

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE  
BARCELONA**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA**

**PERFUSIÓN PORTAL DE PGE1 EN LA FASE  
DE REVASCULARIZACIÓN DEL INJERTO  
HEPÁTICO: ESTUDIO DE LA TOLERANCIA  
HEMODINÁMICA Y DEL EFECTO SOBRE  
LA LESIÓN DE ISQUEMIA-REPERFUSIÓN  
EN UN MODELO DE TRASPLANTE  
HEPÁTICO PORCINO.**

***MARCELO CECHINEL REIS***

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE  
BARCELONA**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA**

**PERFUSIÓN PORTAL DE PGE1 EN LA FASE  
DE REVASCULARIZACIÓN DEL INJERTO  
HEPÁTICO: ESTUDIO DE LA TOLERANCIA  
HEMODINÁMICA Y DEL EFECTO SOBRE  
LA LESIÓN DE ISQUEMIA-REPERFUSIÓN  
EN UN MODELO DE TRASPLANTE  
HEPÁTICO PORCINO.**

**Tesis doctoral de: Marcelo Cechinel Reis**

**Dirigida por el Prof. Carlos Margarit Creixell**

**Barcelona, septiembre de 2004.**

**DR. CARLOS MARGARIT CREIXELL**, Profesor Titular de Patología Quirúrgica de la Universitat Autònoma de Barcelona,

Certifico que,

La tesis doctoral titulada: **PERFUSIÓN PORTAL DE PGE1 EN LA FASE DE REVASCULARIZACIÓN DEL INJERTO HEPÁTICO: ESTUDIO DE LA TOLERANCIA HEMODINÁMICA Y DEL EFECTO SOBRE LA LESIÓN DE ISQUEMIA-REPERFUSIÓN EN UN MODELO DE TRASPLANTE HEPÁTICO PORCINO**, realizada por Marcelo Cechinel Reis, se ha desarrollado bajo mi dirección y reúne los criterios científicos y formales suficientes para ser presentada ante el tribunal correspondiente, para optar al título de Doctor.

**Barcelona, 01 de Noviembre de 2004.**

**Firmado: Dr. Carlos Margarit Creixell.**

**Profesor Titular de Cirugía.**

Dedico este trabalho a meus pais,  
Lucio Ricardo Reis e Maria das Graças Cechinel Reis, pela  
confiança e apoio que sempre depositaram em todas minhas  
iniciativas.

# **AGRADECIMIENTOS**

---

- En especial al Dr. Carlos Margarit, quien ha confiado en mi capacidad de trabajo. Su gran conocimiento y cualidad de excepcional profesional fue primordial para mi formación médica y la realización de esta tesis. Su inmensa responsabilidad y incansable dedicación a su trabajo y a los pacientes me enseñaron un camino más corto al éxito. Como ser humano, agradezco enormemente por su compasión hacia mi persona. En los momento más difíciles que necesité de su ayuda, siempre estuvo presente. Incluso mi estancia en España no hubiese sido posible sin su auxilio. Gracias de corazón, se ha comportado como un verdadero padre.
  
- Al Dr. Enric Murio, por su gran amistad y apoyo como amigo en todo el periodo que estuvimos en convivencia, indudablemente fundamental para mi adaptación. Sus conocimientos como médico cirujano y investigador me posibilitaron crecer como profesional y dar mis primeros pasos en el campo de investigación experimental.
  
- Al resto de los miembros de la Unidad de cirugía Hepato-bilio-pancreática y trasplante hepático, Dra. Itxarone Bilbao, Dr. Jose Luis Lázaro, Alfredo Escartin, Dr. D. Cura y Dr. M. Asensio, personas excepcionales y excelentes profesionales. Sus cualidades contribuyeron en gran parte para la formación de mi conocimiento en el campo de la cirugía y también como persona.
  
- A Montserrat Amenos, secretaria de la Unidad de cirugía Hepato-bilio-pancreática y trasplante hepático y a todos los profesionales de la 9ª planta por el cariño y auxilio depositado durante todo mi transcurso en el hospital.

- A los Doctores Luis Humberto Rojas, Ricardo Alvarado, Pierluigi Berti, Jorge Cancino, Abel Orozco, Jesus Porraz y Martín Gaxiola por la gran amistad y compañerismo en todos los momentos y con quienes hemos tenido la tarea de realizar los trasplantes hepáticos presentados en este trabajo de investigación.
- A Marta Rosal, por su dedicación como veterinaria y fundamental apoyo en la organización de los protocolos (quirúrgico y anestésico) y materiales necesarios para que se pudiera realizar los experimentos de trasplante hepático porcino.
- A la Doctora Elena Allende, quien ha colaborado en el análisis histológico de las biopsias hepáticas.
- A Doctora Marta Pico, a Marisa Perez, a Rosa Espetez, y a Francisco Montero, quienes han colaborado en el análisis de las pruebas de coagulación. A las Doctoras Rosa Segura y Dolors Pelegri, por realizar la evaluación bioquímica de las muestras.
- A los profesionales de Infociencia Clinical Research por la fundamental ayuda para la realización del estudio estadístico.
- A la Fundación Catalana de trasplantes por haberme concedido una Beca en el año 2003 para que pudiese desarrollar este estudio de investigación.
- En especial a Natalia Martí y a todos los residentes de cirugía y amigos que me han apoyado constantemente en la realización de esta tesis doctoral.

# ÍNDICE

---

---

<b>1- INTRODUCCIÓN</b> .....	01
<b>1.1 - LA IMPORTANCIA DE LA LESIÓN DE ISQUEMIA-     REPERFUSIÓN EN EL TRASPLANTE HEPÁTICO</b> .....	02
<b>1.2 - FISIOPATOLOGÍA DE LA LESIÓN     DE ISQUEMIA REPERFUSIÓN</b> .....	04
1.2.1- Lesión de pre-preservación.....	04
1.2.2- Lesión de preservación (isquemia fría):hipotermia.....	06
1.2.3- Lesión de isquemia caliente.....	10
1.2.4- Lesión de reperfusión.....	11
<b>1.3 - DIAGNÓSTICO Y EVALUACIÓN CLÍNICA DE LA LIR</b> .....	27
<b>1.4 - MÉTODO ACTUAL DE PRESERVACIÓN DEL HÍGADO</b> .....	31
<b>1.5 - PROSTAGLANDINA TIPO E1 (PGE1)</b> .....	37
1.5.1 - Efecto citoprotector.....	37
1.5.2 - Efecto anti-inflamatorio.....	38
1.5.3 - Efecto vasodilatador.....	39
1.5.4 - Administración de prostaglandina por vía sistémica.....	40
1.5.5 - Administración de PGE1 por vía portal.....	41
<b>2- JUSTIFICACIÓN</b> .....	43
<b>3- HIPÓTESIS</b> .....	46
<b>4- OBJETIVOS</b> .....	48
<b>5- MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	50
<b>5.1 - TRASPLANTE HEPÁTICO EN CERDOS</b> .....	51
<b>5.2 - POBLACIÓN DE ESTUDIO</b> .....	56
<b>5.3 - DISEÑO DEL ESTUDIO</b> .....	58

---

<b>5.4- PARÁMETROS ANALIZADOS EN EL ESTUDIO</b>	
<b>PARA LA VALORACIÓN DE LA LIR.....</b>	<b>60</b>
5.4.1- Marcadores bioquímicos de la LIR.....	60
A)- Marcadores de Lesión Hepatocelular.....	60
B)- Marcador de Lesión Endotelial.....	60
C)- Marcador Inflamatorio en la LIR.....	61
5.4.2- Parámetros de Síntesis Hepática.....	62
5.4.3- Estudio Histopatológico.....	63
5.4.4- Estudio Hemodinámico. ....	64
5.4.5- Variables atribuibles a la intervención quirúrgica.....	67
<b>5.5- METODOLOGÍA DE LA RECOGIDA DE</b>	
<b>MUESTRAS Y DETERMINACIONES.....</b>	<b>68</b>
5.5.1- Fases del experimento.....	68
5.5.2- Protocolo de recogida de muestras y determinaciones.....	70
5.5.3- Procesamiento de las muestras de sangre y biopsias.....	73
<b>5.6- PROCEDIMIENTO ANESTÉSICO.....</b>	<b>75</b>
5.6.1- Donante.....	75
5.6.2- Receptor.....	77
<b>5.7- PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO.....</b>	<b>79</b>
5.7.1- Donante.....	79
5.7.2- Receptor.....	81
<b>5.8- METODOLOGÍA ESTADÍSTICA.....</b>	<b>84</b>
<b>6- RESULTADOS.....</b>	<b>85</b>
<b>6.1- CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO.....</b>	<b>86</b>

---

<b>6.2- CARACTERÍSTICAS DE LOS GRUPOS.....</b>	<b>87</b>
<b>6.3- ANÁLISIS DE LA LIR.....</b>	<b>95</b>
A)- Marcadores de lesión hepatocelular.....	95
- AST/ALT.....	95
- LDH.....	98
B)- Marcador inflamatorio en la LIR.....	99
- B- Galactosidasa. ....	99
C)- Marcador de lesión endotelial.....	101
- Ácido Hialurónico.....	101
D)- Correlación entre los marcadores de la LIR.....	103
<b>6.4- PARÁMETROS DE SÍNTESIS HEPÁTICA.....</b>	<b>106</b>
- TPP y Factor V.....	106
- Producción de bilis.....	107
<b>6.5- ESTUDIO HISTOLÓGICO.....</b>	<b>110</b>
- Hematoxilina-eosina.....	110
<b>6.6- ESTUDIO HEMODINÁMICO.....</b>	<b>115</b>
- Hemodinámica regional (hepática).....	115
- A- Análisis del Flujo Portal.....	115
- B- Análisis del Flujo Arterial.....	116
- C- Correlación de los flujos hepáticos con la lesión endotelial.....	118
- Hemodinámica sistémica.....	120
<b>6.7- ANÁLISIS DE LA SUPERVIVENCIA.....</b>	<b>122</b>

---

<b>7- DISCUSIÓN.....</b>	<b>123</b>
<b>7.1- ESTABLECIMIENTO DE UN MODELO EXPERIMENTAL DE TRASPLANTE HEPÁTICO PORCINO PARA EL DESARROLLO DEL ESTUDIO.....</b>	<b>131</b>
<b>7.2- ANÁLISIS DE LA SUPERVIVENCIA.....</b>	<b>133</b>
<b>7.3- DIAGNOSTICO Y CUANTIFICACIÓN DE LA LIR Y FUNCIÓN HEPÁTICA, ESTRATIFICANDO EL GRADO DE LESIÓN.....</b>	<b>136</b>
<b>7.4- ANÁLISIS DEL EFECTO BENEFICIOSO DE LA PROSTAGLANDINA E1 SOBRE LA LESIÓN DE ISQUEMIA-REPERFUSIÓN.....</b>	<b>140</b>
- Análisis de la lesión Hepatocelular y Sinusoidal.....	140
- Análisis de la Función de Síntesis Hepática.....	142
- Análisis del Estudio Histopatológico.....	143
<b>7.5- ANÁLISIS DE LOS EFECTOS DE LA PGE1 SOBRE EL FLUJO HEPÁTICO TOTAL (HEMODINÁMICA REGIONAL) Y SOBRE LA HEMODINÁMICA SISTÉMICA.....</b>	<b>145</b>
- Análisis del Estudio Hemodinámico Regional.....	145
- Análisis del Estudio Hemodinámico Sistémico.....	146
<b>8- CONCLUSIONES.....</b>	<b>148</b>
<b>9- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>151</b>

# INTRODUCCIÓN

---

## **1.1 - La importancia de la lesión de isquemia-reperfusión en el trasplante hepático**

La lesión de isquemia-reperfusión es el daño que sufre el injerto en el proceso del trasplante desde la extracción en el donante hasta el implante, y que se manifiesta en el momento de la revascularización del órgano en el receptor.

En los trasplantes de órganos, la lesión de isquemia-reperfusión (LIR) es una complicación frecuente que, dependiendo de la gravedad, puede comprometer la adecuada recuperación funcional del órgano injertado. En la gran mayoría, esta lesión produce una disfunción inicial del mismo, que normalmente se recupera durante los primeros días del postoperatorio. Sin embargo, esta lesión puede ser muy severa, produciendo el no-funcionamiento primario del injerto.

Durante el trasplante hepático y el postoperatorio precoz y tardío, dependiendo del grado de la LIR, pueden surgir complicaciones. Dentro de las complicaciones postoperatorias precoces, la más grave es el fallo hepático, con una frecuencia estimada del 1 a 5% en los trasplantes hepáticos, llegando a una mortalidad aproximada de 80% si no se realiza el re-trasplante (1). Sobre las complicaciones tardías, el grado de la LIR mantiene correlación con el tiempo de supervivencia del injerto y del enfermo, con la tasa de infección, aparición de rechazos agudo y crónico, entre otras complicaciones, que interfiere en la calidad de vida y supervivencia de los enfermos, así como mayor gasto hospitalario. Debido a esta repercusión clínica tan importante, el estudio de la fisiopatología y posibles tratamientos de la lesión de isquemia-reperfusión se ha intensificado en los últimos 20 años. Además, debido a la falta de órganos para trasplante, cada vez más se está aceptando órganos subóptimos para trasplante, los cuales son más susceptibles al desarrollo de una LIR de peor

pronóstico. Para esto, se han promovido investigaciones de diferentes fármacos que puedan tener un potencial efecto beneficioso, interfiriendo sobre los mecanismos de producción de RL, evitando la aparición posterior de la lesión, parcial o totalmente. En esta línea, se ha demostrado que la prostaglandina tipo E1 (PGE1) presenta efectos citoprotector, anti-inflamatorio y vasodilatador. Debido a esto, la PGE1 reúne gran parte de los requisitos necesarios para disminuir el grado de la lesión de isquemia-reperfusión, al menos desde el punto de vista teórico, posibilitando en muchas ocasiones el aprovechamiento de órganos subóptimos, que con la mejoría de la función de los órganos implantados, disminuirían las tasas de fallo hepático y re-trasplantes.

A pesar de los diversos resultados encontrados en la literatura, en que la mayoría de las virtudes atribuidas provienen de estudios experimentales o ensayos clínicos en series históricas y no controladas, queda claro que la PGE1 posee potenciales efectos beneficiosos, y su administración en dosis tolerables por vía portal en el momento de la revascularización del injerto, aumentará las posibilidades de éxito en el tratamiento de la LIR en trasplante hepático.

## **1.2- Fisiopatología de la LIR**

### *Lesión de Preservación o lesión de Isquemia-reperfusión en el trasplante hepático:*

Deben considerarse cuatro fases que contribuyen desde el punto de vista fisiopatológico en la formación de la lesión de isquemia-reperfusión del injerto hepático (Clavien):

#### 1.2.1- LESIÓN DE PRE-PRESERVACIÓN

Se trata de la lesión que se produce en el donante antes de la obtención del órgano. La patogenia de la lesión de pre-preservación puede resumirse básicamente en aquellos procesos que inducen hipoxia y déficit de sustratos energéticos en el hígado, y que van a ser responsables del daño tisular y celular a través de una serie de mediadores.

La lesión de pre-preservación puede ser debida a las características del donante (edad, estado nutricional, presencia de esteatosis hepática, enfermedades previas y consumo de drogas), presencia de inestabilidad hemodinámica, hipernatremia y tiempo de permanencia en unidad de cuidados intensivos.

Con respecto a la edad del donante, muchos autores han demostrado una peor supervivencia del injerto (41, 42, 43, 44, 50, 51, 54) e incluso una mayor mortalidad al aumentar la edad del donante (42, 43, 44, 51, 54). Donantes con edad superior a 70 años es un factor de riesgo de pérdida del injerto y del paciente tanto en estudios del tipo univariante como en multivariante(54).

El uso de drogas hepatotóxicas y principalmente el alcohol alteran la estructura y función del hepatocito, que en la gran mayoría son lesiones que conllevan a una lesión de isquemia-reperfusión (LIR) importante asociada con disfunción primaria del injerto.

El grado de infiltración de grasa en el hígado que presenta el donante, (esteatosis hepática), está relacionado con diversas situaciones: obesidad, alcoholismo, uso de nutrición parenteral, y mala nutrición (55). Para poder cuantificar la esteatosis, se categorizó en leve (menor de 30%), moderada (de 30% a 60%), y severa (mayor de 60%) (56). Asimismo, anatómicamente, se consideran dos tipos de esteatosis hepática: macrovesicular (gota "gruesa", extracelular), y microvesicular (intracelular). Se ha demostrado una correlación entre la esteatosis severa con la disfunción del injerto y con una LIR severa (56, 58, 59). La infiltración de grasa microvesicular parece comportar un menor riesgo, pudiendo ocasionar, en casos de grados moderados a severos, la aparición de una peor función del órgano sin repercutir en la supervivencia del injerto (60).

Otras circunstancias como la inestabilidad hemodinámica, episodios de hipotensión, hipoxia o anemia grave pueden condicionar un largo periodo de baja perfusión esplácnica y consumo del sustrato energético por metabolismo anaeróbico. La mala perfusión hepática conlleva a una lesión por isquemia y a un rápido consumo de la reserva energética celular previa a la extracción, disminuyendo de esta forma la calidad del injerto.

Puede afirmarse que el estado energético del hígado en términos de contenido de ATP influye significativamente en el resultado del trasplante. La integridad de la cadena respiratoria mitocondrial, así como el aporte de sustratos que mantiene las funciones energéticas celulares son de extrema importancia en la posterior viabilidad del órgano. Es por ello que la hipoalbuminemia o la desnutrición del donante es un factor que influye en la frecuencia de la disfunción primaria del injerto.

Alteraciones endocrinas, tan frecuentes en donantes con TCE como la diabetes insípida, pueden inducir a cambios hidroelectrolíticos con daño celular hepático. La

hipernatremia, secundaria de la diabetes insipidus, está relacionada con una lesión de isquemia-reperfusión de mayor grado, debido a la formación de edema celular generado por la alta presión osmótica (62, 63).

Otro factor importante en la formación de la lesión de pre-preservación es la estancia en unidades de cuidados intensivos, que siendo esta superior a tres días, se considera como una causa por sí misma de peor función del injerto(61). Una larga permanencia en UCI conlleva al consumo de las reservas energéticas intracelular hepática, a un mayor riesgo de episodios de hipotensión y a una mayor posibilidad de morbilidad asociada.

La producción de endotoxinas es también una fuente potencial de daño hepático, tanto en pacientes sépticos, no tributarios de ser considerados donantes de órganos, como en aquellos no sépticos, debiéndose atribuir en este caso su origen a un aumento de la permeabilidad de la barrera intestinal (como ocurre en la nutrición parenteral y el ayuno prolongado).

La lesión de pre-preservación comparte con la lesión de reperfusión una serie de mecanismos que serán estudiados mas adelante con detalles.

### 1.2.2- LESIÓN DE PRESERVACIÓN (ISQUEMIA FRÍA):HIPOTERMIA

La preservación de órganos se fundamenta en el principio de la reducción del metabolismo, que se obtiene mediante la disminución de la temperatura y con el uso de soluciones de preservación apropiadas.

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.

La hipotermia es en la actualidad el pilar básico de las técnicas de preservación, pues disminuye el metabolismo celular y por consiguiente la actividad enzimática responsable de los procesos autolíticos. La mayoría de los sistemas enzimáticos en animales normotérmicos muestran una disminución de su actividad que es de 1.5 a 2 veces por cada 10° C de descenso de temperatura. La disminución de la temperatura desde 37°C a 0°C disminuye la tasa de actividad metabólica de 12 a 13 veces. Dado que el hígado tolera hasta una hora de isquemia caliente, puede deducirse que con la disminución de la temperatura a 0°C podría ser preservado teóricamente de 12 a 13 horas (Beltzer) (7).

Las células de nuestro organismo obtienen su energía de las reacciones de oxidoreducción, donde los electrones son transferidos desde un compuesto dador electrónico (*agente reductor*) a un aceptor electrónico (*agente oxidante*), que en nuestro organismo es el oxígeno molecular. Cuando la célula se halla en condiciones de anoxia, el metabolismo se transforma en anaeróbico, debido a la ausencia de O<sub>2</sub> como aceptor de electrones en la fosforilación oxidativa (principal vía de obtención de ATP en condiciones fisiológicas). En estas circunstancias la célula se ve obligada a obtener energía mediante la glicolisis anaerobia, la cual genera un menor rendimiento energético y entra en un balance negativo de producción de ATP. Gran parte de la lesión de preservación se debe a los efectos de la anoxia (consumo de ATP, la producción de ácido láctico, la acidosis metabólica intracelular, la generación de Radicales Libres de Oxígeno y la inhibición de la bomba Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>). La acidosis resultante altera la cinética normal de las enzimas: se crean menos enlaces de alta energía y la célula es privada del combustible necesario para mantener la homeostasis.

En los mecanismos de muerte celular inducida por la isquemia se ha valorado la importancia de la membrana celular, del cito-esqueleto y de la regulación iónica (Blankenstein) (8). Aunque no se ha identificado a un único proceso como el factor crítico que conduce a la muerte de la célula, la depleción de los depósitos energéticos celulares produce un fracaso de la homeostasis celular caracterizada por la pérdida del gradiente de los iones a través de las membranas celulares. Los cambios de la membrana plasmática conducen a una pérdida del balance de los iones sodio y calcio, seguida de acidosis, de shock osmótico, de agrupamiento de la cromatina y lesión nuclear. Los iones sodio entran en la célula arrastrando con ellos un volumen de agua para mantener el equilibrio osmótico con el espacio intersticial del entorno, y los iones potasio escapan desde la célula hacia el intersticio. Estos cambios se acompañan de la activación de la fosfolipasa mitocondrial, de una precipitada pérdida de la fosforilación oxidativa y de una ulterior disminución de la producción de ATP. La entrada y sobrecarga masiva de calcio conduce a una alteración funcional de la membrana mitocondrial y a su lesión irreversible. Los efectos sobre la función mitocondrial son especialmente relevantes en este proceso, ya que desempeña un papel central para el metabolismo energético celular. La estabilidad de la membrana mitocondrial y el mantenimiento del gradiente electroquímico es pues, esencial para el mantenimiento de la capacidad de síntesis de ATP. A continuación se produce una autólisis secundaria con edema de los lisosomas, dilatación y vesiculación del retículo endoplásmico, filtración de las enzimas y de las proteínas y pérdida de la compartimentalización celular, y la célula muere.

Conjuntamente al proceso de pérdida de la homeostasis celular, llevando al edema, acidosis intracelular y lesión mitocondrial, la degradación de ATP para atender las necesidades energéticas residuales conduce al acúmulo de hipoxantina y xantina,

esto es, los metabolitos finales del AMP. En condiciones fisiológicas, la degradación se realiza mediante la forma Xantina-deshidrogenasa de la enzima Xantina-oxidoreductasa, pero en situación de isquemia, ésta se convierte en Xantina-oxidasa, (por el incremento del calcio citosólico y activación de proteasas), la cual cataliza la degradación de hipoxantina en Xantina y ácido úrico, produciendo, de esta forma, sustrato para la formación de RLO en el momento de la reperfusión. No obstante, la hipotermia reviste especial importancia pues disminuye el metabolismo, no únicamente a nivel catabólico, sino que también a nivel anabólico, con un efecto neto beneficioso para la preservación de los órganos, como demuestra el hecho que el consumo de ATP es mucho mayor en condiciones de isquemia caliente (Kamiike) (9).

Hasta aquí, se han descrito mecanismos clásicos de lesión inducida por la hipotermia en todas las clases de órganos. Sin embargo, durante la preservación del hígado se produce una lesión específica de las células del sinusoides hepático, esto es, de la microcirculación. La hipotermia induce daño a las células del endotelio sinusoidal (CES), favoreciendo la adhesión plaquetar en la reperfusión hepática, llevando en ciertos casos a la coagulación intravascular, seguramente mediada por la activación de las células de Kupffer y del propio endotelio, con liberación de potentes mediadores de la inflamación. La lesión endotelial provoca en presencia del oxígeno, la liberación local de RLO y proteasas, a lo que contribuyen los neutrófilos activados que tienden a adherirse. La activación del endotelio vascular induce una situación de procoagulabilidad e incremento de la adhesión de neutrófilos y activación en cascada del sistema complemento, que amplificará la lesión inicial de preservación.

### 1.2.3- LESIÓN DE ISQUEMIA CALIENTE (*rewarming injury*)

Otro factor que determina la intensidad de la lesión de reperfusión es el período de preservación poiquilotérmica (isquemia caliente), que se verifica entre el momento en que el órgano se retira del baño frío y la revascularización sanguínea (portal y/o arterial). Con el incremento de la temperatura, se produce una reactivación enzimática en condiciones anaeróbicas. Se intensifica el consumo de ATP con disminución del contenido energético celular, ocasionando con mayor rapidez el proceso de lesión celular mencionado anteriormente. Los depósitos de glicógenos disminuyen hasta un 30%.

El porcentaje de lesión irreversible y muerte celular es proporcional a la suma de los tiempos de isquemia fría y caliente. La muerte celular inducida por isquemia puede ser de dos tipos: la apoptosis y la necrosis. La apoptosis o muerte celular programada ("suicidio celular") es un mecanismo fisiológico para eliminar las células senescentes, lesionadas o anormales que afecta a las células individuales de forma dispersa. La apoptosis es iniciada por una endonucleasa y se caracteriza por la fragmentación del DNA en 180-200 pares de bases múltiples. Las células apoptóticas son ingeridas por los macrófagos sin la liberación de enzimas proteolíticas o de especies tóxicas del oxígeno y el proceso no se acompaña de inflamación. Por el contrario, la necrosis ("asesinato celular") es un proceso patológico que afecta a poblaciones de células y produce destrucción hística local, inflamación y, a menudo, graves consecuencias sistémicas. Aunque clásicamente se consideraba que tras una isquemia, la célula muere por necrosis, hoy en día se sabe que muere por necrosis o apoptosis dependiendo de la severidad de la noxa.

La reperfusión permite la expresión de la lesión generada durante la isquemia fría. Por ejemplo, la producción de radicales libres no tiene lugar hasta el momento de la reperfusión, y será proporcional al tiempo de preservación fría y a la duración de la isquemia caliente. De la misma forma la adhesión de neutrófilos y la activación de las células de Kupffer no se produce hasta el momento de la reperfusión.

- Transformación del metabolismo celular
- Mayor consumo energético intracelular (ATP)
- Disminución de la función de la bomba Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>
- Edema celular
- Aumento de Ca<sup>++</sup> intracelular y intra-mitocondrial.

**Tabla 1.1** - Mecanismos patogénicos implicados en la lesión por isquemia.

#### 1.2.4- LESIÓN DE REPERFUSIÓN

El restablecimiento del flujo sanguíneo en el injerto supone el fin de la fase de isquemia, que produce dos consecuencias beneficiosas en el tejido isquémico: se restablece el aporte de oxígeno y se eliminan los metabolitos tóxicos. La reperfusión es un prerrequisito para la recuperación de la lesión isquémica. Sin embargo, de forma paradójica supondrá la expresión de la lesión gestada durante la preservación. La intensidad de la lesión de reperfusión dependerá de la duración de la preservación, de manera que, el déficit energético que se produce en la fase de preservación se manifiesta en el momento de la revascularización, comprometiendo la viabilidad del injerto. La revascularización lleva implícita el aporte masivo de O<sub>2</sub> y otros nutrientes celulares a la

vez, que implicará la incorporación a la circulación sistémica el contenido del órgano isquémico ( $K^+$ , mediadores de la inflamación RLO,  $H^+$ ). El vertido de estos metabolitos tóxicos a la circulación sistémica puede tener consecuencias metabólicas a distancia o se puede inducir una ulterior lesión tisular local.

Paradójicamente, la reperfusión normóxica de los tejidos isquémicos produce un agravamiento de la lesión del órgano. Por el contrario, la reperfusión con bajo contenido de oxígeno de tejidos isquémicos produce muy poca lesión. Así, el regreso de la sangre oxigenada al tejido isquémico desencadena reacciones que producen más lesión en el tejido.

Se ha identificado a los radicales libres derivados del oxígeno (RLO) como los mediadores de la lesión en la secuencia isquemia-reperfusión. Se ha podido demostrar una explosión de oxidantes que se produce inmediatamente después de la reperfusión y que dura de 2-5 minutos. Asimismo, mediante el tratamiento con barrederos (scavengers) de los RLO tales como la superóxido dismutasa, la catalasa y el manitol se ha conseguido reducir esta explosión.

Debido a la progresiva oclusión de la microcirculación, algunos órganos no se pueden reperfundir tras la isquemia. Este proceso, denominado "fenómeno de la falta de revascularización" (no-reflow) se relaciona con la duración del intervalo isquémico. La causa exacta de este fenómeno no se conoce en su totalidad. Se sabe que se producen depósitos progresivos de fibrina en el endotelio vascular, que atrapan eritrocitos. De esta manera, se necesita de una mayor presión de apertura para abrir el lecho capilar. El edema celular también puede conducir al taponamiento capilar durante la reperfusión y contribuir así al fenómeno de falta de revascularización. El empleo de agentes fibrinolíticos o hiperosmóticos tales como el manitol pueden ayudar a contrarrestar este efecto.

En situaciones más delicadas, en que se desarrolla un LIR de grado moderado o severo, surgen las consecuencias sistémicas relacionadas con la liberación de detritus celulares, mediadores inflamatorios y RLO al torrente sanguíneo. El cuadro clínico suele caracterizarse por acidosis metabólica, hiperpotasemia y fracaso renal agudo.

En algunos pacientes, tras la reperfusión del tejido isquémico (generalmente en trasplante hepático o cardíaco) se produce el denominado "síndrome de reperfusión" con neutropenia, edema pulmonar no cardiogénico y graves alteraciones hemodinámicas, característicos de un fracaso multiorgánico. Esta lesión pulmonar se caracteriza por un incremento de la permeabilidad microvascular y por una acumulación de neutrófilos que han migrado hacia el pulmón tras su activación debida a los agentes liberados en los tejidos isquémicos reperfundidos. Se ha sugerido que el aumento de la permeabilidad pulmonar es dependiente del complemento.

La lesión de reperfusión se puede dividir en:

A) Lesión sinusoidal:

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 (76-78). Es la lesión prínceps generada en la fase de preservación, aunque se expresa en la reperfusión.

La capa vascular endotelial modula el tono del músculo liso vascular a través de la liberación de varias hormonas locales o autacoides. Éstos incluyen los metabolitos del ácido araquidónico, como por ejemplo la prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), el tromboxano A<sub>2</sub> y

el LTB<sub>4</sub>, al factor relajante derivado del endotelio/óxido nítrico y a la endotelina. Otros mediadores que tienen un papel en la lesión de la secuencia isquemia-reperfusión son el PAF, el complemento y las citocinas. Las células endoteliales también modifican la respuesta inflamatoria mediante la regulación de la expresión de las moléculas de adhesión (ICAM-1, ICAM-2, ELAM-1) que se unen a las integrinas de los neutrófilos (CD11/CD18) y median la infiltración de los neutrófilos. El endotelio también tiene un significativo papel en la reactividad inmunológica, en el transporte de los lípidos y en la regulación de la coagulación induciendo un estado procoagulante (Figura 1.1).

La lesión sinusoidal ha sido documentada por medio de estudios ultraestructurales, por la determinación de niveles de creatinquinasa-BB así como por la presencia de ácido hialurónico circulante (marcador de lesión endotelial). La lesión de las células del endotelio sinusoidal induce alteraciones en la microcirculación, bien caracterizadas por medio de técnicas de microfluorografía in vivo, los cuales determinan una alteración en la resistencia al flujo sanguíneo, predominantemente a nivel arterial y que se traducen por un menor aporte de sangre. Son clásicos los fenómenos de no revascularización (non reflow) así como de fracaso de revascularización postisquémico secundario (reflow paradox).

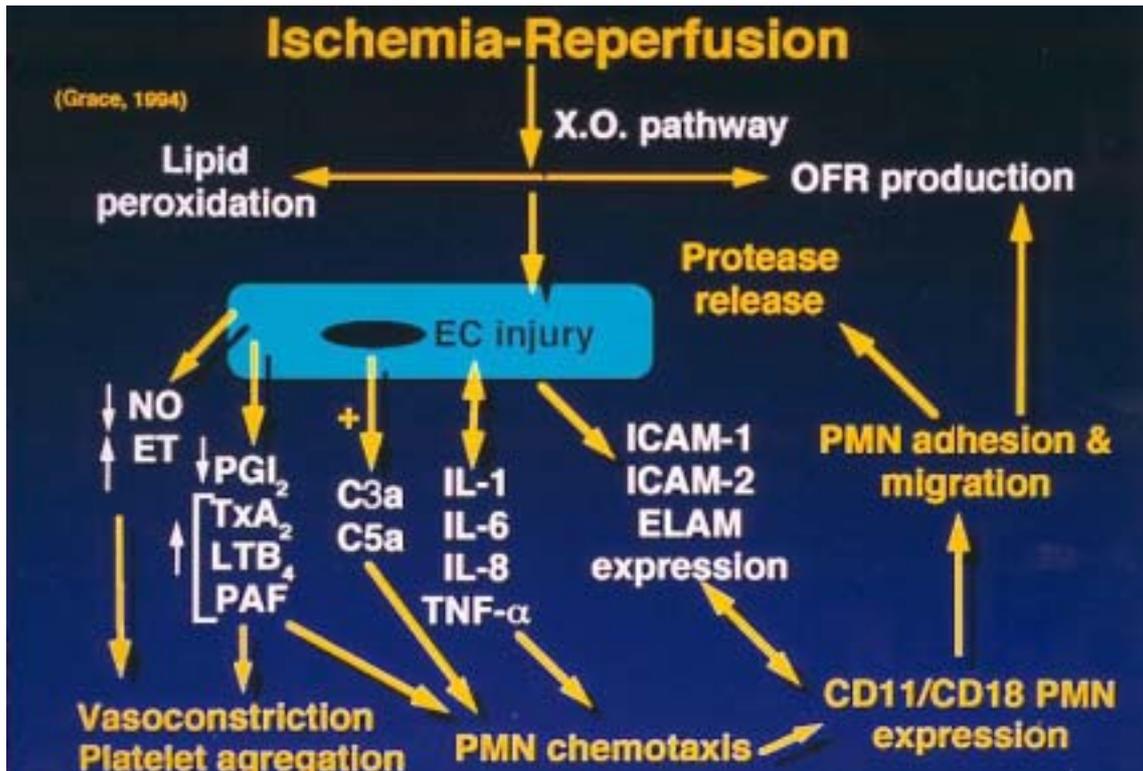
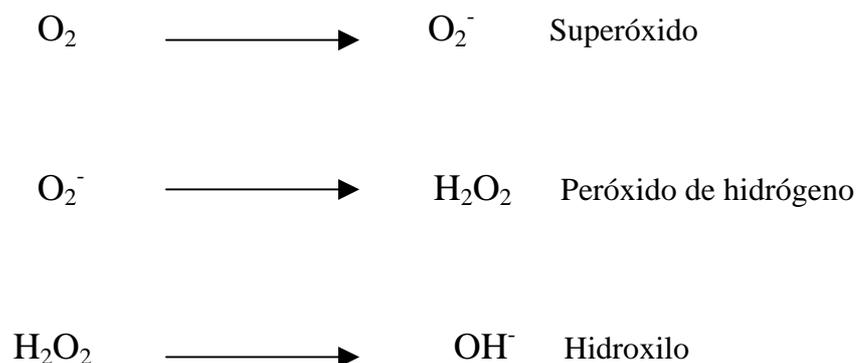


Figura 1.1 - Efecto del endotelio en la lesión producida por la isquemia-reperfusión.

