



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

La perfusión normotérmica “ex-situ” como continuación de la “recirculación normotérmica” en la obtención de injertos hepáticos procedentes de donantes a corazón parado

David Calatayud Mizrahi

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

**LA PERFUSIÓN NORMOTÉRMICA “EX-SITU” COMO
CONTINUACIÓN DE LA “RECIRCULACIÓN NORMOTÉRMICA”
EN LA OBTENCIÓN DE INJERTOS HEPÁTICOS PROCEDENTES
DE DONANTES A CORAZÓN PARADO**

TESIS PRESENTADA POR

DAVID CALATAYUD MIZRAHI

para otorgar al grado de doctor en Medicina

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE MEDICINA

Barcelona, Junio de 2010



Facultat de Medicina
**Departament de Cirurgia i Especialitats
Quirúrgiques**

Casanova, 143
08036 Barcelona

Los abajo firmantes: Profesor Dr. Juan Carlos García-Valdecasas, Catedrático de Cirugía de la *Facultat de Medicina* de la *Universitat de Barcelona*, como director y el Dr. Constantino Fondevila, Profesor Asociado de Cirugía de la *Facultat de Medicina* de la *Universitat de Barcelona*, como co-director

CERTIFICAN, que la tesis doctoral titulada **“La perfusión normotérmica “ex-situ” como continuación de la “recirculación normotérmica” en la obtención de injertos hepáticos procedentes de donantes a corazón parado”**, realizada por David Calatayud Mizrahi, para obtener el grado de doctor en medicina, se halla en condiciones de ser leída ante el tribunal correspondiente.

Ello se hace constar en Barcelona, a 10 de junio de 2010.

Dr. Juan Carlos García-Valdecasas

Dr. Constantino Fondevila

A mi yaya Rocha

AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento para:

Mis padres Fernando y Sarah, por la educación que me han dado, el apoyo constante que han tenido hacia mí y los valores que me han inculcado, así como el cariño inagotable durante todos los años de mi vida. El mejor creativo que existe y la mujer más inteligente y más fuerte sin duda alguna. Gracias por todo a vosotros dos.

Mis hermanos Rosa, Eva, Fernando y Raquel, que son lo mejor que uno pudiese desear tener cerca. Siempre os tengo a mi lado, igual que mis sobrinos, vuestras parejas y el resto de la familia.

Clara, por el amor continuo y la disponibilidad que siempre tiene a ayudarme en todo lo posible. Todo se hace más fácil contigo. También a sus padres Joan y Teresa y a su hermana Paula, que se han convertido en una segunda familia para mí.

El Prof. Dr. Juan Carlos García-Valdecasas, Catedrático de Cirugía de la *Universitat de Barcelona* y co-director de la tesis, Jefe de Servicio de Cirugía General y Digestiva del Hospital Clínic de Barcelona. Por el impulso, la perseverancia y la dedicación puesta detrás de esta tesis, y por la confianza que siempre me ha demostrado. Gracias por toda la paciencia y toda la ayuda que me has brindado.

El Dr. Constantino Fondevila, profesor asociado de la *Universitat de Barcelona*, co-director de la tesis y médico cirujano de Cirugía Hepática y Trasplantes del Hospital Clínic de Barcelona, por el enorme trabajo realizado en la creación y desarrollo de esta línea de trabajo experimental, traducido en los increíbles resultados obtenidos.

El Prof. Dr. Josep Fuster. Profesor Titular de la *Universitat de Barcelona* y Jefe de la Unidad de Trasplante Digestivo del Hospital Clínic de Barcelona, por la sabiduría que desprende dentro y fuera del quirófano, así como la confianza que también me ha sabido demostrar en más de una ocasión. En el léxico taurino, se merece las dos orejas y el rabo.

La Dra. Pilar Taurá, del Servicio de Anestesiología y Terapia del Dolor del Hospital Clínic de Barcelona. La capacidad de trabajo bien hecho combinando la cirugía experimental con el trabajo asistencial en quirófano y los trasplantes de hígado es un ejemplo a seguir. Toda esta profesionalidad sumada a su faceta humana la convierten en una persona excepcional. Gracias por tu apoyo y amistad. También quiero agradecer el trabajo realizado a todos los compañeros del Servicio de Anestesia que han colaborado y que siguen colaborando en la línea experimental, de nuestro hospital y de otros países.

El Dr. Ángel Ruiz, del Servicio de Coordinación de Trasplantes del Hospital Clínic, por el trabajo realizado en este trabajo experimental, por su dominio en sistemas de circulación extracorpórea y por la gran amistad que tenemos. También agradezco la colaboración de los demás miembros de Coordinación de Trasplantes que han participado en este trabajo.

Los biólogos Javier Muñoz y Olga Sánchez, por el amplio trabajo realizado alrededor del trabajo experimental actual y otras líneas similares, y por su compañerismo. Su asesoramiento científico es de gran valía.

El Dr. Hugo Maathius, y el equipo colaborador del Servicio de Cirugía de la *Universidad de Groningen* (Holanda), encabezados por el Prof. Rutger Ploeg, por su colaboración logística y sus aportaciones en máquinas de perfusión ex-situ.

La Dra. Rosa Miquel, del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínic de Barcelona, por el trabajo realizado en el estudio de las muestras histológicas. Su gran disponibilidad y enorme profesionalidad siempre han ido unidas a una constante amabilidad.

La Dra. América Jiménez, Jefa de Servicio del Estabulario de la *Facultat de Medicina* de la *Universitat de Barcelona*, por su gran ayuda y apoyo durante todos estos años, así como por su gran profesionalidad.

Todos los compañeros que han colaborado directa o indirectamente en este trabajo experimental: residentes y especialistas de cirugía, estudiantes de medicina, técnicos de laboratorio de urgencias, del Servicio de Anatomía Patológica y de Criobarna; gracias a todos por conseguir llevar a cabo todo este trabajo.

También quiero agradecer a todos mis compañeros de Cirugía del Hospital Clínic de estos 10 años que llevo en esta institución. A todos ellos, ya sean residentes, especialistas, jefes de sección, jefes de servicio y ex-compañeros, porque de todo se aprende en esta vida.

Los miembros del Servicio de Hepatología y de Gastroenterología del Hospital Clínic, por su disponibilidad y la buena relación que existe, consiguiendo que el trabajo sea siempre más agradable.

ÍNDICE

I. INTRODUCCION.....	21
1. Trasplante hepático en España.....	23
2. Situación actual.....	27
2.1. Necesidad donación.....	27
2.2. Ampliación criterios donación: Alternativas.....	31
2.2.1. Donante vivo (THDV).....	33
2.2.2. Split (infantil-adulto).....	35
2.2.3. Dominó (PAF).....	36
2.2.4. Trasplante de donante a corazón parado (DCP).....	38
3. Donación a corazón parado (DCP).....	40
3.1. Clasificación DCP.....	40
3.2. Estado actual.....	44
3.3. Experiencia Clínica.....	46
3.3.1. Estados Unidos.....	46
3.3.2. Madrid/La Coruña.....	49
3.4. Hospital Clínic de Barcelona (HCP).....	52
3.4.1. Experiencia animal.....	52
3.4.2. Experiencia Clínica.....	56
3.4.2.1. Protocolo de donantes a corazón parado en el HCP.....	56
3.4.2.2. Nuestra primera experiencia clínica.....	67

II. HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	69
III. OBJETIVOS.....	73
IV. MATERIAL Y MÉTODOS.....	77
Grupos.....	79
1. Animales.....	80
2. Anestesia.....	80
3. Protocolo quirúrgico del donante.....	82
3.1. Monitorización del donante.....	82
3.2. Accesos vasculares del by-pass cardiopulmonar.....	84
3.3. Cirugía de banco.....	86
4. Máquina de perfusión.....	88
5. Protocolo quirúrgico del receptor.....	91
5.1. Preparación Prequirúrgica.....	91
5.2. Procedimiento Quirúrgico.....	92
5.2.1. Tiempo Cervical.....	92
5.2.2. Tiempo Abdominal.....	93
6. Toma de muestras en el receptor.....	99
6.1. Muestras sanguíneas.....	99
6.2. Muestras de tejido.....	99
6.2.1. Formaldehído: Hematoxilina-Eosina.....	100
6.2.2. OCT: Inmunohistoquímica.....	100

6.2.3. Expresión genética mediante PCR.....	100
6.3. Muestras de suero.....	102
7. Valoración clínica en el postoperatorio.....	104
8. Administración de medicamentos.....	105
9. Parámetros a analizar.....	105
9.1. Parámetros biológicos.....	105
9.2. Parámetros funcionales.....	106
9.3. Parámetros histológicos.....	106
10. Análisis estadístico.....	108
V. RESULTADOS.....	109
1. Análisis comparativo de la supervivencia.....	113
2. Análisis comparativo de la función hepática.....	121
2.1. GOT.....	121
2.2. LDH.....	135
2.3. Bilirrubina.....	149
2.4. Quick.....	160
3. Análisis comparativo de los parámetros de RNA tisular.....	170
3.1. Caspasa-3.....	170
3.2. MCP-1.....	183
3.3. IL-6.....	196

3.4. TNF- α	208
3.5. E-selectina.....	223
4. Análisis comparativo de los parámetros obtenidos de suero.....	236
4.1. ELISA: Factor de vonWillebrand (vWF).....	236
4.2. TBars: Thiobarbiturate reactive substances.....	250
4.3. Quimioluminiscencia: Sales biliares.....	263
5. Análisis histológico de las muestras de tejido.....	276
5.1. Necrosis coagulativa.....	276
5.2. Microvesiculación citoplasmática hepatocelular.....	285
5.3. Epitelio biliar.....	294
5.4. Dilatación-Congestión sinusoidal.....	300
5.4.1. Dilatación sinusoidal.....	302
5.4.2. Congestión sinusoidal.....	310
VI. DISCUSIÓN.....	313
1. Donante a corazón parado: problemática actual.....	315
2. Recuperación de hígados no válidos.....	317
3. Resultados del experimento.....	319

3.1. Supervivencia.....	319
3.1.1. Importancia del tiempo de isquemia.....	319
3.1.2. Valor de la Recirculación Normotérmica (RCN).....	321
3.2. Efecto de la bomba de perfusión ex-situ.....	322
3.2.1. Función hepática.....	322
3.2.1.1. Función hepatocelular.....	322
3.2.1.2. Función de la célula endotelial.....	326
3.2.2. Histología.....	330
3.2.3. Respuesta inflamatoria.....	335
VII. CONCLUSIONES.....	339
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	343

I. INTRODUCCIÓN

1. Trasplante hepático en España

Desde hace años y a fecha de hoy, España sigue siendo el país con mayor tasa de donaciones por población. Con una población de 45,2 millones de habitantes, y un estado autonómico dividido en 17 comunidades autónomas, disponemos de 167 hospitales autorizados para la generación de órganos, para un total de 45 hospitales autorizados para realizar trasplantes. Existen 25 centros para realizar trasplante hepático.

En cuanto a la actividad de los equipos de hígado, a fecha de 1 de enero de 2010, se han realizado un total de 17.231 trasplantes hepáticos, desde el primero realizado hace 26 años (febrero de 1984) por el equipo de Carles Margarit y Eduardo Jaurrieta¹. En total, se han realizado más de 73.855 trasplantes de órganos, correspondiendo 2/3 a trasplantes de riñón, a 1 de enero de 2010.

Desde la creación de la Organización Nacional de Trasplantes (ONT) en 1989, hemos pasado de 550 donantes ese mismo año a 1605 el pasado año 2009; con una tasa de donaciones por millón de población de 14,3 pmp a 34,3 pmp. Nos encontramos en una situación “privilegiada” si comparamos con las medias de tasas de donación de otros países². Así, en Estados Unidos esta tasa se sitúa en 26,3 pmp, generando el año pasado 7.984 donantes³. En Europa, la tasa de 2009 fue de 18,1 pmp, en Australia de 12,1 pmp, y en el resto del continente americano llegaba a 6,5 pmp. Dentro de Europa, únicamente 6 países superan las 20 donaciones pmp⁴.

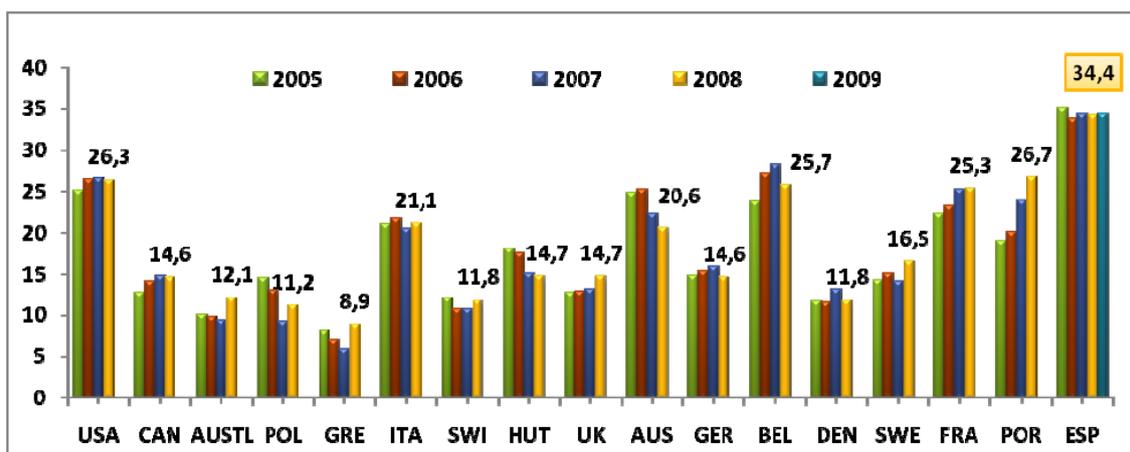


Gráfico 1: Tasa anual (p.m.p.) de donantes de órganos España y otros países (2005-2009) (fuente: ONT)

Durante todos estos años, ha evolucionado mucho el tipo de donantes de órganos. A inicios de los años 90, la edad media de los donantes de órganos no llegaba a los 40 años (38 ± 15), siendo en el año 2009 de $56,4 \pm 16,3$ ². Esto es debido, por un lado, a las mejoras en cuanto a la seguridad vial (infraestructuras, avances mecánicos tecnológicos en los vehículos, ...) lo que ha hecho disminuir, afortunadamente, el número de víctimas mortales en accidentes de tráfico (noviembre de 2007 se convirtió en el mes con menos muertos en carretera de los últimos 27 años, con 174 víctimas).

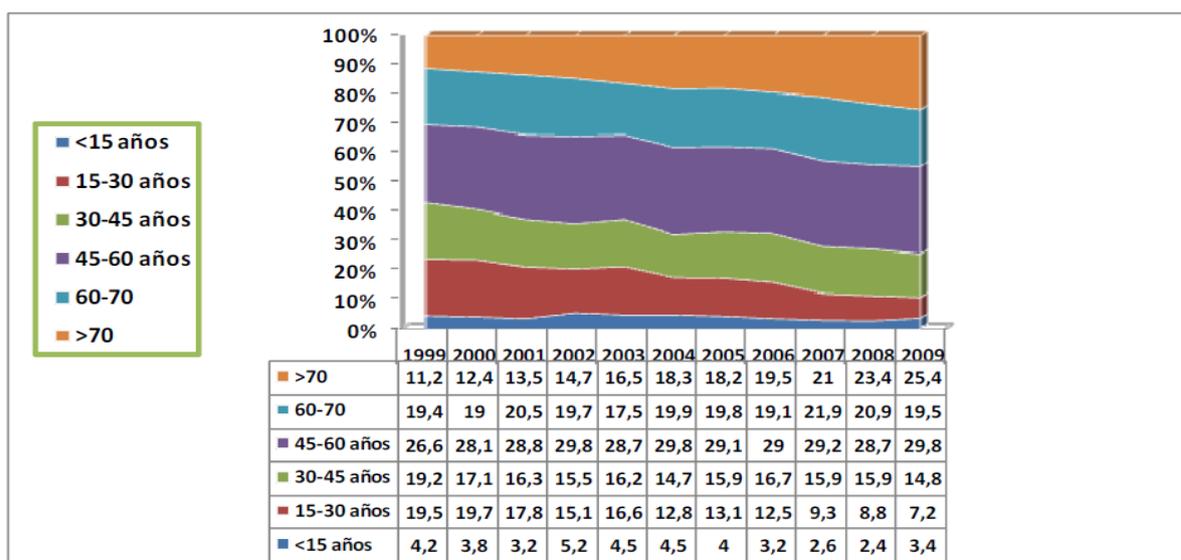


Gráfico 2: Evolución de la edad de los donantes en los últimos 10 años (fuente: ONT)

Así, pasamos de 358 donantes por accidente de tráfico en 1992, a 129 en 2009. Por otro lado, debido en parte a la necesidad de aumentar el pool de donantes (como desarrollaremos a continuación), y en parte a los avances técnicos en trasplante y el desarrollo de la medicina en este campo, se han incrementado la edad de aceptación de órganos para trasplante, no existiendo límite en el hígado, si se acompaña de una valoración del injerto aceptable.

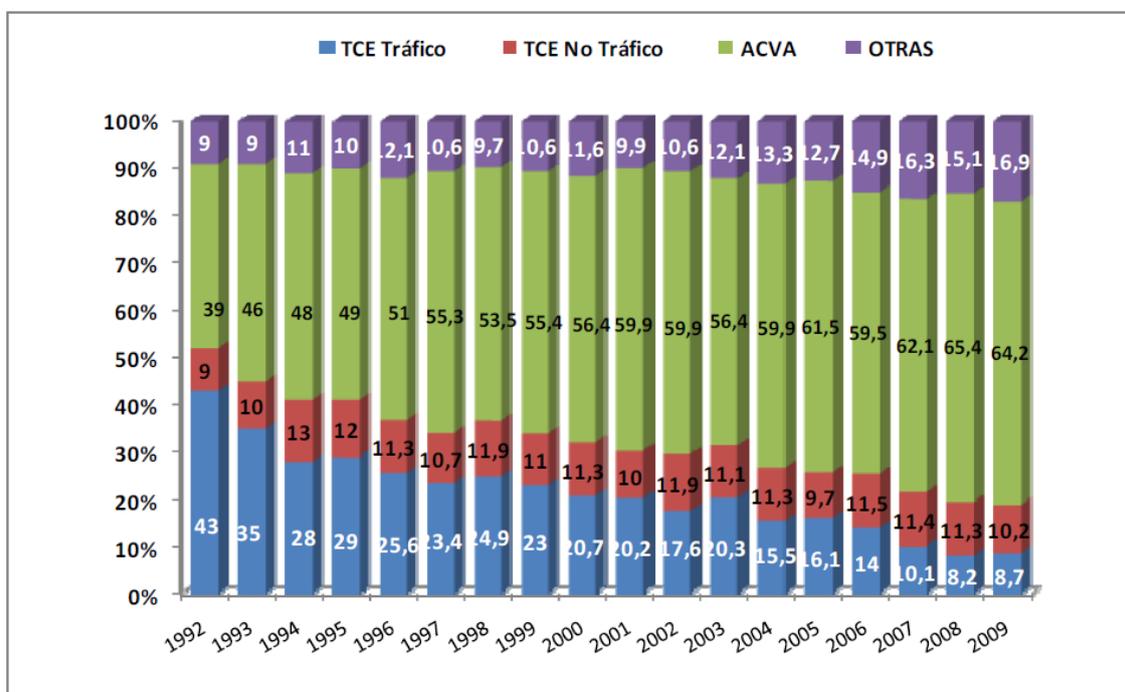


Gráfico 3: Causas de muerte de donantes de órganos en España (1992-2009) (fuente:ONT)

En el esfuerzo de la ONT de seguir aumentando la tasa de donaciones año tras año, vemos una considerable disminución del porcentaje de negativas familiares a la donación, pasando de 27,5% en 1992, a 17,8% en 2008 (manteniéndose por debajo del 20% desde 2002).

Los resultados de la acción conjunta de los coordinadores de trasplante y los equipos médico-quirúrgicos de trasplante hepático se ven reflejados en la evolución del número de trasplantes de hígado realizados. En el año 1988 se realizaron 123 trasplantes hepáticos en toda España. El año pasado se realizaron 1099, situándonos en una tasa de donación de hígado por millón de población de 23,5 en 2009 ². Sigue siendo la tasa líder en el mundo, seguida de cerca por Estados Unidos con 20,8 pmp.

