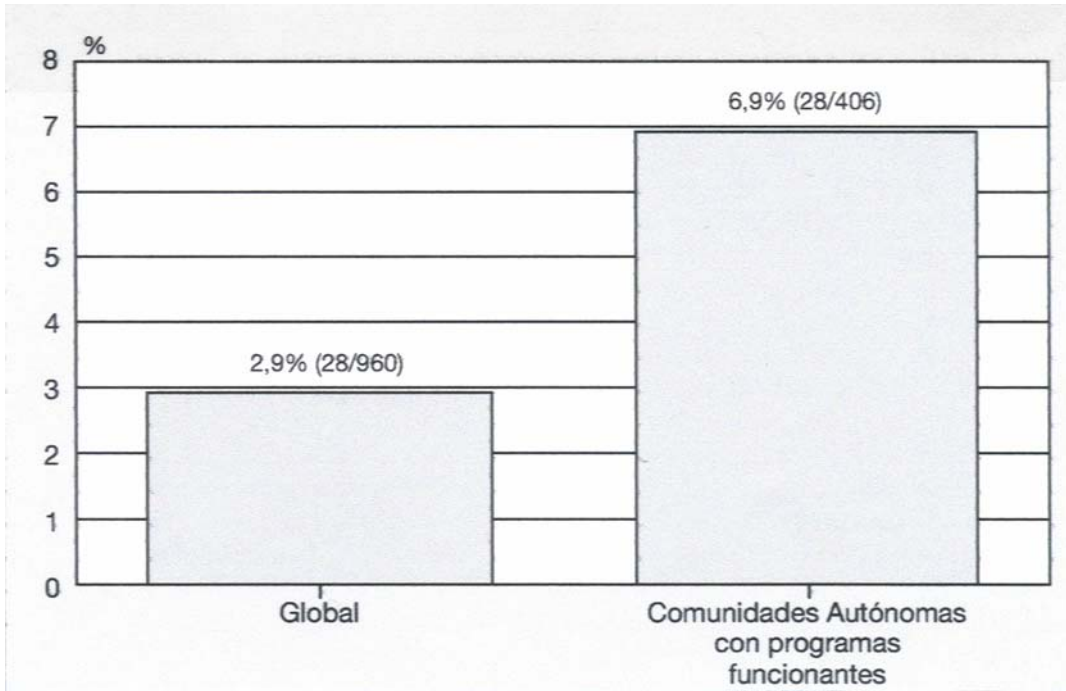
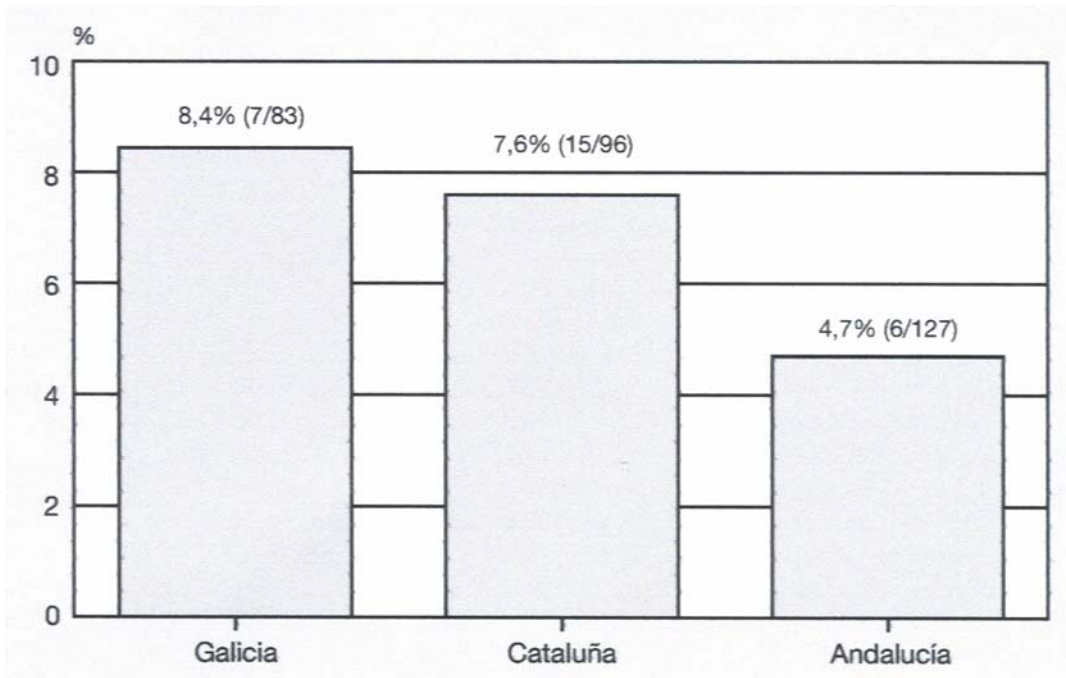
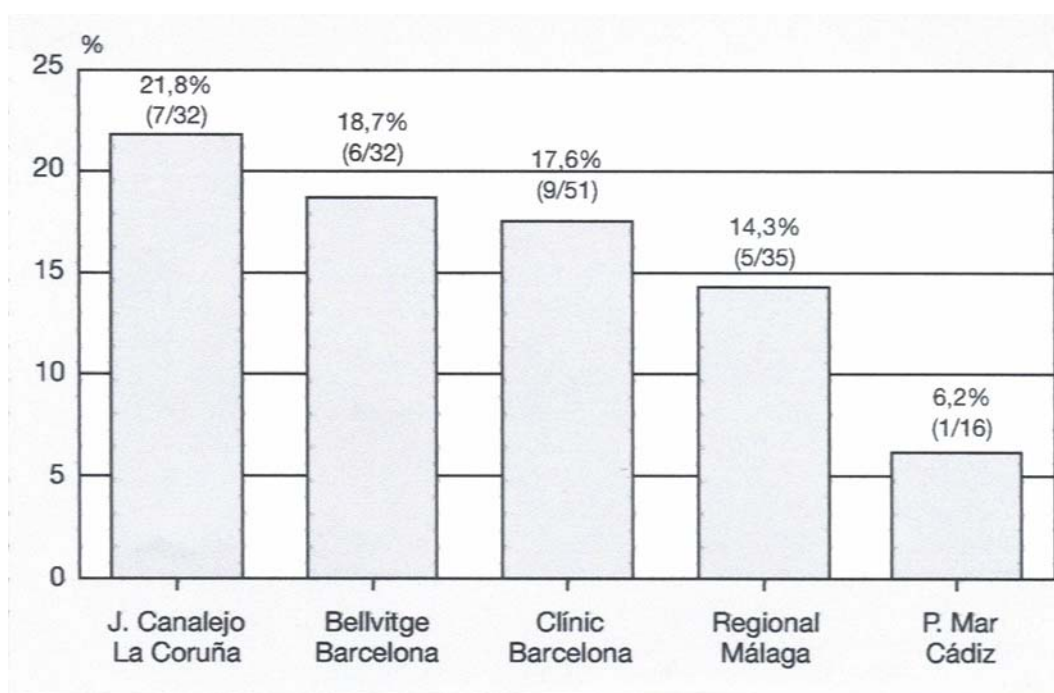


Figura 6: Donantes a corazón parado. España, 1994. Comunidades Autónomas con programas funcionantes.



Si analizamos sólo aquellos centros con programas de estas características, la cifra se eleva hasta situarse entre el 6,2 y el 21,8% (Figura 7). El potencial de donantes de este tipo es muy difícil de calcular, pero a lo que sí nos podemos aproximar en base a los datos disponibles es al potencial de donantes a corazón parado del tipo IV de la clasificación de Maastricht.

Figura 7: Donantes a corazón parado. España, 1994. Comunidades Autónomas con programas funcionantes.



Según el registro de muerte cerebral de la Comunidad Autónoma de Madrid, el 10% de los potenciales donantes en muerte cerebral presentan una parada cardíaca antes de poder completar el diagnóstico legal o antes de llegar a la extracción. En otros estudios encontramos porcentajes que oscilan entre el 3% del grupo de Málaga y el 10% del estudio de Euskadi.

Si las muertes cerebrales suponen entre el 2 y el 4% de todos los fallecimientos, es fácil deducir que el potencial incremento de esta fuente de donación es 5-7 veces mayor que el de donantes convencionales.

1.3.4.3.- Resultados en riñón e hígado.

Existen numerosas publicaciones que hacen referencia a la donación a corazón parado (42-46), y la experiencia con este tipo de donantes se ha adquirido sobre todo con riñones. Todas ellas coinciden en que los riñones así obtenidos son útiles para trasplante y aunque tienen una mayor incidencia de fracaso de la función inicial, su supervivencia a largo plazo es similar a la obtenida con aquellos riñones procedentes de donantes con corazón latiendo. La obtención de órganos provenientes de donantes a corazón parado se basa en la reducción del tiempo de isquemia caliente al máximo. Desde que García-Rinaldi y colaboradores (47) iniciaron la preservación "in situ" de riñones mediante la perfusión fría de los órganos del cadáver, se han diseñado diferentes sistemas de enfriamiento (método de enfriamiento local de órganos abdominales, infusión de líquidos por gravedad a través de catéteres femorales, catéteres femorales con perfusión por bomba, etc....) con resultados buenos. De entre ellos, el que en estos momentos ha demostrado tener una mayor eficacia es aquél que permite el enfriamiento corporal total mediante el empleo de una **bomba de bypass cardiopulmonar** (48-51). Este método, inicialmente **descrito por Koyama y cols. en 1989** (52), consigue mediante la circulación extracorpórea reducir la temperatura corporal de forma rápida y progresiva permitiendo un enfriamiento homogéneo de todos los órganos y tejidos, a la vez que mantiene una buena perfusión y

oxigenación tisular. La experiencia con la obtención de órganos extrarrenales (hígado, páncreas y pulmones) es muy aislada. A diferencia de lo que sucede con el riñón, cuya función puede ser suplida por un dializador, la función inmediata del injerto hepático es necesaria para mantener la vida del paciente; además, la intensidad de las lesiones producidas y la capacidad del órgano para recuperarse de las mismas son desconocidas hasta el momento. Los pocos resultados existentes en clínica son ambiguos en la medida en que no se define siempre el tipo de donante considerado, según las categorías de Maastricht. Algunos estudios exponen la experiencia de hígados obtenidos a partir de donantes a corazón parado con tiempos de isquemia caliente de hasta 15 (53) y 75 (54) minutos. Si bien son estudios con un número limitado de pacientes y con unos resultados variables, se aprecia que la obtención de estos órganos para trasplante podría ser factible.

En EEUU, se inició en la década de los noventa la extracción a partir de donantes en los que la parada cardíaca ocurrió inmediatamente antes de la extracción del órgano, obteniendo así resultados esperanzadores. El grupo de Pittsburgh (44) compara resultados de seis trasplantes hepáticos a partir de donantes a corazón parado "no controlados" con seis obtenidos de donantes a corazón parado "controlados". El número de hígados trasplantados en el grupo no controlado fue inferior al grupo controlado (6/10 vs 6/7) y la incidencia de fracaso en la función inicial del injerto fue superior (50% vs 0%). El grupo de Wisconsin (55) transplanta cinco hígados a partir de donantes controlados en cuatro pacientes, con solamente un caso de malfunción primaria que califican de causa técnica.

1.3.4.4.- Técnicas de obtención de órganos.

Los donantes a corazón parado han sido utilizados durante muchos años como una fuente alternativa para obtener riñones para trasplantes. Con el avance de la medicina y un mejor entendimiento de la lesión por isquemia reperfusión, se han ido obteniendo resultados similares a los que se presentan con donantes a corazón latiente. Avalados por la experiencia en trasplante renal con donantes a corazón parado, sumados a la falta de hígados para trasplantes, los diferentes equipos trasplantadores han comenzado a utilizar hígados provenientes de donantes a corazón parado.

El **principal objetivo**, una vez identificado un posible donante a corazón parado, es **disminuir al máximo posible el tiempo de isquemia caliente**. A lo largo de los años, diferentes alternativas fueron surgiendo con el propósito de disminuir o revertir las lesiones que se producen durante el tiempo de parada cardíaca. Durante la década de los 70 y durante muchos años se ha empleado como técnica de enfriamiento de órganos la perfusión in situ de los órganos por medio de catéteres femorales, posteriormente surgió el enfriamiento corporal total y, más recientemente, se ha empleado la recirculación normotérmica.

1.3.4.4.1.- Bomba de by-pass cardiopulmonar.

La técnica del enfriamiento corporal total mediante bypass cardiopulmonar se fundamenta en la **preservación hipotérmica de los tejidos**, pues el descenso de la temperatura se considera esencial en la preservación de los órganos (56). La hipotermia produce unos cambios

a nivel celular, basados en la disminución de toda reacción metabólica. Como consecuencia, se produce una **disminución de los requerimientos energéticos y un menor consumo de ATP** respecto a la isquemia caliente. A la vez, se inhiben las reacciones catabólicas produciendo un menor acúmulo intracelular de metabolitos tóxicos y una disminución de la acidosis celular (57). La incorporación de una bomba de rodete en el circuito del bypass permite además mantener una presión de perfusión suficiente y una velocidad de flujo elevada, que evitan la vasoconstricción que se instaura con otras técnicas de perfusión por gravedad y que aumentaría el daño isquémico (58). Otra característica es el uso de la **sangre como líquido de enfriamiento del sistema**, que presenta ventajas sobre el uso de cristaloides: la sangre es un coloide que actúa como una solución buffer efectiva, manteniendo una presión oncótica adecuada y evitando la expansión del espacio intersticial, pues esta expansión podría producir la compresión del sistema capilar y la incompleta limpieza del sistema vascular; además, la sangre contiene sustratos necesarios para el metabolismo tisular; la hemoglobina facilita el transporte de oxígeno y ello mejora la función de las mitocondrias. También se hallan presentes sustancias fisiológicas protectoras contra los radicales libres de oxígeno (51).

La utilización del bypass cardiopulmonar en el donante a corazón parado permite el **enfriamiento corporal total de forma homogénea** y rápida sin necesidad de disección de los tejidos y reduce, por tanto, de forma significativa el período de tiempo de isquemia caliente. Este hecho demostrado para la obtención de órganos en el trasplante renal (59, 60), unido a la sugerencia por algunos autores de que una primera reperfusión del órgano con suero a temperatura corporal, justo antes de la perfusión fría, es beneficiosa para la microcirculación hepática (61), nos lleva a la aplicación de esta técnica no solamente para enfriar, sino

también para recircular el órgano y oxigenarlo, manteniendo la temperatura a 37°C, previo al enfriamiento. Es lo que vamos a llamar el **“período de recirculación a 37°C”**.

Los primeros estudios experimentales realizados en el campo de la donación a corazón parado fueron dirigidos prácticamente a evaluar la supervivencia del animal trasplantado (49, 50).

Un trabajo de Tojimbara y cols. investiga el efecto de la temperatura del líquido de perfusión previo al enfriamiento y preservación del injerto concluyendo que, en el donante a corazón parado, una **perfusión inicial a 37°C** tiene un efecto beneficioso sobre la supervivencia y la función del injerto hepático en la rata (61).

Un estudio de Hoshino y cols. en cerdos (63) utiliza la circulación extracorpórea como método para recuperar los órganos para trasplante (al igual que se hace en la clínica para la obtención de riñones). Entre sus conclusiones, destaca el efecto beneficioso de la recirculación a 37°C durante un tiempo, como paso previo al enfriamiento del donante, puesto que los hígados con parada cardíaca de veinte minutos, únicamente eran viables si existía un período de tiempo con oxigenación a 37°C, intercalado entre el inicio de la circulación extracorpórea y el enfriamiento. De su estudio se concluye además, que los hígados así mantenidos (a 37°C durante un tiempo antes del enfriamiento corporal) recuperaban parte de su estado energético durante este período.

También un estudio de Endoh y cols. (64) confirma el efecto beneficioso de la perfusión oxigenada a 37°C mediante bypass cardiopulmonar sobre la recuperación de la carga energética y la actividad ATPasa.

Otro estudio del mismo grupo (65) presenta los resultados del uso del bypass cardiopulmonar en la recuperación de hígados de donantes

a corazón parado mediante el uso de un perfusato (solución Krebs-Henseleit) con glóbulos rojos pero depleccionado de leucocitos, citotoxinas y endotoxinas, permitiendo así la función de oxigenación e impidiendo la lesión mediada por los neutrófilos. Obtienen una mejoría en la producción de ATP, en la carga energética y una disminución del daño en el endotelio sinusoidal. Si además utilizan fármacos que protegen de la lesión por isquemia caliente (Metilprednisolona, FK 506, análogo de la PGI₂,...), la supervivencia en el receptor se incrementa sustancialmente.

1.3.4.4.2.- Enfriamiento in situ.

El objetivo básico de estos métodos es realizar el enfriamiento de los órganos abdominales, para disminuir la temperatura de los mismos, haciendo que **la isquemia caliente sea lo más corta posible**.

Se empezó a realizar mediante un catéter colocado en la arteria y vena femorales. El catéter arterial se utiliza para la infusión de los líquidos de preservación, mientras que el catéter venoso se utiliza para la salida de sangre. Posteriormente, se empezó a utilizar el **catéter femoral de doble balón diseñado por Garcia-Rinaldi en 1975** y que fue ampliamente utilizado por los diferentes equipos trasplantadores. Se procede a la disección de la arteria femoral y se introduce el catéter con dos balones que, una vez hinchados, se sitúan por encima y por debajo de las arterias renales. Con este método se enfría selectivamente el área renal (66, 67, 68).

La perfusión de los líquidos de preservación se ha realizado tanto a bajas como a altas presiones (más de 70 mmHg). Se ha comprobado que la perfusión a altas presiones consigue un enfriamiento más rápido, así como también una disminución en la resistencia

intraparenquimatosa, hecho que tendría importancia en la futura función del injerto (67, 69-73).

Con el tiempo fueron surgiendo diferentes variaciones en este tipo de procedimiento, una de ellas fue la utilización de **bombas de perfusión** para realizar el enfriamiento, argumentando que, con este procedimiento, se logran **mejores presiones de perfusión a nivel intraparenquimatoso**. El tiempo entre la parada cardíaca y la extracción pueden ser hasta 2-3 horas cuando se utilizan máquinas de perfusión, mientras que cuando se perfunde con gravedad se recomienda que sea de 1 hora. Otra alternativa utilizada ha sido la administración de fentolamina, previa a la infusión de los líquidos de lavado, para producir una mayor relajación vascular y permitir de esta manera una buena perfusión de los órganos con el líquido de preservación (74, 75).

1.3.4.4.3.- Enfriamiento corporal total.

Esté método consiste en el enfriamiento de todo el cuerpo a través de una bomba de circulación extracorpórea. Se describió en un principio para la preservación del corazón y pulmones y a partir de ahí, se empezó a utilizar para el enfriamiento de órganos abdominales (principalmente riñones) en países donde el concepto de muerte cerebral no existía y los donantes a corazón parado eran la única fuente de órganos para trasplantes. El enfriamiento corporal total se realiza con **Ringer lactato y con la propia sangre del paciente**. Esto último permite mantener una buena oxigenación de los órganos mientras se disminuye la temperatura de los mismos. Asimismo, el flujo de la bomba de recirculación que se utiliza es alto, 2000-3000 ml/min., lo que permite que exista una alta perfusión de los órganos, evitando así que se produzca vasoconstricción y que aumente el daño isquémico. El tiempo

aproximado de enfriamiento con este método es de 20 a 30 minutos. En relación al trasplante hepático, ha sido demostrado que este método es superior a las técnicas de lavado in situ (76- 82).

En base a diferentes trabajos experimentales donde se había demostrado que la hemoperfusión de riñones, previo a la isquemia fría, mejoraba la viabilidad de los órganos a transplantar, Hoshino T., demostró en 1994, que la realización de un período de hemoperfusión a 37°C antes del enfriamiento corporal total, era beneficioso en la obtención de hígados en donantes a corazón parado. Por su parte, Tojimbara, en 1995 publicó un trabajo experimental de trasplante hepático en ratas con donantes a corazón parado, donde demostraba que realizando el lavado del hígado con solución de Wisconsin a 37 °C, la lesión por isquemia reperfusión era menor, tanto desde el punto de vista bioquímico como histológico (83- 87).

La realización de un período de hemoperfusión antes del enfriamiento corporal total ha demostrado ser eficaz en la obtención tanto de riñones como hígados para trasplantes, con buenos resultados clínicos (88, 89).

[1.4. Lesión por Isquemia-Reperfusión](#)

El problema principal con el que se enfrenta este tipo de tratamiento es la lesión que se produce tras la isquemia y en el momento de la reperfusión en el injerto hepático, la llamada lesión por isquemia-reperfusión.

El conocimiento de los fenómenos de isquemia-reperfusión es de gran interés en los trasplantes de órganos, ya que están implicados en

los acontecimientos fisiopatológicos de la revascularización del órgano tras la isquemia fría. También existen otras situaciones clínicas frecuentes, como los **traumatismos importantes de extremidades**, para las que en su tratamiento quirúrgico se precisa mantener la extremidad sin flujo sanguíneo, desencadenándose los fenómenos de isquemia-reperusión.

Cada órgano o tejido del organismo tiene una sensibilidad y resistencia distinta para la pérdida total o parcial de su flujo sanguíneo, que varía desde pocos minutos en el caso del cerebro, a horas en el caso de las extremidades. Por otro lado, en las situaciones patológicas donde se disminuye de forma aguda o crónica la perfusión sanguínea de los órganos, aparecen lesiones no sólo en el órgano diana, sino también sistémicas. Por ejemplo, en el caso del **shock hemorrágico**, se puede terminar desarrollando, si la volemia no se restablece adecuadamente, un fallo multiorgánico. Lo mismo puede suceder ante disminuciones del flujo sanguíneo total de un órgano, como es el caso de la **embolia mesentérica**, etc.

1.4.1.- Concepto

La lesión de isquemia-reperusión se define como el proceso que sufre un órgano **sometido temporalmente a la falta de flujo sanguíneo** y que posteriormente es **reperfundido con sangre oxigenada**. El resultado es una **agresión tisular secundaria a la anoxia**, a la privación de metabolitos y al acúmulo de sustancias de desecho del metabolismo, que conduce a una alteración de la función celular, a un edema intersticial y a la muerte de la célula.

Durante el proceso de obtención de un órgano a partir de un donante a corazón parado y su posterior implante en el receptor,

existen etapas en las que se producen diferentes lesiones en el injerto, derivadas las mismas de la falta de irrigación sanguínea de dicho órgano, del almacenamiento en frío del mismo y de su posterior reoxigenación una vez implantado, por lo tanto estudiaremos separadamente lo que ocurre durante estos tres períodos bien diferenciados (90):

- 1- Isquemia caliente: Es el período de tiempo durante el cual el individuo está en **parada cardiorrespiratoria**. Sucede con la interrupción del flujo sanguíneo, pero la temperatura del órgano se mantiene al mismo nivel que tiene habitualmente en el organismo.
- 2- Isquemia fría: Abarca el período desde la entrada de los líquidos de enfriamiento hasta la reperfusión del órgano una vez implantado. Se desarrolla con el órgano fuera del organismo, a una **temperatura de 4° C**, con la finalidad de entretener el metabolismo del órgano al máximo antes de ser implantado.
- 3- Reperfusión: Es cuando el injerto es **reoxigenado** con la sangre del receptor.

El entendimiento de los mecanismos productores de la lesión por isquemia-reperfusión, así como también de los mediadores de dicha lesión es muy importante, debido a que este fenómeno puede llevar a una lesión del injerto de intensidad variable. La misma puede variar desde una lesión leve que provocará una disfunción inicial del injerto,

hasta una lesión importante que puede llevar a una mal función primaria del injerto con pérdida de la viabilidad del mismo.

1.4.2.- Lesiones por isquemia caliente.

Una vez producida la parada cardíaca **se interrumpe el aporte de oxígeno a todos los tejidos del organismo**. Dependiendo del tiempo de la isquemia caliente, las lesiones que se producen podrán ser reversibles o no. Asimismo, esto último también va a depender de la resistencia que tenga el tejido a la hipoxia.

El primer acontecimiento que se presenta durante la isquemia de cualquier órgano es la **transformación del metabolismo celular**, que pasa de ser aerobio a anaerobio, debido a la falta de aporte de oxígeno a la célula. Esto trae aparejado una serie de cambios importantes, tanto en el interior de la célula como a nivel de su membrana plasmática.

En el interior de la célula, debido a la **disminución en la fosforilación oxidativa**, se comienza a **consumir el ATP** existente, siendo éste un mecanismo que utiliza la célula para mantener su homeostasis. El ATP es hidrolizado a ADP y AMP (91). El AMP posteriormente es catabolizado a **hipoxantina**, siendo esta última importante en la lesión por reperfusión. Asimismo se estimula la **glucólisis anaerobia** formándose ácido láctico, lo que produce la disminución del pH intracelular con la consiguiente acidosis intracelular. La deplección de los depósitos de energía celular lleva a un fracaso en la homeostasis celular que simultáneamente llevará a un trastorno en los gradientes transmembrana (92).

En el ámbito de la membrana plasmática se produce una alteración de la actividad de la **bomba Na-K-ATPasa**, que es la

encargada de mantener el equilibrio iónico entre la célula y el espacio intersticial, produciéndose una alteración del transporte de sodio, calcio y potasio. Los iones sodio penetran dentro de la célula, arrastrando así un gran volumen de agua, y los iones potasio salen de la célula para mantener el equilibrio iónico en el espacio intersticial. Ello conduce a la aparición de edema celular y a diferentes alteraciones citoplasmáticas (autólisis de lisosomas, dilatación del retículo endoplasmático), que llevarán inevitablemente a la **muerte de la célula**.

Como consecuencia de los cambios antes citados, se produce también un aumento del calcio intracitoplasmático, que activará diferentes sistemas enzimáticos, que se verán implicados en las repuestas inflamatorias que se producirán más tarde durante la reperfusión.

Tabla 3: Mecanismos patogénicos implicados en la lesión por isquemia.

- ◆ Transformación del metabolismo celular
- ◆ Menor producción de ATP
- ◆ Disminución de la función de la bomba Na^+/K^+
- ◆ Edema celular
- ◆ Aumento del Ca^+ intracelular

Los cambios celulares antes citados, aún pueden ser reversibles si se restablece el aporte de oxígeno a la célula. Si esto último no sucede, comienza la salida de diferentes enzimas al citoplasma lo que provoca la digestión celular. Consecuentemente, empieza la degradación de los fosfolípidos de la membrana celular, lo que conduce inevitablemente a la muerte celular.

1.4.3.- Lesiones por preservación.

La lesión por preservación aparece tras la isquemia fría. La meta primaria de la preservación es mantener la integridad de todos los sistemas celulares. Esto puede ser posible con el almacenamiento del órgano a transplantar a bajas temperaturas (**almacenamiento hipotérmico**) y con el uso de **soluciones de preservación** apropiadas. Es por ello que **todo órgano a transplantar debe ser exanguinado, lavado con alguna solución de preservación y posteriormente preservado a bajas temperaturas (4°C).**

La razón primaria por la cual la hipotermia mantiene viable los órganos preservados es por medio de la disminución del metabolismo celular, es decir, disminuye la velocidad a la cual las enzimas intracelulares degradan los componentes necesarios para la viabilidad del órgano. Este proceso es reversible con la reperfusión del órgano. Queda claro que el **almacenamiento hipotérmico no impide la muerte celular, sino que solamente la retrasa.** Así, la mayoría de los sistemas enzimáticos presentan una disminución de 1,5 a 2 veces su actividad por cada 10 °C que se disminuye la temperatura (56).

Las soluciones de preservación cumplen una función muy importante en lo referente a la preservación de los órganos, ya que su composición electrolítica está ideada para **prevenir el edema que produce la hipotermia y la acidosis intracelular producto de la isquemia.** También las soluciones de preservación tienen que prevenir el edema intersticial que se produce por el uso de las mismas.

Asimismo, el lavado con las soluciones de preservación, tiene la función de lavar el árbol intravascular de células sanguíneas, aglutininas y diferentes factores de la coagulación. La realización de un mal lavado

puede llevar a una disfunción de la microcirculación del órgano, que trae aparejado trastornos de la reperfusión y en la función del mismo.

1.4.4.- Lesiones por reperfusión.

Cuando se produce la llegada de sangre oxigenada al hígado trasplantado, debido a la reperfusión, empiezan a producirse diferentes tipos de fenómenos, los cuales se caracterizan por dañar al órgano trasplantado. Esto es lo que se conoce con el nombre de lesión por reperfusión. Ésta es el resultado de la interacción de sustancias vasoconstrictoras y vasodilatadoras que actúan al nivel de la microcirculación hepática (93-95).

1.4.4.1.- Fundamentos etiopatogénicos.

Durante la reperfusión, proceso imprescindible para la viabilidad del órgano, se produce el **restablecimiento del flujo** sanguíneo y se **recupera el nivel energético** que había disminuido durante la isquemia. También se ponen de manifiesto los efectos de los metabolitos tóxicos, que se habían formado durante la fase previa, que pueden tener repercusión sistémica y local. Al inicio de la reperfusión aparecen una serie de lesiones, que son distintas de las que aparecen a las 4-6 h del inicio de la reperfusión.

A nivel sistémico, aparece una **acidosis metabólica** y una **hipercaliemia** que, si no se compensan, pueden conducir a la muerte del sujeto. Aparecen, además, **mioglobinemia y mioglobinuria**, y en el pulmón se describe un aumento de la permeabilidad microvascular y una acumulación de neutrófilos, pudiéndose desarrollar el denominado edema pulmonar no cardiogénico (**pulmón de distrés**).

A nivel local, en el hígado, durante la reperfusión, aparece el **fenómeno de "no reflujo"**, caracterizado por la imposibilidad de la reperfusión del órgano debido a la obstrucción progresiva en la microcirculación. Aunque no se sabe exactamente su mecanismo de producción, se ha observado que se puede prevenir su aparición con la administración de **agentes fibrinolíticos** durante el inicio de la reperfusión y que, como veremos más adelante, tienen un papel fundamental la adhesión de los leucocitos al endotelio y la activación de éste.

En lo referente al trasplante hepático, se ha demostrado que el principal lugar de impacto de la lesión por isquemia- reperfusión es la microcirculación hepática y, más específicamente, la célula endotelial sinusoidal (96-98).

Existen diferentes mediadores y acontecimientos que han sido fuertemente implicados dentro de la patogenia de la lesión por reperfusión:

1.4.4.2.- Endotelio vascular.

Desempeña un papel muy importante en la lesión por isquemia-reperfusión. Se produce una activación de su superficie endotelial, que conlleva la **secreción de mediadores de la inflamación** que facilitarán posteriormente la penetración de los neutrófilos en el parénquima hepático (99). En su superficie se observan receptores para interleucinas, complemento, etc., mediadores que participan en el desarrollo de la lesión por isquemia-reperfusión. Muchas de estas respuestas del endotelio vascular a la lesión no son exclusivas de la lesión por isquemia-reperfusión, sino que también aparecen en la inflamación (100).

Entre los mediadores que se han implicado en la lesión por isquemia-reperfusión cabe destacar algunas citocinas. La **interleucina 1** y el **factor de necrosis tumoral** activan la célula endotelial para que exprese las moléculas de adhesión, a la vez que activan a los neutrófilos a través de la interleucina 8. Asimismo, también están implicadas en la producción y modulación de los **radicales libres**, ya que éstos disminuyen cuando se administran anticuerpos contra la interleucina 1 (101-103).

La **endotelina 1** es un potente vasoconstrictor local, derivado de las células endoteliales, que regula fisiológicamente la microcirculación de los tejidos. Se ha comprobado que está implicada en los mecanismos de isquemia-reperfusión. La administración de suero antiendotelina 1 disminuye las lesiones por isquemia-reperfusión al mejorar el flujo sanguíneo local (104).

En estudios de isquemia caliente realizados en perros, con diferentes tiempos de isquemia, se ha observado que los valores portales de endotelina son mayores que los sistémicos, y este aumento es más acusado cuanto mayor es el tiempo de isquemia practicado (105).

1.4.4.3.- Calcio.

Es uno de los primeros implicados en la patogenia de la lesión por isquemia-reperfusión. Durante la isquemia aparece inmediatamente un **aumento citosólico del calcio**, activándose diferentes sistemas enzimáticos que, con la reoxigenación del órgano, producirán a su vez una activación de los mediadores de la inflamación (106).

Se han usado distintos bloqueantes de los canales de calcio en modelos experimentales de isquemia caliente. El **verapamilo**, el

nicardipino y el nimodipino sólo protegen de la lesión por isquemia-reperfusión cuando se administran antes de la realización de la misma, implicándose en su mecanismo de acción protectora la activación de proteasas que convierten la xantina deshidrogenasa en xantina oxidasa (107-109). Asimismo, también **mejoran la microcirculación** durante la perfusión, aumentando el flujo tisular hepático durante este periodo (108, 109).

La utilización de estos antagonistas del calcio en estudios de preservación hepática también ha demostrado la mejor funcionalidad hepática del órgano (110-111), aunque otros autores no han encontrado diferencias con respecto al grupo control (112).

El papel del Ca^{2+} , por tanto, está todavía en discusión, y se necesitarán nuevos estudios para definir completamente el papel de este ion en la isquemia-reperfusión hepática.

1.4.4.4.- Neutrófilos.

Están implicados en la lesión por isquemia-reperfusión hepática. Su papel ha quedado demostrado, no sólo por su presencia en las muestras anatomopatológicas tomadas tras este fenómeno, sino también en diferentes tipos de estudios funcionales. Cuando se realiza una neutropenia periférica sanguínea, se observa una disminución del número de neutrófilos en el tejido hepático, asociado a una disminución de la lesión por isquemia-reperfusión (113). En los procesos inflamatorios, la **adhesión de los leucocitos a la célula endotelial** es un requisito necesario e imprescindible para que migren dentro del tejido lesionado.

La migración la realiza a través de las moléculas de adhesión, que se hallan habitualmente en el endotelio vascular del huésped y que son reguladas por el mismo mecanismo de quimiotaxis (114).

La mayoría de las lesiones por reperfusión están mediadas por los neutrófilos que **se fijan al endotelio a través de una glucoproteína adhesiva**, denominada CD 18, que parece ser la señal que necesita el neutrófilo para producir H₂O₂ y proteasas en el espacio extracelular. Esta adhesión está influida por factores plasmáticos, nucleótidos cíclicos, productos de las lipooxigenasas y factores plaquetarios (115). Los neutrófilos se adhieren o bien a nivel precapilar o en las vénulas postcapilares, provocando un **aumento de la viscosidad sanguínea** que podría explicar en parte el fenómeno de "no reflujo" que a veces sucede en la reperfusión (116).

Una vez que los neutrófilos han pasado al tejido hepático, se constituyen en una fuente de mediadores citotóxicos, fosfolipasas, peroxidasas, proteasas y radicales libres. Los neutrófilos migran desde el endotelio hacia los hepatocitos, a través de los sinusoides venosos, por un mecanismo que parece dependiente de las integrinas 1. En el caso de una situación de estrés oxidativo están involucradas, además, las integrinas 2, la Mac-1 en el neutrófilo, y la ICAM-1 en la célula endotelial (117). Los neutrófilos provocan la lesión celular a través de dos mediadores citotóxicos mayores: los compuestos oxígeno reactivos y las proteasas, sobre todo **catepsina y elastasa**, que son las responsables de la **necrosis parenquimatosa**.

Durante la preservación fría del hígado se ha demostrado un aumento de la adherencia leucocitaria al endotelio, que es más elevada cuanto mayor es el tiempo de isquemia fría, lo cual podría estar relacionado con el fallo primario del injerto. La importancia de los mecanismos de adhesión leucocitaria varían según el hígado sea sometido a períodos cortos o prolongados de preservación. En el caso de períodos cortos de preservación en la patogenia de la lesión generada, tienen más importancia los radicales libres y las células de

Kupffer, mientras que en el caso de periodos prolongados, son las proteínas de la superficie celular las que desempeñan un papel más importante (118, 119,120).

Finalmente, debemos reseñar que los leucocitos activados pueden inducir, por la vía del ácido araquidónico, un incremento de **leucotrienos**, que también están implicados en la lesión por isquemia-reperfusión (121).

1.4.4.5.- Activación del complemento.

Durante la isquemia-reperfusión asistimos a la activación del complemento en la superficie endotelial, preferentemente a través de la vía alternativa.

La actividad del complemento es la resultante de la interacción de las proteínas que lo forman, que se encuentran en las membranas celulares y en gran número de proteínas plasmáticas, provocando la opsonización de células fagocíticas y activación de los mecanismos de la inflamación. Cuando se activa localmente, puede inducir la adherencia leucocitaria en el endotelio vascular, diapédesis de los neutrófilos y migración de los mismos a los focos inflamatorios con su posterior descarga de productos citotóxicos y bactericidas (122). Con la deplección del complemento se ha conseguido disminuir el infiltrado leucocitario en la zona de isquemia-reperfusión (123). Estudios experimentales, con inhibidores solubles del complemento (sCR1) y frente a otros elementos del complemento, han demostrado una disminución de las lesiones por isquemia-reperfusión (108, 124-128).

1.4.4.6.- Metales pesados.

Son elementos que también se han implicado en la lesión por isquemia-reperfusión. Contribuyen a la **desintoxicación y catálisis de los radicales libres**.

Sobre todo, el **hierro y el cobre** tienen importancia en la formación de radicales libres, mientras que el selenio es un constituyente de la enzima glutatión peroxidasa, imprescindible para la reducción de los hidroperóxidos lipídicos a su forma análoga. El zinc evita la oxidación de la xantina deshidrogenasa a xantina oxidasa e interactúa con el hierro y el cobre previniendo sus efectos prooxidantes.

Además, el zinc, junto con el cobre, es un cofactor de la superóxido dismutasa (129).

El hierro puede catalizar la degradación de los lipoperóxidos dentro de compuestos carbonilos citosólicos, como aldehídos e hidroxiálcalis, algunos de los cuales, como el malondialdehído, pueden provocar la rotura de la membrana celular e inactivar los sistemas enzimáticos y de transporte. Durante la isquemia, se produce una **acumulación intracelular de hierro** y puede ser utilizado posteriormente para la **formación de radicales libres derivados del oxígeno**. Durante la reperfusión, la administración de **desferroxamina** (quelante del hierro) ejerce un efecto protector sobre la lesión por isquemia-reperfusión en muchos tejidos del organismo, no sólo en el hígado (130).

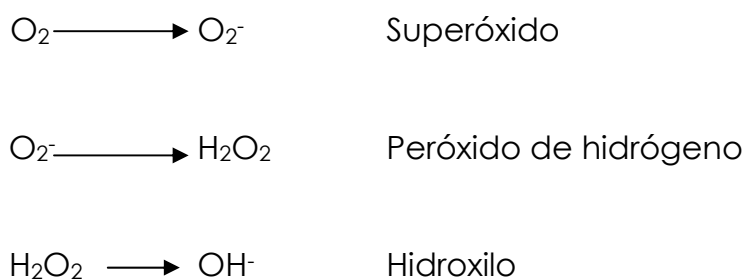
Secuestrando el hierro, en forma de ferritina, se puede disminuir la producción de radicales libres, ya que la formación de OH necesita la presencia de metales como hierro y cobre para su producción (131). Finalmente, algunos autores han demostrado que dietas con sobrecarga de hierro provocan una deplección en los antioxidantes

endógenos y, por tanto, aumento de la tendencia oxidante, ocasionando lesiones moderadas (132).

1.4.4.7.- Radicales libres de oxígeno.

Como hemos hecho referencia anteriormente, la llegada de oxígeno a la célula, después de un período de isquemia, desencadena cambios importantes a nivel celular. Uno de los primeros fenómenos que ocurren es la producción de radicales libres de oxígeno (RLO).

Los RLO son moléculas inestables que tienen uno o varios electrones no apareados en su estructura y han sido implicados en la lesión por isquemia-reperfusión (133, 134). Los radicales libres se producen por la reducción del oxígeno molecular, según el número de electrones de oxígeno que se reducen vamos a tener diferentes tipos de radicales libres. Con la reducción de un electrón tendremos superóxido (O_2^-); con la de dos, peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y con la reducción de tres, radical hidroxilo (OH^-) (135).