B) Producción de Radicales Libres de Oxígeno (RLO):

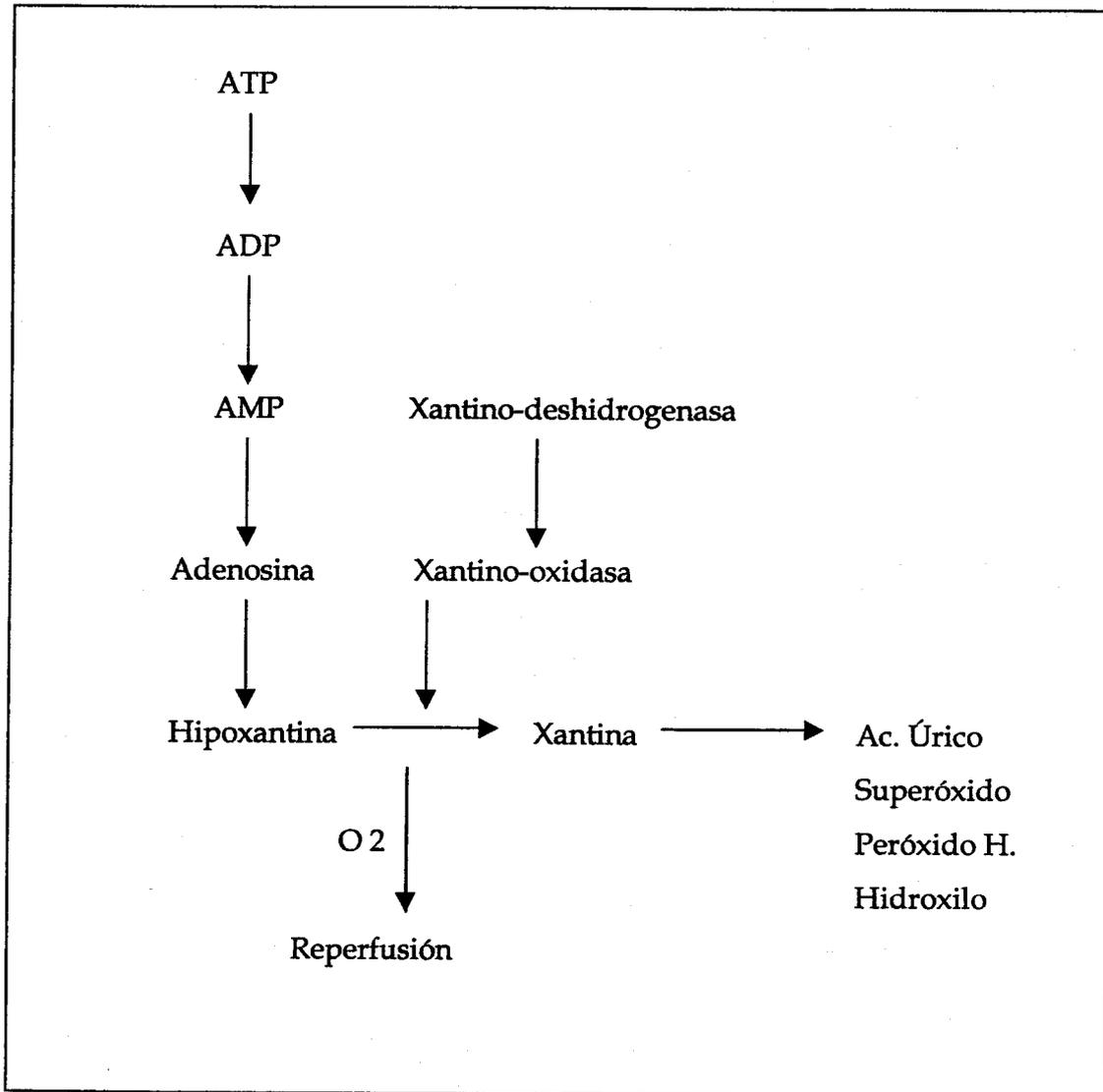
Se definen como cualquier átomo o molécula con un número impar de electrones en su órbita, que le confieren una marcada reactividad por su inestabilidad. Actualmente se prefiere el término de Especies Reactivas de Oxígeno, pues no todos estos compuestos interaccionan con el medio por reacciones radicalarias. Destacan el radical superóxido ( $O_2^-$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el hidroxilo ( $OH^\cdot$ ).



Durante el periodo de isquemia, a nivel intracelular se acumula hipoxantina, derivada del metabolismo de APT, necesario para mantener los niveles energéticos celulares. Paralelamente, en condiciones de anaerobiosis, ocurre la conversión de la xantina deshidrogenasa tipo D, a xantina oxidasa O (XO), por acción de una proteasa dependiente de  $Ca^{++}$ . Durante la reperfusión en presencia del Oxígeno la XO transforma la hipoxantina en xantina generándose de esta manera peróxido de hidrógeno, anión hidroxilo y ácido úrico (14, 83, 86, 87, 15).

Los RLO se originan a nivel de las células endoteliales así como de las células de Kupffer, PMN y se cree que tiene una actividad eminentemente local dada su gran inestabilidad. La acción lesiva de los RLO se debe a su capacidad para reaccionar con cualquier componente celular, destacando por su susceptibilidad las proteínas, los lípidos de membrana y los ácidos nucleicos (ADN). Cuando los RLO entran en contacto con las membranas de las células, determinan la lipoperoxidación de sus componentes lipídicos (ácidos grasos polinsaturados y fosfolípidos), ocasionando una importante desestructuración de la membrana que puede desembocar en la lisis celular. De modo parecido pueden modificar los canales iónicos de la membrana celular, oxidar el ADN y desnaturalizar moléculas proteicas por la escisión de diversos polipéptidos.

Las células en condiciones basales disponen de diversos mecanismos de defensa contra la acción lesiva de los RLO, se conocen con el término de *Scavengers*, (Superóxido Dismutasa, Catalasa, Peroxidasas, el propio sistema de oxidación mitocondrial,  $\alpha$ -tocoferol, ácido ascórbico, glutatión,  $\beta$ -carotenos, Ubiquinona).



**Figura 1.2** - Vía de degradación del ATP y formación de radicales libres a partir de la Xantino-oxidasa.

C) Adherencia de leucocitos: complejo leucocito-endotelio:

El fenómeno de adherencia leucocitaria al endotelio es exclusivo de la reperfusión. Algunos trabajos sugieren que la adhesión leucocitaria se correlaciona con los niveles GPT y tiempo de protrombina después del trasplante (Schwartz) (13). Existen suficientes evidencias de que los neutrófilos son los responsables tanto de la lesión local, como de la sistémica, produciendo el aumento de la permeabilidad y la

formación del edema. La adhesión leucocitaria parece estar relacionada con los cambios inducidos en la superficie del endotelio por la lesión de preservación. Cabe destacar el efecto nocivo ejercido por los propios RLO sobre las células endoteliales mediante la lipoperoxidación de sus membranas. Se ha propuesto que el superóxido producido a través de la vía de la xantinoxidasa tras la isquemia-reperfusión puede inducir la liberación de RLO que a su vez estimulan:

- a. La producción de mediadores por parte de las células endoteliales (leucotrieno B<sub>4</sub>, PAF, CD62) que activan y promueven la adherencia de los leucocitos al endotelio microvascular;
- b. Inducir la expresión y la activación de las glucoproteínas de adhesión endotelial-moléculas de adhesión intercelular (ICAM) tipos 1 y 2, la molécula de adhesión vascular de la célula tipo 1 (VCAM-1), la molécula de adhesión leucocito-endotelial tipo 1 (ELAM-1), y la L-Selectina;
- c. Inactivar al óxido nítrico derivado del endotelio, que es un factor antiadhesivo endógeno.

El lugar de unión de los leucocitos al endotelio se produce entre los receptores de superficie leucocitarios y los receptores del endotelio mediante las llamadas moléculas de adhesión, como son la L – Selectina (responsable del denominado *rolling* neutrofílico), la ELAM-1 (endothelial leukocyte adhesion molecule-1), la ICAM-1 (intracellular adhesion molecule-1), la VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1), con especial afinidad por linfocitos y monocitos o la familia de las Integrinas (CD11/CD18) (Figuras 1.3 y 1.4) .

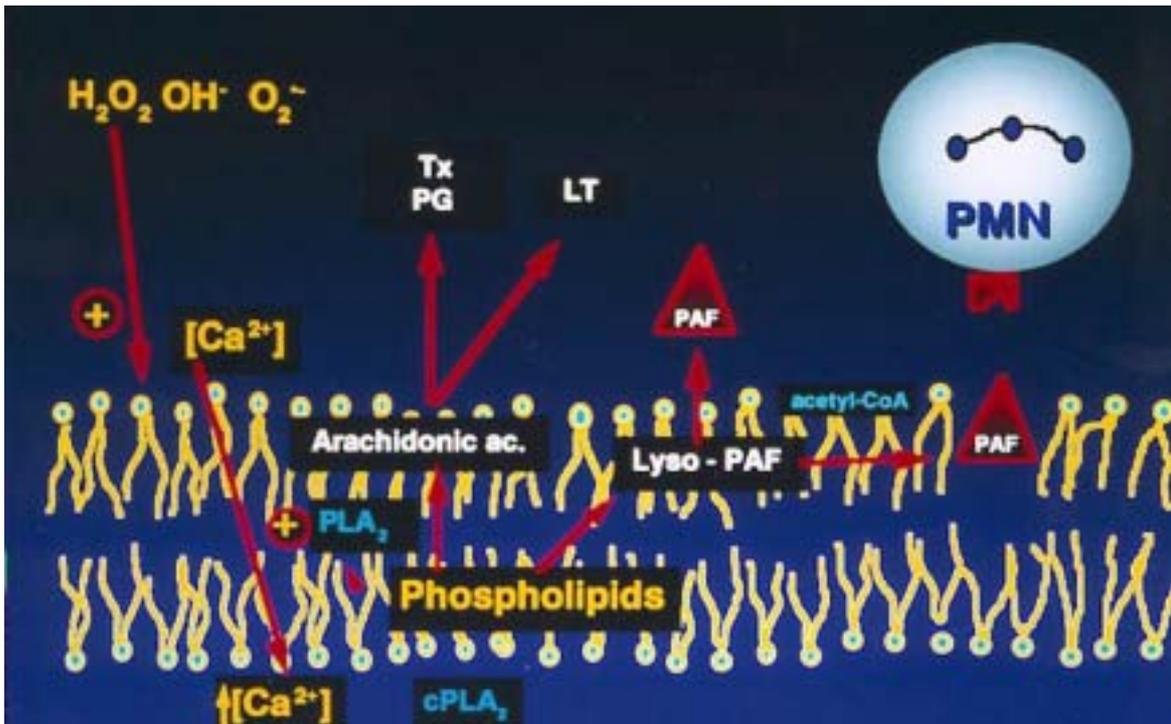


Figura 1.3 - Activación leucocitaria en la lesión endotelial.

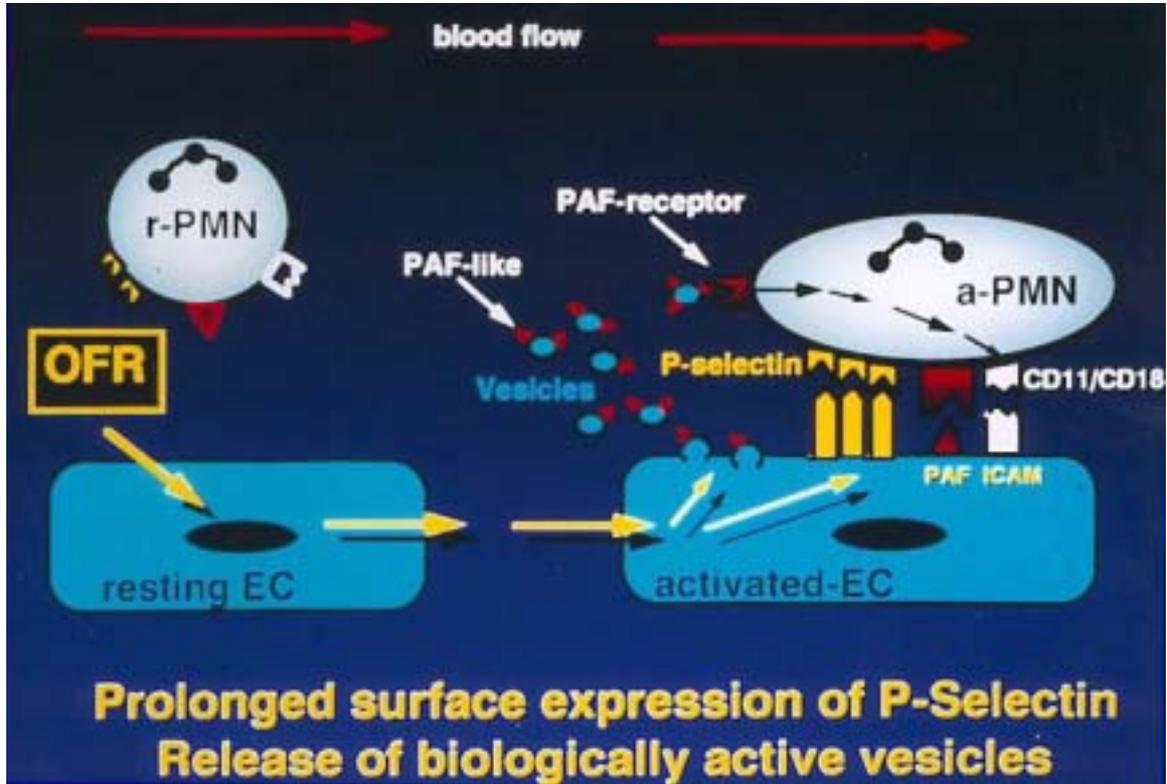


Figura 1.4 - Adherencia leucocitaria en el endotelio sinusoidal.

La reacción inflamatoria que se desencadena es enormemente extensa y compleja, pero en resumen, la activación leucocitaria (PMN en su mayor parte) conduce a la amplificación de la lesión basal, destacando la adhesión leucocitaria y la síntesis de metabolitos y sustancias tóxicas. Se desencadena una multitud de respuestas que producen vasoconstricción, agregación plaquetaria, quimiotaxis de los neutrófilos y su adhesión a las células endoteliales. Así, los neutrófilos activados, es decir, aquellos que expresan sus moléculas de adhesión (integrinas CD11/CD18), adhieren y migran a través del endotelio produciendo destrucción local mediante la liberación de radicales libres, enzimas proteolíticas (colagenasa, elastasa, catepsina G) y mieloperoxidasa, provocando una mayor lesión hística. El secuestro de los neutrófilos activados en los pulmones y en otros órganos es un paso importante en el desarrollo del fracaso orgánico multisistémico.

D) Adherencia plaquetar/ complejo plaqueta-endotelio:

Las plaquetas también se adhieren al endotelio inmediatamente después de la reperusión y el grado de adherencia se ha correlacionado con la intensidad de la lesión de preservación (14). La adhesión se produce aún en presencia de heparina. Parece además, que el grado de adhesión se relaciona con el estado energético del hígado, de forma que cuanto mayor la reserva de glicógeno, menor es la adhesión plaquetar, al menos en estudios experimentales. De igual forma que con la adhesión leucocitaria, la adhesión plaquetar produce un daño en la superficie del endotelio.

E) Mediadores de la respuesta inflamatoria asociada a la lesión de isquemia-reperfusión:

La lesión de reperfusión se debe a los cambios estructurales en la superficie del endotelio originados por la preservación, que inducen posteriormente a la adhesividad de leucocitos y plaquetas del receptor, y que magnificarán la respuesta inflamatoria a través de diversos mediadores, así como a un desequilibrio entre anticoagulación - coagulación. Los más relevantes son:

- **Citoquinas:** tal y como se ha descrito anteriormente la lesión de reperfusión es un mecanismo eminentemente inflamatorio, esto es, una secuencia amplificada de reacciones mediadas por diversas moléculas polipeptídicas (Citoquinas) que conducen a la lesión celular. Las citoquinas son liberadas por las células de Kupffer, células sinusoidales y leucocitos circulantes, especialmente por PMN. Destacan FNT o Factor de Necrosis Tumoral, IL-1,  $\gamma$  IFN o  $\gamma$ -interferón, IL-8.

El FNT- $\alpha$  ha sido implicado tanto en la lesión hepática como pulmonar tras el trasplante hepático. Tiene su origen en diferentes células, entre ellas, las células de Kupffer, células intestinales, células del epitelio biliar, y células endoteliales (88). Esta citoquina propaga la respuesta inflamatoria por el hígado y órganos vecinos por medio de la inducción de moléculas de adhesión I. También provoca la activación de sustancias procoagulantes y depósitos de fibrina, incremento de la IL 1 y del factor activador de plaquetas. Así mismo, ha sido demostrado que aumenta la adhesión de leucocitos tanto en el hígado como en el pulmón (90,84,89,91).

Otras citoquinas que son liberadas durante la reperfusión son: IL1, IL6, IL8, IL10 e IL 12. Camargo y colaboradores han demostrado en un modelo experimental en ratas, que minutos después de la reperfusión se produce un aumento de IL6, que tiene

un efecto protector contra la isquemia caliente por medio de sus propiedades antiinflamatorias y también por disminuir la producción de FNT- $\alpha$  (65). En contraste, la IL1, IL10, IL12 aumentan también tras la reperfusión. Estas interleuquinas tienen efectos perjudiciales a través de la producción de radicales libres y también por incrementar la producción de FNT- $\alpha$  (84, 66).

- **Proteasas:** procedentes de las células de Kupffer y leucocitos, juegan un papel relevante en la producción de RLO. En este aspecto, se destacan por facilitar la conversión de XD en XO, concretamente la subforma irreversible. Son también trascendentales en la patogenia del mecanismo lesional de las células del endotelio.

- **Calcio:** la inversión de las concentraciones intracelular/extracelular de calcio, genera un importante disturbio en la homeostasis celular por el flujo masivo de calcio al interior de la célula secundario a la desestructuración de la membrana, así como a la inhibición de la bomba  $\text{Ca}^+\text{ATPasa}$  y lesión de los canales de calcio. Este hecho se puede validar con la demostración del efecto citoprotector en modelos de isquemia-reperfusión mediante el uso de bloqueadores de los canales de calcio (16, 19). Los principales efectos relacionados con el aumento de calcio intracelular serían:

- La activación de fosfolipasa  $A_{1,2}$  y C y de la ciclo-oxigenasa;
- La potenciación de la conversión de XD en XO por estimulación de proteasas y la inestabilización de los lisosomas;
- La desestructuración de la membrana plaquetar.

- **Óxido Nítricos o Factor relajante derivado del endotelio:** liberado de forma primordial por las Células Endoteliales Sinusoidales (CES), activa la adenilato ciclasa y

por consiguiente incrementa los niveles de cGMP, ocasionando una marcada relajación del músculo liso e inhibición de la agregación plaquetar. Conceptualmente ejerce un efecto protector sobre el endotelio, pues preserva su perfusión y actuaría de forma antiinflamatoria. Por otro lado, se ha visto implicado en diversas acciones paradójicas pues podría combinarse con iones superóxido dando lugar al peroxidonitrito, con actividad citotóxica muy potente con afinidad a las proteínas de membrana celular.

- **Fosfolipasa A<sub>2</sub>**: la fosfolipasa (FL) está constituida por un conjunto de enzimas que tiene como principal sustrato de actuación los glicerofosfolípidos, los cuales son degradados por hidrólisis obteniendo ácidos grasos libres, destacando el ácido araquidónico (AA) como primer metabolito obtenido y otros eicosanoides derivados. La Fosfolipasa A<sub>2</sub> para activarse precisa de elevados niveles de Ca<sup>2+</sup> intracelular.

- **Eicosanoides**: derivados del catabolismo de la FLA<sub>2</sub> sobre los glicerofosfolípidos se obtienen un conjunto de moléculas con actividad pro/antiinflamatorias, de acción local, conocidas genéricamente con el nombre de autacoides. Se originan en las células de Kupffer y PMN predominantemente, así como en las c. sinusoidales y se cree que el principal estímulo para su producción serían los RLO. Del conjunto de los autacoides destacan los eicosanoides, que son los derivados del AA y se sintetizan por acción de la ciclo-oxigenasa. Son de especial relevancia las Prostaglandinas, Prostaciclina (PC), el PAF o Factor Activador Plaquetar y el Tromboxano A<sub>2</sub>. Todos ellos son mediadores de la inflamación que se liberan en grandes cantidades después de la reperfusión y modulan la amplificación de las lesiones

en esta fase. Merecen especial atención las prostaglandinas por su potencial terapéutico en el trasplante.

- **Endotelinas (ET):** es una familia de polipéptidos de 21 aminoácidos procedente de las c. endoteliales (ET-1, ET-2...) con efecto vasoconstrictor e inhibidor de la ATPasa Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>.

F) Actividad procoagulante:

La hipoxia tisular parece promover la síntesis del Factor X asociado a membrana que activa la coagulación, la cual se potencia en condiciones de acidosis. Otros factores implicados en la situación procoagulante son la supresión de la síntesis de trombomodulina, así como la desaparición del heparansulfato proteoglicano de la superficie del endotelio, que tienen efectos anticoagulantes. De la misma forma, se ha sugerido que la secreción de heparanasa por parte de los leucocitos y la liberación de proteasas (catepsina B, elastasa), que vertidas en la circulación, causan consumo de factores de coagulación, observación sobre la que se fundamenta el uso de aprotinina (14). Finalmente, la actividad procoagulante se ha relacionado con la producción de citoquinas (especialmente IL-1, TNF), que a su vez induce cambios en la superficie del endotelio y favorece la producción de fibrinógeno. La activación de las células de Küpffer, leucocitos y plaquetas estimula la liberación de PAF, que a su vez incrementa la adhesión plaquetar.

G) Mecanismos de defensa:

Se sabe que diversos mecanismos endógenos pueden inhibir la lesión por isquemia-reperfusión. Asimismo, numerosos compuestos exógenos pueden actuar como fármacos protectores. Estos agentes actúan de formas diversas incluyendo el efecto antioxidante, el barrido o la inhibición de la producción de los RLO y la inhibición de los neutrófilos.

Los barrenderos o *scavengers* de los RLO son agentes que interactúan con estos radicales transformándolos en menos dañinos. Entre ellos podemos nombrar la superóxido dismutasa, la catalasa y la glutatión reductasa. La superóxido dismutasa es una enzima endógena que protege los tejidos contra el radical superóxido, gracias a su conversión a peróxido de hidrógeno. En combinación con la superóxido dismutasa actúa la catalasa, que es una metaloproteína que existe de forma natural y que descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno (85, 67).

El manitol, aparte de su potente acción diurética, ha sido empleado clínicamente durante muchos años debido a su efecto *scavenger* del radical hidroxilo. La histidina, un *scavenger* del oxígeno inglete, se ha mostrado protector de la lesión por isquemia-reperfusión. Finalmente, compuestos que contienen tiol, tales como la N-acetilcisteína, la mercaptopropionil glicina y el captopril, pueden actuar como *scavengers* de RLO, ahorrando óxido nítrico.

El alopurinol inhibe de forma competitiva a la xantina oxidasa, reduciendo de esta forma la producción del anión superóxido. La potente acción de quelante del hierro de la desferrioxamina interrumpe la producción de radicales hidroxilo. El empleo de ambos fármacos ha mostrado efectos beneficiosos en la lesión por isquemia-reperfusión.

*In vivo*, la depleción de leucocitos ha ofrecido protección contra la isquemia-reperfusión. Los antagonistas específicos del PAF y los inhibidores de la 5-lipoxigenasa inhiben la quimioatracción de los neutrófilos. Los anticuerpos monoclonales desarrollados contra el complejo CD11-CD18 y el TGF- $\beta$  inhiben la adherencia de estas células al endotelio. La adenosina, a través de un receptor específico, inhibe la producción de anión superóxido por parte de los neutrófilos activados.

Numerosos investigadores han demostrado que una serie de episodios de isquemia breves, seguidos de perfusión, provocan que el corazón u otros órganos se hagan resistentes a un posterior periodo prolongado de isquemia. Este fenómeno se denomina preconditionamiento isquémico. El preconditionamiento isquémico parece ser un fenómeno bifásico, con una fase temprana de protección, que comprende alrededor de 2 horas, tras el estímulo preconditionante, y una segunda ventana de protección que se produce 24 horas más tarde. Los mecanismos que rigen ambas ventanas son diferentes y se encuentran implicados en ellos el óxido nítrico, la endotelina y las proteínas calientes de *shock* (heat *shock* proteins). La adenosina, un producto omnipresente en la isquemia, a través de su receptor A<sub>1</sub>, y la proteincinasa C se han implicado recientemente en el preconditionamiento isquémico.

Actualmente no existe un consenso sobre cuál de estos agentes proporciona beneficios evidentes desde el punto de vista clínico. Aunque se ha sugerido que será preciso una combinación de fármacos. Es probable que las estrategias terapéuticas requieran de acciones específicas durante los diferentes periodos del trasplante: en la fase de pre-extracción (el cuidado del donante), en el periodo de mantenimiento del órgano (preservación en frío) y tras el recalentamiento del órgano (reperfusión).

### **1.3- Diagnóstico y evaluación clínica de la LIR**

Clásicamente, la lesión de preservación-reperusión se ha cuantificado mediante la función clínica posterior a la revascularización del órgano, siendo su máxima expresión el fracaso del injerto (Fallo Primario del Injerto).

Actualmente, se determina el grado de LIR y el funcionalismo del órgano trasplantado mediante valoración clínica, estudio hemodinámico regional y sistémico, determinación bioquímica de marcadores de lesión hepática y por la monitorización directa de la producción de bilis.

#### 1.3.1- VALORACIÓN CLÍNICA

Existen muchos aspectos clínicos que ayudan a graduar la lesión de isquemia reperusión, prediciendo la evolución que tendrá el órgano implantado. En muchas circunstancias se puede indicar el re-trasplante del hígado sólo con la valoración clínica.

En el momento del desclampaje vascular (revascularización hepática), ocurre el síndrome de reperusión, que puede desarrollar desde una leve alteración de la presión arterial hasta una hipotensión severa con parada del latido cardiaco. La producción de radicales libres y mediadores inflamatorios (citoquinas) en el momento de la revascularización del injerto es el gran responsable por este síndrome. Seguramente cuanto mayor es la lesión de isquemia-reperusión mayor será el síndrome reperfusional, que se acompaña posteriormente por acidosis metabólica y disturbios electrolíticos, siendo la hipercalemia la principal alteración electrolítica.

En las fases subsecuentes a la reperusión del injerto, se puede valorar clínicamente la función de síntesis hepática mediante control ácido-básico, glucemia

capilar, producción de bilis, persistencia de la hipotensión o necesidad de uso de drogas vaso-activas. En casos de LIR severa, produciendo la disfunción primaria del injerto, hemodinámicamente se observa el desarrollo de hipotensión mantenida con la necesidad de uso de drogas vaso-activas, pérdida de líquido al tercer espacio, persistencia de acidosis metabólica, alteraciones electrolíticas ( $\uparrow K^+$ ), hipoglucemia y más tardíamente el desarrollo de disturbios de coagulación y el síndrome inflamatorio pulmonar. La severa lesión endotelial con posterior activación leucocitaria y plaquetaria conlleva a una persistente producción de citoquinas por el injerto implantado, llevando a una actividad procoagulante en los sinusoides, culminando con trombosis de la microcirculación hepática y disfunción del hígado (Tabla 1.2).

### **SINTOMAS Y SIGNOS CLÍNICOS DE DISFUNCIÓN DEL INJERTO**

<b>SÍNDROME DE REPERFUSIÓN SEVERA</b>
<b>PÉRDIDA DE LÍQUIDO AL TERCER ESPACIO</b>
<b>HIPOTENSIÓN Y NECESIDAD DE DROGAS VASOACTIVAS</b>
<b>HIPOGLUCEMIA</b>
<b>ACIDOSIS METABÓLICA MANTENIDA</b>
<b>DISTURBIOS ELECTROLÍTICOS, (K<sup>+</sup>) PRINCIPALMENTE</b>
<b>NO PRODUCCIÓN DE BILIS POR EL INJERTO IMPLANTADO</b>
<b>ALTERACIÓN LA DE COAGULACIÓN</b>
<b>SÍNDROME INFLAMATORIO PULMONAR</b>
<b>FALLO MULTIORGÁNICO</b>

Tabla 1.2 – Síntomas y signos clínicos de la disfunción del injerto.

#### 1.3.2- ESTUDIO HEMODINÁMICO REGIONAL Y SISTÉMICO

Para analizar la hemodinámica regional (flujos arterial y portal), inicialmente debe tenerse en cuenta el gasto cardíaco (Hemodinámica sistémica) del enfermo y si éste presenta alguna patología portal como shunt o trombosis en el momento del trasplante.

En el momento del desclampaje vascular, la rapidez de la reperfusión completa del hígado, la coloración del hígado tras la reperfusión y los flujos hepáticos arterial y portal (Hemodinámica Regional) ayudan a valorar la LIR y pronosticar la evolución del órgano implantado.

Los órganos que presentan largo tiempo de isquemia fría, esteatosis hepática, fibrosis por actividad viral o alcohol, hígados previamente lesionados por parada cardíaca o uso de drogas vaso-activas en el donante, favorecen una disminución de los flujos hepático portal y arterial en los primeros momentos de la reperfusión. En las fases subsiguientes, cuanto mayor es la LIR más intensa será la resistencia sanguínea, reduciéndose principalmente el flujo de la arteria hepática. El aumento de la resistencia vascular en el hígado se debe a la agregación plaquetaria y leucocitaria que liberan citoquinas, produciendo vasoconstricción y formación de microtrombosis sinusoidal.

### 1.3.3- ANÁLISIS LABORATORIAL (ENZIMAS HEPÁTICAS)

El funcionalismo del órgano trasplantado y la valoración de la LIR inicial, se determinan actualmente mediante enzimas que expresan citolisis (**AST/ALT**) y la función de síntesis representada por el tiempo de protrombina (**TP**) y **factor V**. Los niveles de bilirrubina (**Bilirrubina indirecta y directa**) están relacionados tanto con la función hepática (predominio de bilirrubina indirecta), como también con la lesión canalicular intrahepática generada por la LIR (predominio de bilirrubina directa). Mediante estos parámetros se han realizado diversas clasificaciones, destacando la de Greig (1989). Esta clasificación tiene un importante valor a nivel clínico, pero no permite discriminar correctamente la gran cantidad de eslabones y procesos implicados en la lesión de isquemia-reperfusión (el grado de lesión endotelial, el grado activación

neutrófila, la acción lesiva de los RLO, el consumo celular de ATP o la liberación de mediadores inflamatorios). Por todo ello, y debido al mejor conocimiento de las bases fisiopatológicas de la preservación de órganos, es necesario definir nuevos parámetros para evaluar la lesión de isquemia-reperfusión e incluso establecer un carácter pronóstico que podría orientar sobre la evolución del injerto y determinar la necesidad de terapéutica específica.

Para la realización de nuestro estudio y con el objetivo de poder analizar la lesión de isquemia-reperfusión, hemos seleccionado una serie de parámetros, ya contrastados ampliamente en la literatura, que expresan los diversos eslabones implicados en la fisiopatología de la lesión de preservación. Como la  $\beta$ -galactosidasa implicada en la activación de las células de Kupffer y el ácido hialurónico siendo un marcador de lesión endotelial sinusoidal. Por otro lado, en la selección de dichas determinaciones se ha tenido en cuenta la experiencia de nuestro grupo de trabajo. Así pues, se estudiará la lesión de preservación a través de: parámetros bioquímicos de lesión endotelial y hepatocelular, cuantificación de mediadores inflamatorios, valoración histopatológica, parámetros de síntesis hepática y determinación hemodinámica sistémica y regional hepática.

#### 1.3.4- DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN BILIS EN LA LIR

Actualmente, la cuantificación de la producción de bilis tras la reperfusión hepática es el marcador más fiable de síntesis hepática. Está claro que órganos con severa lesión de isquemia-reperfusión presentarán baja producción de bilis, debido al mal funcionamiento del injerto. La ausencia de producción de bilis es un signo de disfunción primaria del injerto.

## 1.4- Método actual de preservación del hígado

### 1.4.1- ALMACENAMIENTO HIPOTÉRMICO

El método de preservación del hígado utilizado por los grupos de trasplante es el almacenamiento hipotérmico perfundido por una solución de preservación, siendo la solución de Wisconsin la más empleada, debido a su mayor efectividad en la preservación del hígado en isquemia fría. Tanto por su temperatura (normalmente 4°C), como por sus componentes, permite el enfriamiento in situ del órgano en el donante, así como la conservación en frío del órgano una vez extraído. Así pues, se intenta integrar los principios básicos de la isquemia hipotérmica anaeróbica con los principios del metabolismo órgano-específico.

El lavado intravascular del órgano se consigue mediante la perfusión del líquido a una presión hidrostática baja que arrastre elementos formes, isoaglutininas y factores de la coagulación del árbol vascular. Un lavado inadecuado favorecería la presencia de microagregados de hematíes en la microcirculación que dificultaría la reperfusión sanguínea y la función posterior del órgano.

Los fundamentos para la preservación del órgano se basan en dos pilares: la ***hipotermia*** y los ***efectos de protección tisular de las soluciones de preservación***.

#### A) HIPOTERMIA

El principal fundamento de la preservación es la hipotermia, la cual disminuye el metabolismo celular, reduciendo la velocidad de degradación enzimática intracelular de los componentes esenciales necesarios para la viabilidad del órgano. Con esta finalidad, se exanguina el órgano y la sangre se reemplaza por una solución de preservación a baja

temperatura. La composición de esta solución es un factor clave para optimizar la tolerancia del órgano a la hipotermia.

La hipotermia no detiene el metabolismo, sino que lo ralentiza y retrasa la muerte celular. La mayoría de las enzimas de los animales normotérmicos presentan una reducción de su actividad de 1.5 a 2 veces por cada 10 ° C de reducción de la temperatura. Así, algunas vías enzimáticas ralentizan entre 12 y 13 veces cuando la temperatura desciende de 37 ° C a 0 ° C.

El hígado puede tolerar una isquemia caliente entre 30 y 60 minutos sin que se produzca una pérdida completa de su función. Así, el enfriamiento de 37 ° C hasta 0 ° C se puede alargar el tiempo de preservación por un factor de 12-13 horas.

## B) EFECTOS PROTECTORES DE LAS SOLUCIONES DE PRESERVACIÓN

Fueron muchas las soluciones utilizadas en el mundo de los trasplantes, sin embargo a medida que el programa de trasplante hepático fue progresando, surgió la necesidad de soluciones de preservación que permitiesen prolongar la hipotermia simple de estos órganos. A principios de los años ochenta, Belzer, en Wisconsin (USA) diseñó la solución de la Universidad de Wisconsin (UW) o solución de Belzer. Esta solución tiene una composición electrolítica de tipo intracelular, omite la glucosa, y además contiene nuevos impermeantes no metabolizables, tales como el lactobionato y la rafinosa. La solución también contiene fosfato y sulfato como tampones, adenosina como precursor para la resíntesis de ATP y un coloide estable y efectivo para aportar presión coloidosmótica, el almidón hidroxietilo (hydroxyethyl starch). Finalmente se añaden otras sustancias como el glutatión, alopurinol y magnesio por razones teóricas.

(mmol/l)	(C) Celsior	EC	UW	
Sodio	100	10	30	Elect.
Potasio	15	115	120	Elect.
Magnesio	13	---	5	Elect.
Cloro	50	15	---	Elect.
Bicarbonato	---	10	---	Bufer
Fosfato	---	50	25	Bufer
Sulfato	---	---	5	Bufer
Histidina	30	---	---	Bufer, Imperm.
Glucosa	---	195	---	Imperm.
Manitol	60	---	---	Imperm.
Rafinosa	---	---	30	Imperm.
Lactobionato	80	---	100	Imperm.
Adenosina	---	---	5	Energ.
Calcio	0,25	---	---	Energ.
Glutation	3	---	3	Scav.
Alopurinol	---	---	1	Inh., Scav.
HES	---	---	50 g/L	Coloide
Glutamato	20	---	---	Fármaco
Dexametasona	---	---	8	Fármaco
Insulina	---	---	100 U/L	Fármaco
Osmolalidad				
(mOsm/l)	320	355	320	

**C:** solución de Celsior; **EC:** EuroCollins; **UW:** solución de Belzer o de la Universidad de Wisconsin. **Elect.:** electrolito; **Bufer:** sustancia tampón; **Imperm.:** sustancia impermeante; **Energ.:** precursor energético; **Scav.:** scavenger de radicales libres de oxígeno; **Inh.:** inhibidor enzimático; **Coloide:** sustancia coloidal; **Fármaco:** fármacos con otros mecanismos de acción.

**Tabla 1.3** - Composición electrolítica de las soluciones de preservación multiorgánicas.

En preservación hepática, esta solución (Wisconsin) ha permitido una gran mejora de los resultados del trasplante, y ampliar a 18 - 24 horas la isquemia fría. No se sabe cuáles son los componentes imprescindibles en la solución y si todos ellos son necesarios. Diversos estudios sugieren que el lactobionato sea un componente clave que tiene diversos efectos beneficiosos: es un buen impermeante y un potente quelante del calcio y del hierro (Tabla 1.3).

La solución de Celsior, inicialmente desarrollada para la preservación cardíaca, comienza a ser utilizada en trasplante hepático. Es una solución extracelular con baja concentración de potasio. Un estudio multicéntrico realizado por Dr. Cavallari y colaboradores, comparando las soluciones de Wisconsin y Celsior en trasplante hepático, demostró que la solución de Celsior presenta similar eficacia en la preservación del hígado (79).

### **Efectos de protección tisular de las soluciones de preservación:**

#### **1- Minimizar el edema celular inducido por la hipotermia**

La situación de isquemia hipotérmica suprime la actividad de la bomba de Na-K-ATPasa y reduce el potencial de membrana celular. Consecuentemente el cloro y el sodio entran en la célula a través de un gradiente de densidad y la célula se hincha debido al cúmulo de agua.

En la composición de la mayoría de líquidos de preservación la composición electrolítica es clave. Generalmente ésta se asemeja al líquido del compartimiento intracelular con una baja concentración de sodio y elevada concentración de potasio evitando así que el sodio difunda pasivamente al interior de la célula. La tendencia al edema debe ser contrarrestada con la adición de sustancias impermeables para la célula

(impermeantes). Así un componente clave de una solución de preservación es una concentración adecuada de un impermeante efectivo. Los impermeantes más habituales son azúcares simples, como la glucosa (PM 180), la sucrosa (PM 342) y el manitol (182). También se utilizan el lactobionato (PM 358) y un trisacárido, la rafinosa (PM 594).