2. Situación actual

El trasplante hepático es el único tratamiento válido en pacientes con enfermedad hepática en estadio terminal⁵.

2.1. Necesidad de donación

Sin embargo, debido a la escasez de órganos, su aplicabilidad se ve reducida. En los últimos años se está incrementando la diferencia entre indicaciones para el trasplante y los trasplantes realizados. Por ello, a pesar de que España conserva el mayor índice de donaciones por millón de población en el mundo (34,4 donantes p.m.p. en 2009), la lista de espera sigue aumentando cada año.

En la Unión Europea y en Estados Unidos, entre un 10 y un 30% de los pacientes fallecen en lista de espera antes de recibir un hígado adecuado para el trasplante. En España, según datos de la Organización Nacional de Trasplantes (ONT), la lista de espera de pacientes pendientes de recibir un trasplante hepático ha aumentado un 42% en los últimos 10 años². De este modo, la indicación de trasplante hepático se sitúa en 45,7 pmp, con una tasa de trasplante que se ha estabilizado en 23,5 pmp. Esto hace que la mortalidad española en lista de espera se sitúe alrededor del 6%.

La situación, como vemos, se vuelve más dramática, año tras año. En 2009 había un total de 2046 pacientes adultos en lista de espera para un trasplante de hígado en toda España. A 31 de diciembre de 2009, en este último año, se han realizado 1032 trasplantes de hígado en adulto, quedando en lista de espera, en esta misma fecha, 120 pacientes. Han sido 696 los pacientes que han muerto en lista de espera este año 2009, esperando un trasplante. Hasta el año anterior, realizando aproximadamente el mismo número de trasplantes, la mortalidad anual en lista de espera se situaba entre 150 y 170 adultos, como vemos en la gráfica siguiente.

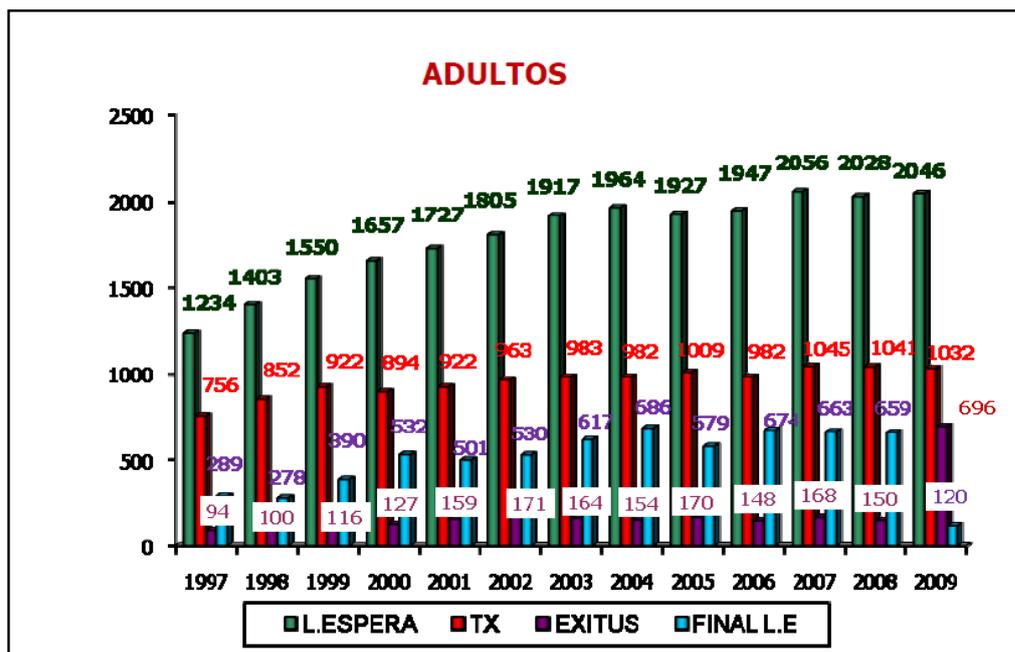


Gráfico 4: Evolución lista de espera en trasplante hepático adulto (fuente: ONT)

Si observamos retrospectivamente la evolución de las indicaciones de trasplante hepático y los trasplantes realizados, vemos el incremento sufrido año tras año en el número de pacientes en lista de espera. Así, en 1993 hubieron 743 indicaciones, para 495 trasplantes realizados ese año, quedando en lista 159 pacientes. Este número no ha hecho más que aumentar desde entonces, con una diferencia de 1052 pacientes entre lista de espera y trasplantes realizados en 2009, con 2151 indicaciones.

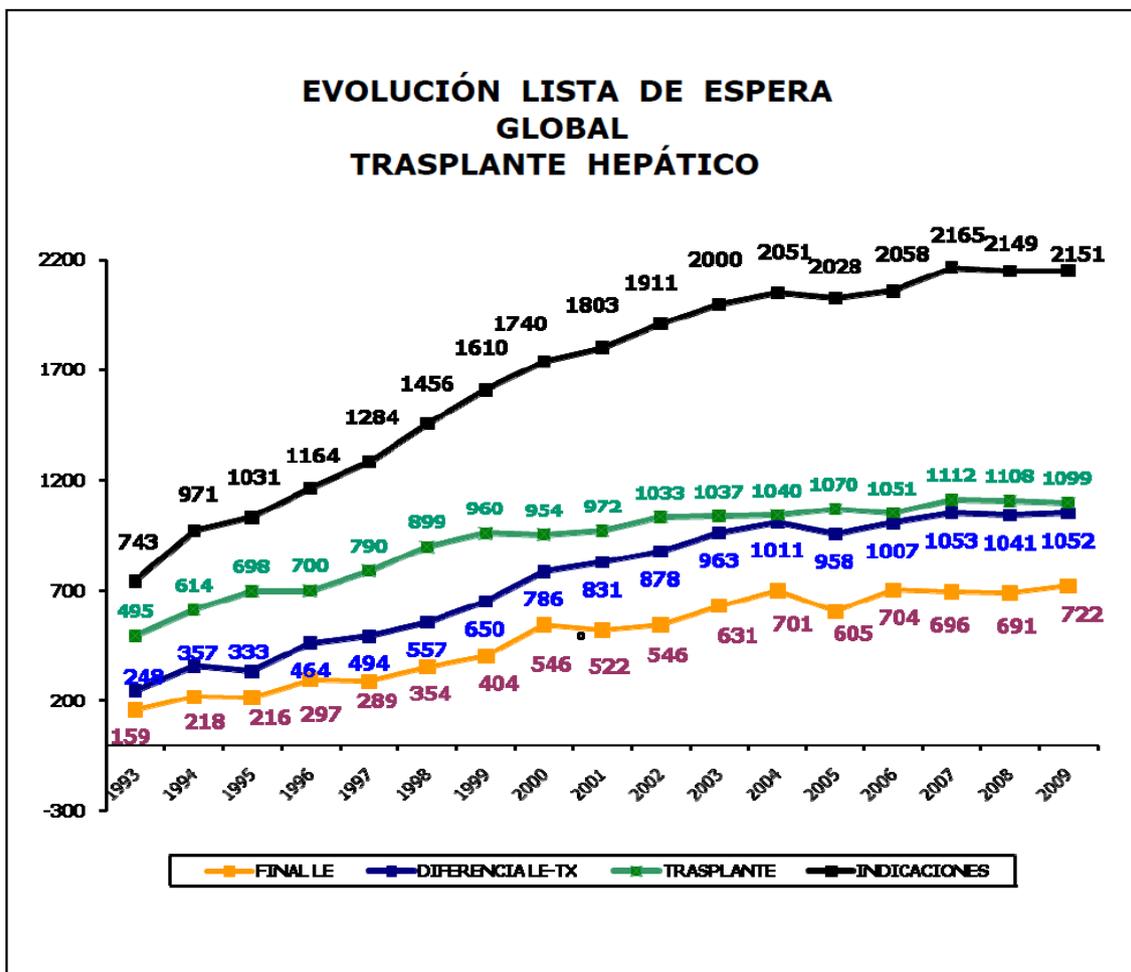


Gráfico 5: Evolución de la lista de espera, de los trasplantes realizados y de las indicaciones en los últimos 15 años (fuente: ONT)

Todos estos datos repercuten en el tiempo de espera en lista, que va incrementando igualmente cada año, y consecuentemente, la mortalidad en lista. Así, el tiempo medio en lista de espera en 2009 es de 133 días. Está claro que existen muchas diferencias entre los diferentes centros trasplantadores, pues la actividad en algunos es mucho mayor que en otros, con un tiempo en lista también mucho mayor que otros. De todas formas, a nivel global, en España el porcentaje de los pacientes que se trasplantan antes de los 3 meses no llega al 50%.

2.2. Ampliación de los criterios de donación: Alternativas

Debido a la situación actual expuesta anteriormente, todos los esfuerzos se centran en aumentar lo máximo posible el número de donantes válidos para trasplante⁶
¹¹. Como ya hemos adelantado, esta evolución de la edad de los donantes viene dada, no sólo por la reducción de la mortalidad por accidentes de tráfico, sino también por una ampliación de los criterios de donación. Aparte de eliminar el límite de edad para los donantes de hígado¹², se ha visto, en estos años de experiencia clínico-quirúrgica, que injertos que eran considerados marginales hace unos años (por el grado de esteatosis, ...) mantienen una funcionalidad correcta tras el trasplante. Además, se aceptan donantes con serología positiva para VHC hasta los 50 años, donantes con infecciones sistémicas tratadas y controladas en las últimas 48 horas previas a la extracción y también donantes con historia de neoplasia antigua estando libres de enfermedad por lo menos 5 ó 10 años (excepto para cáncer de mama, melanoma y neoplasias hematológicas)¹³⁻¹⁵.

Aparte de ampliar los criterios para considerar un injerto válido para el trasplante, se han buscado alternativas al tipo habitual de trasplante a partir de donante en muerte encefálica¹⁶. Esto ha dado lugar a 4 tipos de trasplante: el trasplante de donante vivo, el trasplante “Split” o bipartición hepática, el trasplante “Dominó” en pacientes con polineuropatía amiloidótica familiar (PAF) y el trasplante de donante a corazón parado (DCP).

De esta forma se ha conseguido que, a pesar de que el trasplante a partir de muerte encefálica siga siendo el predominante, las alternativas que acabamos de mencionar representen el 6,5% del total de los trasplantes realizados en 2009 en España. Así, de los 1099 trasplantes realizados en España en 2009, 1032 correspondían a donantes de muerte encefálica, y 67 a trasplantes “alternativos”. De estos 67 hubieron 29 trasplantes de donante vivo, 20 trasplantes de donante a corazón parado, 11 trasplantes “Dominó” y 7 trasplantes “Split”. Esta cifra es levemente superior que en los años anteriores, que se situaban en 61 en el año 2006 y 63 en 2005, con un incremento más acelerado en el caso del donante de corazón parado: 6 en 2005, 11 en 2006 y 17 en 2007².

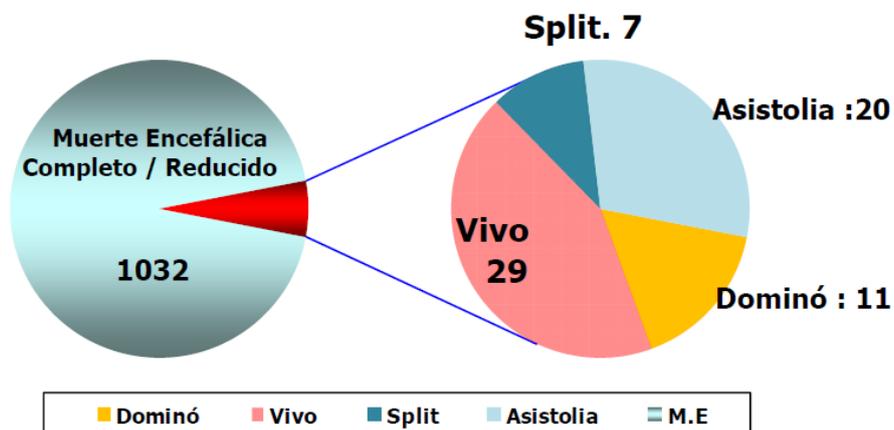


Gráfico 6: Trasplante hepático: Actividad en 2009 según tipo de donante (fuente: ONT)

2.2.1. Donante vivo (THDV)

El primer trasplante hepático de donante vivo (THDV) en España se realizó en julio de 1993 en el Hospital La Paz de Madrid, por el equipo de Juan Vázquez¹⁷. Hasta el año 2000 la actividad de este tipo de trasplante fue anecdótica: 2 en 1993, 1 en 1994 y en 1995, 2 en 1998, y ninguno en 1996 ni en 1999. En el año 2000 se realizaron en España 10 THDV y en 2009 se han realizado 29. La cifra récord se sitúa en 2002, que se realizaron 41 THDV. Actualmente, en España, esta modalidad de trasplante representa el 2,8% del total de trasplantes hepáticos realizados. A nivel internacional, esta cifra es muy variable, dependiendo de la actividad trasplantadora de cada centro, sobrepasando algunos el 50%. En Estados Unidos representa el 4,3%, y en Europa, los países con mayores porcentajes de THDV respecto al número total de trasplantes hepáticos son Bélgica (7,6%), Alemania (7,8%), antigua Yugoslavia (8,2%), Austria (8,5%), Bulgaria (10%), Rumanía (15%) y Turquía (64,3%).

En este tipo de trasplante, en nuestro medio y en la mayoría de países occidentales se realiza una partición utilizando como injerto el hígado derecho del donante. Posee la ventaja de tratarse de un procedimiento electivo, en el que se realiza primero una validación del donante propuesto (por compatibilidad de grupo, valoración psicológica y médico-quirúrgica) y posteriormente un exhaustivo estudio anatómico-radiológico por medio de Resonancia Magnética (RMN hepática) o TAC. Con esta prueba se realiza primero un estudio volumétrico de ambos lóbulos hepáticos (el derecho a implantar y el izquierdo remanente) para valorar e intentar descartar la aparición de un posible síndrome de “small-for-size” ó insuficiencia hepática por hígado

pequeño¹⁸. Está aceptado como ratio de confianza entre peso del injerto y peso corporal una cifra mayor a 0,8. Aparte del estudio volumétrico se realiza un estudio sobre la distribución vascular de vasos sanguíneos aferentes (arteriales y portales), de drenaje (venosos) en la vena cava y biliares, para realizar el planteamiento quirúrgico adecuado previo a la intervención (en cuanto a posibles reconstrucciones ó plastias).

La mayor controversia en el THDV viene dada por las consideraciones éticas, al someter a un sujeto sano (el donante) a un procedimiento quirúrgico mayor que no está exento de posibles complicaciones, incluso de una potencial mortalidad. Aún cuando no existiese morbimortalidad alguna, se trata de una agresión quirúrgica importante¹⁹.

En España hay en la actualidad 6 hospitales con programa de donante vivo activo. Estos son: Hospital La Paz de Madrid, Hospital Clínic de Barcelona, Hospital Doce de Octubre de Madrid, Hospital Doce de Octubre Infantil, Hospital Reina Sofía de Córdoba y Clínica Universitaria de Navarra².

En nuestro centro, desde que se iniciara el programa en el año 2000, hemos realizado 70 THDV, y, como vemos en la literatura científica internacional, las complicaciones se observan sobre todo por problemas a nivel de la vía biliar^{20,21}: fugas biliares, estenosis biliares tardías, ... Al igual que en los demás centros, la tasa de complicaciones biliares está en torno al 30-35% de los casos.

2.2.2. *Split (infantil-adulto)*

El trasplante “Split” ó bipartición hepática consiste en realizar una división del hígado del donante para poder implantar dos injertos en dos receptores diferentes. Se utilizan los segmentos II-III para implantar en un receptor pediátrico, y el injerto remanente en un receptor adulto²². Cuando se ha realizado una partición en lóbulos hepáticos izquierdo (I-IV) y derecho (V-VIII) para implantar en dos receptores adultos, hay una mayor probabilidad de que aparezca un síndrome de “small-for-size” puesto que no se suele disponer del estudio volumétrico previo (como en el THDV) y las variaciones anatómicas suelen ser hallazgos intraoperatorios. Por estas razones, suele utilizarse la opción de receptor infantil-adulto, y restringirse este tipo de trasplante a centros con población pediátrica.

Esta modalidad de trasplante se realiza actualmente en 5 hospitales de España: Hospital La Paz de Madrid, Hospital 12 de Octubre de Madrid, Hospital La Fe de Valencia, Hospital Vall d’Hebrón y Hospital Vall d’Hebrón Infantil. En el año 2009 se realizaron 7 trasplantes “Split” en España.

2.2.3. *Dominó (PAF)*

El trasplante “Dominó” se realiza sobre todo (en España) en pacientes afectos de polineuropatía amiloidótica familiar (PAF) ó enfermedad de Andrade. Esta enfermedad es una forma hereditaria de amiloidosis sistémica. El hígado de estos pacientes tiene una estructura y una función normal, excepto en la producción de una variante amiloidogénica de transthyretina (TTR). La TTR en los pacientes con PAF es producida en su mayoría por el hígado, y el trasplante hepático elimina más del 95% de la TTR amiloidogénica de la circulación, considerándose actualmente el único tratamiento potencialmente curativo²³. La clínica en pacientes con PAF no suele aparecer antes de los 20 años, y en los receptores de un trasplante dominó es difícil de estimar cuando aparecerá la sintomatología sistémica. Esta clínica viene determinada por la afectación del sistema nervioso periférico y autónomo y por la afectación de diferentes órganos por el depósito patológico de sustancia amiloide.

En España la evolución en los últimos 10 años ha sido satisfactoria, pasando de 3 trasplantes “Dominó” en 1999 a 16 en 2007, disminuyendo a 11 el año pasado. Hay 8 centros que actualmente realicen esta modalidad de trasplante: Hospital Clínic de Barcelona, Hospital Virgen del Rocío en Sevilla, Hospital de Bellvitge, Hospital Ramón y Cajal de Madrid, Hospital Gregorio Marañón de Madrid, Hospital Carlos Haya de Málaga, Hospital 12 de Octubre y el Hospital Cruces de Bilbao.

Las características de este tipo de trasplante hace que los esfuerzos por ampliar el número de trasplantes a partir de esta modalidad queda totalmente limitada por el número de pacientes que entran el lista de espera con esta enfermedad. Por lo que no puede incrementarse más que la incidencia de PAF en lista de espera.

2.2.4. Trasplante de donante a corazón parado (DCP)

Los donantes a corazón parado (DCP) presentan una parada cardiaca irreversible antes de que se obtengan los órganos para el trasplante. Estos donantes son considerados subóptimos para el trasplante debido al periodo de isquemia caliente que sufren, que puede ser más o menos prolongado. Este periodo de isquemia caliente puede comprometer la viabilidad y la función del injerto tras el trasplante. El paso más importante para preservar los órganos de un DCP era considerado el enfriamiento más rápido posible de los órganos tras el cese de la circulación general, la declaración de la muerte y la obtención del consentimiento familiar. Tras la declaración de la muerte es necesario aplicar una técnica quirúrgica rápida para asegurar la viabilidad de los órganos.

Esta alternativa de trasplante es la que más está desarrollándose en los últimos años. Desde su inicio en 1995 (1 trasplante) hasta nuestros días (20 trasplantes en 2009), la evolución fue bastante “tímida” hasta 2003 (3 trasplantes), incrementándose posteriormente cada año de una forma importante. Actualmente en España existen 3 equipos que realizan este tipo de trasplante: Hospital 12 de Octubre de Madrid, Hospital Clínic de Barcelona y Hospital Juan Canalejo de La Coruña.

Detrás de estas cifras hay un importante trabajo desarrollado por los equipos de Coordinación de Trasplantes de cada centro, así como de los Servicios de Emergencia (SEM), Urgencias Hospitalarias y Servicios de Cirugía implicados. Este trabajo conjunto está dando como resultado un aumento en los donantes de este tipo, sobre todo a partir de 2001, con 18 donantes, llegando a 148 donantes en 2009. Antes de 2001, la

cifra de donantes rondaba entre 20 y 40. Este incremento en el número total de donantes de corazón parado se correlaciona con un incremento paralelo en la tasa de donación por millón de población, pasando de 0,4 en 2001 a 1,9 pmp en 2007. Porcentualmente, este tipo de donante ha pasado de representar el 1,3% de todas las donaciones en 2001 al 6,7% en 2009. La evolución de los DCP es esperanzadora para aumentar el pool de donantes y paliar o suavizar la situación actual.