Son sustancias que **tienen uno o varios electrones no apareados en su estructura** y han sido ampliamente implicados en la patogenia de la lesión por isquemia-reperfusión (136). Por ser **sustancias inestables**, tienden a producir reacciones en cadena hasta generar compuestos más estables. Durante este proceso se producen compuestos

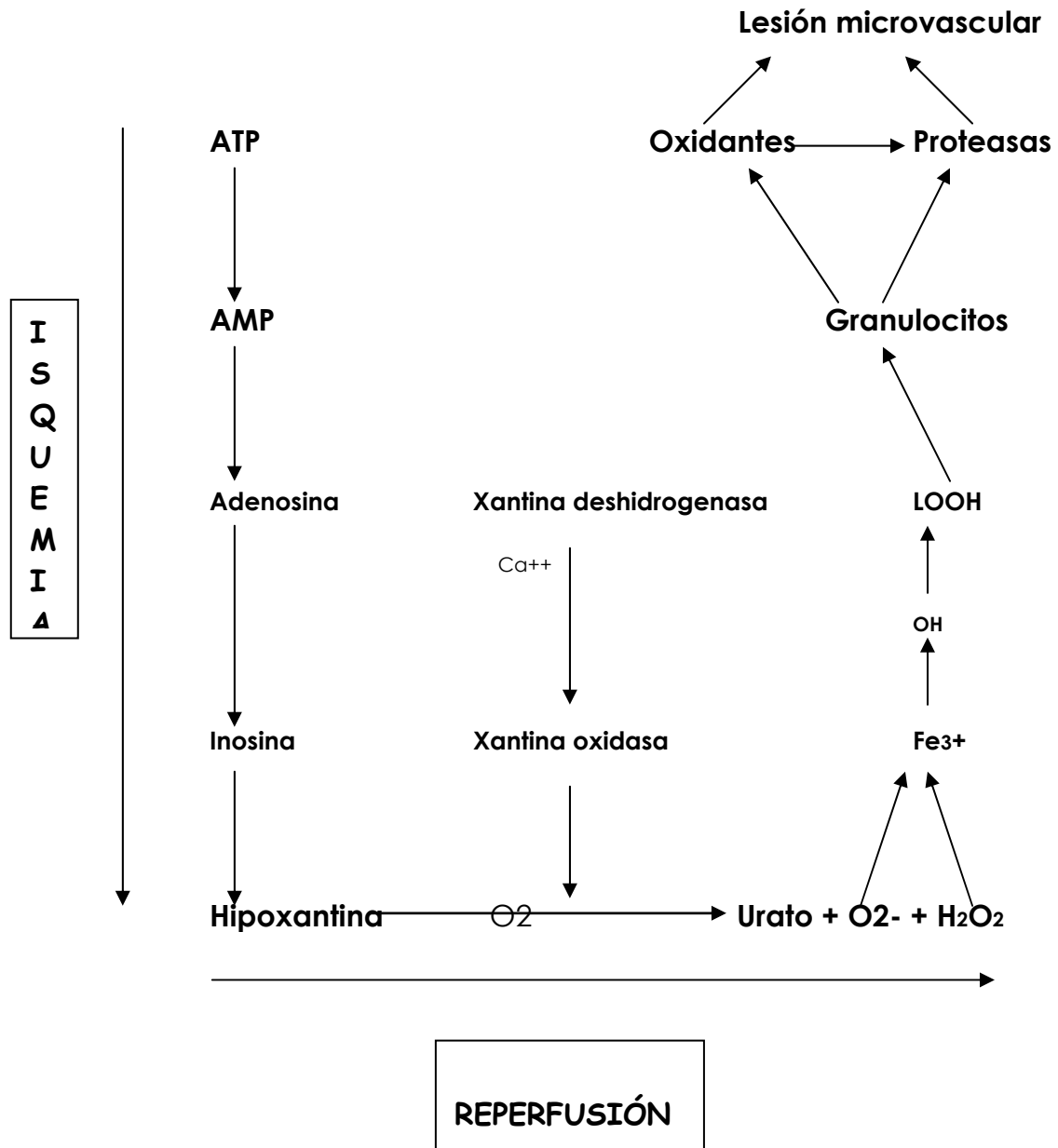
intermedios que pueden o no generar lesiones, dependiendo de los compuestos que alteren o de las reacciones que condicionen.

Los radicales libres se producen de forma fisiológica en el organismo humano en diferentes fuentes: como componentes del sistema de transporte electrónico mitocondrial, en el retículo endoplásmico, durante la síntesis de prostaglandinas y sistemas de las lipooxigenasas, de proteínas y enzimas, y también se producen por autooxidación de numerosos compuestos. De ello se deducen la gran cantidad de relaciones que los radicales libres pueden tener con numerosas situaciones de homeostasis intra y extracelular (137).

En situaciones patológicas de reperfusión, tras una disminución o abolición del flujo sanguíneo, las fuentes de radicales libres más importantes son los siguientes sistemas enzimáticos: **la xantina oxidasa, la oxidasa NADPH de los neutrófilos, la lipoperoxidación, la oxidasa de las catecolaminas y la síntesis de las prostaglandinas.**

1.4.4.7.1.- Complejo enzimático de la xantina-oxidasa.

Figura 8: Complejo enzimático de la xantina oxidasa durante la isquemia-reperfusión.



En el hígado ha sido identificado como una deshidrogenasa tipo D (xantina deshidrogenasa tipo D), dependiente de NAD^+ y una oxidasa dependiente de O_2 (xantina oxidasa tipo O). La oxidación de la deshidrogenasa tipo D es estimulada por NAD^+ con formación de NADP , mientras que la de la deshidrogenasa tipo O no modifica su actividad en presencia del NAD^+ (138). La **xantina oxidasa** es un complejo molibdoflavoproteína que se asume que es una enzima encargada del catabolismo de las purinas en muchos tejidos, y provoca la **oxidación de hipoxantina a xantina y ácido úrico**, con la generación del **radical superóxido**.

En condiciones normales, cerca del 98% de la reducción del oxígeno es catabolizado por el complejo citocromo oxidasa en la mitocondria, produciendo H_2O_2 , que es un compuesto totalmente inocuo, sin la detección de formas intermedias oxígeno reducidas. Según el número de electrones que se reduzcan en el oxígeno molecular, uno, dos o tres, se producen superóxido O_2^- , peróxido de hidrógeno (H_2O_2), o radical hidróxilo OH , respectivamente. El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es citotóxico debido a su moderada capacidad oxidativa, siendo usado comúnmente como antiséptico. El radical hidróxilo es extremadamente reactivo e inestable, y un potente oxidante de radicales libres, produciéndose a partir de una reacción catabolizada por metales, entre el O_2^- y el H_2O_2 . Fisiológicamente provoca un gran daño oxidativo no específico, además de iniciar reacciones radical libre. En cuanto al superóxido, es una sustancia químicamente buena reductora y moderadamente oxidativa, que también puede iniciar reacción radical libre. Puede ser citotóxico en gran número de circunstancias, como son la toxicidad del oxígeno, daño por radiaciones, inflamación mediada por células fagocíticas y la lesión por isquemia (139). Sus concentraciones en los tejidos y sangre se

han utilizado como un parámetro de actividad radical libre. Asimismo, también se ha estudiado qué células dentro de los tejidos son las que lo producen, observándose que los neutrófilos y las células de Kupffer pueden generarlo, no sólo en situaciones de isquemia caliente, sino también durante la preservación fría (140).

Las moléculas radicales libres de oxígeno provocan un daño a las membranas celulares, directamente por la peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados y de los fosfolípidos de la membrana. Este fenómeno es producido preferentemente por el anión superóxido o por el radical hidróxilo, aunque también los radicales peróxido lipídicos e hidróxilos lipídicos poseen actividad oxidante y, por tanto, capacidad de ampliar el efecto lesivo. El daño de la membrana celular puede afectar a su integridad o la de organelas celulares importantes, como lisosomas y mitocondrias, comprometiendo seriamente la función celular.

En el proceso de isquemia-reperfusión, durante el período de revascularización, la enzima **xantina oxidasa es la mayor fuente de radicales superóxido**, los cuales se forman a partir de la hipoxantina, acumulada por la degradación de las moléculas energéticas durante el período de isquemia. La xantina deshidrogenasa tipo O, que es como se encuentra la enzima en los tejidos no lesionados, pasa por una proteasa dependiente del Ca^{2+} a xantina oxidasa O, durante el período de isquemia, la cual, a su vez, en presencia de oxígeno durante la perfusión, transforma la hipoxantina a peróxido de hidrógeno, anión hidrógeno y ácido úrico (136, 141).

Se han descrito dos formas de transformar la xantina deshidrogenasa a xantina oxidasa: una **forma irreversible**, que sucede en la mayoría de los tejidos, por la acción proteolítica existente durante la isquemia, y otra forma de conversión **reversible**, que se halla

precedida por la disminución de glutatión durante la isquemia. Secuencialmente primero sucede la conversión reversible y con posterioridad, la irreversible (142).

La administración de **anticuerpos contra la xantina oxidasa** ha facilitado que se pudiese crear un mapa de su localización, detectándose su presencia en las células endoteliales de muchos tejidos, entre ellos el hígado, corazón, pulmón y riñón, pero no se ha detectado en las células epiteliales de estos órganos, así como tampoco en los leucocitos, linfocitos, macrófagos ni eritrocitos (143, 144).

Actualmente se discute si la transformación de la xantina deshidrogenasa en xantina oxidasa se produce durante el período de isquemia hepática o en los primeros momentos de la reperfusión. Se ha observado que los valores de hipoxantina y xantina aumentan progresivamente con el mayor tiempo de isquemia, mientras que la cantidad de enzima xantina deshidrogenasa más xantina oxidasa permanece constante durante 90 y 120 min de isquemia y en la reperfusión (145). Otros estudios con inhibidores de la xantina oxidasa, como el alopurinol, han demostrado que el estado oxidante durante la reperfusión no es debido únicamente a los radicales superóxido (146). Por otro lado, diversos estudios con las técnicas de quimioluminiscencia han demostrado la producción de radicales libres de oxígeno durante la isquemia-reperfusión en cultivos celulares hepáticos y de células endoteliales (147).

La influencia de los radicales libres en la lesión por isquemia-reperfusión hepática ha quedado patente en diferentes estudios. La administración de scavengers de los radicales libres en diferentes estudios experimentales en perros (148), y en modelos de isquemia caliente hepática en ratas (149), ha demostrado su efecto protector. En un modelo de isquemia intestinal en gatos se observó una disminución

de la lesión hepática y un aumento de la permeabilidad vascular con inhibidores de la xantina oxidasa, comprobándose además que esta enzima es la mayor fuente de radicales libres en el intestino delgado (150).

Un marcador de la lesión en la célula endotelial por radicales libres es la concentración de la **enzima fosforilasa y de los nucleótidos purina**, que se encuentran habitualmente en el citoplasma de la célula endotelial y de la célula de Kupffer. Se ha demostrado que su concentración **aumenta con la isquemia y disminuye durante la reperfusión** (151).

1.4.4.7.2.- Lipoperoxidación.

Otro papel importante de los radicales libres liberados durante la reperfusión es el de iniciar la lipoperoxidación de las membranas celulares, con la consiguiente liberación de sustancias que atraen, activan y promueven la adherencia de polimorfonucleares al endotelio microvascular, aumentando posteriormente la lesión (152). Los neutrófilos activados pueden producir a su vez radicales libres, aumentando en sangre los parámetros de lipoperoxidación como el malondialdehído (153). En el hígado también se ha observado que la administración de anticuerpos frente a los receptores de los neutrófilos Mac-1 disminuye la lesión hepática, acompañada de una reducción del número de neutrófilos, así como de su estado oxidante, con inactivación de los mismos al reducirse la producción espontánea de anión su peróxido (154).

En estudios experimentales de isquemia fría se ha observado que, en ausencia de las células de Kupffer, se produce una disminución en la producción del anión superóxido y liberación del factor de necrosis

tumoral (TNF), con una disminución en la acumulación de polimorfonucleares y menor grado de lesión celular (140).

1.4.4.7.3.- Scavengers.

Los scavengers son agentes que **eliminan directamente los radicales libres de oxígeno**. No sólo disminuyen la producción de hidrolipoperóxidos, sino también la producción de tromboxano A, no modificándose la producción de prostaciclina. Por tanto, posibilitan un posible papel de las prostaglandinas en la lesión por isquemia-reperfusión (155). También se ha demostrado que la administración de PGE1, en el líquido de preservación o en el inmediato postoperatorio, disminuye la producción del anión superóxido y mejora la preservación del injerto y la funcionalidad hepática (156). Por otro lado, la administración de sustancias que aumentan la producción de las prostaglandinas puede disminuir la lesión por isquemia-reperfusión, ya que aumentan los nucleótidos de alta energía (157).

Los radicales libres generan la peroxidación de metabolitos, con lo que el estudio de estos metabolitos y de sus derivados se considera una forma indirecta de valorar la función de los radicales libres (158). El estado antioxidante del organismo se modifica por multitud de causas, entre ellas la lesión por isquemia-reperfusión (159).

Estos productos de la lipoperoxidación desempeñan un papel importante en la lesión oxidativa por generar ella misma reacciones radical libre. Algunos de sus productos de degradación son tóxicos por sí mismos (aldehídos) y generan un aumento de la reducción del sistema de desintoxicación glutatión dependiente y, por tanto, disminuyen las defensas celulares para desintoxicar otras sustancias (160).

Se ha demostrado que la lipoperoxidación de la membrana celular generada por los radicales libres se produce en mayor grado en las células no parenquimatosas que en los hepatocitos (161).

1.4.4.8.- Óxido nítrico.

Un mediador que se ha considerado de suma importancia en la patogenia de la lesión por isquemia-reperfusión es el óxido nítrico (NO) o **factor de relajación endotelial**. Se forma a partir de la L-arginina mediante la acción de la enzima **NO sintetasa**, que es dependiente del NADPH, calcio y calmodulina, inhibiéndose por análogos de la arginina. El NO difunde al espacio muscular liso vascular adyacente, donde se une a la guanilato ciclasa y provoca la relajación del músculo liso. Tiene una vida media muy corta, de segundos, lo que hace que sean difíciles su estudio y determinación analítica (162). En el organismo humano se produce en las arterias y venas, contribuyendo a la **modulación del flujo sanguíneo local**. En el espacio intravascular inhibe la adhesión y agregación plaquetaria, lo que le confiere propiedades útiles para su aplicación clínica (163). Disponemos actualmente de los valores normales plasmáticos para la población adulta (164).

De la enzima óxido nítrico sintetasa se han determinado **tres formas** diferentes: una de ellas inducible y calcio dependiente, que se expresa en condiciones patológicas, y dos isoformas de la enzima constituyente, que son las encargadas de provocar sus efectos en condiciones fisiológicas. Su inhibición provoca un importante descenso de la microcirculación hepática, mientras que su estímulo induce un aumento del flujo microvascular (165). Su síntesis se regula por la concentración de glutatión, importante cofactor para gran número de

sistemas enzimáticos, entre los que se encuentra la óxido nítrico sintetasa inducible.

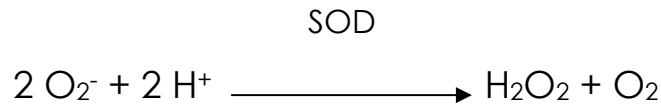
Las acciones del óxido nítrico sobre el organismo pueden ser protectoras o deletéreas, según en qué sistema biológico u órgano estudiado nos encontremos (166). La acción relajante del óxido nítrico se prolonga por la administración de **superóxido dismutasa**, lo que demuestra que su acción está modulada por los radicales libres derivados del oxígeno (167, 168); su acción es inhibida por los radicales superóxido e hidróxilo (169).

En el hígado se ha observado que puede ejercer tanto **acciones prooxidantes como antioxidantes**, siendo considerado por algunos autores como un parámetro de seguimiento de algunas enfermedades hepáticas (166). En estudios in vitro actúa como antioxidante, evitando el efecto oxidativo mediado por el hierro (170). En la lesión por reperusión se ha observado que posee un efecto **favorable sobre la microcirculación y disminuye la extensión de la necrosis hepática** (171). Si se administra antes de la realización de la isquemia hepática, **disminuye la lesión por isquemia-reperusión** (172).

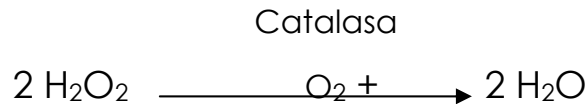
1.4.5.- Mecanismos celulares de defensa.

Los propios tejidos cuentan con diferentes enzimas que intentarán defender a la célula de la agresión, entre las que podemos nombrar la superóxido dismutasa, la catalasa y la glutatión reductasa, cuya principal función es eliminar los radicales libres formados a partir del oxígeno (173, 174).

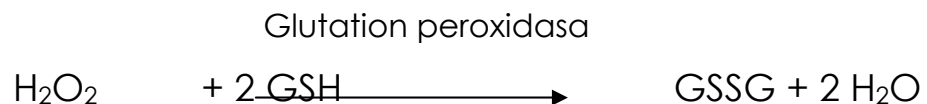
La superóxido dismutasa cataliza la reacción entre dos radicales superóxido, generando peróxido de hidrógeno y O₂.



La catalasa cataliza la conversión de peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno molecular.



Por su parte, la glutatión peroxidasa cataliza la oxidación del glutatión reducido y el peróxido de hidrógeno.



Queda claro que, del balance en la producción de todas estas sustancias dependerá el estado final de la microcirculación y principalmente de las células endoteliales del sinusoides hepático que es el principal blanco de toda la agresión (96, 98, 175, 176).

1.4.5.1.- Antioxidantes. Superóxido dismutasa.

Los antioxidantes son agentes endógenos o exógenos que pueden **prevenir la acción de los radicales libres** derivados del oxígeno y, por tanto, disminuir la lesión mediada por estos radicales. Los antioxidantes pueden actuar bien eliminando directamente los radicales libres, en cuyo caso se les denomina scavengers, o bien bloqueando la generación de éstos o sus efectos deletéreos (130, 177-183).

Existen diferentes clasificaciones de los antioxidantes en la bibliografía. Nosotros vamos a describir la que utiliza como criterio de clasificación el modo de acción.

Los fármacos con capacidad antioxidante se pueden dividir en **cinco grupos fundamentales**: scavengers o eliminadores de los radicales libres, inhibidores de la producción de radicales libres, inhibidores de los neutrófilos, inhibidores de la peroxidación y los condicionantes de la situación oxidativa y energética preisquémica (177, 178) (tabla 4).

Tabla 4: Mecanismos de defensa antioxidantes en la isquemia-reperusión.

| MODO DE ACCIÓN | AGENTE | NIVEL DE ACCIÓN |
|---|---|--|
| Scavenger de los radicales libres | Superóxido dismutasa Catalasa Manitol Albúmina Nafazatrom Histidina Melatonina | Eliminan los distintos radicales libres oxígeno-derivados |
| Inhibidores de la producción de radicales libres | Alopurinol Oxipurinol Ácido fólico Deferroxamina Ceruloplasmina | Inhiben los distintos sistemas enzimáticos productores de radicales libres |
| Inhibidores de los neutrófilos | Anticuerpos monoclonales Antagonistas del PAF Antiproteasas | Modulan la producción del anión superóxido |
| Inhibidores de la lipoperoxidación | Vitamina E Propranolol Captopril Bloqueadores de los canales de calcio Nafazotrom | Disminuyen la lipoperoxidación de las membranas celulares |
| Condiciones antes de la preisquemia | N-acetilcisteína Glutatión Ebselen Oltipraz Adenosina | Aumentan la actividad antioxidante endógena |

En la literatura científica se han descrito numerosas sustancias con efecto antioxidante, eficaces para la prevención de la lesión por isquemia-reperfusión (148 bis).

Gran parte de las mismas han demostrado su efecto protector en diferentes estudios experimentales de isquemia-reperfusión hepática (149-151, 182, 183).

La superóxido dismutasa (SOD) es el scavenger o eliminador de los radicales libres superóxido más conocido. De forma fisiológica, su acción, en el metabolismo hepático, es la de formar peróxido de hidrógeno a partir de la xantina y el anión superóxido.

Su administración de forma exógena tiene la limitación de su **corta vida media**, aunque se dispone de formas comercializadas que alcanzan una vida media de hasta 4-6 h.

La administración de SOD mejora la lesión por isquemia-reperfusión en diferentes modelos experimentales (184). Se ha descrito un aumento de la producción de bilis y disminución de transaminasas (185). Esta mejoría es mayor cuando se administra previa a la isquemia, ya que disminuye el grado de necrosis anatomopatológica.

Durante la isquemia hepática disminuyen las concentraciones de SOD junto al incremento de las concentraciones de hipoxantina y xantina, mientras que en la postisquemia predomina el descenso de las concentraciones de ATP (145). Esto explica que la administración exógena de SOD antes de la isquemia mejore la funcionalidad hepática (187). Se ha demostrado que la administración de SOD también disminuye la formación de radicales libres durante la reperfusión y, por tanto, mejora la lesión por reperfusión (184-188). Por otro lado, en modelos de hepatectomía parcial en ratas, su administración disminuye la lipoperoxidación y favorece la regeneración hepática (187).

1.5.- Sustancias citoprotectoras

Con el objetivo de mejorar la viabilidad del injerto hepático, diferentes trabajos han demostrado el efecto protector de algunas sustancias sobre la lesión por isquemia-reperfusión, administradas durante el periodo de recirculación normotérmica:

1.5.1.- Glicina.

La glicina es el **aminoácido carboxiterminal** de la molécula de glutatión. Ha demostrado su efecto protector sobre la lesión por isquemia fría, inhibiendo la degradación proteolítica que contribuye a la lesión durante la preservación hepática. También tiene efecto estabilizante de la membrana plasmática, reduciendo su permeabilidad. La infusión de glicina en la reperfusión disminuye los niveles sanguíneos de LDH y transaminasas.

Se trata de un aminoácido no esencial que ha demostrado un efecto protector contra la hipoxia, la isquemia y minimiza la acción de varias sustancias citotóxicas sobre los túbulos renales y los hepatocitos. También minimiza el daño hepático después de la exposición crónica al alcohol.

La glicina mejora la supervivencia después de un estado de shock séptico mediado por endotoxinas. Tiene un efecto protector sobre varios tipos de células u órganos. El shock endotóxico conduce al fallo multiorgánico y a la coagulación intravascular diseminada, y el TNF-alfa es conocido por causar muchos de los síntomas observados en el shock séptico. La glicina es capaz de **suprimir los niveles de TNF-alfa** segregado por los macrófagos, en un modelo experimental en la rata (189).

El síndrome del distrés respiratorio del adulto (ARDS) también constituye una manifestación del shock endotóxico. La glicina ha demostrado en este sentido, **proteger al pulmón del edema**, pudiendo explicar así la mayor supervivencia en la rata tras la infusión de glicina en el shock séptico. La glicina reduce la síntesis de mediadores químicos, incluyendo el TNF-alfa, minimizando así la lesión pulmonar y mejorando la supervivencia.

Es bien conocido que las endotoxinas producen daño hepático, especialmente durante las hepatectomías parciales, tras la administración de tetracloruro de carbono, o el tratamiento con galactosamina. La activación de las células de Kupffer produce daño hepático a través de la liberación de citocinas, eicosanoides, óxido nítrico y radicales libres. La elevación en suero de las transaminasas, la necrosis hepática masiva y la infiltración hepática por los neutrófilos queda suprimida tras la administración de glicina en un modelo experimental en la rata. Una posible explicación para este efecto de la glicina es la **reducida respuesta de las células de Kupffer ante los lipopolisacáridos**. La glicina también es capaz de mejorar la microcirculación hepática. Esta **mejoría de la microcirculación hepática** podría explicar en parte el efecto beneficioso de la glicina sobre la lesión por isquemia-reperfusión. Las células de Kupffer producen mediadores químicos con propiedades vasoactivas y ése sería el punto donde actuaría la glicina a nivel de la microcirculación: inhibiendo la producción de dichas sustancias vasoactivas.

La lesión por isquemia-reperfusión en el hígado es un importante problema después de la cirugía hepática. Además, el daño hepático a veces es consecuencia del fallo cardíaco, trombosis, o enfermedad venooclusiva hepática. Bajo estas condiciones, unas bajas dosis de endotoxina son capaces de exacerbar el daño hepático y pulmonar. Es

bien conocido que la lesión por isquemia-reperfusión aumenta la sensibilidad de las células de Kupffer a los lipopolisacáridos. La adición de glicina en el líquido de preservación mejora la supervivencia de la rata tras el trasplante hepático.

Aunque el efecto de la glicina no está totalmente estudiado, parece ser que su mecanismo de acción se basa principalmente en la supresión de la activación de las células de Kupffer. La glicina puede también ser de utilidad en casos de traumatismo y en cirugía mayor, en donde la endotoxina puede tener efectos nocivos.

Estudios previos han demostrado que las células de Kupffer contienen canales de calcio voltaje-dependientes (190) y que los incrementos de calcio son esenciales para la liberación de prostanoïdes y citoquinas inflamatorias en respuesta al estímulo de los lipopolisacáridos. Los bloqueadores de los canales de calcio previenen de la lesión por isquemia-reperfusión y mejoran la supervivencia en un modelo experimental de trasplante hepático en la rata.

El efecto protector de la glicina contra los lipopolisacáridos es debido, en gran parte, a la **prevención de la elevación de calcio en las células de Kupffer**, involucradas en la liberación de mediadores químicos (**TNF-alfa y eicosanoides**).

La glicina ha demostrado proteger de la lesión por isquemia-reperfusión **estabilizando la membrana celular defendiéndola del ataque de los radicales libres** (191-192). También mejora la microcirculación actuando sobre las células de Kupffer, que se activan durante la isquemia-reperfusión; la glicina puede prevenir la activación de dichas células (193).

La glicina inhibe las proteasas dependientes del calcio no lisosomales y esta acción es responsable de la protección de los hepatocitos contra la anoxia (194). La proteólisis contribuye a la lesión

asociada al trasplante hepático y los inhibidores de las proteasas mejoran la función del injerto (195).

La glicina también bloquea el nivel de calcio intracelular disminuyendo la activación de las células de Kupffer y de las proteasas dependientes del calcio (196, 197).

Okazi demostró que la glicina puede proteger contra la lesión por reperfusión reduciendo la peroxidación lipídica, en un proceso independiente del aumento de glutatión en el tejido hepático (198). Otros autores han descrito que la glicina estabiliza la membrana inhibiendo la fosfolipasa A2, que al liberar ácido araquidónico, estimula la producción de eicosanoides vasoconstrictores (199).

En resumen, durante la isquemia-reperfusión las células de Kupffer se activan y éstas son la principal fuente de eicosanoides en el hígado, por lo tanto, el bloqueo de su activación evitando el aumento de calcio intracelular, disminuiría la producción de eicosanoides y ello repercutiría favorablemente en la microcirculación, evitando la vasoconstricción. Este efecto hemodinámico de la glicina sería independiente del óxido nítrico, tal y como sugirió Schemmer y cols. (197), pues la administración de glicina no sólo no incrementa la producción de NO por las células de Kupffer, sino que incluso la disminuye.

[1.5.2.- Arginina.](#)

La L-Arginina es el sustrato de la NO sintasa que produce óxido nítrico, potente vasodilatador por su efecto relajante sobre la musculatura lisa vascular, mejorando así la microcirculación hepática. El óxido nítrico modula las interacciones adhesivas entre leucocitos, plaquetas y célula endotelial. Inhibe la adhesión de los neutrófilos al

endotelio del sinusoides hepático y la expresión de las moléculas de adhesión P-selectina, E-selectina, ICAM-1 y VCAM.

La lesión por isquemia-reperfusión se trata de un proceso complejo en donde se encuentran implicados diferentes mecanismos fisiopatológicos, como la función de la microcirculación, la adhesión leucocitaria y agregación plaquetaria, la producción de radicales libres, lipoperoxidación e hipoxia (200-202, 208). La actividad reducida del óxido nítrico podría estar implicada en la patogenia de la isquemia-reperfusión. Como consecuencia de la lesión sobre las células endoteliales y la poca disponibilidad de arginina debida al aumento de la liberación de arginasa por el hígado, la producción de NO podría encontrarse disminuida(203). Se ha demostrado que la inhibición del NO empeora la lesión por isquemia-reperfusión (204, 205, 208). Incluso la arginina tiene un efecto protector sobre la lesión por isquemia-reperfusión (206).

En el caso del trasplante hepático, la administración de arginina en el receptor durante la reperfusión es capaz de aumentar el flujo sanguíneo portal (207) y el flujo tisular hepático (201, 206). El NO es un potente vasodilatador a nivel arterial y portal, inhibiendo la adhesión leucocitaria y la agregación plaquetaria y puede actuar neutralizando los radicales superóxido (208).

El daño hepático después de la isquemia-reperfusión hepática es un proceso complejo que incluye muchos mecanismos fisiopatológicos: función de la microcirculación, adhesión leucocitaria, agregación plaquetaria, producción incrementada de radicales libres de oxígeno, lipoperoxidación e hipoxia (201, 202, 208, 209). La actividad reducida del óxido nítrico puede estar involucrada en la patogénesis de la lesión por isquemia-reperfusión debido al **daño de la célula endotelial y a la escasa disponibilidad de L-arginina secundaria a la gran cantidad de**

arginasa liberada por el hígado isquémico (203). La inhibición del óxido nítrico agrava la lesión por isquemia-reperfusión (204, 205, 210, 211). La administración de L-arginina mejora la lesión por isquemia-reperfusión en varios modelos puros de isquemia-reperfusión (206, 212). Se ha visto que la L-arginina administrada en el receptor produce un incremento en el flujo venoso portal (207) y en el flujo sanguíneo hepático total (201, 206, 208). Finalmente, el NO es conocido por ser un **potente vasodilatador portal y arterial**, inhibe la adhesión leucocitaria, y puede actuar como un **scavenger del radical superóxido citotóxico** (208).

En un estudio realizado por Valero et al. (213) se demuestra cómo la utilización de L-arginina exógena reduce considerablemente el daño hepático después del trasplante hepático a partir de donante a corazón parado en un modelo experimental en el cerdo. La administración de L-arginina se asoció a una considerable disminución de la necrosis celular hepática y del daño en el tracto biliar hepático. El mecanismo más probable que produce estos efectos beneficiosos sea una mejoría funcional a nivel de la microcirculación y un incremento del flujo hepático.

1.5.3.- S-Adenosil metionina.

Es un **precursor del glutathion intracelular** que contribuye a aumentar los niveles de este tripéptido con función antioxidante, que neutraliza los radicales libres generados durante la isquemia-reperfusión, responsables de la lipoperoxidación de las membranas y, por tanto, del daño celular. Asimismo, el SAME ha demostrado el efecto **vasodilatador**, función atribuida a la adenosina que se genera como metabolito secundario en la vía de síntesis de la cisteína, que acabará formando parte del glutathion.

Dado que uno de los elementos implicados en la lesión por isquemia-reperfusión es la producción de radical superóxido, diferentes tratamientos basados en la administración de antioxidantes han demostrado proteger parcialmente de esta lesión (214, 215, 216, 217). El SAME ha sido uno de los compuestos utilizados con esta finalidad, ya que es capaz de incrementar los niveles hepáticos de glutatión, que es uno de los antioxidantes más importantes en el hígado (218, 219).

Durante el metabolismo del SAME, no sólo se incrementa la cisteína, y como consecuencia el glutatión, sino que también se genera adenosina gracias a la actividad de la enzima S-adenosil homocisteína hidrolasa. Por lo tanto, la administración de SAME sería una fuente exógena de un **potente antioxidante y de adenosina** que podría ejercer algún efecto adicional a través de otros mecanismos.

El efecto hemodinámico del SAME podría estar mediado por un aumento de adenosina, y más concretamente estaría mediado por el NO, como ha sido sugerido por otros autores (205).

En relación al efecto vasoactivo del SAME algunos investigadores han demostrado su efecto inhibiendo directamente la agregación plaquetaria (220), la capacidad de incrementar la producción vascular de prostaciclina (221), y el papel protector contrarrestando el efecto vasoactivo del leucotrieno D4 (222).

El SAME es sintetizado fisiológicamente a partir de metionina y adenosintrifosfato (ATP) por la **SAME sintetasa**. Este compuesto está involucrado en las reacciones de transmetilación, restableciendo la fluidez de la membrana plasmática del hepatocito y en las reacciones de transulfuración, aumentando la cisteína y el glutatión, que incrementan la capacidad antioxidante del hepatocito. Por otro lado, la adenosina generada a partir del SAME en el proceso de biosíntesis de cisteína podría proporcionar un efecto de protección.

Es bien conocido que el **precondicionamiento hepático** mediante breves períodos de isquemia-reperfusión hepática antes de un período prolongado de isquemia está mediado por un **incremento de los niveles de adenosina** (205). Como consecuencia, la adenosina interacciona con los receptores A₂ e induce la producción de NO, que protege contra la lesión por isquemia-reperfusión. No obstante, tras prolongar el período de isquemia más allá de 15 minutos, la degradación del ATP precede a la acumulación de xantina y la producción del radical superóxido a través del sistema de la xantina oxidasa. Bajo estas condiciones, los radicales superóxido reaccionan con el NO, generando radicales de peroxinitrito, y el efecto pernicioso de la xantina predomina sobre el efecto beneficioso de la adenosina (223). Estos estudios sugieren que aumentando la adenosina y disminuyendo la xantina podrían protegerse las células de la lesión por isquemia-reperfusión.

El SAME ha demostrado **aumentar el pool de glutatión hepatocitario**, el antioxidante más potente del hígado (219). Sin embargo, en el metabolismo del SAME no sólo aumenta la cisteína, y como consecuencia el glutatión, sino que también se genera adenosina a través de la actividad de la S-adenosil homocisteína hidrolasa. Como consecuencia, el SAME es una **fuentes exógena de adenosina** que podría producir efectos beneficiosos a través de otros mecanismos.

Net et al. demuestran en un estudio experimental de trasplante hepático en el cerdo a partir de donante a corazón parado, que tras 40 minutos de isquemia caliente, la degradación del ATP produce una mayor cantidad de xantina que de adenosina, y como consecuencia, el ratio adenosina/xantina disminuye drásticamente. Sin embargo, la administración de SAME facilita el incremento de este ratio durante la recirculación normotérmica. De acuerdo con nuestros estudios previos,

que demuestran que los niveles elevados de xantina después de la recirculación normotérmica se correlacionan significativamente con una escasa viabilidad del injerto hepático (224), los bajos niveles de xantina también contribuyen a reducir el daño hepático. Dunne et al. han demostrado que el SAME proporciona su protección contra la lesión por isquemia-reperfusión a través de la interacción con los purinoreceptores en hígados aislados de rata, produciendo un efecto vasoactivo (225). Además, en el estudio de Dunne, la inhibición de la NO sintetasa mediante la N-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) reduce el elevado flujo sanguíneo alcanzado después del tratamiento con SAME, sugiriendo que el SAME puede actuar, en parte, mediante la activación de la producción de NO. Además, los niveles elevados de adenosina durante la recirculación normotérmica en los hígados tratados sugerido por otros autores (226), y podría producir un efecto con SAME podría inducir la síntesis de NO, como ha sido hemodinámico beneficioso.

En este contexto, para mejorar la calidad del injerto, los disturbios de la microcirculación que aparecen durante la isquemia-reperfusión, han sido corregidos en diversos estudios mediante el **incremento en la producción de NO**, el cual tiene un efecto vasodilatador tanto arterial como portal (208). Después de la administración de SAME, los flujos sanguíneos hepáticos y de bomba incrementaron durante la RN, indicando una **mejor perfusión hepática** durante la obtención del órgano. Nosotros hemos demostrado previamente que la L-arginina, un dador de NO, administrado durante la RN, demostró un efecto similar (213), indicando que el NO podría estar implicado en el mecanismo de acción del SAME. Se ha sugerido que el efecto del SAME puede estar parcialmente relacionado con el incremento del balance adenosina/xantina.

Al mejorar las condiciones de la RN mediante la administración de SAME conduce a una menor lesión endotelial y hepatocitaria, preservando la viabilidad celular. La acción del SAME también permite la resíntesis de ATP durante la RN, como es de esperar durante la presencia de adenosina y oxígeno, y también aumenta la carga energética al final de la obtención del órgano. Este incremento de la carga energética es un dato importante de cara a mejorar la viabilidad del injerto hepático (227).

La muerte del tejido hepático después de la isquemia-reperfusión no ocurre sólo por necrosis, sino por muerte celular programada, o apoptosis. El SAME reduce la necrosis hepática después del trasplante y previene la necrosis del tracto biliar, lo que provoca la muerte precoz de los animales, lo cual ha sido también observado en varios modelos experimentales en la rata (225, 211). Net et al. demuestran la evidencia de que existe apoptosis sólo 1 hora después de la reperusión, mientras que la necrosis aparece a los 5 días del trasplante. Las moléculas mediadoras de la apoptosis se conoce que se activan precozmente tras la isquemia-reperfusión, causando **apoptosis precedente a la necrosis** (230). La prevención de la apoptosis mediada por SAME puede estar relacionada con los receptores A2 o con la producción de NO (228, 229). El SAME también reduce los niveles hepáticos de xantina, otro mecanismo que podría estar implicado en la disminución de la apoptosis. El **precondicionamiento isquémico**, mediado en parte por los **niveles altos de adenosina y bajos de xantina y NO**, reduce la apoptosis (230).

1.6.- Justificación de la tesis.

Durante las dos décadas transcurridas desde que en 1963 Starzl lograra el primer trasplante ortotópico de hígado (1) se han sucedido numerosas investigaciones clínicas, técnicas e inmunológicas hasta que en 1983, el Instituto Nacional de la Salud (National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement) de los Estados Unidos de Norteamérica considerara que el trasplante hepático ya no era un tratamiento en fase experimental, sino que se había convertido en una modalidad terapéutica para aquellos pacientes que presentaran una enfermedad hepática en fase terminal.

Actualmente existe un **incremento en las indicaciones del trasplante hepático mientras que el número de donaciones se mantiene constante**. Si además se tiene en cuenta que no todos los órganos son aptos para el trasplante, cabría plantearse nuevas alternativas para la obtención de órganos. Una de ellas es la obtención de órganos a partir de donantes en parada cardíaca, lo cual podría incrementar el número de donantes hasta un 20% más. La obtención de órganos para trasplante a partir de donantes a corazón parado continúa siendo en la actualidad un **reto importante en medicina**. La situación actual nos permite obtener riñones en buenas condiciones para trasplante y es una situación contemplada de forma habitual en la práctica clínica. No ocurre lo mismo en lo que se refiere al hígado. El desconocimiento de la calidad del injerto potencial no permite su utilización de forma sistemática a pesar de que pudiera cumplir los requisitos para mantener las funciones hepáticas de forma inmediata. El equipo de trasplante hepático del Hospital Clínic de Barcelona ha demostrado a lo largo de los últimos años que la inclusión después de la parada cardíaca de un periodo al que denominamos **“recirculación normotérmica”** (circulación

extracorpórea mediante la utilización de by-pass cardiopulmonar y oxigenación tisular antes del enfriamiento corporal total, con la obtención de los órganos para trasplante) tiene un efecto beneficioso sobre la lesión isquémica ya producida y es capaz de revertir o evitar de forma completa o parcial las lesiones a nivel del hígado, de tal forma que lo hace viable para trasplante. Esta capacidad de evitar o revertir las lesiones producidas después de la parada cardíaca es limitada y está en relación con el tiempo de isquemia caliente. Sin embargo, la utilización durante este periodo de Recirculación Normotérmica de diferentes sustancias, que se han mostrado capaces en estudios previos de reducir la lesión por isquemia-reperfusión, ha permitido en estudios posteriores comprobar que este periodo de isquemia caliente puede aumentar de forma ostensible hasta los 40 minutos sin perjudicar de forma significativa la supervivencia tanto a corto (preservación de la función hepatocelular) como a largo plazo (conservación de la indemnidad de la vía biliar, especialmente sensible a los períodos de isquemia).