**- Disminuir la acidosis intracelular**

La isquemia, incluso en frío, estimula la glicolisis y la glicogenolisis incrementándose la producción de ácido láctico y la concentración de iones hidrógeno. Por tanto las soluciones de preservación deben incorporar sustancias tampón para mantener el PH lo más fisiológico posible. Los tampones más utilizados son el bicarbonato, el citrato, el fosfato, el lactobionato y la histidina.

**- Prevenir la expansión del espacio intersticial durante la reperfusión**

Para prevenir la expansión del espacio intersticial durante el almacenamiento del hígado, la solución de Belzer presenta almidón hidroxietilo, una sustancia de alto peso molecular que produce un efecto coloidosmótico capaz de evitar o disminuir la difusión de líquido hacia el intersticio, evitando así, la expansión o edema intersticial, que puede colapsar la red capilar.

**- Disminuir el daño inducido por radicales libres del oxígeno**

Durante la isquemia fría y la reperfusión existe una producción masiva de radicales libres del oxígeno. La adición de sustancias scavenger exógenas potencialmente frenaría el daño por los RLO. Los scavengers más utilizados son el glutatión y el manitol.

**- Proveer de precursores para regenerar los compuestos fosforados de alta energía**

Durante la isquemia fría hay una rápida pérdida de ATP y de otros compuestos fosforados de alta energía. La reperfusión del órgano necesita de una reactivación rápida de la bomba de Na-K-ATPasa así como de otras vías metabólicas que requieren ATP. Los precursores de ATP que más se utilizan son la inosina y la adenosina.

## **1.5- Prostaglandina tipo E1 (PGE1)**

Las prostaglandinas forman parte de los llamados autacoides u hormonas locales, porque se sintetizan y liberan localmente, actúan a corta distancia, tienen una vida media muy corta, no se almacenan, siempre se sintetizan de “novo”, y al pasar por el hígado, pulmón o riñón, son degradadas rápidamente.

Las prostaglandinas son derivados de ácidos grasos esenciales de 20 carbonos que contienen 3, 4 o 5 uniones dobles en la cadena lateral, esto designa el número de la serie (1, 2 o 3 por ejemplo). De acuerdo a la cantidad de dobles ligaduras se originan las prostaglandinas de las diferentes series: Las prostaglandinas de la serie 1 o PGE1 derivan del ácido 8,1,14 eicosatrienoico (ácido bishomo-gamma-linoleico), tienen tres uniones dobles. El 80-90% de las prostaglandinas al pasar por la circulación pulmonar se metabolizan rápidamente, por medio de omega-hidroxiación, es decir la inserción de un OH en la terminal omega de la molécula. Luego sufren beta-oxidación de la cadena carboxílica. Se generan metabolitos tetranor y dinor, inactivos. La deshidrogenación en C15 ocurre por la enzima prostaglandin-15-deshidrogenasa, que es muy activa en el riñón, pulmón y útero. La 15-deshidrogenación de las prostaglandinas es el mecanismo fisiológico más rápido e importante en la inactivación de las prostaglandinas.

Las prostaglandinas de la serie E han demostrado tener experimentalmente efectos de tipo inmunológico, citoprotector y hemodinámico.

### 1.5.1- EFECTO CITOPROTECTOR

Clásicamente se ha atribuido la capacidad estabilizadora de membranas mediante un aumento del AMP cíclico intracelular y regulando el flujo de calcio hacia

el interior de la célula, mecanismos ambos que inhiben la activación de proteasas (30, 31, 32). Además parecen ejercer una inhibición directa de la producción de RLO.

Por otra parte, la PGE1 induce la producción de IL-6. Esta interleuquina, estimula la producción de proteínas de fase aguda por el hígado, y se ha sugerido que estas proteínas ayudan a restablecer el equilibrio homeostático del tejido hepático, siendo, por lo tanto, un otro mecanismo de citoprotección (129).

### 1.5.2- EFECTO ANTI-INFLAMATORIO

Ejerce un efecto bloqueante de ciertos mediadores inflamatorios como TNF y IL-2. Otros efectos atribuidos a la acción de PGE1 son una inhibición de la agregación plaquetar y leucocitaria, a través de un incremento en el contenido de AMPc plaquetar con estabilización de las membranas. El AMPc bloquea los dos mecanismos de activación plaquetaria, inhibiendo la movilización de calcio, que es el mediador de la degranulación, tanto para el TXA2 como para el PAF. Este efecto, sumado a una acción vasodilatadora, dificultaría la formación de microtrombos. Al mismo tiempo, a través de su efecto antiagregante leucocitario, impediría la adhesión leucocitaria al endotelio sinusoidal, con la consiguiente disminución de la activación inflamatoria, tal y como parecen demostrar los trabajos de Henley (33). Posteriormente, se han atribuido efectos inmunomoduladores a la administración de PGE1 a través de una inhibición de la liberación de IL-2, con mejoría de la función hepática en casos de cross-match positivo y reducción de la incidencia de episodios de rechazo agudo (34).

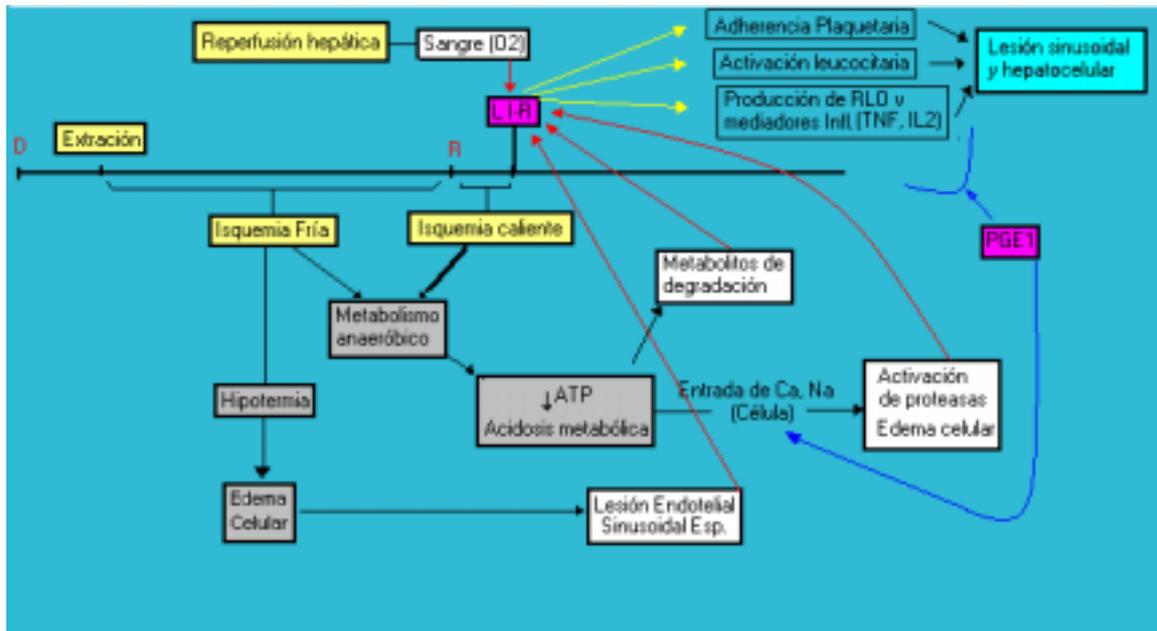
### 1.5.3- EFECTO VASODILATADOR

Debido a los efectos vasodilatadores de la Prostaglandina E1, muchas son sus aplicaciones. Actualmente, está siendo utilizada para tratar la disfunción eréctil, la hipertensión pulmonar, en cirugías cardíacas y a nivel experimental en las hepatectomías con clampaje vascular total y en el tratamiento de la LIR. La vasodilatación es promovida por activación de la adenilciclase, que al unirse al receptor IP, aumenta la concentración de AMPc en el músculo liso vascular, causando la vasodilatación.

La administración de PGE1 por vía portal genera un claro efecto de relajación del músculo liso a nivel portal y de las comunicaciones arterioportales, llevando a un incremento tanto del flujo portal como arterial (1) (Kawachi).

En 1989, Greig y cols. (10) demostraron que la administración de Prostaglandina E1 (PGE1) en pacientes con disfunción primaria del injerto mejoró tanto la supervivencia de los pacientes como de los injertos, aunque se trataba de un estudio no aleatorio y comparado con un grupo histórico. El trabajo de Henley y cols. (1995) (33) demostró, en un estudio controlado, que la administración de PGE1 por vía sistémica disminuyó la necesidad de técnicas de depuración renal en el postoperatorio, menor incidencia de reintubación y reintervenciones, con disminución de la estancia en UCI y de hospitalización, así como menor gasto de hemoderivados.

La PGE1 posee efectos teóricamente beneficiosos, y si se administra directamente al injerto implantado (hígado), se podrá infundir de inmediato a la reperusión hepática en dosis plenas, momento en el cual se genera la LIR.



**Figura 1.5** - Acción de la PGE1 en la fisiopatología de la lesión de isquemia-reperfusión.

#### 1.5.4- ADMINISTRACIÓN DE PROSTAGLANDINA POR VÍA SISTÉMICA

Los efectos colaterales causados por la administración sistémica de PGE1 son dolor, enrojecimiento cutáneo, sudoración y también síntomas gastrointestinales. Generalmente son transitorios y pueden ser mitigados disminuyendo la dosis o prolongando el tiempo de la infusión. Sin embargo, el principal inconveniente cuando se realiza la infusión de PGE1 por vía sistémica (venosa o arterial) es su efecto vasodilatador a nivel periférico, que impide su administración precoz en las fases intraoperatoria y postoperatoria inmediata, debido a la delicada situación hemodinámica de los pacientes trasplantados. Además, el efecto local de la medicación en el hígado es muy pequeño, pues la rápida metabolización a nivel pulmonar, hace que sólo del 15 a 20% de la dosis infundida alcance el hígado.

Los efectos vasodilatadores a nivel sistémico ejercen un efecto protector de la función renal, contrarrestando los efectos vasoconstrictores de la ciclosporina A y FK 506 que parecen estar mediados por la liberación de endotelina y tromboxanos.

#### 1.5.5- ADMINISTRACIÓN DE PGE1 POR VÍA PORTAL

La vía de administración es crucial, pues como se ha comentado, las prostaglandinas son sustancias de acción local, de manera que cuando se aplican por vía periférica son metabolizadas hasta un 80% a nivel pulmonar y carecen por lo tanto de efectos “distancia”, como puede ser el hígado (35, 36, 37, 38). Por el contrario, cuando se administra por vía portal se consigue una mayor efectividad en el tratamiento de la LIR, debido a la aplicación directa de la medicación en el hígado. Conjuntamente, la administración regional (portal) desde el momento de la revascularización, permite disminuir la formación de la LIR sin causar inestabilidad hemodinámica sistémica, debido a la metabolización casi total (90%) en el injerto implantado y el restante (10%) en el pulmón, como demuestran algunos trabajos experimentales. Se ha demostrado en un estudio experimental en cerdos, que tras la infusión de PGE1 por vía portal, al pasar por el hígado, la concentración de PGE1 en las venas suprahepáticas era 10 veces menor a la dosis inicial portal (1).

Sobre los estudios previamente realizados por nuestro grupo de investigación, se puede citar el estudio hemodinámico en trasplante hepático, valorando también el uso de prostaglandina E1 por vía portal, tema de la tesis doctoral del Dr. Hidalgo dirigida por Dr. Carlos Margarit. En este estudio se concluye que la administración de PGE1 por vía intraportal inmediatamente después de la reperfusión no tuvo efecto a nivel sistémico, de manera que su administración a dosis plenas fue factible y segura. El

efecto beneficioso de la perfusión de PGE1 a nivel hemodinámico consistió en un descenso de la resistencia portal al final de los 90 minutos. En cuanto al efecto beneficioso clínico, el conjunto de pacientes tratados con la medicación, obtuvo una menor mortalidad postoperatoria. El grupo de pacientes con mayor riesgo de desarrollar una lesión de preservación moderada-severa tuvo una menor estancia en la UCI y menor necesidad de diálisis (77).

# JUSTIFICACIÓN

---

## Justificación

El aumento del número de candidatos a trasplantes, con un incremento de la mortalidad en la lista de espera, es uno de los problemas en gran parte de los grupos de trasplante en la actualidad. Para evitar la progresión de este problema, nuevas técnicas quirúrgicas, como el donante vivo y el Split, fueron aplicadas en el campo del trasplante hepático con el intento de ofertar una mayor cantidad de órganos.

Desafortunadamente, un gran porcentaje de los órganos ofrecidos son desechados, debido al gran riesgo de producirse un mal funcionamiento del injerto, causado por una lesión de isquemia-reperfusión severa. Debido a estas circunstancias, se intensificaron los estudios de investigación en el tratamiento de la LIR para que se pudiera aprovechar al máximos los órganos ofertados. En esta línea de investigación, la administración de PGE1 por vía intraportal, en el momento de la resvascularización del injerto, tiene como objetivo ofrecer la posibilidad de tratar la LIR, disminuyendo el grado de lesión. Debido a esto, será posible rescatar algunos de los órganos que antes eran rechazados por el gran riesgo de originarse una LIR severa. Los injertos con presencia de esteatosis de grado leve a moderado o con un largo periodo de isquemia fría y los hígados de donantes añosos, serían los que más se beneficiarían del tratamiento con PGE1, de manera que, administrando la medicación por vía portal inmediatamente en el momento de la reperfusión proporcionaría un tratamiento más efectivo.

Otro particularidad a tener en cuenta es que el grado de la lesión de isquemia-reperfusión mantiene correlación directa con el tiempo de supervivencia del injerto y del enfermo, con la estancia hospitalaria, con las tasas de infecciones y rechazos. Por estos motivos, la administración de PGE1 por vía portal contribuirá a alcanzar mejores

resultados, beneficiando al enfermo en todos los aspectos y, paralelamente, generando un menor coste económico al hospital.

Teóricamente, la PGE1 es un fármaco capaz de modular la lesión de IR siempre y cuando su administración sea precoz (inmediatamente post-reperfusión), directa al injerto (perfusión intraportal) y a dosis plenas. Para ello se ha diseñado este estudio con la finalidad de demostrar objetivamente si es efectiva la administración de PGE1 y por tanto, si puede tener aplicabilidad contrastada en el campo del trasplante hepático humano.

# HIPÓTESIS

---

## **Hipótesis del Trabajo**

- 1.- El modelo de trasplante hepático porcino con el órgano preservado por una duración de 24 horas producirá una lesión isquemia-reperfusión severa con elevada mortalidad.
  
- 2.- La lesión de isquemia-reperfusión podrá ser cuantificada y caracterizada mediante las diferentes pruebas del estudio.
  
- 3.- La infusión de PGE1 intraportal producirá un efecto beneficioso y disminuirá la lesión de isquemia-reperfusión.
  
- 4.- La administración de Prostaglandina E1 por vía intraportal, inmediatamente después de la reperfusión, será bien tolerada hemodinámicamente debido a la metabolización casi total en el injerto implantado.

# **OBJETIVOS**

---

## Objetivos

1. - Establecer un modelo experimental de trasplante hepático porcino, en el que se pueda reproducir el fenómeno de isquemia-reperfusión, para poder desarrollar el estudio, valorando los efectos de la prostaglandina tipo E1 en la LIR.

2. - Diagnosticar y cuantificar precozmente la lesión de IR y función hepática por medio de parámetros bioquímicos, tisulares y hemodinámicos, estratificando el grado de lesión.

3. - Estudiar el posible efecto beneficioso de la prostaglandina E1 administrada por vía intraportal sobre la lesión de IR, mediante los parámetros hemodinámicos, bioquímicos y histológicos.

4. - Valorar los efectos de la PGE1 sobre el flujo hepático total (hemodinámica regional), y principalmente sobre la hemodinámica sistémica, estudiando la tolerancia hemodinámica.

# **MATERIAL Y MÉTODOS**

---

## Material y Métodos

### 5.1- Trasplante hepático en cerdos

Dentro de la práctica de investigación experimental, hace mucho años que se están utilizando al cerdo como animal de experimentación del trasplante hepático. Este hecho se basa, principalmente, en una anatomía semejante entre el cerdo y el hombre, aparte de ser un animal que se puede criar fácilmente en cautiverio, de reproducción numerosa y económicamente accesible. Además, en lo referente al trasplante hepático específicamente, la técnica quirúrgica utilizada en cerdos es similar a la practicada en humanos, permitiendo, también, contribuir para el entrenamiento técnico a los cirujanos de trasplante en formación.

Con respecto a la técnica empleada, todos los experimentos de trasplante hepático fueron realizados mediante la técnica clásica y no se utilizó ningún tipo de by-pass veno-venoso para descongestionar la región esplácnica durante la fase anhepática. Por tanto el tiempo del implante no debe pasar de los 30 minutos tras el clampaje portal y sistémico, debido a la disminución del retorno venoso y falta de drenaje esplácnico.

Para que hubiera la posibilidad del desarrollo de los trasplantes hepáticos porcino, además de los materiales fungibles necesarios para este tipo procedimiento, fueron imperiosos varios aparatos para la monitorización anestésica, así como los propios para poder realizar cualquier intervención quirúrgica. Entre ellos:

- Aparato de ventilación mecánica (Veterinary Anesthesia Ventilator M 2000);
- Monitor de presiones y electrocardiograma (Diascope 2);
- Oxímetro - Monitor (Pulsiometre Baxter);
- Equipo de medición de flujos sanguíneos (Transonic System - T206);

- Bisturí eléctrico (Eschmann TD411RS);
- Sistema de aspiración de campo quirúrgico central (Vacutron);
- Manta calentadora;
- Calentador de sueros (Memmert);
- Bombas de perfusión de soluciones.



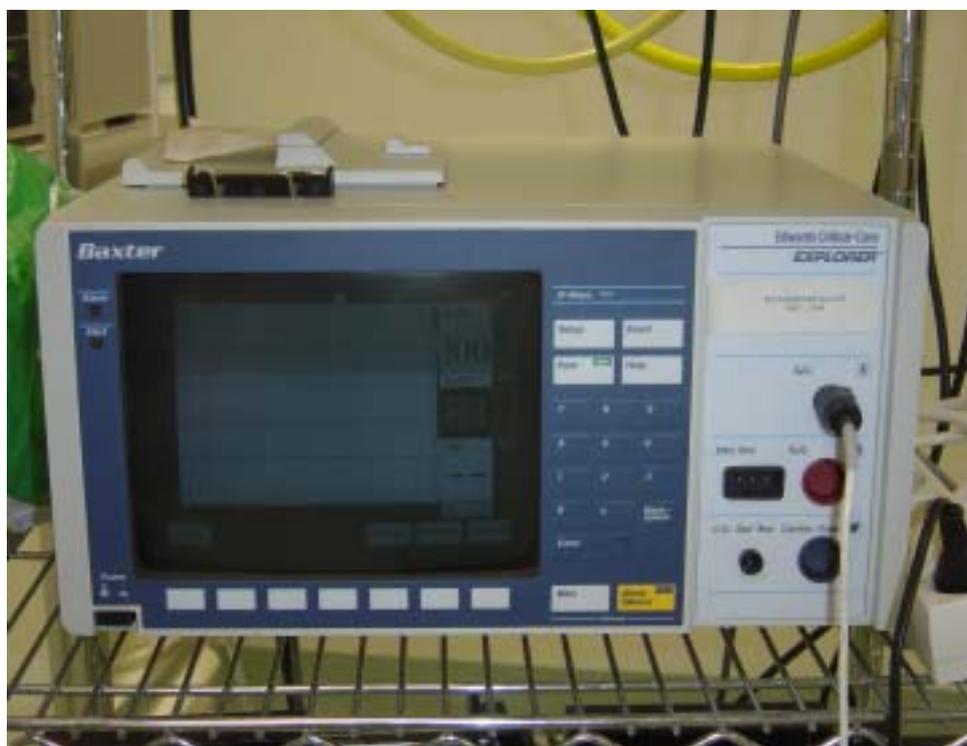
**Figura 5.1** - Calentador de sueros (Memmert).



**Figura 5.2** - Manta eléctrica.



**Figura 5.3** - Bisturí eléctrico (Eschmann – TD41RS).



**Figura 5.4** – Monitor (Pulsiometre Baxter).



**Figura 5.5** – Monitor de electrocardiograma y PAM (Diascope 2).

El estabulario del Hospital Vall d'Hebron presenta 8 corralinas individuales, con ambiente climatizado, piso templado y acceso a demanda de agua. Conjuntamente, cuenta con personal especializado que se encarga diariamente de la alimentación y limpieza de los animales. El estabulario tiene la acreditación por parte de la Generalitat y está reglamentado dentro de las normativas éticas y sanitaria.



**Figura 5.6** – Corralinas del departamento de investigación experimental.



**Figura 5.7** – Corralina con piso templado.

## 5.2- Población de estudio

En el estudio se utilizaron hembras de la especie porcina de una mezcla entre las razas Largewhitex y Landrace, con un rango de peso que variaba de 30-35 Kg. Los experimentos se desarrollaron desde abril/2003 hasta diciembre/2003. Todos los animales fueron suministrados por una misma granja especializada y estabulados en condiciones controladas, pasando por un riguroso cuidado y control de enfermedades infecciosas, siendo supervisados por veterinarios durante la fase de crecimiento.



**Figura 5.8** - Hembras de la especie porcina (donante y receptor).

Para el desarrollo del estudio, se realizaba un trasplante hepático porcino a la semana, siendo necesarios trasladar dos cerdos (un donante y un receptor) a nuestro estabulario, los cuales eran sometidos a una semana de cuarentena en ambiente

climatizado con perfectas condiciones de limpieza, y debidamente cuidados por celadores. En total, hemos utilizado 54 cerdos (27 donantes y 27 receptores), completando 27 experimentos de trasplante hepático ortotópico porcino.

### **Experimentos desechados**

En total fueron desechados 9 experimentos. Los primeros 3 trasplantes se destinaron a poner a punto la técnica quirúrgica y anestésica (curva de aprendizaje) y 6 experimentos no fueron considerados válidos debido a complicaciones técnicas, 1 por problema anestésico y 5 por fallo quirúrgico.

#### Complicaciones técnicas:

- 4 por abdomen hemorrágico (3 hemorragias de suturas vasculares, 1 lesión esplénica).
- 1 estenosis de la vena cava suprahepática.

### **Experimentos válidos**

Todos los experimentos que no presentaron complicaciones técnicas o disparidad con respecto a los tiempos: de intervención, de fase anhepática y de isquemia fría fueron considerados válidos. En total, 18 trasplantes fueron aceptados para el estudio.

### 5.3- Diseño del estudio

Se trata de un estudio experimental prospectivo, donde se estudia principalmente el efecto de la prostaglandina E1 en la Lesión de Isquemia-Reperfusión (LIR) y la tolerancia hemodinámica por el uso de esta medicación inmediatamente a la reperfusión del injerto en el trasplante hepático ortotópico.

El estudio se compone por tres grupos:

- Un **grupo control** con 4 experimentos con implante de un injerto preservado durante sólo 3 horas de isquemia fría;
- Otros dos **grupos (A y B)**, ambos con 7 experimentos de trasplante hepático ortotópico con hígados preservados por una duración de 24 horas.

Con respecto a la infusión de medicación por vía portal, mediante un catéter introducido por una colateral venosa insinuada hacia el tronco portal, se administró, en la fase de revascularización del órgano, suero fisiológico en el **Grupo A** y prostaglandina E1, con la dosis de 0.15  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$  (Alprostadil 500 $\mu\text{g}$ ) por una duración de 90 minutos, en el **Grupo B**. En todos los experimentos se aplicaron la misma técnica anestésica y quirúrgica.

Grupo	(N)	Uso de PGE1	Tiempo de Isquemia Fría
A	7	NO	24 Horas
B	7	SI	24 Horas
Control	4	NO	3 Horas

Con relación a las intervenciones quirúrgicas, primeramente en el cerdo donante, se hacía la cirugía de extracción completa del órgano (hígado) bajo la técnica de disección y perfusión, el cual se preservaba con solución de Wisconsin en una temperatura entre 0 a 4° C. Tras 3 horas de isquemia fría del órgano en el grupo control, o 24 horas en los grupos A y B, el hígado era trasplantado en el cerdo receptor en posición ortotópica sobre la técnica clásica sin by-pass. Siendo que, en la fase de revascularización portal hepática se administraba por vía portal, suero fisiológico (Grupo A) o PGE1 (Grupo B) durante 90 minutos. A medida que transcurría el estudio, se intercalaban los grupos a cada experimento para que no hubiera influencia en los resultados atribuibles a curva de aprendizaje.

Durante la cirugía del cerdo receptor y en las 24 horas siguientes del postoperatorio, se verificaron los parámetros hemodinámicos regional y sistémico, se obtuvieron las muestras de sangre para análisis bioquímica, las biopsias hepáticas para el estudio histológico y la cuantificación de la producción de bilis para la valoración de la síntesis hepática. Mediante estos parámetros, se valoró y estratificó precozmente el grado de la Lesión de Isquemia Reperfusión (LIR) y la función hepática, posibilitando analizar el posible efecto beneficioso de la Prostaglandina E1 y los efectos sobre la hemodinámica sistémica y regional hepática.

## 5.4- Parámetros analizados en el estudio para valorar la LIR y la tolerancia hemodinámica a la medicación (PGE1)

### 5.4.1- CUANTIFICACIÓN DE LA LIR

#### A)- Marcadores de Lesión Hepatoceleular

- **AST/ALT/LDH:** son los parámetros más clásicos para la determinación de la lesión celular hepática, pues su presencia en el plasma indica citólisis de los hepatocitos. La determinación de la concentración catalítica de aspartato / alanina aminotransferasa circulante constituye una indicación de lesión hepatoceleular. A la vez existe una importante relación de linealidad entre sus valores en plasma y el grado de lesión. Los indicadores de citólisis, representados por las transaminasas (ALT y AST) y por la láctico dehidrogenasa (LDH), se elevan de modo prácticamente inmediato tras el desclampaje de la vena porta y la subsiguiente reperusión. El pico máximo de estos marcadores se alcanza entre el primero y el segundo día del postoperatorio, tendiendo a normalizarse en el curso de la primera semana (10).

#### B)- Marcador de Lesión Endotelial

- **Ac. Hialurónico (clearance):** Esta molécula corresponde a un glicosaminoglicano de elevado peso molecular, específicamente depurado en las Células Endoteliales Sinusoidales (CES), mediante endocitosis y degradación, siendo sus valores inversamente proporcionales a la actividad sinusoidal.

Es posiblemente el método de evaluación bioquímica de lesión endotelial más utilizado. El comportamiento de esta molécula así como de la cretinquinasa-BB ha sido

ampliamente estudiado por *Dr. Ramon Marti*, con motivo de su tesis (dirigida por la Dra. Segura y el Dr. Margarit) (20). Mediante un modelo de trasplante hepático porcino se estudió su comportamiento en función de diversos tiempos de isquemia fría y de diversas soluciones de preservación (Collins vs Wisconsin), validando dicho marcador como determinante de función endotelial.

C)- Marcador Inflamatorio en la LIR:

- **B-Galactosidasa (Gal):** es una glicohidrolasa que predomina en los lisosomas liberados durante la muerte o en la activación de las células de Kupffer. Ha sido propuesta como un mediador inflamatorio específico en la lesión de isquemia-reperusión en trasplante hepático, ya que su liberación representa un evento precoz en la cascada de la lesión de reperusión.

En la LIR, el agotamiento del ATP, durante la fase de isquemia, conduce a inactivación de la bomba sodio-potasio, pérdida del gradiente electrolítico, edema celular y afluencia de calcio hacia el interior de la célula. Las fosfolipasas implicadas en la lesión mediada por calcio, provienen en gran parte de las células endoteliales y de Kupffer en la fase de isquemia. Las células de Kupffer representan de 80 a 90% de los macrófagos del cuerpo y tienen un enorme potencial para liberar mediadores inflamatorios y lisosomas. En presencia de isquemia, la activación o lesión de las células de kupffer representa uno de los eventos primarios en la cascada de la LIR que genera la liberación de lisosomas, los cuales contienen en su interior la enzima B-Galactosidasa. Por lo tanto, tras la fase de reperusión del injerto en la presencia de la isquemia tisular previa, las células de Kupffer sirven como fuente primaria en la elevación de los niveles de (Gal).

Por el hecho de preceder al daño hepatocelular, la (Gal) es un marcador más sensible y precoz que las transaminasas, demostrando una subida más rápida de sus niveles en las primeras horas del trasplante, llegando al punto máximo en las 5 horas tras la reperusión del injerto y que suele normalizarse por completo en las 48 horas de postoperatorio. Una elevación rápida de los niveles de B-galactosidasa se relaciona con una función hepática deficiente y una LIR severa (2).

#### 5.4.2- PARÁMETROS DE SÍNTESIS HEPÁTICA

- **Bilirrubina total:** Es un parámetro que valora la función hepática por la depuración de la bilirrubina indirecta, sin embargo, a condición de que no haya obstrucción biliar o lesión canalicular por rechazo.

En lo que se refiere a los índices plasmáticos de colestasis, los niveles de bilirrubina total y directa tienden a subir sólo después de las 12-24 horas del postoperatorio, y siguen aumentando en prácticamente todos los pacientes, si bien con cierto grado de variabilidad entre individuos, para retornar a la normalidad en el curso de la tercera semana del trasplante (2). Por lo tanto, los niveles de bilirrubina total son proporcionales a la gravedad de la LIR y al grado de disfunción del hígado.

- **Tiempo de Protrombina (TP):** es un de las pruebas más utilizadas para cuantificar la capacidad de síntesis hepática. Una lesión IR severa llevará a niveles bajos de TP en las primeras horas post-trasplante.

- **Factor V:** es un de los factores de coagulación producido en el hígado de gran importancia en el estudio propuesto, pues para valorar la síntesis hepática en un

pequeño intervalo de tiempo es más fiable y sensible que el tiempo de protrombina (tiempo de Quick).

**-Producción de bilis:** Cuantificar el volumen de bilis producido en el hígado implantado, por medio de un tutor conectado a un colector, es un método sencillo de bajo coste y además un excelente parámetro para la evaluación de la función de síntesis hepática.

#### 5.4.3- ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO

En el Estudio, fueron planteadas para el análisis histológico la obtención de biopsias hepáticas en tres fases del experimento en el receptor:

- 1ª) Momento antes de implantar el órgano (Fase A);
- 2ª) Tras finalizar el tratamiento con PGE1 (Fase R2);
- 3ª) En el momento del fallecimiento del animal.

- **Hematoxilina-eosina:** Se cuantificó la LIR por una escala de lesión histopatológica. A cada biopsia hepática se graduaba la LIR por la verificación de 5 parámetros: la presencia de polimorfonucleares, vacuolización, dilatación sinusoidal, congestión sinusoidal y apoptosis. A cada uno de los parámetros, la graduación variaba de 0 a 3 puntos. **0** – ausencia, **1** – Leve (menos de 33% de afectación), **2** – moderado (de 33 a 66% del campo afectado) y **3** – severo (más de 66% de afectación). Esta escala fue ampliada añadiendo la presencia de necrosis celular, asignando 5 puntos para necrosis leve, 10 puntos para moderada y 20 para necrosis severa (25).

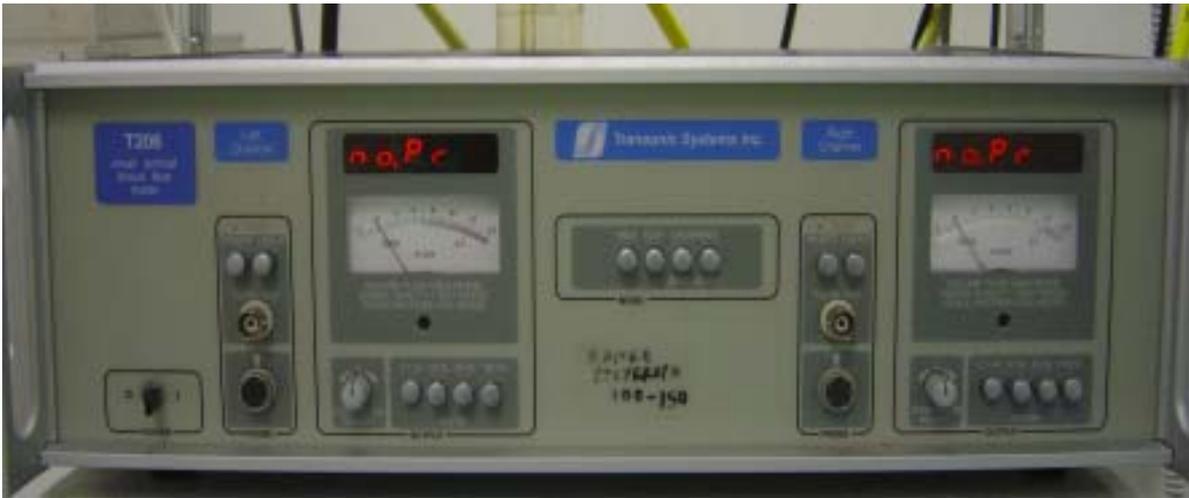
<i>Parámetros</i>	<i>Graduación</i>
Presencia de polimorfonucleares	0 a 3 puntos
Dilatación sinusoidal	0 a 3 puntos
Congestión sinusoidal	0 a 3 puntos
Vacuolización	0 a 3 puntos
Apoptosis	0 a 3 puntos
Necrosis	0, 5, 10 o 20 puntos

**Tabla 5.1** - Parámetros utilizados para la graduación de la lesión Histológica.

#### 5.4.4- ESTUDIO HEMODINÁMICO

- **Hemodinámica Regional (hepática):** La determinación de los flujos sanguíneos intraoperatoriamente y de forma incruenta de la vena Porta y arteria Hepática, por medio del aparato *CardioMed Flowmeter*, mediante el principio del Tiempo de tránsito, nos permitió determinar los cambios hemodinámicos hepáticos en la presencia de la LIR, incluyendo también las posibles alteraciones hemodinámica por el uso de la PGE1.

Tal y como se ha descrito con anterioridad, la lesión de preservación tiene su máxima expresión a nivel del sinusoides hepático mediante la afectación de las células y de su arquitectura. Estos cambios microestructurales implican una desestructuración del sistema sinusoidal, que provoca una mayor dificultad para la circulación a dicho nivel y que se traduce en un incremento de las resistencias al flujo portal y arterial, y consecuentemente una disminución de la perfusión del injerto, llegando en ocasiones al denominado non reflow/reflow paradox.



**Figura 5.9** -Medidor de flujo.

Existen numerosos estudios donde se pone de manifiesto la estrecha relación entre el grado de lesión endotelial y la supervivencia del injerto (21). Incluso en trabajos (tanto experimentales como clínicos) se demuestra como la microperfusión del injerto se correlaciona de forma inequívoca con la supervivencia del mismo, llegando a determinar un cut - off a partir del cual el fracaso del hígado es inevitable (22, 23). Todos estos cambios a nivel de la microcirculación se pueden igualmente objetivar analizando la hemodinámica hepática en la fase peroperatoria, y de esta forma establecer un patrón de comportamiento, tras la lesión de isquemia-reperfusión, con carácter pronóstico.

A partir de los registros hemodinámicos, se ha intentado establecer un patrón de comportamiento que se correlacionara posteriormente con la función del injerto, tanto clínica como analíticamente. Los resultados iniciales (C.Margarit y Cols. 1999) (24) apuntan a una disminución significativa de la perfusión del injerto, especialmente del flujo portal, en aquellos casos que presentaron una lesión de preservación moderada-severa.

- **Hemodinámica Sistémica:** En las mismas fases en que se verifica la hemodinámica regional, también se valoran las condiciones cardiovasculares, midiendo la Presión Arterial (PA), Presión venosa Central (PVC) y Frecuencia Cardíaca (FC). Con estas mediciones sistémicas, el gran objetivo es comprobar la seguridad del tratamiento de la LIR con la PGE1 en dosis plenas por vía portal, sin que haya alteraciones en la hemodinámica sistémica.

Según algunos trabajos publicados, el uso de la PGE1 por vía portal en dosis plenas, no genera ningún cambio en la hemodinámica sistémica. Esto se debe por el metabolismo de la PGE1 en el hígado y pulmón. En un trabajo hecho en ratas propuesto por S. Kawachi y cols, se comprobó la eficacia del hígado en la depuración de la PGE1 por vía portal, siendo que 89 a 95% de la dosis total fue eliminada en el primer paso por el hígado. Lo restante se depuró en el pulmón. En otro estudio experimental porcino, valorando el efecto hemodinámico regional por el uso de la PGE1, realizado por este mismo grupo de investigadores, se demostró que el uso de PGE1 por vía portal lleva a un aumento significativo del flujo arterial hepático y consecuentemente a un incremento de la perfusión tisular. Se supone que esta mejora se debe principalmente a la disminución de la resistencia vascular en la microcirculación hepática, tanto por el tratamiento de la LIR con PGE1, como por el efecto vasodilatador de la medicación (1).

En resumen, con el estudio hemodinámico, se pretende valorar los efectos de la LIR sobre la hemodinámica sistémica y regional hepática, evaluando también los cambios hemodinámicos producidos debido al uso de la prostaglandina tipo E1 en el tratamiento de la LIR en el hígado implantado.