3. Donación a corazón parado (DCP)

3.1. Clasificación DCP

Desde los principios de la historia del trasplante, con los éxitos iniciales de gemelos idénticos, la principal fuente de riñones fueron, de hecho, donantes a corazón parado. Pacientes traumáticos con importante daño cerebral eran llevados al quirófano. Cuando los cirujanos se habían lavado, vestido, y preparado el campo quirúrgico, entonces se retiraba la ventilación asistida y se esperaba la parada cardiaca. En ese momento se realizaba una laparotomía para realizar la extracción renal. Los resultados del trasplante renal realizado no eran muy buenos, tan solo aceptables. Esto no era debido únicamente al daño isquémico, sino también al importante desconocimiento en la época sobre terapia inmunosupresora. Muchos pacientes sufrieron una disfunción tardía de sus injertos renales, y esta llamada necrosis tubular aguda (NTA) realmente ocultaba y retrasó el descubrimiento del diagnóstico de rechazo.

Se realizaron muchos estudios para intentar averiguar cómo poder mejorar y, sobre todo, predecir la función de estos riñones procedentes de donantes a corazón parado^{24,25}. Se desarrollaron entonces varias máquinas de preservación, y tests de laboratorio²⁶.

Con la introducción del concepto de muerte encefálica, los riñones podían ser extraídos de donantes a corazón batiente. Los riñones a partir de estos donantes funcionaban mejor, y se abandonaron las extracciones de DCP. La histórica publicación de Terasaki y Opelz²⁷ en la que demostraban que el almacenamiento en frío (cold storage) era tan beneficioso como las máquinas de preservación existentes, en donantes de muerte encefálica, provocó el abandono también de estas máquinas.

Hasta 1982, iba empeorando el problema de la falta de donantes de riñón, por lo que poco a poco se fue reintroduciendo el concepto de pool de donante de corazón parado. No fue hasta 1989 que no se volvieron a sentar unas bases sobre la donación a corazón parado. Y en 1993, al recuperar las máquinas de preservación, se volvió al mismo punto donde se había abandonado este tipo de donación en los años 70.

En el donante a corazón batiente, el diagnóstico de muerte está basado en criterios cerebrales, y el concepto es llamado “Muerte Encefálica” (ME). Dependiendo del país, pueden existir diferencias importantes en cuanto a este mismo término, en cuanto al punto de vista médico, legal o cultural. En los DCP, la muerte cardíaca hace referencia a la parada cardíaca irreversible.

En 1995, en el Primer Workshop Internacional sobre DCP realizado en Maastricht, se desarrolló un documento de consenso para definir y clasificar los diferentes tipos de DCP²⁸.

Se establecieron 4 categorías de potenciales DCP:

Tipo 1: Llegada al hospital muerto (“dead on arrival”); no se suele utilizar ya que se desconoce exactamente el tiempo de isquemia caliente desde el suceso hasta su llegada al hospital, así como las causas de la muerte,...

Tipo 2: Resucitación no efectiva (unsuccessful resuscitation); es una nueva categoría contemplada en esta Reunión Internacional, ya que en los inicios de la historia del trasplante los DCP que se utilizaban eran controlados.

Tipo 3: Retirada del ventilador; es la categoría ya conocida y utilizada antaño. Ya se tenía experiencia con esta categoría.

Tipo 4: Pacientes con diagnóstico de muerte encefálica, o durante el proceso de muerte encefálica, que tienen una parada cardíaca en la que la resucitación no es efectiva.

Existen dos tipos fundamentales de DCP: no controlados y controlados.

Los DCP controlados (tipo 3) son pacientes hemodinámicamente estables que son extubados en el quirófano o en la Unidad de Cuidados Intensivos tras la decisión de los familiares del paciente de cesar medidas activas terapéuticas y habiendo firmado un consentimiento informado para la donación de órganos. La parada cardiorrespiratoria (PCR) es un evento planificado en el cual el equipo quirúrgico de extracción de órganos está presente para realizar el procedimiento rápidamente con el fin de disminuir al máximo el tiempo de isquemia caliente

Los DCP no controlados (tipos 1 y 2) son pacientes en los que la PCR es un evento no planificado. Son pacientes que sufren una PCR antes de su llegada al hospital, en el Servicio de Urgencias, o estando ingresados.

La obtención de órganos de DCP controlados tiene lugar en el quirófano, donde se procede a la retirada del soporte vital ventilatorio con la consiguiente parada cardíaca, con el equipo extractor de órganos presente. Obviamente, los órganos obtenidos de DCP controlados son comparativamente menos propensos a sufrir daño isquémico y suelen presentar una mejor función postoperatoria.

Los pacientes en muerte encefálica que sufren una PCR en la UCI o durante el traslado al quirófano (tipo 4) también son considerados no controlados.

El mismo año 1995, la ONT elaboró su propio documento de consenso estableciendo las directrices del DCP, recomendando excluir la categoría III debido a razones éticas, en espera de regulaciones legales al respecto. La nueva legislación sobre DCP de 1999 no regula de forma específica la categoría III, por lo que sigue inactiva hoy día en España²⁹.

3.2. Estado actual

Durante la pasada década la supervivencia del injerto hepático procedente de DCP ha sido pobre (17-41%) pero trabajos recientes utilizando criterios estrictos están mejorando mucho los resultados. La supervivencia del injerto hepático procedente de DCP controlados ha ascendido desde un 50 a un 100% al año de seguimiento³⁰⁻³².

La selección de un donante adecuado es crucial para el éxito del trasplante hepático. El objetivo de la evaluación del donante de hígado es identificar aquellos órganos que tienen elevadas probabilidades de funcionar adecuadamente y rechazar aquellos que previsiblemente fracasarán. Entre los factores más destacados del donante que pueden influir en la aparición de una mala función inicial o un fallo primario del injerto se encuentran: la edad avanzada del donante, un tiempo prolongado de isquemia, episodios de hipotensión y soporte inotrópico del donante, la esteatosis hepática y el uso de DCP.

El tiempo de preservación hipotérmica o isquemia fría (0-4°), que se realiza utilizando soluciones de preservación como la solución de Wisconsin para disminuir la actividad metabólica de los órganos, es uno de los parámetros más importantes que determinan la viabilidad posterior del injerto. De este modo, es bien conocido como los periodos superiores a 18 horas de isquemia fría se asocian con una elevada incidencia de fallo funcional del injerto hepático. Además, esta disfunción primaria del injerto hepático, que puede presentarse hasta en el 2-23% de los trasplantes, es una de las principales causas de muerte tras el trasplante.

La severa escasez de donantes hepáticos hace que sea muy difícil limitar la selección de donantes a aquellos con características impecables. El uso de donantes con criterios expandidos, como los DCP se ha convertido en una necesidad en el momento actual ya que pueden representar una fuente importante de órganos si son recuperados para el trasplante con una técnica de preservación eficaz.

En los últimos años, los DCP han representado aproximadamente el 1% del total de órganos cadavéricos en Estados Unidos³³, pero algunas estimaciones establecen que los DCP tienen la capacidad de incrementar el número de donantes cadavéricos hasta en un 25-42%^{34,35}. En España, el número de hígados que se han desestimado para realizar el trasplante ha ido aumentando en los últimos años hasta ser de 380 el año pasado, siendo la principal causa la esteatosis hepática.

En 2009, en el Hospital Clínic de Barcelona, se activaron 72 códigos 303 (llegada de una ambulancia con soporte avanzado con un paciente que podría ser un DCP), de los cuales hubieron 69 casos potenciales, siendo finalmente 24 los donantes de órganos. En la evaluación de estos casos, potenciales donantes hepáticos fueron 14, llegándose a trasplantar finalmente 4. De los 80 trasplantes de hígado realizados en nuestro centro en 2009, los DCP representan el 5%. De los 69 DCP potenciales durante el año 2009 únicamente se obtuvieron 4 hígados, lo que representa tan sólo el 5,8%. Es evidente que el mantenimiento adecuado de los órganos procedentes de DCP es el determinante fundamental de su viabilidad y constituye la clave para poder recuperar dichos órganos para el trasplante.

3.3. Experiencia Clínica

3.3.1. Estados Unidos

Los DCP no controlados representan el mayor pool de potenciales donantes de corazón parado y las estimaciones realizadas calculan un posible aumento de 5000 donantes por año en los EEUU^{36,37}. Sin embargo, existen importantes cuestiones éticas, legales y logísticas que hacen que se excluyan en gran medida el uso de estos donantes en los Estados Unidos. Los DCP controlados no presentan toda esta problemática, y tienen la potencialidad de incrementar en 1000 los donantes por año^{35,38}. A pesar de ello, este grupo está infrautilizado, pudiendo ser una fuente interesante de órganos.

Hace pocos años, en 2001, se realizó un estudio a partir de los datos de la United Network of Organ Sharing (UNOS). Se analizaron todos los trasplantes hepáticos realizados en adultos desde abril de 1987 hasta diciembre de 2001. El concepto de DCP se introdujo en las bases de datos de la UNOS en el año 1993³. Se excluyeron del estudio los trasplantes parciales (“Split”), retrasplantes y trasplantados multiorgánicos. Se trataba de un estudio centrado en la supervivencia del injerto y la supervivencia del paciente³⁰.

Entre 1993 y 2001 se realizaron 191 trasplantes de DCP, con un incremento en la utilización de esta modalidad en los últimos años (pasando del 0,26% en 1003 a 1,1% en 2001). Se realizaron 26.856 donantes de muerte encefálica (ME). La supervivencia

del injerto fue significativamente menor en los DCP comparado con los donantes de ME. Así, al año y a los 3 años, la tasa de supervivencia del injerto en los DCP era de 70,2% y 63,3% respectivamente, frente a los donantes de ME, con tasas de 80,4% y 72,1% ($p = 0,003$ y $p = 0,012$).

Asimismo, los receptores de un injerto procedente de un DCP presentaban mayor incidencia de fallo primario del injerto (11,8% vs 6,4%, $p = 0,008$) y de retrasplante (13,9% vs 8,3%, $p = 0,04$) comparado con los receptores de injerto procedente de donante por ME. Dentro del grupo de DCP, se hallaron como factores predictores de fallo primario del injerto precoz el tiempo prolongado de isquemia fría y el soporte vital que precisó el receptor (utilización de drogas vasoactivas y de ventilación mecánica asistida).

Aunque no existían diferencias estadísticamente significativas en la supervivencia del paciente, existía una fuerte tendencia desfavorable en los DCP: al año y a los 3 años, la supervivencia en los DCP era de 79,7% y 72,1% versus 85,0% y 77,4% en los de ME ($p = 0,082$ y $p = 0,146$).

Se concluyó que la supervivencia del injerto y la supervivencia del paciente era menor en los trasplantes de DCP; y que, a pesar de que los DCP podían constituir una fuente importante de órganos, se aconsejaba utilizarlos en pacientes estables y minimizando en lo posible el tiempo de isquemia fría.

Es interesante analizar también, en la experiencia de los centros americanos con DCP controlados, la morbilidad asociada, comparada con trasplantes de ME. La presencia de una isquemia caliente inicial, seguida una isquemia fría provoca una mayor

incidencia de complicaciones de la vía biliar en los trasplantes de hígado procedente de DCP. Esto es debido a que el epitelio biliar es la estructura supuestamente más sensible del hígado al daño isquémico. De hecho, en el trabajo de Abt de 2003³⁹ se describen complicaciones biliares mayores en el 33% de los trasplantes de DCP vs 19,2% en los de ME ($p < 0,01$). Entre las complicaciones biliares, las más frecuentes 66% fueron las estenosis biliares intrahepáticas difusas de causa isquémica.

3.3.2. Madrid / La Coruña

Como ya hemos explicado previamente, en España no se realizan extracciones de donantes a corazón parado controlados, siendo utilizados los tipo II de la categoría de Maastricht. Son 3 centros los que realizan extracciones de este tipo de donantes, utilizando 3 métodos diferentes de mantenimiento, como veremos.

El equipo del Hospital Clínico San Carlos de Madrid tiene un programa activo de donación a corazón parado desde 1989^{40,41}. Coordinados con el SAMUR y el 061 reciben pacientes en código de parada cardiaca irrecuperable, o pacientes intrahospitalarios en sala convencional o de Cuidados Intensivos. Es un programa muy activo sobre todo a nivel de donación de riñones y de tejidos, aunque también realizan extracciones de hígado y de pulmones. Los criterios de inclusión que utilizan son:

- Tiempo de parada cardiaca conocido
- Maniobras de reanimación cardiopulmonar (RCP) instauradas en los primeros 10 minutos tras el evento
- Edad entre 7 y 55 años (7-40 para hígado y 7-50 para pulmón)
- Causa de muerte conocida o supuesta
- Ausencia de heridas sangrantes en abdomen y tórax
- Aspecto saludable sin evidencia de factores de riesgo de SIDA
- Tiempo de asistencia < 90 minutos (incluido el traslado al hospital)
- Ausencia de traumatismo torácico (en caso de extracción pulmonar)

Tras realizar una canulación de vasos femorales, se instaura un circuito de bypass cardiopulmonar, con recirculación de sangre oxigenada hipotérmica a 4°C.

El Hospital Doce de Octubre de Madrid inició el programa de trasplante de donación de corazón parado en junio de 1995. En una publicación reciente⁴² describen los trasplantes hepáticos realizados a partir de injertos procedentes de DCP en el periodo comprendido entre enero de 2006 y diciembre de 2007.

Utilizando la misma metodología de nuestro centro –que explicaremos en el siguiente apartado-, se realizaron en el hospital madrileño 20 trasplantes de hígado de DCP en estos 2 años, correspondiendo a la categoría 2 de la clasificación de Maastricht. Tras la parada cardiaca y el traslado del paciente al Servicio de Urgencias, se inicia la Recirculación Normotérmica (RCN o NECMO) como periodo-puente antes de la extracción hepática.

Los factores de inclusión de los donantes son:

- Edad < 50 años
- Tiempo de parada circulatoria < 15 minutos
- Tiempo de isquemia caliente < 150 minutos
- Tiempo de Recirculación Normotérmica (RCN) < 270 minutos
- Flujo de bomba comprendido entre 2,5 y 3,5 L/minuto
- Valor de transaminasas < 4 veces el límite superior

Con un seguimiento medio de 330,4 ±224,9 días, la supervivencia acumulada del paciente al año fue de 85,5% y la supervivencia acumulada del injerto al año fue de 80%.

De los 20 pacientes incluidos en este periodo, hubo 1 paciente (5%) que desarrolló una colangiopatía isquémica. En 2 pacientes (10%) hubo un fallo primario del injerto (FPI), con pérdida del injerto. Se tuvieron que retrasplantar a 3 pacientes (15%), 2 de ellos debido al FPI y el tercero debido a la colangiopatía isquémica.

El equipo del Hospital Juan Canalejo de La Coruña empezó el programa de donación a corazón parado hace ya más de 10 años⁴³. Entre diciembre de 1995 y noviembre de 2004 se extrajeron 10 hígados para trasplantar. Los donantes se mantuvieron utilizando un método de compresión-descompresión de tórax y abdomen. Este método se aplica desde que se establece el diagnóstico de muerte cardiaca, hasta la extracción de órganos. Consiste en la colocación de un cardiocompresor, asistido de una contrapulsación abdominal, para mejorar las maniobras de RCP. Durante todo este tiempo el donante está bajo ventilación mecánica. Hasta el momento de la extracción, para considerar efectivas las maniobras de mantenimiento de RCP, la presión arterial media debe mantenerse en torno a 70 mmHg y la pO₂ cercana a 100%. Tras la heparinización sistémica, se realiza una extracción en bloque para dar lugar al trabajo en cirugía de banco.

De los 10 pacientes trasplantados en este periodo, uno presentó un fallo primario del injerto, precisando de un retrasplante, con buena función posterior. Los otros 9 siguieron un curso postoperatorio satisfactorio. El seguimiento posterior muestra un funcionalismo correcto en todos los trasplantados, excepto 1 paciente, que murió a los 3 años, tras la recidiva de su VHC.

3.4. Hospital Clinic de Barcelona

3.4.1. Experiencia animal

En 1993 se inició el proyecto de cirugía experimental en modelo porcino con el objetivo de reproducir el trasplante hepático a partir de un donante a corazón parado. Dicho modelo se basaba en la utilización de 4 grupos de animales con diferentes tiempos de parada cardiaca (PC) (20, 30 y 40 minutos). Tras este periodo se iniciaba un periodo de 20 minutos de recirculación normotérmica (RCN) a 37°C (el 4º grupo no entraba en este periodo). La RCN se realizaba por medio de un sistema de bypass cardiopulmonar (CPB). Posteriormente se iniciaba el enfriamiento corporal total (TBC) de forma progresiva hasta llegar a una temperatura de 15°C. Se realizaba posteriormente la extracción hepática y su conservación en frío a 4°C durante 6 horas, tras perfundir el injerto hepático con solución de Wisconsin (UW). Entonces se realizaba el implante hepático en otro animal, y se mantenía con la medicación inmunosupresora, antibióticos, analgesia, etc... durante 5 días si sobrevivía, para realizar una eutanasia electiva. Durante todo el procedimiento se realizaban mediciones analíticas, mediciones de flujo, toma de muestras hepáticas, y valoraciones de carga energética. Además, se pudieron realizar manipulaciones durante el periodo de RCN, añadiendo sustancias citoprotectoras, para poder valorar su efecto contra la lesión por isquemia/reperfusión (IR).

De los resultados obtenidos se obtuvieron importantes trabajos que han tenido una repercusión clínica importante, como el hecho de que se implante en muchos grupos el uso de la RCN en los pacientes DCP.

Se pudieron observar interesantes resultados al analizar los resultados.

Aparte de encontrar una técnica factible y reproducible⁴⁴, se conseguía una supervivencia del injerto a los 5 días utilizando esta técnica, evidenciando la reversibilidad de las lesiones histológicas de IR producidas por la PC^{45,46}, incluso un incremento en la carga energética al realizar el periodo de RCN^{47,48}. El uso de este periodo de RCN tras un periodo más o menos prolongado de PC mejoraba la supervivencia.

También resultó interesante la posibilidad de manipulación durante el periodo de RCN, utilizando sustancias citoprotectoras:

El S-Adenosyl-L-Methionine (SAME) es un buen agente de preservación para células hepáticas lesionadas por isquemia, tanto parenquimatosas como no-parenquimatosas (endoteliales), mediante el aumento de los niveles intracelulares de glutation. Su utilización tras el periodo de PC se relacionaba con un aumento en la supervivencia y una mejoría en los niveles de marcadores de lesión. A nivel histológico, la administración del SAME durante la RCN prevenía la lesión histológica a nivel de

endotelio hepático, parénquima hepático y tracto biliar⁴⁹; el rol del SAME podría estar mediado parcialmente por el efecto de la adenosina durante la extracción hepática⁵⁰.

La L-arginina es un precursor fisiológico del ácido nítrico, el cual es efectivo disminuyendo la lesión por IR. La utilización de esta sustancia durante el periodo de RCN aumentó la supervivencia y mejoró significativamente el daño histológico producido tras la isquemia caliente, preservando el tracto biliar^{51,52}.

La glicina es otra sustancia citoprotectora, que actúa frente a la lesión por IR mediante la estabilización de la membrana celular y la prevención de la liberación de prostanoïdes y de citoquinas inflamatorias (lo que dificulta la reperfusión del injerto). A nivel hemodinámico, tras administrar glicina, los flujos hepáticos y de bomba mejoraron durante la RCN (indicando una mejor perfusión hepática durante su extracción). A nivel histológico, la mejorada perfusión hepática durante la RCN se relacionaba con un menor daño hepatocitario y del endotelio sinusoidal. La viabilidad hepática valorada histológicamente también mejoraba en los hígados tratados con glicina durante la RCN, reduciendo la presencia de colangitis isquémica, lo que empeoraba la supervivencia a largo plazo en el grupo control; en el grupo tratado había una mejoría en la supervivencia a los 5 días⁵³.