Desde el punto de vista objetivo, la Recirculación Normotérmica tiene un **efecto beneficioso sobre la viabilidad del injerto**. Sin embargo, se desconoce cuáles son los parámetros de circulación extracorpórea (tiempo, flujos, sistema de cebado...) más eficaces, puesto que tanto el tiempo como las características establecidas en su día por nuestro grupo fueron determinadas de forma absolutamente arbitrarias. Se desconocen las condiciones óptimas que se pueden conseguir con la manipulación farmacológica para mejorar la perfusión del injerto. Nuestro grupo investigador ha comprobado diversas hipótesis:

1.- En un estudio experimental con cerdos y donante a corazón parado se ha visto que produciendo tiempos de isquemia caliente de 20, 30 y 40 min y añadiendo un periodo de recirculación a 37° y

oxigenación durante 30 minutos, es posible obtener hígados viables, y que **la supervivencia del injerto a los cinco días se relaciona de forma inversamente proporcional con el tiempo de isquemia caliente** (100, 70 y 50% respectivamente). Asimismo, se ha observado que el grupo en el que no se ha utilizado el periodo de recirculación a 37°C, la supervivencia del injerto ha sido nula. Ello demuestra que la utilización de circulación extracorpórea a 37° y oxigenación tisular es capaz de **revertir la lesión por isquemia-reperfusión** que sucede después de la parada cardíaca y que se traduce en lesión hepatocitaria y sinusoidal, evidenciadas indirectamente por la elevación plasmática de las transaminasas y el ácido hialurónico, y directamente por la lesión histológica en la que se observan lesiones por isquemia e infiltrado sinusoidal. Mediante el periodo de recirculación se consigue que al quinto día post-trasplante se normalicen las transaminasas, el ácido hialurónico y las lesiones histológicas.

2.- Siguiendo la misma línea de estudio experimental con cerdos y donante a corazón parado con tiempos de isquemia caliente de 20, 30 y 40 min y recirculación con oxigenación a 37°C, y posterior enfriamiento mediante la bomba de by-pass cardiopulmonar, se ha evaluado el **flujo sanguíneo hepático y el cociente de extracción de oxígeno como predictores de la viabilidad del injerto**. En este caso se ha observado que los flujos sanguíneos elevados de bomba, vena porta y arteria hepática se correlacionan positivamente con la supervivencia del injerto, obteniéndose el mayor flujo de bomba en aquellos donantes con menor tiempo de isquemia caliente. Aunque el cociente de extracción de oxígeno aumenta durante la recirculación respecto al valor basal, la supervivencia aumenta en aquellos hígados con cocientes de extracción de oxígeno más bajos.

3.-Igualmente se ha podido observar que tras periodos de isquemia caliente superiores a 30 minutos las lesiones que se producen comprometen la viabilidad del injerto, sobre todo por **necrosis de la vía biliar**, disminuyendo la supervivencia hasta un 50% en el grupo sometido a 40 minutos de isquemia caliente. Con el objetivo de mejorar dicha viabilidad, diferentes trabajos han demostrado el efecto protector de algunas sustancias sobre la lesión por isquemia-reperfusión, administradas durante el periodo de recirculación normotérmica:

Glicina : La glicina es el aminoácido carboxiterminal de la molécula de glutatión. Ha demostrado su efecto protector sobre la lesión por isquemia fría, inhibiendo la degradación proteolítica que contribuye a la lesión durante la preservación hepática. También tiene efecto estabilizante de la membrana plasmática reduciendo su permeabilidad. La infusión de glicina en la reperfusión, disminuye los niveles sanguíneos de LDH y transaminasas.

L-Arginina: La L-Arginina es el sustrato de la NO sintasa que produce Oxido Nítrico (NO) que es un potente vasodilatador por su efecto relajante sobre la musculatura lisa vascular, mejorando así la microcirculación hepática. El óxido nítrico modula las interacciones adhesivas entre leucocitos, plaquetas y célula endotelial. Inhibe la adhesión de los neutrófilos al endotelio del sinusoides hepático y la expresión de las moléculas de adhesión P-selectina, E-selectina, ICAM-1 y VCAM.

S-Adenosilmetionina (SAdMe) : Es un precursor del glutatión intracelular que contribuye a aumentar los niveles de este tripéptido con función antioxidante que neutraliza los radicales libres generados durante la isquemia-reperfusión responsables de la lipoperoxidación de las membranas y por tanto del daño celular. Asimismo, el SAdMe ha demostrado el efecto vasodilatador, función atribuida a la adenosina

que se genera como metabolito secundario en la vía de síntesis de la cisteína que acabará formando parte del glutathion.

Los resultados obtenidos por nuestro equipo investigador con la administración separada de cada uno de dichos compuestos después de 40 minutos de parada cardíaca, ha demostrado su efecto beneficioso sobre la lesión por isquemia-reperfusión sobre la célula endotelial y el hepatocito, y sobre la viabilidad del injerto, **aumentando la supervivencia hasta un 80%**. El efecto beneficioso demostrado por estas sustancias una vez producida la lesión isquémica sugiere la posibilidad de **condicionar el injerto potencial** durante la obtención del órgano. Es posible que la manipulación mediante la acción conjunta de estos tres agentes, que actúan mediante distintos mecanismos, tenga un **efecto aditivo o aditivo** mejorando los marcadores de lesión, tanto sinusoidales como hepáticos, así como la viabilidad del injerto.

La experiencia obtenida nos permite establecer que tanto las transaminasas (ASAT), como la alfa-GST, el ácido hialurónico y el estudio histológico son unos buenos parámetros en la evaluación de la lesión de isquemia-reperfusión. Sin embargo, a raíz de la gran eficacia de la L-arginina y su probable acción a través de la producción de óxido nítrico (NO) nos plantea la necesidad de determinar parámetros que se relacionen con la producción de NO, como son, nitritos y nitratos a nivel de la vena hepática, así como los niveles de AMPc en tejido hepático. Como quiera que se trata de un modelo de recirculación, interesa también estudiar el grado de indemnidad-preservación de la célula endotelial hepática. Es por ello, que también creemos importante el estudio por microscopía electrónica de la apoptosis celular.

Por todo ello, esta tesis pretende estudiar el efecto aditivo de distintas sustancias citoprotectoras, que por separado ya han demostrado su eficacia sobre la lesión por isquemia-reperfusión.

2- HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

Desde el punto de vista objetivo, el efecto beneficioso demostrado por sustancias capaces de proteger el injerto de la lesión por isquemia-reperfusión (L-arginina, SAME, glicina) una vez producida la lesión isquémica sugiere la posibilidad de condicionar el injerto potencial durante la obtención del órgano.

¿SE PODRÍA MEJORAR LA VIABILIDAD DEL INJERTO OBTENIDO DE DONANTES A CORAZÓN PARADO MEDIANTE LA ADMINISTRACIÓN COMBINADA DE DISTINTAS SUSTANCIAS CITOPROTECTORAS DEL INJERTO HEPÁTICO?

OBJETIVOS:

Una vez demostrada la necesidad de la recirculación normotérmica para conseguir la viabilidad del injerto procedente de donante a corazón parado, nos planteamos los siguientes objetivos:

- 1.-Evaluar si el **flujo sanguíneo hepático** y la **extracción hepática de oxígeno** durante la recirculación normotérmica pueden influir sobre la **viabilidad del injerto**.
- 2.- Evaluar si el empleo conjunto de **sustancias protectoras** de la lesión por isquemia-reperfusión, tienen **acción aditiva** sobre la recuperación de la **carga energética** y el **acúmulo de purinas** en tejido hepático, después de 60 minutos de isquemia caliente.

3.- Evaluar si el empleo conjunto de **sustancias protectoras** de la lesión por isquemia-reperfusión tienen **acción aditiva** sobre la **preservación de la célula endotelial y del hepatocito**.

4.- Evaluar si el empleo conjunto de **sustancias protectoras** de la lesión por isquemia-reperfusión tienen **acción aditiva** sobre la **protección de la necrosis de la vía biliar**.

3-MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Sujetos de estudio y definición de los grupos (grupo control y grupos de estudio).

Utilizamos como sujetos de estudio 40 pares de cerdos "large white" (donante y receptor) de un peso aproximado entre 25 y 30 Kg. El diseño del estudio consistió en realizar un trasplante hepático a partir de donante obtenido tras 60 minutos de paro cardíaco (periodo de isquemia caliente), el cual fue sometido a diferentes condiciones de manipulación de sustancias según la siguiente distribución aleatoria randomizada:

Grupo 1 (n=8) o grupo control:

Periodo de isquemia caliente de **60 minutos**, intercalando un periodo de **circulación extracorpórea a 37°C durante 30 minutos**, con flujo de bomba variable, en función del retorno venoso, sin adición de volemia ni drogas, seguido de recirculación con hipotermia rápida con el mismo tipo de flujo.

Grupos de estudio:

Dado que en nuestra experiencia previa, la utilización de las tres sustancias de estudio, tras un periodo de isquemia caliente de 40 minutos, permitió una supervivencia del 80%, y que la L-arginina fue la sustancia que mostró una mayor eficacia, ello hizo necesario aumentar el periodo de parada cardíaca a 60 minutos e incluir la L-arginina sistemáticamente en todos los grupos de estudio.

Grupo 2 (n=8):

Periodo de isquemia caliente de **60 minutos**, con **circulación extracorpórea a 37°C durante 30 minutos**, con el mismo flujo de bomba, añadiendo la administración de **L-arginina** en los siguientes tiempos y dosis:

L-arginina: 400 mg/Kg de peso en bolus al inicio de la recirculación normotérmica (RN) y la misma dosis al inicio de la reperusión del injerto en el receptor.

Grupo 3 (n=8):

Periodo de isquemia caliente de **60 minutos**, con **circulación extracorpórea a 37°C durante 30 minutos**, con el mismo flujo de bomba, añadiendo la administración de **L-arginina y glicina** en los siguientes tiempos y dosis:

L-arginina: 400 mg/Kg de peso en bolus al inicio de la recirculación normotérmica (RN) y la misma dosis al inicio de la reperusión del injerto en el receptor.

Glicina: infusión de 150 mg de glicina diluida en 500 ml de Ringer lactato (20 mM) durante la RN (30 minutos) y la misma dosis al inicio de la reperusión en el receptor hasta el final de la intervención.

Grupo 4 (n=8):

Periodo de isquemia caliente de **60 minutos**, con **circulación extracorpórea a 37°C durante 30 minutos**, con el mismo flujo de bomba, añadiendo la administración de **L-arginina y SAME** en los siguientes tiempos y dosis:

Arginina: 400 mg/Kg de peso en bolus al inicio de la recirculación normotérmica (RN) y la misma dosis al inicio de la reperfusión del injerto en el receptor.

SAMe:

A/ 30 mg/kg de peso en bolus al inicio de la RN e infusión continua de 1 mg/kg/min durante los 30 minutos de la RN.

B/ Suplementar la solución de Wisconsin con 100mg/l.

C/ Bolus de 30 mg/Kg al inicio de la reperfusión e infusión continua de 1 mg/Kg/min durante 30 minutos.

Grupo 5 (n=8):

Periodo de isquemia caliente de **60 minutos**, con **circulación extracorpórea a 37°C durante 30 minutos**, con el mismo flujo de bomba, añadiendo la administración de **L-arginina, SAMe y glicina** en los siguientes tiempos y dosis:

L-arginina: 400 mg/Kg de peso en bolus al inicio de la recirculación normotérmica (RN) y la misma dosis al inicio de la reperfusión del injerto en el receptor.

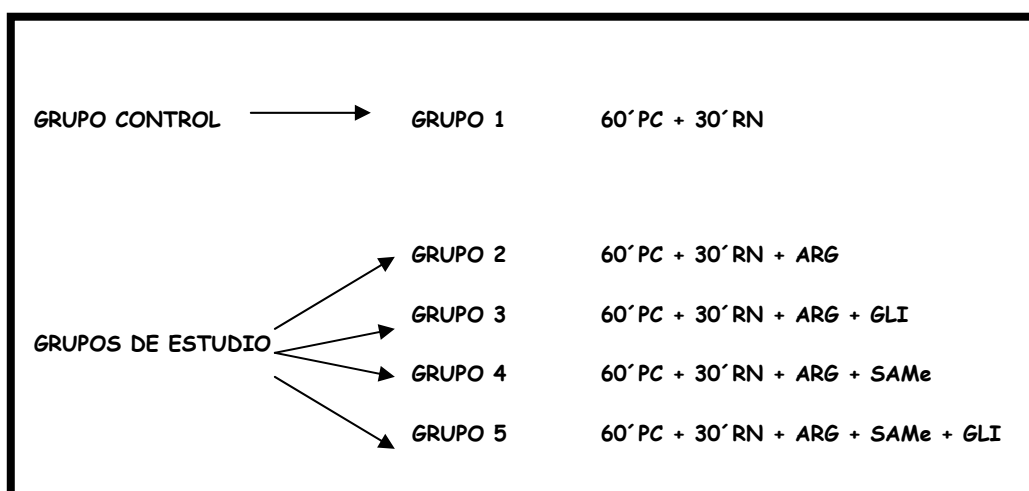
SAMe: A/ 30 mg/kg de peso en bolus al inicio de la RN e infusión continua de 1 mg/kg/min durante los 30 minutos de la RN.

B/ Suplementar la solución de Wisconsin con 100mg/l.

C/ Bolus de 30 mg/Kg al inicio de la reperfusión e infusión continua de 1 mg/Kg/min durante 30 minutos.

Glicina: infusión de 150 mg de glicina diluida en 500 ml de Ringer lactato (20 mM) durante la RN (30 minutos) y la misma dosis al inicio de la reperfusión en el receptor hasta el final de la intervención.

Figura 9: Resumen del diseño del estudio.



3.2.- Anestesia en el donante y en el receptor.

Antes de empezar a premedicar al animal, se anotaron las medidas de **peso y altura**, así como la **superficie corporal** ajustada al peso y altura según una tabla estandarizada. La premedicación se realizó con una inyección intramuscular de **azaperona** a dosis de 10 mg/Kg de peso.

Para la inducción anestésica se utilizó **pentobarbital** sódico a dosis de 15 mg/Kg de peso por vía endovenosa, a través de un catéter insertado en una vena auricular. Tras la intubación orotraqueal con tubo de 6.5 F, los pulmones fueron ventilados mecánicamente (ventilador Siemens Servo 900 D ®, Siemens-Elema AB; Suecia) con un volumen corriente de oxígeno de 10-15 ml / Kg y FiO₂ del 100%. El mantenimiento anestésico fue realizado con isoflurane al 1-2% y fentanilo a dosis de 3 microgramos / Kg de peso. La relajación muscular se obtuvo administrando besilato de **atracurio** en perfusión, a dosis de 0.3 mg / Kg y la analgesia con **fentanilo** a dosis de 0,10 mg / hora.

3.2.1.- Monitorización del donante:

La exposición de los vasos del cuello se realizó mediante una incisión longitudinal paratraqueal derecha. La toma de **presión arterial cruenta** fue mediante canulación de la arteria carótida derecha con catéter 16 G y monitorización con aparato de Hewlett-Packard, M 1046 A, 71034 Boeblingen (Alemania). La vena yugular externa fue también disecada para posterior canulación. El **registro electrocardiográfico** también fue monitorizado tras colocar los electrodos sobre la superficie corporal.

A continuación se procedió a la apertura del abdomen realizando **laparotomía media xifopubiana** y disección de las estructuras del hilio hepático.

Las **temperaturas hepática** y esofágica fueron también monitorizadas con un termistor (Mon-A-Therm; Mallinckrodt Medical Inc. ®; St Louis, MO 63134, EUA).

Se colocaron dos **flujómetros** no invasivos (Transonic Systems Inc. HT207. Ithaca, New York 14850, EUA) alrededor de la arteria hepática y vena porta respectivamente. En ese momento determinamos las medidas de los flujos basales, una vez estabilizados. En este punto se administró heparina intravenosa a dosis de 3 mg / Kg de peso.

3.2.2.- Accesos vasculares del by-pass cardiopulmonar.

La **vena yugular externa, la arteria aorta infrarrenal y la vena cava inferior** fueron canuladas (22Fr, 16Fr y 28 Fr respectivamente) y conectadas a un **oxigenador** pediátrico de burbuja (Bard Quantum Oxygenator and Venous reservoir, HF 6000-H 6770 VR, CR Bard Inc ®; Haverhill, MA 01832, EUA), a un **intercambiador de temperatura** (Módulo Normo-hipotermia Palex S.A., Barcelona, España) y a una **bomba de rodete** (Stöckert-Shiley ®, Munich, Alemania).

Figura 10: Animal durante la fase de recirculación extracorpórea. Se pueden observar las cánulas que recogen la sangre venosa (rojo oscuro) y la cánula que envía desde el oxigenador la sangre oxigenada (rojo intenso).



El cebado del circuito se efectuó con 500 ml de solución salina, 500 ml de Hemocé ® y Manitol (0,5 gr / Kg peso). Las temperaturas esofágica y hepática fueron también monitorizadas (Mon-A-Therm; Mallinckrodt Medical Inc. ®; St Louis, MO 63134, USA).

El **paro cardíaco** fue provocado mediante la inyección endovenosa de cloruro potásico a dosis de 10-15 ml 2M. Tras 60 minutos de parada cardíaca, fue iniciado el periodo de recirculación normotérmica (circulación extracorpórea y oxigenación tisular a 37°C). La recirculación normotérmica fue mantenida durante 30 minutos hasta alcanzar un flujo de bomba máximo de 2.4 L / min / m² de superficie corporal. La determinación del flujo de bomba fue considerado como un valor indirecto de la función circulatoria durante el periodo de recirculación normotérmica entero. Dicho valor de flujo fue

determinado en distintos tiempos a lo largo de la recirculación, calculando finalmente una media entre los distintos valores.

En este momento se inició el **enfriamiento corporal total** mediante circulación extracorpórea hasta alcanzar una temperatura hepática de 15°C. El tiempo hasta alcanzar los **15°C** fue registrado y seguidamente se procedió a la perfusión con **solución de Wisconsin** a través de la arteria aorta y de la vena porta.

Figura 11: Equipo de circulación extracorpórea (bomba de bypass cardiopulmonar): Bomba, oxigenador e intercambiador de calor.



Una vez concluida la perfusión, se realizó la **extracción hepática** y se colocó el órgano en una bolsa de preservación a una temperatura de **4°C** durante seis horas. Se determinaron cada cinco minutos la presión arterial media, las temperaturas hepática y esofágica, y la temperatura del intercambiador de temperatura. Los flujos portal y hepático fueron registrados continuamente durante los 30 minutos de recirculación normotérmica y durante el enfriamiento corporal total.

3.2.3.- Monitorización del receptor.

El manejo anestésico en el receptor fue muy similar al del donante. La exposición de la vena yugular externa y de la arteria carótida se realizó de igual modo que en el donante. En la vena se dejó un catéter venoso central para medicar al animal y tomar muestras sanguíneas en el postoperatorio. El catéter arterial sirvió para monitorizar la tensión arterial peroperatoria, siendo éste retirado al finalizar la intervención. El registro electrocardiográfico, la presión venosa central y la presión arterial fueron monitorizadas durante todo el acto operatorio.

3.3. Técnica quirúrgica en el donante y en el receptor.

3.3.1.- Extracción en el donante.

Se efectúa la extracción del hígado cuando se ha conseguido una temperatura en la superficie hepática de 15°C y posteriormente se perfunde el hígado con solución preservadora UW (University of Wisconsin) a través de la vena porta y de la arteria hepática. Se perfora la vena cava inferior suprahepática e infrahepática para aspirar la solución de irrigación que alcanza el torrente venoso.

Una vez en el banco, se completa la perfusión y el lavado de la vía biliar. En esta fase se pretende dejar preparados todos los vasos para su posterior anastomosis, disecando la arteria hepática desde el tronco celiaco y parte de la aorta, la vena cava inferior infra y suprahepática, la vena porta y el colédoco.

3.3.2.- Implante en el receptor.

La incisión en el receptor consiste en una laparotomía media supraumbilical con prolongación subcostal derecha, dos traveses bajo la última costilla. Tratándose de un trasplante ortotópico, primero se extirpa el hígado del receptor y luego se implanta el injerto en el mismo lugar. Siguiendo la técnica estandarizada de exéresis de la vena cava retrohepática y anastomosis con el siguiente orden:

- 1-cava suprahepática,
- 2-vena porta (reperfusión venosa),
- 3-cava infrahepática,
- 4-arteria hepática (reperfusión arterial) y
- 5-vía biliar.

La anastomosis de la arteria hepática se realiza en la bifurcación de la arteria hepática propia y la arteria gastroduodenal. La anastomosis biliar se realiza mediante sutura termino-terminal con calibración interna perdida rodeada con 2 ligaduras de seda y manteniendo la vesícula biliar in situ. Todas las anastomosis las realizamos con sutura continua de material irreabsorbible (Prolene®) de distintos grosores según el vaso (4/0 para la cava, 5/0 para la porta y 6/0 para la arteria). En ningún caso se realizó un by-pass veno-venoso para mantener la hemodinámica del animal, puesto que en todos los casos la fase anhepática duró un máximo de 20 minutos. El periodo de isquemia fría (desde el final del enfriamiento corporal total del donante hasta la reperfusión en el receptor) duró entre 5 y 6 horas. La pared abdominal fue cerrada con dos suturas continuas de material reabsorbible (Dexon®) para la capa peritoneal y la aponeurosis, y la piel con continua de seda.

3.4.- Determinaciones analíticas del estudio.

Se obtienen muestras de sangre venosa periférica y de tejido hepático (congeladas a -170°C en nitrógeno líquido) para determinar el grado de lesión hepática y el estado energético celular.

3.4.1.- Transaminasas (ASAT, ALAT y GST).

Uno de los marcadores más característicos de la lesión hepatocelular es el aumento en los niveles séricos de aspartatoaminotransferasa (ASAT) y alaninoaminotransferasa (ALAT), ya que estas enzimas se encuentran dentro del citoplasma de los hepatocitos. Si existe citolisis, estas enzimas son liberadas a la circulación sanguínea.

La ALAT y ASAT son determinadas en suero de sangre arterial periférica. Una vez que la muestra es extraída del animal se la deja reposar durante 30 minutos para una mejor separación del coágulo sanguíneo con respecto al suero, el cual se obtiene posteriormente por medio de la centrifugación de la muestra, durante 5 minutos a 350 RPM. Una vez realizada la separación, el suero es obtenido utilizando pipeta Pasteur, el cual se conserva a - 20°C en tubos Eppendorf.

Para realizar la determinación se deja descongelar el suero a temperatura ambiente. Debido a la gran cantidad de fibrina que presenta el suero de los cerdos, es necesario volver a centrifugar la muestra y hacer una dilución de 1/3 con suero fisiológico.

Las determinaciones de ASAT y ALAT se realizan por medio de un autoanalizador Dax (Bayer-Technicon). Siempre las determinaciones se realizan por duplicado.

La Alfa-glutation-S-Transferasa (GST) en suero de sangre periférica es un marcador muy precoz de lesión isquémica hepatocelular. Tiene especial utilidad para valorar la lesión tras la parada cardíaca.

La glutacion-S-Transferasa es una familia de enzimas que catalizan diferentes reacciones a nivel intracelular. La α -GST es una enzima citosólica que se encuentra en altas concentraciones en el hígado y se ha demostrado que aumenta rápidamente y en grandes concentraciones ante el daño hepático, por lo que es considerado un marcador útil para la detección del daño hepatocelular.

La α -GST es una enzima que se localiza principalmente en hepatocitos centrolobulillares mientras que las transaminasas lo hacen preferentemente en los periportales. Presentan una elevación muy precoz ante la lesión hepatocelular y una vida media en plasma de aproximadamente de 1 hora, por lo que ha sido empleada como marcador precoz de la lesión por isquemia-reperfusión en este modelo de trasplante hepático con donante a corazón parado.

La α -GST, igual que con las transaminasas, es determinada en suero de sangre arterial, siendo éste obtenido de manera similar. Las determinaciones de α -GST se realizan por medio del método de ELISA (Enzyme Linked Immunoassay) utilizando in kit específico para su determinación. (Biotrin HEPKIT™-Alpha-Porcine GST-Alpha Biotrin LTD, Dublin, Ireland).

El suero es descongelado a temperatura ambiente. Se trabaja con 100 microlitros de muestra, debiendo diluir al 1/5 las muestras obtenidas a la hora de la reperfusión por el alto valor de α -GST que presentan debido al daño hepático existente.

En primer lugar se cargan las muestras en una placa de ELISA que presenta pocillos con anti-Ig G ALFA-GST porcina adherida. Se deja incubar durante una hora hasta alcanzar una mezcla uniforme.

Posteriormente se añaden anticuerpos unidos a biotina (Biotin-Ig G anti- α -GST) y después estreptovirina conjugada con peroxidasa. Realizado este proceso se puede cuantificar la concentración de la GST presente en la muestra por medio de la lectura de adsorbancia a 450 nm.

3.4.2.- Ácido hialurónico.

El ácido hialurónico es un glucosaminglicano de alto peso molecular que se sintetiza en las células mesenquimatosas de todo el organismo. Normalmente llega hasta el hígado, donde es captado predominantemente por las células endoteliales sinusoidales que son las encargadas de la remoción del mayor porcentaje de ácido hialurónico de la circulación general. Diferentes estudios han podido demostrar que los niveles en suero reflejan la función de las células endoteliales del sinusoides hepático, siempre que no exista otra causa que pueda provocar valores altos, como es posible encontrar en el fallo hepático agudo, mesoteliomas y cirrosis.

Es conocido por todos nosotros que durante en trasplante hepático existe un daño importante del sinusoides hepático caracterizado principalmente por el daño de las células endoteliales. Es por ello que se ha utilizado el ácido hialurónico como marcador de la lesión de las células endoteliales durante el procedimiento.

Para su determinación en suero de sangre arterial, que se realiza por medio de RIA (Radio Inmune Assay), se utiliza un kit comercial (Pharmacia HA Test, Pharmacia & Upjohn Diagnostics AB, Uppsala, Sweden). Todas las muestras se realizan por duplicado. El test se basa en la mezcla de 200 microlitros de proteínas de unión de ácido hialurónico aislada de cartílago bovino (HABP-¹²⁵) con 100 microlitros de muestra del cerdo correspondiente.

Después de un proceso de incubación de 60 minutos a 4-20°C, se debe agregar 100 microlitros de AH-sefarosa y esperar un último período de incubación de 45 minutos a la misma temperatura que el anterior. Después se agregan 2 ml de solución de decantación y se centrifuga la muestra durante 10 minutos a 1500 rpm. Así se está en condiciones de cuantificar la HBP-¹²⁵ no unida al ácido hialurónico presente en la muestra, por medio de un contador gamma. La radioactividad medida es inversamente proporcional a la cantidad de ácido hialurónico presente en la muestra.

El *Clearance de ácido hialurónico* o aclaramiento de ácido hialurónico es un índice de funcionalismo de la célula endotelial del sinusoides hepático en cada momento, a partir de sus concentraciones en suero de sangre periférica y vena hepática, según la siguiente fórmula:

Clearance de AH= (AH arterial-AH VH) % / AH arterial.

3.4.3.- Histología.

Las muestras son obtenidas al quinto día del trasplante, previo al sacrificio del animal. Se toma para estudio anatomopatológico un lóbulo hepático completo.

Para la realización de la microscopía óptica se fijan las muestras tomadas en solución de formol al 3 % y posteriormente se incluyen en parafina. La inclusión se realiza con un procesador de tejido Citadel 2000 de Shandon. El punto de fijación de la parafina será de 60°C.

Posteriormente, los bloques parafinados serán cortados con un micrótopo de rotación de Reichert-Jung 2035 a de 3 micras de espesor.

Como último paso se realiza la desparafinación de la muestra y posterior tinción con Hematoxilina y Eosina.

Todas las muestras obtenidas durante el estudio son analizadas por el mismo patólogo, quien valora la muestra desconociendo el grupo de pertenencia. Se presta atención a la presencia de los siguientes cambios histológicos:

- Infiltrado leucocitario sinusoidal
- Infiltrado linfocitario sinusoidal
- Dilatación sinusoidal
- Despegamiento de hepatocitos
- Colangitis isquémica
- Necrosis centrolobulillar
- Area de necrosis media

El análisis se realiza mediante la utilización de un sistema de valoración semicuantitativo considerando los cambios como: ausentes (-), leves (+), moderados (++) o severos (+++). Para la identificación de la colangitis isquémica se ha evaluado la presencia (+) o ausencia (-).

El cálculo del área necrótica media se realiza sobre un corte representativo de parénquima midiendo de forma específica el área de tejido necrótico presente en un campo de 15,45 mm². La medición es realizada por el mismo patólogo utilizando el programa de análisis de imagen MIP de CID (Barcelona). Dicho sistema consta de un microscopio lumínico Olympus BH2 conectado mediante una cámara de video a un ordenador. Las áreas necróticas fueron dibujadas en un tablero digitalizador utilizando cámara clara y puntero luminoso. Los resultados del análisis se expresaron como porcentaje de área necrótica.

3.5.- Marcadores hemodinámicos durante la recirculación normotérmica.

Específicamente durante el período de circulación extracorpórea a 37°C y para estudiar el valor de la misma y la viabilidad del injerto se determinan:

3.5.1.- Flujos sanguíneos hepáticos y de bomba.

Antes y durante el período de recirculación normotérmica se realiza de forma continua la medición del flujo sanguíneo en la arteria hepática y la vena porta. La medición se realiza con transductores específicos que son conectados a un aparato medidor de flujos Transonic (Transonic Systems Inc, Ht 207, Ithaca, NY, USA).

También es valorado el flujo sanguíneo de la bomba de recirculación extracorpórea y calculado el flujo hepático total (flujo de arteria hepática + flujo de vena porta). Todas estas mediciones son corregidas por la superficie corporal, dato que se obtiene a partir del peso y de la talla del cerdo.

Primero se realiza el registro basal de los flujos antes de la parada cardíaca. Una vez que se comienza a realizar la recirculación normotérmica la medición de los flujos se realiza de forma continuada. Para el estudio de los flujos se tienen en cuenta los valores registrados a los 5, 15 y 30 minutos de dicho período.

3.5.2.- Metabolismo hepático del oxígeno.

Durante los 5, 15 y 30 minutos de la recirculación normotérmica se realizan extracciones sanguíneas de la vena porta, vena suprahepática

y arteria carótida para realizar diferentes pruebas gasométricas y poder calcular el metabolismo hepático del oxígeno.

Las muestras sanguíneas obtenidas son procesadas por un analizador de gases (Analyser 288, blood gass system, Ciba-Corning Diagnostics, Medfield MA 02052, USA). Con los valores obtenidos se ha calculado el contenido de oxígeno de la vena porta (CpO_2), vena suprahepática ($CshO_2$) y arteria carótida (CaO_2) por medio de la siguiente fórmula:

Contenido de oxígeno:

$$pO_2 \times 0.0023 + (Hb \times (\text{sat } O_2/100) \times 1.31).$$

También se han calculado los siguientes parámetros:

Llegada de oxígeno al hígado (HDO₂):

$$(CaO_2 \times \text{flujo arterial}) + (CpO_2 \times \text{flujo portal})$$

**Aporte de oxígeno hepático:*

$$HDO_2 = (FSAH \times CaO_2 \times 0.01) + (FSP \times CvpO_2 \times 0.01)$$

Extracción hepática de oxígeno (HVO₂):

$$HDO_2 - (CshO_2 \times \text{flujo suprahepático})$$

**Consumo de oxígeno hepático:*

$$HVO_2 = HDO_2 - (FSAH + FSP) \times CvhO_2 \times 0,01$$

Flujo suprahepático: flujo arterial + flujo portal

Índice de extracción hepática de oxígeno:

$$(HVO \times 100) / HDO$$

El cálculo se realiza a partir del conocimiento del flujo portal (FSP) y arterial hepático (FSAH) mediante un medidor de flujo Transonic®, así como de las concentraciones de oxígeno a nivel de la porta (C_{vpO_2}), arteria (C_{aO_2}) y vena hepática (C_{vhO_2}).

3.6.- Marcadores del estado energético.

3.6.1.- Nucleótidos de adenosina.

Se determina el estado energético a partir de la concentración de ATP, ADP, AMP, Xantina e Hipoxantina (Hepatology 1994; 20:565) . Determinados por HPLC.

La concentración de los nucleótidos de adenosina (ATP, ADP, AMP, adenosina, hipoxantina, xantina) se ha determinado en muestras de tejido hepático, por medio de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Una vez obtenida la muestra es conservada en forma inmediata en nitrógeno líquido a -170°C . Para realizar la determinación de nucleótidos se procede de la siguiente manera: A las muestras de tejido hepático se les añade ácido perclórico (1 ml, 0,6 N) en baño de hielo a una temperatura de 4°C , con la finalidad de homogeneizar y separar los compuestos de interés de la matriz proteica. Posteriormente, las biopsias son homogeneizadas en un sistema Polytron 10 ST tres veces durante 10 segundos manteniendo el medio a 4°C . Tras centrifugación a 15000 rpm durante 5 minutos manteniendo la temperatura, el sobrenadante obtenido (0,5 ml) es neutralizado con carbonato potásico al 9% hasta obtener un pH 7 (0,3 ml). Se debe dejar reposando 15 minutos y luego se realiza una segunda centrifugación en frío para separar el precipitado del perclorato potásico formado. El extracto neutralizado obtenido fue

diluido a la mitad con tampón de dihidrogenofosfato de amonio 0,10 M (fase móvil), e inyectado para su análisis en el sistema cromatográfico.

La determinación de las concentraciones de los nucleótidos y sus derivados se realizó mediante HPLC en columna de fase reversa de 20 cm de longitud y 0,4 cm de diámetro interno empaquetadas con Nucleosil C-18, de 5 micrometros de diámetro de partícula.

Para la fase móvil se utilizó un tampón dihidrogenofosfato de amonio 0,10 M preparado a partir de 6,7 ml de ácido fosfórico (PO_4H_3) al 85% por litro e hidróxido amónico (NH_4OH) al 25% hasta alcanzar un pH de 6. El flujo se mantuvo a 1 ml/min.

Una vez obtenidos los cromatogramas, se identificaron los metabolitos de las muestras en estudio, mediante la comparación de los tiempos de retención en la columna con los tiempos obtenidos de una mezcla de estándares de ATP, ADP, AMP, adenosina, hipoxantina y xantina de concentración conocida.

Las concentraciones de las sustancias en estudio son expresadas en nmol/ml de extracto. Se obtienen por extrapolación de las áreas del cromatograma sobre rectas de calibración construidas a partir de cinco concentraciones distintas de estándares.

A partir del valor de las concentraciones de nucleótidos en las biopsias, se ha calculado para cada muestra de tejido hepático la proporción de cada nucleótido, en porcentaje con respecto al total de nucleótidos y derivados, en cada fase del estudio.

[3.6.2.- Carga energética.](#)

Con todos los valores de los nucleótidos obtenidos se calcula la carga energética según la ecuación de Atkinson:

$$CE = (ATP + 0,5 \times ADP) / (ATP + ADP + AMP)$$

Todas estas muestras se obtienen en las siguientes fases bien definidas:

- 1) Basal: Antes de la manipulación del animal donante una vez colocados los catéteres y transductores térmicos.
- 2) Período de isquemia caliente: 60 minutos después de la parada cardíaca, antes de la recirculación. Traduce la lesión después del episodio de parada cardíaca.
- 3) Fase de recirculación a 37°C : Tras 30 min. de recirculación con sangre oxigenada. Traduce el efecto que ha tenido la circulación con sangre oxigenada.
- 4) Inmediatamente después de la reperfusión vascular en el receptor durante la realización del trasplante. Traduce la lesión tras el período total de isquemia.
- 5) Reperfusión vascular: Una hora después de la reperfusión del hígado. Traduce la lesión por isquemia-reperfusión.
- 6) Quinto día del trasplante, en el animal superviviente.

3.7.- Análisis estadístico.

Los resultados de las variables cuantitativas están expresados como medias +/- error estándar de la media, mientras que los resultados de las variables cualitativas son expresados como porcentaje de casos.

Según fuera necesario, para comparar los resultados de las variables cualitativas se empleó la prueba de Chi cuadrado y test de Fischer. Para comparar los resultados del análisis de las variables cuantitativas se utilizó el método de la varianza de ANOVA utilizando como prueba post hoc el test de Bonferroni.

Se consideraron significativos valores de p inferiores a 0,05.

3.8.- Control, seguimiento y sacrificio del animal.

El animal intervenido pasa después del trasplante a una jaula metabólica. La analgesia se realiza con meperidina subcutánea, a dosis de 100 mg/6h, las primeras 24 h y en los días sucesivos con pauta más espaciada.

Las determinaciones analíticas se toman a través de la vía central que se deja en la vena yugular permanentemente, en los días 1, 3 y 5.

La inmunosupresión se realiza intraoperatoriamente administrando 500 mg de metilprednisolona y azatioprina 1,5 mg/Kg antes de la reperfusión hepática.

La alimentación se inicia a partir de las 24 horas con agua y posteriormente dieta blanda.

El sacrificio se efectúa el quinto día del trasplante, con pentotal a través de la vía central. En ese momento se extrae el injerto para biopsia al 5º día y se toman muestras de sangre.

Los animales son incinerados fuera del estabulario de la Facultad de Medicina.

4. RESULTADOS

4.1.- Análisis de la supervivencia.

A todos los animales que murieron antes del quinto día postoperatorio se les realizó la autopsia con el fin de averiguar la causa de la muerte. Ninguno de los 17 animales fallecidos mostró señales de muerte atribuibles a la cirugía. Los animales que mostraron algún problema quirúrgico durante la intervención (por ejemplo hemorragia) o algún hallazgo anatómico anómalo que difería de los demás, fueron excluidos del estudio.

Para analizar el efecto de los distintos tratamientos sobre la supervivencia al 5º día se utilizó el test de Chi-cuadrado con la corrección del test exacto de Fisher (tabla 5).

La comparación entre el grupo control y cada uno de los grupos de estudio no fue significativa, existiendo una tendencia hacia una mayor supervivencia en el grupo control respecto a los grupos 4 y 5 ($p=0,059$).

Tabla 5: Número de casos por cada tratamiento en función de la supervivencia.

| GRUPO | SUPERVIVENCIA | | TOTAL |
|------------------|---------------|------------|-------|
| | NO | SI | |
| 1 (CONTROL) | 1 | 7 (87.5%) | 8 |
| 2 (ARG) | 3 | 5 (62.5%) | 8 |
| 3 (ARG-GLI) | 3 | 5 (62.5%) | 8 |
| 4 (ARG-SAMe) | 5 | 3 (37.5%) | 8 |
| 5 (ARG-SAMe-GLI) | 5 | 3 (37.5%) | 8 |
| TOTAL | 17 | 23 (57.5%) | 40 |

2.- Efecto de los distintos tratamientos sobre la lesión del parénquima hepático.

Debido a la variabilidad existente entre las determinaciones basales de los animales de un mismo grupo y entre diferentes grupos, hemos analizado la variación en las determinaciones de ASAT y ALAT a través del porcentaje de aumento de las mismas respecto al valor basal obtenido.

4.2.1.- Niveles séricos de aspartato aminotransferasa (ASAT).

La figura 12 muestra cómo los niveles séricos de ASAT tienden a aumentar progresivamente desde sus valores basales hasta el 2º día postrasplante, momento en que se detecta su valor máximo ($p < 0,05$ respecto al valor basal en todos los grupos). Posteriormente, al 5º día, esta enzima tiende a normalizarse, aunque con niveles por encima del basal.

-ARG: En el grupo tratado con arginina existió una menor elevación de ASAT respecto al grupo control ($p < 0,049$) al 2º día, no apreciando diferencias significativas respecto a los demás grupos.

-ARG-GLI: No hubo diferencias significativas en ninguno de los tiempos, entre este grupo y el grupo control ni con los demás grupos tratados.