#### 5.4.5- VARIABLES ATRIBUIBLES A LA INTERVENCIÓN QUIRÚRGICA

En este experimento, incluimos como variante relacionada con la cirugía, el tiempo de la fase anhepática y el tiempo de intervención quirúrgica. Por el hecho de la técnica quirúrgica estar bien establecida, la cual siempre se ejecuta la misma, no hay otras variables.

- **Tiempo de la fase Anhepática:** mantiene relación con el control hemodinámico del animal inmediatamente después de la reperfusión hepática, debido a la reducción del retorno venoso portal y sistémico, por el clampaje de las venas porta y cava en el momento del implante del hígado. Cuanto más largo es el tiempo de esta fase, mayor será el período de hipotensión tras la reperfusión hepática, repercutiendo consecuentemente en la hemodinámica regional y en el desarrollo de la LIR.

- **Tiempo de Intervención Quirúrgica:** puede influir en los valores de los marcadores de lesión hepática, principalmente en los menos específicos.

## 5.5- Metodología de la recogida de muestras y determinaciones

### 5.5.1- FASES DEL EXPERIMENTO

El experimento se divide en 6 fases:

**Fase D1 o Basal:** al finalizar la disección del hilio hepático.

En esta fase, únicamente se ha anatomizado el hilio hepático, es decir, se ha expuesto la vena porta y la arteria hepática, sin otras maniobras quirúrgicas que puedan artefactar la situación basal del experimento.

**Fase A:** Corresponde a la fase anhepática, iniciándose en el momento del clampaje de las venas suprahepáticas, cava infrahepática y porta.

Una vez finalizada la disección del hilio hepático, venas suprahepáticas y cava, se seccionan los ligamentos hepáticos y se liga la arteria hepática, procediendo a la hepatectomía (inicio de la fase anhepática). Esta fase tiene como término la revascularización portal del injerto. En esta fase, en una palangana se perfunde el injerto con 500ml de Ringer Lactato a temperatura ambiente para barrer la solución de Wisconsin.

**Fase R1 o Post-revascularización Inmediata:** Se inicia tras la revascularización portal del injerto.

Finalizadas las anastomosis de la cava con las venas suprahepáticas y la anastomosis portal, se retiran los clamps de las venas suprahepáticas y porta, iniciando la revascularización del injerto (inicio de la fase R1). En toda la extensión de esta fase, de duración de 90 min, se administra PGE1 (0,15ug/kg/min) por vía portal en los

experimentos del Grupo B y suero fisiológico en los animales del Grupo A.

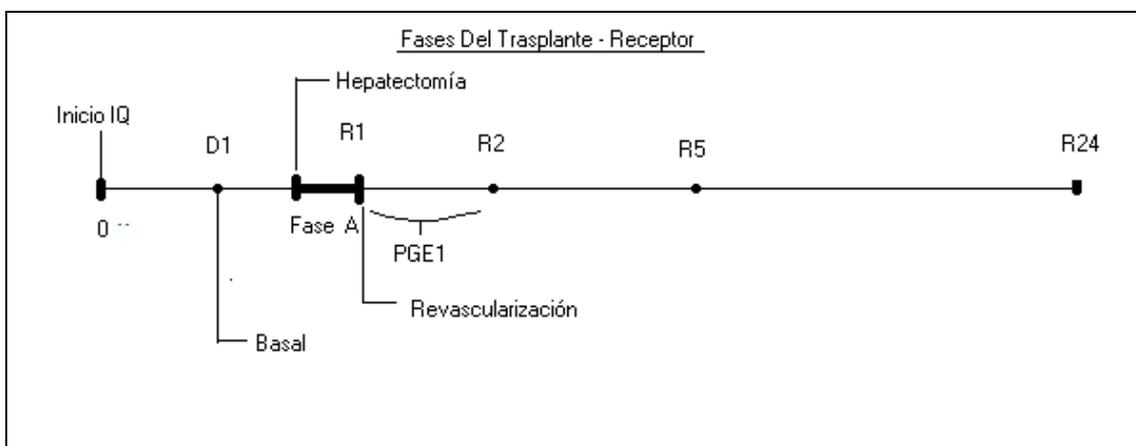
**Fase R2:** empieza a los 90 minutos de la reperfusión portal.

Esta fase coincide con la etapa final del trasplante y con el término del uso de la Prostaglandina E1 por vía portal, prácticamente antes de cerrar la laparotomía.

**Fase R5:** Corresponde a las 5 horas tras la reperfusión del injerto.

En las primeras horas de postoperatorio inmediato, se corrigen los desequilibrios metabólicos, electrolíticos, ácido-básico y se mantiene el control hemodinámico. Se evalúa la función pulmonar del animal, mediante control clínico y gasométrico, para valorar la posibilidad de extubación. En caso que no sea posible, debido a la inestabilidad hemodinámica o a problemas respiratorios, se deja el animal intubado sobre efecto de sedación general.

**Fase R24:** representa las 24 horas tras la reperfusión del injerto (1º día de postoperatorio). En esta fase es donde se saca la última muestra de sangre y biopsia hepática, y cuando se realiza la cuarta determinación hemodinámica. En seguida, se sacrifica el animal bajo anestesia general.



### 5.5.2- PROCOLO DE RECOGIDA DE MUESTRAS Y DETERMINACIONES

Las determinaciones hemodinámicas, muestras sanguíneas e histológicas son recogidas en diferentes fases del trasplante en el receptor.

#### Respecto a las muestras sanguíneas:

- En la totalidad se recoge 5 muestras de sangre, 4 por vía arterial sistémica y 1 por las venas suprahepáticas.

#### En relación a las biopsias hepáticas:

- Se realizan 3 biopsias hepáticas, la primera en la fase A, la segunda en el período R2 y la última biopsia en la fase R24 o en el momento del fallecimiento del animal.

#### Sobre las determinaciones:

- Se cuantifica la producción de bilis (ml/h) en dos períodos. Primero, se cuantifica el volumen de bilis producida durante los 90 minutos de administración de prostaglandina E1 (Fase 1). Seguidamente, se determina la producción de bilis durante el período situado entre la fase R2 hasta el fallecimiento del animal (Fase 2);

- Se verifican los parámetros hemodinámicos sistémicos y regional hepático (flujo arterial y portal hepático) en las fases D1, R1, R2 y R24.

**Fase D1:** Muestras Basales. Se recoge en el momento de la disección hepática una muestra de sangre vía arterial sistémica para bioquímica general, coagulación y marcadores específicos de lesión hepática. Se verifican datos hemodinámicos sistémicos

y regional hepático en el momento que se acaba la disección del hilio hepático (Estudio Hemodinámico D1).

**Fase A:** En el momento en que se lava el injerto con una perfusión de 500ml de Ringer Lactato a temperatura ambiente, se realiza la primera biopsia hepática, la cual es almacenada en frasco con formalina al 10%.

**Fase R1:** Tras la reperfusión portal del injerto, se extrae la sangre de las venas suprahepáticas. Es la única vez en que se obtiene sangre por esta vía, pues en esta fase, los marcadores de lesión hepática se encuentran en una mayor concentración en las venas suprahepáticas en comparación con la sangre de la vía arterial sistémica. En las demás fases, los marcadores ya están mezclados en la sangre, hasta el punto de no haber diferencias entre las vías de obtención de muestras sanguíneas.

En esta fase, para una posterior cuantificación de bilis en la fase R2, se introduce en la vía biliar un tutor conectado a un reservorio.

Tras la anastomosis arterial se verifican los parámetros hemodinámico regional y sistémico (Estudio Hemodinámico R1).

**Fase R2:** Tras el término del uso de la medicación por vía portal (PGE1 o suero fisiológico):

Se determinan los valores hemodinámicos sistémicos y regional (Estudio Hemodinámico R2);

Se cuantifica la producción de bilis (ml/h) producida desde el momento de la revascularización del injerto, o sea, se determina el volumen de bilis excretado durante el periodo de administración de la medicación por vía portal (Fase 1);

Se extraen una muestra de sangre arterial sistémica y la segunda biopsia hepática.

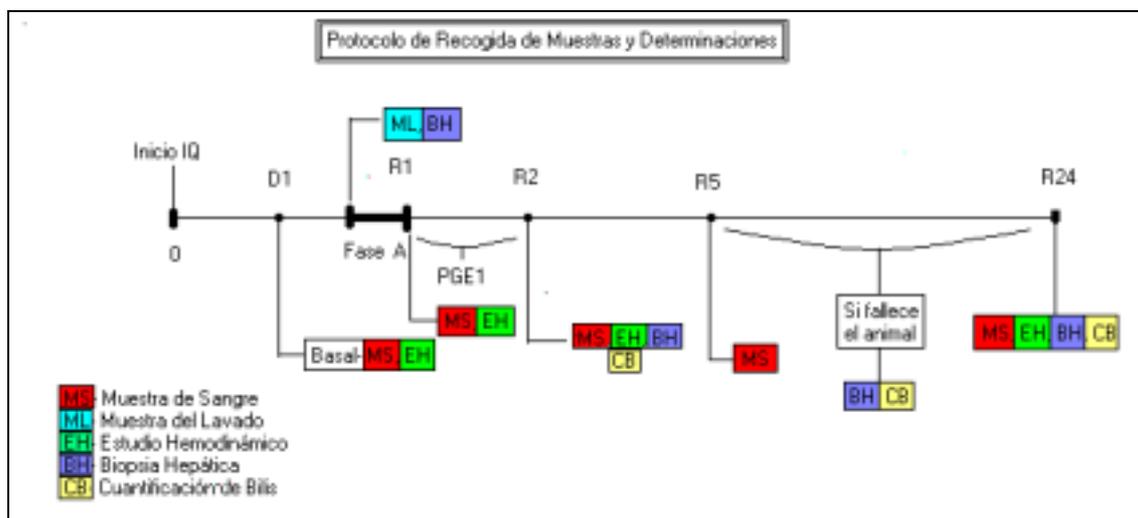
**Fase R5:** Obtención de una muestra de sangre.

**Fase R24:** Se ejecuta una laparotomía para verificar las determinaciones hemodinámicas (Estudio Hemodinámico R24). En la secuencia se toma la última muestra sanguínea, la tercera biopsia hepática y se determina la cantidad de bilis producida desde la fase R2.

Al final, se sacrifica el animal con una sobredosis de tiobarbital y cloruro de potasio.

Si el animal fallece antes de completar las 24 horas de postoperatorio:

Se realiza la laparotomía exploradora, se extrae la tercera biopsia hepática y se cuantifica la producción de bilis formada desde la fase R2 hasta el momento del fallecimiento.



### 5.3- PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE SANGRE Y BIOPSIAS

Para la obtención de cada muestra de sangre se extraen 10ml (4,5ml para los tubos con EDTA, 2,5 ml para los tubos con citrato y 3ml para los tubos con heparina L). Los tubos son centrifugados a una velocidad de 4000 ciclos, durante 10min a 4°C. En seguida, las muestras son procesadas en alicotas de 0,4ml en tubos eppendorf, debidamente codificados y congelados a -80°C.

Con respecto a las biopsias hepáticas, estas son almacenadas en botes de 100ml con formalina a 10%.



**Figura 5.10** – Materiales necesarios para procesar las muestras sanguíneas.



**Figura 5.11 - Centrifuga.**

## **5.6- PROCEDIMIENTO ANESTÉSICO**

### **5.6.1- Donante**

Se considera suficiente la privación de alimento, no de agua, en las 24 horas previas a la anestesia para evitar las complicaciones asociadas a un estómago lleno y para facilitar el procedimiento quirúrgico.

#### SEDACIÓN (Premedicación)

Para la sedación, se administra por vía intra-muscular:

- Ketamina 50: 20 a 30mg/kg;
- Xilacina 2 mg/kg;
- Atropina 0,03 mg/kg

Tras 15 minutos de la sedación, los animales son lavados con agua templada y depositados en la mesa quirúrgica que ha sido previamente calentada mediante una manta eléctrica. Se colocan en posición de decúbito prono o esternal y se procede a preoxigenación a través de mascarilla. Con el animal adecuadamente sedado por la premedicación descrita, se procede a la canulación de una vía venosa en la oreja que utilizamos tanto para la administración de fármacos como para la fluidoterapia per y postoperatoria. Se coloca el aparato de electrocardiografía con tres electrodos precordiales y la terminal de pulsioxímetro en la cola del animal. Se administran la inducción anestésica con Propofol 3mg/kg (bolus) a través de la vena auricular. Tras comprobar la disminución del reflejo palpebral se procede a la intubación endotraqueal.

### TÉCNICA DE INTUBACIÓN ENDOTRAQUEAL

Se abre la cavidad oral mediante dos tiras de vendas, sujetando una a la mandíbula superior y otra la mandíbula inferior y manteniendo el cuello en hiperextensión. En esta posición y bajo visión directa se coloca la pala del laringoscopio sobre la mandíbula inferior, encima de la lengua, y se hace progresar hasta conseguir calzar la epiglotis con el extremo distal de la pala. Se visualiza, entonces, la glotis en la que introducimos el tubo con fiador dirigido hacia abajo. Cuando notamos que el extremo del tubo se enfrenta, directamente, al suelo de la laringe lo rotamos 180° hacia arriba, intentando seguir la curvatura traqueal. Se avanza el tubo y se hincha el balón con 5 cm de aire. Una vez asegurado el control de la vía aérea se inicia la ventilación mecánica.

### VENTILACIÓN MECÁNICA

Se conecta al respirador con un volumen de 12ml/kg con el oxígeno a 50% con una Frecuencia Respiratoria (FR) de 13-15 irpm, manteniendo la oximetría de pulso en 100%.

### MANTENIMIENTO ANESTÉSICO

- FENTANILO: 11,5 (+/-3) ug/Kg/hr en bomba de perfusión;
- PROPOFOL: 10 (+/-3) mg/Kg/hr en bomba de perfusión;
- CRISTALOIDES: 13 ml/Kg/h calentados a 39 °C.

## CONTROL ANESTÉSICO

Se efectúa a través de la monitorización de los siguientes parámetros:

- Saturación de Oxígeno (StO<sub>2</sub>) a través de la oximetría de pulso;
- ECG;
- Frecuencia Cardíaca (FC);
- Presión Venosa Central (PVC) por cateterización de vena yugular externa D;
- Presión Arterial Continua mediante catéter en la arteria carótida común derecha;
- Temperatura (T°C).

Finalizada la disección, se extrae 1 bolsa de sangre para la cirugía del receptor, en seguida se administra Heparina Na 3mg/kg EV antes de colocar las cánulas en la arteria Aorta y vena Porta para proceder la perfusión del hígado con Wisconsin.

### **5.6.2- Receptor**

Se deja en ayunas sin restricción de agua por 24 horas previas a la anestesia. En la sedación, la premedicación es la misma utilizada en el donante. Sin embargo, para que no haya interferencia en los resultados por contaminación bacteriana inadvertida, se administra antibiótico profiláctico, 1g de Augmentine 30 minutos antes de la cirugía y 1g al final de intervención.

Las fases de inducción, intubación, monitorización y mantenimiento anestésico son idénticas a las practicadas en el donante. Salvo que, en el control anestésico se incluyen la monitorización del equilibrio ácido básico, electrolítico y del hematocrito por gasometrías arteriales seriadas en 3 fases de la cirugía:

- Tras los 5 minutos de clampaje portal (Fase Anhepática);
- Tras la reperfusión portal del hígado;
- Al final de la intervención.

Para el mantenimiento de la volemia se instala solución cristaloide a un volumen de 13ml/kg/h más las pérdidas operatorias. En la fase anhepática, debido al clampaje venoso central y portal ocurre una disminución del retorno venoso, de manera que, para mantener la Presión Arterial Media (PAM) entre 45 - 55mmHg, se administra 500ml de coloide. En este periodo, se suspende las drogas anestésicas de mantenimiento hasta el momento del desclampaje para el restablecimiento del retorno venoso portal.

Tras el desclampaje, se corrige el equilibrio ácido básico con bicarbonato sódico 1/6 molar conforme gasometría. Al final del procedimiento quirúrgico, se efectúa la corrección electrolítica y se suspenden los fármacos intravenosos. Cuando la situación hemodinámica lo permite, se comprueba la eficacia de la ventilación espontánea, garantizando siempre el aporte de oxígeno conforme las necesidades del animal. Se extuba la tráquea, cuando el animal mantiene la saturación de oxígeno por encima de 90%. Se aplica la analgesia con Buprenorfina 0,3mg a cada 12 horas por vía intramuscular. Se mantiene una fluidoterapia por 8 horas en el postoperatorio con suero fisiológico y suero glucosado a 10%. Se controla el volumen infundido conforme la PVC y volumen de diuresis. Finalmente, se deposita el animal en las cestas que se han acondicionado en las jaulas del animalario.

## 5.7- PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO

### 5.7.1- Donante

Tras la preparación del campo operatorio con solución de povidona yodada y entallado, se practica una incisión laterocervical derecha, con disección y canalización de la vena yugular externa, para infusión de líquidos, medicación anestésica y monitorización de la PVC. Se disecciona la arteria carótida común derecha para verificar la presión arterial continua.

Por medio de laparotomía xifopúbica, se explora la cavidad para descartar posibles anomalías. Se aborda la aorta por encima de la bifurcación ilíaca, rodeándola con una cinta. A continuación se anatomiza la vena cava inferior infrahepática (VCIH), reconociendo ambas venas renales. Se disecciona la vena renal izquierda y la arteria mesentérica superior, poniendo una ligadura 0 como reparo. Se secciona el peritoneo del hilio hepático reconociendo la vía biliar principal que se secciona y liga distalmente. Se identifican las ramas arteriales hepáticas, seccionando el epiplón menor, accediendo a la transcavidad de los epiplones. Se identifica la arteria coronaria y gastroduodenal, que son seccionadas entre ligaduras. Se identifica la arteria hepática común, prosiguiendo la disección hasta el tronco celíaco. Se anatomiza la vena porta, que es disecada hasta la confluencia con la vena esplénica. En este momento, se prosigue la disección de la arteria hepática, ligando las pequeñas colaterales. Se identifica la arteria esplénica, que es seccionada entre ligaduras. Se visualiza la aorta abdominal supracelíaca por medio de la sección del tabique entre los pilares diafragmáticos. Se secciona el diafragma subxifoideo para acceder al tórax, anatomizando la aorta descendente que se rodea con una cinta. Se identifica el tronco celíaco en su inserción aórtica. A continuación se

seccionan los ligamentos coronarios y triangulares hepáticos así como la fina lámina conjuntiva retrohepática, anatomizando las venas suprahepáticas. Se abre la vesícula biliar para dar salida a su contenido y se lava con suero fisiológico. En este momento se hepariniza al animal y se insertan las cánulas en la aorta suprailíaca y en la porta. Se procede al clampaje de la aorta torácica, iniciando la perfusión y seccionando la vena cava inferior suprahepática (VCIS), que drena el injerto. Se liga la arteria mesentérica superior. Se secciona la vena porta en su bifurcación con la vena esplénica. Se inunda el campo con hielo picado y se observa la correcta perfusión del hígado, tomando precauciones para que no se torsione ningún segmento. Una vez perfundido el hígado (1 litro de solución de preservación de Wisconsin por aorta y 1 litro por vena porta), se secciona la aorta torácica, prosiguiendo su disección en sentido caudal hasta sobrepasar el tronco celíaco. En este punto, la aorta es seccionada nuevamente, obteniendo un patch aórtico. Se secciona la VCIH por encima de la vena renal izquierda. Se secciona el diafragma alrededor de la VCIS obteniendo un injerto, el cual es colocado en una batea con 1 litro de solución de preservación en una bolsa intestinal, envuelta por otra bolsa con 500ml suero fisiológico frío (0 a 4°C), sobre un lecho de hielo picado.

### CIRUGÍA DE BANCO

Se procede a la inspección del órgano, resecaando las porciones de diafragma adherida a la VCIS. Se recorta ésta a nivel de su inserción diafragmática, consiguiendo un calibre adecuado. Se identifica las venas diafragmáticas que son ligadas con seda 3-0. Se inspecciona la vena porta y se identifica la vena pancreática, una de las ramas portales, y se cateteriza con un abbocath para la administración de la PGE1 o placebo durante la fase de reperfusión hepática en el receptor. Se revisa el injerto arterial,

liberándolo de adherencias. Se comprueba la estanqueidad del sistema inyectando, con un Abbocath 16G, líquido de preservación a través del orificio aórtico. Se cierran las dos bolsas de aislamiento e introduce el injerto en una maleta isotérmica con hielo picado. Se lleva la maleta con el injerto a una cámara fría a 4°C, donde se mantiene almacenado durante 24 horas.

### **5.7.2- Receptor**

Tras la preparación del campo operatorio con solución de povidona yodada y entallado, la intervención comienza con una incisión cervical derecha anatomizando la vena yugular externa que es canalizada con un venocath 16 y la arteria carótida común derecha, que también es canalizada para registro de presión arterial. Se realiza una laparotomía xifo-umbilical, explorando la cavidad para descartar anomalías. Se anatomiza la VCIH por encima de la vena renal izquierda que es visualizada. Se aborda el hilio hepático identificando la vía biliar. Se secciona entre ligaduras el conducto cístico y el hepático común. Se prosigue la disección de la arteria hepática propia hasta llegar en la arteria gastroduodenal. En la secuencia se disecciona la arteria hepática izquierda encontrando la arteria coronaria que se secciona. Se anatomiza la vena porta hasta su confluencia con la vena esplénica. Se seccionan entre ligaduras las colaterales venosas pancreática y la vena coronaria. Se realiza la determinación de la hemodinámica general y de los flujos de la arteria hepática y vena porta en condiciones basales por medio del sistema CardioMed. En este momento, se saca una muestra de sangre arterial basal (10cc, Fase D1). A continuación se secciona los ligamentos suspensorios y la lámina retrohepática anatomizando las venas suprahepáticas. Se retira

el órgano de la nevera cogiendo la bolsa interior que contiene Wisconsin y se deposita en una batea, lo cual se realiza una biopsia hepática (1ª Biopsia - fase A) y se procede al lavado del injerto con 500 ml de Ringer Lactato a temperatura ambiente. Con el injerto preparado para el implante, se completa la hepatectomía en el receptor. Las ramas de la arteria hepática propia son ligadas próximas a la placa hiliar. Se procede al clampaje de la vena porta, vena cava infrahepática y vena cava suprahepática, seccionando los vasos y obteniendo la pieza de hepatectomía. Se inicia la anastomosis de la VCIS del injerto con las venas suprahepáticas del receptor, a través de una sutura continua con prolene 4-0. Finalizada esta, se realiza la anastomosis continua de la vena porta con prolene 6-0. Se clampa la VCIH del injerto y se desclaman la vena porta y la cava suprahepática reperfundiendo el hígado, finalizando la fase anhepática (entre 20-25 min). Al mismo tiempo, cuando se efectúa el desclampaje portal, se administra PGE1 (0,1ug/kg/min) o placebo por vía portal mediante el catéter colocado en cirugía de banco en el órgano del donante. Se obtiene una muestra de sangre (10cc) de las venas suprahepáticas (Muestra sanguínea – fase R1). Posteriormente, se anastomosa la vena cava infrahepática con sutura continua de Prolene 5-0 y se procede a su desclampaje. En seguida, se canaliza la vía biliar con un tutor para cuantificar la producción de bilis (ml/h) en un contenedor cerrado. A continuación, se confecciona la anastomosis arterial con sutura continua de prolene 7-0 entre el patch de la arteria esplénica con el tronco celíaco (injerto), con el patch de la arterial gastroduodenal con la arteria hepática propia del receptor. Una vez finalizada la anastomosis se retira el clamp, obteniendo la revascularización arterial. En esta fase (Fase R1), se miden los flujos arterial y portal juntamente con una hemodinámica general. Se mantiene la laparotomía abierta hasta que termine el período de 90 minutos tras la reperusión portal, que corresponde el término de la fase R1 y inicio de la fase R2, momento en el cual se realizan:

- Determinación de la hemodinámica general y flujos portal y arterial;
- Obtención de muestra de sangre arterial (10cc);
- Una biopsia hepática (2ª biopsia Hepática – Fase R2);
- Cuantificación de la producción de bilis (ml/h).

Finalmente, se revisa la hemostasia y cierre de la laparotomía, procediendo a la reanimación del animal, corrigiendo desequilibrios ácidos-básicos, electrolíticos, glucemia y control hemodinámico.

Tras las 5 horas de reperfusión portal (Fase R5), se saca una muestra sanguínea arterial (10cc). Con el control clínico del animal, cuando es posible, se procede a su estabulación controlada hasta el día siguiente, en el que se inspecciona la cavidad abdominal y se realizan: el estudio hemodinámico, la cuantificación de bilis (en ml/h) entre las fases R2 – R24, obtención de una muestra sanguínea arterial y una biopsia hepática. Si en la evolución del postoperatorio el animal muere antes de completar las 24h tras la reperfusión del injerto, se obtiene una biopsia hepática y se mide la cantidad de bilis producida entre la fase R2 hasta el fallecimiento. Los experimentos serán realizados por orden aleatorio con el fin de evitar sesgos atribuibles a curvas de aprendizaje.

## **5.8- Metodología estadística**

El análisis estadístico se ha realizado mediante el paquete estadístico SAS V8(2). Los valores P inferiores a 0,05 han sido considerados significativos.

Se han estudiado las variables cuantitativas a través de pruebas no paramétricas dado el número escaso de la muestra. Así, para la comparación de dos grupos independientes se ha utilizado el test de Wilcoxon-Mann-Whitney, mientras que para la comparación de datos dependientes (por ejemplo, dentro de un mismo grupo) se ha utilizado el test de Wilcoxon para medidas repetidas.

# RESULTADOS

---

## Resultados

### 6.1- Características de la población de estudio

En relación a la población del estudio, para el desarrollo de los experimentos, fueron escogidos tanto para el donante como para el receptor, hembras sanas de 30-35 Kg, estabuladas en condiciones controladas, de una mezcla entre las razas Largewhitex y Landrace.

Entre el mes de abril/2003 a finales de diciembre/2003, hemos completado 27 experimentos, totalizando 54 cerdos. Los primeros 3 trasplantes se destinaron a poner a punto la técnica quirúrgica y anestésica (curva de aprendizaje). Los experimentos que presentaron complicaciones fueron desechados, para que no hubiera alguna influencia en los resultados. Se excluyeron 6 experimentos, 1 por fallo anestésico y otros 5 por complicaciones técnicas (quirúrgicas).

Resumiendo, totalizaron 18 trasplantes hepáticos porcinos válidos ( $n = 18$ ). Se administró PGE1 por vía portal en la fase de revascularización hepática en 7 experimentos (Grupo B). En otros 7 animales, se puso suero fisiológico por vía portal (Grupo A), y en 4 experimentos, el trasplante hepático fue hecho con tiempo de isquemia fría de apenas 3 horas, sin uso de medicación por vía portal (Grupo control).

<b>Grupos</b>	<b>N</b>	<b>Uso de PGE1</b>	<b>Tiempo de Isquemia Fría</b>
Grupo A	N = 7	Sin uso de PGE1	24 Horas
Grupo B	N = 7	Con uso de PGE1	24 Horas
Grupo Control	N = 4	Sin uso de PGE1	3 horas

## 6.2- Características de los grupos

En relación al procedimiento quirúrgico, no se evidenciaron complicaciones quirúrgicas o anestésicas en los experimentos considerados válidos. La técnica de extracción del injerto e implante del hígado fue la misma en todos los experimentos. Salvo que, en los tres primeros experimentos (n = 3), en el receptor, la anastomosis biliar se hizo con una asa yeyunal, y en los demás (n = 15), se puso un tutor en la vía biliar conectado a un colector para medir la producción de bilis en las fases peroperatoria y postoperatoria.

Analizando el tiempo de intervención quirúrgica y el tiempo de fase anhepática en el receptor, no se observaron diferencias significativas entre los grupos (Tablas 6.1 y 6.2).

## CARACTERÍSTICAS DE LA INTERVENCIÓN QUIRÚRGICA

Grupo	N	Media	DE
<b>Grupo Control</b>			
TIEMPO DE INT. INTERVENCIÓN (min)	4	<b>210.75</b>	11.62
TIEMPO DE FASE ANHEPÁTICA (min)	4	<b>23.00</b>	2.16
<b>Grupo A – Sin PGE1</b>			
TIEMPO DE INT. INTERVENCIÓN (min)	7	<b>216.43</b>	18.86
TIEMPO DE FASE ANHEPÁTICA (min)	7	<b>24.43</b>	3.15
<b>Grupo B – Con PGE1</b>			
TIEMPO DE INT. INTERVENCIÓN (min)	7	<b>219.00</b>	10.63
TIEMPO DE FASE ANHEPÁTICA (min)	7	<b>26.29</b>	3.77

**Tabla 6.1-** Estadísticos descriptivos de las características quirúrgica de los grupos control A y B.

Grupo	N	Media	DE	P-valor
TIEMPO DE INT. QUIRÚRGICA (Minutos)	7	<b>216.43</b>	18.86	0.6515
<b>Grupo A - Sin PGE1</b>	7	<b>219.00</b>	10.63	
<b>Grupo B - Con PGE1</b>				
TIEMPO DE FASE ANHEPÁTICA (Minutos)	7	<b>24.43</b>	3.15	0.3358
<b>Grupo A - Sin PGE1</b>	7	<b>26.29</b>	3.77	
<b>Grupo B - Con PGE1</b>				

**Tabla 6.2 -** Comparación de las características de la intervención quirúrgica entre los grupos A y B.

\*P-valor del test no paramétrico de Wilcoxon-Mann-Whitney.

Con respecto a los injertos, todos estos, en los grupos A y B, se mantuvieron almacenados en cámara fría, debidamente crio-preservados alrededor de 24 horas. En cambio, en el grupo control el tiempo de isquemia fría fue sólo de 3 horas. Las biopsias obtenidas en la fase A, momentos antes de la reperfusión, se mostraron prácticamente con el mismo grado de lesión de preservación en los grupos A y B, siendo que, en el grupo control se evidenció un menor grado de lesión (Tablas 6.3 y 6.4).

### CARACTERÍSTICAS DEL INJERTO

Grupo	N	Media	DE
<b>Grupo - Control</b>			
TIEMPO DE ISQUEMIA FRÍA(horas)	4	<b>2.94</b>	0.31
BIOPSIA HEPÁTICA FASE A	4	<b>1.25</b>	0.50
<b>Grupo A - Sin PGE1</b>			
TIEMPO DE ISQUEMIA FRÍA(horas)	7	<b>23.92</b>	0.19
BIOPSIA HEPÁTICA FASE A	7	<b>3.71</b>	2.21
<b>Grupo B - Con PGE1</b>			
TIEMPO DE ISQUEMIA FRÍA(horas)	7	<b>24.01</b>	0.55
BIOPSIA HEPÁTICA FASE A	7	<b>3.86</b>	1.35

**Tabla 6.3** - Estadísticos descriptivos de las características del injerto.

Grupo	N	Media	DE	P-valor*
TIEMPO DE ISQUEMIA FRÍA		<b>Horas</b>		
Grupo A - <b>Sin PGE1</b>	7	<b>23.92</b>	0.19	0.7235
Grupo B - <b>Con PGE1</b>	7	<b>24.01</b>	0.55	
BIOPSIA HEPÁTICA FASE A				
Grupo A - <b>Sin PGE1</b>	7	<b>3.71</b>	2.21	0.8953
Grupo B - <b>Con PGE1</b>	7	<b>3.86</b>	1.35	

**Tabla 6.4** - Comparación de las características del injerto entre los grupos A y B.

Por medio de la muestra sanguínea extraída en la fase D1, que corresponde el término de la disección del hilio hepático, por no haber efecto de la medicación (PGE1) en estudio o otras variantes, se pudo evidenciar la igualdad entre los grupos, comparando las medias de (Bilirrubina Total, AST, ALT, FA, GGT, LDH, Ácido Hialurónico, B-galactosidasa, Factor V y TTP) (Tablas 6.5, 6.6, 6.7 y 6.8).

#### ANALÍTICAS DE LOS GRUPOS CONTROL, A y B – (FASE D1)

Grupo Control	N	Media	DE
BILIRRUBINA TOTAL D1	4	<b>0.27</b>	0.09
AST D1	4	<b>52.75</b>	17.29
ALT D1	4	<b>30.50</b>	6.35
FOSFATASA ALCALINA D1	4	<b>121.50</b>	25.72
GGT D1	4	<b>85.75</b>	58.39
LDH D1	4	<b>1085.25</b>	233.95
AC. HIALURÓNICO D1	4	<b>160.25</b>	95.77
B-GALACTOSIDADA D1	4	<b>1.40</b>	0.59
TIEMPO DE PROTROMBINA D1	4	<b>154.50</b>	7.94
FACTOR V D1	4	<b>634.75</b>	90.25

**Tabla 6.5** – Estudio descriptivo de la analítica del grupo control (Fase D1).

<b>Grupo A - Sin PGE1</b>	<b>N</b>	<b>Media</b>	<b>DE</b>
BILIRRUBINA TOTAL D1	7	<b>0.31</b>	0.09
AST D1	7	<b>57.00</b>	8.10
ALT D1	7	<b>34.00</b>	12.08
FOSFATASA ALCALINA D1	7	<b>126.14</b>	22.84
GGT D1	7	<b>46.57</b>	12.99
LDH D1	7	<b>1135.86</b>	157.82
AC.HIALURÓNICO D1	7	<b>269.71</b>	130.10
B-GALACTOSIDADA D1	7	<b>1.96</b>	1.25
TIEMPO DE PROTROMBINA D1	7	<b>173.86</b>	17.63
FACTOR V D1	7	<b>654.14</b>	96.87

**Tabla 6.6** - Estudio descriptivo de la analítica del grupo A - sin PGE1 (Fase D1).

<b>Grupo B – Con PGE1</b>	<b>N</b>	<b>Media</b>	<b>DE</b>
BILIRRUBINA TOTAL D1	7	<b>0.26</b>	0.04
AST D1	7	<b>50.14</b>	13.86
ALT D1	7	<b>35.14</b>	9.01
FOSFATASA ALCALINA D1	7	<b>126.71</b>	44.48
GGT D1	7	<b>40.00</b>	11.08
LDH D1	7	<b>1036.71</b>	139.06
AC.HIALURÓNICO D1	7	<b>171.57</b>	142.02
B-GALACTOSIDADA D1	7	<b>1.49</b>	0.92
TIEMPO DE PROTROMBINA D1	7	<b>171.29</b>	19.12
FACTOR V D1	7	<b>718.29</b>	125.85

**Tabla 6.7** - Estudio descriptivo de la analítica del grupo B - con PGE1 (Fase D1).

Grupo	N	Media	DE	P-valor*
<b>BILIRRUBINA TOTAL D1</b>				
<b>Sin PGE1</b>	7	<b>0.31</b>	0.09	0.1215
<b>Con PGE1</b>	7	<b>0.26</b>	0.04	
<b>AST D1</b>				
<b>Sin PGE1</b>	7	<b>57.00</b>	8.10	0.0835
<b>Con PGE1</b>	7	<b>50.14</b>	13.86	
<b>ALT D1</b>				
<b>Sin PGE1</b>	7	<b>34.00</b>	12.08	0.7981
<b>Con PGE1</b>	7	<b>35.14</b>	9.01	
<b>FOSFATASA ALCALINA D1</b>				
<b>Sin PGE1</b>	7	<b>126.14</b>	22.84	0.8983
<b>Con PGE1</b>	7	<b>126.71</b>	44.48	
<b>GGT D1</b>				
<b>Sin PGE1</b>	7	<b>46.57</b>	12.99	0.3363
<b>Con PGE1</b>	7	<b>40.00</b>	11.08	
<b>LDH D1</b>				
<b>Sin PGE1</b>	7	<b>1135.86</b>	157.82	0.1599
<b>Con PGE1</b>	7	<b>1036.71</b>	139.06	
<b>AC.HIALURÓNICO D1</b>				
<b>Sin PGE1</b>	7	<b>269.71</b>	130.10	0.2013
<b>Con PGE1</b>	7	<b>171.57</b>	142.02	
<b>B-GALACTOSIDADA D1</b>				
<b>Sin PGE1</b>	7	<b>1.96</b>	1.25	0.2217
<b>Con PGE1</b>	7	<b>1.49</b>	0.92	
<b>TIEMPO DE PROTROMBINA D1</b>				
<b>Sin PGE1</b>	7	<b>173.86</b>	17.63	0.6529
<b>Con PGE1</b>	7	<b>171.29</b>	19.12	
<b>FACTOR V D1</b>				
<b>Sin PGE1</b>	7	<b>654.14</b>	96.87	0.4057
<b>Con PGE1</b>	7	<b>718.29</b>	125.85	

**Tabla 6.8** – Comparación de la analítica basal (Fase D1) entre los grupos control, A y B.

\*P-valor del test no paramétrico de Wilcoxon-Mann-Whitney.