De todos estos resultados se desprende:

1. Utilidad de la RCN. Modo de Acción: Precondicionamiento isquémico

El mantenimiento de los DCP mediante recirculación normotérmica ha demostrado tener gran utilidad frente al enfriamiento corporal total tras la parada cardíaca. De este modo se puede mantener el hígado a temperatura corporal sin enfriarlo antes de la extracción. El beneficio de la recirculación normotérmica se fundamenta en que transforma el periodo de isquemia caliente inicial del órgano tras la parada cardiorrespiratoria en un periodo de precondicionamiento isquémico, habiéndose demostrado que produce un aumento en los niveles de adenosina.

2. Posibilidad de manipulación

Está demostrada la ventaja de poder utilizar sustancias citoprotectoras durante el periodo de RCN, tanto a nivel de supervivencia como de prevención de lesión en el injerto. Esto multiplica la potencialidad del uso de la RCN en un DCP tras el periodo de parada cardíaca.

3.4.2. Experiencia Clínica

3.4.2.1. Protocolo de Donantes a Corazón Parado del Hospital Clinic de Barcelona

Criterios de Inclusión

- Edad:
 - a. Donante renal: ≤ 65 años. En los potenciales donantes entre 61 y 65 años se realiza una evaluación individualizada. Los riñones generados y no aceptados por nuestro equipo se ofertan a otros centros.
 - b. Donante hepático: ≤ 65 años. En los potenciales donantes de 51 hasta 65 años se hace una valoración particular de cada caso, teniendo en cuenta diferentes factores como: antecedentes patológicos, tiempo de isquemia caliente, bioquímica de ingreso y curva evolutiva, etc.
 - c. El límite inferior de edad es de 14 años o 40 kg de peso (debido al tamaño de las cánulas y al circuito de recirculación extracorpórea).
- Ausencia de contraindicación absoluta para la aceptación del donante de órganos (VIH+, sepsis o infección sistémica activa descontrolada o no tratada, neoplasia activa (salvo excepciones)).
- Ausencia de serología positiva para Ac VHC y Ag VHBs.
- Patología asociada: a valorar en cada caso.
- Patología causante de la muerte: valorar si puede afectar la viabilidad de los órganos.
- Ausencia de evidencia de criminalidad o muerte violenta no aclarada.

Además, según el tipo de donante a corazón parado, también se valoran los siguientes criterios para su aceptación:

Donantes Extrahospitalarios

- PCR sin RCP (Reanimación cardiopulmonar) efectiva ≤ 30 minutos (20 minutos para donantes hepáticos). El inicio de la PCR debe ser conocido.
- Intervalo desde la asistolia hasta el inicio de la preservación de los órganos (RCN) ≤ 150 minutos, manteniendo RCP efectiva.
- Ausencia de Inestabilidad hemodinámica previa a la PCR.

Donantes Intrahospitalarios

- Función renal y hepática normal previa a la inestabilidad hemodinámica que conduce a la PCR.
- Inestabilidad hemodinámica (TAS < 60 mmHg) previa a la PCR < 60 minutos.
- PCR sin RCP/Cardiocompresor < 15 minutos.
- Intervalo desde el inicio de la inestabilidad hemodinámica hasta el inicio de la preservación de los órganos (RCN) ≤ 150 minutos, manteniendo RCP efectiva.
- Días de UCI, dosis de drogas vasoactivas y otros factores durante ingreso a valorar en cada caso.

Los diversos periodos de tiempo establecidos para la aceptación de los donantes se deben seguir de forma estricta y sin sobrepasar sus límites.

Proceso obtención de órganos de DCP

Ante un Soporte Vital Avanzado asistido por los Servicios de Urgencias del SEM, y tras la no recuperación del paciente después de 30 minutos de maniobras de RCP adecuadas, puede ser activado a través de la Central de Coordinación 061 el Protocolo de “Soporte Vital Avanzado Prolongado”.

La Central de Coordinación del SEM alerta a Coordinación de Trasplantes y al Servicio de Urgencias del H. Clínic del traslado de un paciente en asistolia, con la realización de maniobras de reanimación cardiopulmonar avanzada, manual o mecánica mediante el dispositivo de cardiocompresión móvil LUCAS® (Lund University Cardiopulmonary Assist System).



Figura 1: Lund University Cardiopulmonary Assist System (LUCAS®)

El diagnóstico de la muerte ha de ser un diagnóstico clínico y eléctrico (registro electrocardiográfico demostrativo de asistolia durante 5 minutos).

Continuación de las maniobras de masaje cardiaco y ventilación mecánica, que se llevan a cabo con el pistón mecánico de compresión y descompresión activa (Cardio-pump) y conexión a una fuente de oxígeno.



Foto 1: Cardiocompresor mecánico

Se evalúa si el caso es o no judicial, edad, antecedentes médicos y quirúrgicos, historia médico-social, tratamientos previos, tiempo de isquemia caliente sin maniobras de RCP, tiempo de isquemia caliente con maniobras de RCP.

Se inicia entonces la monitorización del paciente y la notificación judicial (si fuera necesario).

Seguidamente se avisa a los miembros de trasplante hepático y renal y se extraen muestras de sangre, orina y contenido gástrico. La administración inicial de fármacos corresponde a heparina sódica endovenosa (3mg/kg y reheparinización cada 90 minutos a 1,5 mg/kg) y pantoprazol 40mg en bolus y perfusión de 8mg/h.

Se procede entonces a la cateterización de arterias y vena femorales e inicio de la Recirculación Normotérmica.

La obtención del consentimiento familiar y realización de la historia médico-social se continúa con la solicitud de la autorización judicial para la extracción de los órganos y tejidos.

La recirculación se mantiene hasta la perfusión de los órganos. Se comprueba el correcto enfriamiento de los órganos y el aspecto macroscópico, una vez perfundidos con el líquido de perfusión. También se comprueba la viabilidad de los órganos tras corroborar los tiempos de isquemia caliente y las determinaciones analíticas. En caso necesario se realizan biopsias de los diferentes órganos y/o tumoraciones, necropsia post-operatoria inmediata, utilización de la máquina de perfusión pulsátil, etc.

Preservación de los órganos del cadáver: Recirculación normotérmica

Para la realización de la cateterización de los potenciales donantes a corazón parado se avisa al cirujano que está disponible para dicha canulación.



Foto 2: Canulación de vasos femorales e inicio de recirculación normotérmica

El cirujano cateteriza la arteria y vena femorales de un lado y la arteria femoral del lado contralateral para colocar el catéter de Fogarty®. Paralelamente el coordinador de trasplantes conecta el circuito de recirculación extracorpórea y ceba el circuito. El cebado se lleva a cabo con 2000 ml de suero:

- 500 ml de Bicarbonato 1/6 Molar
- 500 ml de Manitol 10%
- 500 ml de Plasmalyte
- 500 ml de Gelafundina

Una vez preparadas las cánulas arterial y venosa se entregan al cirujano y se conectan a los catéteres introducidos a nivel de los vasos femorales.

El balón del Fogarty® debe ser inflado con unos 30 ml de solución estéril de contraste. Posteriormente debe realizarse una radiografía de tórax portátil, para comprobar la oclusión completa de la aorta torácica a nivel supra-diafragmático.

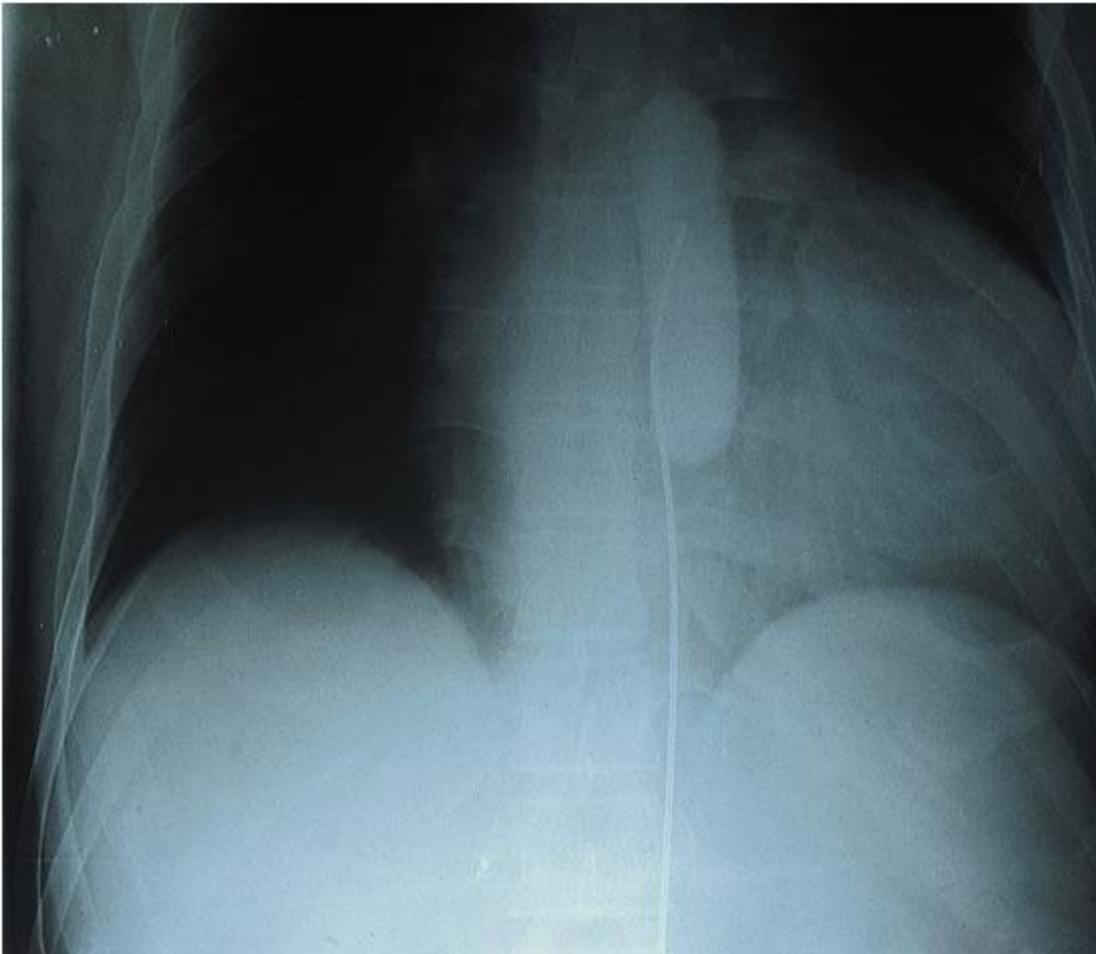


Foto 3: Radiografía de tórax de comprobación de la posición correcta del balón del catéter de Fogarty® en aorta torácica descendente

Cuando el circuito está conectado, se desclaman las cánulas arterial y venosa y se pone en funcionamiento la bomba de rodillo.

Se mantiene la recirculación normotérmica a 37 °C y se intenta obtener un flujo de perfusión entre 1,7 y 2.5 L/min/m² de superficie corporal. El flujo mínimo constante que debemos mantener para considerar al donante como válido es de 1 L/min/m². La velocidad de perfusión viene determinada por el drenaje y el retorno venoso. Si es preciso podemos añadir más volumen de perfusión a través del reservorio venoso.

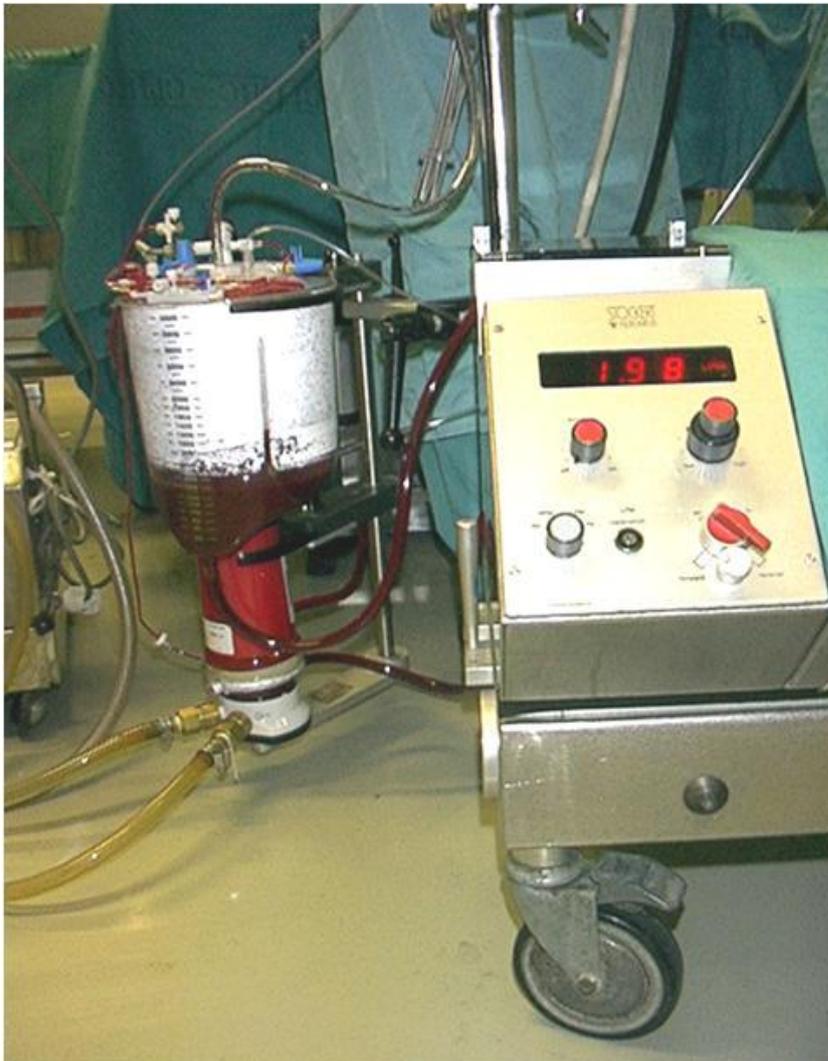


Foto 4: Reservorio sanguíneo y bomba de presión

La RCN se prolonga hasta la visualización macroscópica del hígado y riñones en quirófano y la posterior perfusión fría de los órganos con la solución de preservación.

Durante la fase de recirculación extracorpórea se realizan determinaciones seriadas de EAB, hematología, bioquímica hepática y renal. Dichas determinaciones deben realizarse cada 30 minutos. En caso necesario se realizan las correcciones precisas. Se debe reheparinizar cada 90 minutos con una dosis de 1,5mg/kg.

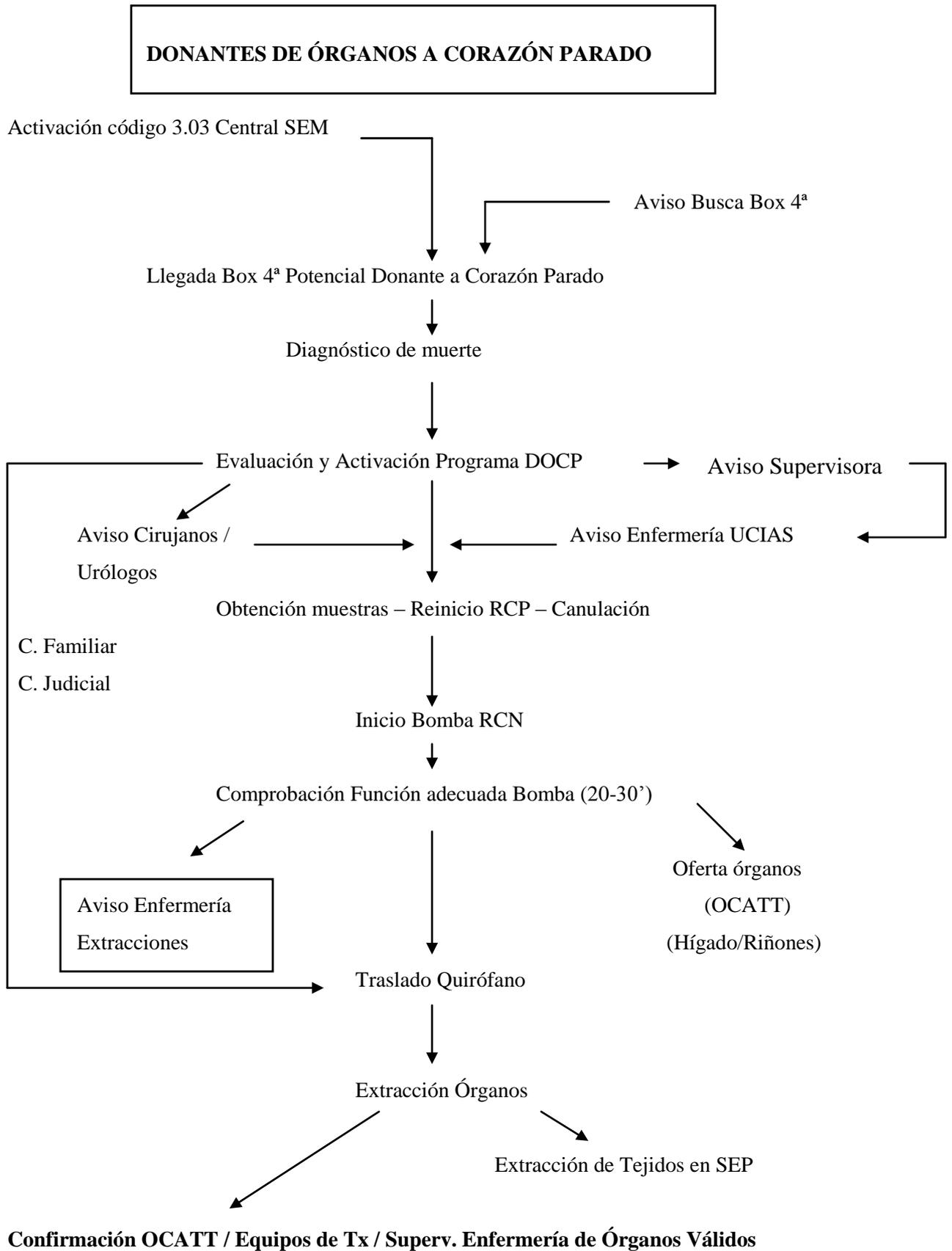
El tiempo mínimo de RCN es de 1 hora y el máximo hasta la extracción de los órganos es de 4 horas, pudiéndose alargar hasta 6 horas si los parámetros bioquímicos, gasométricos y hematológicos se mantienen controlados.

Una vez trasladado el donante a quirófano, se utiliza una técnica rápida de extracción de los órganos abdominales. Se procede a la perfusión de los mismos sin realizar una disección previa del hilio hepático, excepto por la sección de la vía biliar, próxima al duodeno, para su limpieza antes de la perfusión. Esta maniobra es, a su vez, útil para valorar la vascularización y el estado de la vía biliar. Para realizar la perfusión con la solución de preservación, únicamente se debe realizar la disección y canulación del acceso portal. La perfusión arterial se realiza por el catéter previamente colocado por la vía femoral. No es necesario el clampaje de la aorta supracelíaca puesto que se encuentra colocado el catéter Fogarty®. El drenaje venoso se obtiene por la vía femoral ya canulada y también a través del orificio que se realiza en la vena cava intrapericárdica para asegurar un mejor lavado del parénquima hepático.