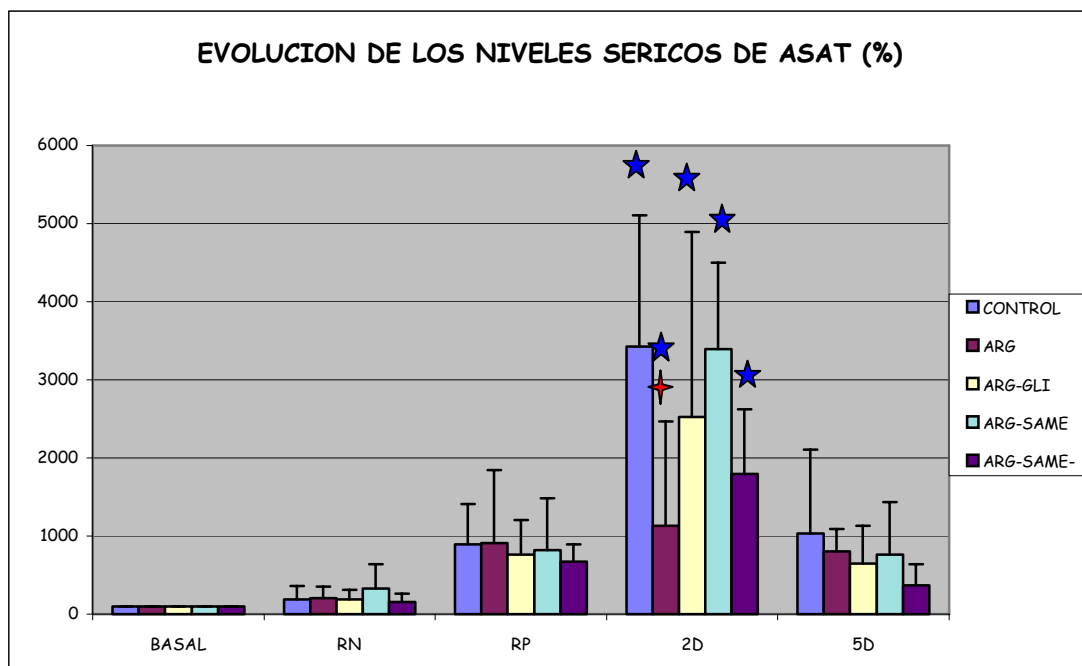
-ARG-SAMe: No hubo diferencias entre este grupo y los demás en ningún tiempo de forma significativa, aunque se aprecia una tendencia

a ser más elevado respecto al grupo ARG al 2º día del trasplante (p=0,07).

-ARG-SAME-GLI: Tampoco hubo diferencias significativas en los niveles de ASAT entre este grupo y los demás.

Observemos que todos los grupos incrementan significativamente su valor al 2º día respecto a la fase de reperfusión, excepto el grupo ARG, que no varía significativamente en el tiempo.

Figura 12: Efecto de los distintos tratamientos sobre la evolución de los niveles séricos de ASAT.



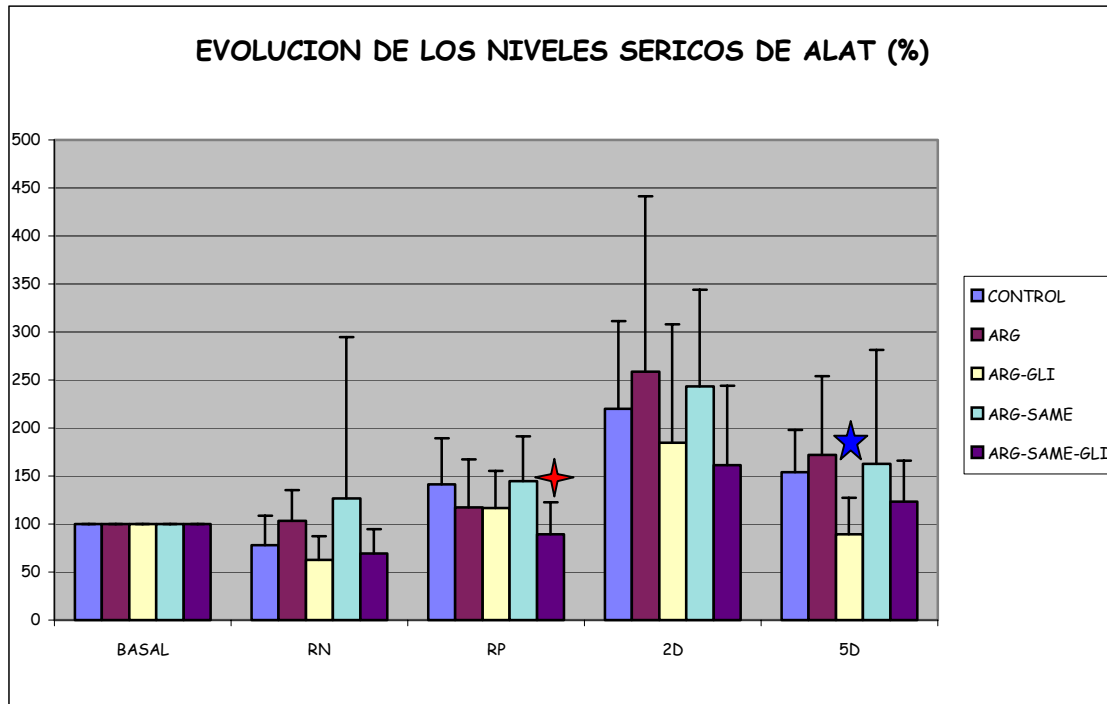
p=0.049 respecto al grupo control en la misma fase.



p<0.05 respecto a la fase de RN y RP en el mismo grupo.

4.2.2.- Niveles séricos de alanin aminotransferasa (ALAT).

Figura 13: Efecto de los distintos tratamientos sobre la evolución de los niveles séricos de ALAT.



p= 0.02 respecto al grupo control y respecto al grupo ARG-SAME en la misma fase.



p=0.047 respecto al grupo ARG en la misma fase.

-ARG: Este grupo no difirió con los demás grupos, salvo al 5° día, cuya elevación fue mayor que la del grupo ARG-GLI (p=0.047).

-ARG-GLI: La elevación de ALAT en este grupo no fue estadísticamente diferente de los demás, excepto al 5° día, que se elevó menos que el grupo ARG (p=0.047).

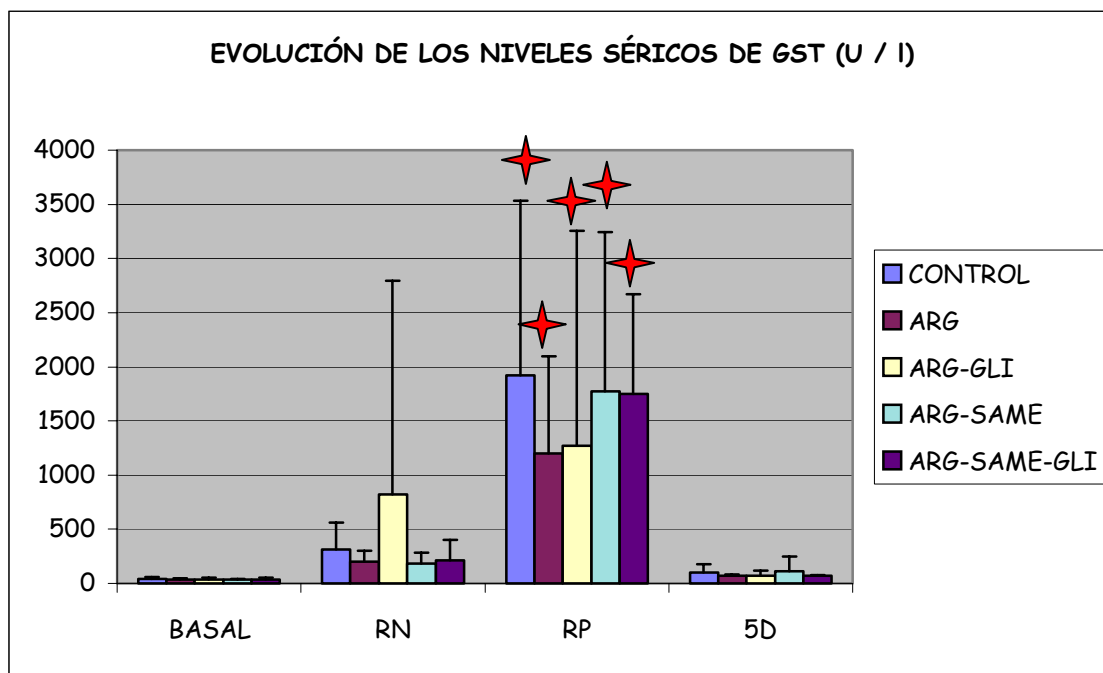
-ARG-SAMe: Durante la reperfusión vemos una mayor elevación de ALAT respecto al grupo ARG-SAMe-GLI ($p=0.02$).

-ARG-SAMe-GLI: Durante la reperfusión hubo menor elevación de ALAT respecto al grupo control ($p=0.02$) y respecto al grupo ARG-SAMe ($p=0.02$).

4.2.3.- Niveles séricos de alfa glutation-S-transferasa (GST).

La alfa-GST mostró un incremento significativo en todos los grupos ($p<0.02$) respecto a su nivel basal en la fase de RP. Al 5° día del trasplante se normalizan las cifras, indicando que es un marcador precoz de lesión hepatocitaria. No observamos diferencias entre grupos en ninguna de las fases.

Figura 14: Efecto de los distintos tratamientos sobre la evolución de los niveles séricos de α -GST.



★ $p < 0.02$ respecto a su nivel basal en el mismo grupo.

4.3.- Efecto de los distintos tratamientos sobre el endotelio sinusoidal hepático.

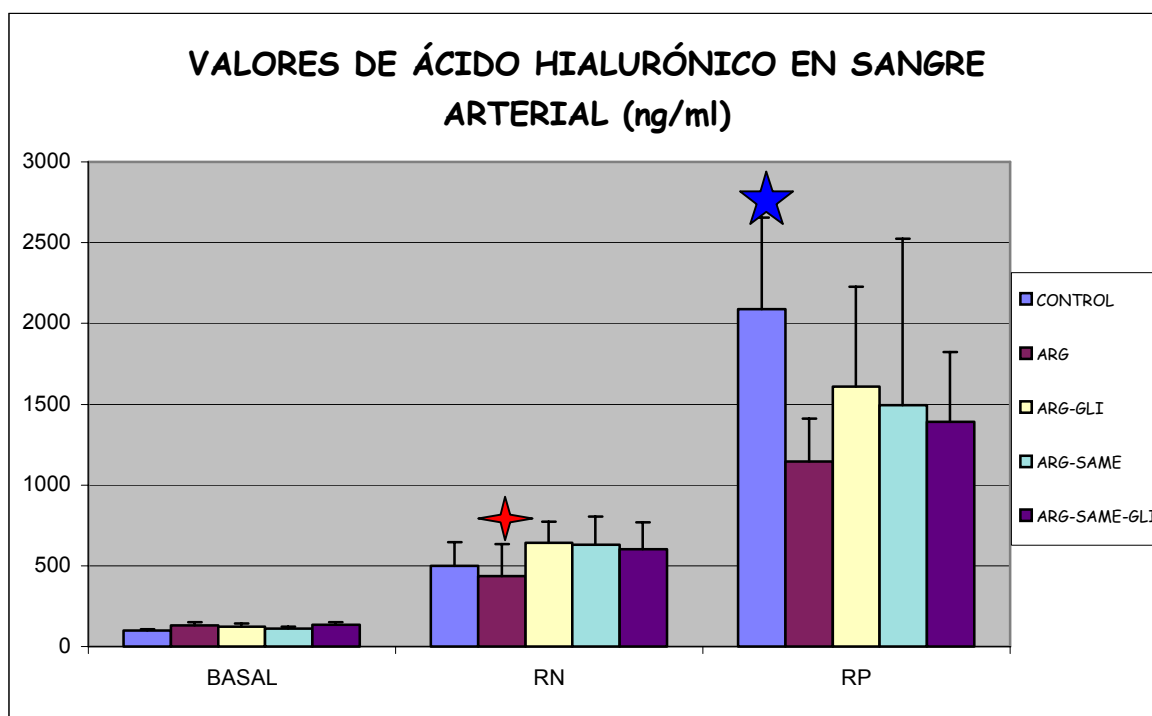
Analizando la determinación de ácido hialurónico en sangre arterial periférica tras la RN y una hora después de la reperfusión (RN y RP respectivamente), vemos un incremento significativo en todos los grupos con respecto a su nivel basal en la fase de RP (figura 15).

No existieron diferencias significativas entre grupos en cuanto al nivel basal de ácido hialurónico.

En la fase de RN observamos un incremento del valor basal en todos los grupos, siendo el grupo de arginina el que mostró menor aumento respecto al grupo ARG-GLI ($p=0.031$) y respecto al grupo ARG-SAME ($p=0.043$).

En la fase de RP existe un mayor aumento en todos los grupos y vemos que el grupo control fue el que mostró mayor incremento ($p=0.012$ respecto al grupo ARG y $p=0.048$ respecto al grupo ARG-SAME-GLI). De modo que el incremento de ácido hialurónico en la RP fue significativamente menor en los grupos tratados con ARG-SAME-GLI y arginina sola.

Figura 15: Efecto de los distintos tratamientos sobre la evolución de los niveles séricos de ácido hialurónico en sangre arterial.



★ $p=0.031$ respecto al grupo ARG-GLI y $p=0.043$ respecto al grupo ARG-SAME.

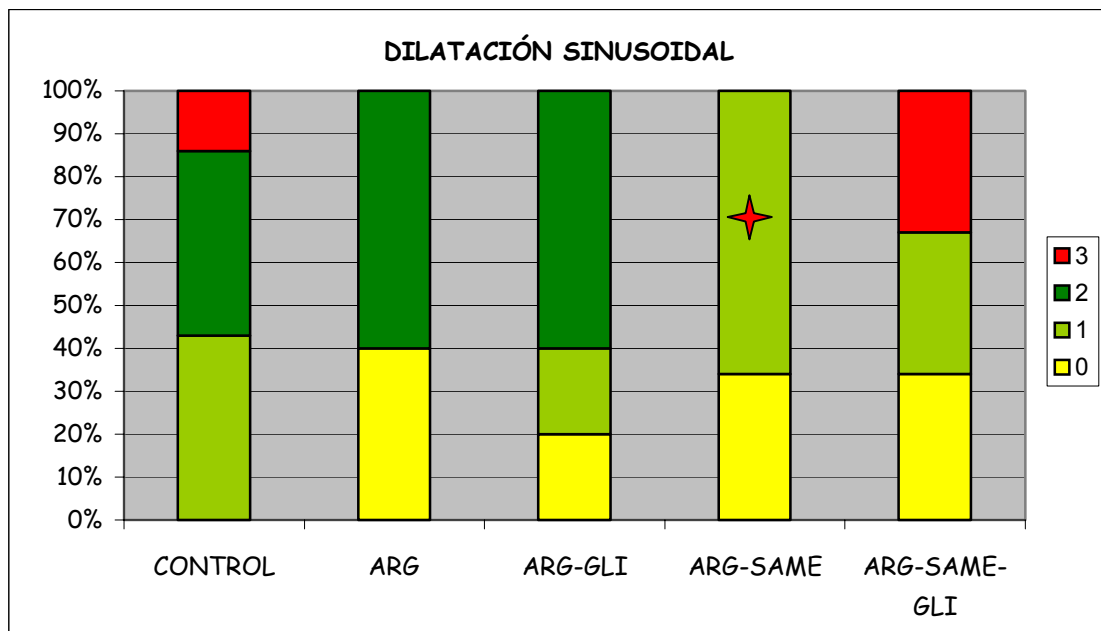
★ $p=0.012$ respecto al grupo ARG y $p=0.048$ respecto al grupo ARG-SAME-GLI.

4.4.- Histología.

Las variables histológicas son cualitativas y están representadas como porcentaje de casos de cada grado de lesión, siendo el grado 0=ausencia de lesión, en color amarillo; grado 1=lesión leve, en verde claro; grado 2=lesión moderada, en verde oscuro; y grado 3=lesión severa, en rojo.

4.4.1.- Dilatación sinusoidal.

Figura 16: Grado de dilatación sinusoidal en los diferentes grupos. Porcentaje de casos por cada grado de lesión en cada grupo.



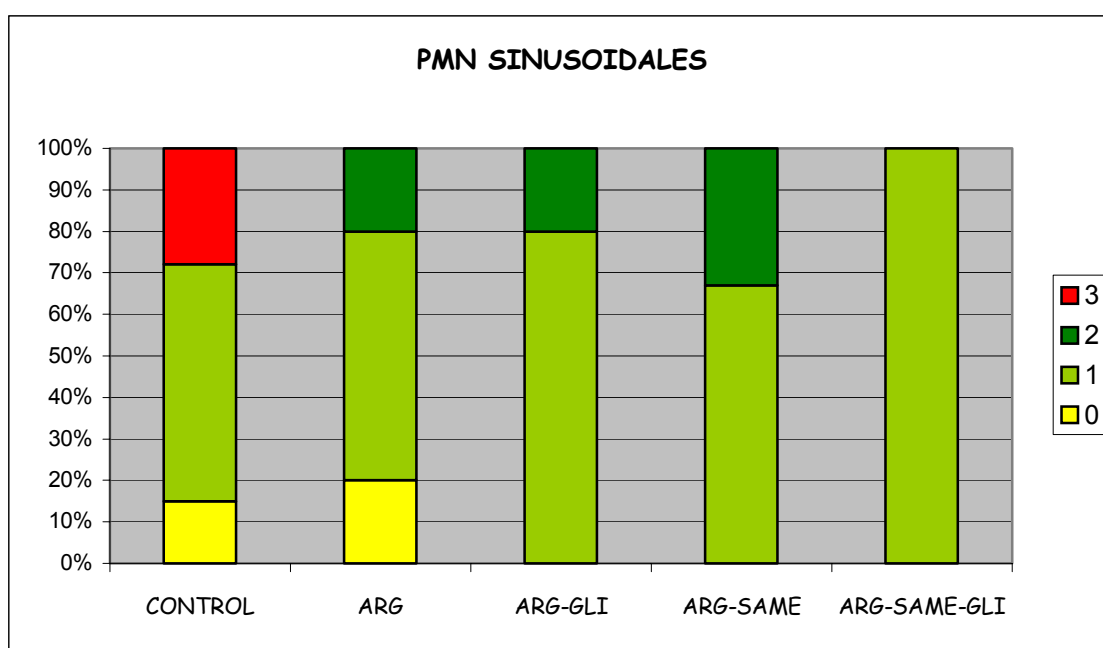
★ p=0.048 respecto al control.

El grado de congestión sinusoidal fue menor en los grupos tratados con ARG y ARG-GLI respecto al grupo control, aunque de forma no significativa.

El tratamiento con ARG-SAMe consiguió disminuir significativamente ($p=0.048$) la dilatación o congestión sinusoidal respecto al control.

4.4.2.-Infiltración sinusoidal por polimorfonucleares

Figura 17: Grado de infiltración sinusoidal por polimorfonucleares en los diferentes grupos. Porcentaje de casos por cada grado de lesión en cada grupo.



En condiciones normales existe una mínima cantidad de leucocitos polimorfonucleares a nivel de los sinusoides hepáticos, concordante con el número existente en la circulación sanguínea, de modo que es normal encontrar alguna célula circulante en los sinusoides. Cuando hay lesión de isquemia-reperfusión existe lesión de la membrana citoplasmática hepatocitaria y endotelial. La puesta en contacto de antígenos citoplasmáticos con la circulación atrae los

polimorfonucleares que acaban lesionando los hepatocitos, objetivándose histológicamente como un mayor número de PMN circulantes (a las 24-48 horas de la reperfusión, más que al 5º día) y focos de necrosis unicelulares hepáticos asociados a grupos de polimorfonucleares (microabscesos). No existieron diferencias significativas entre grupos, pero destacamos que el único grupo que presentó un grado de lesión 3 fue el control en el 28% de los casos.

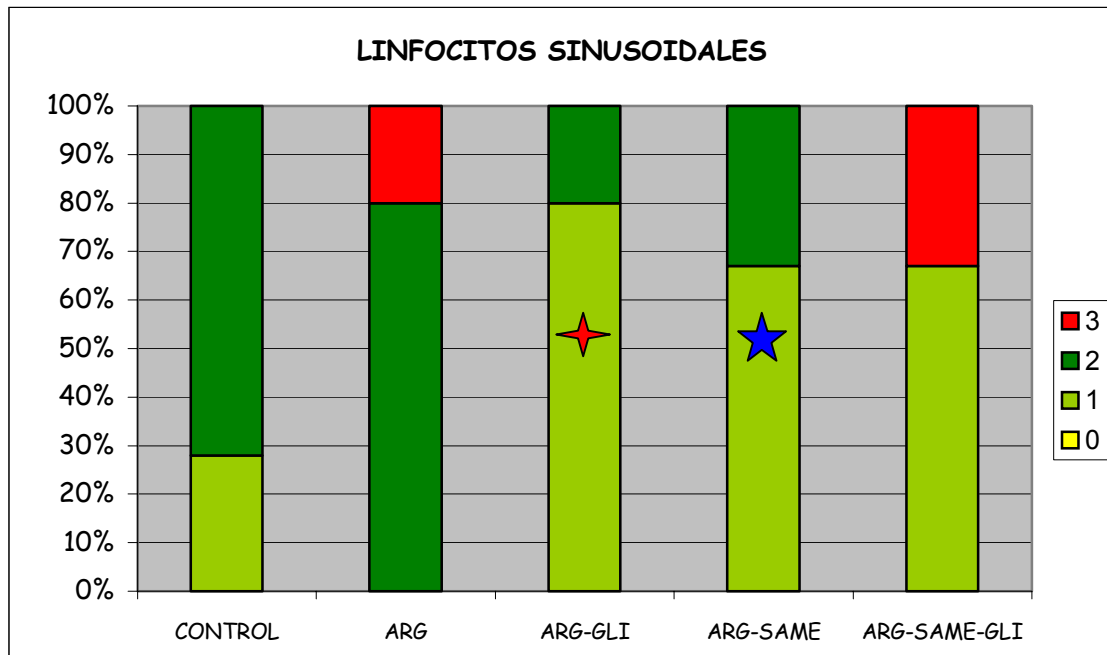
4.4.3.- Infiltración sinusoidal por linfocitos.

En condiciones normales existen unos pocos linfocitos circulantes en los sinusoides como parte de la celularidad sanguínea circulante. La presencia de linfocitos sinusoidales en gran número puede estar indicando estados de linfocitosis hematológica, un proceso inflamatorio tipo hepatitis aguda o un estado de rechazo del injerto. En nuestro caso, podría obedecer a un estado de rechazo, a pesar de la administración sistemática de inmunosupresores.

El grupo ARG-GLI mostró una menor lesión respecto al grupo control ($p=0.04$).

El grupo ARG presentó una mayor linfocitosis sinusoidal respecto al grupo ARG-GLI ($p=0.01$) y respecto al grupo ARG-SAMe ($p=0.03$).

Figura 18: Grado de infiltración sinusoidal por linfocitos en los diferentes grupos. Porcentaje de casos por cada grado de lesión en cada grupo.



★ $p=0.04$ respecto al control y $p=0.01$ respecto al grupo ARG.

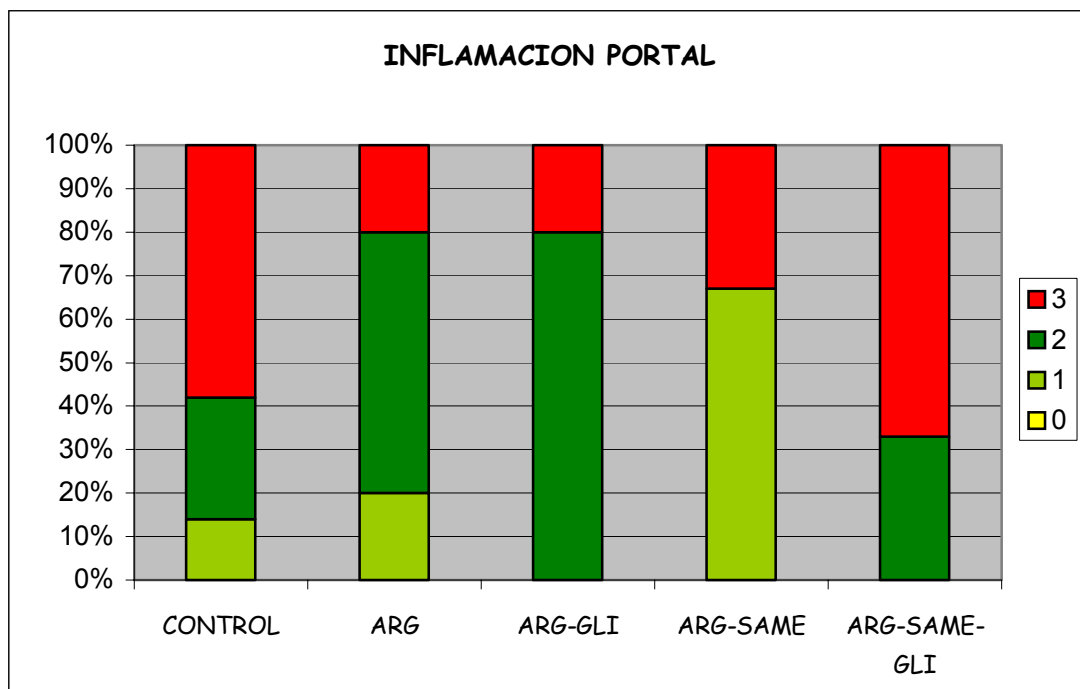
★ $p=0.03$ respecto al grupo ARG.

4.4.4.- Inflamación portal.

La presencia de células inflamatorias portales puede ser una respuesta inespecífica a un insulto o deberse a lesiones específicas, en especial hepatitis, en cuyo caso encontraremos especialmente linfocitos, o bien en cuadros de rechazo donde la celularidad es mixta (linfocitos, eosinófilos, polimorfonucleares y macrófagos).

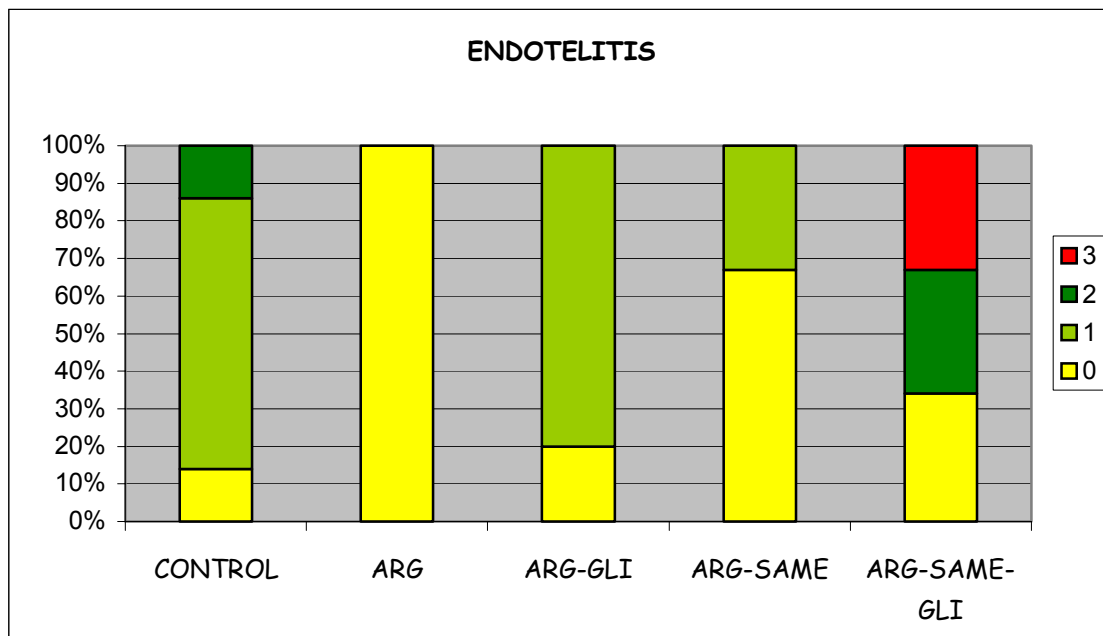
Todos los grupos mostraron un cierto grado de inflamación portal. Los grupos con mayor grado de lesión fueron el control y el tratado con las tres sustancias, no existiendo diferencias significativas.

Figura 19: Grado de inflamación portal en los diferentes grupos. Porcentaje de casos por cada grado de lesión en cada grupo.



4.4.5.- Endotelitis.

Figura 20: Grado de endotelitis en los diferentes grupos. Porcentaje de casos por cada grado de lesión en cada grupo.



En el grupo ARG-SAME-GLI existe endotelitis de grado comparable a las lesiones inflamatorias portales (probablemente por el rechazo).

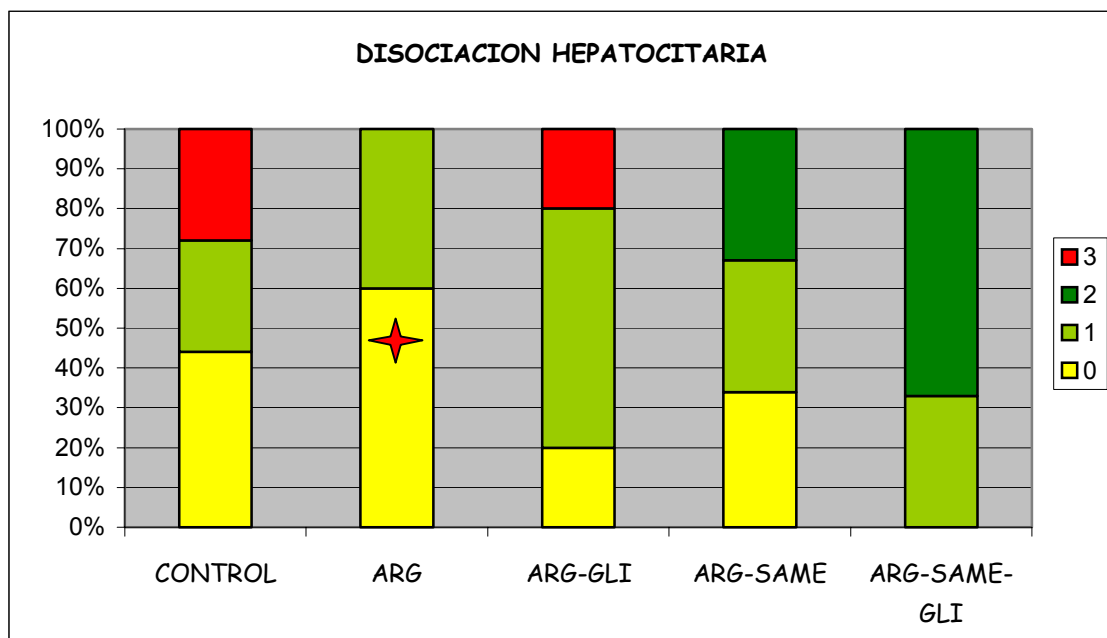
La presencia de infiltración subendotelial por linfocitos y/o lesiones destructivas del endotelio de venas hepáticas o portales indica un daño inmunitario frente al endotelio. Sin embargo, si bien es una lesión muy típica de rechazo agudo, puede también observarse en procesos de tipo hepático importantes. En este estudio, y teniendo en cuenta la existencia de otras lesiones coexistentes como la inflamación portal, cabe interpretar estos hallazgos como de rechazo.

4.4.6.- Disociación hepatocitaria.

Esta lesión traduce un daño celular durante la isquemia-reperfusión. La isquemia produce deformación de los hepatocitos, perdiendo su forma organizada alineada y poligonal, convirtiéndose en células redondeadas por edema intracelular (degeneración hidrópica). Aumenta el espacio entre los hepatocitos y las células endoteliales. Es el paso previo a la necrosis centrolobulillar.

No hubo diferencias significativas entre ningún grupo respecto al control. El grupo ARG mostró menor lesión respecto al tratado con ARG-SAMe-GLI ($p=0.04$). El grupo con mayor porcentaje de lesión severa fue el control.

Figura 21: Grado de disociación hepatocitaria en los diferentes grupos. Porcentaje de casos por cada grado de lesión en cada grupo.

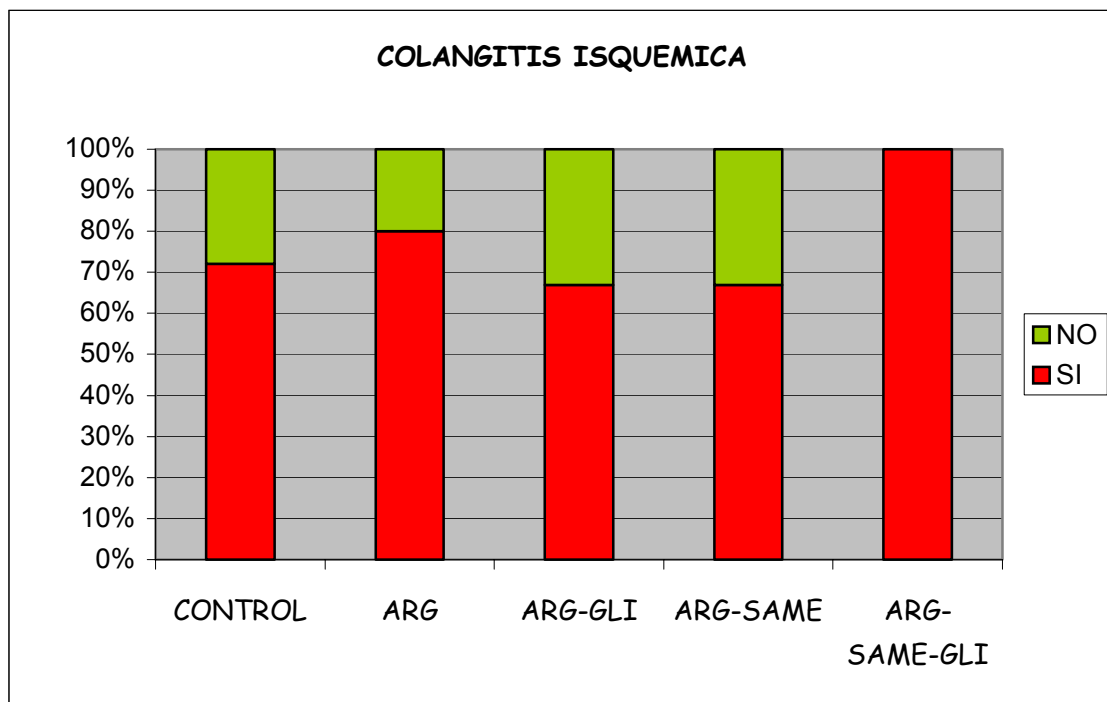


★ $p=0.04$ respecto al grupo ARG-SAMe-GLI.

4.4.7.- Colangitis isquémica.

En la colangitis isquémica existe frecuentemente obstrucción de la luz de conductos biliares de gran tamaño, hiliares y perihiliares. La lesión inicial incluye destrucción epitelial mediada inmunológicamente y necrosis isquémica del conducto biliar secundaria a lesión de la arteria hepática. La necrosis de la pared biliar se asocia a inflamación, acúmulo de detritus necróticos y material biliar que acaba taponando la vía. En la vía biliar intrahepática, de menor calibre, estas alteraciones se traducen como edema portal, mayor o menor grado de inflamación crónica y puede también existir proliferación colangiolar periportal.

Figura 22: Colangitis isquémica en los diferentes grupos. Porcentaje de casos que presentaban o no esta lesión en cada grupo.



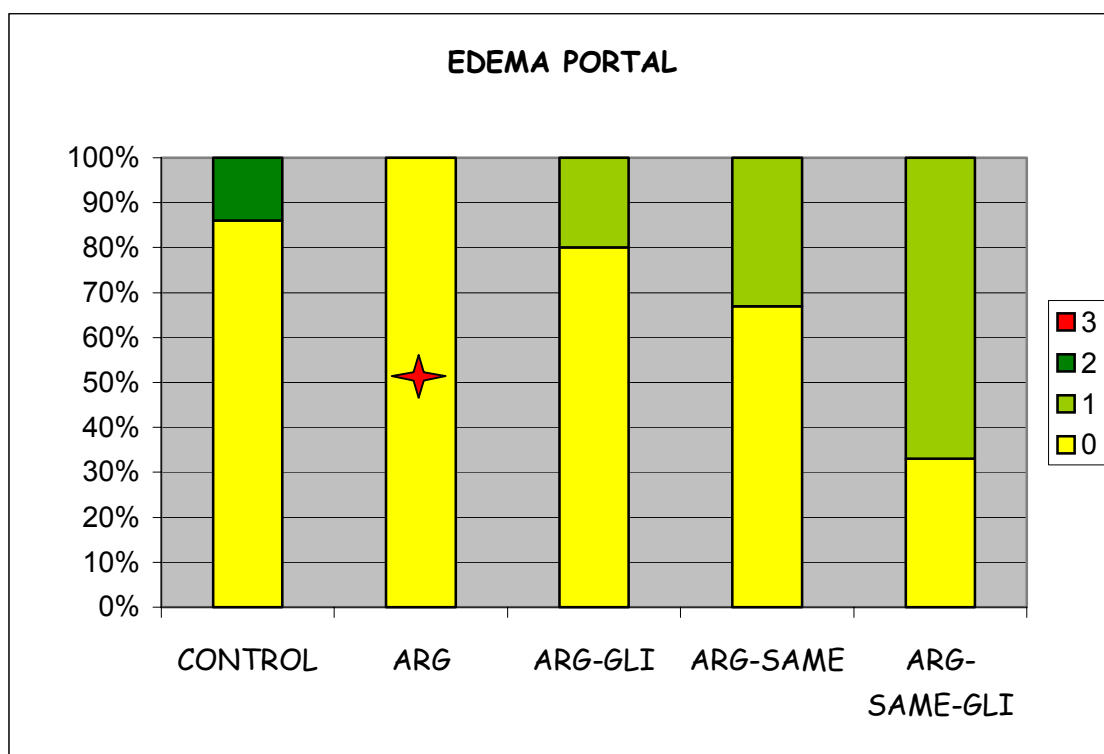
Todos los grupos mostraron una intensa lesión por colangitis isquémica, independientemente del tratamiento farmacológico.

4.4.8.- Edema portal.

El edema portal es una lesión poco frecuente en el trasplante y se puede observar en caso de obstrucción biliar extrahepática.

No hubo diferencias entre los grupos de estudio y el control. Hubo menor edema portal en el grupo tratado con ARG respecto al ARG-SAME-GLI ($p=0.04$).

Figura 23: Grado de edema portal en los diferentes grupos. Porcentaje de casos por cada grado de lesión en cada grupo.



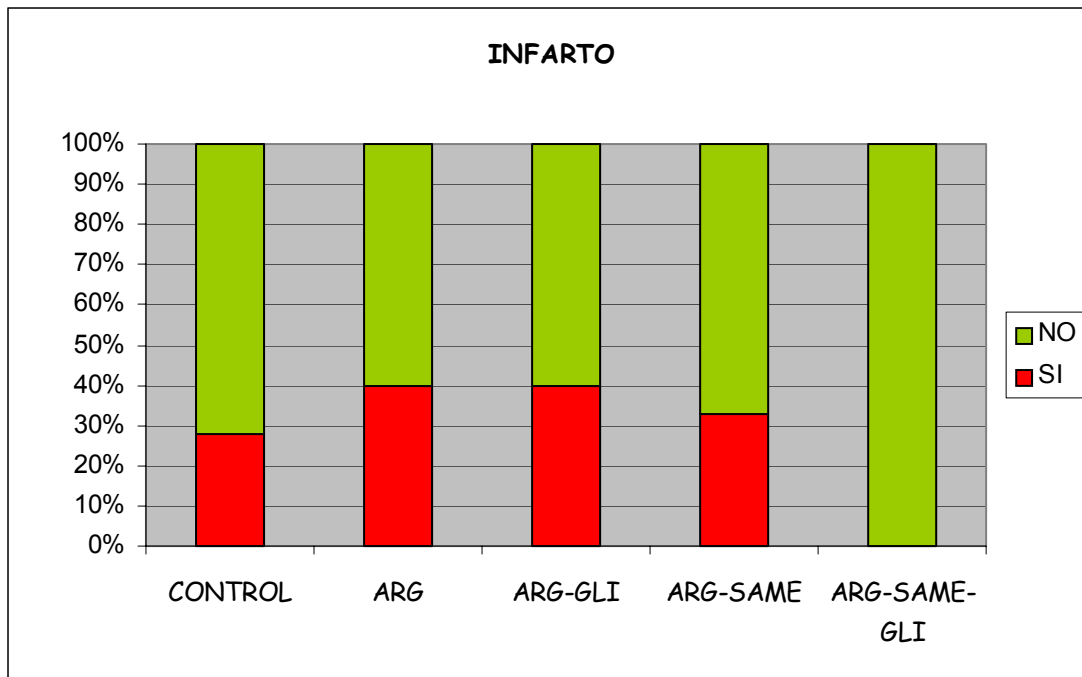
★ $p=0.04$ respecto al grupo ARG-SAME-GLI.