Con respecto a la muestra sanguínea obtenida en la fase R1, que corresponde el momento en que empieza la administración de PGE1 por vía portal en la reperfusión hepática del injerto, comparando las medias de (Bilirrubina Total, AST, ALT, FA, GGT, LDH, Ácido Hialurónico, B-galactosidasa, Factor V y TTP) se demuestra que los grupo A y B presentan una similitud referente a los marcadores sanguíneos de lesión y función hepática. No obstante, el grupo control presentó una menor alteración analítica en este primer momento de la reperfusión hepática (Fase R1) (Tablas 6.9 y 6.10).

#### ANALÍTICAS DE LOS GRUPOS CONTROL, A y B – (FASE R1)

Variable	Grupo	Fase R1			
		N	Media	DE	P-valor*
Bilirrubina Total	Control	4	<b>0.37</b>	0.12	N.S. 0.293
	Grupo A	7	<b>0.32</b>	0.05	
	Grupo B	7	<b>0.24</b>	0.04	
Fosfatase Alcalina	Control	4	<b>164.00</b>	67.72	N.S. 0.8478
	Grupo A	7	<b>191.43</b>	63.57	
	Grupo B	7	<b>183.71</b>	42.59	
GGT	Control	4	<b>80.50</b>	46.15	N.S. 0.6093
	Grupo A	7	<b>114.29</b>	46.55	
	Grupo B	7	<b>102.86</b>	29.88	
AST	Control	4	<b>137.25</b>	55.41	N.S. 0.7983
	Grupo A	7	<b>234.29</b>	98.16	
	Grupo B	7	<b>258.86</b>	78.12	
ALT	Control	4	<b>29.00</b>	6.48	N.S. 1.0000
	Grupo A	7	<b>47.29</b>	3.59	
	Grupo B	7	<b>49.00</b>	8.72	

**Tabla 6.9** - Comparación de los niveles de (Bilirrubina total, Fosfatasa Alcalina, GGT, AST y ALT) en la Fase R1 entre los grupos control, A y B.

\*P-valor del test no paramétrico de Wilcoxon-Mann-Whitney

Variable	Grupo	Fase R1			
		N	Media	DE	P-valor*
LDH	Control	4	<b>1163.00</b>	208.87	
	Grupo A	7	<b>1413.71</b>	179.16	N.S.
	Grupo B	7	<b>1432.14</b>	245.26	1.0000
AC. Hialurónico	Control	4	<b>748.75</b>	67.03	
	Grupo A	7	<b>1151.57</b>	430.52	N.S.
	Grupo B	7	<b>1259.14</b>	634.57	0.7015
B- Galactosidasa	Control	4	<b>3.73</b>	1.67	
	Grupo A	7	<b>11.17</b>	5.48	N.S.
	Grupo B	7	<b>11.59</b>	2.25	0.8983
Tiempo de Protrombina	Control	4	<b>94.80</b>	27.79	
	Grupo A	7	<b>86.06</b>	11.35	N.S.
	Grupo B	7	<b>84.81</b>	17.87	0.6544
Factor V	Control	4	<b>379.50</b>	147.87	
	Grupo A	7	<b>288.14</b>	137.22	N.S.
	Grupo B	7	<b>233.86</b>	84.08	0.3711

**Tabla 6.10** – Comparación de las analíticas (LDH, Ac. Hialurónico, B-Galactosidasa, Tiempo de Protombina y Factor V) de la Fase R1 entre los grupos control, A y B.

\*P-valor del test no paramétrico de Wilcoxon-Mann-Whitney

Resumiendo, analizando las características de la intervención quirúrgica, la condición del hígado momentos antes de la reperfusión (Fase A) y las analíticas sanguíneas (Fases D1 y R1) hasta el momento de la aplicación de la variable del estudio (PGE1 por vía portal), se verificó que los grupos A y B son semejantes en estos aspectos, siendo así coherente las comparaciones en las fases subsiguientes.

### 6.3- Análisis de la LIR

#### A)- MARCADORES DE LESIÓN HEPATOCELULAR

##### - AST y ALT:

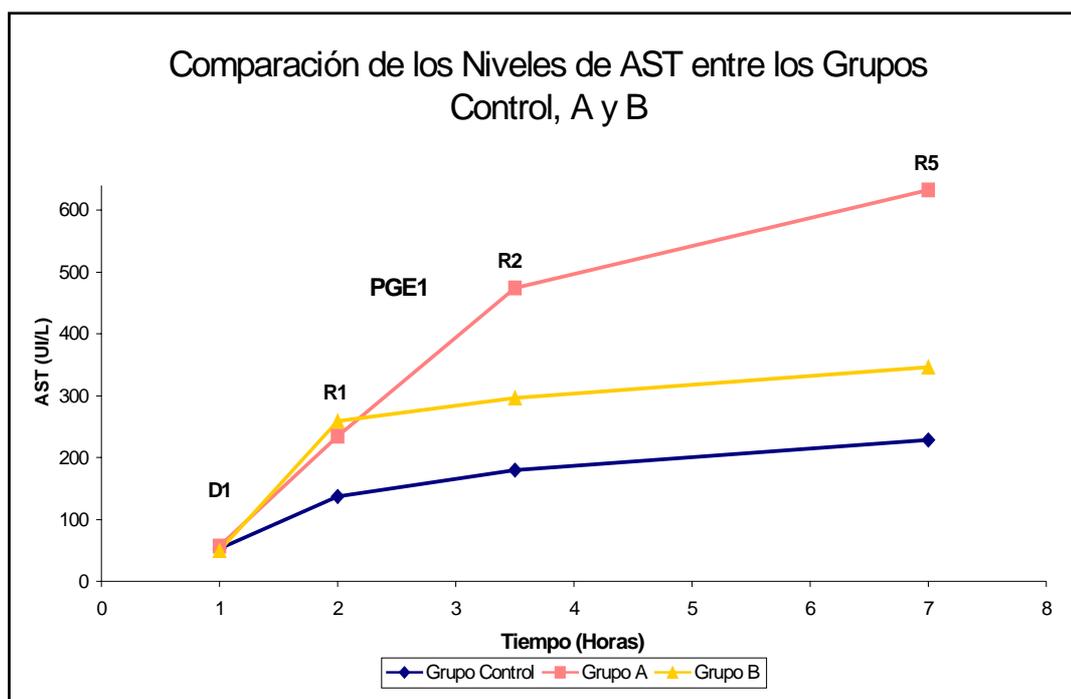
Los valores de transaminasas en la analítica basal (Fase D1) se mostraron muy similares en los 3 grupos en estudio.

Analizando los niveles de AST y ALT en la fase de reperfusión hepática (Fase R1), tanto en el grupo A como en el grupo B se evidenció el mismo grado de lesión hepatocelular. No obstante, en el intervalo de las fases R1 a R2, momento en el cual se utilizó la PGE1, el grupo B evolucionó con menores cifras de AST y ALT en comparación con el grupo A que no utilizó la medicación.

Con el término de la administración de PGE1 en la fase R2, comparando los grupos A y B, en el período R5 el grupo B presentó menores cifras de transaminasas (ALT y AST). El incremento de R2 a R5 fue menor en el grupo B para el marcador AST, sin embargo para la ALT el incremento fue similar entre los grupos A y B (Fig. 1 y 2).

Las diferencias se mostraron significativas tanto para AST como para ALT en el intervalo de R1 a R2 (AST - P: 0.0016, ALT - P: 0.0149). En relación al periodo de R2 a R5, la diferencia fue significativa para la AST (P: 0,0269) y no significativa para la ALT (P: 0,5).

El Grupo control, en todas las fases tras la reperfusión hepática, presentó menores niveles de transaminasas (AST y ALT) (Gráficos 6.1, 6.2 y Tablas 6.11 - 6.14).



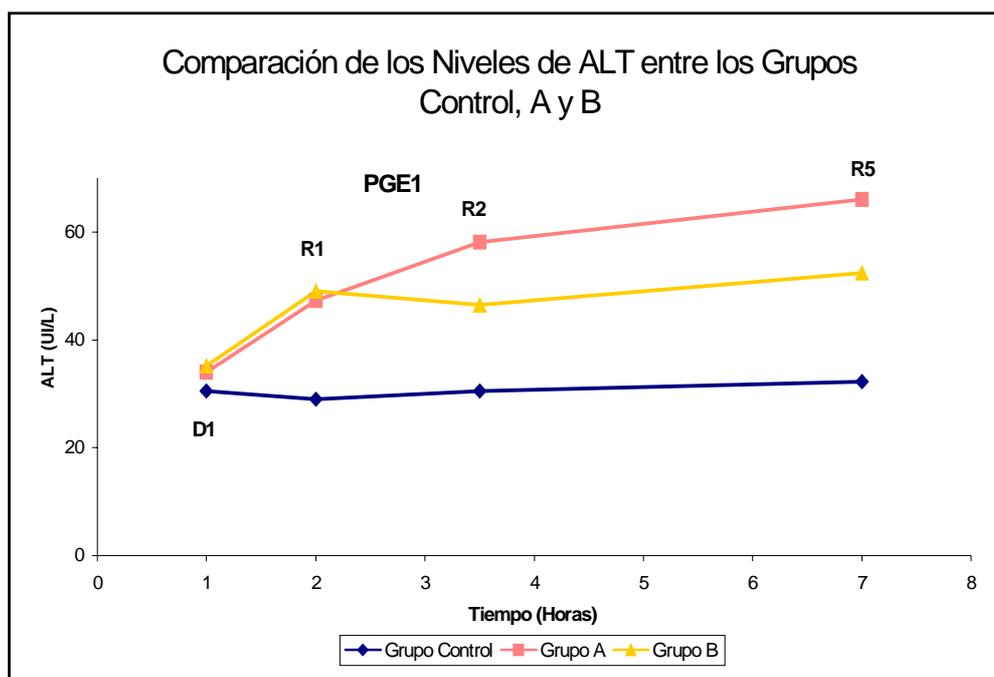
**Gráfico 6.1** - Comparación de los niveles de AST entre los Grupos Control, A y B.

Variable	Grupo	R1			R2			R5			R24		
		N	Media	DE	N	Media	DE	N	Media	DE	N	Media	DE
AST	Control	4	137.25	55.4	4	180.25	53.5	4	229.00	69.4	4	835.5	91.3
	Grupo A	7	234.29	98.1	7	474.14	188	6	632.50	255	0	-	-
	Grupo B	7	258.86	78.1	7	296.86	96.7	7	346.29	55.9	0	-	-

**Tabla 6.11** - Medias de los niveles de AST de los Grupos Control, A y B en las fases R1, R2, R5 y R24.

AST	Grupo	N	Incremento (Media)	P-valor
Intervalo R1 – R2	Grupo A	7	239.86	<b>0.0016</b>
	Grupo B	7	38.00	
Intervalo R2 – R5	Grupo A	7	158.36	<b>0.0269</b>
	Grupo B	7	49.43	
Intervalo R1 – R5	Grupo A	7	398.22	<b>0.0041</b>
	Grupo B	7	87.43	

**Tabla 6.12** - Estudio estadístico para la AST.



**Gráfico 6.2** - Comparación de los niveles de ALT entre los Grupos Control, A y B.

Variable	Grupo	R1			R2			R5			R24		
		N	Media	DE	N	Media	DE	N	Media	DE	N	Media	DE
ALT	Control	4	<b>29.00</b>	6.48	4	<b>30.50</b>	3.11	4	<b>32.25</b>	5.19	4	<b>61</b>	9.89
	Grupo A	7	<b>47.29</b>	3.59	7	<b>58.14</b>	11.3	6	<b>66.00</b>	15.3	0	-	-
	Grupo B	7	<b>49.00</b>	8.72	7	<b>46.43</b>	7.93	7	<b>52.47</b>	12.1	0	-	-

**Tabla 6.13** – Medias de los niveles de ALT de los Grupos Control, A y B en las fases R1, R2, R5 y R24.

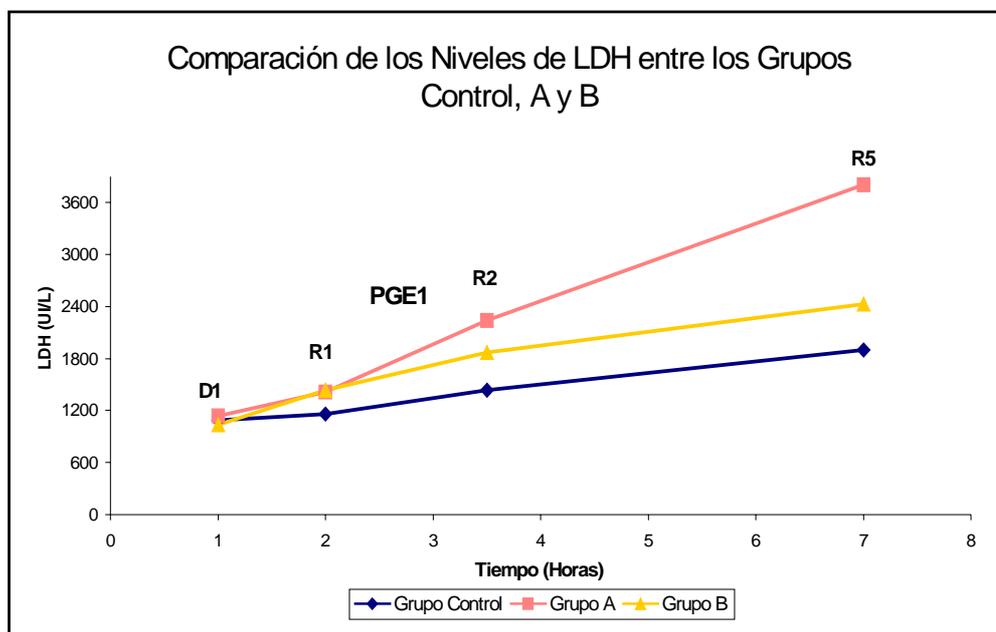
ALT	Grupo	N	Incremento (Media)	P-valor
<b>Intervalo R1 – R2</b>	Grupo A	7	10.86	<b><u>0.0149</u></b>
	Grupo B	7	-2.57	
<b>Intervalo R2 – R5</b>	Grupo A	7	7.86	<b>0.5000</b>
	Grupo B	7	6.04	
<b>Intervalo R1 – R5</b>	Grupo A	7	18.72	<b>0.1120</b>
	Grupo B	7	3.47	

**Tabla 6.14** - Estudio estadístico para la ALT.

**- LDH:**

Con respecto a la enzima LDH, se pudo evidenciar en los grupos A y B una semejanza de los niveles en el primer momento de la reperfusión del injerto (Fase R1). No en tanto, el grupo B evolucionó con niveles más bajos de LDH en las fases R2 y R5, mientras que, el grupo A desarrolló un mayor aumento de sus niveles en la evolución. No obstante, el análisis estadístico se mostró casi significativo en los intervalos de R1 a R2 ( $P = 0,0626$ ) y de R2 a R5 ( $P = 0,0668$ ).

El grupo control desarrolló menores cifras de LDH tanto en las fases iniciales de la reperfusión hepática como también en los tiempos subsiguientes (Gráfico 6.3, Tablas 6.15 y 6.16).



**Gráfico 6.3** - Comparación de los niveles de LDH entre los Grupos Control, A y B.

Variable	Grupo	R1			R2			R5			R24		
		N	Media	DE	N	Media	DE	N	Media	DE	N	Media	DE
LDH	Control	4	1163.0	208	4	1437.50	387	4	1902.2	680	4	3376.2	216
	Grupo A	7	1413.7	179	7	2237.29	321	6	3806.3	1236	0	-	-
	Grupo B	7	1432.1	245	7	1868.71	251	7	2428.4	507	0	-	-

**Tabla 6.15** - Medias de los niveles de LDH de los Grupos Control, A y B en las fases R1, R2, R5 y R24.

LDH	Grupo	N	Incremento (Media)	P-valor
Intervalo R1 – R2	Grupo A	7	823.59	0.0626
	Grupo B	7	436.57	
Intervalo R2 – R5	Grupo A	7	1569.01	0.0668
	Grupo B	7	559.71	
Intervalo R1 – R5	Grupo A	7	2392.6	0.0874
	Grupo B	7	996.28	

**Tabla 6.16** - Estudio estadístico para la LDH.

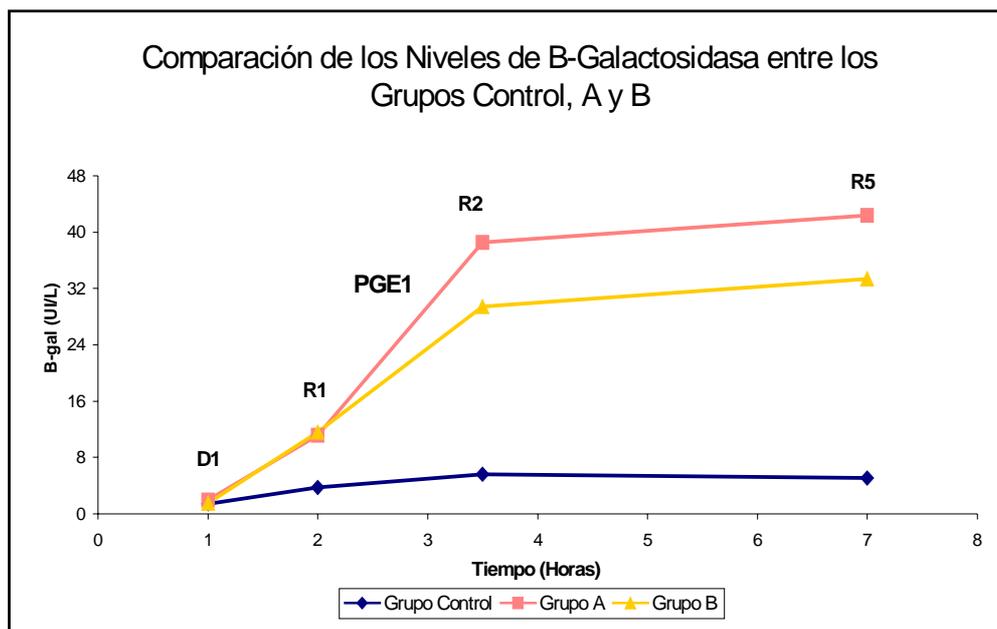
## B)- MARCADOR INFLAMATORIO EN LA LIR

### - B-Galactosidasa ( $\beta$ - Gal):

En relación a la enzima B-Galactosidasa analizada fotométricamente, se verificó en el período de R1-R2 una menor elevación de los niveles en el grupo con uso de la PGE1, siendo significativa la diferencia en el estudio estadístico ( $P = 0.0483$  – intervalo R1-R2).

En la subsiguiente fase R2-R5, momento en el cual no se administraba la medicación por vía portal, ambos grupos (A y B) presentaron el mismo incremento de los niveles de B-galactosidasa, siendo estadísticamente no significativo ( $P = 0,4152$  - intervalo R2-R5). No obstante, analizando el incremento desde la fase R1 hasta la R5, se observó que la menor elevación de los niveles de  $\beta$ -Gal desarrollada por el grupo B fue significativa en el estudio estadístico ( $P = 0,019$  - intervalo R1-R5).

El grupo control en todas las fases tras la reperfusión hepática exhibió valores de B-galactosidasa significativamente inferiores a los grupos A y B (Gráfico 6.4 y Tablas 6.17 y 6.18).



**Gráfico 6.4** - Comparación de los niveles de B-galactosidasa entre los Grupos Control, A y B.

Variable	Grupo	R1			R2			R5			R24		
		N	Media	DE	N	Media	DE	N	Media	DE	N	Media	DE
B-galactosidasa	Control	4	<b>3.73</b>	1.67	4	<b>5.63</b>	1.21	4	<b>5.10</b>	2.22	4	<b>1.4</b>	0.31
	Grupo A	7	<b>11.17</b>	5.48	7	<b>38.53</b>	6.08	6	<b>42.35</b>	8.20	0	-	-
	Grupo B	7	<b>11.59</b>	2.25	7	<b>29.43</b>	8.59	7	<b>33.39</b>	8.12	0	-	-

**Tabla 6.17** - Medias de los niveles de B-Galactosidasa de los Grupos Control, A y B en las fases R1, R2, R5 y R24.

B-Gal	Grupo	N	Incremento (Media)	P-valor
Intervalo R1 – R2	Grupo A	7	27.36	<b><u>0.0483</u></b>
	Grupo B	7	17.84	
Intervalo R2 – R5	Grupo A	7	3.82	<b>0.4152</b>
	Grupo B	7	3.96	
Intervalo R1 – R5	Grupo A	7	31.18	<b><u>0.0190</u></b>
	Grupo B	7	21.80	

**Tabla 6.18** - Estudio estadístico para la B-Gal.

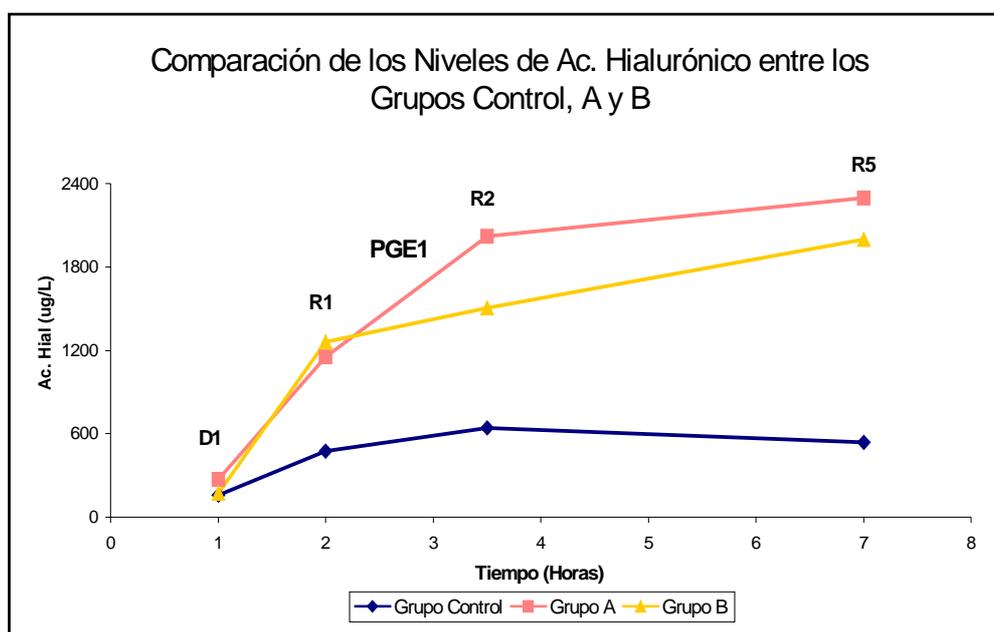
### C)- MARCADOR DE LESIÓN ENDOTELIAL

#### - **Ácido Hialurónico (Ac. Hial):**

Analizando el marcador endotelial, en el momento R1 no hubo diferencia en los valores de Ác. Hialurónico entre los grupo A y B. Sin embargo, en el intervalo de R1-R2 se evidenció en el grupo A una subida más acentuada de los niveles de (Ac. Hial) que en el grupo B. Esta diferencia alcanzó significación estadística ( $P = 0,0368$  - intervalo R1-R2).

En el período R2-R5, el incremento de los niveles de Ac. Hialurónico en los grupos A y B fueron prácticamente idénticos ( $P = 0,5$  - intervalo R2-R5).

Los niveles de Ac. Hial en el grupo control fueron menores, en comparación con los Grupos A y B, en todas las determinaciones sanguíneas tras la reperfusión del injerto (gráfico 6.5, Tablas 6.19 y 6.20).



**Gráfico 6.5** - Comparación de los niveles de Ac. hialurónico entre los Grupos Control, A y B.

Variable	Grupo	R1			R2			R5			R24		
		N	Media	DE	N	Media	DE	N	Media	DE	N	Media	DE
AC. Hial.	Control	4	<b>748.75</b>	67	4	<b>643.00</b>	192	4	<b>536.75</b>	85.4	4	<b>218.0</b>	79.7
	Grupo A	7	<b>1151.5</b>	430	7	<b>2018.4</b>	318	6	<b>2294.50</b>	317	0	-	-
	Grupo B	7	<b>1259.1</b>	634	7	<b>1505.8</b>	454	7	<b>1996.71</b>	282	0	-	-

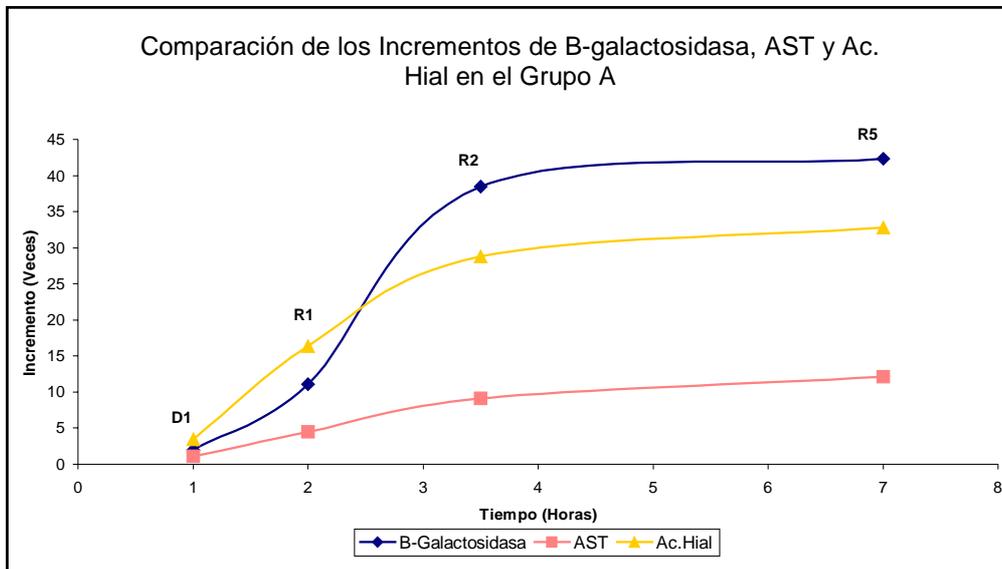
**Tabla 6.19** - Medias de los niveles de Ac. Hialurónico de los Grupos Control, A y B en las fases R1, R2, R5 y R24.

Ac. Hial	Grupo	N	Incremento (Media)	P-valor
<b>Intervalo R1 – R2</b>	Grupo A	7	866.9	<b><u>0.0368</u></b>
	Grupo B	7	246.71	
<b>Intervalo R2 – R5</b>	Grupo A	7	276.1	<b>0.5000</b>
	Grupo B	7	490.86	
<b>Intervalo R1 – R5</b>	Grupo A	7	1143.0	<b>0.0874</b>
	Grupo B	7	737.57	

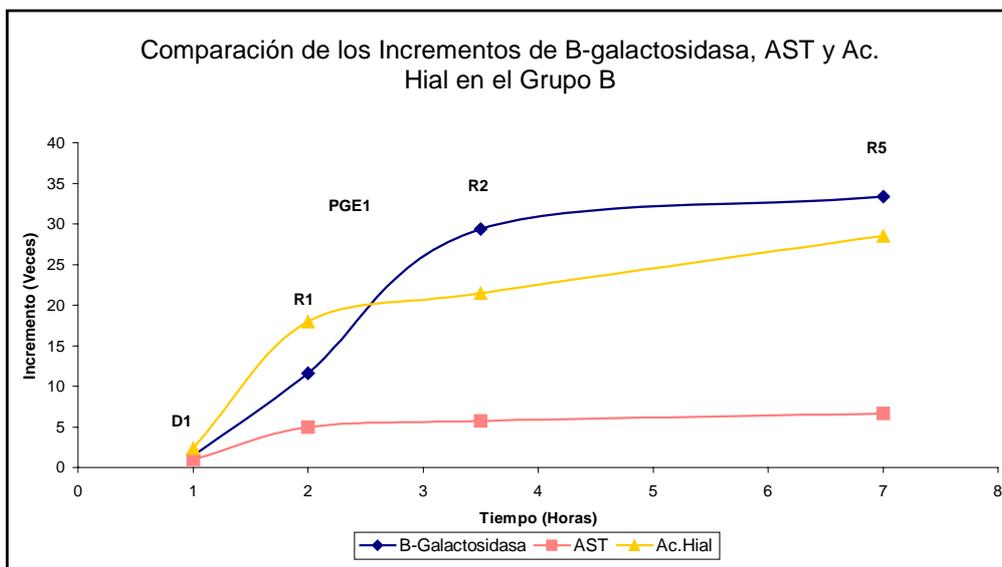
**Tabla 6.20** - Estudio estadístico para el Ac. Hial.

#### D)- CORRELACIÓN ENTRE LOS MARCADORES DE LA LIR

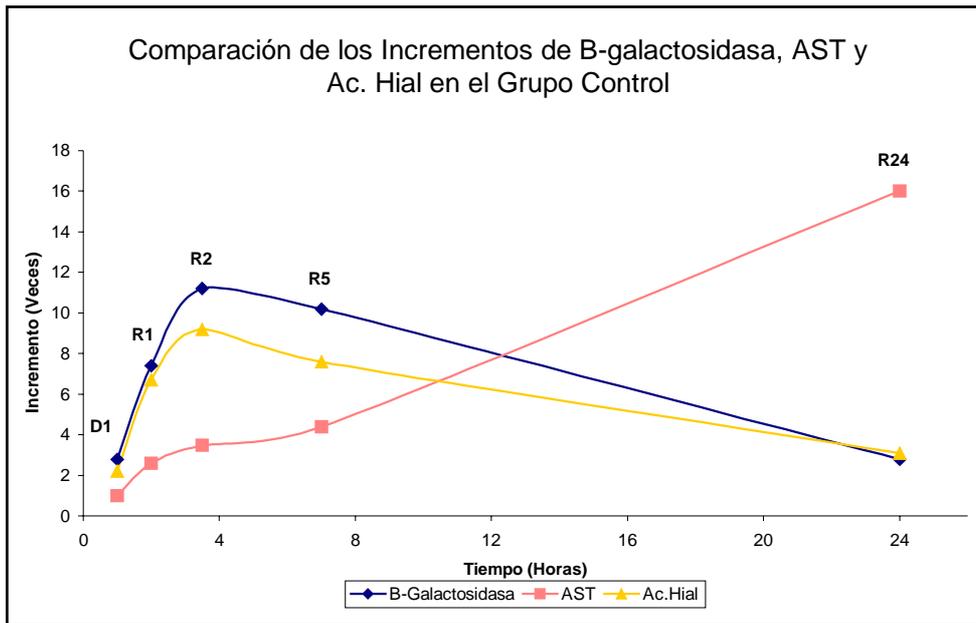
En todos los grupos (Control, A y B) se pudieron distinguir y determinar los períodos en que ocurrieron las lesiones endotelial sinusoidal y hepatocelular, mediante las determinaciones seriadas de los marcadores específicos de lesión. Inicialmente, durante las primeras 5 horas de la reperfusión del injerto, hubo una subida brusca del Ácido hialurónico (marcador de lesión endotelial sinusoidal) y de la Beta-Galactosidasa (marcador de activación neutrofílica en el endotelio), evidenciando el daño endotelial. En una segunda fase, tras el aumento de los marcadores de lesión y inflamación del endotelio sinusoidal, se constató la elevación de los marcadores de lesión hepatocelular, representada por la AST en los gráficos (6.6, 6.7 y 6.8). Debido al mayor grado de LIR en los grupos A y B, por el implante de hígados preservados durante 24 horas, se verificó un mayor incremento de todos los marcadores de lesión hepática en comparación con el grupo Control.



**Gráfico 6.6** - Comparación de los incrementos de B-galactosidasa, AST y Ac. Hialurónico en el grupo A.



**Gráfico 6.7** - Comparación de los incrementos de B-galactosidasa, AST y Ac. Hialurónico en el grupo B.



**Gráfico 6.8** - Comparación de los incrementos de B-galactosidasa, AST y Ac. Hialurónico en el grupo Control.

## 6.4- Parámetros de síntesis hepática

### - Tiempo de Protrombina (TP) y Factor V:

Las pruebas de función hepática en el momento de la reperfusión del injerto (Fase R1) se mostraron muy semejantes entre los grupos A y B.

Se observó una disminución brusca de los valores de TP y de Factor V en ambos grupos en la evolución R1-R2 y R2-R5. Sin embargo, el descenso de la función hepática fue más pronunciado en el grupo A. Las diferencias no alcanzaron significación estadística. Periodo de R1-R2: (TP – P = 0,1855; Factor V – P = 0,2615); Periodo de R2-R5: (TP – P = 0,2602; Factor V – P = 0,216).

En el grupo Control, la disminución del tiempo de protrombina y Factor V después de la reperfusión hepática fue menos acusada que en los Grupos A y B, presentando al día siguiente (Fase R24) cifras normales (Tablas 6.21 a 6.24).

Variable	Grupo	R1			R2			R5			R24		
		N	Media	DE	N	Media	DE	N	Media	DE	N	Media	DE
TP	Control	4	<b>94.80</b>	27.7	4	<b>68.38</b>	23.2	4	<b>77.48</b>	7.49	4	<b>89.0</b>	4.77
	Grupo A	7	<b>86.06</b>	11.3	7	<b>38.81</b>	4.06	6	<b>22.48</b>	3.58	0	-	-
	Grupo B	7	<b>84.81</b>	17.8	7	<b>43.03</b>	4.96	7	<b>28.07</b>	5.14	0	-	-

**Tabla 6.21** - Medias de los valores de Tiempo de Protrombina (TP) de los Grupos Control, A y B en las fases R1, R2, R5 y R24.

Variable	Grupo	R1			R2			R5			R24		
		N	Media	DE	N	Media	DE	N	Media	DE	N	Media	DE
Factor V	Control	4	<b>379.50</b>	147	4	<b>287.63</b>	136	4	<b>220.00</b>	121	4	<b>345.2</b>	23.4
	Grupo A	7	<b>288.14</b>	137	7	<b>70.06</b>	34.9	6	<b>33.35</b>	3.35	0	-	-
	Grupo B	7	<b>233.86</b>	84.0	7	<b>61.09</b>	19.4	7	<b>40.29</b>	3.76	0	-	-

**Tabla 6.22** - Medias de los valores de Factor V de los Grupos Control, A y B en las fases R1, R2, R5 y R24.

TP	Grupo	N	Incremento (Media)	P-valor
Intervalo R1 – R2	Grupo A	7	- 47.25	0.1855
	Grupo B	7	- 41.79	
Intervalo R2 – R5	Grupo A	7	- 16.33	0.2602
	Grupo B	7	- 14.94	
Intervalo R1 – R5	Grupo A	7	- 63.58	0.1766
	Grupo B	7	- 56.73	

**Tabla 6.23** - Estudio estadístico para el TP.

Factor V	Grupo	N	Incremento (Media)	P-valor
Intervalo R1 – R2	Grupo A	7	- 218.08	0.2615
	Grupo B	7	- 172.77	
Intervalo R2 – R5	Grupo A	7	- 36.71	0.2160
	Grupo B	7	- 20.80	
Intervalo R1 – R5	Grupo A	7	- 254.79	0.1123
	Grupo B	7	- 193.57	

**Tabla 6.24** - Estudio estadístico para el Factor V.

### - Producción de bilis:

La determinación de la producción de bilis fue un parámetro que se planteó en el transcurrir del estudio. Por lo tanto, en los tres primeros experimentos realizados (2 del grupo A y 1 del grupo B) no se realizaron la cuantificación de la producción de bilis.

En total este parámetro se verificó en 15 animales, siendo 5 experimentos grupo A, 6 del grupo B y 4 del grupo control.

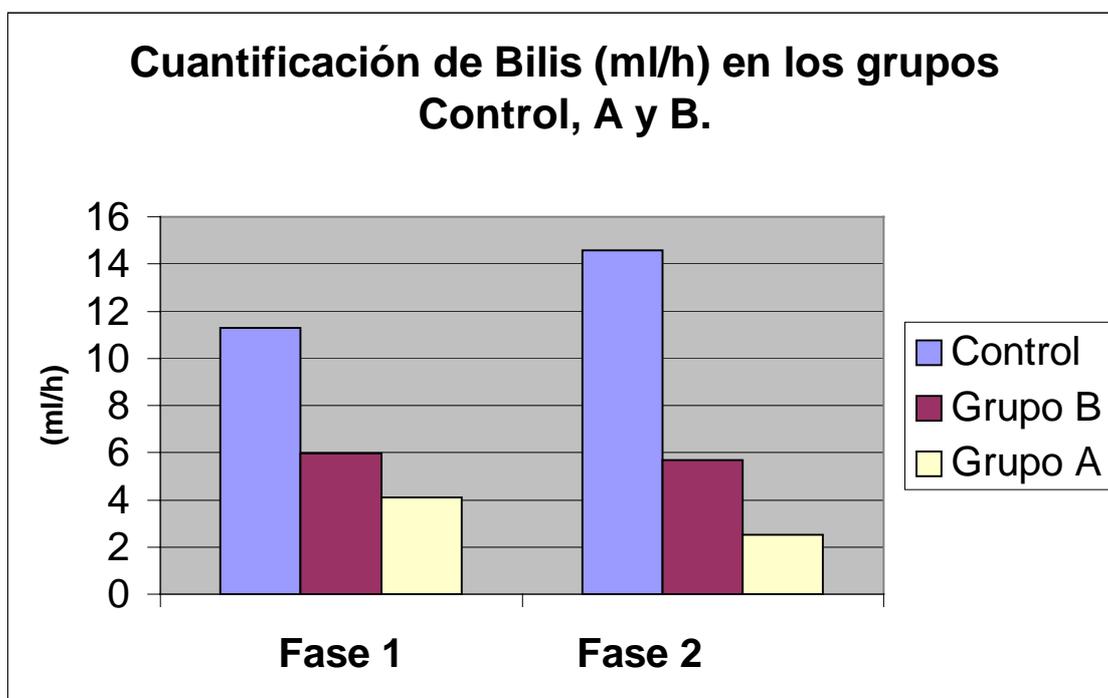
Se cuantificó la producción de bilis (ml/h) en dos períodos:

- **(Fase 1)** - Durante el momento en que se transfundía la prostaglandina E1, o sea entre las fases R1 a R2 (1hora y media de intervalo);

- **(Fase 2)** - Tras el término del tratamiento de la PGE1 por vía portal hasta el fallecimiento del animal o, en el caso del grupo control, hasta las 24horas del postoperatorio.