Evaluación de la viabilidad de los órganos de DCP

La viabilidad de los órganos de los donantes a corazón parado se hace según:

- Edad
- Grupo sanguíneo
- Antecedentes patológicos y tratamientos
- Serologías
- Ausencia de nefropatía previa
- Ausencia de hepatopatía previa
- Asistolia sin RCP Avanzada < 20-30 minutos (hígado-riñón)
- Asistolia sin RCP Avanzada + Soporte vital avanzado < 150 minutos
- Bioquímica renal previa al evento (Cr < 2.5), tras el diagnóstico de muerte (Cr < 2.5) y curva evolutiva durante la RN cada 30 minutos con una Cr final < 2.5
- Bioquímica hepática inicial (momento del diagnóstico de muerte): (AST, ALT < 3-4 veces el valor normal), curva evolutiva y final (AST, ALT < 4-5 veces el valor normal)
- pH en GSA mantenido entre 7.0 y 7.4
- Flujos de bomba de RCN > 1 L/min/m²
- Tiempo de RCN mínimo de 1h y máximo de hasta 6h
- Aspecto macroscópico intraoperatorio renal y hepático
- Características histológicas renales y hepáticas (si se precisa)
- Resistencias renales en máquina de perfusión pulsátil < 0.3 (en algunas ocasiones se puede aceptar resistencias entre 0.3 y 0.4 si el resto de parámetros son adecuados y se considera válido el órgano para trasplante)



3.4.2.2. Nuestra primera experiencia clínica

En base a los trabajos experimentales se implementó de forma sistemática la utilización de la RCN en la obtención de órganos procedentes de donantes a corazón parado. Desde abril de 2002 hasta mayo de 2006 se trasplantaron 10 injertos hepáticos de 40 potenciales⁵⁴. Entre los receptores, la indicación del trasplante fue infección crónica por VHC en 6, cirrosis alcohólica en 1 caso, y ambas etiologías en 1 de ellos. Todos los receptores excepto uno presentaban una cirrosis descompensada en el momento del trasplante (1 Child A priorizado por presentar un hepatocarcinoma). 7 de los receptores se encontraban hospitalizados previamente al trasplante por problemas médicos relacionados con su enfermedad hepática.

En cuanto a la supervivencia del injerto, en 5 de los 10 trasplantados existe una funcionalidad hepática conservada. Hubo un caso de fallo primario del injerto (FPI) y un caso de trombosis de la arteria hepática a los 41 días, siendo ambos casos retrasplantados sin complicaciones posteriores. En el caso del FPI, se pudo observar un periodo prolongado (155 min) desde la parada cardiaca hasta el inicio de la RCN. Además, tras 70 minutos de RCN hubo un periodo de 95 minutos de hipotermia controlada debido a un problema técnico en el intercambiador de temperatura.

En cuanto a la supervivencia del paciente, 3 receptores murieron con injertos funcionantes; 2 de ellos en el primer mes tras el trasplante debido a complicaciones post-trasplante, y uno a los 6 meses por recidiva del VHC. Estos 3 pacientes se encontraban en un estadio muy avanzado de su enfermedad previo al trasplante (MELD 23, 26 y 32; Child C) y se encontraban hospitalizados por complicaciones de su enfermedad hepática.

Solamente hubo un caso de complicaciones biliares, en un paciente en el que no se colocó un tubo de Kehr, en forma de colestasis. Ésta era debida a una leve estenosis en la anastomosis, colocándose finalmente un stent biliar.

II. HIPÓTESIS DE TRABAJO

En el contexto del donante a corazón parado:

1. La recirculación normotérmica ha demostrado ser útil
2. Los órganos así obtenidos presentan una buena función tras el trasplante
3. La eficiencia de este método es limitada, ya que se utiliza una mínima fracción de los que se evalúan inicialmente

Nuestra hipótesis plantea que la perfusión sanguínea “ex-situ”, como método de preservación que se añade a una metodología habitual, es potencialmente una técnica factible para proveer órganos tras una lesión por isquemia caliente y un periodo más o menos largo de preservación. Para validar esta técnica de preservación mediante la máquina de perfusión para salvaguardar órganos de DCP es necesaria la demostración de la función y recuperación tras el trasplante.

Utilizamos este modelo animal con el fin de poder confirmar la validez de este sistema de perfusión como método de preservación e iniciar de forma pionera la utilización de dicho sistema en el donante a corazón parado en humanos, lo que mejoraría de forma importante la necesidad actual de injertos hepáticos.

III. OBJETIVOS

Demostrar la utilidad de una máquina de perfusión normotérmica “ex-situ”, como continuación de la recirculación normotérmica en la obtención de injertos hepáticos procedentes de donantes a corazón parado, mediante:

1. La recuperación de la función del injerto
2. La evaluación de la viabilidad

Para ello, comparamos la metodología habitual mediante recirculación normotérmica y almacenamiento en frío, con otros grupos en donde se utilizará preservación fría y preservación mediante perfusión normotérmica tras un periodo de recirculación normotérmica.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

DISEÑO EXPERIMENTAL – METODOLOGÍA

Grupos experimentales:

Grupo 1: (n=6)

Cerdo donante: Parada cardiorrespiratoria: 90 minutos

Preservación hipotérmica en frío a 4°C durante 4 horas

Cerdo receptor: Implante hepático según técnica convencional

Grupo 2: (n=6)

Cerdo donante: Parada cardiorrespiratoria: 90 minutos

Recirculación normotérmica: 60 minutos

Preservación hipotérmica en frío a 4°C durante 4 horas

Cerdo receptor: Implante hepático según técnica convencional

Grupo 3: (n=6)

Cerdo donante: Parada cardiorrespiratoria: 90 minutos

Recirculación normotérmica: 60 minutos

Preservación normotérmica en máquina de perfusión durante 4 h

Cerdo receptor: Implante hepático según técnica convencional

1. Animales

Se utilizan cerdos “large-white” con un peso de 30-35 kg.

2. Anestesia

Los animales se encuentran en ayuno de 12h antes de la cirugía. Se realiza premedicación 30 minutos antes con azaperona (Stressnil®) intramuscular 10mg/kg. La inducción anestésica se realiza con tiopental sódico por vía venosa periférica en pabellón auricular a una dosis de 15mg/kg. Se procede a la intubación orotraqueal (nº7) y posterior ventilación mecánica. Si es preciso se induce y mantiene relajación muscular con infusión continua de besilato de atracurio en perfusión de 10mg/h. La analgesia se realiza mediante fentanilo (0,1mg/h) y el mantenimiento de la anestesia con Isoflurane 1-2% mediante vaporizador. La inserción de un catéter venoso en la vena yugular interna nos sirve para entradas y medición de PVC y un catéter arterial en carótida interna para muestreo de sangre arterial intraoperatorio y medición de presión arterial invasiva.

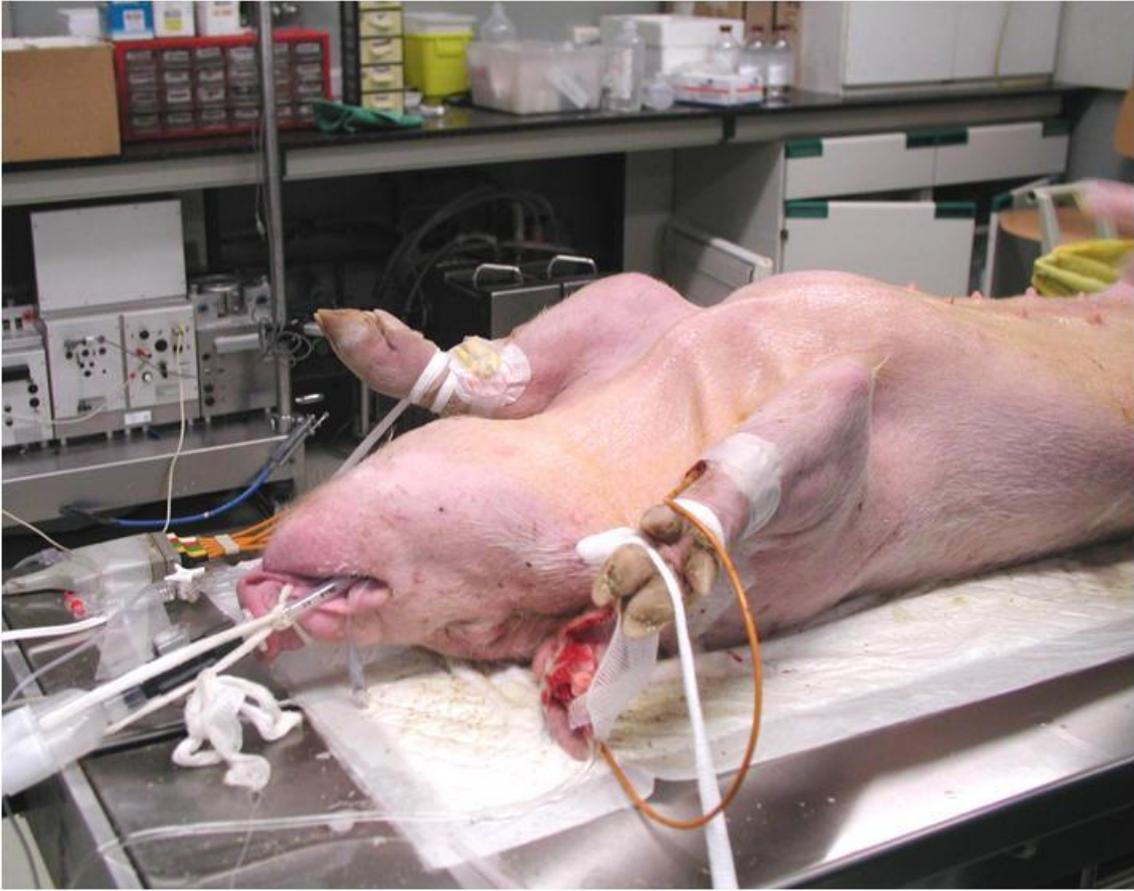


Foto 5: Animal intubado en anestesia general

3. Protocolo quirúrgico del donante

3.1. Monitorización del donante

La exposición de los vasos del cuello se realiza mediante una incisión longitudinal paratraqueal derecha. La toma de presión arterial invasiva se realiza mediante canulación de la arteria carótida derecha con catéter 16 G y monitorización con aparato de Hewlett-Packard, M 1046 A, 71034 Boeblingen (Alemania). La vena yugular interna también se disecciona para colocación de un catéter vascular de 3 lúmenes. El registro electrocardiográfico también se monitoriza tras colocar los electrodos sobre la superficie corporal.

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

Las temperaturas hepática y esofágica son también monitorizadas con un termistor (Mon-A-Therm; Mallinckrodt Medical Inc.®; St. Louis, MO 63134, EUA). Se colocan dos flujómetros no invasivos (Transonic Systems Inc. HT207. Ithaca, New York 14850, EUA) alrededor de la arteria hepática y vena porta respectivamente. En ese momento se determinan las medidas de los flujos basales, una vez estabilizados. En ese punto se administra heparina intravenosa a dosis de 3 mg / kg de peso.

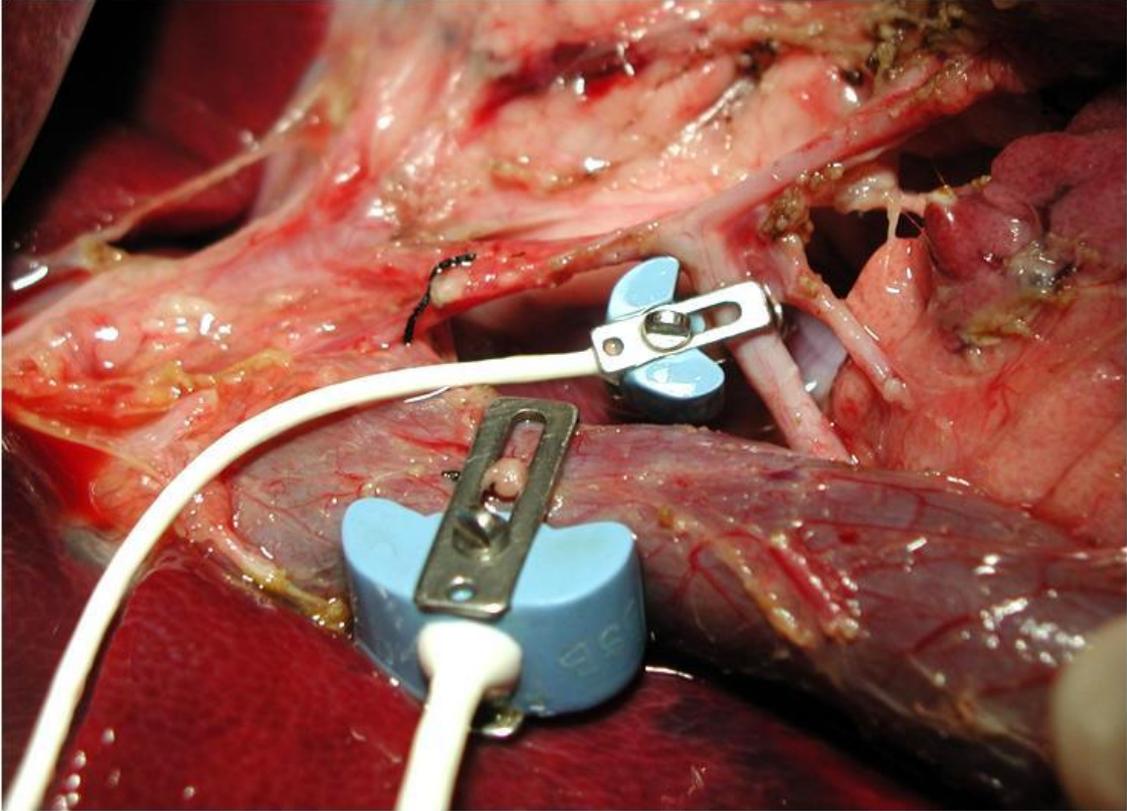


Foto 6: Determinación de flujos vasculares en arteria hepática y vena porta del animal

3.2. Accesos vasculares del by-pass cardiopulmonar

La arteria aorta infrarrenal y la vena cava inferior son canuladas (16 Fr y 26 Fr respectivamente) y conectadas a un oxigenador pediátrico de burbuja (Bard Quantum Oxygenator and Venous reservoir, HF 6000-H 6770 VR, CR Bard Inc.®; Haverhill, MA 01832, EUA), a un intercambiador de temperatura (Módulo Normo-hipotermia Palex S.A., Barcelona, España) y a una bomba de rodete (Stöckert-Shiley ®, Munich, Alemania).

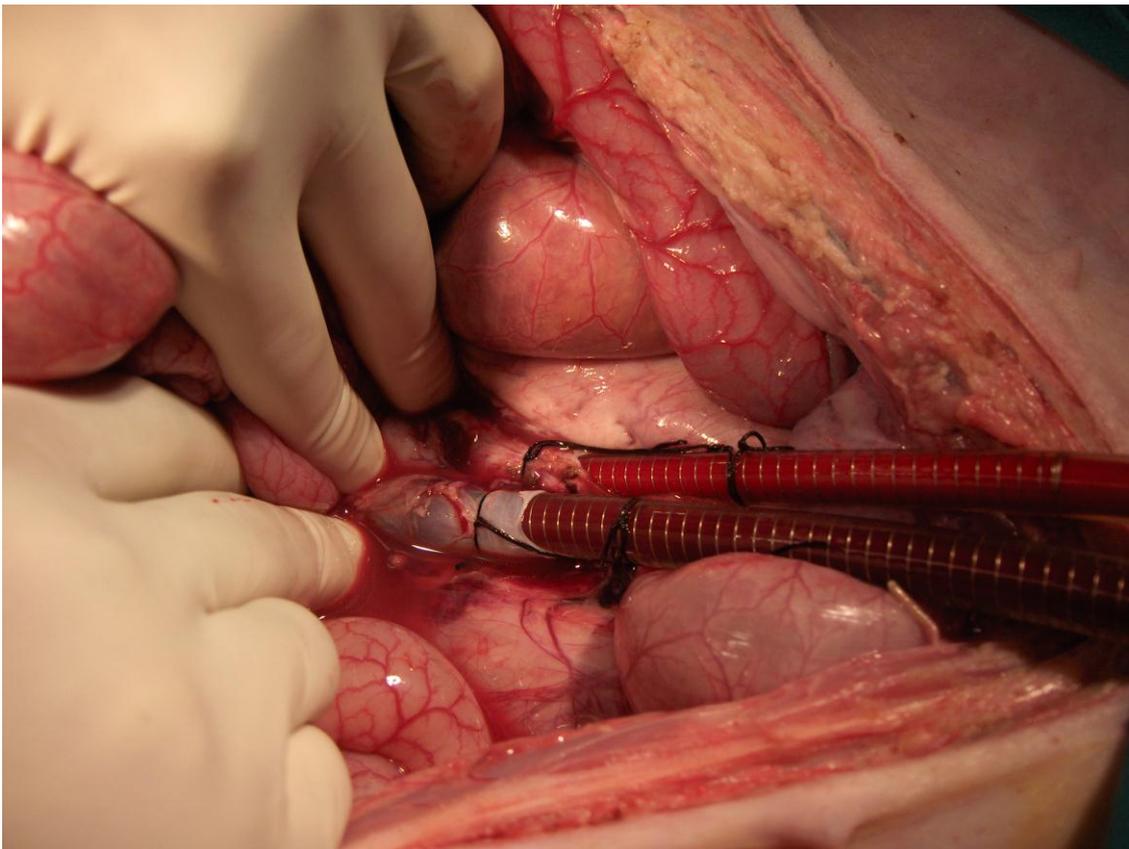


Foto 7: Aorta infrarrenal y vena cava canuladas

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

El paro cardíaco se provoca mediante la inyección endovenosa de cloruro potásico a dosis de 10-15 ml 2M. Tras 90 minutos de parada cardíaca, se inicia el periodo de recirculación normotérmica (circulación extracorpórea y oxigenación tisular a 38 °C). La recirculación normotérmica se mantiene durante 60 minutos hasta alcanzar un flujo de bomba máximo de 2,4 l / min / m² de superficie corporal.

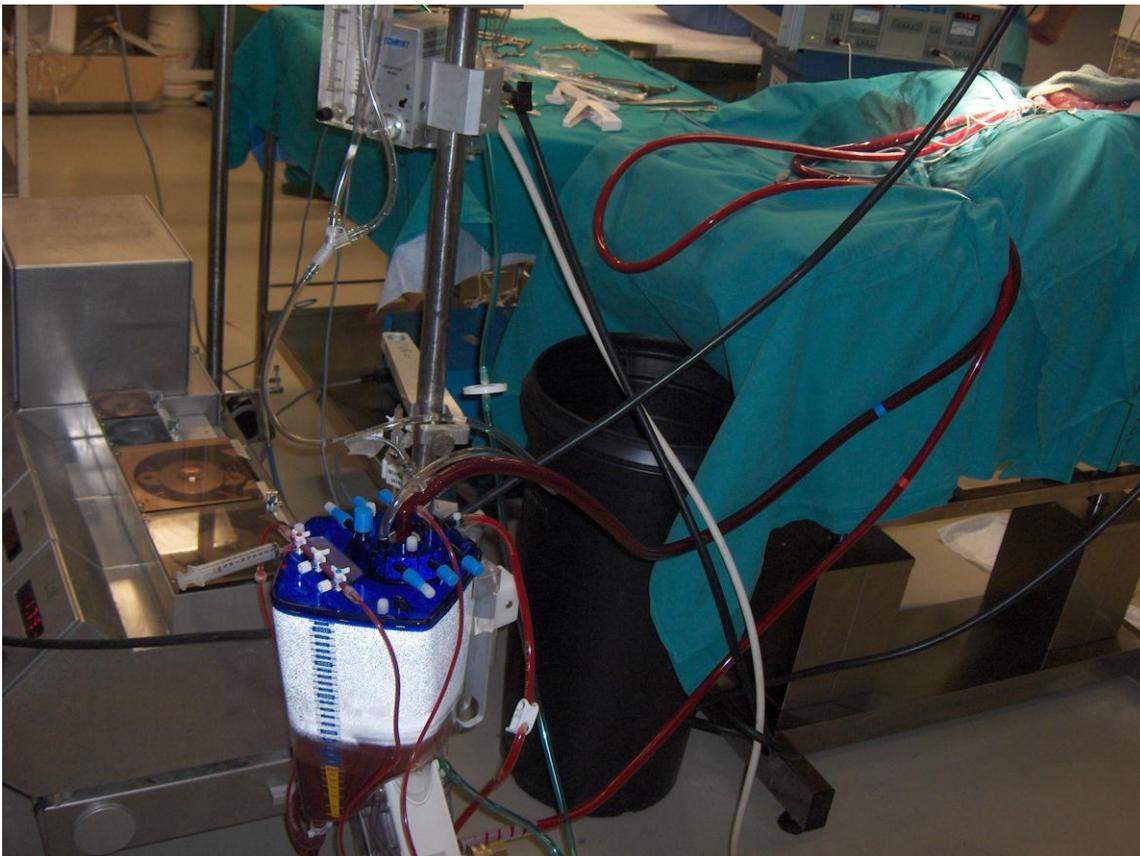


Foto 8: Circuito de recirculación normotérmica, donde vemos el oxigenador, el reservorio de sangre y la bomba de rodete

Seguidamente se procede a la perfusión con solución de Wisconsin a través de la arteria aorta y de la vena porta y a la extracción hepática.