4.4.9.- Infarto.

El infarto se define como una zona localizada de necrosis isquémica en un órgano o tejido, resultante de la oclusión de su riego arterial o venoso. La lesión citológica es la necrosis de tipo coagulativo en la que los citoplasmas de las células hepáticas se vuelven más eosinófilos, densos, y los núcleos acaban desapareciendo. La extensión y la gravedad del infarto dependen del estado del sistema cardiovascular, del tipo anatómico de riego vascular, del ritmo en que se desarrolla y de la vulnerabilidad del tejido por la isquemia. La distribución anatómica puede ser variable, con zonas muy afectadas y otras menos, dependiendo del territorio que se afecte. Dado que el estudio histológico de este trabajo se realizó sobre una muestra limitada de tejido y no sobre el órgano entero, los resultados obtenidos en este apartado pueden estar sesgados.

El único grupo que no mostró zonas de infarto fue el tratado con las tres sustancias, existiendo lesión en todos los demás grupos.

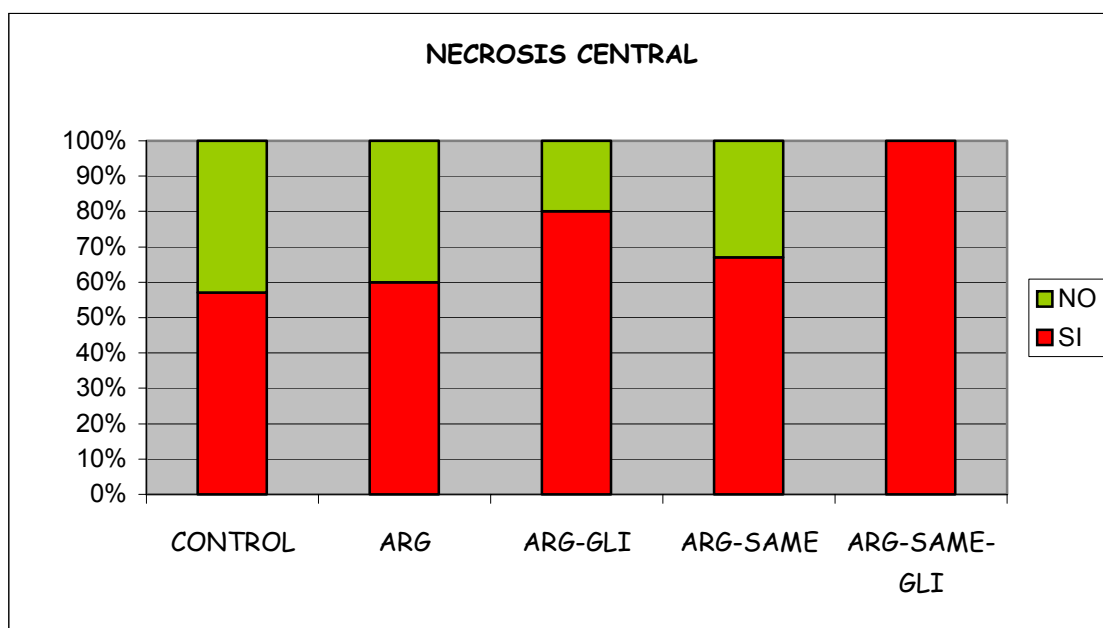
Figura 24: Presencia de infarto en los diferentes grupos. Porcentaje de casos que presentaban o no esta lesión en cada grupo.



4.4.10.- Necrosis.

La necrosis celular se refiere a la muerte celular de los hepatocitos como consecuencia de la isquemia en este estudio. Traduce un contexto de isquemia que se objetiva especialmente en los hepatocitos más alejados geográficamente de la zona de aporte vascular, como son los situados alrededor de la vena centrolobulillar. Se ha valorado este resultado como un porcentaje aproximado de la necrosis del lobulillo. Dicha lesión también estuvo presente en todos los grupos, en la mayor parte de las biopsias.

Figura 25: Necrosis isquémica centrolobulillar en los diferentes grupos. Porcentaje de casos que presentaban o no esta lesión en cada grupo.



4.4.11.- Área necrótica media o porcentaje de necrosis.

La necrosis centrolobulillar objetiva que ha existido una lesión isquémica del parénquima hepático que ha provocado necrosis de células más alejadas de la circulación / oxigenación, que son las células alrededor de la vena centrolobulillar. Esta necrosis es altamente variable, dependiendo de las zonas anastomóticas intrahepáticas y del grado de lesión predominantemente arterial existente. Siempre habrá más lesión en las zonas más periféricas del hígado (subcapsulares) y menor en las zonas centrales, por lo que dependiendo de donde se tome la biopsia o muestra a estudiar, el resultado puede variar.

La siguientes figuras muestran el porcentaje de área necrótica en la pieza hepática biopsiada del 5º día. En azul se muestra el porcentaje de área necrótica, y en granate el porcentaje de área de parénquima normal.

Figura 26: Área necrótica media en el grupo control. En azul, área necrótica. En granate, área de parénquima normal sin necrosis.

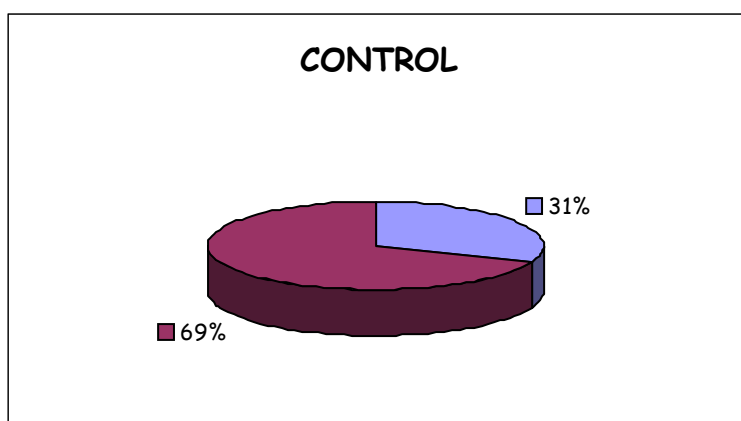


Figura 27: Área necrótica media en el grupo arginina. En azul, área necrótica. En granate, área de parénquima normal sin necrosis.

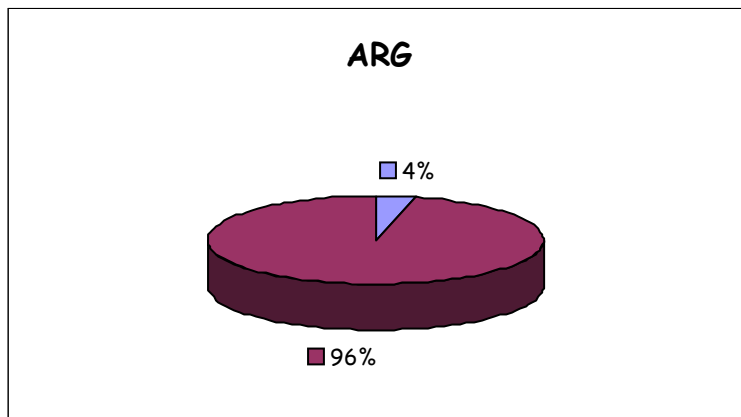


Figura 28: Área necrótica media en el grupo arginina-glicina. En azul, área necrótica. En granate, área de parénquima normal sin necrosis.

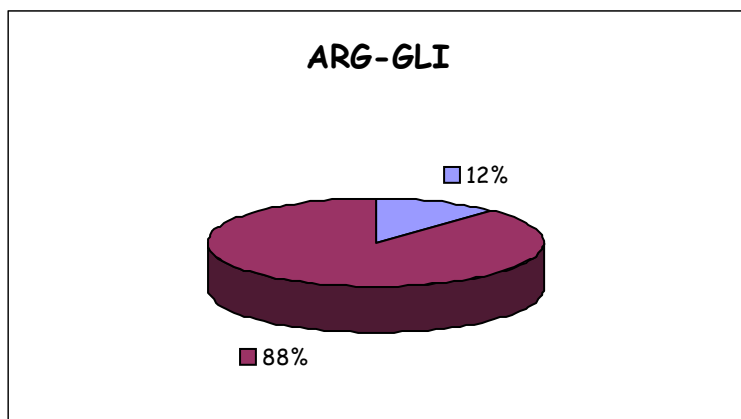


Figura 29: Área necrótica media en el grupo arginina-SAMe. En azul, área necrótica. En granate, área de parénquima normal sin necrosis.

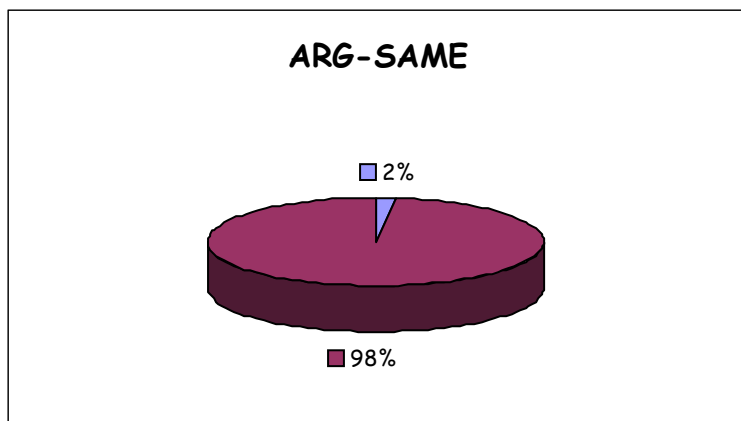
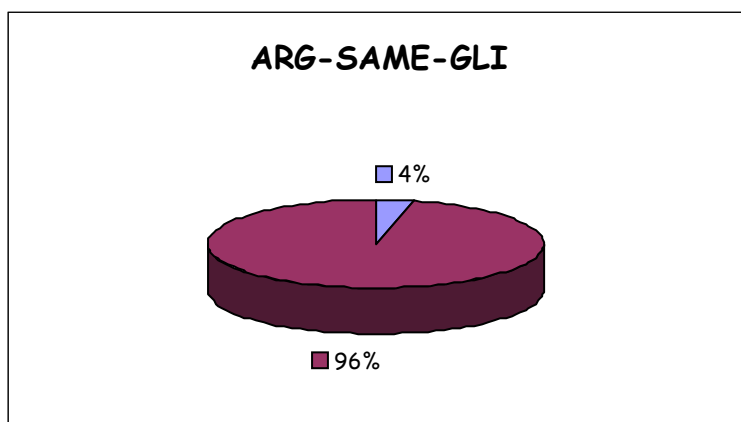


Figura 30: Área necrótica media en el grupo arginina-SAMe-glicina. En azul, área necrótica. En granate, área de parénquima normal sin necrosis.



Aquí destacamos que el grupo que mostró mayor área necrótica fue el grupo control, y si comparamos grupo "control" contra grupo "tratamiento", vemos que existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) a favor del grupo "tratamiento", es decir, que los grupos tratados con alguna sustancia farmacológica o con varias de éstas, tuvieron menor área necrótica hepática que el grupo control.

El grupo tratado con arginina presentó menos área necrótica que el grupo control ($p < 0.05$).

El grupo arg-gli mostró menor área necrótica que el control, sin diferencias significativas ($p > 0.05$).

El grupo arg-SAMe también obtuvo menor área necrótica que el control ($p < 0.05$).

El grupo arg-SAMe-gli también presentó menor porcentaje de necrosis que el control ($p < 0.05$).

4.4.12.- Imágenes de la histología al 5º día.

Figura 31: Imagen histológica de una zona de parénquima normal. No dilatación sinusoidal. No inflamación . No necrosis.

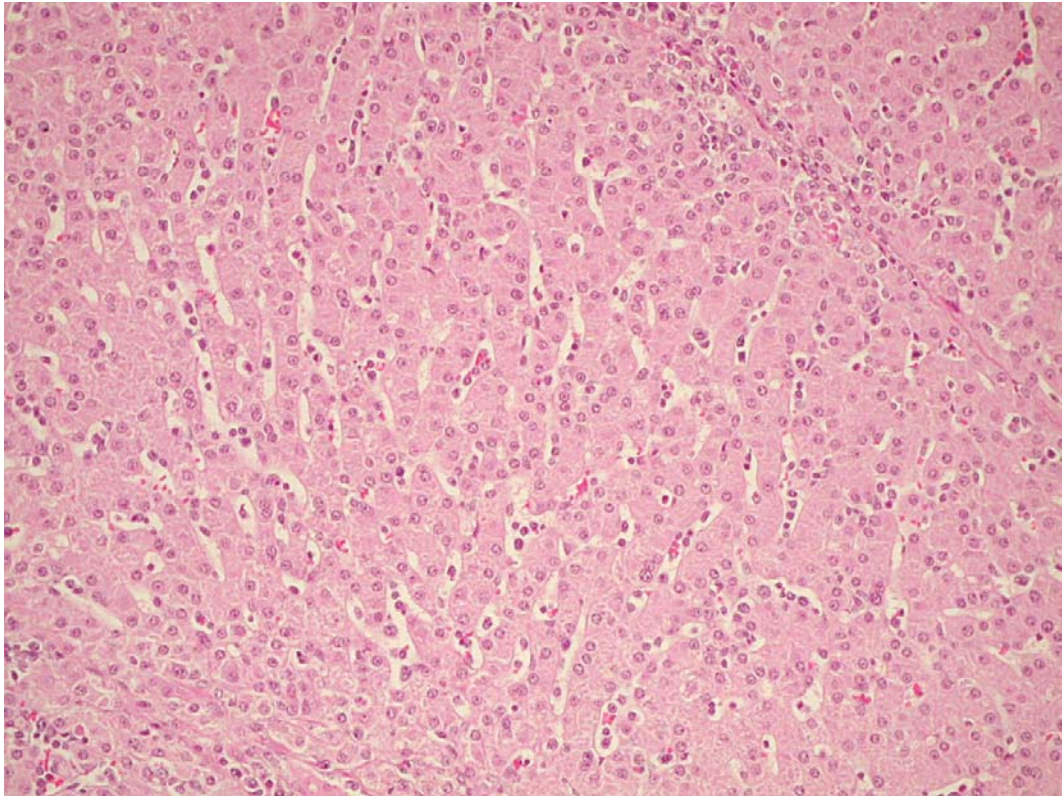


Figura 32: Vía extrahepática normal. Aproximación de una zona de necrosis coagulativa centrolobulillar. Los hepatocitos están más eosinófilos, con citoplasmas densos y borramiento del núcleo.

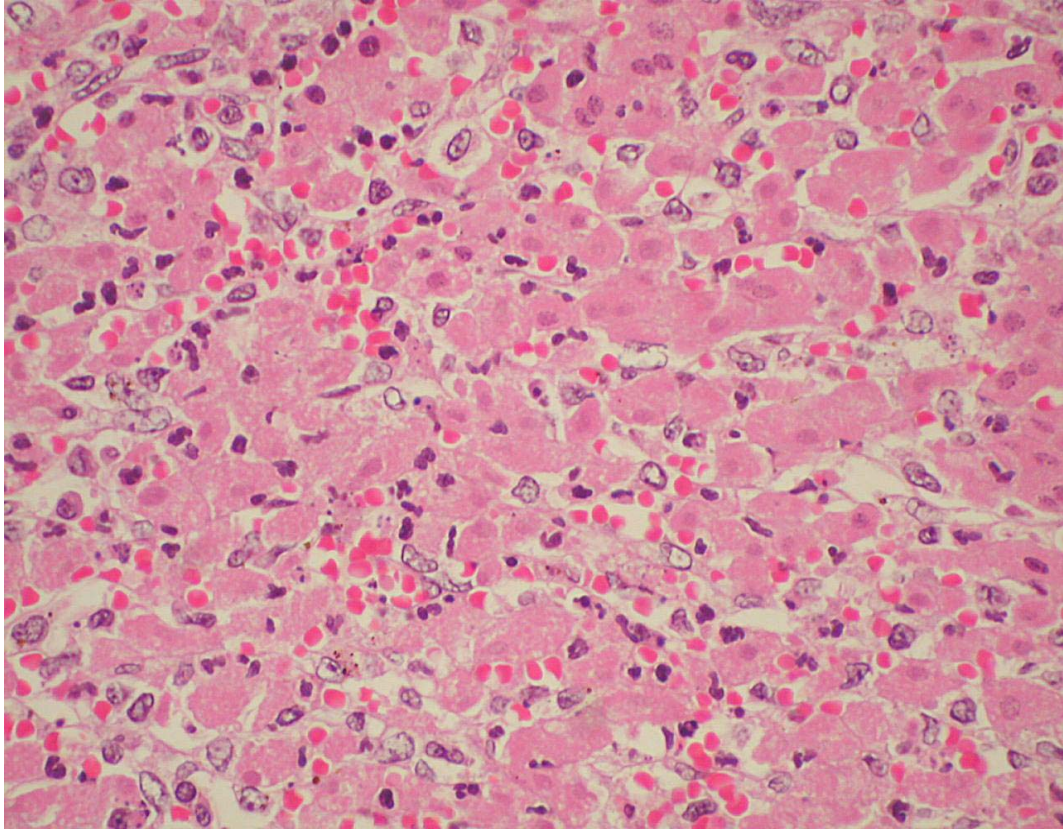
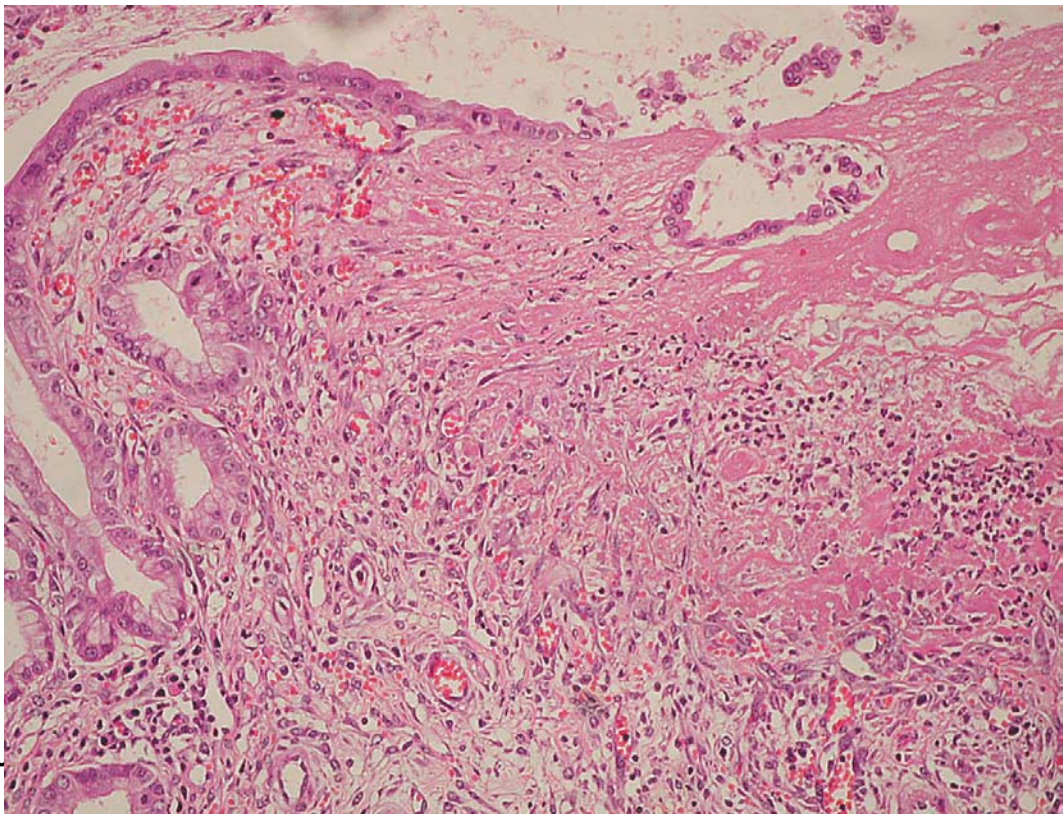


Figura 33: Imagen de necrosis de la vía biliar extrahepática. Necrosis del epitelio de la vía biliar.



Fig



Figura 35: Imagen histológica de un área de infarto con necrosis coagulativa difusa de todo un área.

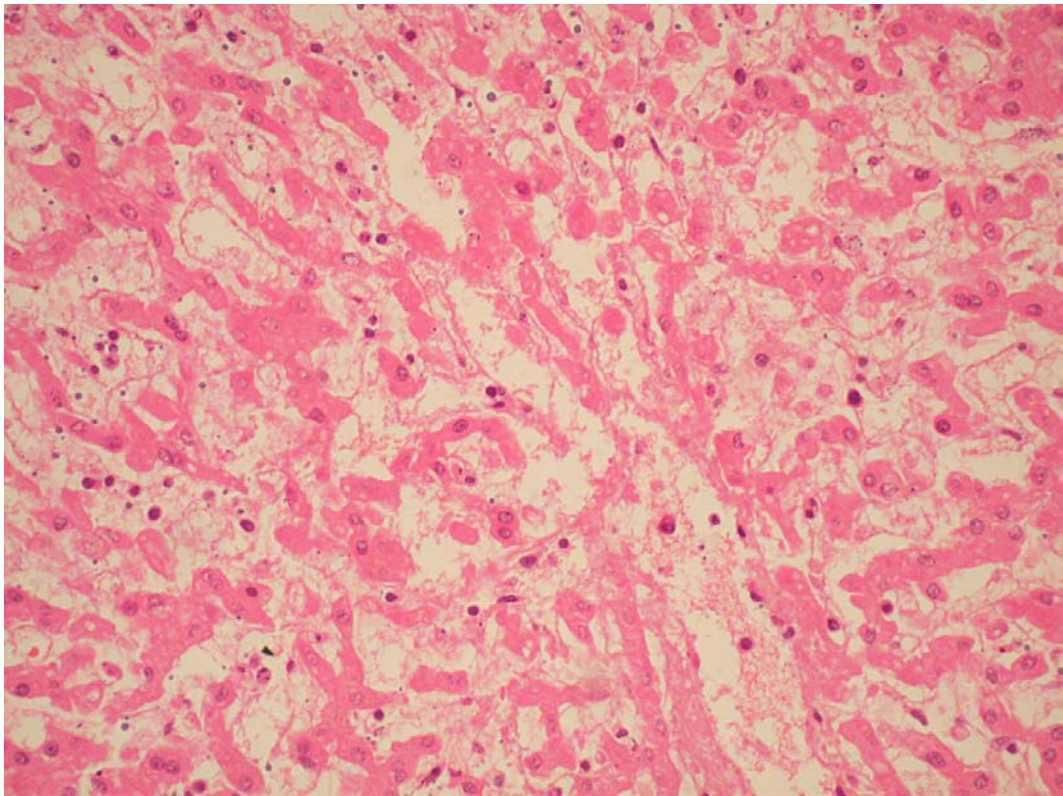


Figura 36: Inflamación portal densa (predominantemente linfocitos).

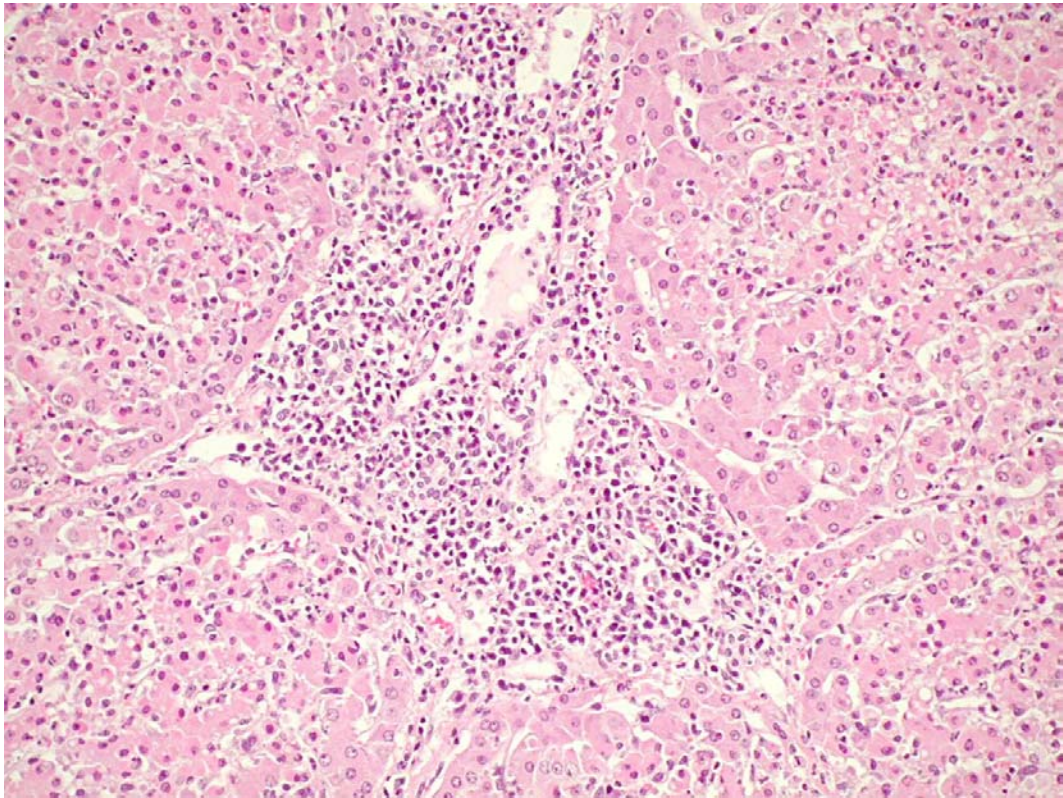


Figura 37: Dilatación sinusoidal de grado 3.

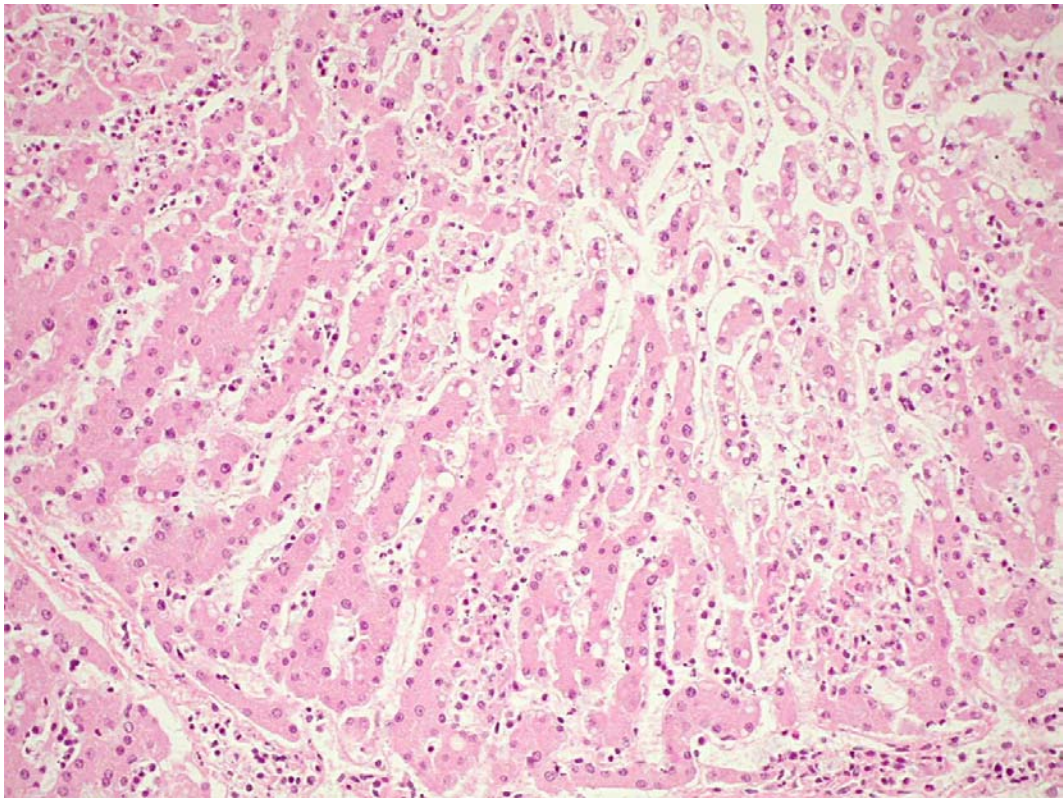
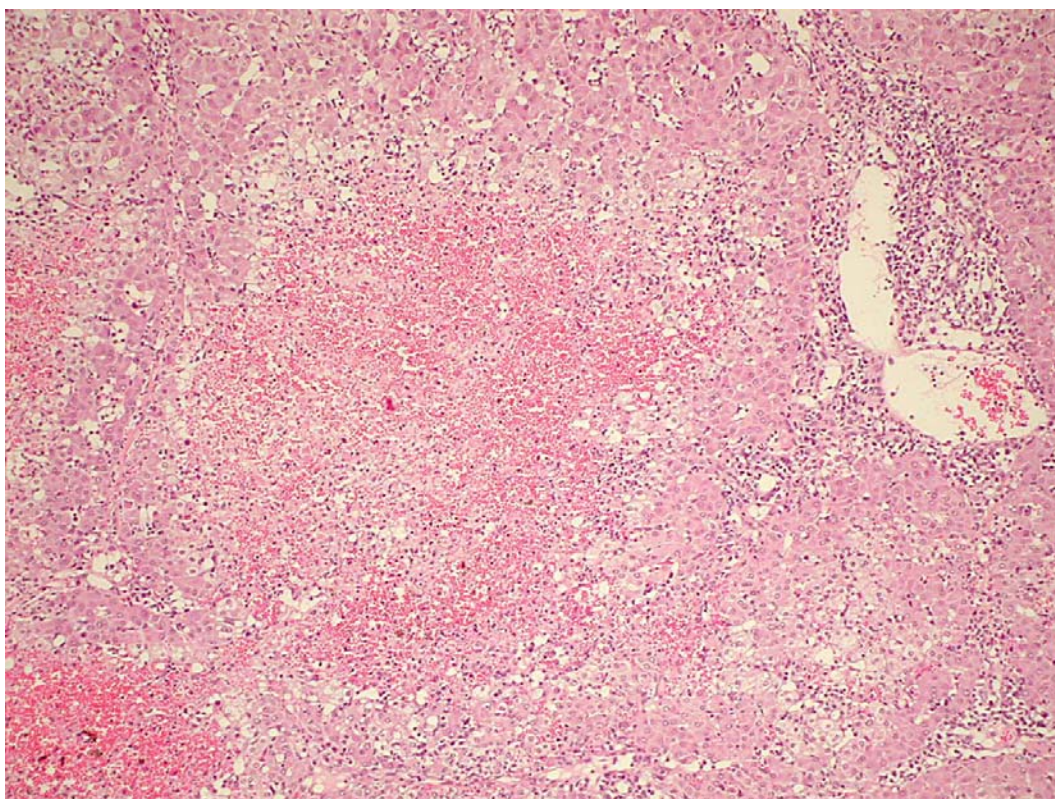


Figura 38: Aproximación macroscópica de una zona subcapsular con hemorragia puntual correspondiente a hemorragias de áreas centrolobulillares.



Figura 39: Necrosis hemorrágicas centrolobulillares.



4.5.- Estudio de los flujos sanguíneos hepáticos durante la recirculación normotérmica.

4.5.1.- Efecto de los tratamientos sobre los flujos sanguíneos hepáticos durante la recirculación extracorpórea.

4.5.1.1.- Flujo sanguíneo arterial.

Figura 40: Efecto de los diferentes tratamientos sobre los flujos sanguíneos de arteria hepática durante la recirculación normotérmica.

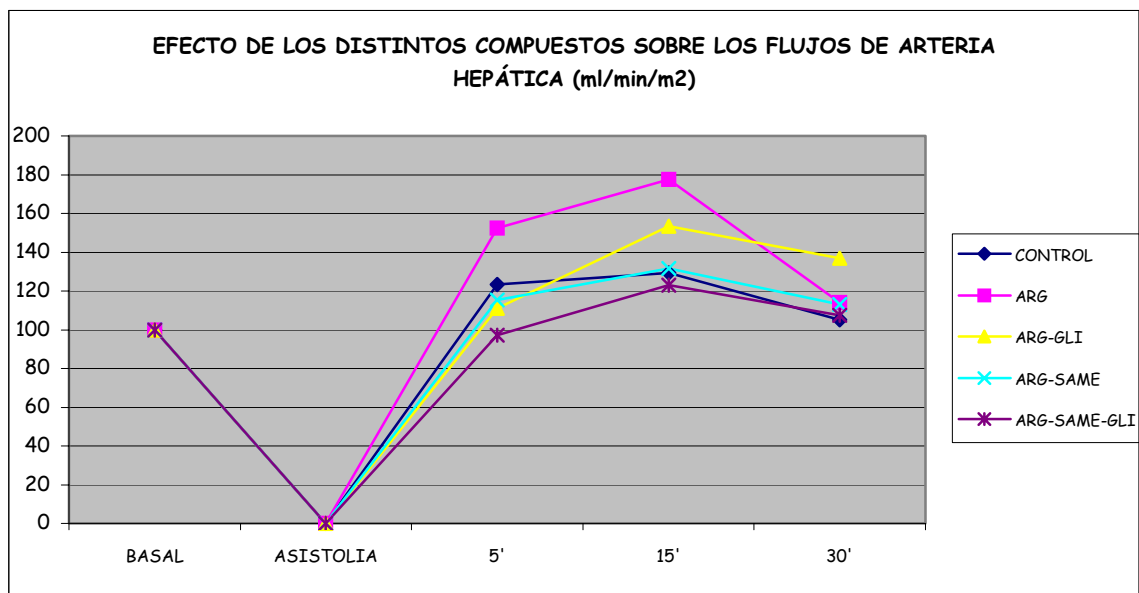


Tabla 6: Efecto de los diferentes tratamientos sobre los flujos sanguíneos de arteria hepática durante la recirculación normotérmica. Valores expresados como media \pm desviación estándar en ml/min/m².

| | Valor basal | Asistolia | 5´ | 15´ | 30´ |
|---------------------------|-------------|-----------|---------------|---------------|--------------|
| Grupo control | 100 \pm 0 | 0 | 123 \pm 73 | 129 \pm 82 | 105 \pm 51 |
| Grupo ARG | 100 \pm 0 | 0 | 152 \pm 51 | 177 \pm 57 | 114 \pm 62 |
| Grupo ARG-GLI | 100 \pm 0 | 0 | 110 \pm 134 | 153 \pm 144 | 137 \pm 50 |
| Grupo ARG-SAMe | 100 \pm 0 | 0 | 115 \pm 99 | 131 \pm 109 | 113 \pm 53 |
| Grupo ARG-SAMe-GLI | 100 \pm 0 | 0 | 97 \pm 61 | 122 \pm 65 | 107 \pm 71 |

El flujo sanguíneo de la arteria hepática se recupera durante la RN en todos los grupos, obteniendo mayores flujos en el grupo tratado con arginina, con respecto a los demás grupos.

-ARG: Los flujos arteriales basales en este grupo y en el control no fueron estadísticamente diferentes. El tratamiento con arginina sola sin adición de otras sustancias consiguió aumentar el flujo arterial de forma no significativa.

-ARG-GLI: Los flujos arteriales basales en este grupo y en el control no fueron estadísticamente diferentes. Tampoco hubo diferencias de flujos en los demás tiempos durante la RN.

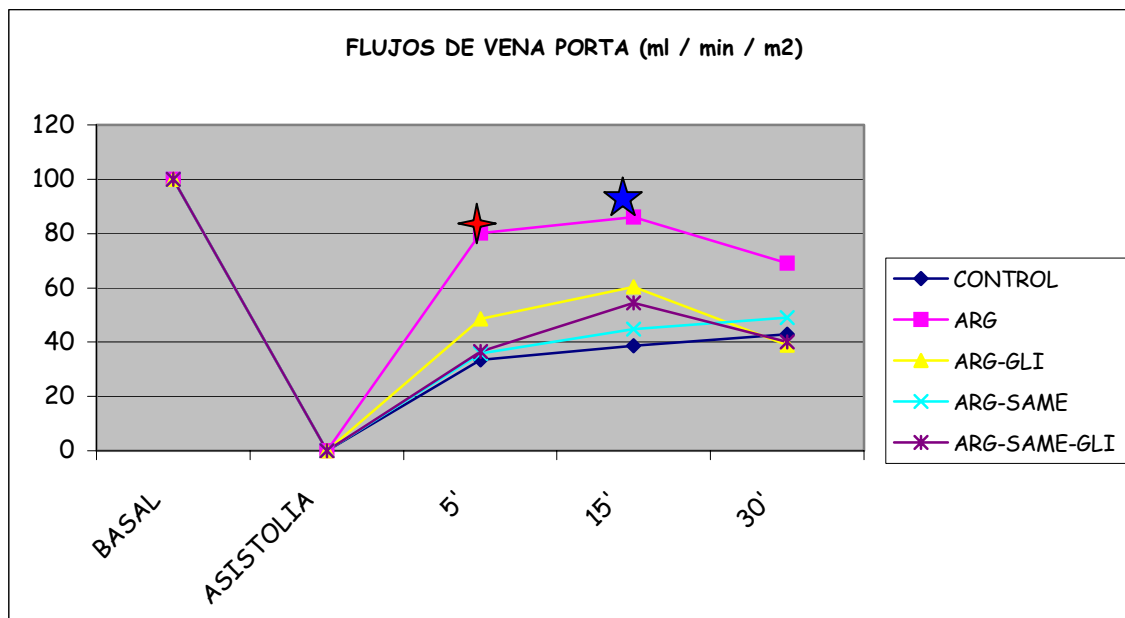
-ARG-SAMe: Los flujos arteriales basales en este grupo y en el control no fueron estadísticamente diferentes. El tratamiento con arginina y SAMe

no fue capaz de aumentar los flujos arteriales por encima del grupo control.

-ARG-SAMe-GLI: Los flujos arteriales basales en este grupo y en el control no fueron estadísticamente diferentes. Los flujos arteriales en este grupo fueron inferiores al control de forma no significativa a los 5 y 15 minutos de RN.

4.5.1.2.- Flujo sanguíneo portal.

Figura 41: Efecto de los diferentes tratamientos sobre los flujos sanguíneos de vena porta durante la recirculación normotérmica.



★ p=0.02 respecto al control y ARG-SAME y p=0.03 respecto al ARG-SAME-GLI.

★ p=0.03 respecto al control y p=0.04 respecto al ARG-SAME.

Tabla 7: Efecto de los diferentes tratamientos sobre los flujos sanguíneos de vena porta durante la recirculación normotérmica. Valores expresados como media ± desviación estándar en ml/min/m2.

| | Valor basal | Asistolia | 5' | 15' | 30' |
|---------------------------|-------------|-----------|---------|---------|---------|
| Grupo control | 100 ± 0 | 0 | 33 ± 14 | 38 ± 23 | 42 ± 30 |
| Grupo ARG | 100 ± 0 | 0 | 80 ± 58 | 86 ± 64 | 69 ± 52 |
| Grupo ARG-GLI | 100 ± 0 | 0 | 48 ± 35 | 60 ± 46 | 38 ± 21 |
| Grupo ARG-SAME | 100 ± 0 | 0 | 35 ± 37 | 44 ± 24 | 49 ± 36 |
| Grupo ARG-SAME-GLI | 100 ± 0 | 0 | 36 ± 16 | 54 ± 35 | 40 ± 25 |

Los flujos sanguíneos de vena porta no recuperan su nivel basal tras 60 minutos de asistolia en ninguno de los grupos.

-ARG: Los flujos basales en este grupo y el control no fueron estadísticamente diferentes. El tratamiento con arginina consiguió aumentar el flujo portal sobre el control a los 5 minutos ($p=0,02$) y a los 15 minutos ($p=0,03$). También aumentó el flujo respecto a otros grupos de estudio: a los 5 minutos respecto al grupo ARG-SAMe ($p=0,02$) y respecto al grupo ARG-SAMe-GLI ($p=0,03$); a los 15 minutos aumentó el flujo respecto al grupo ARG-SAMe ($p=0,04$).