Analizando esta variante, en ambas fases de determinación se comprobó que el grupo control produjo una cantidad de bilis muy superior a los demás grupos en análisis (Gráfico 6.9 y Tabla 6.25).

Comparando los grupos A y B, bajo el efecto de la medicación (PGE1) sobre el hígado injertado, el grupo B presentó una mayor producción de bilis, tanto en la fase 1 como en la fase 2. La diferencia se mostró significativa en las 2 fases, (Fase 1 –  $P = 0,047$ ) y (Fase 2 –  $P = 0,032$ ).



**Gráfico 6.9** - Comparación de la producción de bilis (ml/h) entre los grupos control, A y B en las fases 1 y 2.

Variable	Grupo	Bilis Fase 1			Bilis Fase 2		
		N	Media	DE	N	Media	DE
<b>Producción de Bilis (ml/h)</b>	Control	4	<b>11.27</b>	0.82	4	<b>14.57</b>	1.22
	Grupo A	5	<b>4.16</b>	0.83	5	<b>2.52</b>	1.20
	Grupo B	6	<b>5.98</b>	1.83	6	<b>5.70</b>	3.39
<b>Estudio Estadístico entre (A y B)</b>		<b><u>0.047</u></b>			<b><u>0.032</u></b>		

**Tabla 6.25** - Medias correspondientes a la producción de bilis en las fases 1 y 2 de los Grupos Control, A y B.

## 6.5- Estudio histológico

### - Hematoxilina-eosina:

Para valorar el injerto implantado mediante la histología fue planteada la obtención de biopsias hepáticas en tres fases del experimento en el receptor:

- 1ª Biopsia - Momento antes de implantar el órgano;
- 2ª Biopsia - Tras el término del tratamiento con PGE1 (Fase R2);
- 3ª Biopsia - En el momento del fallecimiento del animal (Grupo A y B) o en las 24 horas del postoperatorio (Grupo Control).

Se cuantificó en cada biopsia el grado de lesión hepatocelular conforme una escala con diversos parámetros de lesión histopatológica graduados por puntos. Los parámetros incluidos fueron: vacuolización, dilatación sinusoidal, congestión sinusoidal, apoptosis, presencia de polimorfonucleares y necrosis.

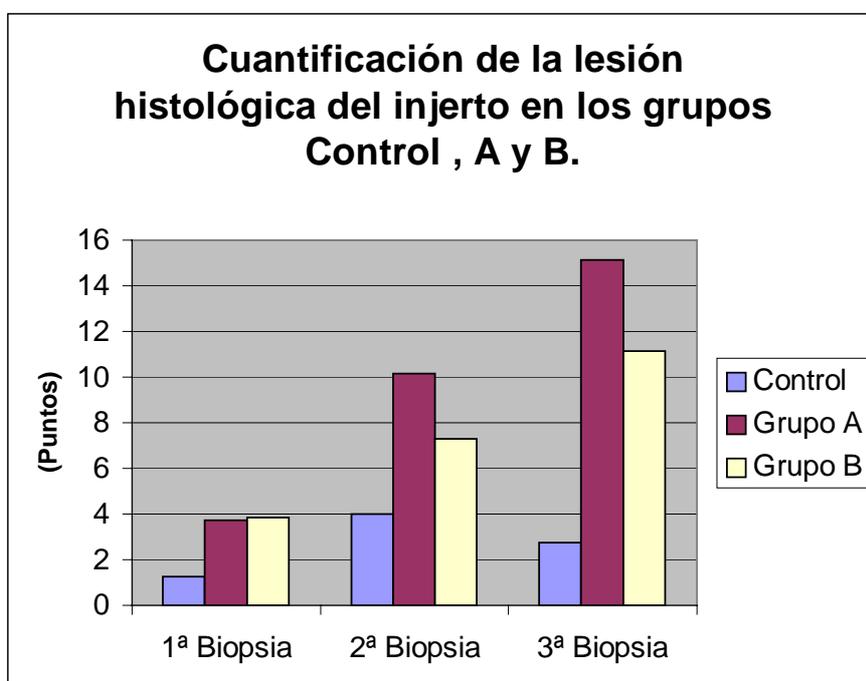
Parámetros	Graduación
Presencia de polimorfonucleares	0 a 3 puntos
Dilatación sinusoidal	0 a 3 puntos
Congestión sinusoidal	0 a 3 puntos
Vacuolización	0 a 3 puntos
Apoptosis	0 a 3 puntos
Necrosis	0, 5, 10 o 20 puntos

En la 1ª biopsia, tras 24 horas de isquemia fría, momentos antes de la reperusión del órgano, los grupos A y B presentaron el mismo grado de lesión hepatocelular.

Analizando la 2ª biopsia obtenida en la fase R2, el grupo B, con uso de PGE1, desarrolló un menor grado de lesión histológica, siendo significativa la diferencia en comparación al grupo A que no utilizó la medicación ( $P = 0,0335$ ).

Con respecto a la 3ª biopsia, también se evidenció un menor grado de lesión en el grupo B en comparación al grupo A. ( $P = 0,0315$ ).

El grado de lesión hepatocelular en el grupo control fue sustancialmente menor en las tres biopsias hepáticas en comparación con los grupos A y B (Gráfico 6.10 y Tabla 6.26).



**Gráfico 6.10** - Comparación del grado de lesión histológica del injerto entre los grupos control, A y B.

Variable	Grupo	1ª Biopsia			2ª Biopsia			3ª biopsia		
		N	Media	DE	N	Media	DE	N	Media	DE
Biopsia	Control	4	<b>1,25</b>	0,5	4	<b>4.00</b>	0.82	4	<b>2.75</b>	1.71
	Grupo A	7	<b>3,71</b>	2,21	7	<b>10.14</b>	3.13	7	<b>15.14</b>	3.53
	Grupo B	7	<b>3,86</b>	1.35	7	<b>7.29</b>	2.93	7	<b>11.14</b>	2.19
<b>Estudio Estadístico entre (A y B)</b>		<b>0.8953</b>			<b><u>0.0335</u></b>			<b><u>0.0315</u></b>		

**Tabla 6.26** – Medias correspondientes a la cuantificación de lesión histológica de los Grupos Control, A y B en la 1ª, 2ª y 3ª biopsia.

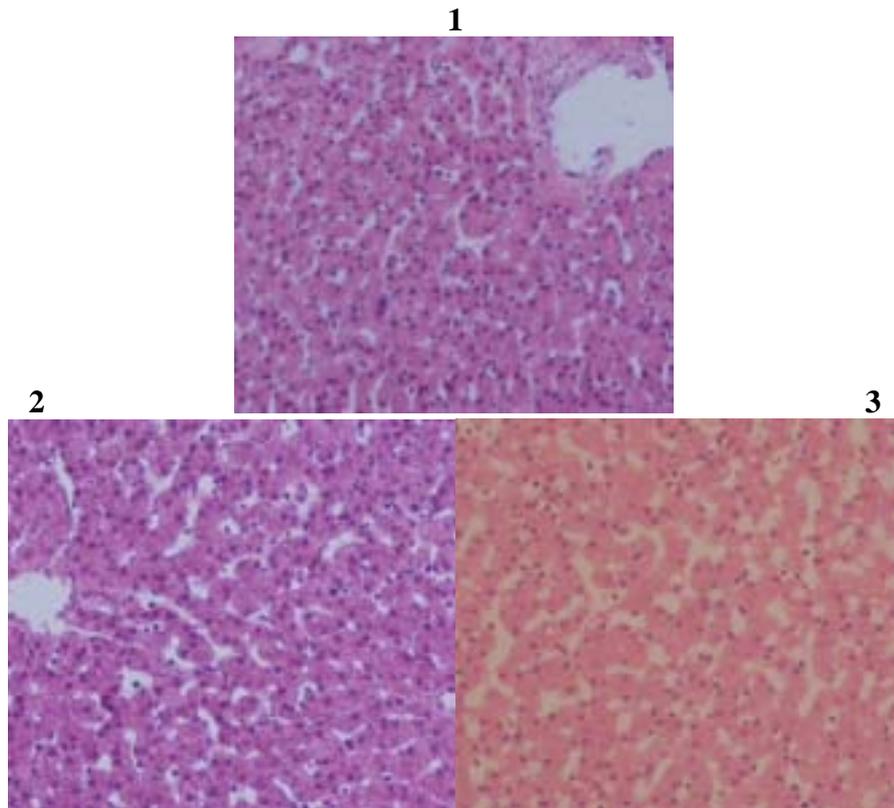
Examinando separadamente los parámetros establecidos para la cuantificación de lesión, la primera biopsia hepática realizada momentos antes de la reperfusión revelaba una leve a moderada congestión y dilatación sinusoidal en ambos grupos A y B. La biopsia obtenida a los 90 minutos de la reperfusión (2ª biopsia) reveló una menor presencia de polimorfonucleares, menor dilatación y congestión sinusoidal en el grupo que se administró la medicación. Sin embargo, estas diferencias no alcanzaron significación estadística. Con respecto a la biopsia sacada en el momento de la muerte del animal (3ª biopsia), se observó en el grupo tratado con PGE1 menos apoptosis, y necrosis hepatocelular, persistiendo la menor presencia de polimorfonucleares. El estudio estadístico se mostró significativo sólo para el menor grado de necrosis (Tablas 6.27 y 6.28 y Figuras 6.1, 6.2 y 6.3).

2ª BIOPSIA PARÁMETROS	GRUPO A (N=7)		Total	GRUPO B (N=7)		P
	n x (1), n x (2), n x (3)	Total		n x (1), n x (2), n x (3)	Total	
Polimorfonucleares	1 x (1), 3 x (2), 3 x (3)	16	3 x (1), 4 x (2)	11	NS	
Dilatación sinusoidal	1 x (1), 2 x (2), 4 x (3)	17	3 x (1), 2 x (2), 2 x (3)	13	NS	
Congestión sinusoidal	2 x (1), 3 x (2), 2 x (3)	14	4 x (1), 3 x (2)	10	NS	
Vacuolización	6 x (1), 1 x (2)	8	1 x (0), 5 x (1), 1 x (2)	7	NS	
Apoptosis	2 x (0), 4 x (1), 1 x (2)	6	2 x (0), 5 x (1)	5	NS	
Necrosis	5 x (0), 2 x (5)	10	6 x (0), 1 x (5)	5	NS	
<b>TOTAL (Puntos)</b>		<b>71</b>		<b>51</b>	<b>0,033</b>	

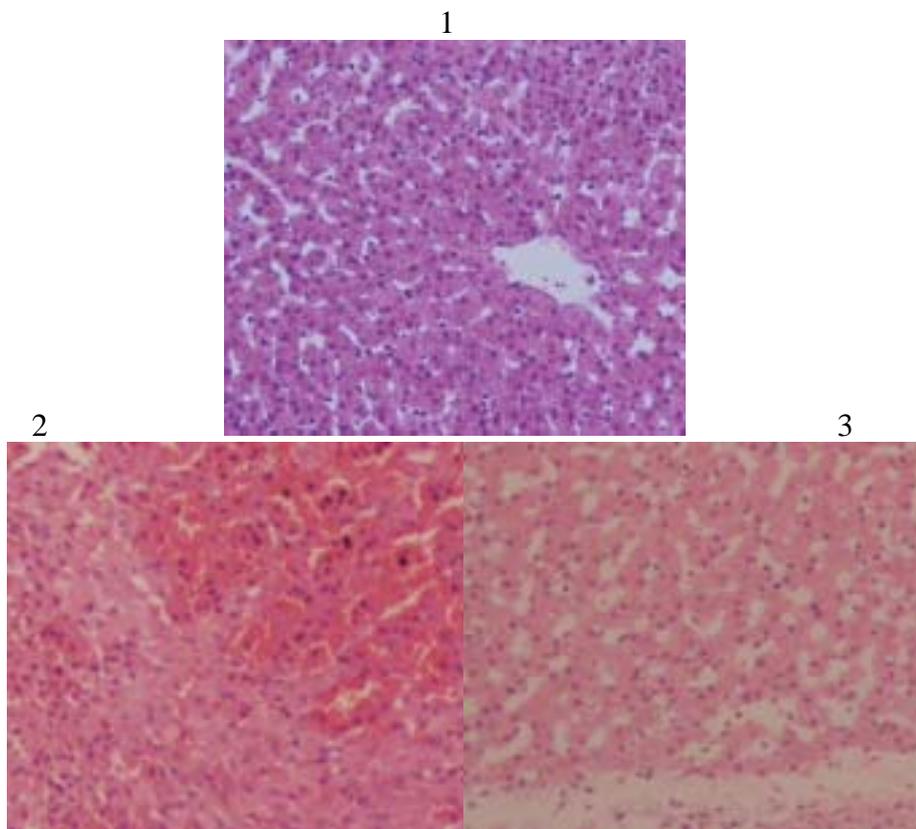
**Tabla 6.27-** Análisis comparativa de los parámetros de lesión histológica referente a la 2ª biopsia entre los grupos A y B.

3ª BIOPSIA PARÁMETROS	GRUPO A (N=7)		Total	GRUPO B (N=7)		P
	n x (1), n x (2), n x (3)	Total		n x (1), n x (2), n x (3)	Total	
Polimorfonucleares	4 x (2), 3 x (3)	17	2 x (1), 4 x (2), 1 x (3)	13	NS	
Dilatación sinusoidal	3 x (2), 4 x (3)	18	1 x (1), 3 x (2), 3 x (3)	16	NS	
Congestión sinusoidal	4 x (2), 3 x (3)	17	2 x (1), 2 x (2), 3 x (3)	15	NS	
Vacuolización	2 x (1), 3x (2), 2 x (3)	14	2 x (1), 4 x (2), 1 x (3)	13	NS	
Apoptosis	1 x (1), 4 x (2), 2 x (3)	15	3 x (1), 3 x (2), 1 x (3)	12	NS	
Necrosis	3 x (0), 3 x (5) 1(10)	25	5 x (0), 2 x (5)	10	0,046	
<b>TOTAL (Puntos)</b>		<b>106</b>		<b>79</b>	<b>0,031</b>	

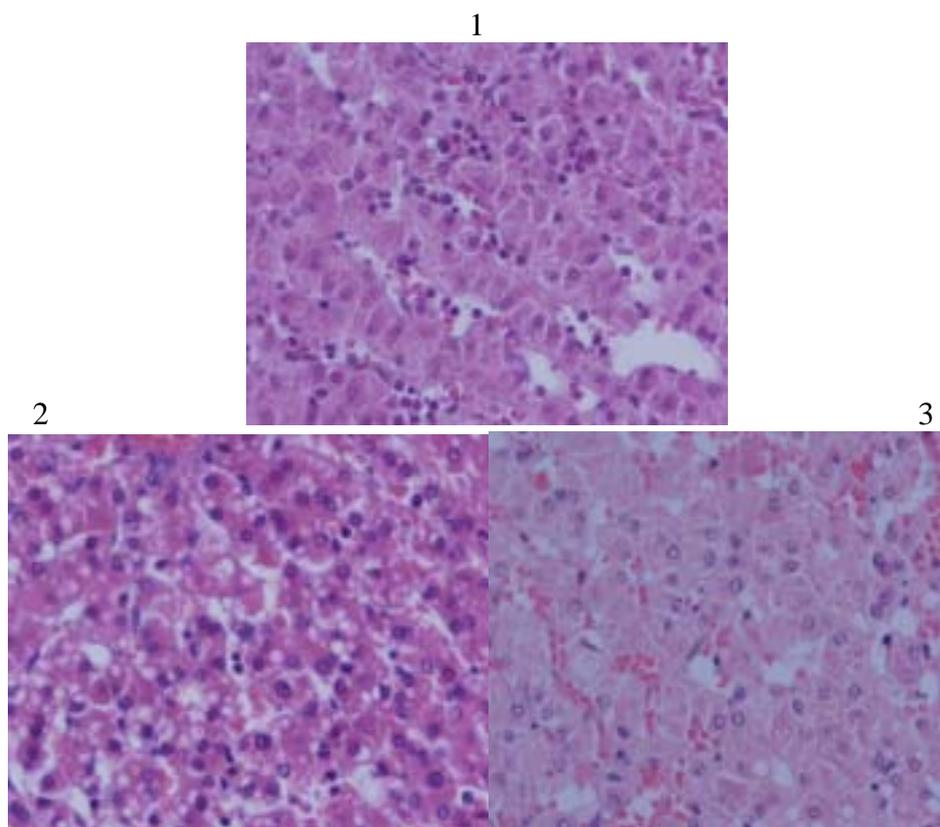
**Tabla 6.28-** Análisis comparativa de los parámetros de lesión histológica referente a la 3ª biopsia entre los grupos A y B.



**Figura 6.1** – Análisis histológica de la primera biopsia. (1- Grupo Control, 2- Grupo A y 3- Grupo B).



**Figura 6.2** – Análisis histológica de la segunda biopsia. (1- Grupo Control, 2- Grupo A y 3- Grupo B).



**Figura 6.3** – Análisis histológica de la tercera biopsia. (**1**- Grupo Control, **2**- Grupo A y **3**- Grupo B).

## 6.6- Estudio hemodinámico

### - Hemodinámica Regional (Hepática):

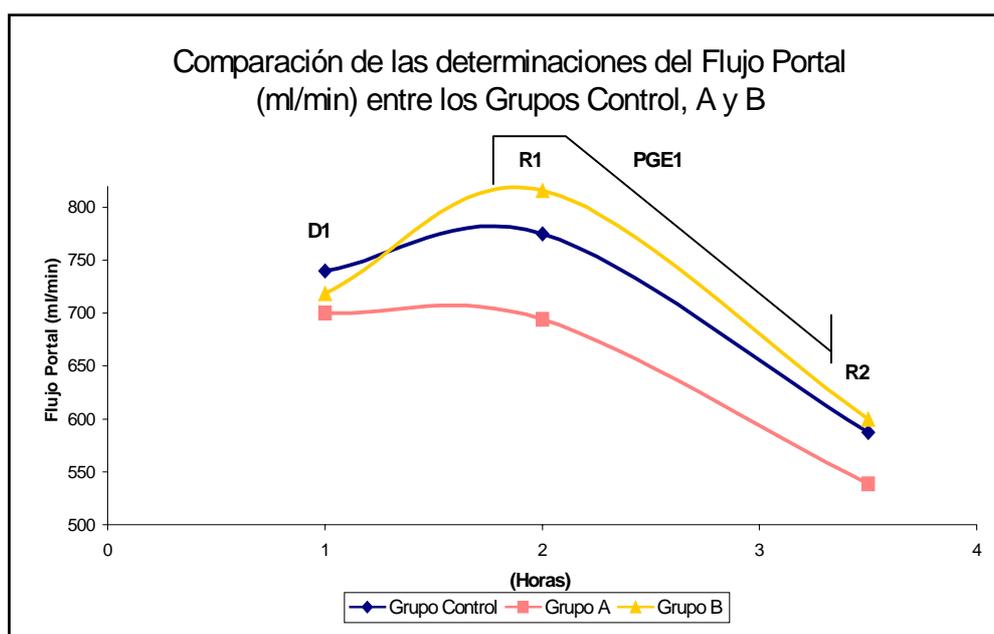
Se determinaron los flujos sanguíneos intraoperatoriamente y de forma incruenta de la vena porta y arteria hepática por medio del aparato *CardioMed Flowmeter*, mediante el principio del tiempo de tránsito. Las determinaciones se verificaron en las fases D1, R1, R2 y en R24 en los cerdos que sobrevivieron las 24 horas del postoperatorio (grupo Control).

La determinación hemodinámica de los flujos portal y arterial realizada en la fase R1, se efectuó en el momento en que se acabó la anastomosis arterial, 25 a 30 minutos tras la reperfusión portal del injerto. Por lo tanto, en los experimentos en que se utilizaron PGE1, los flujos en la fase R1 se determinaron sobre efecto de la medicación.

#### A)- ANÁLISIS DEL FLUJO PORTAL:

Con respecto al flujo portal, tras la disección del hilio hepático (Fase D1), los flujos se presentaron similares comparativamente entre los grupos. En la fase R1, coincidiendo con el uso de la PGE1 por la vena porta, se produjo un incremento del flujo portal en el grupo B en comparación con el grupo A, posiblemente debido al efecto vasodilatador de la medicación (PGE1). La significación estadística fue: ( $P = 0,07$  – Fase R1) (Gráfico 6.11 y Tabla 6.29).

En la fase R2, ya sin la administración de PGE1, el flujo portal permaneció un poco más elevado en el grupo B en relación al Grupo A, sin embargo la diferencia se mostró menos pronunciada en comparación a la fase R1 ( $P = 0,22$ ).



**Gráfico 6.11** - Comparación de las determinaciones del flujo portal entre los grupos control, A y B.

Variable	Grupo	D1			R1			R2			R24		
		N	Media	DE	N	Media	DE	N	Media	DE	N	Media	DE
Flujo portal	Control	4	740.0	121	4	775.0	167	4	587.5	188	4	825.0	95.7
	Grupo A	7	700.0	111	7	694.2	193	7	538.5	228	0	-	-
	Grupo B	7	718.5	146	7	815.7	157	7	600	155	0	-	-
Estudio Estadístico entre (A y B)		0.70			0.0795			0.22			-		

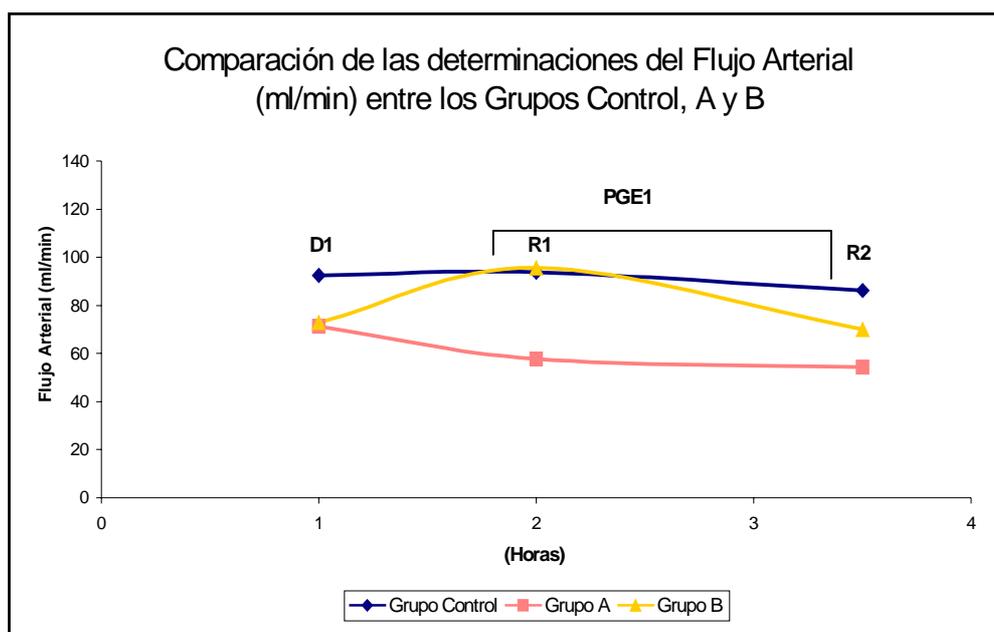
**Tabla 6.29** – Medias correspondientes al flujo portal en las fases D1, R1, R2 y R24 de los Grupos Control, A y B.

#### B)- ANÁLISIS DEL FLUJO ARTERIAL:

En las determinaciones iniciales (Fase D1) no hubo diferencias significativas entre los grupos analizados.

En relación a la fase R1, en el grupo B se evidenció un aumento significativo del flujo arterial frente al grupo A ( $P = 0,001$ ).

En la fase R2, una vez finalizada la infusión de PGE1, el flujo arterial persistió más elevado en el grupo B en relación al Grupo A ( $P = 0.099$ ), a pesar de sufrir un mayor descenso de la curva (Gráfico 6.12 y Tabla 6.30).



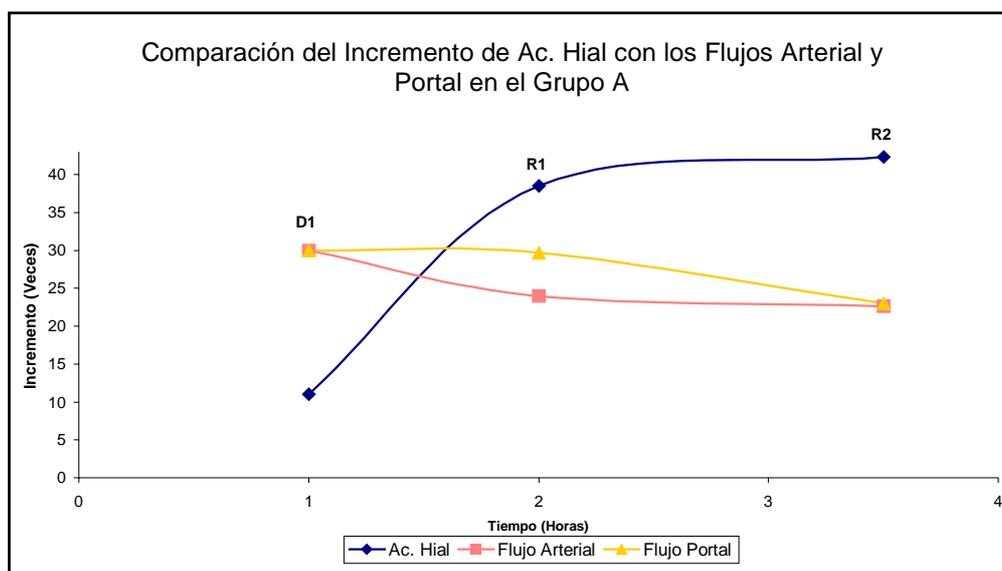
**Gráfico 6.12** - Comparación de las determinaciones del flujo arterial entre los grupos control, A y B.

Variable	Grupo	D1			R1			R2			R24		
		N	Media	DE	N	Media	DE	N	Media	DE	N	Media	DE
Flujo Arterial	Control	4	<b>92.5</b>	19.3	4	<b>93.7</b>	31.4	4	<b>86.2</b>	22.8	4	<b>145.0</b>	47.9
	Grupo A	7	<b>71.4</b>	42.2	7	<b>57.8</b>	30.8	7	<b>54.2</b>	26.9	0	-	-
	Grupo B	7	<b>72.8</b>	29.2	7	<b>95.7</b>	34.5	7	<b>70.0</b>	50.3	0	-	-
<b>Estudio Estadístico entre (A y B)</b>		<b>0.7950</b>			<b><u>0,001</u></b>			<b>0.099</b>			-		

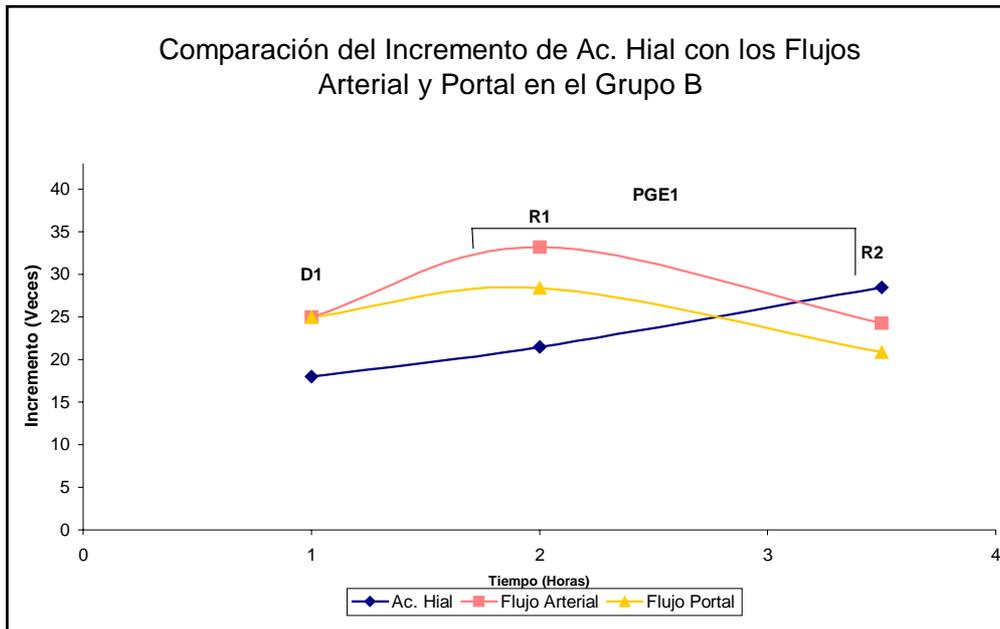
**Tabla 6.30** – Medias correspondientes al flujo Arterial en las fases D1, R1, R2 y R24 de los Grupos Control, A y B.

### C)- CORRELACIÓN DE LOS FLUJOS HEPÁTICOS CON LA LESIÓN ENDOTELIAL

La correlación de la evolución de la lesión endotelial con la hemodinámica regional hepática mostró que los flujos arterial y portal disminuyen a medida que progresan la lesión sinusoidal y la resistencia vascular en la microcirculación hepática. Por tanto el grupo B, mientras se administró la PGE1, presentó un menor incremento de la lesión endotelial señalado por el marcador Ác. Hialurónico y consecuentemente los flujos portal y arterial hepático aumentaron. En el grupo A, se desarrolló una mayor lesión endotelial y se verificó un descenso de los flujos hepáticos conforme progresaba la lesión sinusoidal (Gráficos 6.13 y 6.14).



**Gráfico 6.13** – Comparación de la lesión endotelial con los flujos Arterial y portal en el Grupo A.

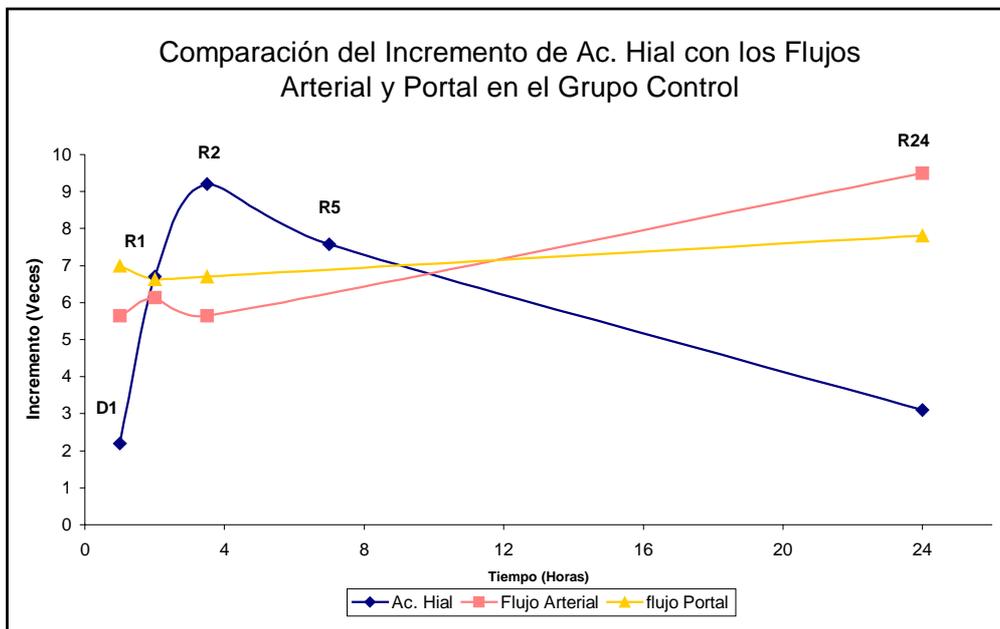


**Gráfico 6.14**– Comparación de la lesión endotelial con los flujos Arterial y portal en el Grupo B.

Con respecto al grupo Control, en los primeros 90 minutos de la reperfusión hepática, se notó una mayor resistencia vascular en la microcirculación hepática debido al auge de la lesión sinusoidal en esta fase y una menor PAM, disminuyendo, consecuentemente, los flujos portal y arterial hepático. No obstante, en las fases subsiguientes, con la recuperación progresiva de la lesión endotelial y de la presión arterial, se evidenció un aumento gradual de los flujos portal y arterial hepático (Gráfico 6.15).

En comparación con los grupos A y B, el grupo Control, tras los 90 minutos de reperfusión, evolucionó con mejor flujo hepático total debido a la menor resistencia vascular sinusoidal generada por una LIR de grado leve. Por lo tanto, existe una fuerte

correlación entre la hemodinámica regional con el grado de LIR, y más específicamente con la lesión sinusoidal.



**Gráfico 6.15**– Comparación de la lesión endotelial con los flujos arterial y portal en el Grupo Control.

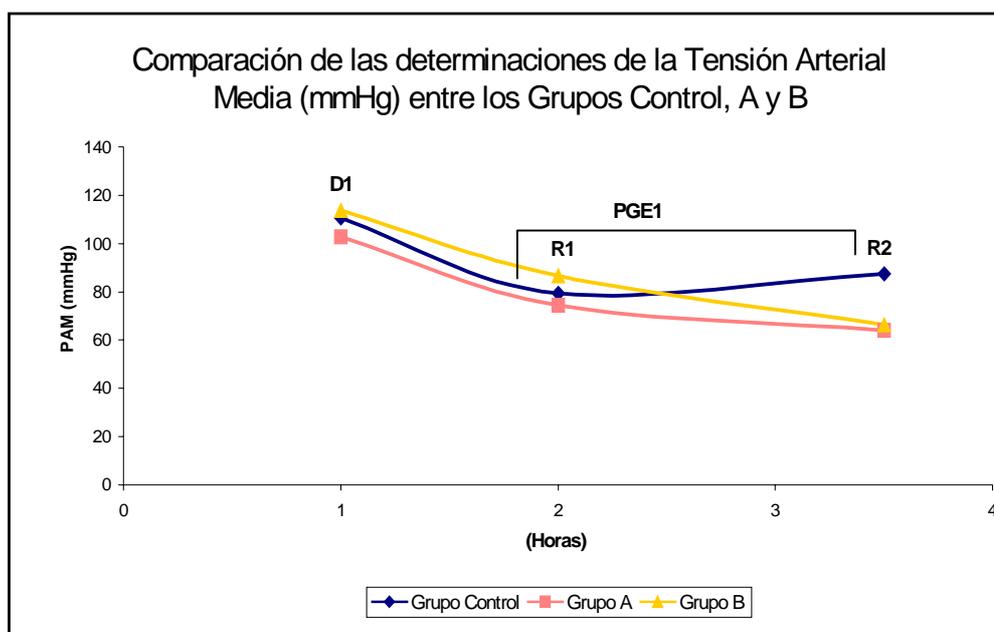
#### - Hemodinámica Sistémica:

En la determinación hemodinámica basal (momento D1), los tres grupos mostraron semejantes en cuanto a la Presión Arterial Media (PAM).

En la verificación hemodinámica sistémica en la fase R1, se detectó una disminución de la PAM en todos los grupos. También se verificó que en el grupo B, bajo el efecto de la PGE1, no presentó una mayor inestabilidad hemodinámica en comparación con el grupo A ( $P = 0.35$  – Fases D1-R1).

Referente al período de R1 a R2, se verificó un empeoramiento de la PAM en los grupos A y B de forma similar ( $P = 0,22$  – Fases R1-R2).

El grupo control, tras la leve inestabilidad hemodinámica en la fase R1, evolucionó en la fase R2 con una mejora de presión arterial media, presentando cifras normales en la fase R24 (Gráfico 6.16 y Tabla 6.31).



**Gráfico 6.16** - Comparación de las determinaciones de la Presión Arterial Media (PAM) entre los grupos control, A y B.

Variable	Grupo	D1			R1			R2			R24		
		N	Media	DE	N	Media	DE	N	Media	DE	N	Media	DE
Tensión Arterial media	Control	4	110.58	11.8	4	79.45	16.5	4	87.38	18.0	4	100.8	4.1
	Grupo A	7	102.89	5.02	7	74.46	15.3	7	64.13	13.7	0	-	-
	Grupo B	7	113.64	19.4	7	86.60	23.2	7	66.37	9.79	0	-	-
Estudio Estadístico entre (A y B)		0.3507			0.35			0,22			-		

**Tabla 6.31** - Medias correspondientes a la tensión arterial media en las fases D1, R1, R2 y R24 de los Grupos Control, A y B.