3.3. Cirugía de banco

Se disecan las estructuras vasculares del hígado (vena cava, vena porta y arteria hepática), preparándolo para el implante en el cerdo receptor.

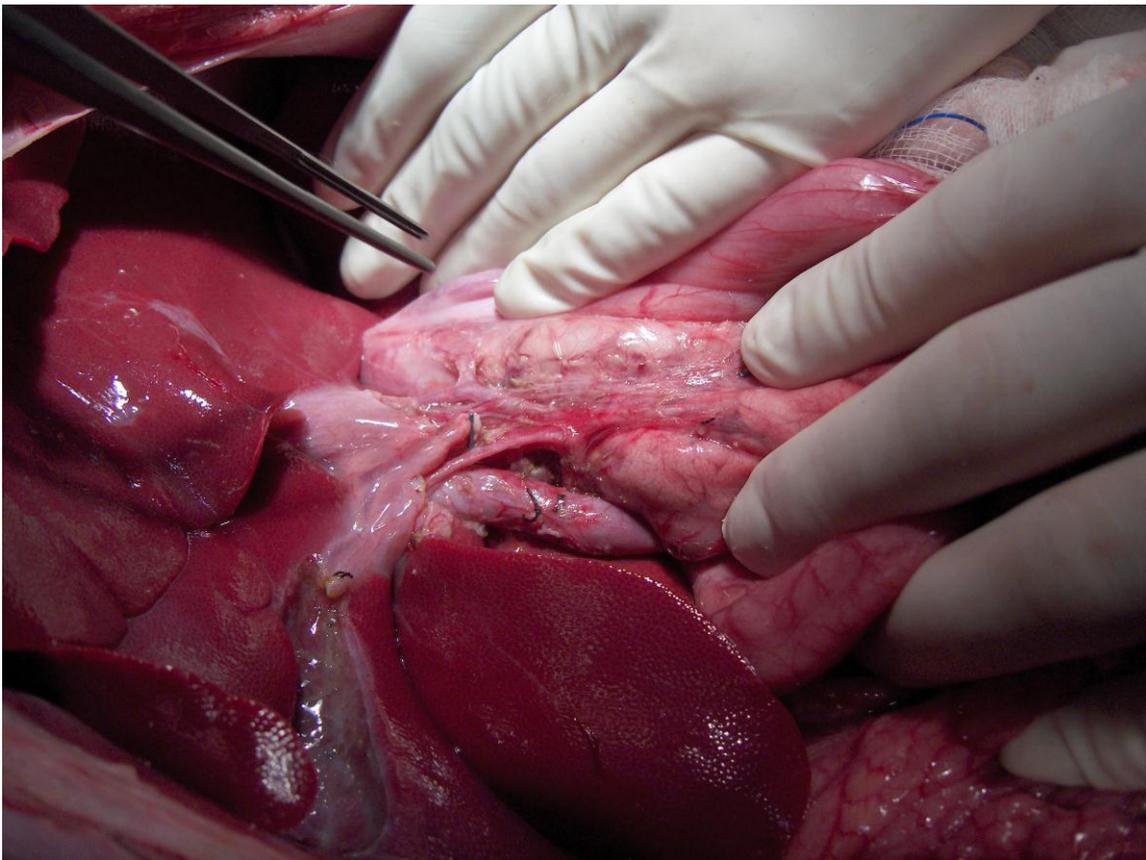


Foto 9: Disección de estructuras del hilio hepático

En la extracción del injerto hepático, la arteria hepática se disecciona hasta la aorta abdominal, con resección de unos 7-8 cm de ésta. Esto lo realizamos para la colocación de las cánulas que conectaremos en la máquina de perfusión hepática, a saber: una cánula en la aorta abocando al tronco celíaco y una cánula en la vena porta, debidamente fijadas.

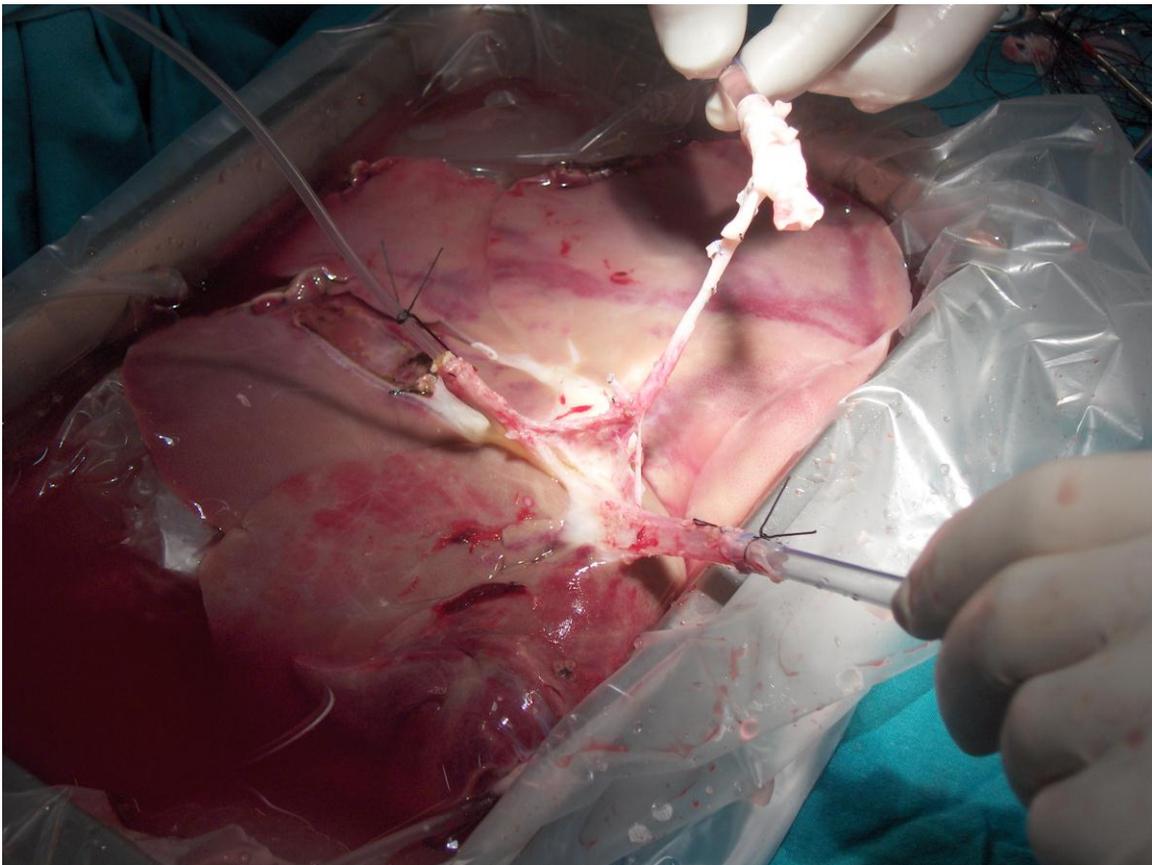


Foto 10: Cánulas colocadas en aorta a la salida del tronco celíaco y en vena porta. Vía biliar tutorizada con un catéter

4. Máquina de perfusión

Consta de 5 partes: oxigenador, calentador, bomba centrífuga, reservorio de sangre venosa y tubos de conexión (polivinilclorido) Se utiliza como líquido de perfusión la propia sangre del donante que se obtiene mediante cebado de la bomba de recirculación del donante. Mantenemos una perfusión pulsátil a través de la arteria hepática y una perfusión continua a través de la vena porta a una temperatura de 38°C. El drenaje venoso se realiza directamente por vena cava del injerto, recuperando la sangre venosa para el circuito. Asimismo, mediante la canalización de la vía biliar controlamos la producción biliar. Se añade cloruro cálcico o bicarbonato sódico para corregir las alteraciones determinadas con las analíticas seriadas.



Foto 11: Máquina de perfusión ex-situ en funcionamiento. Vemos en esta foto el recipiente del hígado, el oxigenador, la bomba de rodete, el flujómetro y el reservorio de recogida de producción de bilis



Foto 12: Intercambiador de temperatura

Durante el periodo de preservación (4 horas) se realizan mediciones de presiones y de flujos vasculares y de producción de bilis cada 15 minutos. Se mantienen flujos y presiones fisiológicas en arteria hepática y vena porta controlando las bombas de infusión y ajustándola según las resistencias. Las determinaciones a partir de muestras de sangre se realizan cada 30 minutos.



Foto 13: Injerto hepático en la máquina de perfusión, con las cánulas vasculares conectadas y la recogida de la producción de bilis

5. Protocolo quirúrgico del receptor

5.1. Preparación Prequirúrgica

Se realiza la premedicación 30 minutos antes de la anestesia con azaperona (Stressnil®) intramuscular en muslo 10mg/kg. Se procede a medir el peso del animal. A continuación se realiza una cateterización venosa con Medicuth® rosa (nº20) en pabellón auricular y fijación con Omnifix®. La inducción anestésica se realiza con tiopental sódico endovenoso (15 mg/kg). Se realiza la intubación orotraqueal (nº 6,5-7), inflado de globo del tubo con 6-7 ml de aire y comprobación de correcta posición y ventilación con capnógrafo. Seguidamente se conecta al ventilador y mantenimiento de la anestesia con fentanilo (Fentanest®) como narcótico y con isoflurane en el vaporizador del respirador (misma metodología anestésica que en el donante). Se colocan en la superficie corporal del animal electrodos de registro electrocardiográfico para monitorización continua durante el procedimiento. Se coloca la placa bipolar para toma de tierra de bisturí eléctrico (electrocauterio). Antes de iniciar el procedimiento quirúrgico, se inyecta por vía endovenosa la profilaxis antibiótica con 1 gr de cefoxitina, que se repite a las 3 h. A continuación se lava y se entalla el animal.

5.2. Procedimiento Quirúrgico

5.2.1. Tiempo Cervical

Se realiza una incisión paratraqueal derecha, para proceder a la disección por planos hasta acceder a vasos cervicales profundos: vena yugular interna y arteria carótida. Éstos se disecan y se referencian con ligaduras de 3/0 de seda.

La cateterización arterial se realiza con un catéter vascular de una luz, introduciendo 7-8 cm y ligando las referencias de seda. La cateterización venosa, con un catéter vascular de 3 luces, introduciendo 7-8 cm y ligando las referencias de seda. Se comprueba a continuación la permeabilidad de los catéteres vasculares. Se conecta el catéter venoso a un sistema de entradas de líquidos y toma de muestras venosas. El catéter arterial se conecta a un sistema de monitorización continua de hemodinámica cardíaca (presión arterial invasiva y frecuencia cardíaca). Se realiza la toma de muestras sanguíneas basales, y se protege el campo quirúrgico cervical con una gasa con yodo.

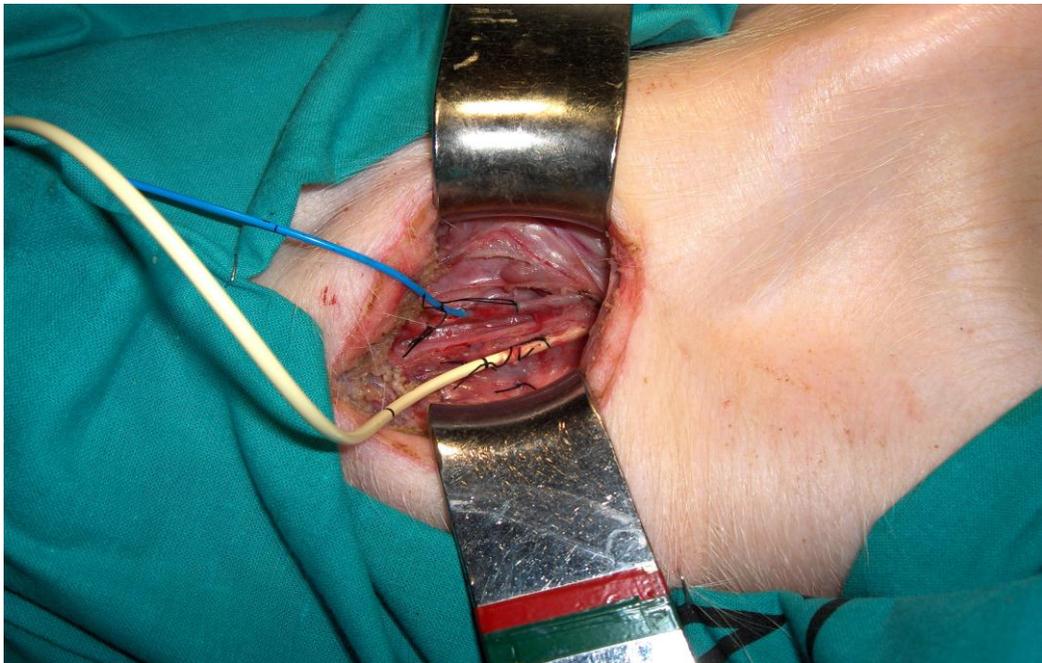


Foto 14: Disección y canulación de arteria carótida y vena yugular interna

5.2.2. Tiempo Abdominal

Se realiza una laparotomía mediante una incisión en “J”. Se fija la aponeurosis de la confluencia media-lateral en zona dorsal derecha con un punto suelto de Dexon® triangular del 0. Se realiza la liberación del hígado en zona media a diafragma, lateral izquierda y lateral derecha. A continuación disecamos la vena cava inferior infrahepática, y colocamos una toalla quirúrgica por encima de riñón derecho para rechazar las asas intestinales. Realizamos entonces la disección del hilio hepático a nivel distal (próximo a hígado), en el orden:

- Vía biliar: Disección y sección entre ligaduras, dejando el cabo largo para referencia
- Arterias: Disección y sección entre ligaduras o clips vasculares, incluyendo la rama gástrica
- Vena porta: Disección

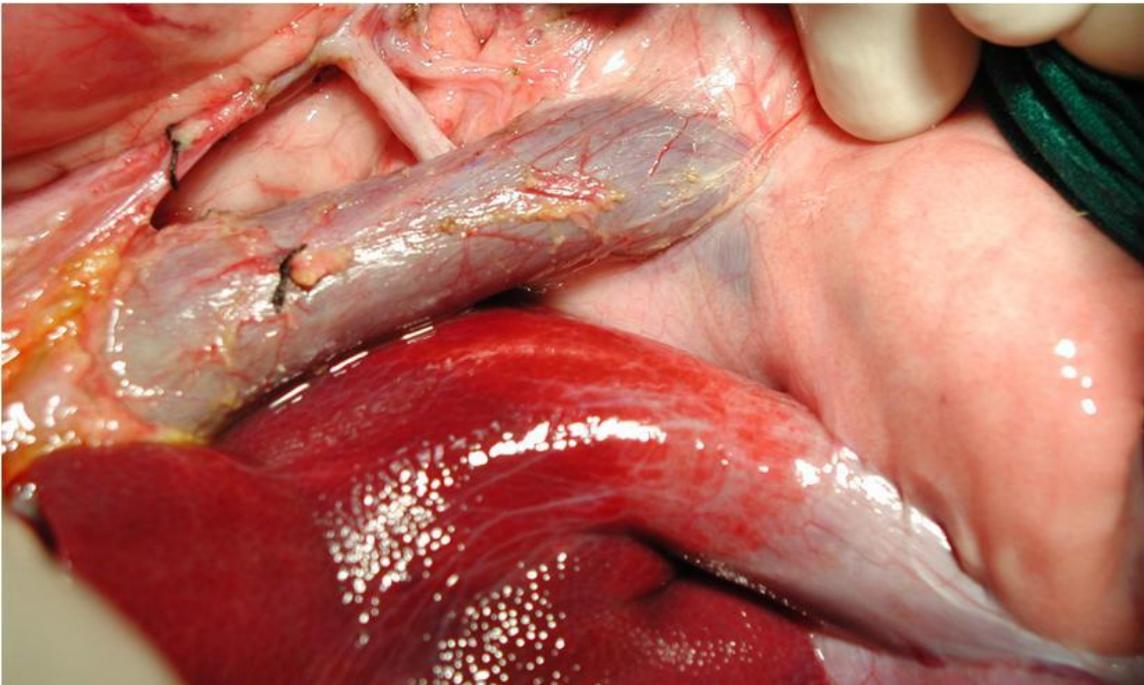


Foto 15: Hilio hepático disecado, con sección de la vía biliar, y exposición de arteria hepática, vena porta y vena cava disecados

En este punto ya estamos dispuestos a realizar la hepatectomía. Entonces extraemos el injerto hepático del donante de la bolsa o de la máquina de perfusión, según el grupo que estemos trabajando. Realizamos el lavado por porta del injerto con 500 mL de suero Ringer lactato a 37°C. Realizamos el clampaje vascular según el orden: vena cava infrahepática, vena porta y vena cava suprahepática. Realizamos la sección de los vasos clampados muy próximo al hígado. Extraemos el hígado del receptor y medimos su peso.

Durante la fase anhepática administramos como inmunosupresión:

- Metilprednisolona: 500 mg iv
- Tacrolimus: 0,04 mg / kg de peso

Realizamos cuatro anastomosis vasculares en el siguiente orden:

1. vena cava suprahepática con 2 suturas continuas (cara posterior y cara anterior) de Prolene 4/0 aguja 17mm
2. vena porta, con 2 suturas continuas de Prolene 5/0 aguja 17mm, instilando suero antes del último punto y dejando 7-8 mm de factor de crecimiento
3. vena cava infrahepática, con 2 suturas continuas de Prolene 4/0 aguja 17mm
4. arteria hepática, con 2 suturas continuas de Prolene 6/0 aguja 9mm