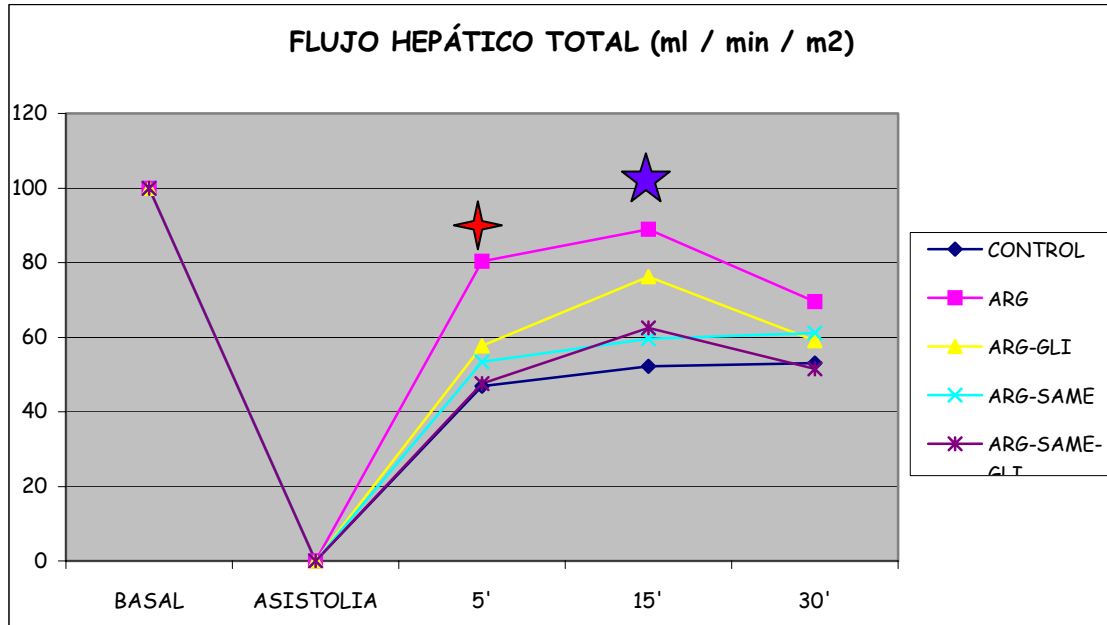
-ARG-GLI: Los flujos basales en este grupo y el control no fueron estadísticamente diferentes. El tratamiento con arginina y glicina aumentó los flujos sobre el grupo control a los 5 y 15 minutos de la RN de forma no significativa.

-ARG-SAMe: Los flujos basales en este grupo y el control no fueron estadísticamente diferentes. El tratamiento con arginina y SAMe no fue capaz de aumentar los flujos portales sobre el grupo control.

-ARG-SAMe-GLI: Los flujos basales en este grupo y el control no fueron estadísticamente diferentes. Este tratamiento tampoco varió significativamente respecto al control.

4.5.1.3.- Flujo sanguíneo hepático total.

Figura 42: Efecto de los diferentes tratamientos sobre los flujos sanguíneos hepáticos durante la recirculación normotérmica.



★ P=0.02 respecto al control y respecto al ARG-SAME-GLI y p=0.04 respecto al ARG-SAME.

★ P=0.02 respecto al control.

Tabla 8: Efecto de los diferentes tratamientos sobre los flujos sanguíneos hepáticos durante la recirculación normotérmica. Valores expresados como media ± desviación estándar en ml/min/m2.

| | Valor basal | Asistolia | 5' | 15' | 30' |
|---------------------------|-------------|-----------|---------|---------|---------|
| Grupo control | 100 ± 0 | 0 | 46 ± 11 | 52 ± 18 | 53 ± 30 |
| Grupo ARG | 100 ± 0 | 0 | 80 ± 31 | 88 ± 34 | 69 ± 31 |
| Grupo ARG-GLI | 100 ± 0 | 0 | 57 ± 37 | 76 ± 48 | 59 ± 17 |
| Grupo ARG-SAME | 100 ± 0 | 0 | 53 ± 29 | 59 ± 19 | 61 ± 33 |
| Grupo ARG-SAME-GLI | 100 ± 0 | 0 | 47 ± 19 | 62 ± 22 | 51 ± 21 |

-ARG: Los flujos hepáticos totales basales en este grupo y en el control no fueron estadísticamente diferentes. El tratamiento con arginina consiguió aumentar significativamente el flujo hepático total con respecto al grupo control a los 5 minutos ($p=0,02$) y a los 15 minutos ($p=0,02$). El grupo arginina también fue capaz de aumentar el flujo hepático por encima del grupo arginina-SAMe ($p=0,04$) y por encima del grupo arginina-SAMe-glicina ($p=0,02$) a los 5 minutos de RN.

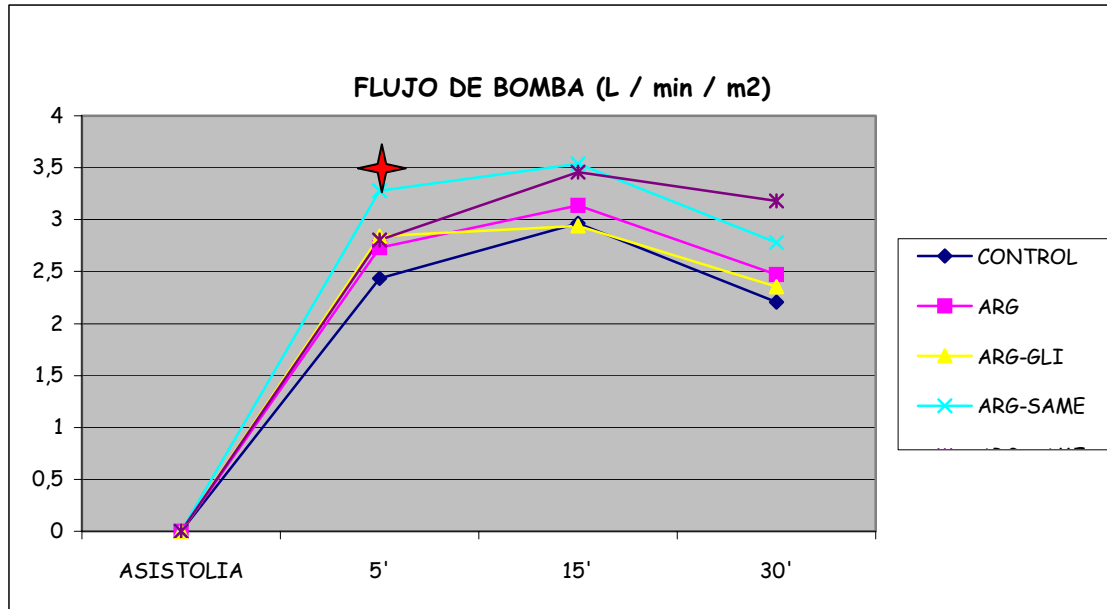
-ARG-GLI: Los flujos hepáticos totales basales en este grupo y en el control no fueron estadísticamente diferentes. El tratamiento con arginina y glicina aumentó el flujo en todos los tiempos respecto al grupo control, de forma no significativa.

-ARG-SAMe: Los flujos hepáticos totales basales en este grupo y en el control no fueron estadísticamente diferentes. El tratamiento con arginina y SAMe aumentó el flujo en todos los tiempos respecto al grupo control, de forma no significativa.

-ARG-SAMe-GLI: Los flujos hepáticos totales basales en este grupo y en el control no fueron estadísticamente diferentes. El tratamiento con arginina, SAMe y glicina no consiguió aumentar los flujos por encima del grupo control de forma significativa.

4.5.1.4.- Flujo sanguíneo en la bomba de recirculación extracorpórea.

Figura 43: Efecto de los diferentes tratamientos sobre los flujos sanguíneos de la bomba de recirculación extracorpórea.



★ p=0.03 respecto al grupo control.

Tabla 9: Efecto de los diferentes tratamientos sobre los flujos sanguíneos de bomba durante la recirculación normotérmica. Valores expresados como media ± desviación estándar en ml/min/m2.

| | Valor basal | Asistolia | 5' | 15' | 30' |
|---------------------------|-------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Grupo control | 100 ± 0 | 0 | 2.4 ± 0.4 | 2.9 ± 0.9 | 2.2 ± 0.6 |
| Grupo ARG | 100 ± 0 | 0 | 2.7 ± 0.3 | 3.1 ± 0.4 | 2.4 ± 0.7 |
| Grupo ARG-GLI | 100 ± 0 | 0 | 2.8 ± 0.6 | 2.9 ± 0.9 | 2.3 ± 1 |
| Grupo ARG-SAME | 100 ± 0 | 0 | 3.2 ± 1.2 | 3.5 ± 1.1 | 2.7 ± 1.4 |
| Grupo ARG-SAME-GLI | 100 ± 0 | 0 | 2.8 ± 0.5 | 3.4 ± 1 | 3.1 ± 1.4 |

-ARG: No hubo diferencias significativas en el flujo de bomba entre el grupo control y el grupo al que se administró arginina.

-ARG-GLI: El tratamiento combinado con arginina y glicina no fue capaz de aumentar de forma significativa el flujo de bomba con respecto al grupo control.

-ARG-SAMe: Este tratamiento alcanzó flujos de bomba superiores al grupo control ($p= 0,03$) a los 5 minutos de iniciar la RN, mostrando una tendencia durante todo el tiempo a ser más elevado.

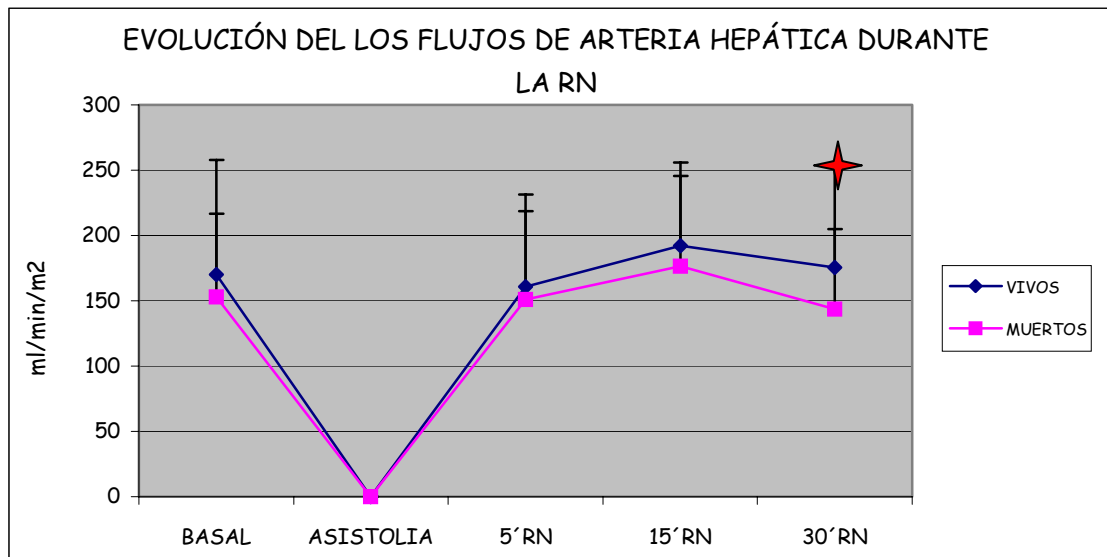
-ARG-SAMe-GLI: Este tratamiento mostró valores superiores de flujos de bomba respecto al grupo control, de forma no significativa.

4.5.2.- Diferencias en los flujos sanguíneos durante la RN entre los animales supervivientes.

Hemos comparado los flujos entre los animales que sobrevivieron hasta el 5º día y los que fallecieron antes de ser sacrificados, con el fin de evaluar si existe correlación entre la supervivencia y los flujos.

4.5.2.1.- Flujo sanguíneo arterial.

Figura 44: Diferencias en los flujos de arteria hepática entre los animales vivos al 5º día y los muertos.

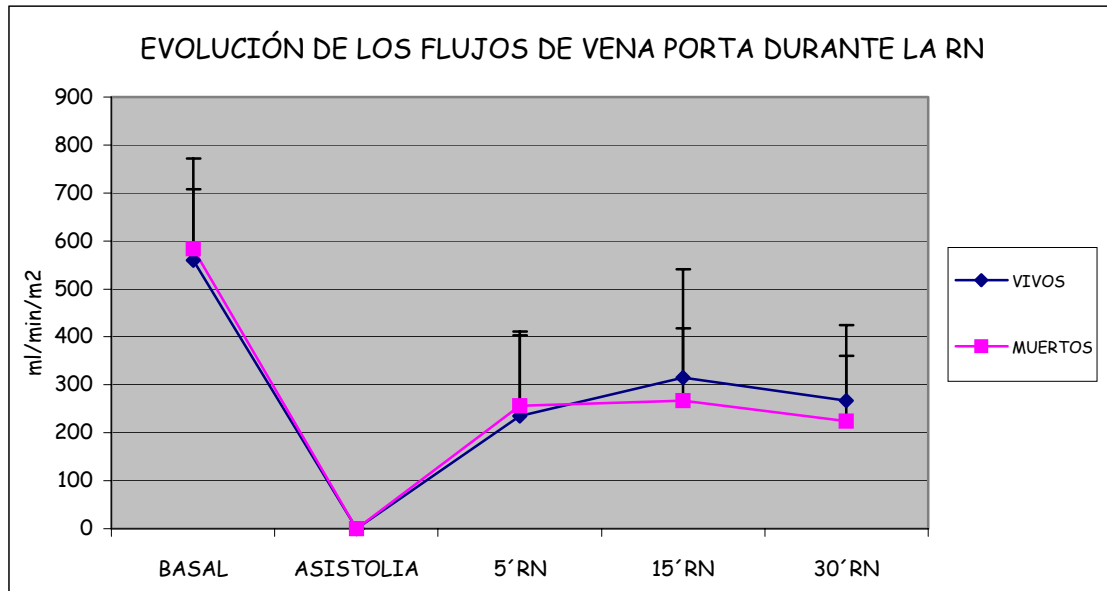


★ p=0.04 respecto a los animales muertos.

El flujo arterial a los 30 minutos de la RN fue significativamente mayor en los animales vivos ($F=4.2$, $p=0.04$). No hubo diferencias significativas entre animales vivos al 5º día y muertos en cuanto al flujo arterial basal, 5 y 15 minutos.

4.5.2.2.- Flujo sanguíneo portal.

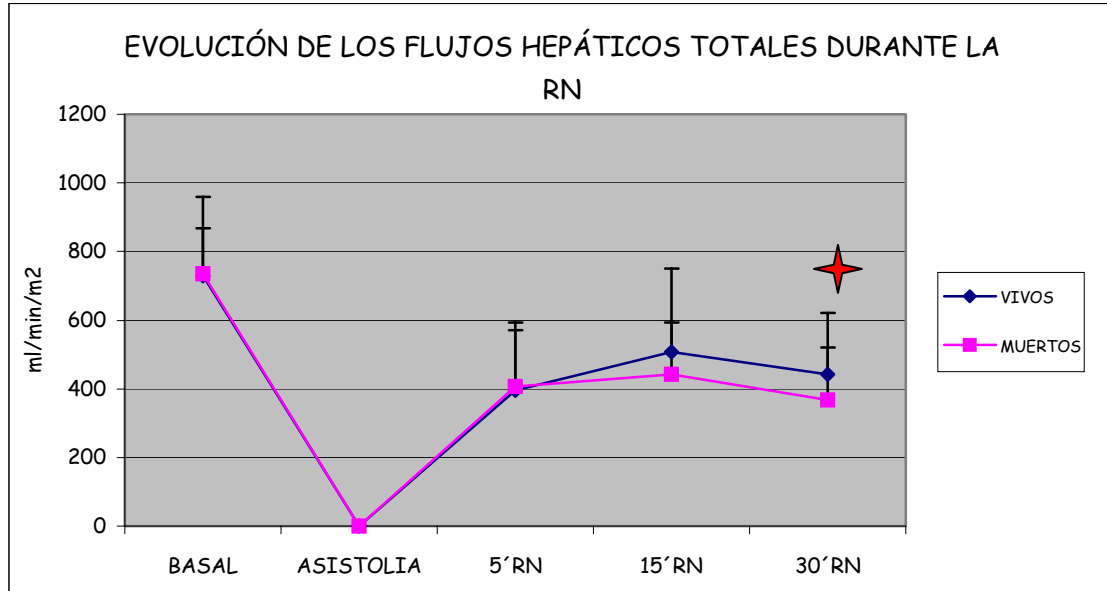
Figura 45: Diferencias en los flujos de vena porta entre los animales vivos al 5° día y los muertos.



No hubo diferencias significativas en cuanto al flujo portal entre animales vivos y muertos, en ninguno de los tiempos. No obstante, observamos una tendencia hacia un flujo portal superior en el grupo de vivos.

4.5.2.3.- Flujo sanguíneo hepático total.

Figura 46: Diferencias en los flujos hepáticos entre los animales vivos al 5° día y los muertos.

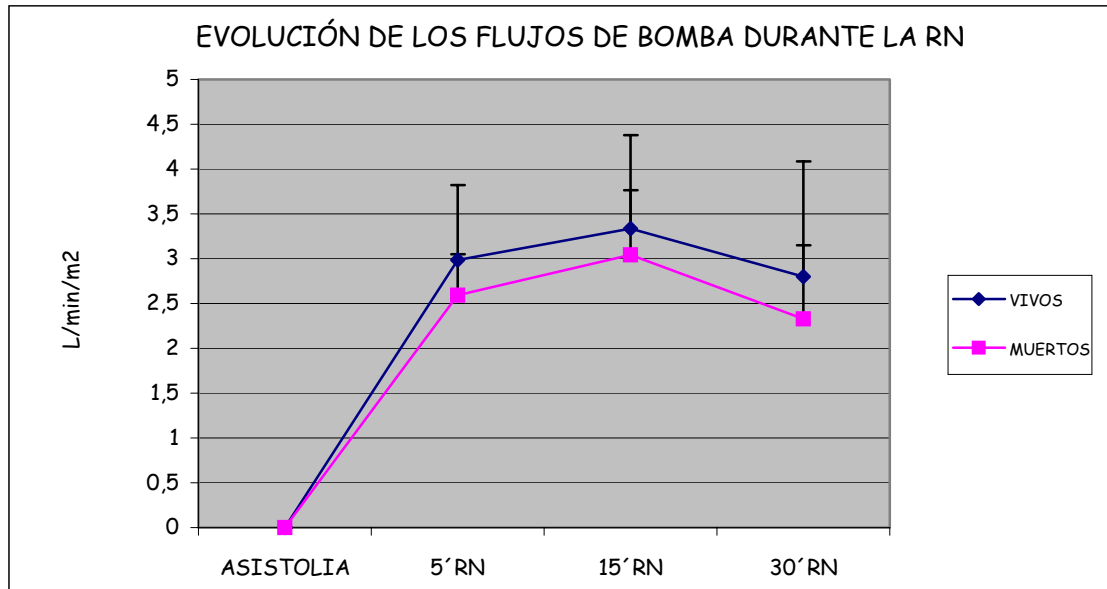


★ $p=0.047$ respecto a los animales muertos.

El flujo hepático total en los animales vivos fue significativamente superior a los 30 minutos ($F=4.1$, $p=0.047$). No hubo diferencias a los 5 y 15 minutos.

4.5.2.4.- Flujo sanguíneo de bomba.

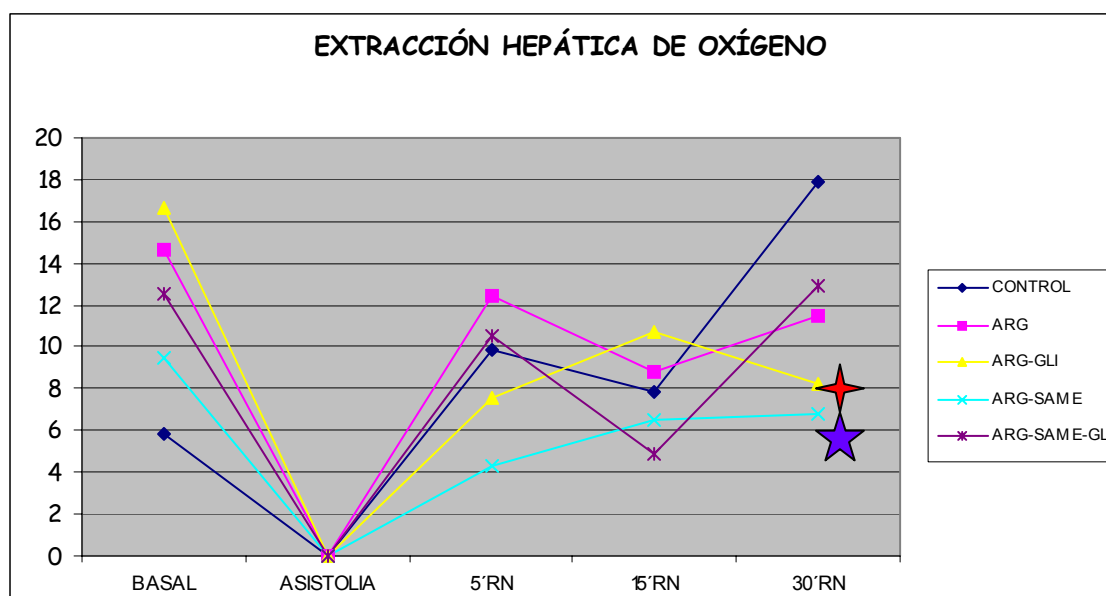
Figura 47: Diferencias en los flujos de la bomba de recirculación extracorpórea entre los animales vivos al 5º día y los muertos.



Vemos una tendencia superior en el grupo de vivos a aumentar el flujo de bomba respecto a los animales fallecidos antes del 5º día, sin diferencias estadísticamente significativas.

4.6.- Metabolismo hepático del oxígeno durante la RN.

Figura 48: Efecto de los distintos tratamientos sobre la extracción hepática de oxígeno durante la recirculación normotérmica.



★ p=0.04 respecto al control.

★ p=0.03 respecto al control.

Tabla 10: Efecto de los diferentes tratamientos sobre la extracción hepática de oxígeno durante la recirculación normotérmica. Valores expresados como media \pm desviación estándar en ml/min/m².

| | Valor basal | Asistolia | 5´ | 15´ | 30´ |
|---------------------------|-------------|-----------|--------------|-------------|-------------|
| Grupo control | 5.8 \pm 4 | 0 | 9.8 \pm 10 | 7.8 \pm 6 | 17 \pm 6 |
| Grupo ARG | 14 \pm 9 | 0 | 12 \pm 6 | 8.8 \pm 4 | 11 \pm 8 |
| Grupo ARG-GLI | 16 \pm 16 | 0 | 7.5 \pm 8 | 10 \pm 6 | 8.2 \pm 6 |
| Grupo ARG-SAME | 9 \pm 6 | 0 | 4.3 \pm 5 | 6.4 \pm 6 | 6.7 \pm 7 |
| Grupo ARG-SAME-GLI | 12 \pm 6 | 0 | 10 \pm 6 | 4.8 \pm 4 | 12 \pm 9 |

No hubo diferencias estadísticas en el nivel basal de extracción hepática de oxígeno (EHO) entre los distintos grupos.

A los 5 minutos de RN todos los grupos descienden su valor respecto al nivel basal excepto el grupo control, que aumenta.

-ARG: Este grupo no varió significativamente respecto al control ni con los demás grupos en ninguna de las fases, aunque durante toda la RN descendió la EHO por debajo de su nivel basal.

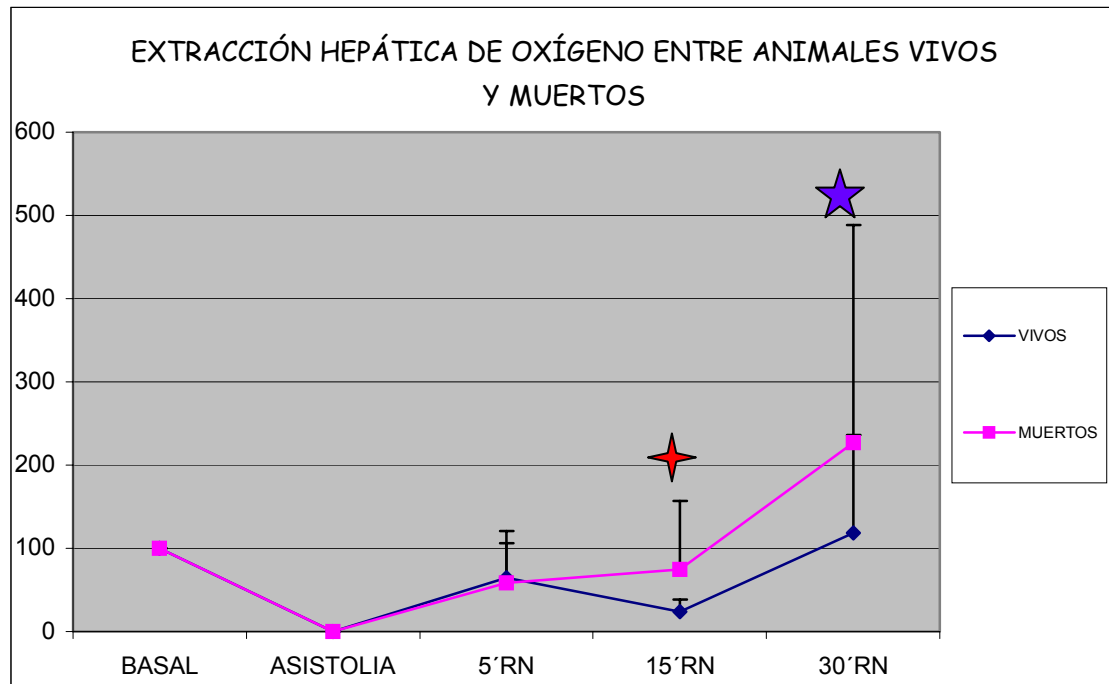
-ARG-GLI: El tratamiento con arginina y glicina descendió la EHO por debajo del grupo control a los 30 minutos de iniciar la RN ($p=0.04$). No hubo diferencias con los demás grupos en ningún tiempo.

-ARG-SAMe: Este grupo también descendió la EHO por debajo del control a los 30 minutos ($p=0.03$) y en todos los tiempos estuvo bajo su nivel basal.

-ARG-SAMe-GLI: No hubo diferencias entre este grupo y los demás en ninguno de los tiempos.

4.6.1.- Diferencias en la extracción hepática de oxígeno durante la RN entre los animales supervivientes.

Figura 49: Diferencias en la extracción hepática de oxígeno entre los animales vivos al 5º día y los muertos.



No hubo diferencias a los 5 minutos de la RN entre la EHO de los animales vivos y muertos. Sin embargo, los animales muertos muestran un incremento significativo a los 15 ($p=0.04$) y a los 30 minutos ($p=0.03$) de iniciada la RN, respecto a los vivos.

★ $p=0.04$ respecto a los animales vivos.

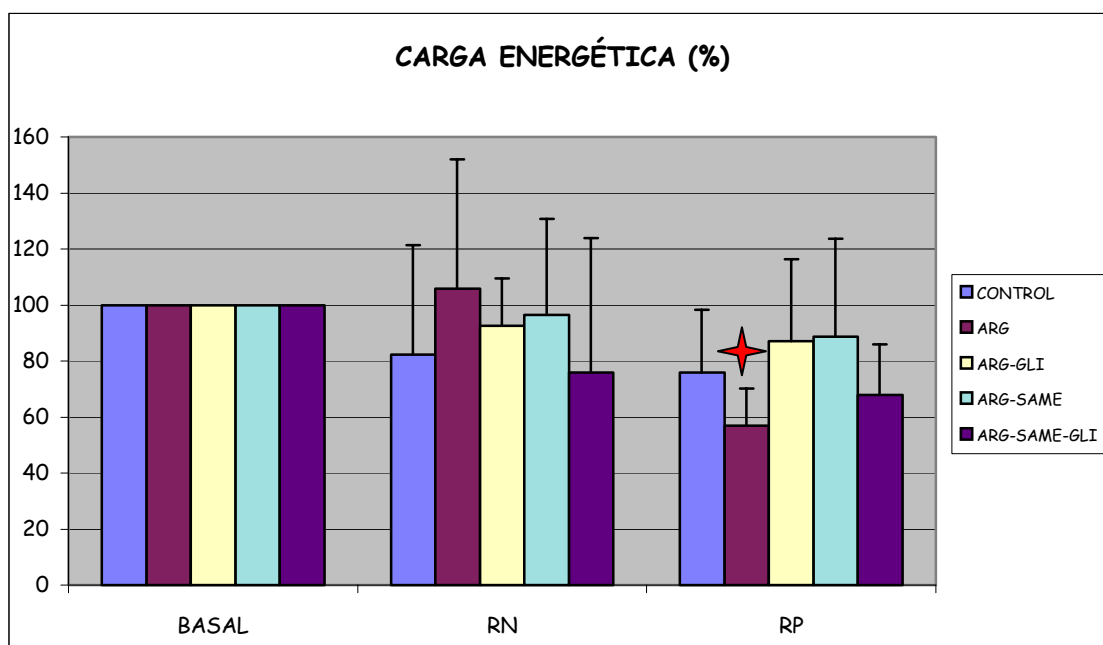
★ $p=0.03$ respecto a los animales vivos.

4.7.- Estudio de la carga energética y los niveles hepáticos de xantina.

4.7.1.- Carga energética.

La figura 50 muestra la evolución de la carga energética hepática según el tratamiento administrado. Después de 60 minutos de isquemia caliente y 30 minutos de RN todos los grupos descienden la carga energética excepto el grupo tratado con arginina. Sin embargo, en la fase de reperfusión en el receptor, todos los grupos disminuyen sensiblemente la carga energética, y el grupo tratado con arginina no consigue mantener su valor basal, descendiendo la carga energética por debajo del grupo ARG-GLI ($p=0.023$) y del grupo ARG-SAME ($p=0.017$).

Figura 50: Efecto de los distintos tratamientos sobre la carga energética.



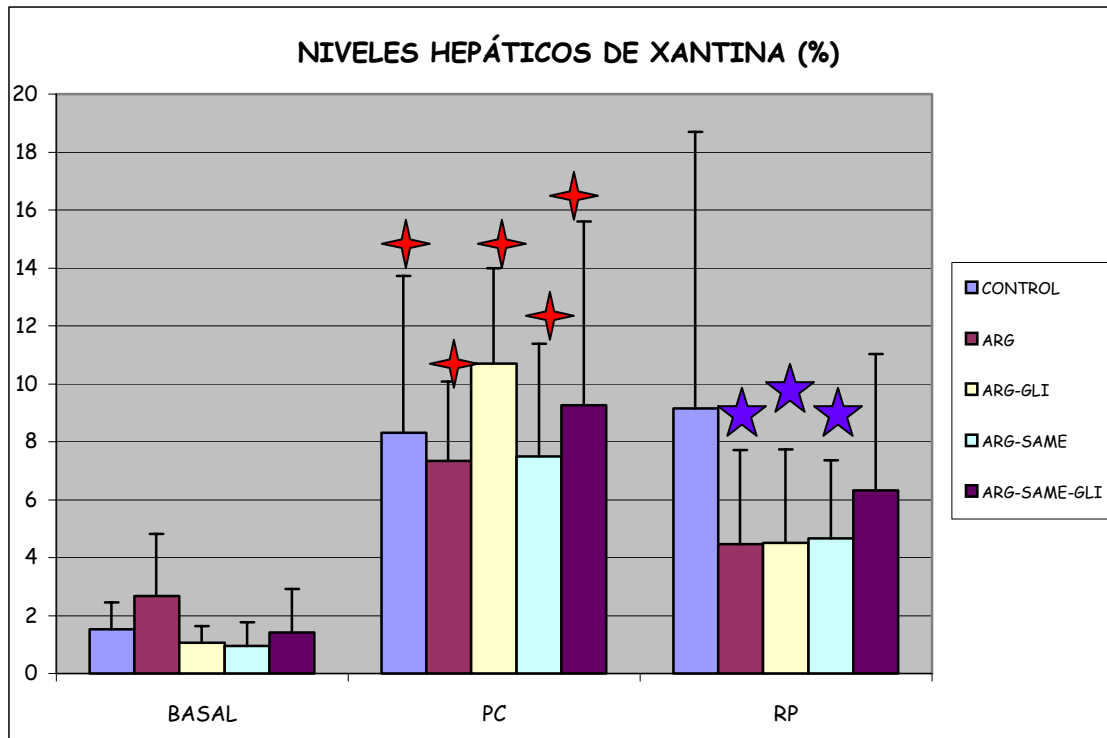
* $p=0.023$ respecto al grupo ARG-GLI y $p=0.017$ respecto al grupo ARG-SAME en la misma fase.

4.7.2.- Xantina.

Los niveles hepáticos de xantina aumentan significativamente al final de la parada cardíaca en todos los grupos respecto a su valor basal ($p < 0.05$).

Durante la reperfusión en el receptor vemos una tendencia en todos los grupos tratados hacia alcanzar su nivel basal, mientras el grupo control sigue ascendiendo el nivel de xantina. Existe un decremento significativo ($p < 0.05$) entre los grupos 2 (arginina), 3 (arginina-glicina) y 4 (arginina-SAMe) respecto al grupo control en la fase de reperfusión.

Figura 51: Efecto de los distintos tratamientos sobre los niveles hepáticos de xantina.



★ $p < 0.05$ respecto a su valor basal.

★ $p < 0.05$ respecto a l grupo control en la misma fase.

5. DISCUSIÓN

La obtención de hígados de donantes a corazón parado está siendo considerada como una posible fuente adicional de órganos para trasplante. En el caso del trasplante renal, la utilización de estos órganos está aceptada y ha supuesto un incremento en el número de donantes de un veinte por cien aproximadamente. En el trasplante hepático existe mucha menos experiencia, pues el hígado es muy sensible a la isquemia caliente y se desconoce el alcance de la lesión y hasta qué punto estos injertos pueden funcionar de forma correcta después de trasplantados. La necesidad del injerto hepático de funcionar de forma inmediata después de trasplantado es un factor más, que ha limitado su utilización y que, contrariamente, en el caso del riñón puede suplirse temporalmente por la diálisis.

En estudios previos, se ha demostrado que los hígados obtenidos después de un período de isquemia caliente pueden mantener su función después de trasplantados (50, 231, 232, 233, 234) y que la lesión por isquemia-reperfusión (I-R) asociada al trasplante de estos hígados se puede atenuar utilizando un período de circulación extracorpórea a 37°C (recirculación normotérmica, RN) y enfriamiento corporal total mediante bypass cardiopulmonar, antes de la extracción del órgano. A pesar de que este período es esencial para la obtención de hígados viables después de 20 y 30 minutos de isquemia caliente, la prolongación de este período hasta los 40 minutos tiene como consecuencia una mortalidad del cincuenta por cien de los animales trasplantados debida al fallo en la función del injerto (232, 235, 236). Por otro lado, el daño severo e irreversible de la vía biliar intrahepática afecta a los injertos que sobreviven (237). Por lo tanto, se plantea el

objetivo de disminuir la lesión por I-R producida después de tiempos prolongados de isquemia caliente.

En estudios previos, hemos demostrado que al prolongar el período de isquemia caliente hasta 40 minutos uno de los parámetros capaces de predecir la viabilidad del injerto son los parámetros hemodinámicos durante la recirculación normotérmica (232). Así, hemos podido observar que tanto los flujos sanguíneos hepáticos como los de la bomba de circulación extracorpórea durante la RN empeoran al aumentar el período de isquemia caliente, y cómo la extracción hepática de oxígeno aumenta. Estos parámetros hemodinámicos y del metabolismo del oxígeno son capaces de distinguir entre los animales vivos y muertos de forma precoz en el donante y, por tanto, determinan en cierta medida las condiciones de obtención del injerto hepático.

Dado que después de 40 minutos de isquemia caliente estos parámetros empeoran significativamente, el objetivo será el de mejorarlos mediante la administración de tres sustancias protectoras: L-arginina, SAME y glicina, que han demostrado en otros modelos proteger de la lesión por isquemia-reperfusión.

ARGININA

Hemos visto que la lesión por isquemia-reperfusión se trata de un proceso complejo en donde se encuentran implicados diferentes mecanismos fisiopatológicos, como la función de la microcirculación, la adhesión leucocitaria y agregación plaquetaria, la producción de radicales libres, lipoperoxidación e hipoxia (208, 200-2). La actividad reducida del óxido nítrico podría estar implicada en la patogenia de la isquemia-reperfusión. Como consecuencia de la lesión sobre las células endoteliales y la poca disponibilidad de arginina debida al aumento de la liberación de arginasa por el hígado, la producción de NO podría

encontrarse disminuida(203). Se ha demostrado que la inhibición del NO empeora la lesión por isquemia-reperfusión (204, 205, 208, 238). Incluso la arginina tiene un efecto protector sobre la lesión por isquemia-reperfusión (206, 238, 239, 240).

En el caso del trasplante hepático, la administración de arginina en el receptor durante la reperfusión es capaz de aumentar el flujo sanguíneo portal (207) y el flujo tisular hepático (201, 206, 208). El NO es un potente vasodilatador a nivel arterial y portal, inhibiendo la adhesión leucocitaria y la agregación plaquetaria y puede actuar neutralizando los radicales superóxido (208).

En nuestro estudio, el tratamiento con arginina sin adición de otras sustancias, ha demostrado afectar favorablemente los parámetros hemodinámicos durante la RN. Así, el tratamiento con arginina ha mostrado una tendencia a aumentar el flujo de la arteria hepática por encima del grupo control y ha conseguido incrementar significativamente el flujo portal y hepático total después de un periodo de 60 minutos de isquemia caliente. Los flujos portal y hepático se relacionan directamente con el flujo de bomba. Si tenemos en cuenta que el flujo de bomba de bypass cardiopulmonar depende del retorno venoso y que éste depende a su vez de la microcirculación (241-42), los resultados obtenidos sugieren que el empeoramiento de la circulación sistémica durante la obtención del hígado donante después de 60 minutos de parada cardíaca, afecta de forma adversa al flujo hepático, y por lo tanto, la administración de arginina puede prevenir estos aspectos negativos.

La extracción hepática de oxígeno (EHO) es un índice del oxígeno que capta el hígado del total que le llega, que será la suma del que llega por la arteria hepática y la vena porta. Este parámetro aumenta durante la RN para restablecer el metabolismo energético perdido

después de la isquemia caliente. Algunos estudios demuestran que la EHO es más alta en aquellos hígados más dañados después de la isquemia caliente, aumentando tras tiempos de isquemia más prolongados.

En nuestro estudio, la extracción hepática de oxígeno es un parámetro capaz de distinguir de forma precoz en el donante entre los animales vivos y muertos. Así, los hígados de los animales que acabarán muriendo antes del 5º día, presentan una EHO superior a la de los que vivirán, indicando que ya durante la RN están más dañados.

De acuerdo con estos resultados, la L-arginina mostró una tendencia a disminuir la EHO a los 30 minutos de la RN por debajo del grupo control, sin diferencias significativas.

La adición de glicina y arginina sí disminuyó de forma significativa a los 30 minutos de la RN bajo el grupo control la EHO, mostrando pues un efecto aditivo.

El tratamiento combinado con arginina y SAME también tuvo un efecto aditivo positivo disminuyendo la EHO bajo el grupo control.

SAMe

El radical superóxido es uno de los elementos implicados en la lesión por isquemia-reperfusión. El SAMe es un compuesto capaz de incrementar los niveles hepáticos de glutatión, que es uno de los antioxidantes más importantes en el hígado (218-19).

Además, en el metabolismo del SAMe no sólo aumenta la cisteína y como consecuencia el glutatión, sino que se genera adenosina gracias a la enzima S-adenosil homocisteína hidrolasa. Por lo tanto, la administración de SAMe sería una fuente exógena de un potente antioxidante, y de adenosina, que podría ejercer algún efecto adicional a través de otros mecanismos.

Nosotros hemos observado que los grupos tratados con SAME (grupos 4 y 5 del estudio) no mejoraron el flujo arterial, portal ni hepático total respecto al control. No podemos concluir que exista efecto aditivo entre la arginina y el SAME ni entre arginina, SAME y glicina en cuanto a mejoría de flujos tras 60 minutos de isquemia caliente. Sí que obtuvimos una mejoría en el flujo de bomba en los grupos tratados con SAME, sin repercusión sobre el resto de flujos.