## 6.7- Análisis de la Supervivencia

Analizando la supervivencia, el grupo control (n = 4) presentó 100% de supervivencia en las primeras 24h del postoperatorio, siendo sacrificados tras la obtención de la muestra de sangre, biopsia y determinación de la hemodinámica (Regional y Sistémica).

En los grupos A y B, con tiempo de preservación del injerto de 24 horas, todos los animales fallecieron alrededor de 4 a 7 horas tras la reperfusión hepática. No obstante, el grupo B presentó un mayor tiempo de supervivencia en comparación con el grupo A, resultando significativa la diferencia. (P = 0,0122).

Grupo	N	Media (min)	DE	Mínimo (min)	Máximo (min)	P-valor*
Control	4	<b>1440</b>	0	1440	1440	
Grupo A	7	<b>309.43</b>	35.93	236	340	<b><u>0.0122</u></b>
Grupo B	7	<b>359.29</b>	32.84	325	410	

**Tabla 6.32** - Comparación de las medias de los tiempos de supervivencia (min) entre los grupo Control A y B.

# DISCUSIÓN

---

## Discusión

En la actualidad, la escasez de donantes de órganos con el continuo aumento de candidatos en la lista de espera es una realidad prácticamente en todos los países del mundo. Esta situación forzó a la mayoría de los grupos de trasplantes a tomar una conducta menos selectiva con respecto a la aceptación de órganos de donantes cadavéricos, surgiendo, desde entonces, un incremento en el número de donantes añosos e implantes de órganos sub-óptimos. No obstante, con esta política aumentó la incidencia de Lesión de Isquemia Reperusión (LIR), sobre todo en grados más severos, incluyendo el fallo hepático que presenta una incidencia de 2 - 5% y que representa la indicación principal de re-trasplante precoz. En el estudio de los factores de riesgo de morbi-mortalidad precoz en el trasplante hepático, tema de la tesis doctoral de la Dra. Itxarone Bilbao, se refiere que grados más avanzados de LIR causan un mayor porcentaje de mortalidad del enfermo y pérdida del injerto en el primer año del trasplante (70).

LIR (Grado)	-	<b>Leve</b>	<b>Moderada</b>	<b>Severa</b>
Nº de pacientes	-	(124)	(46)	(17)
Mortalidad pacientes 1 año	-	(25%)	(28,3%)	(41,2%)

LIR (Grado)	-	<b>Leve</b>	<b>Moderada</b>	<b>Severa</b>
Nº de Injertos	-	(126)	(53)	(17)
Pérdida de injertos 1 año	-	(29,4%)	(24,5%)	(70,6%)

Para el tratamiento clínico del fallo hepático o como medida de soporte a la espera de un órgano en la necesidad de re-trasplante urgente, se han promovido muchos estudios para la investigación de nuevas sustancias con el objetivo de prevenir o tratar la LIR (Tabla 7.1).

<b>Alteraciones</b>	<b>Determinaciones diagnósticas</b>	<b>Tratamiento</b>
<b>Lesión endotelial</b>	Ac. Hialurónico, Creatinkinasa-BB Endotelina Trombomodulina Análisis de la microcirculación (Histología)	Prostaglandinas, Prostaciclina, FK -506, Ciclosporina, Bloqueadores de canales de Calcio, BM-910228, SB 211475
<b>Activación de las Céls. de Kupffer</b>	Beta-Galactosidasa	Prostaglandinas, Prostaciclina
<b>Agregación de Polimorfonucleares</b>	Elastasa polimorfonuclear Lactoferrina L-Selectina ELAM, VCAM, ICAM, Examen Histológico	Prostaglandinas Prostaciclina
<b>Activación plaquetaria</b>	Tromboelastografía Factor de Adhesión Plaquetar (PAF)	Prostaglandina E1 Prostaciclina Dipiridamol Iloprost
<b>Vasoconstricción</b>	Estudio hemodinámico de los flujos y resistencias portal, arterial hepático y tisular	Prostaglandinas, PGI2
<b>Formación de RLO</b>	Análisis de la lipoperoxidación en el tejido, Determinación de la Xantina Oxido Reductasa, NO2 y NO3	Prostaglandinas Prostaciclina Glutation Ác. Ursodeoxicólico ascorbic acid 2-glucoside
<b>Citolisis hepatocelular</b>	GOT, GPT, LDH, FNT, Análisis Histológico	Prostaglandinas Prostaciclina Bloqueadores de canales de Calcio
<b>Disminución de síntesis hepática</b>	Tiempo de Protrombina, Factor V, Determinación de la producción de bilis, Colesterol, albúmina	Prostaglandinas PGI2 BM-910228

**Tabla 7.1** - Opciones diagnósticas y terapéuticas de las alteraciones en la fisiopatología de la LIR.

Las prostaglandina E1, debido a sus características: anti-inflamatoria, citoprotectora y vasodilatadora, actúa sobre diversas etapas en el desarrollo de la LIR, siendo una de las medicaciones más efectivas en el tratamiento de esta lesión y principalmente en situaciones que aportan un mayor riesgo en la formación del fallo

hepático. En muchos ensayos clínicos y en estudios experimentales se ha visto el efecto beneficioso de la prostaglandina sobre la LIR y la hemodinámica regional (Tablas 7.2 y 7.3).

	Vía	Inicio de la Medicación	Dosis	Valoración
Henley 1995	Sistémica	10ug/h en la fase anhepática y 40ug/h tras la reperfusión hepática. Tratamiento fue mantenido por 21 días	10 a 40ug/h	Ensayo clínico controlado randomizado doble ciego. Estudio del efecto de la PGE1 sobre la supervivencia del enfermo y del injerto y de la morbilidad en Trasplante Hepático
Hidalgo 2002	Portal	En el momento de la reperfusión Hepática	0,6ug/kg/h	Valoración del uso de PGE1 por vía portal sobre la hemodinámica sistémica y regional hepática
Katsuramaki 1996	Sistémica X Portal	Inicio durante la cirugía con uso continuo hasta el 3º postoperatorio	250 a 500ug/día (Portal), 720 ug/día (Sistémica)	Comparación de la administración de PGE1 por vía portal o sistémica en relación al efecto protector en casos de hepatectomías con masiva pérdida de sangre
Inagaki 1999	Portal	Inicio durante la cirugía con uso continuo hasta el 5º postoperatorio	120ug/día - 0,0013ug/Kg/min	Ensayo clínico controlado prospectivo. Estudio del efecto citoprotector de la administración de PGE1 por vía portal en pacientes sometidos a hepatectomía por hepatocarcinoma
Gaber 1988	Portal	En el donante, momento antes de perfundir con Eurocollins	1mg de PGE1 (Bolus)	Uso de PGE1 en el donante para la valoración del efecto citoprotector durante la preservación del hígado en isquemia fría.
Giostra 1997	Sistémica	Inicio durante la reperfusión hepática. Mantenido por 4 días	0,1 a 0,6ug/kg/h	Valoración de uso de PGE1 por vía sistémica sobre la LIR en trasplante hepático ortotópico
Tancharoen 1992	Sistémica	Inicio: 11 a 35h tras la reperfusión hepática. Mantenido por 6 a 23 días	0,2 a 0,6ug/kg/h	Valoración del uso de PGE1 por vía sistémica en casos de fallo hepático en trasplante hepático ortotópico
Himmelreich 1993	Sistémica	En el inicio de la cirugía en el receptor. Mantenido por 3 días	10 a 40ug/h	Valora el efecto del uso de PGE1 por vía sistémica sobre la agregación plaquetaria en trasplante hepático ortotópico
Kornberg 2000	Sistémica	Inicio al final de la cirugía. Mantenido por 7 días	0,25ug/kg/h	Valora el efecto de la PGE1 por vía sistémica en la LIR en trasplante hepático ortotópico.
Grazi 1994	Sistémica	Inicio en la UCI (1ºPO). Mantenido como mínimo 7 días	0,1 a 0,6ug/kg/h	Valoración del uso de PGE1 por vía sistémica en casos de fallo hepático en trasplante hepático ortotópico
Greig 1989	Sistémica	Inicio tras el diagnóstico de Fallo hepático. Mantenido por 4 a 7 días	0,1 a 0,6ug/kg/h	Valoración del uso de PGE1 por vía sistémica en casos de fallo hepático en trasplante hepático ortotópico

**Tabla 7.2** - Ensayos clínicos valorando el uso de PGE1.

	<b>Vía</b>	<b>Inicio de la Medicación</b>	<b>Dosis</b>	<b>Animal / Valoración</b>
Kawachi 1997	Portal	Reperusión hepática	0,01 a 0,15Ug/kg/min	Estudio Hemodinámico y de la LIR en TH porcino
Oishi 1996	Sistémica	Fase Anhepática	0,05ug/kg/min	Valoración hemodinámica en trasplante hepático porcino
Hossain 1999	Portal	15' antes del clampaje y tras la isquemia caliente por 2h	0,5ug/Kg/min	Uso de PGE1 vía portal. Estudio del efecto protector en 1h de isquemia caliente hepática + hepatectomía de 70% en ratas
Takahashi 1993	Sistémica	30' antes del lavado en el donante	0,5ug/Kg/min	Uso de PGE1 en el donante para la valoración del efecto citoprotector durante la preservación del hígado en TH canino
Izuishi 2003	Portal	Reperusión hepática	0, 5, 50 y 100ng/ml	Correlación entre la dosis de PGE1 X efectividad del tratamiento de la LIR en TH en Ratas
Beck 1993	Oral	Postoperatorio por 1 mes	10ug/oral/día	Valoración del efecto citoprotector de la PGE1 en un modelo de inducción de cirrosis en ratas
Ueda 1987	Sistémica	30' antes de la inducción de la isquemia de 90'	0- 0,1- 0,5- 1ug/Kg/min (PGE1); 0,1- 0,5ug/Kg/min (PGE2)	Valoración del efecto citoprotector de la PGE1 X PGE2 en un modelo de isquemia caliente en perros
Totsuka 1995	Portal X Sistémica	15' antes del clampaje y tras la isquemia caliente por 2h	0,02ug/kg/min	Comparación de la administración de PGE1 por vía portal o sistémica en relación al efecto protector en un modelo de isquemia caliente de 90' en perros
Helling 1995	Sistémica	30' antes del clampaje y tras la isquemia caliente por 1h	0,75ug/kg/min	Valoración del uso de PGE1 sobre la restauración de APT en un modelo de isquemia caliente de 2 horas en cerdos.
Stachura 1981	Subcutánea	30' antes de la administración de CC14, 8hs y 24hs tras el uso de CC14	3 dosis de 5ug/kg	Valoración del efecto citoprotector de la PGE2 en un modelo de inducción de necrosis hepatocelular en ratas

**Tabla 7.3** - Estudios experimentales valorando el uso de PGE1 y PGE2. (TH – Trasplante hepático).

En un estudio clínico no randomizado realizado por Greig et al, se evidenció que el uso de la prostaglandina E1 por vía sistémica generó un aumento de la supervivencia del hígado y del enfermo en casos de disfunción primaria del injerto, disminuyendo la necesidad de re-trasplante. No obstante, en el análisis del estudio, el grupo que utilizó la PGE1 fue comparado con un grupo histórico. Henley et al, en un ensayo clínico

randomizado, constataron una menor necesidad de transfusión sanguínea, una mejora de la función renal post-trasplante y una menor morbilidad en los pacientes que recibieron la PGE1 por vía sistémica, no obstante no hubo diferencias con respecto a las tasas de supervivencia del enfermo y del injerto.

Analizando la efectividad de la PGE1 en relación a la vía de administración (sistémica, portal, oral y subcutánea), la infusión por vía portal es la más efectiva en el tratamiento de la LIR, debido a una mayor concentración hepática de la medicación y por ser posible su administración en el momento de la reperfusión hepática sin interferir en la hemodinámica sistémica. Sin embargo, la vía sistémica y subcutánea presentan una mayor posibilidad de alteración de la hemodinámica sistémica (hipotensión). En un estudio clínico, Katsuramaki et al compararon el uso de PGE1 por vía sistémica versus portal en pacientes sometidos a hepatectomías con un sangrado superior a 2000ml durante la intervención quirúrgica. Comprobaron que el uso de la medicación por vía portal fue más efectivo en la prevención de colestasis y en aumentar más rápidamente la función hepática (71).

En los modelos experimentales en que se utilizó la prostaglandina E1 por vía portal, se demostró una reducción de la LIR en el injerto implantado (71, 121) y un efecto citoprotector en el hígado tras el periodo de isquemia caliente (64). En la tesis doctoral del Dr. Hidalgo, mediante un ensayo clínico se observó que la administración de PGE1 por vía intraportal inmediatamente después de la reperfusión no tuvo efecto a nivel sistémico. El efecto beneficioso de la perfusión de PGE1 a nivel hemodinámico consistió en un descenso de la resistencia portal al final de los 90 minutos. En cuanto al efecto beneficioso clínico, el conjunto de pacientes tratados con la medicación, obtuvo una menor mortalidad postoperatoria, una menor estancia en la UCI y una menor necesidad de diálisis (77).

Con respecto a la administración de la PGE1 en el donante, se ha visto en un estudio experimental canino, que el uso de PGE1 por vía portal en los 30 minutos anteriores a la canulación y perfusión del órgano con Wisconsin reduce los niveles de transaminasas tras la reperfusión hepática en el receptor, observándose en el examen histológico un menor grado de necrosis celular (121).

En relación a la administración de PGE1 en el receptor, el inicio del uso de la medicación puede ser en la fase anhepática, en el momento de la reperfusión hepática o tras la estabilidad hemodinámica que suele ser al final de la intervención quirúrgica. La mayoría de los estudios encontrados en la literatura inician la infusión de PGE1 por vía sistémica en el postoperatorio tras el diagnóstico de fallo hepático. Sin embargo, los mejores resultados en relación al tratamiento de la LIR y mayor incremento del flujo hepático total se obtuvieron con el uso de PGE1 (vía portal) en el momento de la reperfusión hepática.

Oishi *et al*, mediante un estudio experimental porcino, valoró el uso de PGE1 en la fase anhepática del trasplante hepático, concluyendo que la administración de Prostaglandina E1 antes de la reperfusión produjo un aumento del gasto cardíaco y un menor grado de hipertensión pulmonar tras la reperfusión hepática, debido a una disminución de la resistencia vascular sistémica y pulmonar (36).

Correlacionando la dosis empleada de PGE1 con la efectividad en el tratamiento de la LIR, en un estudio experimental de trasplante hepático con ratas se observó que la producción de bilis del injerto y el incremento de la perfusión tisular hepática fueron superiores en el grupo en que se administró una mayor dosis de PGE1 (52).

En resumen, el uso de prostaglandina E1 por vía portal en dosis plenas en el momento de la reperfusión hepática es la mejor forma de infundir esta medicación para el tratamiento de la LIR. En situaciones en que las características del donante (edad,

tiempo en UCI, grado de esteatosis hepática, uso de drogas hepatotóxicas) favorecen la obtención de un hígado “límite”, la administración de PGE1 (vía portal) durante la fase de extracción produce un efecto protector en el órgano extraído, conduciendo a una mayor tolerancia del injerto durante el periodo de isquemia fría.

Los pacientes con hepatopatía evolucionada (Child C) o con presencia de hipertensión pulmonar pre-trasplante pueden favorecerse con el uso de PGE1 por vía sistémica en la fase anhepática, pues con la disminución de la resistencia vascular sistémica y pulmonar ocurre un incremento del gasto cardíaco mejorando la reperfusión hepática en el momento del desclampaje. Además, previene un mayor aumento de la presión arterial pulmonar que suele ocurrir tras la reperfusión hepática.

## **7.1 - Establecimiento de un modelo experimental de trasplante hepático porcino para el desarrollo del estudio.**

En el presente estudio, el primer objetivo fue crear un modelo experimental de trasplante hepático porcino, reproduciendo el fenómeno de isquemia-reperfusión. Para esto, se establecieron los protocolos de cirugía y anestesia basados en las experiencias previas de nuestro grupo y también en protocolos de otros grupos de investigación en cirugía experimental (39, 40).

Gracias al soporte económico de la Maratón TV3, se pudo disponer de todos los materiales necesarios para la realización de los experimentos de trasplante hepático porcino. Y tras la inauguración en el 2003 de las nuevas instalaciones de cirugía experimental y estabulario en el Hospital Vall d'Hebron para la realización de estudios en investigación experimental, se pusieron en marcha los experimentos.

Los 3 primeros trasplantes hepáticos porcinos se utilizaron para la puesta a punto de:

- La técnica quirúrgica (curva de aprendizaje);
- Los protocolos (anestésico y quirúrgico);
- La determinación de las fases de recogida de muestras y parámetros.

En el planteamiento del modelo, para que se pudiera estudiar mejor la lesión de isquemia reperfundida y comprobar con una mayor efectividad el efecto beneficioso de la PGE1 sobre esta lesión, se decidió que el injerto tenía que aportar una LIR importante, de grados más avanzados. Por este motivo, se escogió un tiempo de preservación de isquemia fría de 24 horas. Por lo tanto, se programaron las cirugías del donante y

receptor, para que el tiempo entre la extracción del órgano y su implante fuese de 24 horas.

Con respecto a la técnica quirúrgica, en el cerdo donante la técnica empleada fue similar a la que se practica en humanos, realizándose en la secuencia: disección, canulación y perfusión con la solución de Wisconsin. En el cerdo receptor, el trasplante hepático se practicó bajo la técnica clásica y sin uso de by-pass veno-venoso en la fase anhepática. Por tanto, el clampaje portal y sistémico producía una disminución del retorno venoso sistémico y falta de drenaje esplácnico, exigiendo que el tiempo de fase anhepática no pasara a los 30 minutos. Debido a esta circunstancia, los experimentos sirvieron también, como un perfecto entrenamiento técnico, visto que el equipo de implante tenía que emplear una técnica apurada con agilidad y sin cometer errores. Además, por ser muy lábil la raza porcina, pequeños fallos tanto a nivel anestésico como quirúrgico, sumados al implante de órganos con largo tiempo de preservación (24 horas), culminaba con la pérdida del experimento. En total fueron desechados 6 experimentos por complicaciones técnicas.

## 7.2 – Análisis de la supervivencia

El análisis de la supervivencia de los animales trasplantados ha sido utilizado durante mucho tiempo como uno de los parámetros que se relaciona directamente con las manipulaciones de cualquier procedimiento quirúrgico.

Analizando los experimentos del grupo Control, en que los hígados trasplantados presentaban un corto tiempo de isquemia fría (3 horas), la supervivencia fue de 100% hasta el primer día del postoperatorio. Cuando se completaba 24 horas tras la reperfusión portal del injerto, los animales eran sometidos a una relaparotomía para la cuantificación de producción de bilis, determinación y obtención de: flujos sanguíneos, biopsias y muestra de sangre. Seguidamente, eran sacrificados bajo anestesia general.

Cuando analizamos la supervivencia de los animales trasplantados con un injerto preservado por un largo tiempo de isquemia fría (24 horas) se observó que, debido al desarrollo de una lesión de isquemia-reperfusión de grado severo, todos los animales fallecieron alrededor de 4 a 7 horas tras la reperfusión hepática. No obstante, comparando la supervivencia entre los grupos A y B, se evidenció que el grupo con uso de la medicación (PGE1) presentó una mayor supervivencia cuantificada en horas, siendo significativa la diferencia. Esta diferencia conseguida por la administración de Prostaglandina E1, fue debido a la disminución de la LIR que se comprobó mediante los marcadores de lesión hepática, el estudio anatomopatológico y clínicamente por la mayor producción de bilis del injerto implantado. Este efecto beneficioso en el grupo B proporcionó una mejor función del hígado, que favoreció un retraso en el desarrollo de la inestabilidad hemodinámica y una severa alteración de la coagulación, proporcionando así esta mejoría con respecto a la supervivencia.

Un importante aspecto a resaltar es la relación entre la supervivencia con el tiempo de isquemia fría. En el trasplante hepático ortotópico porcino, cuando el tiempo de isquemia fría es igual o mayor a 12 horas la mortalidad es muy elevada. Sin embargo, reduciendo el tiempo de preservación a 8 horas la supervivencia puede llegar a 70%. (101). Por tanto, nuestros resultados corroboran la alta mortalidad en el trasplante hepático porcino cuando se superan las 12 horas de preservación, aún utilizando la solución de Wisconsin. No obstante, en otros modelos como el canino, se consigue supervivencia con tiempo de preservación superior a 24 horas e incluso en trasplante hepático humano en condiciones ideales se puede llegar a las 18 – 20 horas de permanencia en isquemia fría en solución de Wisconsin.

Sobre esta misma línea de investigación en cirugía experimental porcina, actualmente estamos realizando un estudio que valora la administración más prolongada de PGE1 por vía portal en hígados preservados durante 12 horas de isquemia fría. El estudio está compuesto por 3 grupos, el primero en el cual no se utiliza la medicación y los otros dos grupos, en los cuales se administra la PGE1 por vía portal en el momento de la reperusión del injerto: durante 90 minutos en el segundo grupo y durante 5 horas en el tercer grupo. Con los 15 experimentos realizados hasta el momento, 5 en cada grupo, además del efecto beneficioso dado por el uso de la PGE1, se observó también, una relación entre la supervivencia y la administración de la PGE1 (vía intraportal). En el grupo 1 que no utilizó el fármaco, no fue posible extubar la vía aérea en ningún de los animales y hubo un 100% de mortalidad. En el grupo 2 en el que se usó la PGE1 durante 90 minutos, la extubación fue posible en 2 animales (40%) y todos los cerdos fallecieron, sin embargo con un mayor tiempo de supervivencia en comparación con el grupo anterior. En el grupo que se administró la PGE1 durante 5 horas (grupo 3), se pudieron extubar 4 animales (80%) y 3 de ellos (60%) vivieron hasta completar las 24

horas tras el implante del órgano, cuando eran sacrificados posteriormente a la relaparotomía para la obtención de muestras y determinaciones.

Basado en el trabajo anterior y en otros estudios en la literatura (10, 102, 103, 104, 106, 115), está claro que la PGE1 lleva a una mejoría de la tasa de supervivencia, que se debe no sólo a la reducción del grado de lesión de isquemia-reperfusión en el hígado, sino también al efecto de la PGE1 sobre otros órganos, como el pulmón y el riñón. Se ha comprobado que el uso de prostaglandina E1 en el trasplante hepático reduce la acidosis respiratoria transitoria tras la reperfusión hepática, pues mantiene la integridad y el metabolismo pulmonar mediante la estabilización celular del endotelio capilar pulmonar (103). Con respecto a los efectos de la PGE1 sobre el riñón, se evidenció en algunos trabajos una mejora de la función renal debido a la disminución de la resistencia vascular renal, mayor secreción de sodio y agua y un efecto protector a los inmunosupresores anti-calcineurínicos (103, 34).

Por lo tanto, el efecto beneficioso de la prostaglandina tipo E1 sobre el hígado y también sobre otros órganos conlleva a una mejora del estado clínico del enfermo o animal trasplantado, que consecuentemente se puede reflejar en la tasa de supervivencia. No en tanto, en situaciones límites o extremas, como el largo tiempo de isquemia fría de 24 horas, es menos probable que la PGE1 produzca un aumento de la supervivencia.

### **7.3- Diagnóstico y cuantificación de la LIR y función hepática, estratificando el grado de lesión**

La lesión de isquemia reperfusión se manifiesta en el momento de la reperfusión del injerto. La lesión endotelial y hepatocelular generada durante la extracción del órgano y su mantenimiento en isquemia fría se expresa con la presencia del oxígeno. El desarrollo de esta lesión se inicia primeramente con un intenso proceso inflamatorio sobre las células endoteliales sinusoidales, mediante la formación de radicales libres de oxígeno, mediadores inflamatorios, activación neutrofílica y plaquetaria, generando en su mayor expresión la formación de microtrombos en la microcirculación sinusoidal. El daño de las células sinusoidales también conlleva a una disminución de la producción de Prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), que es una sustancia vasodilatadora y un inhibidor de la agregación plaquetaria (110).

La lesión hepatocelular en el momento de la reperfusión suele ser de baja magnitud, incluso en caso de periodos largos de isquemia fría, pues los hepatocitos presentan una mayor resistencia a la hipotermia que el endotelio. La exploración por microscopia electrónica de hígados sometidos a largos periodos de isquemia fría revela que gran parte de los hepatocitos están intactos, mientras que las células sinusoidales se encuentran edematosas y con descamaciones (102, 110). Además, las células hepatocitarias sufren menos directamente la acción neutrofílica y el ataque de los radicales libres y mediadores inflamatorios que las células endoteliales.

En una fase más tardía, la hipoperfusión tisular hepática, consecuencia del daño en la microcirculación sinusoidal, magnifica la lesión hepatocelular al disminuir el aporte de oxígeno y nutrientes a las células hepatocitarias. Por lo tanto, cuanto mayor es la lesión endotelial mayor será el daño hepatocitario. En síntesis, la LIR en el hígado es

un proceso inflamatorio que ocurre básicamente a nivel endotelial, y gran parte de la lesión hepatocelular, en la mayoría de las veces, representa una consecuencia del daño de la microcirculación hepática (104, 110).

No obstante, en algunas situaciones como la presencia de esteatosis, que dependiendo del grado (leve, moderada o severa) y tipo (microvesicular o macrovesicular), puede generar en las fases iniciales de la revascularización del hígado una lesión hepatocelular importante independiente de la lesión endotelial. El daño hepatocitario se da mediante la cristalización de la grasa por la acción de la hipotermia.

Para el diagnóstico y cuantificación de la LIR en los grupos A, B y control se analizaron los marcadores bioquímicos de lesión hepática, correlacionándolos con la función del injerto y con los estudios histopatológico y hemodinámico. Todos los cerdos que recibieron un hígado mantenido durante 24 horas en isquemia fría desarrollaron LIR severa. En cambio, en los animales en que se implantaron injertos preservados por sólo 3 horas de isquemia fría, se constató una lesión de isquemia-reperfusión de grado leve.

Analizando los resultados del Grupo Control, se evidenció un discreto aumento de los niveles de Ác. Hialurónico y Beta-Galactosidasa en las primeras 5 horas tras la reperfusión del injerto, estando normales sus niveles en la analítica del día siguiente (Fase R24). Correlacionando estos marcadores con el estudio histopatológico, se pudo comprobar que la lesión endotelial fue mínima en todas las biopsias, hallándose en las biopsias con mayor grado de puntuación una ligera dilatación y congestión sinusoidal con poca presencia de polimorfonucleares. El examen de los marcadores de lesión hepatocelular, la AST y la ALT mostraron a las 24 horas del postoperatorio medias de 835 UI/L y 61 UI/L respectivamente, que se correspondían con una lesión hepatocitaria de grado leve. En la función hepática, se observó un ligero descenso de los marcadores

de síntesis hepática (Tiempo de Protrombina y Factor V) que fueron remontando hasta alcanzar cifras normales en la última analítica (Fase R24). La producción de bilis estaba dentro de los límites de normalidad para un cerdo de 30 a 35 Kg, cuantificándose en 14,57 ml/h de bilis en la Fase 2. En el postoperatorio, los animales se mantuvieron hemodinámicamente estables, sin el desarrollo de trastornos electrolíticos o del equilibrio ácido-básico. Completando las primeras 24 horas tras la reperfusión del injerto, los animales eran sometidos a una relaparotomía para recoger muestras y determinaciones, siendo posteriormente sacrificados bajo anestesia general. Por lo tanto, debido al mínimo daño endotelial y hepatocelular constatado, y al mantenimiento de la función de síntesis hepática por el injerto implantado, consideramos que el grupo control desarrolló una lesión de isquemia-reperfusión leve.

Con respecto a los grupos A y B, los niveles de los marcadores de lesión endotelial (Ác. Hialurónico) y de activación neutrofílica (Beta-Galactosidasa) se encontraron muy elevados desde la primera determinación tras la reperfusión (Fase R1), reflejando una considerable lesión en los sinusoides hepáticos. Con la progresión de la lesión sinusoidal y posterior formación de microtrombos en la microcirculación hepática encontrada en el examen histológico, se produjo en la fase R2 una disminución significativa de los flujos hepáticos tanto arterial como portal. Clínicamente, entre la 2<sup>a</sup> y 3<sup>a</sup> hora del postoperatorio, los animales de los grupos A y B presentaron de forma progresiva trastornos electrolíticos (hipercalcemia, hipocalcemia), hipoglucemia, acidosis metabólica, coagulopatía, progresando la inestabilidad hemodinámica (hipotensión), anuria, palidez cutánea y pérdida de líquidos al tercer espacio. Además de este síndrome post-reperfusional, la función hepática fue marcada por un rápido y progresivo

descenso de los marcadores de síntesis hepática (Tiempo de Protrombina y factor V) tras la reperfusión del injerto.

Con el fallecimiento de los animales, en las relaparotomías se observaron la formación de gran cantidad de ascitis y una escasa producción de bilis, que en el grupo A fue de 2,5 ml/h y en el grupo B de 5,7 ml/h durante la Fase 2. Cantidades muy inferiores a la normal para un cerdo de 30 a 35 Kg: (12 a 18 ml/h).

La LIR severa fue la causa de muerte de los cerdos trasplantados en los grupos A y B. El uso de PGE1 en el grupo B disminuyó el daño hepático tras la reperfusión, pero no lo suficiente para reducir el grado de la LIR a un nivel que permitiese la supervivencia de los animales.

## **7.4 - Análisis del efecto beneficioso de la Prostaglandina E1 sobre la lesión de isquemia-reperfusión**

En los grupos A y B se comparó la intensidad de la LIR mediante parámetros bioquímicos, histológicos y hemodinámicos, y se examinó el efecto beneficioso de la Prostaglandina E1.

Se confirmó la homogeneidad de los grupos A y B a través de la semejanza encontrada en las comparaciones de los tiempos de intervención quirúrgica y de fase anhepática, de la lesión histológica del hígado momento antes de la reperfusión (Fase A) y de las analíticas sanguíneas antes de la aplicación de la variable del estudio (PGE1).

### **- Análisis de la lesión Hepatocelular y Sinusoidal**

La prostaglandina tipo E1, por ser una medicación vasodilatadora, anti-inflamatoria, citoprotectora e inmunomoduladora, posee diversos mecanismos de acción capaces de disminuir la progresión de la lesión de isquemia-reperfusión tras la reperfusión hepática.

Analizando los resultados con respecto a los marcadores de lesión hepatocelular y sinusoidal, se pudo comprobar el efecto beneficioso de la PGE1 sobre la LIR a través de la comparación de los grupos en que se implantaron hígados con el tiempo de preservación larga de 24 horas.

La lesión sinusoidal se evaluó directamente por las determinaciones seriadas de Ácido Hialurónico (Ác. Hial), sustancia metabolizada específicamente por las células sinusoidales y por la activación neutrofílica en la microcirculación hepática, mediante los niveles de Beta-Galactosidasa ( $\beta$ -Gal). En relación al marcador (Ác. Hial) se

verificó una menor lesión de la microcirculación hepática en el grupo B tras el uso de la PGE1 en comparación con el grupo que no utilizó la medicación, siendo significativa la diferencia. Igualmente, el marcador ( $\beta$ -Gal) mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos A y B, que acusó menor lesión sinusoidal por disminuir la migración y la actividad leucocitaria en el grupo B.

La Prostaglandina E1 disminuye la migración leucocitaria por reducir la síntesis de leucotrienos B4 y mieloperoxidasa (130) e inhibir la producción del anión superóxido de los neutrófilos (98), mientras que la disminución de la agregación es debida a un incremento en el contenido de AMPc intracelular y a la estabilización de las membranas celulares (33).

Para la cuantificación de la lesión hepatocelular, se determinaron los niveles de AST, ALT y LDH. Se observó en el grupo B, tras la administración de PGE1, una menor lesión hepatocelular en relación al grupo A, que fue confirmado por el estudio histológico. Esta diferencia fue significativa para los marcadores AST y ALT.

Analizando el grupo Control, en el cual se trasplantaron hígados con solo 3 horas de isquemia fría, la lesión sinusoidal y hepatocelular encontrada fue infinitamente inferior en comparación con los grupos A y B. De esta manera, el tiempo de isquemia fría de 24 horas fue el motivo por el cual los grupos A y B desarrollaron una lesión de isquemia-reperfusión severa. Siendo que, la administración de PGE1 por vía intraportal en los momentos iniciales a la perfusión hepática, logró disminuir la progresión de la LIR en el grupo B, mediante el efecto inhibitorio directo en la formación de radicales libres de oxígeno y mediadores inflamatorios, la disminución de la agregación plaquetaria y leucocitaria y la estabilización de la membrana celular por controlar la entrada de  $Ca^{++}$  hacia el interior de la célula y por la restauración de AMP cíclico, ADP

y ATP. Además, el efecto vasodilatador de la PGE1 aumentó el flujo hepático total, dificultando la formación de microtrombos en la microcirculación hepática.

### **Análisis de la Función de Síntesis Hepática**

Los parámetros utilizados para la determinación de la función hepática, Tiempo de Protrombina (TP), Factor V y la cuantificación de bilis, mantuvieron una correlación directa con el grado de la lesión de isquemia reperfusión.

Analizando la función hepática en los grupos A y B, se observó que el TP, el factor V y la cuantificación de bilis iban decayendo a medida que progresaba la LIR. No obstante, el grupo B presentó un menor descenso de la función de síntesis hepática en las fases subsiguientes a la infusión de Prostaglandina E1. Siendo que las diferencias obtenidas mediante los niveles de TP y Factor V no se mostraron significativas, posiblemente por el número escaso de la muestra y por la lesión hepática severa con una corta supervivencia de los animales, que no permitió una mayor diferencia entre los grupos en comparación.

Con relación a la cuantificación de bilis, el grupo B presentó una mayor producción de bilis que el grupo A, siendo la diferencia estadísticamente significativa. Por lo tanto, considerando que la determinación del volumen de bilis producida por el injerto es el mejor método para la determinación de la función de síntesis hepática, aunque las demás pruebas (TP y Factor V) no hayan alcanzado diferencias significativas, se puede decir que el Grupo B, mediante la cuantificación de bilis, presentó una mejor función hepática que el grupo A en las fases subsiguientes al uso de PGE1.

Con respecto al grupo Control, la producción de bilis, los niveles de TP y Factor V fueron muy superiores a los valores encontrados en los grupos A y B. El tiempo de isquemia fría de sólo 3 horas generó en el hígado porcino una LIR leve, permitiendo que la función hepática a las 5 horas tras la reperfusión fuera prácticamente normal desde del punto de vista analítico (TP y Factor V) y de producción de bilis. En cambio, la LIR severa que se produjo en los grupos A y B, no permitió que hubiese un repunte de la función del injerto, observándose un deterioro de la función de síntesis en las fases subsiguientes a la reperfusión hepática.

### **Análisis del Estudio Histopatológico**

Examinando el estudio histológico, el grupo control presentó un menor grado de lesión histológica que los grupos A y B, tanto en la primera biopsia antes de la revascularización como en las biopsias subsiguientes a la reperfusión hepática. El menor tiempo de preservación (3 horas) en el grupo Control favoreció el desarrollo de una LIR leve, aflorando en las biopsias tras la reperfusión hepática una ligera dilatación y congestión sinusoidal con poca presencia de polimorfonucleares.

Comparando los grupos A y B se verificó el mismo grado de lesión histológica referente a la primera biopsia. No obstante, en las 2 biopsias siguientes, el grupo que no recibió la medicación PGE1 desarrolló un mayor grado de lesión sinusoidal y hepatocelular, lo cual fue significativa la diferencia.

Examinando separadamente los parámetros establecidos para la cuantificación de lesión, el grupo que utilizó la PGE1 presentó una menor presencia de polimorfonucleares, menor dilatación y congestión sinusoidal en la biopsia obtenida a los 90 minutos de la reperfusión. No obstante, estos hallazgos no fueron significativos

estadísticamente. En la biopsia sacada en el momento de la muerte de animal, se observó en el grupo tratado con PGE1 un menor grado de necrosis hepatocelular, que fue significativo en el estudio estadístico.

Resultados similares se obtuvieron en un trabajo experimental con perros realizado por Takahashi, que valoró el uso de Prostaglandina E1 por vía sistémica en un modelo de trasplante hepático con injertos preservados en isquemia fría por 24 horas. En el estudio histopatológico, se comprobó que la biopsia sacada a las 2 horas tras la reperfusión presentó un mayor porcentaje de vacuolización, necrosis y edema sinusoidal en el grupo no tratado con PGE1. Además en la microscopia electrónica, el grupo sin la administración de PGE1 exhibió un mayor edema mitocondrial y degeneración hepatocitaria (121).

## **7.5 – Análisis de los efectos de la PGE1 sobre el flujo hepático total (hemodinámica regional) y sobre la hemodinámica sistémica.**

### **Análisis del Estudio Hemodinámico Regional**

Con respecto a los efectos hemodinámicos producidos por la infusión de la PGE1 por vía intraportal, se verificó en el grupo B un aumento tanto del flujo arterial hepático como portal en comparación al grupo A que no utilizó la PGE1. Este incremento hemodinámico en el grupo B generó un mayor flujo hepático total y consecuentemente una mejora de la perfusión tisular hepática.