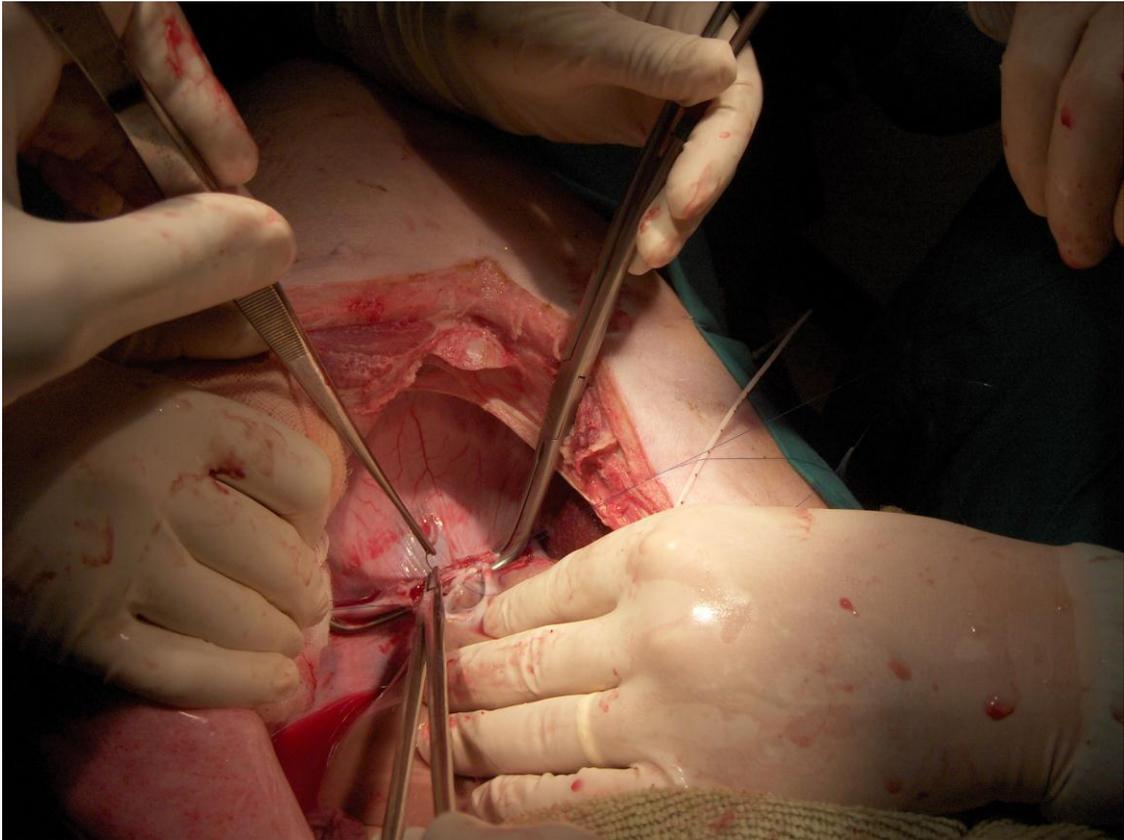


Foto 16: Anastomosis cava suprahepática

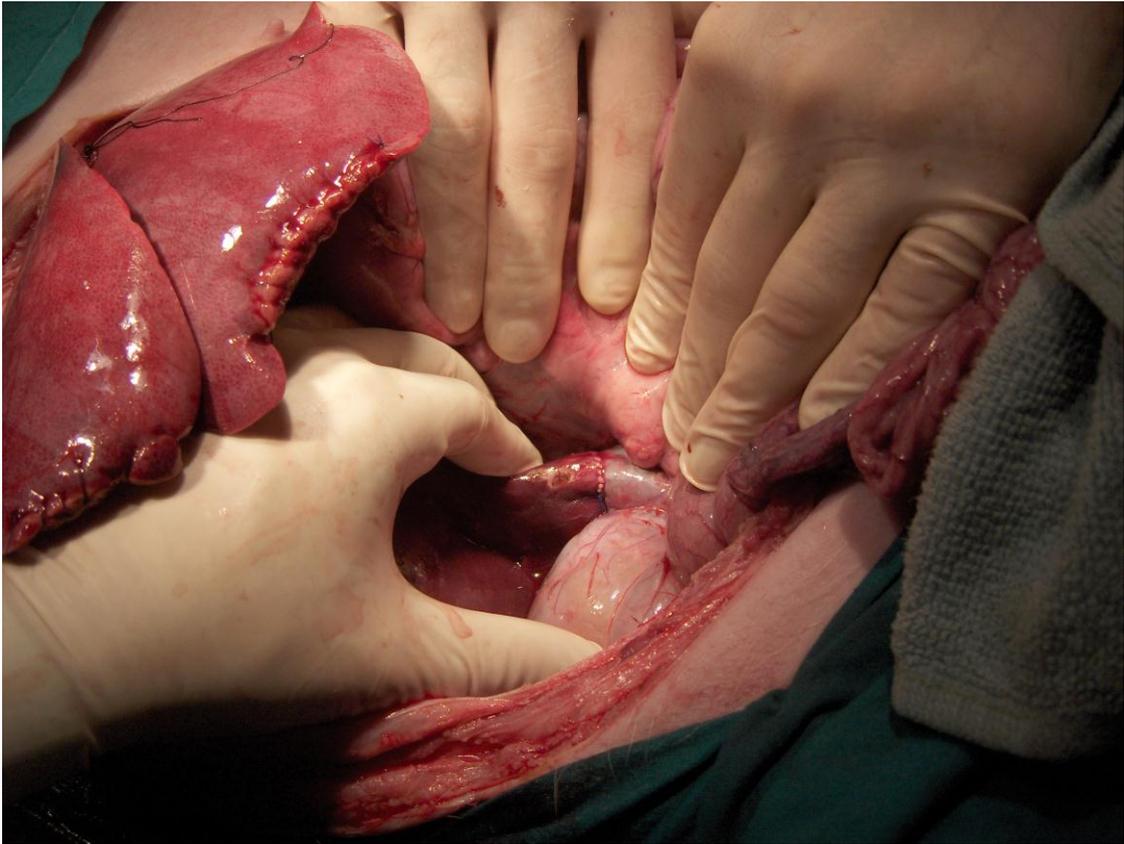


Foto 17: Anastomosis cava infrahepática

Tras realizar la reperfusión portal se realizan mediciones de flujo portal y de hemodinámica cardíaca: Presión arterial media y frecuencia cardíaca. Para la anastomosis arterial disecamos la arteria hepática del receptor hasta la arteria gastroduodenal que se disecciona, se secciona y se liga distalmente, dejando abierta la parte proximal para preparar el patch arterial (de preferencia, tipo Carrell). En el injerto hepático preparamos también un patch arterial, preferentemente en la salida de la arteria gastroduodenal, y se realiza entonces la anastomosis arterial.

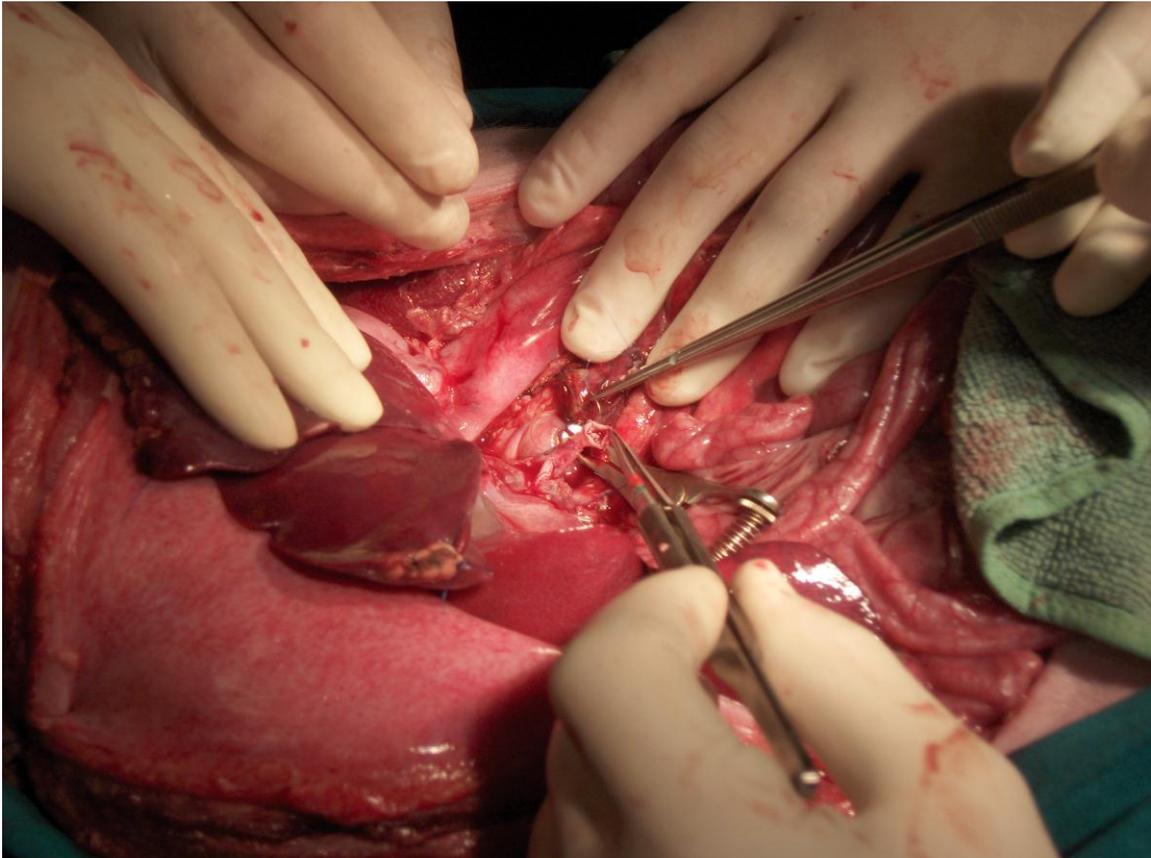


Foto 18: Anastomosis arterial

Tras realizar la reperfusión arterial se realizan mediciones de flujo arterial, de flujo portal y de hemodinámica cardiaca: Presión arterial media y frecuencia cardiaca. Además, tomamos una muestra de tejido con una biopsia hepática.

Para la vía biliar introducimos aproximadamente 1,5 cm de tubo de equipo de suero seccionado en bisel en vía biliar del receptor y del injerto hepático, y se liga con seda en ambas vías biliares para sujeción del tutor y se fijan ambos cabos con 3-4 puntos sueltos de Prolene 3/0.



Foto 19: Anastomosis biliar con colocación de un tubo a modo de tutor biliar

Tras comprobar la correcta hemostasia se cierra la pared abdominal con 2 suturas continuas de PDS II la parte horizontal y 1 sutura continua la parte vertical. El cierre de la piel se realiza con suturas continuas de seda 2/0, así como el cierre de la cervicotomía, tunelizando los catéteres vasculares hasta la zona dorsal.

Se procede a la extubación del receptor a los 20-35 minutos tras la cirugía y se le coloca en una jaula metabólica con calor.

6. Toma de muestras en el receptor

6.1. Muestras sanguíneas

Se toman muestras de sangre basal, tras la reperfusión: 1 hora y 3 horas, y en el postoperatorio: 6h, 12h, 24h, 2 días, 3 días, 4 días y 5 días (en el momento previo al sacrificio del animal). Se toman muestras de sangre venosa, 12 mL para tubos de bioquímica, tubos de hemostasia y tubos de centrifugado para obtención de suero. En el postoperatorio también se utiliza sangre venosa para estudiar el equilibrio ácido-base. Se toman muestras de sangre arterial, 2 mL, previa heparinización de la jeringa, para la realización de gasometrías intraoperatorias (Advia 1650 automatic analyzer, Centro de Diagnóstico Biomédico, Hospital Clínic de Barcelona).

6.2. Muestras de tejido

Se toman muestras de tejido a los 90 minutos de la parada cardiaca, a la hora de la reperfusión y en el momento del sacrificio del animal, a no ser que haya fallecido con anterioridad, en cuyo caso se tomará la muestra y se conservará en formaldehído. De las biopsias hepáticas realizadas se realizan secciones para tres tipos de estudio posteriores:

6.2.1. Formaldehído: Hematoxilina-Eosina

Una o dos secciones de tejido se fijan en formaldehído al 10% y se incluyen en parafina para realizar secciones histológicas que se tiñen con H-E (hematoxilina-eosina) para su examen con microscopía óptica: evaluación del daño a nivel histológico de la isquemia-reperfusión (IR). Se evalúa:

- la necrosis coagulativa
- la microvesiculación citoplasmática hepatocelular
- la dilatación y la congestión sinusoidal
- el epitelio biliar.

6.2.2. OCT

Una o dos secciones de tejido, con progresiva congelación del material mediante introducción parcial en nitrógeno líquido, y posterior introducción completa envuelto en papel de aluminio, para estudio inmunohistoquímico.

6.2.3. Expresión genética mediante PCR

En trozos pequeños de aprox. 1mm, introducción en 3 tubos diferentes de tipo Eppendorf®, para estudios de expresión genética mediante PCR. Los parámetros a analizar son:

- Caspasa-3: Este gen codifica una proteína que pertenece a la familia de proteasas ácido cisteína-aspártico (caspasa). La activación secuencial de las caspasas juega un papel central en la fase de ejecución de la apoptosis celular

- MCP-1: Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) o CCL2 es una citoquina pequeña que pertenece a la familia de las quimoquinas. Esta quimoquina recluta monocitos, células T-memoria y células dendríticas en zonas de lesiones tisulares y en infecciones. Esta quimoquina está producida como un precursor proteico conteniendo un péptido señal de 23 amino-ácidos y un péptido maduro de 76 amino-ácidos
- IL-6: La interleuquina-6 (IL-6) es una interleuquina que actúa como una citoquina tanto pro-inflamatoria como anti-inflamatoria. Está secretada por las células T y por los macrófagos para estimular la respuesta inmune frente a cualquier lesión tisular que conduzca a la inflamación
- TNF- α : El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), o caquectina, es una citoquina involucrada en los mecanismos de inflamación sistémica y es miembro de un grupo de citoquinas que estimulan la reacción de fase aguda. La función principal del TNF- α se centra en la regulación de las células inmunes. El TNF- α también es capaz de inducir la apoptosis celular, inducción de la inflamación, inhibición de la tumorigénesis y de la replicación viral
- E-selectina: La E-selectina, también conocida como CD62E, es una molécula de adhesión celular expresada únicamente en las células endoteliales activadas por citoquinas. Al igual que otras selectinas, juega un papel importante en la inflamación. Durante la inflamación, la e-selectina juega un importante papel en el reclutamiento leucocitario en la zona lesionada. La liberación local de IL-1 y de TNF- α por parte de

células lesionadas induce la sobre-expresión de e-selectina en las células endoteliales de los vasos sanguíneos cercanos. A medida que la respuesta inflamatoria avanza, las quimoquinas liberadas por el tejido lesionado entran en los vasos sanguíneos y activan los leucocitos, que ahora son capaces de unirse a la superficie endotelial para migrar hacia el tejido.

6.3. Muestras de suero

- ELISA: Factor de vonWillebrand (vWF):

Es una glicoproteína presente en el plasma sanguíneo y producida esencialmente por el endotelio vascular, los megacariocitos y el tejido conectivo subendotelial. El vWF es un marcador de daño endotelial, incrementándose en plasma cuando existe una lesión endotelial

- Quimioluminiscencia: Sales biliares

Las sales biliares están producidas en el hígado por la degradación oxidativa del colesterol. La bilis porcina contiene principalmente ácido hyocólico, hyodesoxicólico y quemodesoxicólico. Se ha encontrado que los ácidos biliares son un parámetro más sensible y reflejan de manera más temprana la función hepática incipiente del injerto hepático que los parámetros convencionales de función hepática

- TBars: Thiobarbiturate reactive substances

Son productos finales de bajo peso molecular, cuyo principal componente es el malondialdehído (MDA), que se forma durante la descomposición de los productos de la peroxidación lipídica. La concentración en plasma o en orina de los Tbars es utilizada como un índice de la peroxidación lipídica y reflejo del estrés oxidativo. La peroxidación lipídica hace referencia a la degradación oxidativa de los lípidos. Éste es el proceso por el cual los radicales libres se adueñan de electrones procedentes de los lípidos de las membranas celulares, llevando al daño celular y a la necrosis celular. Los productos iniciales en las células vivas son los radicales libres de oxígeno, generados durante la isquemia. Tras la reperfusión, el oxígeno induce la peroxidación lipídica. La medición de los Tbars es un reflejo del nivel de peroxidación de la membrana plasmática, lo que equivale al estrés oxidativo generado durante la isquemia.

7. Valoración clínica en el postoperatorio:

En el postoperatorio, cada 8 horas hasta el quinto día, se realiza una valoración clínica utilizando una escala de puntuación teniendo en cuenta: postura, respiración, ingesta y respuesta a estímulos. Cada parámetro se valora del 1 al 3 (como se muestra a continuación), precediendo a la eutanasia electiva si se repiten dos valoraciones consecutivas iguales o mayores a 9.

	1	2	3
Respiración	Normal	Taquipnea	Bradipnea
Respuesta estímulos	Normal	Disminuida	Escasa/Nula
Observación postural	Levantado	Acostado pero capaz de levantarse	Acostado/No se levanta
Ingesta	Normal	Consume agua/alimento ayudado	Nula

Tabla 1: Evaluación clínica del seguimiento en el post-operatorio

8. Administración de medicamentos

La inmunosupresión se administra en la fase anhepática y cada 24 horas hasta el quinto día. Se administra tacrolimus (0,04 mg / kg) y metilprednisolona en pauta descendente (500 mg como dosis inicial, y 125 / 100 / 75 / 50 / 25 mg/día iv cada 24 horas).

La antibioterapia utilizada consiste en cefoxitina (1 gr iv), que se administra en la inducción anestésica, 3 horas después y cada 24 horas hasta el 4º día.

La analgesia utilizada en el postoperatorio es buprenorfina intramuscular (Buprex®), y en el seguimiento del postoperatorio se administra si lo precisara.

Se administraría además sueroterapia si precisara, por inicio tardío de la ingesta o por empeoramiento analítico de la creatinina (>2.0).

9. Parámetros a analizar

Los parámetros analizados tienen como finalidad la evaluación de la funcionalidad del hígado. Los englobamos en 3 grandes grupos: parámetros biológicos, funcionales e histológicos.

9.1. Parámetros biológicos:

Como parámetros biológicos utilizamos como reflejo de daño hepatocelular: GOT, GPT, FA, Bilirrubina y LDH.

9.2. Parámetros funcionales:

Como parámetros funcionales reflejamos la función de síntesis del hígado, mediante la medición de producción de bilis durante el periodo de perfusión en máquina y la determinación del tiempo de protrombina (en %).

9.3. Parámetros histológicos:

Como parámetros histológicos usamos la necrosis coagulativa, la microvesiculación citoplasmática hepatocelular, la dilatación y la congestión sinusoidal, y la preservación del epitelio biliar.

Necrosis coagulativas (isquemia)	0 : no 1 : 1/3 2 : 2/3 3 > 2/3
Microvesiculación citoplasmática hepatocelular (necrosis- isquemia)	0 : no 1 : 1/3 2 : 2/3 3 > 2/3
Dilatación - Congestión sinusoidal	0 : no 1 : 1/3 2 : 2/3 3 > 2/3
Epitelio biliar	0 : normal 1 : lesiones degenerativas

Tabla 2: Escala de evaluación histológica

Las muestras de tejido obtenidas se fijan en formaldehído al 10% y se incluyen en parafina para realizar secciones histológicas que se tiñen con H-E para su examen con microscopía óptica. Parte de las biopsias se incluyen en OCT para criopreservarlas a -80°C y realizar posteriormente tinciones inmunohistoquímicas. Tejido hepático adicional se congela inmediatamente en nitrógeno líquido y se preservará para su posterior evaluación, para la determinación de la expresión de genes implicados en los fenómenos de isquemia/reperfusión, apoptosis y de citoquinas proinflamatorias.

RT-PCR: La reacción en cadena de la polimerasa por transcriptasa inversa la usamos para detectar cambios en los niveles de RNAm de TNF, IL-6, E-selectina, MCP-1 y caspasa-3 tras la reperfusión. El RNA tisular lo aislamos utilizando el reactivo Trizol (Invitrogen, Breda, Holanda) y el DNAc lo sintetizamos a partir de 1 μg de RNA (Invitrogen, Breda, Holanda). La amplificación y la detección se realizan con el Sistema de Detección de Secuencias ABI Prism 7900-HT (Applied Biosystems) utilizando la emisión a partir de SYBR-Green. Todos los ensayos los realizamos por triplicado. La expresión génica la normalizamos con la media de contenido de RNAm de β -actina y calculada en relación a los controles utilizando el método de curva estándar relativo. Los resultados los expresamos finalmente como $2^{-\Delta\text{CT}}$ (CT, ciclo umbral).

La secuencia de los primers del gen control es: β -actine sense AAC ACC CCA GCC ATG TAC G-3', β -actine anti-sense 5'-ATG TCA CGC ACG ATT TCC C-3'

ELISA: La concentración sérica del factor de von Willebrand (vWF) fue calculada mediante ELISA (Coamatic vWF kit, Nodia BV, Amsterdam, Holanda).

TBars: Los niveles séricos de ácido thiobarbitúrico (Thiobarbituric acid reactive substance = TBARS) los analizamos como un indicador del incremento de la peroxidación lipídica por los radicales libre de oxígeno (ROS) tras la reperfusión. Los TBARS fueron medidos con un espectrofotómetro de fluorescencia a 485/590 nm (Baun de Ronde FL 600, Abcoude, Holanda).

10. Análisis estadístico

El estudio estadístico se realiza utilizando el test de Fisher's, t de Student, análisis múltiple de la varianza y el test de correlación de Pearson cuando es necesario. Se considera que una medición es estadísticamente significativa si la $p < 0,05$. Todos los resultados están expresados como media +/- error estándar.

V. RESULTADOS

1. ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA SUPERVIVENCIA

Grupo 1:

En el grupo 1, los animales fueron sometidos a una parada cardíaca de 90 minutos, seguido de una preservación hipotérmica mediante almacenamiento en frío durante 4 horas, para realizar seguidamente el implante según la técnica detallada en la metodología.

De los 6 animales del grupo, todos murieron en las primeras 33 horas tras la reperfusión. Hubieron tres animales (1F, 1G y 1J) con una mortalidad precoz, dentro de las primeras 6 horas post-reperfusión. Los otros tres animales (1H, 1I y 1K) sobrevivieron 28, 33 y 31 horas tras la reperfusión.

La supervivencia global fue del 0% a los 5 días.