La EHO, el otro parámetro relacionado con la hemodinámica hepática durante la RN, disminuye en los hígados tratados con SAME en adición con otras sustancias (grupos 4 y 5) al compararlos con el grupo control, indicando ello una mejor calidad de estos injertos. De modo que existe efecto aditivo entre ARG-GLI y ARG-SAME-GLI en cuanto a la EHO.

GLICINA

La glicina ha demostrado proteger de la lesión por isquemia-reperfusión estabilizando la membrana celular defendiéndola del ataque de los radicales libres (243-4). También mejora la microcirculación actuando sobre las células de Kupffer, que se activan durante la isquemia-reperfusión; la glicina puede prevenir la activación de dichas células (245).

La glicina inhibe las proteasas dependientes del calcio no lisosomales y esta acción es responsable de la protección de los hepatocitos contra la anoxia (194). La proteólisis contribuye a la lesión asociada al trasplante hepático y los inhibidores de las proteasas mejoran la función del injerto (195).

La glicina también bloquea el nivel de calcio intracelular disminuyendo la activación de las células de Kupffer y de las proteasas dependientes del calcio (196-7).

Okazi demostró que la glicina puede proteger contra la lesión por reperfusión reduciendo la peroxidación lipídica, en un proceso independiente del aumento de glutatión en el tejido hepático (198). Otros autores han descrito que la glicina estabiliza la membrana inhibiendo la fosfolipasa A2, que al liberar ácido araquidónico estimula la producción de eicosanoides vasoconstrictores (199).

En resumen, durante la isquemia-reperfusión las células de Kupffer se activan y éstas son la principal fuente de eicosanoides en el hígado, por lo tanto, el bloqueo de su activación evitando el aumento de calcio intracelular, disminuiría la producción de eicosanoides y ello repercutiría favorablemente en la microcirculación evitando la vasoconstricción. Este efecto hemodinámico de la glicina sería independiente del óxido nítrico.

En nuestro estudio, hemos podido observar que el tratamiento combinado con arginina y glicina ha tenido un efecto beneficioso a nivel hemodinámico, ya que el flujo arterial , portal y hepático total han sido más elevados que el grupo no tratado, aunque las diferencias no han sido significativas. Probablemente, si aumentáramos el tamaño de la muestra obtendríamos diferencias significativas. Contrariamente, no hemos visto un incremento del flujo de bomba en el grupo tratado con arginina y glicina respecto al control.

En cuanto a la EHO la glicina y arginina han conseguido disminuir dicho parámetro por debajo del grupo control al final de la RN. Así, durante el trasplante hepático el consumo de oxígeno se duplica. La elevación del consumo hepático de oxígeno, consecuencia de la activación de las células de Kupffer, provoca hipoxia hepática, y ello se ha visto atenuado después de la infusión de glicina y arginina en nuestro estudio. La arginina sabemos que actúa a través de un mecanismo

distinto a la glicina, pero vemos que conjuntamente actúan de forma aditiva.

Podemos concluir que los diferentes compuestos administrados han tenido un efecto a nivel hemodinámico mediante mecanismos diferentes. La acción de la L-arginina estaría relacionada con la producción de óxido nítrico; la del SAME, con el aumento en los niveles de adenosina, que acabaría induciendo la producción de óxido nítrico; y la glicina, inhibiendo la activación de las células de Kupffer productoras de eicosanoides vasoconstrictores.

FLUJOS SANGUÍNEOS HEPÁTICOS Y SUPERVIVENCIA

En estudios previos se ha observado que los flujos sanguíneos hepáticos durante la RN no sólo son un índice de calidad del injerto, sino que además son capaces de predecir la viabilidad de dicho injerto de forma precoz durante su obtención (232).

En el presente estudio, uno de los aspectos que nos habíamos planteado inicialmente, era averiguar si el flujo sanguíneo hepático durante la recirculación normotérmica podía ser un factor predictivo de viabilidad del injerto. Efectivamente, hemos visto que los animales vivos al quinto día presentaron mayores flujos durante la RN. Probablemente, al aumentar el tamaño de la muestra, existirían más diferencias significativas. De momento hemos alcanzado significación estadística a nivel del flujo arterial y hepático total a favor de los animales vivos.

En conclusión, y de acuerdo con otros estudios, corroboramos el hecho de que a mayor flujo hepático, mayor probabilidad de supervivencia del injerto.

En cuanto a la EHO hemos visto que los animales muertos antes del quinto día presentaban una EHO superior a la de los vivos, de acuerdo con estudios anteriores (232).

Por tanto, concluimos también que la EHO es un parámetro de predicción de viabilidad del injerto, al igual que los flujos sanguíneos hepáticos.

En resumen, al mejorar los parámetros hemodinámicos, ello repercute favorablemente sobre la supervivencia de los animales trasplantados y sobre la viabilidad del injerto.

METABOLISMO ENERGÉTICO

Algunos estudios han demostrado que aspectos relacionados con el metabolismo energético y con la acumulación de purinas como productos del consumo de ATP durante la isquemia, también son marcadores precoces de viabilidad del injerto, pues son moléculas implicadas en el mecanismo de lesión durante la isquemia-reperfusión (246-48).

Estudios centrados en el trasplante hepático demuestran que los niveles hepáticos de ATP y la carga energética disminuyen después de la isquemia y recuperan después de la perfusión (249-51). Este hecho es lógico, pues en los tejidos privados de oxígeno durante la isquemia, se bloquea la respiración celular y como consecuencia la fosforilación oxidativa, y el ATP presente se consume siguiendo su vía de degradación. El estado energético celular refleja el grado de lesión hepática y la integridad del hepatocito. Nuestro grupo investigador describió que la carga energética mejoraba después de la perfusión, hecho corroborado por otros investigadores (252-54). Así, tras 40 minutos de isquemia caliente vimos que la carga energética disminuía bajo su

nivel basal y que ésta se recuperaba al mejorar la disponibilidad hepática de oxígeno, durante la RN y después de la reperfusión en el receptor.

En este estudio hemos observado que tras 60 minutos de isquemia caliente, los niveles de carga energética disminuyen bajo su nivel basal excepto el grupo tratado con arginina, que aumenta por encima del basal durante la RN. Sin embargo, en la fase de reperfusión en el receptor, todos los grupos disminuyen su carga energética bajo el nivel basal, sin recuperación de la misma. Es más, el grupo arginina es el que desciende más la carga energética de forma significativa al comparar con el grupo tratado con arginina-glicina y con el arginina-SAMe.

En conclusión, tras 60 minutos de isquemia caliente y 30 minutos de RN, no se puede recuperar la carga energética en ningún grupo, probablemente debido a la privación severa de oxígeno tras 60 minutos de parada cardíaca. Cabe destacar que el tratamiento con arginina-glicina y arginina-SAMe favorece la recuperación de la carga energética tras la reperfusión, de modo que existiría un efecto aditivo entre estas sustancias al compararlas con el tratamiento con arginina sola.

No hemos visto diferencias en la carga energética entre animales vivos y muertos, por lo que no parece existir correlación entre la recuperación de la carga energética y la supervivencia tras 60 minutos de isquemia caliente.

Continuando más allá en la vía metabólica de degradación del ATP, el consumo celular de ATP durante la isquemia da lugar a la acumulación de purinas como la hipoxantina y la xantina (186, 255-6), mientras que después de la reperfusión, los niveles de estas purinas disminuyen hasta sus valores basales normales (249).

En este estudio hemos observado que los niveles de xantina incrementan tanto en el grupo control como en los grupos tratados, al final de la parada cardíaca, con un incremento significativo en todos los grupos ($p < 0.05$) respecto al basal. Tras la reperfusión en el receptor, la acumulación de xantina tiende a normalizarse en todos los grupos excepto en el control, con diferencias significativas ($p < 0.05$). Ello nos indica que la adición de arginina a la glicina y al SAME, e incluso el tratamiento con arginina sola, son capaces de disminuir el acúmulo de xantina en tejido hepático que se ha producido durante la isquemia caliente. Este hecho es lógico, pues al mejorar la oxigenación tisular, disminuye el consumo de ATP y se acumulan menos purinas en el hígado. Probablemente, la sustancia que demuestra su efectividad en este sentido sea la arginina, independientemente de la adición de otras sustancias.

SUPERVIVENCIA

Nuestro grupo investigador ha demostrado que es posible obtener hígados viables después de tiempos de isquemia caliente de 20, 30 y 40 minutos añadiendo un período de recirculación normotérmica, obteniendo una supervivencia del injerto a los cinco días inversamente proporcional al tiempo de isquemia (100, 70 y 50% respectivamente). También hemos demostrado que **cuando no se ha utilizado la recirculación normotérmica, la supervivencia es nula**. Estas evidencias demuestran que la RN es capaz de revertir la lesión por isquemia-reperfusión después de la parada cardíaca sobre la célula hepática y endotelial del sinusoides hepático.

Hemos visto que tras períodos de isquemia caliente superiores a 30 minutos, las lesiones que se producen comprometen la viabilidad del injerto, sobre todo por necrosis de la vía biliar, disminuyendo la

supervivencia de los injertos sometidos a 40 minutos de isquemia caliente al 50%.

Nuestro grupo investigador ha realizado varias series de trasplantes hepáticos en el cerdo a lo largo de los últimos 10 años. En una primera serie, obtuvimos una supervivencia del 50% tras 40 minutos de isquemia caliente y 30 minutos de RN. En una segunda serie, realizando el mismo tratamiento (40 minutos de isquemia y 30 minutos de RN) la supervivencia ascendió al 60%. Esta mejoría de la supervivencia a lo largo del tiempo la atribuimos a un mejor manejo anestésico y también al equipo quirúrgico, puesto que inicialmente desconocíamos la clave para obtener la máxima supervivencia y hoy día conocemos que el cerdo debe estar como máximo 20 minutos anhepático y la hemorragia peroperatoria no debe superar los 400 cc.

El conocimiento progresivo, tanto del manejo anestésico como de la técnica quirúrgica, nos han permitido obtener un resultado tan sorprendente como el de 87,5 % de supervivencia en el grupo control (60 minutos de isquemia caliente y 30 minutos de RN).

Este resultado es difícil de explicar, pues la pregunta que nos planteamos a continuación es: "¿por qué la sobrevida tras 60 minutos de parada cardíaca es superior a la sobrevida tras 40 minutos, haciendo el mismo tratamiento?".

Incluso nos hemos planteado ¿por qué la supervivencia del grupo control es superior a la de los grupos tratados, si el resto de parámetros apuntan hacia una mejoría en los grupos tratados?

No parece que la supervivencia al 5º día sea un parámetro decisivo en este estudio para evaluar la calidad del injerto potencial; el hecho de que sobrevivan más los animales del grupo control quizás cambiaría al aumentar el tamaño de la muestra. Existen muchas variables que influyen sobre la supervivencia: la intervención quirúrgica y

el cirujano, el manejo anestésico, la preparación preoperatoria, los cuidados postoperatorios, el tratamiento realizado, etc. El animal trasplantado no reside en una UCI postoperatoria y su hidratación depende únicamente de la ingesta oral, por lo que probablemente, si estos cuidados postoperatorios mejoraran, objetivaríamos mejor la variable "supervivencia".

Al adquirir más experiencia del equipo en la experimentación animal aumenta la supervivencia, de ahí que el grupo control haya sobrevivido más con 60 minutos que con 40 de isquemia caliente.

Por ello concluimos que la variable supervivencia es una variable burda y está sometida a tantos factores, que no debemos considerarla tanto como otras variables más objetivas.

De todos modos, nos llama la atención que los grupos tratados con SAME (grupos 4 y 5) sean los de menor supervivencia (37,5%) comparando con los grupos no tratados con SAME (70%), cuando era una sustancia que había demostrado su efecto citoprotector. Sin embargo, en adición a otras sustancias no parece tener efecto aditivo.

LESIÓN ENDOTELIAL

En el trasplante hepático la recirculación normotérmica juega un papel muy importante en la preservación del endotelio sinusoidal hepático. En previos estudios hemos demostrado que la lesión endotelial que se produce en el trasplante de hígados obtenidos después de sólo 20 minutos de isquemia caliente sin RN, se encuentra atenuada cuando se utiliza la RN (236). Por otro lado, el grado de lesión endotelial se correlaciona con el tiempo de isquemia caliente (235).

También hemos observado en otros estudios que la mejoría en la hemodinámica durante la RN producto de la administración de L-arginina, SAME y glicina, disminuye significativamente el daño sobre el

endotelio sinusoidal hepático asociado al trasplante de donante a corazón parado tras 40 minutos de isquemia caliente. La L-arginina fue la sustancia que mostró una mejor preservación de la célula endotelial.

Nos interesa saber si tras 60 minutos de isquemia caliente, existe efecto aditivo entre la arginina y las otras sustancias.

Después de la reperfusión hepática en el receptor es cuando se producen los máximos valores de ácido hialurónico (AH) en sangre periférica debido a la no captación por parte del hígado (235, 236), y es el momento en que se detecta el máximo de lesión endotelial. En nuestro estudio hemos corroborado este hecho, dado que en la fase de RP existe un incremento significativo respecto a su valor basal en cada grupo, no existiendo diferencias entre grupos en el nivel basal.

Durante la fase de RN todos los grupos incrementan el valor de AH en sangre, pero el grupo tratado con arginina fue el que mostró menor incremento comparado con el grupo ARG-GLI y con el grupo ARG-SAMe con diferencias estadísticamente significativas. No parece que la adición de la arginina a otras sustancias tenga efecto aditivo sobre la preservación de la célula endotelial.

Es más, durante la fase de RP, que es la fase que afecta más negativamente al endotelio, el grupo control incrementa su valor de AH en sangre con diferencias significativas respecto a grupo tratado con arginina sola y al grupo tratado con las tres sustancias.

De modo que queda claro que el grupo no tratado o grupo control se encuentra más afectado que los demás, aunque no podemos afirmar que exista efecto aditivo entre sustancias, y únicamente confirmamos que el tratamiento con arginina sigue siendo el de mayor efectividad en la preservación de la célula endotelial.

LESIÓN DEL PARÉNQUIMA HEPÁTICO

ASAT

El valor de ASAT máximo alcanzado en todos los grupos ocurre durante el segundo día del trasplante. Así, vemos un incremento significativo en todos los grupos respecto al basal. Nos llama la atención que el menor incremento de ASAT corresponde al grupo tratado con arginina sola sin adición a otras sustancias, con un incremento significativamente inferior respecto al grupo control.

De modo que no podemos tampoco afirmar el efecto aditivo entre la arginina y las demás sustancias al valorar la ASAT, pero sí destacar su efectividad por sí sola.

ALAT

Referente a la transaminasa ALAT también vemos que el mayor incremento en todos los grupos ocurre al 2º día postrasplante. Aquí destacamos que el tratamiento combinado con arginina y glicina es mejor que la arginina sola, dado que existe un incremento significativamente inferior al grupo arginina al 5º día.

No observamos diferencias entre los grupos tratados y el control en cuanto a la variable ALAT. No podemos afirmar si existe efecto aditivo entre sustancias.

GST

La GST ha demostrado ser un marcador de lesión hepática más precoz y sensible, pues su valor máximo en todos los grupos ocurre durante la fase de RP y no al 2º del trasplante.

Debido al cese en el suministro por parte de la casa comercial de Biotín (que no proporcionó la alfa GST porcina), no hemos determinado los valores de GST en el grupo tratado con arginina, pero sí en los demás grupos.

Sin embargo, no podemos hablar de efecto aditivo entre sustancias en lo que se refiere a la GST, pues únicamente corroboramos el hecho de que se trata de un marcador precoz, pero no vemos diferencias significativas entre ningún grupo y el control. Faltaría saber qué ocurre con la arginina sola.

HISTOLOGÍA

Al analizar las variables bioquímicas que objetivan la lesión, tanto sinusoidal como parenquimatosa, hemos visto hasta ahora que la sustancia que ha demostrado una mayor efectividad en la preservación sinusoidal y hepatocitaria es la L-arginina, y no queda demostrado que exista efecto aditivo entre las diferentes sustancias, que por separado sí eran citoprotectoras.

Pero es necesario estudiar la calidad de estos hígados a los 5 días del trasplante con el fin de conocer las repercusiones de los distintos tratamientos a más largo plazo, y en especial, sobre la preservación de la vía biliar. Anteriormente, se ha demostrado en otros estudios que la lesión de la vía biliar es uno de los aspectos que más limitan la supervivencia a largo plazo de los injertos trasplantados, después de períodos prolongados de isquemia caliente (235, 237).

La microscopía óptica al 5º día en este estudio ha demostrado que tanto la congestión (o dilatación) como la infiltración sinusoidal por PMN fue de mayor grado en el grupo control que en los grupos tratados. Así, la adición de arginina y SAME presenta un grado de congestión sinusoidal significativamente inferior al grupo control; también el

tratamiento con arginina sola y con arginina-glicina, mostraron menor lesión.

Este resultado está de acuerdo con el hecho de que la L-arginina, con o sin adición a otras sustancias, ha mejorado la función endotelial, como ha demostrado su menor concentración de ácido hialurónico en sangre periférica.

La linfocitosis sinusoidal, otra variable relacionada con el endotelio, también fue menor en el grupo tratado con arginina y glicina.

De este modo, la evaluación por microscopía óptica ha demostrado que, en general, los tratamientos han preservado los hígados trasplantados en los distintos niveles estudiados.

Tanto la inflamación portal como las lesiones destructivas del endotelio de venas hepáticas o portales (endotelitis) se vieron más afectadas en el grupo control, sin poder afirmar si existió efecto aditivo.

La disociación hepatocitaria es la lesión previa a la necrosis. La isquemia produce deformación hepatocitaria, perdiendo estas células su organización alineada y poligonal, convirtiéndose en células redondas por el edema intracelular (degeneración hidrópica). En este estudio, el grupo control mostró el mayor porcentaje de lesión severa y el grupo arginina fue el que mostró menor grado de lesión.

De nuevo vemos que el grupo tratado con arginina preserva la integridad del hepatocito en mayor medida que el grupo control y no podemos concluir que exista efecto aditivo entre la arginina y las demás sustancias citoprotectoras.

La colangitis isquémica empieza por la destrucción epitelial mediada inmunológicamente y después la necrosis isquémica del conducto biliar secundaria a la lesión de la arteria hepática. La necrosis de la pared biliar produce acúmulo de detritus necróticos y material biliar que obstruyen la vía biliar. En estudios previos hemos observado

que los largos períodos de isquemia caliente se acompañan de una escasa supervivencia del injerto, debido a la colangitis isquémica y finalmente a la necrosis de la vía biliar. En este estudio hemos visto que la colangitis isquémica fue una lesión presente en casi todas las biopsias de los supervivientes al 5º día. Todos los grupos mostraron más del 60% de casos de dicha lesión, incluso el grupo tratado con las tres sustancias mostró el 100% de los casos con colangitis isquémica.

En conclusión, corroboramos el hecho de que la lesión isquémica de la vía biliar aumenta conforme prolongamos el período de isquemia caliente, y que probablemente la escasa supervivencia obtenida globalmente en este estudio sea debida a la necrosis isquémica de la vía biliar, presente en casi todas las biopsias. No hemos observado efecto aditivo entre sustancias de cara a mejorar la viabilidad del injerto en este sentido.

El edema portal es una lesión poco frecuente que acontece en los casos en que existe obstrucción biliar extrahepática. En este estudio, el único grupo que no mostró edema portal en ningún caso fue el tratado con arginina. El único grupo que mostró un grado de lesión severa fue el grupo control.

El tratamiento con L-arginina fue el que demostró menor edema portal comparado con los demás grupos tratados y con el grupo control. No podemos, pues, hablar de efecto aditivo en términos de edema portal, pero sí resaltar la efectividad de la L-arginina en este sentido.

El infarto y la necrosis son lesiones paralelas, pero el infarto es una lesión macroscópica, que apreciamos ópticamente al analizar la pieza quirúrgica del 5º día, y la necrosis es la lesión citológica que se observa en una zona infartada.

En este estudio, todos los grupos mostraron zonas de infarto excepto el grupo tratado con las tres sustancias. De todos modos, como se ha mencionado previamente, estos resultados pueden estar sesgados porque las biopsias del 5º día se realizaron sobre una muestra limitada de tejido hepático no sobre el órgano entero.

La necrosis fue una lesión presente en todas las muestras de este estudio, lo cual demuestra que tras 60 minutos de isquemia caliente, independientemente de la administración de sustancias citoprotectoras y de la bomba de by-pass cardiopulmonar, existe necrosis celular como consecuencia de la isquemia.

Sin embargo, si analizamos este resultado como porcentaje de área necrótica hemos obtenido diferencias a favor de los grupos tratados comparados con el grupo control.

Tras 60 minutos de isquemia caliente, el porcentaje de área necrótica se atenúa significativamente si administramos arginina o ésta combinada con SAME, o con SAME y glicina.

HEMODINÁMICA Y LESIÓN HEPÁTICA

La mejoría en los aspectos hemodinámicos después de la administración de arginina favorece la correcta preservación del órgano. Queda claro que los parámetros hemodinámicos constituyen un aspecto esencial en las buenas condiciones de obtención del injerto, y que si bien la L-arginina es capaz de mejorar dichas variables hemodinámicas, también es posible que ejerza su efecto positivo a través de otros mecanismos de acción paralelos al efecto hemodinámico, y que también protegen de la lesión por isquemia-reperfusión.

La única sustancia que en nuestro estudio ha demostrado un efecto hemodinámico positivo de forma estadísticamente significativa

respecto al grupo control fue la arginina, incrementando el flujo portal y el hepático total de forma significativa. La acción conjunta de la arginina con la glicina también obtuvo mejoría a nivel hemodinámico con respecto al grupo control. También vimos que a mayores flujos, más supervivencia.

La acción hemodinámica de la L-arginina está mediada probablemente por el óxido nítrico, y aparte, la L-arginina puede tener efectos paralelos como la acción directa sobre la expresión de moléculas de adhesión o la producción de endotelina.

El objetivo de esta tesis era el de mejorar las condiciones de obtención del injerto hepático y comprobar si existía efecto aditivo entre sustancias a este nivel, que por separado habían demostrado ser beneficiosas. Dado que el aspecto hemodinámico es tan importante en la obtención de órganos a partir de donantes a corazón parado, se ha estudiado sobre todo este aspecto demostrando que la única sustancia que mejora la hemodinámica hepática es la L-arginina, tal y como habíamos visto con 40 minutos de isquemia-caliente. La adición de glicina a la arginina también parece tener un efecto beneficioso sobre la hemodinámica hepática, sin obtener resultados significativos.

6. RESUMEN Y CONCLUSIONES

Hemos partido de la base de que la recirculación normotérmica es un elemento esencial para conseguir la viabilidad del injerto hepático procedente de donante a corazón parado.

También hemos partido de la base de que existen sustancias citoprotectoras que protegen el injerto de la lesión por isquemia-reperusión y todo ello nos permite condicionar el injerto potencial durante la obtención del órgano.

En conclusión:

NO PARECE QUE LA ASOCIACIÓN DE SUSTANCIAS QUE HAN DEMOSTRADO SER BENEFICIOSAS POR SÍ SOLAS, SEA CAPAZ DE MEJORAR LA CALIDAD DEL INJERTO OBTENIDO DE DONANTE A CORAZÓN PARADO.

Sin embargo, el análisis de los objetivos, nos permite concluir:

1.- SE CONFIRMA QUE, INDEPENDIENTEMENTE DEL TIEMPO DE ISQUEMIA, EL FLUJO SANGUÍNEO HEPÁTICO Y LA EXTRACCIÓN HEPÁTICA DE OXÍGENO SE CORRELACIONAN DE FORMA EVIDENTE CON LA VIABILIDAD DEL ÓRGANO OBTENIDO.

LA ARGININA SE HA MOSTRADO COMO LA SUSTANCIA MÁS EFICAZ A AÑADIR DURANTE EL PROCESO DE OBTENCIÓN DEL ÓRGANO, PUESTO QUE:

2.- ES CAPAZ DE MEJORAR LA CARGA ENERGÉTICA, ASÍ COMO DE REDUCIR LA ACUMULACIÓN DE PURINAS.

3.- REDUCE LA LESIÓN TISULAR A NIVEL ENDOTELIAL Y HEPATOCELULAR CON INTENSIDAD PARECIDA, TANTO POR SÍ SOLA COMO ASOCIADA A OTRAS SUSTANCIAS CITOPROTECTORAS.

4.- TODO ELLO SE TRADUCE EN UNA NECROSIS BILIAR QUE, AUNQUE EXISTE EN TODOS LOS GRUPOS DE ESTUDIO, ES DE MENOR INTENSIDAD CUANDO SE UTILIZA LA ARGININA.

7.BIBLIOGRAFÍA

1. Starzl T, Marchioro T, Von Kanlla K, Herman G, Brittain R, Waddel W. Homotransplantation of the liver in humans. Surg Gynecol Obstet 1963; 117:659.
2. Starzl T, Groth C, Brettschneider L, Moon J, Fulginiti V, Cotton E. Extended survival in 3 cases of orthotopic homotransplantation of the human liver. Surgery 1968; 63:549.
3. Calne R, Williams R. Liver transplantation in man. Observations on technique and organization in five cases. Brit Med J 1968;4:535.
4. Margarit C, Jaurieta E, Maestre P. Trasplante hepático ortotópico en una paciente con hepatocarcinoma. Rev Esp Enf Ap Digest 1984; 66:234-239.
5. Moreno-González E, Gómez-Sanz R. Breve recuerdo histórico del desarrollo del trasplante de órganos. El presente y el futuro del trasplante de órganos abdominales. Jarpio Editores. Madrid 1997; 1-4.
6. Borel J. Effects of the new antilymphocytic peptide cyclosporine A in animals. Immunology 1977; 32: 1017-1025.
7. National Institute of Health consensus development conference statement: liver transplantation. June 20-23, 1983. Hepatology 1984;4: 1075.

8. Busuttil R, Colonna J, Hiatt J, Brems J, Khoury G, Goldstein L, Quinones-Baldrich W, et al. The first 100 liver transplants at UCLA. *Ann Surg* 1987; 206 (4): 387-402.
9. Busuttil R, Shaked A, Millis J, Jurim O, Colquhoun S, Shackleton C, Nuesse B, et al. One thousand liver transplants. The lessons learned. *Ann Surg* 1994; 219 (5): 490-7.
10. European Liver Transplant Registry. Data Analysis. 1997.
11. <http://www.msc.es/ont/esp/home.htm>.
12. Jacobbi L, McBride V, Etheredge E, Mc Donald J, Cooper E, Frey D, Boudreaux J, et al. The risks, benefits and costs of expanding donor criteria. A collaborative prospective three-year study. *Transplantation* 1995; 60: 1491-1496.
13. Alexander J, Vaughn W, Carey M. The use of marginal donors for organ transplantation: The older and younger donors. *Transplant Proc* 1991; 23 : 905-909.
14. Grande L, Gonzalez F, Manterola C, García-Valdecasas J, Rimola A, Fuster J, Lacy A, et al. Does donor age exclude liver grafting? *Transplant Proc* 1993; 25 : 3153-55.
15. Edmond J, Whittington P, Thistlethwaite J. Transplantation of two patients with one liver: analysis of a preliminary experience with "splitliver" grafting. *Ann Surg* 1990; 212 : 14-22.

16. Otte J, de Ville de Goyet J, Alberti D, Balladur P, de Hemptinne B. The concept and technique of the split liver in clinical liver transplantation. *Surgery* 1990; 107: 605-612.
17. Merion R, Campbell D. Split liver transplantation: one plus one doesn't always equal two. *Hepatology* 1991; 14:572.
18. Houssin D, Boillot O, Soubrane O. Controlled liver splitting for transplantation in two recipients: technique, results and perspectives. *Br J Surg* 1993; 80 : 75-80.
19. Broelsch CE, Burdelski M, Rogiers X, Gundlach M, Knoefel WT, Langwieler T, et al. Living donor for liver transplantation. *Hepatology* 1994;20: 49S-55S.
20. Bucuvalas JC, Ryckman FC. The long-and-short-term outcome of living-donor liver transplantation. *J Pediatrics* 1999; 134:259-61.
21. Emond JC, Rosenthal P, Roberts JP, Stock P, Kelley S, Gregory G, et al. Living related donor liver transplantation: the UCSF Experience. *Transplant Proc* 1996; 28: 2375-7.
22. Heffron TG, Langnas AN, Fox IJ, Mack D, Dhawan A, Kaufman S, et al. Living related donor liver transplantation at the University of Nebraska Medical Center (1996). *Transplant Proc* 1996; 28: 2382.
23. Jurim O, Shackleton CR, Mc Diarmid SV, Martin P, Shaked A, Millis JM, et al. Living-donor liver transplantation at UCLA. *Am J Surg* 1995; 169: 529-32.

24. Otte JB, De ville de Goyet J, Reding R, Sokal E, Lerut J, Vanormelingen P, et al. Living related donor liver transplantation in children: The Brussels experience. *Transplant Proc* 1996; 28: 2378-9.
25. Piper JB, Whittington PF, Woodle ES, Newell KA, Alonso EM, Emond JC, et al. Pediatric liver transplantation at the University of Chicago Hospitals. *Clin Transplants* 1992; 179-89.
26. Strong RW, Lynch SV, Ong TH, Matsunami H, Koido Y, Balderson GA. Successful liver transplantation from a living donor to her son. *N Engl J Med* 1990; 322: 1505-7.
27. Singer PA, Siegler M, Whittington PF, Lantos JD, Emond JC, et al. Ethics with liver transplantation with living donors. *N Engl J Med* 1989; 321:620-1..
28. Malago M, Rogiers X, Broelsch CE. Liver splitting and living donor techniques. *Brit Med Bull* 1997; 53: 860-7.
29. Broelsch C, Whittington P, Edmond J. Liver transplantation in children from living related donors. *Ann Surg* 1991; 214 : 428-39.
30. Singer P, Siegler M, Whittington P, Lantos J, Edmond J, Thistlethwaite J, Broelsch C. Ethics of liver transplantation with living donors. *N Engl J Med* 1989; 321 : 620-622.
31. Broelsch C, Burdelski M, Rogiers X, Gundlach M, Knoefel W, Langwieler T, Fischer L, et al. Living donor for liver transplantation. *Hepatology* 1994; 20 : 49S-55S.

32. Yamaoka Y, Washida M, Honda K, Tanaka K, Mori K, Shimahara Y, Okamoto S, Ueda M, Hayashi M, Tanaka A. Liver transplantation using a right lobe graft from a living related donor. *Transplantation* 1994; 57 (7): 1127-30.
33. Marcos A, Fisher RA, Ham JM, Shiffman ML, Sanyal AJ, Luketic VA, Sterling RK, Posner MP. Right lobe living donor liver transplantation. *Transplantation* 1999; 68 (6): 798-803.
34. Rogiers X, Malagó M, Gaward K, Jauch K, Olausson M, Knoefel W, Gundlach M, et al. In situ splitting of cadaveric livers. The ultimate expansion of a limited donor pool. *Ann Surg* 1996; 224 (3): 331-341.
35. García Valdecasas JC. *Cir Esp* 2002; 71 (1): 45-50.
36. Broering DC, Mueller L, Ganschow R, Kim JS, Achilles EG, Schafer H, Gundlach M, Fischer L, Sterneck M, Hillert C, Helmke K, Izbicki JR, Burdelski M, Rogiers X. *Ann Surg* 2001 Dec; 234 (6): 713-21.
37. Amersi F, Farmer DG, Busuttil RW. Fifteen year experience with adult and pediatric liver transplantation at the University of California, Los Angeles. *Clin Transpl* 1998; 255-61).
38. Farmer DG, Yersiz H, Ghobrial RM, Mc Diarmid SV, Gornbein J, Le H, Schlifke A, Amersi F, Maxfield A, Amos N, Restrepo GC, Chen P, Dawson S, Busuttil RW. Early graft function after pediatric liver transplantation: comparison between in situ split liver grafts and living related liver grafts. *Transplantation* 2001 Dec 15; 72 (11): 1795-802.

39. Diagnóstico Neurológico de la Muerte cerebral. Dictamen Candanchú 1993 de la Sociedad Española de Neurología. Quadern CAPS, 1994:45-6.
40. Statements and Recommendations on Non Heart-Beating Donors. ETCO-Newsletter November, 1995; 13 (2) .
41. Organización Nacional de Trasplantes. Documento de Consenso Español. Donación de órganos a corazón parado. Noviembre, 1995.
42. Booster MH, Wijnen RM, Ming Y, Vroemen JP, Kootstra G. In situ perfusion of kidneys from non heart-beating donors: the Maastricht protocol. *Transplant Proc* 1993; 56 (3) : 1503-4.
43. Booster M, Wijnen R, Vroemen J, Van Hoof J, Kootstra G. In situ preservation of kidneys from non heart-beating donors. A proposal for standardized protocol. *Transplantation* 1993; 56: 613-17.
44. Casavilla A, Ramirez C, Shapiro R, Nghiem D, Miracle K, Bronsther O, Randhawa P, et al. Experience with liver and kidney allografts from non heart-beating donors. *Transplantation* 1995; 59 (2): 197-203.
45. Casavilla A, Ramirez C, Shapiro R, Nghiem D, Miracle K, Fung JJ, Starzl TE. Liver and kidney transplantation from non heart-beating donors: the Pittsburgh experience. *Transplant Proc* 1995; 27 (1) : 710712.
46. Castelao A, Griñó J, Gonzalez C, Franco E, GilVernet S, Andrés E, Serón D, et al. Update of our experience in long term renal function of

kidneys trasplanted from non-heart-beating cadaver donors. *Transplant Proc* 1993; 25 (1): 1513-15.

47. Garcia-Rinaldi R, Lefrak E, Defore W, Feldman L, Noon G, Jachimczyk J, DeBakey M. In situ preservation of cadaver kidneys for transplantation. *Ann Surg* 1975; 182 (5): 576-584.

48. Hoshino T, Maley W, Stump K, Tuttle T, Burdick J, Williams G. Evaluation of core cooling technique for liver and kidney procurement. *Transplant Proc* 1987; 19 (5) : 4123-4128.

49. Hoshino T, Koyama I, Nagashima N, Kadokura M, Kazui M, Omoto R. Liver transplantation from non heart-beating donors by core-cooling technique. *Transplant Proc* 1989; 21 (Feb): 1206-08.

50. Hoshino T, Koyama I, Nagashima N, Kadokura M, Kazui M, Omoto R. Transplantation of livers from non heart-beating donors is possible by core-cooling technique. *Transplant Proc* 1989; 21 (June): 3519.

51. Valero R, Sánchez J, Cabrer C, Salvador L, Oppenheimer F, Manyalich M. Organ procurement from non heart-beating donors through in situ perfusion or total body cooling. *Transplant Proc* 1995; 27 (5): 2899-2900.

52. Koyama I, Hoshino T, Nagashima N, Adachi H, Ueda K, Omoto R. A new approach to kidney procurement from non heart-beating donors: core cooling on cardiopulmonary bypass. *Transplant Proc* 1989; 21:1203-1205.

53. Gómez M, García-Buitron J, Fernandez-García A, Vilela D, Fernandez-Selles C, Corbal R, Fraguera J, et al. Liver transplantation with organs from non heart-beating donors. *Transplant Proc* 1997; 29: 3478-3479.
54. Hong H, Yin H, Zhu S, Lin Y. The results of transplant livers from selected non-heart-beating cadaver donors. *Hiroshima J Med Sci* 1991;40: 87 -91.
55. D'Alessandro AM, Hoffmann RM, Knechtle SJ, Eckhoff DE, Love RB, Kalayoglu M, Sollinger HW, et al. Controlled non heart-beating donors: a potential source of extrarenal organs. *Transplant Proc* 1995; 27 (1): 707-709.
56. Belzer F. Principles of solid-organ preservation by cold storage. *Transplantation* 1988; 45 : 673-676.
57. Gores G, Ferguson D, Ludwig J, Steffen R, RAF. K. Effect of acidosis during cold ischemic storage on liver viability following transplantation in the rat. *Transplant Proc* 1990; 22 : 488-489.
58. Anaise D, Yland M, Waltzer W, Frischer Z, Hurley S, Eychmuller S, apaport F. Flush pressure requirements for optimal cadaveric donor kidney preservation. *Transplant Proc* 1988; 20:891-894.
59. Maessen J, Van der Vusse G, Vork M, Kootstra G. New approach to preservation of non-heart beating donor kidneys: total body cooling. *Transplant Proc* 1987; 19: 4159-61.
60. Alvarez-Rodríguez J, Barrio- Yesa R, Torrente-Sierra J, Prats-Sánchez MJ, Barrientos-Guzmán A. Posttransplant long-term outcome of kidneys

obtained from asystolic donors maintained under extracorporeal cardiopulmonary bypass. *Transplant Proc* 1995; 27:2903-2905.

61. Tojimbara T, Garcia RJ, Burns W, Hayashi MJ, Krams SJ, Martinez O, So S, et al. The use of non heart beating cadaver donors in experimental liver transplantation. *Transplantation* 1995; 60 (10): 1179-1186.

62. Rentsch MJ, Post SJ, Palma PJ, Gonzalez AJ, Menger M, Messmer K. Intravital studies on beneficial effects of warm Ringer's lactate rinse in liver transplantation. *Transpl Int* 1996; 9: 461-467.

63. Hoshino T, Koyama I, Taguchi Y, Kazui M, Neyama K, Omoto R. A new method for safe liver transplantation (L Tx) from non heart-beating donors (NHBD): In situ liver oxygenation by cardiopulmonary bypass (CBP). World Congress of the Transplantation Society. Kyoto, 1994:280.

64. Endoh TJ, Ohkohchi NJ, Katoh H, Seya K, Satomi S, Mori S, Nakamura K. Graft conditioning of liver in non heart-beating donors by an artificial heart and lung machine in situ. *Transplant Proc* 1996; 28 (1): 110-115.

65. Tsukamoto S, Ohkohchi N, Endoh T, Seya K, Satomi S, Mori S. Procurement of liver grafts by an artificial heart-lung machine using leukocyte-depleted washed red blood cells in non heart-beating donors. *Transplant Proc* 1996; 28 (1): 197-200.

66. Shiroki R, Hoshinaga K, Horiba M, Izumitani M, Tsukiashi Y, Yanaoka M, Naide Y, Kanno T. Favorable prognosis of kidney allografts from unconditioned cadaveric donors whose procurement was initiated after cardiac arrest. *Transplant Proc* 1997;29(1-2):1388-2.

67. Rapaport FT, Anaise D. Technical aspects of organ procurement from the non-heart-beating cadaver donor for clinical transplantation. *Transplant Proc* 1993;25(1 Pt 2):1507-8.

68. Garcia-Rinaldi R, Lefrak EA, Defore WW, Feldman L, Noon GP, Jachimczyk JA, DeBakey ME. In situ preservation of cadaver kidneys for transplantation: laboratory observations and clinical application. *Ann Surg* 1975;182(5):576-84.

69. Anaise D, Yland MJ, Waltzer WC, Frischer Z, Rapaport FT. A new perfusion tube for multiple organ procurement. *Transplant Proc* 1987;19(5):4129-36.

70. Booster MH, Wijnen RM, Vroemen JP, van Hooff JP, Kootstra G. In situ preservation of kidneys from non-heart-beating donors. A proposal for a standardized protocol. *Transplantation* 1993;56 (3):613-7.

71. Anaise D, Yland MJ, Waltzer WC, Frischer Z, Hurley S, Eychmuller S, Rapaport FT. Flush pressure requirements for optimal cadaveric donor kidney preservation. *Transplant Proc* 1988;20(5):891-4.

72. Paprocki S, Kruk R, Erturk E, Cerilli J. A technique for successful transplantation of organs from non-heart-beating cadaver donors. *Transplantation* 1992;54(2):381-3.

73. Fujita T, Matsui M, Yanaoka M, Shinoda M, Naide Y. Clinical application of in situ renal cooling: experience with 61 cardiac-arrest donors. *Transplant Proc* 1989;21(1 Pt 2):1215-7.