El aumento del flujo portal se produjo por una disminución de la LIR y por una menor resistencia vascular a nivel sinusoidal, sin embargo, este beneficio por el uso de la medicación (PGE1) no fue suficientemente importante para alcanzar diferencias significativas. Probablemente, aumentando el número de la muestra se podría conseguir significación estadística.

En relación al aumento del flujo arterial, esta mejora fue significativa y se debe tanto al tratamiento de la LIR con PGE1, disminuyendo la resistencia vascular en la microcirculación hepática, como también por el efecto vasodilatador de la medicación sobre el lecho arterial, mediante las intercomunicaciones arterioportales existentes en el hígado (1, 12).

En el trabajo experimental porcino realizado por Kawachi, que estudió el efecto hemodinámico generado por el uso de PGE1 por vía portal también se alcanzaron resultados hemodinámicos similares. Se comprobó un aumento de los flujos arterial y portal, no obstante, el incremento sólo fue significativo para el flujo arterial (1).

### **Análisis del Estudio Hemodinámico Sistémico**

Analizando la hemodinámica sistémica, en el momento de la revascularización del injerto (Fase R1), todos los grupos presentaron un mismo nivel de hipotensión, que fue debido al síndrome de reperfusión sumado a la disminución del retorno venoso generado por el clampaje vascular portal y venoso sistémico. El tiempo de clampaje vascular está directamente relacionado con la disminución del retorno venoso y el sufrimiento intestinal. Por este motivo, el tiempo de fase anhepática mantiene una correlación directa con la Presión Arterial Media (PAM) en el momento de la reperfusión hepática. No hubo diferencias significativas entre los grupos con respecto al tiempo de fase anhepática.

En un trabajo experimental porcino realizado por Tanaka y colaboradores, concluyen que el uso de PGE1 por vía sistémica en dosis bajas (0,05mcg/Kg/min) durante la fase anhepática, aumenta el gasto cardiaco y previene la hipertensión pulmonar tras la reperfusión del injerto sin causar hipotensión, debido a la disminución de la resistencia vascular sistémica (36). Por lo tanto, el uso de PGE1 antes de la reperfusión hepática podía mejorar la hemodinámica sistémica y disminuir la hipotensión causada en los animales en la fase R1, favoreciendo así una mejor reperfusión del injerto.

Examinando el periodo en el cual se utilizó la Prostaglandina E1 por vía portal, se evidenció que en el grupo B la PAM se mantuvo poco más elevada comparativamente al Grupo A (NS). Esto refleja la seguridad del tratamiento de la LIR por vía portal sin afectación de las condiciones hemodinámicas sistémicas. Este hecho se debe a la eficacia del hígado en depurar la PGE1 por vía portal. Del 89 a 95% de la dosis total es eliminada en el primer paso por el hígado y el restante se depura en el pulmón (11).

Comparando la hemodinámica sistémica con el grado de LIR, en el grupo Control, con el desarrollo de una lesión de isquemia-reperfusión leve, se observó una inestabilidad hemodinámica leve en el momento de la reperfusión que mejoró en la fase subsiguiente (R2). En cambio, en los grupos A y B con tiempo largo de preservación del injerto (24 horas) se evidenció una leve inestabilidad hemodinámica inicial a la reperfusión hepática que se agravó progresivamente en la evolución. Las causas de este empeoramiento hemodinámico sistémico fueron debidas a la disminución del drenaje venoso esplácnico por la evolución de la LIR severa, reduciéndose el flujo portal y consecuentemente el retorno venoso sistémico y a la vasodilatación sistémica debida al efecto de la acidosis metabólica mantenida y a la progresiva liberación de mediadores inflamatorios (Interleuquinas, FNT, endotelinas, Radicales Libres, entre otros).

El uso de PGE1 por vía portal en un modelo de trasplante hepático porcino con preservación del injerto durante 24 horas no causó inestabilidad hemodinámica durante el periodo de su administración. Además, los animales que utilizaron la medicación presentaron una mejoría de los marcadores de LIR y función hepática llevando a un retraso en el desarrollo de la inestabilidad hemodinámica regional y sistémica, aumentando el tiempo de supervivencia.

# CONCLUSIONES

---

## Conclusiones

- El modelo experimental de trasplante hepático porcino con una isquemia fría del órgano durante 24 horas produjo una LIR severa, manifestada por una alteración importante de todos los parámetros estudiados y que causó el fallecimiento por fallo hepático de todos animales a pocas horas del trasplante. Sin embargo, el tiempo de supervivencia del grupo tratado con PGE1 fue mayor en comparación con el grupo A que no recibió la medicación. El grupo Control, que desarrolló una LIR leve, presentó 100% de supervivencia.

- Para el diagnóstico y cuantificación de la LIR en los grupos del estudio, se analizaron marcadores específicos de lesión hepática, correlacionándolos con la función del injerto y con los estudios histopatológico y hemodinámico. Con el análisis seriado de los parámetros aplicados en el estudio, se observó en todos los grupos que: la LIR en el hígado se expresó inicialmente con el desarrollo de un daño e inflamación en la microcirculación sinusoidal con posterior lesión hepatocelular. El grupo Control presentó una LIR leve y los grupos A y B una LIR severa, siendo el tiempo de preservación del injerto en isquemia fría responsable de los diferentes grados de lesión.

- El efecto beneficioso de la perfusión portal de PGE1 se manifestó por un aumento del flujo hepático total y una menor alteración de todos los parámetros de lesión hepatocitaria, sinusoidal y de función hepática. Estas diferencias alcanzaron significación estadística en la mayoría de ellos. A pesar de esto, no se consiguió revertir la LIR y todos los animales fallecieron en el post-trasplante inmediato.

- La perfusión portal de PGE1 en dosis plenas en la fase inmediata de la revascularización del injerto fue bien tolerada desde el punto de vista hemodinámico.

# **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

## Referencias Bibliográficas

- 1- Kawachi S, Shimazu M, Wakabayashi G, Tanabe M, Shirasugi N, Kunamoto Y, Karahashi T, Yoshida M, Kitajama M. Efficacy of intraportal infusion of prostaglandin E1 to improve the hepatic blood flow and graft viability in porcine liver transplantation. *Transplantation* 1997; Vol 64, No 2 July:205-209.
- 2- Shan DP, Imber CJ, Cenarruzabeitia IL, Mcguire J, James T, Taylor Richard, Friend PJ. B- Galactosidase as a Marker of Ischemic Injury and a Mechanism for Viability Assessment in Porcine Liver Transplantation. *Liver Transplantation*, Vol 8, N° 1 (January), 2002: 21-26.
- 3- Granger DN, Rutili G, McCord JM: Superoxide radicals in feline intestinal ischemia. *Gastroenterology* 1981; 81: 22-29.
- 4- Granger DN, Hollwarth ME, Parks DA: Ischemia-reperfusion injury: role of oxygen-derived free radicals. *Acta Physiol Scand Suppl* 1986; 548: 4763.
- 5- Omar B, McCord JM. Ischemia-reperfusion. In: Sies, H., editor. *Oxidative stress: oxidant and antioxidants*. London: Academic Press 1991; 493-527.
- 6- Biasi F, Chiarpotto E, Lanfranco G, et al.: Oxidative stress in the development of human ischemic hepatitis during circulatory shock. *Free Rad Biol Med* 1994; 17: 225-233.
- 7- Beltzer F and Southard JH. Principles of solid organ preservation by cold storage. *Transplantation*, 1988; 45:673-6.
- 8- Blankenstein, J.D., Terpstra, O.T.: Liver preservation: the past and the future. *Hepatology*, 1991; 13(6):1235-1250.

- 9- Kamiike W, Burdelski M, Steinhoff G, Ringe B, Lauchart W, Pichlmayer R. Adenine nucleotide metabolism and its relation to organ viability in human liver transplantation. *Transplantation* 1988;45: 138.
- 10- Greig, P.D. , Wolf GM, Sinclair SB, Abecassis M, Strasberg SM, Taylor BR, Blendis LM, Superina RA, Glyn MFX, Langer B, Levy GA. Treatment of primary liver graft nonfunction with prostaglandin E1. *Transplantation*, 1989; 48:447-453.
- 11- Dawson W, Jessup SJ, McDonald-Gibson W, Ramwell PW, Shaw JE. Prostaglandin uptake and metabolism by the perfused rat liver. *Br J Pharmacol* 1970; 39: 585.
- 12- Richardson PDI, Withrington PG. Liver blood flow. II. Effects of drugs and hormones on liver blood flow. *Gastroenterology* 1981; 81: 356.
- 13- Schwartz ME, Manzarbeitia C, Thung S, Miller CM. Interpretation of intraoperative liver biopsies is predictive of early allograft function. *Hepatology* 1990 ; 12: 959.
- 14- Clavien PA., Harvey, PRC., Strasberg, SM.: Preservation and reperfusion injuries in liver allografts. *Transplantation*, 1992; 53:957-978.
- 15- Pesonen EJ, Linder N, Raivio KA, Sarnesto A, Lapatto R, Höckerstedt K, Mäkisalo H, Anderson S. Circulating xanthine oxidase and neutrophil activation during human liver transplantation. *Gastroenterology* 1998;114: 1009-1015.
- 16- Deakin CD, Fagan EA, Williams R. Cytoprotective effects of calcium channel blockers. Mechanisms and potential applications in hepatocellular injury. *Journal Hepat* 1991;12: 251-255.
- 17- Ueda Y, Matsuo K, Kamei T, et al. Prostaglandin E1 but not E2 is cytoprotective of energy metabolism and reticuloendothelial function in the ischemic canine liver. *Transplant Proc* 1987; 19: 1329.

- 18- Stachura J, Tarnawsky A, Ivey KJ, et al. Prostaglandin protection of carbon tetrachloride-induced liver cell necrosis in the rat. *Gastroenterology* 1981; 81: 211.
- 19- Shapiro J, Cheung C, Itabashi A. The effect of verapamil on renal function after warm and cold ischemia in the isolated rat kidney. *Tranplantation* 1985;40: 596.
- 20- Martí Ramon. Tesis Doctoral :, *Xantina Oxidoreductasa : consideraciones metodológicas e implicación en la lesión por isquemia-reperfusión hepática*, bajo la dirección de los Drs. Rosa Segura y Carlos Margarit (Barcelona 1999).
- 21- Otto G, Wolf H, David H. Preservation damage in liver transplantation : electron microscopic findings. *Transplantation Proc.* 1984;16:1247.
- 22- Manner M, Shult W, Senninger N, Machens G, Otto G: Evaluation of preservation damage after porcine liver transplantation by assessment of hepatic microcirculation. *Transplantation* 1990;Vol50No 6, Dec: 940-943.
- 23- Klar E, Brecht M, Kraus T, Angelescu M, Mehrabi N, Senninger G, Otto G, Herfarth C. Early assessment of reperfusion injury by intraoperative quantification of hepatic microcirculation in patients, *Transp Proc.*1997;29:362-363.
- 24- Margarit C , JL Lázaro, R Charco, E Hidalgo, A Mora, I Bilbao, E Murio. Diminished portal and Total hepatic blood flows after liver graft revascularization predicts severity of ischemic lesion. *Transplantation Proceedings.* 1999;31:444.
- 25- Ejiri S, Eguchi Y, Kishida A, Ishigami F, Kurumi Y, Tani T, Kodama M. Cellular distribution of thrombomodulin as an early marker for warm ischemic liver injury in porcine liver trnasplantation. *Transplantation.* 2001; 71: 721-726.

- 26- Esmon CT. The roles protein C and thrombomodulin in the regulation of blood coagulation. *J Biol Chem.* 1989; 264 (9):4743.
- 27- Riewald M, Himmelreich G, Breindl P, Neuhaus P, Riess H. Soluble thrombomodulin levels during orthotopic liver transplantation. *Semin Thromb Hemost* 1993; 19(3):246.
- 28- Sido B, Datsis K, Mehrabi A, et al. Soluble thrombomodulin: a marker of reperfusion injury after orthotopic liver transplantation 1995; 60(5): 462.
- 29- Esteban F, Gomez-Jimenez J, Martin MC, Ruiz JC, Nuvials X, Garcia-Allut JL, Suari R, Murio JE, Mourelle M, Segura RM, et al Nitric oxide and hepatic ischemic injury in human orthotopic liver transplantation. *Transp Proceeding* 1995;27:2283-2285.
- 30- Ramwell PW, Shaw JE. Biological significance of prostaglandins. *Recent Prog Horm Res.*1970; 26:139
- 31- Araki H, Lefer AM. Cytoprotective actions of prostacilin during hypoxia in the isolated perfused cat liver. *Am J Physiol* 1980; 238:H176-181.
- 32- Masaki N, Ohta Y, Shirataki H et al. Hepatocyte membrane stabilization by prostaglandins E1 and E2: favourable effects on rat liver injury. *Gastroenterology.* 1992;102:572-576.
- 33- Henley, KS, Lucey MR, Normolle DP, Merion RM, Mc Laren ID, Crider BA, Mackie DS, Sheick VL, Nostrant TT, Brow KA, Campbell DA, Ham JM, Appelman HD, Turcotte Jg. A double-blind, randomized, placebo-controlled trial of prostaglandin E1 in liver Transplantation. *Hepatology,* 1995;21:366-372.
- 34- Takaya S, Bronsther O, Abu-Elmagd K, Ramos H, Fung JJ, Todo S, Starzl TE. Use of prostaglandin E1 in crossmatch-negative liver transplant recipients treated with FK506. *Transplant Proc* 1993Jun; 25(3):2381-5.

- 35- Golub M, Zia P, Matsumo M, Horton R. Metabolism of prostaglandin A1 and E1 in man. *J Clin Invest* 1975;56:1404.
- 36- Oishi M, Tanaka N, Orita K. Beneficial effects of prostaglandin E1 on hemodynamic changes during liver transplantation in pigs. *Transp. Int. Suppl*1:S100-104, 1996.
- 37- Ferreira SH, Vane JR, *Nature*. Prostaglandins, their disappearance from and release into the circulation. 1967 Dec 2; 216 (118):868-73.
- 38- Lijima T, Ohishi F, Tatara T, Iwao Y. Effect of continuous infusion of prostaglandin E1 on hepatic blood flow. *J Clin Anesth* 2001 Jun; 13(4):250-254.
- 39- Sáez M.J., Turumbay E., Cilveti M. T., Yoldi F. J., Martín M. P. Anaesthetic in experimental surgery. A four year experience. *Servicio de Anestesia. Hospital de Navarra*.
- 40- Cruz J. I., González A., Burzaco O., *Avances y Analgesia del cerdo, (sus scrofa doméstica)*. Servicio de Anestesiología, Hospital Clínico Veterinario, Universidad de Zaragoza.
- 41- Alexander, J.W.; Vaughn, W.K. "The use of "marginal donors for organ transplantation. The influence of donor age on outcome". *Transplantation*. 1991 Jan;51(1):135-41.
- 42- Ploeg, R.J.; D'Alessandro, A.M.; Knechtle, S.J. y otros. "Risk factors for primary dysfunction after liver transplantation-a multivariable analysis". *Transplantation*. 1993 Apr;55(4):807-13.
- 43- Hoofnagle, J.H.; Lombardero, M. (). "Liver donor age and outcome of liver transplantation". *Gastroenterology*. 1993 ;104(A): 917.

- 44- Marino, I.R.; Doyle, H.R.; Doria, C.; Aldrighetti, L.; Gayowski, T.; Scotti Foglieri, C.; Furukawa, H.; Fung, J.; Tzakis, A.; Starlz, T. "Outcome of liver transplantation using donors 60 to 79 years of age". *Transplant Proc.* 1995 Feb;27(1):1184-5.
- 45- Tsunoda S, Jackson EK, Branch RA, Gerkens JF. Comparison of the pulmonary, hepatic and renal extraction of PGI<sub>2</sub> and 6-keto-PGE<sub>1</sub>. *Eur J Pharmacol.* 1982 Jan 22;77(2-3):147-51.
- 46- Hossain MA, Hamamoto I, Kobayashi S, Maeba T, Maeta H. The effects of intraportal administration of prostaglandin E<sub>1</sub> on liver ischemia and hepatectomy in rats. *J Hepatobiliary Pancreat Surg.* 1998;5(4):437-44.
- 47- Iwata K, Shimazu M, Wakabayashi G, Ohshima A, Yoshida M, Kitajima M. Intraportal perfusion of prostaglandin E<sub>1</sub> attenuates hepatic postschaemic microcirculatory impairments in rats. *J Gastroenterol Hepatol.* 1999 Jul;14(7):634-41.
- 48- Gaskill HV 3rd. Intraportal prostaglandin E<sub>1</sub> ameliorates the toxicity of intraportal 2'-deoxy-5-fluorouridine in rats. *J Surg Res.* 1987 Aug;43(2):128-32.
- 49- Gao W, Bentley RC, Madden JF, Clavien PA. Apoptosis of sinusoidal endothelial cells is a critical mechanism of preservation injury in rat liver transplantation. *Hepatology.* 1998 Jun;27(6):1652-60.
- 50- Yersiz, H.; Shaked, A.; Olthoff, K. y otros. "Correlation between donor age and the pattern of liver graft recovery after transplantation". *Transplantation.* 1995 Oct 27;60(8):790-4.
- 51- Washburn, W.; Johnson, L.; Lewis, WD.; Jenkins, R.L. "Graft function and outcome of older (≥60 years) donor livers". *Transplantation.* 1996 Apr 15;61(7):1062-6.

- 52- Izuishi K, Fujiwara M, Hossain MA, Okano K, Usuki H, Maeta H. Protective effect of intraportal prostaglandin E1 on prolonged cold preserved rat liver. *Transplant Proc.* 2003 Feb;35(1):130-1.
- 53- Sinclair SB, Greig PD, Blendis LM, Abecassis M, Roberts EA, Phillips MJ, Cameron R, Levy GA. Biochemical and clinical response of fulminant viral hepatitis to administration of prostaglandin E. A preliminary report. *J Clin Invest.* 1989 Oct;84(4):1063-9.
- 54- Busquets, J.; Figueras, J.; Jaurrieta, E.; Fabregat, J.; Rafecas, A.; Torras, J.; Ramos, E.; Lama, C. "The old liver donors: a great risk". *Hepatogastroenterology* (en prensa).
- 55- Makowka, L.; Gordon, R.E.; Todo, S.; Ohkohchi, N.; Marsh, J.W.; Tzakis, A.G.; Yokoi, H. y otros. "Analysis of donor criteria for the prediction of outcome in clinical liver transplantation". *Transplant Proc.* 1987 Feb;19(1 Pt 3):2378-82.
- 56- D'Alessandro, A.; Kalayoglu, M.; Sollinger, H.; Hoffmann, R.; Reed, A.; Knechtle, S.; Pirsch, J.; Hafez, G.; Lorentzen, D.; Belzer, F. "The predictive value of donor liver biopsies on the development of primary nonfunction after orthotopic liver transplantation". *Transplant Proc.* 1991 Feb;23(1 Pt 2):1536-7.
- 57- Totsuka E, Todo S, Zhu Y, Ishizaki N, Kawashima Y, Jin MB, Urakami A, Shimamura T, Starzl TE. Attenuation of ischemic liver injury by prostaglandin E1 analogue, misoprostol, and prostaglandin I2 analogue, OP-41483. *J Am Coll Surg.* 1998 Sep;187(3):276-86.
- 58- Adam, R.; Reynes, M.; Morino, J.; Astarcioglu, I.; Kafetzis, I.; Castaing, D.; Bismuth, H. "The outcome of steatotic grafts in liver transplantation". *Transplant Proc.* 1991 Feb;23(1 Pt 2):1538-40.

- 59- Marsman, W.; Wiesner, R.; Rodriguez, L.; Batts, K.; Porayko, M.; Hay, J.; Gores, G.; Krom, R. "Use of fatty donor liver is associated with diminished early patients and graft survival". *Transplantation*. 1996 Nov 15;62(9):1246-51.
- 60- Fishbein, T.M.; Fiel, I.; Emre, S.; Cubukcu, O.; Guy, S. y otros. "Use of livers with microvesicular fat safely expands the donor pool". *Transplantation*. 1997 Jul 27;64(2):248-51.
- 61- Greig, P.D.; Forster, J.; Superina, R.A.; Strasberg, S.M.; Mohamed, M.; Blendis, L.M.; Taylor; B.R. y otros. "Donor-specific factors predict graft function following liver transplantation". *Transplant Proc*. 1990 Aug;22(4):2072-3.
- 62- Avolio, A.W.; Agnes, S.; Magalini, S.C.; Castagneto, M. "Importance of donor blood chemistry (AST, serum sodium) in predicting liver transplant outcome". *Transplant Proc*. 1991 Oct;23(5):2451-2.
- 63- Gonzalez, F.X.; Rimola, A.; Grande, L. y otros. "Predictive factors of early postoperative graft function in human liver transplantation". *Hepatology*. 1994 Sep;20(3):565-73.
- 64- Totsuka E, Sasaki M, Takahashi K, Toyoki Y, Seino K, Chiba S, Narumi S, Hakamada K, Morita T, Konn M. The effects of intraportal prostaglandin E1 administration on hepatic warm ischemia and reperfusion injury in dogs. *Surg Today*. 1995;25(5):421-8.
- 65- Camargo CAJ, Madden JF, Gao W, Selvan RS, Clavien PA. Interleukin-6 protects liver against warm ischemia/reperfusion injury and promotes hepatocyte proliferation in the rodent. *Hepatology* 1997;26(6): 1513-20.
- 66- Suzuki S, Toledo-Pereyra LH. Interleukin 1 and tumor necrosis factor production as the initial stimulants of liver ischemia and reperfusion injury. *J Surg Res* 1994;57(2): 253-8.

- 67- Editorial. Metal Chelation therapy, oxygen radicals, and human disease. *Lancet* 1985;1(8421): 143-5.
- 68- Totsuka E, Sasaki M, Takahashi K, Toyoki Y, Seino K, Hakamada K, Konn M. The effect of intraportal PGE1 on warm ischemic liver damage. *Surg Today*. 1994;24(11):1028-30.
- 69- Kim YI, Kobayashi M, Akizuki S, Kawano K, Goto S, Kai T, Shimada T. Beneficial effect of a stable prostacyclin analogue (OP-2507) on pig livers harvested from non-heart-beating pigs. *Transplant Proc*. 1993 Oct;25(5):2955-8.
- 70- Bilbao Itxarone. Tesis Doctoral; Factores de riesgo de morbi-mortalidad precoz en el trasplante hepático, bajo la dirección del Dr. Carlos Margarit (Barcelona 2000).
- 71- Kawachi S, Shimazu M, Wakabayashi G, Tanabe M, Shirasugi N, Kitajima M. Intraportal infusion of prostaglandin E1 improves graft viability after orthotopic liver transplantation in pigs. *Transplant Proc*. 1997 Feb-Mar;29(1-2):374-5.
- 72- Sato T, Asanuma Y, Kurokawa T, Kato T, Yasui O, Kusano T, Koyama K. Prostaglandin E(1) continuous hepatic arterial infusion in the treatment of postoperative acute liver failure: basic study on hepatic hemodynamics and clinical application. *Dig Surg*. 2000;17(3):234-40.
- 73- Inagaki H, Kurokawa T, Nonami T, Miwa T, Nakao A, Takagi H. The effect of intraportal administration of prostaglandin E1 on liver blood flow and liver function. *Hepatogastroenterology*. 1999 Sep-Oct;46(29):2909-13.
- 74- Natori S, Fujii Y, Kurosawa H, Nakano A, Shimada H. Prostaglandin E1 protects against ischemia-reperfusion injury of the liver by inhibition of neutrophil adherence to endothelial cells. *Transplantation*. 1997 Dec 15;64(11):1514-20.

- 75- Ishida T. An experimental study of PGE1 infusion into the liver circulation. *Nippon Geka Gakkai Zasshi*. 1988 Jun;89(6):898-905.
- 76- 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.
- 77- Hidalgo Ernest. Tesis Doctoral.; Estudio hemodinámico del Trasplante hepático: Análisis de la lesión de isquemia-reperusión y valorización de la administración de PGE1 en la fase de revascularización, bajo la dirección del Dr. Carlos Margarit (Barcelona 2002).
- 78- Clavien PA. Sinusoidal endothelial cell injury during hepatic preservation and reperusión. *Hepatology* 1998;28 (2): 281-5.
- 79- Cavallari A, Cillo U, Nardo B, Filipponi F, Gringeri E, Montalti R, Vistoli F, D'amico F, Faenza A, Mosca F, Vitale A, D'amico D. A multicenter pilot prospective study comparing Celsior and University of Wisconsin preserving solutions for use in liver transplantation. *Liver Transpl*. 2003 Aug;9(8): 814-21.
- 80- Fabbri A, Magalotti D, Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, Zoli M. Effects of systemic prostaglandin E1 on splanchnic and peripheral haemodynamics in control subjects and in patients with cirrhosis. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 1998 Mar;55(4):209-18.
- 81- Hossain MA, Hamamoto I, Wakabayashi H, Goda F, Kobayashi S, Maeba T, Maeta H. Experimental study of the effect of intraportal prostaglandin E1 on hepatic blood flow during reperfusion after ischaemia and hepatectomy. *Br J Surg*. 1999 Jun;86(6):776-83.

- 82- Kornberg A, Grube T, Wagner T, Voigt R, Homman M, Schotte U, Schmidt K, Scheele J. Differentiated therapy with prostaglandin E1 (alprostadi) after orthotopic liver transplantation: the usefulness of procalcitonin (PCT) and hepatic artery resistive index (RI) for the evaluation of early graft function and clinical course. *Clin Chem Lab Med.* 2000 Nov;38(11):1177-80.
83. McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *New England Journal of Medicine* 1985; 312(3): 159-63.
- 84- Wanner GA, Ertel W, Muller P, Hofer Y, Leiderer R, Menger MD, Messmer K. Liver ischemia and reperfusion induces a systemic inflammatory response through Kupffer cell activation. *Shock* 1996;5(1): 34-40.
- 85- 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.
- 86- Parks DA, Granger DN. Ischemia-induced vascular changes: role of xanthine oxidase and hydroxyl radicals. *Am J Physiol* 1983; 245(2): G285-9.
- 87- Engerson TD, Mckelvey TG, Rhyne DB, Boggio EB, Snyder SJ, Jones HP. Conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase to oxidase in ischemic rat tissues. *J Clin Invest* 1987;79(6): 1564-70.
- 88- Colleti LM, Remick DG, Kunkel SL, Strieter RM, Campbell DAJ. Role of tumor necrosis factor-alpha in the pathophysiologic alterations after hepatic ischemia/reperfusion injury in the rat. *J Clin Invest* 1990;85(6): 1936-43.
- 89- Lentsch AB, Kato A, Yoshudome H, McMasters KM, Edwards MJ. Inflammatory mechanisms and therapeutic strategies for warm hepatic ischemia/reperfusion injury. *Hepatology* 2000;32(2): 169-73.

- 90- Scales WE, Campbell DAJ, Green ME, Remick DG. Hepatic ischemia/reperfusion injury: importance of oxidant/tumor necrosis factor interactions. *AM J Physiol* 1994;267 (6 Pt 1): G1122-7.
- 91- Oudar O, Moreau A, Feldmann G, Scoazec JY. Expression and regulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in organotypic cultures of rat liver tissue. *J Hepatol* 1998;29(6): 901-9.
- 92- Giostra E, Chen H, Deng H, Buhler L, Romand JA, Hadengue A, Huber O, Morel P, Mentha G. Prophylactic administration of prostaglandin E1 in liver transplantation: results of a pilot trial. *Transplant Proc.* 1997 Aug;29(5):2381-4.
- 93- Isai H, Sheil AG, McCaughan G, Dolan P, Waugh R. Successful reversal of primary graft non-function in a liver transplant patient treated with prostaglandin E1. *Aust N Z J Surg.* 1992 Apr;62(4):314-6.
- 94- Mollison LC, Angus PW, Jones RM. Prostaglandin E1 for the treatment of primary non-function of the donor organ in liver transplantation. *Med J Aust.* 1991 Jul 1;155(1):51-3.
- 95- Sheiner PA. Prostaglandins in liver transplantation. *Hepatology.* 1995 Feb;21(2):592-3.
- 96- Blankensteijn JD, Schlejen PM, Groenland TH, Terpstra OT. The effects of long-term graft preservation and prostaglandin E1 on intraoperative hemodynamic changes in liver transplantation. A comparison between orthotopic and heterotopic transplantation in the pig. *Transplantation.* 1992 Sep;54(3):423-8.
- 97- Isai H, Dolan P, Sheil AG, Painter D, Woodman K, Liu WG. The effect of modified University of Wisconsin solution and stable prostacyclin analogues on liver preservation. *Transplant Proc.* 1992 Feb;24(1):258-9.

- 98- Nakadaira K, Tsukada K, Sakaguchi T, Shirai Y, Kurosaki I, Ohtake M, Yoshida K, Muto T. A pharmacological analysis of prostaglandin E1 on portal blood flow after partial hepatectomy in rats. *Surg Today*. 1993;23(3):277-9.
- 99- Aono T, Sakaguchi T, Fujita N, Shimizu T, Tsukada K, Hatakeyama K. Omental delivery of prostaglandin E1 effectively increases portal venous blood flow in 66%-hepatectomized rats. *Surg Today*. 1997;27(5):473-6.
- 100- Harper PL, Luddington RJ, Jennings I, Reardon D, Seaman MJ, Carrell RW, Klink JR, Smith M, Rolles K, Calne R. Coagulation changes following hepatic revascularization during liver transplantation. *Transplantation*. 1989 Oct;48(4):603-7.
- 101- Audet M, Alexandre E, Mustun A, David P, Chenard-Neu MP, Tiollier J, Jaeck D, Cinqualbre J, Wolf P, Boudjema K. Comparative evaluation of Celsior solution versus Viaspan in a pig liver transplantation model. *Transplantation*. 2001 Jun 27;71(12):1731-5.
- 102- Briegel J, Haller M, Zulke C, Kilger E, Pratschke E, Jauch KW, Berger H, Forst H. Primary graft nonfunction following orthotopic liver transplantation: treatment with prostacyclin. *Transplant Proc*. 1992 Dec;24(6):2693-5.
- 103- Xu HS, Rosenlof LK, Pruett TL, Jones RS. Prostaglandin E1 increases survival with extended anhepatic phase during liver transplantation. *Ann Surg*. 1994 Jul;220(1):53-8.
- 104- Grazi GL, Mazziotti A, Jovine E, Stefanini GF, Frena A, Ercolani G, Gruttadauria S, Gozzetti G. Prostaglandin therapy in primary liver graft nonfunction after orthotopic transplantation. *Transplant Proc*. 1994 Dec;26(6):3651-2.
- 105- Editorial. Prostaglandins in liver transplantation. *Hepatology* 1995 Vol 21(2): 592-93.

- 106- Gaber AO, Thistlethwaite JR Jr, Busse-Henry S, Aboushloe M, Emond J, Rouch D, Broelsch CE. Improved results of preservation of hepatic grafts preflushed with albumin and prostaglandins. *Transplant Proc.* 1988 Oct;20(5):992-3.
- 107- Aono T, Sakaguchi T, Tsukada K, Kurosaki I, Hatakeyama K. Effect of prostaglandin E1 on ammonia concentration in blood of patients with hepatic resection. *Dig Dis Sci.* 1996 Jan;41(1):126-30.
- 108- Carlson LA, Irion E, Oro L. Effect of infusion of prostaglandin E1 on the aggregation of blood platelets in man. *Life Sci.* 1968 Jan 1;7(1):85-90.
- 109- Cazenave JP, Dejana E, Kinlough-Rathbone RL, Richardson M, Packham MA, Mustard JF. Prostaglandins I2 and E1 reduce rabbit and human platelet adherence without inhibiting serotonin release from adherent platelets. *Thromb Res.* 1979;15(1-2):273-9.
- 110- Briegel J, Haller M, Zulke C, Kilger E, Pratschke E, Jauch KW, Berger H, Forst H. Primary graft nonfunction following orthotopic liver transplantation: treatment with prostacyclin. *Transplant Proc.* 1992 Dec;24(6):2693-5.
- 111- Kinlough-Rathbone RL, Packham MA, Mustard JF. The effect of prostaglandin E1 on platelet function in vitro and in vivo. *Br J Haematol.* 1970 Nov;19(5):559-71.
- 112- Virgolini I, Li S, Sillaber C, Majdic O, Sinzinger H, Lechner K, Bettelheim P, Valent P. Characterization of prostaglandin (PG)-binding sites expressed on human basophils. Evidence for a prostaglandin E1, I2, and a D2 receptor. *J Biol Chem.* 1992 Jun 25;267(18):12700-8.
- 113- Aono T, Sakaguchi T, Nakadaira K, Ohtake M, Muto T. Orally administered prostaglandin E1 derivative can enhance liver regeneration in partially hepatectomized rats. *Biochem Pharmacol.* 1993 Aug 17;46(4):767-9.

- 114- Jaffe BM, Moore TC, Vigran TS. Tissue levels of prostaglandin E following heterotopic rat heart allografting. *Surgery*. 1975 Oct;78(4):481-4.
- 115- Lucey MR, Normolle DP, Merion RM, Mc Laren ID, Crider BA, Mackie DS, Sheick VL, Nostrant TT, Brow KA, Campbell DA, Ham JM, Appelman HD, Turcotte Jg. A double-blind, randomized, placebo-controlled trial of prostaglandin E1 in liver Transplantation. *Hepatology*, 1995;21:366-372).
- 116- Sinzinger H, Virgolini I, Lupattelli G, Molinari E, Gerakakis A, Angelberger P. Prostaglandin E1 decreases the low-density-lipoprotein entry into rabbit arterial wall. *Br J Pharmacol*. 1991 Jul;103(3):1626-8.
- 117- Helling TS, Wogahn BM, Olson SA, Evans LS, Reddy BR, VanWay C 3rd. The effect of prostaglandin E1 on liver adenine nucleotides and cytoplasmic enzymes in a porcine model of normothermic hepatic ischemia. *Hepatology*. 1995 Nov;22(5):1554-9.
- 118- Himmelreich G, Hundt K, Neuhaus P, Bechstein WO, Roissant R, Riess H. Evidence that intraoperative prostaglandin E1 infusion reduces impaired platelet aggregation after reperfusion in orthotopic liver transplantation. *Transplantation*. 1993 Apr;55(4):819-26.
- 119- Lefer AM. Cytoprotective actions of prostacyclin during hypoxia in the isolated perfused cat liver. *Am J Physiol*. 1980 Feb;238(2):H176-81.
- 120- Takei Y, Marzi I, Gao WS, Gores GJ, Lemasters JJ, Thurman RG. Leukocyte adhesion and cell death following orthotopic liver transplantation in the rat. *Transplantation*. 1991 May;51(5):959-65.
- 121- Takahashi K, Yamamoto N, Egawa H, Takeuchi T, Yamaguchi T, Takada Y, Nishizawa F, Takayasu T, Narita M, Mori K, et al. Effect of prostaglandin E1 on preservation injury of canine liver grafts preserved in UW solution. *Transpl Int*. 1993;6(5):245-50.

- 122- Jones G, Hurley JV. The effect of prostacyclin on the adhesion of leucocytes to injured vascular endothelium. *J Pathol.* 1984 Jan;142(1):51-9.
- 123- Tancharoen S, Jones RM, Angus PW, Michell ID, McNicol L, Hardy KJ. Prostaglandin E1 therapy in orthotopic liver transplantation recipients: indications and outcome. *Transplant Proc.* 1992 Oct;24(5):2248-9.
- 124- Fantone JC, Marasco WA, Elgas LJ, Ward PA. Stimulus specificity of prostaglandin inhibition of rabbit polymorphonuclear leukocyte lysosomal enzyme release and superoxide anion production. *Am J Pathol.* 1984 Apr;115(1):9-16.
- 125- 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 Jul;49(1):18-22.
- 126- Marubayashi S, Dohi K, Yamada K, Kawasaki T. Role of conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemic rat liver cell injury. *Surgery.* 1991 Sep;110(3):537-43.
- 127- Zager RA. Adenine nucleotide changes in kidney, liver, and small intestine during different forms of ischemic injury. *Circ Res.* 1991 Jan;68(1):185-96.
- 128- Miura Y, Fukui N. Prostaglandins as possible triggers for liver regeneration after partial hepatectomy. A review. *Cell Mol Biol Incl Cyto Enzymol.* 1979;25(3):179-84.
- 129- Sugawara Y, Kubota K, Ogura T, Esumi H, Inoue K, Takayama T, Makuuchi M. Protective effect of prostaglandin E1 against ischemia/reperfusion-induced liver injury: results of a prospective, randomized study in cirrhotic patients undergoing subsegmentectomy. *J Hepatol.* 1998 Dec;29(6):969-76.

- 130- Beck PL, McKnight GW, Kelly JK, Wallace JL, Lee SS. Hepatic and gastric cytoprotective effects of long-term prostaglandin E1 administration in cirrhotic rats. *Gastroenterology*. 1993 Nov;105(5):1483-9.
- 131- Alp MH, Hickman R. The effect of prostaglandins, branched-chain amino acids and other drugs on the outcome of experimental acute porcine hepatic failure. *J Hepatol*. 1987 Feb;4(1):99-107.