74. Booster MH, Wijnen RM, Yin M, Tiebosch AT, Heineman E, Maessen JG, Buurman WA, Kurvers HA, Stubenitsky BM, Bonke H. Enhanced resistance to the effects of normothermic ischemia in kidneys using pulsatile machine perfusion. *Transplant Proc* 1993;25 (6):3006-11.
75. Booster MH, Wijnen RM, Ming Y, Vroemen JP, Kootstra G. In situ perfusion of kidneys from non-heart-beating donors: the Maastricht protocol. *Transplant Proc* 1993;25(1 Pt 2):1503-4.
76. Valero R, Manyalich M, Cabrer C, Salvador L, Garcia-Fages LC. Organ procurement from non-heart-beating donors by total body cooling. *Transplant Proc* 1993;25(6):3091-2.
77. Hoshino T, Maley WR, Labs JD, Clemens MG, Burdick JF, Williams GM. Core cooling technique is superior to flush techniques for liver procurement. *Transplant Proc* 1989;21(3):3517-8.
78. Watanabe T, Koyama I, Taguchi Y, Ogawa N, Omoto R. Salvage of warm ischemic pancreas from non-heart-beating donors by a core-cooling method with cardiopulmonary bypass. *Transplant Proc* 1992;24(4):1331-2.
79. Koyama I, Taguchi Y, Watanabe T, Nagashima N, Otsuka K, Omoto R. Development of a reliable method for procurement of warm ischemic kidneys from non-heart-beating donors. *Transplant Proc* 1992;24(4):1327-8.
80. González-Segura C, López-Navidad A, Kulieusky J, Caballero F. Donantes de órganos a corazón parado. En: *El donante de órganos y tejidos. Evaluación y manejo*. Barcelona: Springer; 1994; 38,497-507.

81. Hoshino T, Koyama I, Nagashima N, Kadokura M, Kazui M, Omoto R. Liver transplantation from non-heart-beating donors by core cooling technique. *Transplant Proc* 1989;21(1 Pt 2):1206-8.
82. Adachi H, Ueda K, Koyama I, Hoshino T, Omoto R, Fraser CD, Kontos GJ, Baumgartner WA, Reitz BA. Donor core cooling for multiple organ retrieval: new application of portable cardiopulmonary bypass for transplantation. *Transplant Proc* 1989;21(1 Pt 2):1200-2.
83. Tojimbara T, Kennedy RG, Burns W, Hayashi M, Krams S, Martinez O, So S, Esquivel CO. The use of non-heart-beating cadaver donors in experimental liver transplantation. *Transplantation* 1995;60 (10):1179-80.
84. Maessen JG, Van der Vusse GJ, Vork M, Kootstra G. The beneficial effect of intermediate normothermic perfusion during cold storage of ischemically injured kidneys. A study of renal nucleotide homeostasis during hypothermia in the dog. *Transplantation* 1989;47(3):409-14.
85. Gaber AO, Yang HC, Haag BW, Buckingham FC, Lloyd DM, Thistlethwaite JR, Jr., Stuart FP. Intermediate normothermic hemoperfusion doubles safe cold preservation of rat kidneys. *Transplant Proc* 1987;19(1 Pt 2):1369-71.
86. Hoshino T, Koyama I, Taguchi Y, Kazui M, Neya K, Omoto R. A new method for safe liver transplantation from non heart beating donors. In: *In situ liver oxigenation by cardiopulmonar by pass procceding of World Congress of Transplantation Society. Kyoto.Japan. 1994;280*
87. Tojimbara T, Wicomb WN, Garcia-Kennedy R, Burns W, Hayashi M, Collins G, Esquivel CO. Liver transplantation from non-heart beating donors in rats: influence of viscosity and temperature of initial flushing solutions on graft function. *Liver Transpl Surg* 1997;3(1):39-45.

88. Alvarez J, del Barrio R, Arias J, Ruiz F, Iglesias J, de Elias R, Yebenes C, Matesanz J, Caniego C, Elvira J. Non-heart-beating donors from the streets: an increasing donor pool source. *Transplantation* 2000;70(2):314-7.
89. Valero R, Cabrer C, Oppenheimer F, Trias E, Sanchez-Ibanez J, De Cabo FM, Navarro A, Paredes D, Alcaraz A, Gutierrez R, et al. Normothermic recirculation reduces primary graft dysfunction of kidneys obtained from non-heart-beating donors. *Transpl Int* 2000;13(4):303-10.
90. D'alessandro AM, Hoffmann RM, Knechtle SJ, Odorico JS, Becker YT, Musat A, Pirsch JD, Sollinger HW, Kalayoglu M. Liver transplantation from controlled non-heart-beating donors. *Surgery* 2000;128(4):579-88.
91. Harvey PR, Lu S, McKeown CM, Petrunka CN, Ilson RG, Strasberg SM. Adenine nucleotide tissue concentrations and liver allograft viability after cold preservation and warm ischemia. *Transplantation* 1988;45(6):1016-20.
92. Kim SK, Belzer FO, Southard JH. Loss of mitochondrial respiratory function and its suppression during cold ischemic preservation of rat livers with University of Wisconsin solution. *Hepatology* 1992;16(3):742-8.
93. Kurokawa T, Nonami T, Harada A, Nakao A, Takagi H. Mechanism and prevention of ischemia-reperfusion injury of the liver. *Semin Surg Oncol.* 1996;12(3):179-82.
94. Dhar DK, Yamanoi A, Ohmori H, Nakashima Y, Yamamoto A, Osama NE, Kubota H, Kohno H, Nagasue N. Modulation of endothelin and nitric oxide: a rational approach to improve canine hepatic microcirculation. *Hepatology* 1998;28(3):782-8.

95. Pannen BH, Al-Adili F, Bauer M, Clemens MG, Geiger KK. Role of endothelins and nitric oxide in hepatic reperfusion injury in the rat. *Hepatology* 1998;27(3):755-64.
96. Vollmar B, Glasz J, Leiderer R, Post S, Menger MD. Hepatic microcirculatory perfusion failure is a determinant of liver dysfunction in warm ischemia-reperfusion. *Am J Pathol.* 1994; 145(6):1421-31.
97. Aii S, Imamura M. Liver transplantation and hepatic sinusoidal cells. *J Gastroenterol Hepatol* 1995;10 Suppl 1:S92-S96.
98. Clavien PA. Sinusoidal endothelial cell injury during hepatic preservation and reperfusion. *Hepatology* 1998;28(2):281-5.
99. Palombo JO, Blackburn GL, Forse RA. Endothelial cell factors and response to injury. *Surgery* 1991; 173: 505-519.
100. Ryan US. The endothelial surface and responses to injury. *FederationProceeding* 1988; 45: 100-6.
101. Shirasugi N, Wakabayashi G, Shimazu M, Shito M, Kawachi S, Kitajima M. Interleukin 1 receptor blockade attenuates oxygen-derived free radical production and microcirculatory disturbances in ischemia/reperfusion injury in the liver. *Transplant Proc* 1997; 29: 371-3.
102. Himmelreich G, Rosch R, Neuhaus P, Riess H. Role of protein S in orthotopic liver transplantation. *Semin Thromb Hemost* 1993; 19: 286-9.

103. Caldwell-Kenkel JC, Currin RT, Tanaka Y, Thurman RG, Lemasters JJ. Reperfusion Injury to endothelial cells following cold ischemic storage of rat livers. *Hepatology* 1989; 10: 292-9.

104. Goto M, Takei Y, Kawano S, Nagano K, Tsuji S, Masuda E et al. Endothelin 1 is involved in the pathogenesis of ischemia/reperfusion liver injury by hepatic microcirculatory disturbances. *Hepatology* 1994; 19: 675-81.

105. Ota T, Hirai R, Urakami A, Soga H, Nawa S, Shimizu N. Endothelin-1 levels in portal venous blood in relation to hepatic tissue microcirculation disturbance and hepatic cell injury after ischemia/reperfusion. *Surgery Today* 1997; 27:313-20.

106. Kerrigan CL, Scotland MA. Ischemia reperfusion injury: a review. *Microsurgery* 1993; 14: 165-75.

107. Nauta RJ, Tsimoyiannis E, Uribe M, Walsch DB, Miller D, Butterfield A. The role of calcium ions and calcium channel entry blockers in experimental ischemia-reperfusion-induced liver injury. *Ann Surg* 1991; 213: 137-42.

108. Chávez Cartaya RE, Pino G, Ramírez P, Calne Y, Jamieson NV. Ischemia and reperfusion injury of the rat liver: the role of nimodipine. *Eur Surg Res* 1996; 60: 199-206.

109. Kito K, Arai T, Mori K, Morikawua S, Inubushi T. Hepatic blood flow and energy metabolism during hypotension induced by prostaglandin E1

and nicardipine in rabbits: an in vivo magnetic resonance spectroscopic study. *Anesth Analg* 1993; 77: 606-12.

110. Takei Y, Marzi I, Kauffman FC, Currin RT, Lemasters JJ, Thurman RG. Increase in survival time of liver transplants by protease inhibitors and a calcium channel blocker nisoldipine. *Transplantation* 1990; 50: 14-20.

111. Ar'Rajab A, Ahren B, Bengmark S. Improved liver preservation for transplantation due to calcium channel blockade. *Transplantation* 1991; 51 965-967.

112. De-Broin E, Urata K, Giroux L, Lepage R, Huet P-M. Effect of calcium antagonists on rat liver during extended cold preservation-reperfusion. *Transplantation* 1997; 63: 1547-1554.

113. Chávez-Cartaya RE, Metcalfe S, Ramirez P, Calne R, Jamieson NV. Rat liver blood flow after ischemia and reperfusion. The effects of the platelet-activating factor antagonist WEB-2170 and of removing circulating leukocytes. *Transplantation* 1994; 57: 1440-1444.

114. Jutila MA, Berg EL, Kishimoto TK, Picker LJ, Bargatze RF, Bishop DK et al. Inflammation-induced endothelial cell adhesion to lymphocytes, neutrophils and monocytes. *Transplantation* 1989 ; 48: 727-731.

115. Harlan JM. Leukocyte-endothelial interactions. *Blood* 1985; 3: 513-525.

116. Welbourn CRB, Goldman G, Paterson IS, Valeri CR, Shepro D, Hechtman HB. Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury central role of neutrophil. *Br J Surg* 1991; 78: 651-655.
117. Jaeschke H. Preservation injury mechanisms, prevention and consequences. *J Hepatol* 1996; 25: 774-780.
118. Clavien PA, Harvey PRC, Sanabria JR, Cywes R, Lavy GA, Strasberg SM. Lymphocyte adherence in the reperfused rat liver mechanisms and effects. *Hepatology* 1993; 17: 131-142.
119. Clavien PA, Morgan GR, Sanabria JR, Petrunka C, Levy GA, Robert P et al. Effect of cold preservation on lymphocyte adherence in the perfused rat liver. *Transplantation* 1991; 52: 412-417.
120. Adams DH, Wang LF, Burnett D, Stockley RA, Neuberger JM. Neutrophil activation an important cause of tissue damage during liver allograft rejection? *Transplantation* 1990; 50: 86-91.
121. Lewis RA, Austen KF, Soberman RJ. Leukotrienes and other products of the 5-lipoxygenase pathway. *N Engl J Med* 1990; 323: 645-655.
122. Frank MM. Complement in the pathophysiology of human disease. *N Engl J Med* 1987; 316: 1525-1530.
123. Jaeschke H, Farhood A, Bautista AP, Spolarics Z, Spitzer JJ, Smith CW. Functional inactivation of neutrophils with a Mac-1 (CD11 b/CD18) monoclonal antibody protects against ischemia-reperfusion injury in rat liver. *Hepatology* 1993; 17: 915-923.

124. Chávez-Cartaya RE, Ramírez P, Calne Y, Jamieson NV. Laser-Doppler flowmetry in the study of in vivo liver ischemia and reperfusion in the rat. *J Surg Res* 1994; 56: 473.
125. Jaeschke H, Farhood A, Smith W. Contribution of complement-stimulated hepatic macrophages and neutrophils to endotoxin-induced liver injury in rats. *Hepatology* 1994; 19: 973-979.
126. White DJG, Oglesby T, Liszewski MK, Tedja I, Hourcade TD, Wang MW et al. Expression of human decay accelerating factor or membrane cofactor protein genes on mouse cells inhibits lysis by human complement. *Transpl Proc* 1992; 24: 474-476.
127. Pruitt SK, Baldwin WM III, Marsh HC JR, Lin SS, Yeh C6, Bollinger RR et al. Effect of soluble complement receptor type 1 on natural antibody levels during xenograft rejection. *Transpl Proc* 1992; 24: 477 –478.
128. Forty J, Hasan R, Cary N, White DJG, Wallwork J. Hyperacute rejection of rabbit hearts by human blood is mediated by the alternative pathway of complement. *Transpl Proc* 1992; 24: 488-489.
129. Arora AS, Gores GJ. The role of metals in ischemialreperfusion injury of the liver. *Semin Liver Dis* 1996; 16 : 31-38.
130. Kirschner RE, Fantini GA. Role of iron and oxygen-derived free radicals in ischemia-reperfusion injury. *J Am Coll Surg* 1994; 179: 103-117.

131. Kukielka E, Cederbaum AI. Ferritin stimulation of hydroxyl radical production by rat liver nuclei. *Arch Biochem Biophys* 1994; 308:70-77.
132. Dabbagh AJ, Mannan T, Lynch SM, Frei B. The effect of iron overload on rat plasma and liver oxidant status in vivo. *Biochem J* 1994; 300: 799-803.
133. McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *New England Journal of Medicine* 1985; 312(3): 159-63.
134. Halliwell B, Gutteridge JM. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* 1984; 219(1): 1-14.
135. Arthur MJ, Bentley IS, Tanner AR, Saunders PK, Millward-Sadler GH, Wright R. Oxygen-derived free radicals promote hepatic injury in the rat. *Gastroenterology* 1985; 89(5): 1114-22.
136. McCord JM. Oxygen-derived radicals: a link between reperfusion injury and inflammation. *Federation Proc* 1987; 46: 2402-2406.
137. Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease Laboratory Investigation 1992; 47: 412-420.
138. Waud WR, Rajagopalan KV. Purification and properties of the NAD⁺ dependent (Type D) and O₂ dependent (Type O) forms of rat liver xanthine dehydrogenase. *Arch Biochem Biophys* 1976; 172: 354-364.
139. McCord JM. The superoxide free radical: Its biochemistry and pathophysiology. *Surgery* 1983; 94: 412-414.

140. Shibuya H, Ohkohchi N, Seya K, Satomi S. Kupffer cells generate superoxide anions and modulate lipid peroxidation and mitochondrial proton ATP-ASE activity in the perfused rat liver cold preservation. *Transpl Proc* 1997; 29: 1328-1333.
141. McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury *N Engl J Med* 1985; 312: 159-163.
142. McKelvey TG, Höllwarth ME, Granger DN, Engerson TD, Landler U, Jones HP. Mechanisms of conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase in ischemic rat liver and kidney. *Gastrointest Liver Physiol* 1988; 17: G753-G760.
143. Jarasch E-D, Bruder G, Heis HW. Significance of xanthine oxidase in capillary endothelial cells. *Acta Physiol Scand* 1986; S548: 39-46.
144. Ratych RE, Chuknynska RS, Bulkley GB. The primary localization of free radical generation after anoxiareoxygenation in isolated endothelial cells. *Surgery* 1987; 102: 122-131.
145. Marubayashi S, Dohi K, Yamada K, Kawasaki T. Role of conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemic rat liver cell injury. *Surgery* 1991; 110: 537-43.
146. Metzger J, Lauterburg H. Effect of allopurinol on oxidant stress and hepatic function following ischemia and reperfusion in the rat. *Liver* 1988; 8: 344-349.

147. Brass CA, Nunes F, Nagpal R. Increased oxyradical production during reoxygenation of perfused rat liver. *Transplantation* 1994; 58: 1329-1335.
148. Chávez-Cartaya R, Jamieson NV, Ramirez P, Marín J, Pino-Chávez G. Free radical scavengers to prevent reperfusion injury following warm liver ischemia. *Transplant Proc* 1999; 31: 2439-2440.
- 148 bis. Ramírez P, Marín JM, Piñero A, Chávez-Cartaya R, Parrilla P. Investigación experimental aplicada a la clínica: isquemia-reperfusión hepática. *Cir Esp* 2000; 67: 281-91.
149. Chávez-Cartaya R, Jamieson NV, Ramírez P, Marín J, Pino-Chávez G. Free radical scavengers to prevent reperfusion injury following experimental warm liver ischemia. Is there a real physiological benefit? *Transplant* 1999; 12: 213-221.
150. Marín JM. Alteraciones de la microcirculación (fluximetría láser-Doppler) y de la función (aclaramiento plasmático ^{99m}Tc -IDA) hepática en un modelo de isquemia-reperfusión hepática en ratas. Estudio del efecto protector de diversos antioxidantes (SOD, vitamina E, captopril, alopurinol, propranolol) (tesis doctoral) Universidad de Murcia, 1998.
151. Rao PN, Walsh TH, Makowka L, Rubin RS, Weber T, Snyder JT et al. Purine nucleoside phosphorylase a new marker for free oxygen radical injury to the endothelial cell. *Hepatology* 1990; 11: 193-198.
152. Granger DN. Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol* 1988; 255: H1269-H1275.

153. Prasad K, Kalra J, Chaudhary AK, Phann M, Debnath D. Effect of polymorphonuclear leukocyte-derived oxygen free radicals and hypochlorous acid on cardiac function and some biochemical parameters. *Am Heart J* 1990; 3: 538-550.
154. Jaeschke H, Farhood A, Bautista AP, Spolarics Z, Spitzer JJ. Complement activates Kupffer cells and neutrophils during reperfusion after hepatic ischemia. *Am J Physiol* 1993; 264: G801-G809.
155. Garcia-Valdecasas JC, Cugat E, Almenara R, Grande L, Angas J, Fuster et al. Ischemia-reperfusion injury in an ischemic rat liver model: relationship between oxygen-derived free radicals and prostaglandins. *Transpl Proc* 1990; 22: 523-526.
156. Olthoff KM, Wasef E, Seu P, Imagawa DK, Freischlag JA, Hart J et al. PGE1 reduces injury in hepatic allografts following preservation. *J Surg Res* 1991; 50: 595-601.
157. Landa JI, Llanos K, Moreno A, Gómez M, Grau M, Balibrea JL. Papel de la prostaciclina y nucleótidos cíclicos en el efecto citoprotector de la somatostatina-14 en un modelo de isquemia-reperfusión en ratas. *Cir Esp* 1992; 6: 396-400.
158. Díaz J, Serrano E, Acosta F, Carbonell L. Reference interval for human plasma nitric oxide end products. *Clin Biochem* 1998; 31

159. Cetinkale O, Belce A, Konukoglu D, Senyuva C, Gumustas MK, Tas T. Evaluation of lipid peroxidation and total antioxidant status in plasma of rats following thermal injury. *Burns* 1997; 23: 114-116.
160. Tribble OL, Yee T, Jones OP. The pathophysiological significance of lipid peroxidation in oxidative cell injury. *Hepatology* 1987; 7: 377–387.
161. Walsh TR, Rao PN, Makowka L, Starzl TE. Lipid peroxidation is a nonparenchymal cell event with reperfusion after prolonged liver ischemia. *J Surg Res* 1990; 49: 18-22.
162. Stark ME, Szurszewski JH. Role of nitric oxide in gastrointestinal and hepatic function and disease. *Gastroenterology* 1992; 103: 1928-1949.
163. Kanematsu T, Higashi H, Takemara K, Matsumata Y, Maehara Y, Sugimachi K et al. Bioenergy status of human liver during and after warm ischemia. *Hepato Gastroenterol* 1990; 37 (Supl): 160-162.
164. Díaz J, Serrano E, Acosta F, Carbonell L. Reference intervals for four biochemistry analytes in plasma for evaluating oxidative stress and lipid peroxidation in human plasma. *Clin Biochem* 1998; 44: 320-324.
165. Bauer C, Walcher F, Kalweit U, Larsen R, Marzi I. Role of oxide in the regulation of the hepatic microcirculation in vivo. *J Hepatol* 1997; 27: 1089-1095.
166. Ellis G, Adatia I, Yazdanpanah M, Makela SK. Nitrite and nitrate analyses a clinical biochemistry perspective. *Clin Biochem* 1998; 3: 1195-220.

167. Murphy ME, Sies H. Reversible conversion of nitroxyl anion to nitric oxide by superoxide dismutase. *Biochemistry* 1991; 88: 10860-10864.

168. Beckman JS, Beckman TW, Chien J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 1620-1624.

169. Harbrecht BG, Billiar TR, Stadler J, Demetris AJ, Ochoa J, Curran RD et al. Inhibition of nitric oxide synthesis during endotoxemia promotes intrahepatic thrombosis and an oxygen radical-mediated hepatic injury. *J Leukocyte Biol* 1992; 52: 390-394.

170. Sergent O, Griffon B, Morell, Chevanne M, Dubos M-P, Cillard P et al. Effect of nitric oxide on iron-mediated oxidative stress in primary rat hepatocyte culture. *Hepatology* 1997; 25: 122.

171. Pannen BHJ, Al-Adili F, Bauer M, Clemens MG, Geiger KK. Role of endothelins and nitric oxide in hepatic reperfusion injury in the rat. *Hepatology* 1998; 27: 755-764.

172. Peralta C, Hotter G, Closa D, Gelpi E, Bulbena O, Roselló-Catafau J. Protective effect of preconditioning on the injury associated to hepatic ischemia-reperfusion in the rat role of nitric oxide and adenosine. *Hepatology* 1997; 25: 934-937.

173. Arthur MJ, Bentley IS, Tanner AR, Saunders PK, Millward-Sadler GH, Wright R. Oxygen-derived free radicals promote hepatic injury in the rat. *Gastroenterology* 1985;89(5):1114-22.

174. Editorial. Metal chelation therapy, oxygen radicals, and human disease. *Lancet* 1985;1(8421):143-5.

175. Thurman RG BHLJJ. Role of sinusoidal lining cells in hepatic reperfusion injury following cold storage and transplantation. *Semin Liver Dis* 1993;13(1):93-100.

176. Tsutsumi R, Azuma T, Miyamoto S, Hou Z, Ohkubo H, Yuzawa H, Kamohara Y, Okudaira S, Mizoe A, Fujioka H, et al. Main injury site of liver grafts from non-heart-beating donors in pigs. *Transplant Proc* 2000;32(7):2348.

177. Schiller HJ, Reilly PM, Bulkley GB Antioxidant therapy *Crit Care Med* 1993; 21: S92-S102.

178. Grace PA. Ischemia-reperfusion injury. *J Surg* 1994; 81: 637-647.

179. Caraceni P, Gasbarrini A, Van Thiel DH, Borle AB. Oxygen free radical formation by rat hepatocytes during postanoxic reoxygenation scavenging effect of albumin. *Gastrointest Liver Physiol* 1994; 24: G451-G458.

180. García JJ, Reiter RJ Guerrero JM, Escames G, Yu BP, Oh CS et al. Melatonina prevents changes in microsomal membrane fluidity during induced lipid peroxidation. *FEBS* 1997; 408: 297-300.

181. Dunne JB, Davenport M, Williams R, Tredger M. Evidence that s-adenosylmethionine and N-acetylcysteine reduce injury from sequential cold and warm ischemia in the isolated perfused rat liver. *Transplantation* 1994; 57: 1161-1168.
182. Sewerynek E, Reiter RJ, Melchiorri D, Ortiz GG, Lewinski A. Oxidative damage in the liver induced by ischemia-reperfusion protection by melatonin. *Hepato Gastroenterology* 1996; 43: 898-905.
183. Ozaki N, Nakamura M, Teraoka S, Ota K. Ebselen, a novel antioxidant compound protects the rat liver from ischemia-reperfusion injury. *Transpl Int* 1997; 10: 96-102.
184. Adkison D, Hollwarth ME, Benoit JN, Parks DA, McCord JM, Granger DN. Role of free radicals in ischemia-reperfusion injury to the liver. *Acta Physiol Scand Suppl* 1986; 548: 101-107.
185. Ontell SJ, Makowka L, Trager J, Mazzaferro V, Ove P, Starzl TE. Pharmacologic modulation of experimental postischemic hepatic function. *Ann Surg* 1989; 209 : 200-210.
186. Kobayashi K, Nonami T, Kurokawa T, Sugiyama S, Ozawa T, Takagi H. Mechanism and prevention of ischemia-reperfusion-induced liver injury in rats. *J Surg Res* 1991; 51: 240-244.
187. Foschi D, Castoldi L, Lesma A, Musazzi M, Benevento A, Trabucchi E. Effects of ischaemia and reperfusion on liver regeneration in rats. *Eur J Surg* 1993; 159: 393-398.

188. Nunes FA, Kumar C, Chance B, Bras CA. Chemiluminescent measurement of increased free radical formation after ischemia/reperfusion. *Dig Dis Sci* 1995; 40: 1045-1053.
189. Ikejima K, Limuro Y, Forman DT, Thurman RG. A diet containing glycine improves survival in endotoxin shock in the rat. *Am J Physiol (United States)*, Jul 1996, 271 (1 Pt 1) pG97-103.
190. Hijioka T, Osenberg RL, Lemasters L, Thurman RG. Kupffer cells contain voltage-dependent calcium channels. *Mol Pharmacol* 1992, 41: 435-440.
191. Marsh D, Hjelmhaug J, Vreugdenhil P, Belzer F, Southard J. Glycine prevention of cold ischemic injury in isolated hepatocytes. *Criobiology* 1991; 28: 105-9.
192. Fergusson D, Gores G, Bronk S, Krom R. An increase in cytosolic protease activity during liver preservation. Inhibition by glutathione and glycine. *Transplantation* 1993; 627-33.
193. Schemmer P, Schoonhoven R, Swenberg JA, Bunzendahl H, Thurman RG. Gentle in situ manipulation during organ harvest decreases survival after rat liver transplantation: role of Kupffer cells. *Transplantation* 1998; 65: 1015-1020.
194. Nichols JC, Bronk SF, Mellgren RL, Gores GJ. Inhibition of nonlysosomal calcium-dependent proteolysis by glycine during anoxic injury of rat hepatocytes. *Gastroenterology* 1994; 106: 168-176.

195. Lemasters JJ, Thurman RG. Reperfusion injury after liver preservation for transplantation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1997; 37: 327-338.
196. Ikejima K, Qu W, Stachlewitz RF, Thurman RG. Kupffer cells contain a glycine-gated chloride channel. *Am J Physiol* 1997; 272: G1581-G1586.
197. Schemmer P, Bradford BU, Rose ML, Bunzendhal H, Raleigh JA, Lemasters JJ, Thurman RG. Intravenous glycine improves survival in rat liver transplantation. *Am J Physiol* 1999; 276: G924-G932.
198. Ozaki M, Ozasa H, Fuchinowe S, Teraoka S, Ota K. Protective effects of glycine and esterified-glutamylcystein on ischemia/reoxygenation injury of rat liver. *Transplantation* 1995; 22: 753-55.
199. Schilling M, den Butter G, Marsh DC, Belzer FO, Southard JH. Glycine inhibits phospholipolysis of hypoxic membranes. *Tx Med* 1994; 6: 140-43.
200. Takei Y, Marzi I, Gao W, Gores GJ, Lemasters JJ, Thurman RG. Leucocyte adhesion and cell death following orthotopic liver transplantation in the rat. *Transplantation* 1991; 51: 959-65.
201. Pannen BH, Al-Adili F, Bauer M, Clemens MG, Geiger KK. Role of endothelins and nitric oxide in hepatic reperfusion injury in the rat. *Hepatology* 1998; 27: 755-764.
202. Vollmar B, Glasz J, Leiderer R, Post S, Menger MD. Hepatic Microcirculatory perfusion failure is a determinant of liver dysfunction in warm ischemia-reperfusion. *Am J pathol* 1994; 145: 1421-31.

203. Roth E, Steininger R, Winkler S, Langle F, Grunberger T, Fugger R, Mülbacher F. L-arginine deficiency after liver transplantation as an effect of arginase efflux from the graft. Influence of nitric oxide metabolism. *Transplantation* 1994; 57: 665-9.

204. Jones SM, Thurman RG. L-arginine minimizes reperfusion injury in a low-flow, reflow model of liver perfusion. *Hepatology* 1996; 24: 163-8.

205. Peralta C, Hotter G, Closa D, Gelpi E, Bulbena O, Rosello-Catafau J. Protective effect of preconditioning on the injury associated to hepatic ischemia-reperfusion in the rat: role of nitric oxide and adenosine. *Hepatology* 1997; 25: 934-7.

206. Shiraishi M, Hiroyasu S, Nagahama M, Miyaguni T, Higa T, Tomori H, Okuhama Y, et. Al. Role of exogenous L-arginine in hepatic ischemia-reperfusion injury. *J Surg Res* 1997; 69: 429-34.

207. Längle F, Steininger R, Waldmann E, Grüberger, Benditte H, Mittlböck M, Soliman T. Improvement of cardiac output and liver blood flow and reduction of pulmonary vascular resistance by intravenous infusion of L-arginine during the early reperfusion period in pig liver transplantation. *Transplantation* 1997; 63: 1225-33.

208. Kobayashi H, Nonami T, Kurokawa T, Takeuchi Y, Harada A, Nakao A, Takagi H. Role of endogenous nitric oxide in ischemia-reperfusion injury in rat liver. *J Surg Res* 1995; 59 (6): 772-9.

209. Takei Y, Marzi I, Gao W, Gores GJ, Lemasters JJ, Thurmann RG. Leucocyte adhesion and cell death following orthotopic liver transplantation in the rat. *Transplantation* 1991; 51: 959.
210. Eriksson S, Fraser J, Laurent T, Pertoff H, Smerdsrod B. Endothelial cells are a site of uptake and degradation of hyaluronic acid in the liver. *Exp Cell Res* 1983; 144: 223.
211. Cottart CH, Do L, Blanc MC, Vaubourdolle M. Hepatoprotective effect of endogenous nitric oxide during ischemia reperfusion in the rat. *Hepatology* 1999; 29: 809.
212. Koeppel TA, Thies JC, Schemmer P. Inhibition of nitric oxide synthesis in ischemia/reperfusion of the rat liver is followed by impairment of hepatic microvascular blood flow. *J Hepatol* 1997; 27: 163.
213. Valero R, García-Valdecasas JC, Net M, Beltrán J, Ordi J, González FJ, López-Boado MA, Almenara R, Taurá P, Elena M, Capdevila L, Manyalich M, Visa J. L-arginine reduces liver and biliary tract damage after liver transplantation from non-heart-beating donor pigs. *Transplantation* 2000; 70: 730-7.
214. Strubelt O, Younes M, Li Y. Protection by albumin against ischemia- and hypoxia-induced hepatic injury. *Pharmacol Toxicol* 1994; 75 (5): 280-4.
215. Durmus O, Aricioglu A, Guven T, Oguz M, Yel M, Turkozkan N. The effect of allopurinol on the liver ultrastructure, reduced glutathione and

lipid peroxide levels during liver ischemia in guinea pigs. *Gen Pharmacol* 1994; 25 (4): 781-6.

216. Vardareli E, Saricam T, Koken T, Degirmenci I, Aral E, Erenoglu E. The effect of alpha-tocopherol and pentoxifyline on ischemia-reperfusion induced liver injury in rats. *Hepatogastroenterology* 1998; 45 (23): 1505-8.

217. Manika A, Trinh T, Lagace G, Dugas MA, Proulx F, Lepage G, Champagne J. N-acetylcysteine in pig liver transplantation from non-heart-beating-donors. *Transplantation* 1999; 68 (3): 327-30.

218. Mesa ML, Carrizosa R, Martinez-Honduvilla C, Benito M, Fabregat I. Changes in rat liver gene expresión induced by thioacetamide: protective role of S-adenosyl-L-methionine by a glutathione-dependent mechanism. *Hepatology* 1996; 23 (3): 600-6.

219. Gonzalez-Correa JA, de la Cruz JP, Martin-Aurioles E, Lopez-Egea MA, Ortiz P, Sanchez de la Cuesta F. Effects of S-adenosyl-L-methionine on hepatic and renal oxidative stress in an experimental model of acute biliary obstruction in rats. *Hepatology* 1997; 26 (1): 121-7.

220. De la Cruz JP, Merida M, Gonzalez-Correa JA, Ortiz P, Sanchez de la Cuesta F. Effects of S-adenosyl-L-methionine on blood platelet activation. *Gen Pharmacol* 1997; 29 (4): 651-5.

221. De la Cruz JP, Gonzalez-Correa JA, Martin-Aurioles E, Ortiz P, Sanchez de la Cuesta F. Effects of S-adenosyl-L-methionine on platelet thromboxane and vascular prostacyclin. *Biochem Pharmacol* 1997; 53 (11): 1761-3.

222. Cincu RN, Rodriguez Ortigosa CM, Vesperinas I, Quiroga J, Prieto J. S-adenosyl-L-methionine protects the liver against the cholestatic, cytotoxic, and vasoactive effects of leukotriene D4: a study with isolated and perfused rat liver. *Hepatology* 1997; 26 (2): 330-5.

223. Peralta C, Closa D, Xaus C. Hepatic preconditioning in rats is defined by a balance of adenosine and xanthine. *Hepatology* 1998; 28 (3): 768-73.

224. Net M, Valero R, Almenara R. Hepatic xanthine levels as viability predictor of livers procured from non-heart-beating-donor pigs. *Transplantation* 2001; 71 (9): 1232-37.

225. Dunne JB, Alexander B, Williams R. Evidence that S-adenosyl-L-methionine diastereoisomers may reduce ischemia-reperfusion injury by interacting with purinoreceptors in isolated rat liver. *Br J Pharmacol* 1998; 125(1): 225-33.

226. Peralta C, Hotter G, Closa D. The protective role of adenosine in inducing nitric oxide synthesis in rat liver ischemia preconditioning is mediated by activation of adenosine A2 receptors. *Hepatology* 1999; 29 (1): 126-132.

227. Hickman R, Rose-Innes C, Tyler M. Energy charge as an indicator of liver viability. *Transplantation* 1992; 53: 540-45.

228. Li J, Yang S, Billiar TR. Cyclic nucleotides suppress tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis by inhibiting caspase activation and

cytochrome c release in primary hepatocytes via a mechanism independent of Akt activation. *J Biol Chem* 2000; 275: 13026-13034.

229. Li j, Billiar TR. The anti-apoptotic actions of nitric oxide in hepatocytes. *Cell Death Differ* 1999; 6: 931-33.

230. Surinder Y, Sindram D, Perry D. Ischemic preconditioning protects the mouse liver by inhibition of apoptosis through a caspase-dependent pathway. *Hepatology* 1999; 30: 1223-31.

231. Tabet J, García-Valdecasas JC, Net M, Cifuentes A, González FX, Valero R, Deulofeu R. Evaluation of ischemic liver injury during graft procurement from non-heart-beating donor pigs. *Transplant Proc* 1997; 29 (8): 3482-3.

232.- Valero R, García-Valdecasas JC, Tabet J, Taurá P, Rull R, Beltrán J, García F. Hepatic blood flow and oxygen extraction ratio during normothermic recirculation and total body cooling as viability predictors in non-heart-beating donor pigs. *Transplantation* 1998; 66 (2): 170-6.

233.- Koyama I, Ogawa N, Watanabe T, Taguchi Y, Asami H, Nagashima N, Shinokuza N. Utilization of warm ischemic livers from non-heart-beating donors by portable cardiopulmonary bypass and heterotopic transplantation. *Transplant Proc* 1996; 28: 1878-9.

234.- Shirakura R, Kamiike W, Matsumura A, Miyagawa S, Fukushima N, Hatanaka N, Chang JC. Multiorgan procurement from non-heart-beating donors by use of Osaka University cocktail, Osaka rinse solution, and de portable cardiopulmonary bypass machine. *Transplant Proc* 1993; 25: 3093-4.

235.- García-Valdecasas JC, Tabet J, Valero R. Evaluation of ischemic injury during liver procurement from non-heart-beating donors. *Eur Surg Res* 1999; 31: 447-56.

236.- García-Valdecasas JC, Tabet J, Valero R. Liver conditioning after cardiac arrest: the use of normothermic recirculation in an experimental model. *Transplant Int* 1998; 11: 424-32.

237.- López-Boado MA, García-Valdecasas JC, Ordi J, Tabet J, Net M, Cifuentes A, Rull R. Histological changes during and after liver transplantation from NHBD pig. *Transplant Proc* 1997; 29: 3471.

238.- Cottart CH, Do L, Blanc MC, Vaubourdolle M, Descamps G, Durand D, Galen FX. Hepatoprotective effect of endogenous nitric oxide during ischemia-reperfusion in the rat. *Hepatology* 1999; 29 (3): 809-13.

239.- Koepffel TA, Thies JC, Schemmer P, Trauner M, Gebhard MM, Otto G, Post S. Inhibition of nitric oxide synthesis in ischemia/reperfusion of the rat liver is followed by impairment of hepatic microvascular blood flow. *J Hepatol* 1997; 27 (1): 163-9.

240.- Uhlmann D, Scommotau S, Witzigmann H, Spiegel HU. Exogenous L-arginine protects liver microcirculation from ischemia-reperfusion injury. *Eur Surg Res* 1998; 30 (3): 175-84.

241.- Mora CT. Cardiopulmonary bypass. Principles and techniques of extracorporeal circulation. New York: Springer-Verlag, 1995.

242.- Hessel EA. Cardiopulmonary bypass circuitry and cannulation techniques. Cardiopulmonary bypass. Principles and practices. Baltimore: Williams and Wilkins, 1993: 55-92.

243.- Marsh D, Hjelmhaug J, Vreugdenhil P, Belzer F, Southard J. Glycine prevention of cold ischemic injury in isolated hepatocytes. *Criobiology* 1991; 28: 105-9.

244.- Fergusson D, Gores G, Bronk S, Krom R. An increase in cytosolic protease activity during liver preservation. Inhibition by glutathione and glycine. *Transplantation* 1993; 627-33.

245.- Schemmer P, Schoonhoven R, Swenberg JA, Bunzendahl H and Thurman RG. Gentle in situ manipulation during organ harvest decreases survival after rat liver transplantation: role of Kupffer cells. *Transplantation* 1998; 65: 1015-20.

246.- Net M. Liver xanthine levels as predictor of graft viability in pig liver transplantation from NHBD. LICAGE. Junio 1998. Strassbourg, France.

247.- Net M. Niveles hepáticos de xantina: valor predictivo de la viabilidad del injerto en el trasplante de hígados obtenidos de donantes a corazón parado en cerdos. V Congreso de la Societat Catalana de Transplantament- 24-27 de enero de 1999. Barcelona, España.

248.- Net M. Liver xanthine levels as predictor of graft viability in pig liver transplantation from NHBD. Congress of the International Society for Organ Sharing. Including 3rd workshop on NHBD. 14-16 de abril de 1999. Maastricht, The Netherlands.

249.- Poston JM, Parenteau GL. Biochemical effects of ischemia on isolates perfused rat heart tissues. *Arch Biochem Biophys* 1992; 295: 35-41.

250.- Saiki S, Yamaguchi K, Chijiwa K, Shimizu S, Hamasaki N, Tanaka M. Phosphoenolpyruvate prevents the decline in hepatic ATP and energy charge after ischemia and reperfusion injury in rats. *J Surg Res* 1997; 73 (1): 59-65.

251.- Shinohara H, Tanaka A, Fujimoto T. Prostaglandin E1 resuscitates hepatic organic anion transport independent of its hemodynamic affect after warm ischemia. *J Surg Res* 1997; 68 (1): 56-62.

252.- Arias Díaz J, Álvarez J, Gómez M. Changes in adenine nucleotides and lipid hydroperoxides during normothermic cardiopulmonary bypass in a porcine of type II non-heart-beating-donor. *Transplant Proc* 1997; 29: 3486-7.

253.- Takada Y, Tabniguchi H, Fukunaga K, Yuzawa K, Otsuka M, Todoroki T. Hepatic allograft procurement from NHBD: limits of warm ischemia in porcine liver transplantation. *Transplantation* 1997; 63: 369-73.

254.- Todo S, Zhu Y, Zhang S. Attenuation of ischemic liver injury by augmentation of endogenous adenosine. *Transplantation* 1997; 63 (2): 217-23.

255.- Seya K, Ohkohchi N, Tsukamoto S, Satomi S. Why is liver preservation performed at 4 degrees C? *Transpl Int* 1996; 9 Suppl 1: s 432-6.

256.- Gulian Jm, Dalmaso C, Desmoulin F, Scheiner C, Cozzone PJ. Twenty-four-hour hypothermic preservation of rat liver with Euro-Collins and UW solutions. A comparative evaluation by ³¹P NMR spectroscopy, biochemical assays, and light microscopy. *Transplantation* 1992; 54 (4): 599-603.