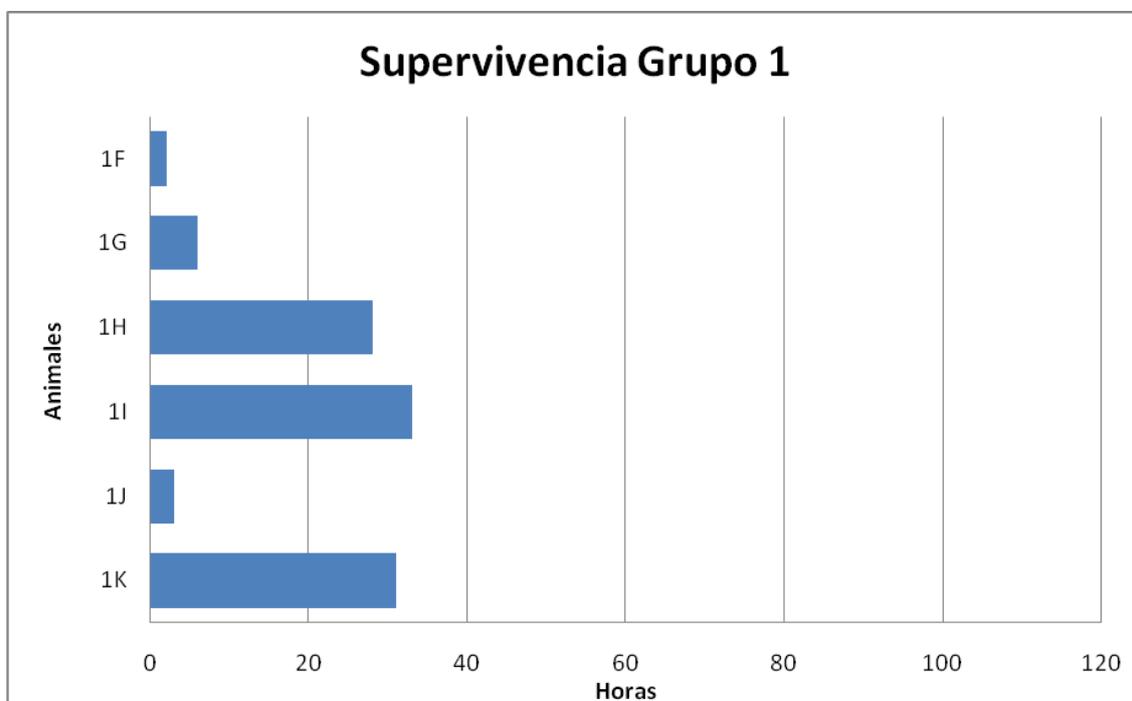


Gráfico 1: Supervivencia del Grupo 1 en horas desglosado por animal

El animal 1F tan solo sobrevivió 2 horas tras la reperfusión. El aspecto macroscópico del injerto hepático tras la reperfusión era más pálido y con una consistencia más dura que los injertos que no sufren una parada cardíaca tan prolongada.

El animal 1G tuvo una supervivencia de 6 horas tras la reperfusión. Destaca a nivel macroscópico un aspecto heterogéneo tras la reperfusión portal y una consistencia más dura. Durante el lavado con suero Ringer previo al implante el líquido de lavado tenía un aspecto turbio.

El animal 1H tuvo una supervivencia de 28 horas. El aspecto macroscópico del hígado en el momento de la necropsia era de congestión, con una coloración global más oscura; con una clara necrosis difusa de todo el injerto. La herida quirúrgica tenía un aspecto normal, no había líquido libre en cavidad abdominal, y los vasos: arteria hepática, vena porta y venas suprahepáticas estaban permeables. La vía biliar era normal.

El animal 1I sobrevivió 33 horas. Lo único que destaca en la necropsia realizada es la presencia de ascitis de forma moderada. La herida quirúrgica era normal, así como los vasos, que eran permeables, y no existía ningún problema en la vía biliar extrahepática.

El animal 1J tuvo una supervivencia de 3 horas. Macroscópicamente no hubo ninguna alteración destacable tras la reperfusión. Únicamente a nivel hemodinámico fue más importante el síndrome post-reperfusión, con una hipotensión más prolongada, aunque pudo estabilizarse.

El animal 1H tuvo una supervivencia de 31 horas. En el momento de la necropsia tan sólo destacaba la presencia de un pequeño seroma en la herida quirúrgica. El aspecto macroscópico del injerto hepático era normal, así como los vasos y la vía biliar.

Score post-operatorio Grupo 1																
Animales	3 h	6 h	12 h	24 h	32 h	40 h	48 h	56 h	64 h	72 h	80 h	88 h	96 h	104 h	112 h	120 h
1F																
1G	12															
1H	10	9	9	7	12											
1I	9	11	8	8	7											
1J	12															
1K	10	10	8	10												

Tabla 1 Score post-operatorio del Grupo 1

Como vemos en la siguiente tabla, la media de supervivencia fue de 17 horas \pm 6,096.

Medias y medianas del tiempo de supervivencia

Media				Mediana			
Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%		Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%	
		Límite inferior	Límite superior			Límite inferior	Límite superior
17,167	6,096	5,219	29,115	6,000	15,309	,000	36,006

Tabla 2: Datos estadísticos de supervivencia en el Grupo 1

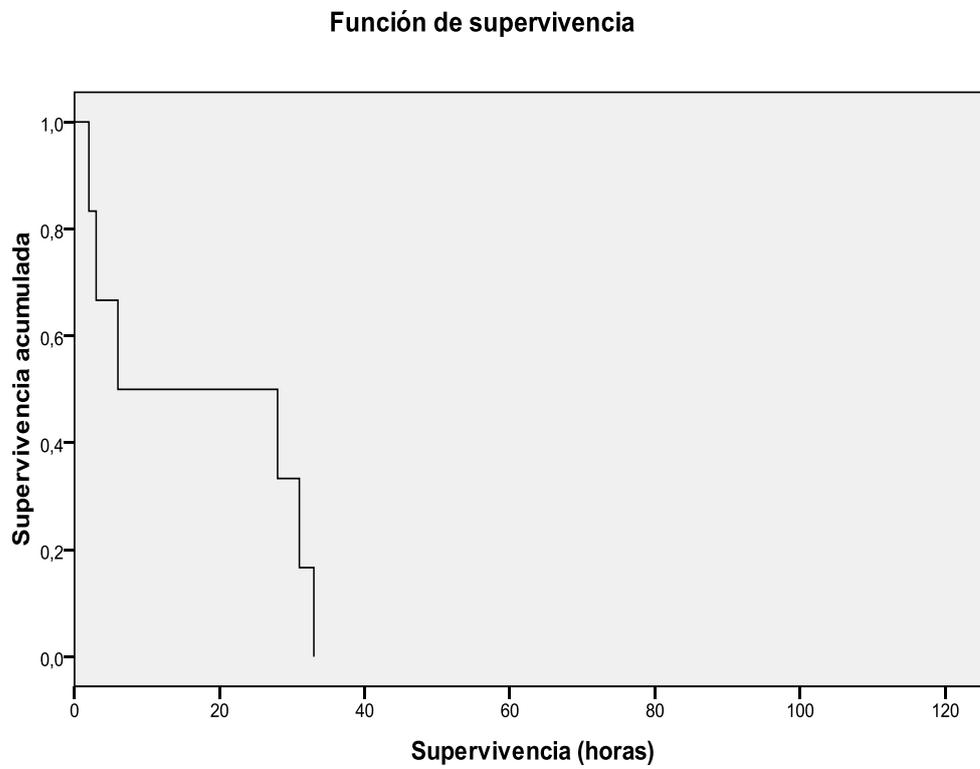


Gráfico 2: Supervivencia acumulada a los 5 días en el Grupo 1

Grupo 2:

En el grupo 2, los animales fueron sometidos a una parada cardíaca de 90 minutos, seguido de una recirculación normotérmica (RCN) durante 60 minutos y posteriormente preservación hipotérmica mediante almacenamiento en frío durante 4 horas, para realizar seguidamente el implante según la técnica detallada en la metodología.

De los 6 animales del grupo, cinco de ellos sobrevivieron los cinco días de seguimiento, muriendo uno (2H) al 3º día (80 horas tras la reperusión). Por lo tanto, la supervivencia a los 5 días en este grupo fue del 83,33%.

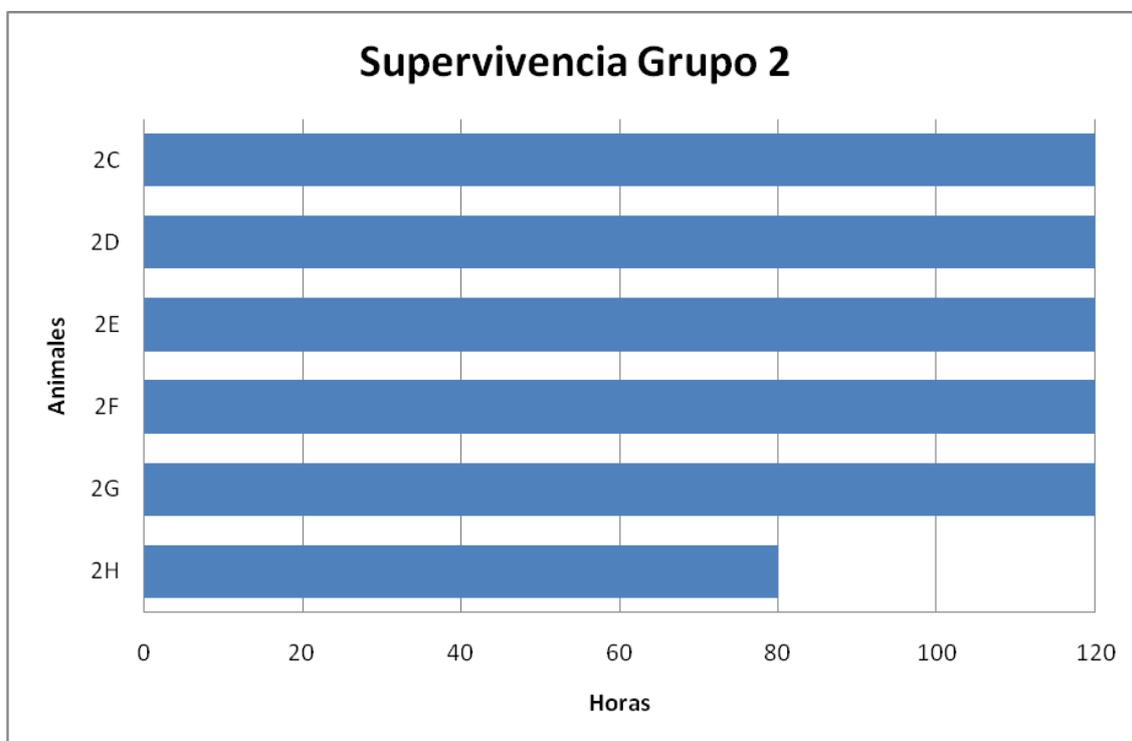


Gráfico 3: Supervivencia del Grupo 2 en horas desglosado por animal

El animal 2C tuvo una supervivencia de 5 días, con una eutanasia electiva. Durante los 5 días de seguimiento el score de evaluación se encontraba entre 6 y 7. En la eutanasia se vio una infección de la herida quirúrgica, pero el aspecto del injerto hepático era normal a nivel macroscópico, en cuanto a consistencia, color y a la ausencia de zonas de necrosis. Los vasos se encontraban todos permeables, y la vía biliar era normal. No había ascitis.

El animal 2D también sobrevivió durante 5 días. En el caso de este animal, su score de seguimiento estuvo entre 4 y 5. En el momento de la eutanasia electiva, el injerto hepático sí que estaba moderadamente congestivo, pero sin áreas de necrosis. La herida quirúrgica estaba normal, así como los vasos y la vía biliar. Tampoco existía ascitis.

El animal 2E tuvo una supervivencia de 5 días, con un score de status de seguimiento entre 7 y 8. En la eutanasia no hubo ningún hallazgo patológico.

El animal 2F sobrevivió los 5 días de seguimiento. Tuvo un mejor status en el seguimiento, con un score medio de 5. En la eutanasia electiva el hígado implantado presentaba áreas macroscópicas de necrosis superficial, aunque mantenía una consistencia normal. Asimismo existía ascitis moderada. Los vasos eran permeables y la vía biliar era normal. Existía una infección de la herida quirúrgica.

El animal 2G sobrevivió también los 5 días de seguimiento. El score de seguimiento fue muy bueno, manteniéndose en 4 durante prácticamente los 5 días post-trasplante. En el momento de la eutanasia se observó una pequeña hernia incisional en la parte vertical de la "J". El injerto hepático y los vasos presentaban un aspecto normal,

pero la vía biliar presentaba una pequeña dehiscencia en uno de sus bordes, lo que condicionó la presencia de un bilioma a nivel subhepático.

El animal 2H tuvo una supervivencia de 80 horas (4 días). En este animal, el lavado con Ringer previo al implante no fue homogéneo y, aunque el post-operatorio inicial fue aceptable, el score pasó rápidamente de 4 a 7. En el momento de la autopsia se vio un injerto hepático muy congestivo con extensas áreas de necrosis. No había ascitis, los vasos eran permeables y la herida quirúrgica estaba bien. La vía biliar presentaba una mínima dehiscencia de sutura que no condicionaba ninguna fuga biliar ni la presencia de ninguna colección biliar. El animal presentaba además una dilatación gástrica muy importante.

Animales	Score post-operatorio Grupo 2															
	3 h	6 h	12 h	24 h	32 h	40 h	48 h	56 h	64 h	72 h	80 h	88 h	96 h	104 h	112 h	120 h
2C	10	7	4	4	4	4	4	4	4	6	6	7	7	6	6	6
2D	8	9	7	4	5	6	6	5	5	4	4	4	4	4	4	4
2E	11	8	9	4	4	5	6	6	8	8	6	5	9	7	4	4
2F	10	10	9	9	7	5	5	5	5	5	5	6	10	7	5	5
2G	11	10	8	5	5	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
2H	11	10	7	4	4	4	4	4	4	7	7					

Tabla 3: Score post-operatorio del Grupo 2

Medias y medianas del tiempo de supervivencia

Media ^a				Mediana			
Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%		Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%	
		Límite inferior	Límite superior			Límite inferior	Límite superior
113,333	6,086	101,405	125,262

a. La estimación se limita al mayor tiempo de supervivencia si se ha censurado.

Tabla 4: Datos estadísticos de supervivencia en el Grupo 2

Grupo 3:

En el grupo 3, los animales fueron sometidos a una parada cardíaca de 90 minutos, seguido de una recirculación normotérmica durante 60 minutos y posteriormente perfusión normotérmica durante 4 horas, para realizar seguidamente el implante según la técnica detallada en la metodología.

De los cinco animales del grupo, todos sobrevivieron los 5 días de seguimiento, con lo que obtenemos una supervivencia del 100% en este grupo.

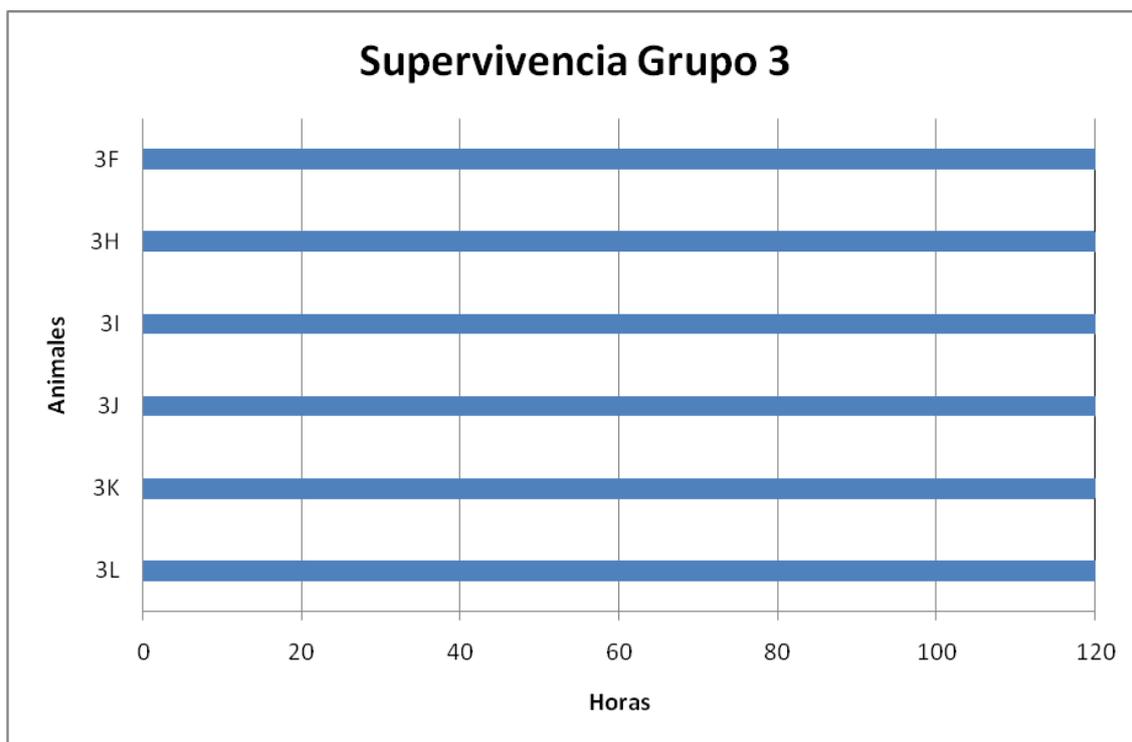


Gráfico 4: Supervivencia del Grupo 3 en horas desglosado por animal

El animal 3F, igual que todos los animales del Grupo 3, sobrevivió los 5 días. A partir de las 48 horas se mantuvo hasta el 5° día con un score de 4. En la eutanasia electiva, el único hallazgo patológico encontrado fue un seroma en la herida quirúrgica. El aspecto del injerto hepático era normal, los vasos permeables, la vía biliar normal y no existía ascitis.

El animal 3I tuvo un score de 4 desde las 12 horas de seguimiento hasta el 5° día. En la eutanasia practicada no se evidenció absolutamente ningún hallazgo patológico.

El animal 3J tuvo un postoperatorio clínicamente peor que el de sus compañeros de grupo. Inicialmente se mantuvo con un score rondando 6, para pasar posteriormente a un score clínico de 9 y 8 los 2 últimos días. La única incidencia acontecida durante el trasplante ocurrió en el momento de la extracción del injerto en el donante en el que la perfusión con solución de Wisconsin fue heterogénea. En la eutanasia electiva realizada, los dos hallazgos patológicos evidenciados fueron una infección de la herida quirúrgica, y la presencia de ascitis en cantidad moderada, teniendo el injerto hepático un aspecto normal, así como los vasos y vía biliar.

El animal 3K presentaba antes de realizarse el trasplante fiebre y linfadenopatías femorales. Desde las 24 horas post-trasplante presentó un score clínico de 4 que se mantuvo hasta el momento de la eutanasia al 5° día. En ésta, el único hallazgo patológico evidenciado fue una infección de la herida quirúrgica. El resto era normal.

El animal 3L presentó desde las 12 horas post-trasplante un score de 4 que se mantuvo igual hasta el 5° día. En la eutanasia únicamente se evidenció una poca

cantidad de ascitis, teniendo el injerto hepático un aspecto normal, así como los vasos, la vía biliar y la herida quirúrgica.

Score post-operatorio Grupo 3																
Animales	3 h	6 h	12 h	24 h	32 h	40 h	48 h	56 h	64 h	72 h	80 h	88 h	96 h	104 h	112 h	120 h
3F	9	9	7	7	7	7	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
3I	8	6	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
3J	11	10	9	8	6	8	6	6	9	9	8	8	8	8	8	8
3K	11	10	7	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
3L	9	5	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4

Tabla 5: Score post-operatorio del Grupo 3

2. ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA FUNCIÓN HEPÁTICA

2.1. GOT

Grupo 1:

Evolución general:

Todos los animales murieron en las primeras 33 horas, con un incremento continuo de GOT (media a las 24 horas: 3764 UI/L). Tal como vemos en la figura, los animales de este grupo tuvieron todos una tendencia a la disfunción hepática, con un aumento progresivo en las cifras de GOT, hasta el fallecimiento.

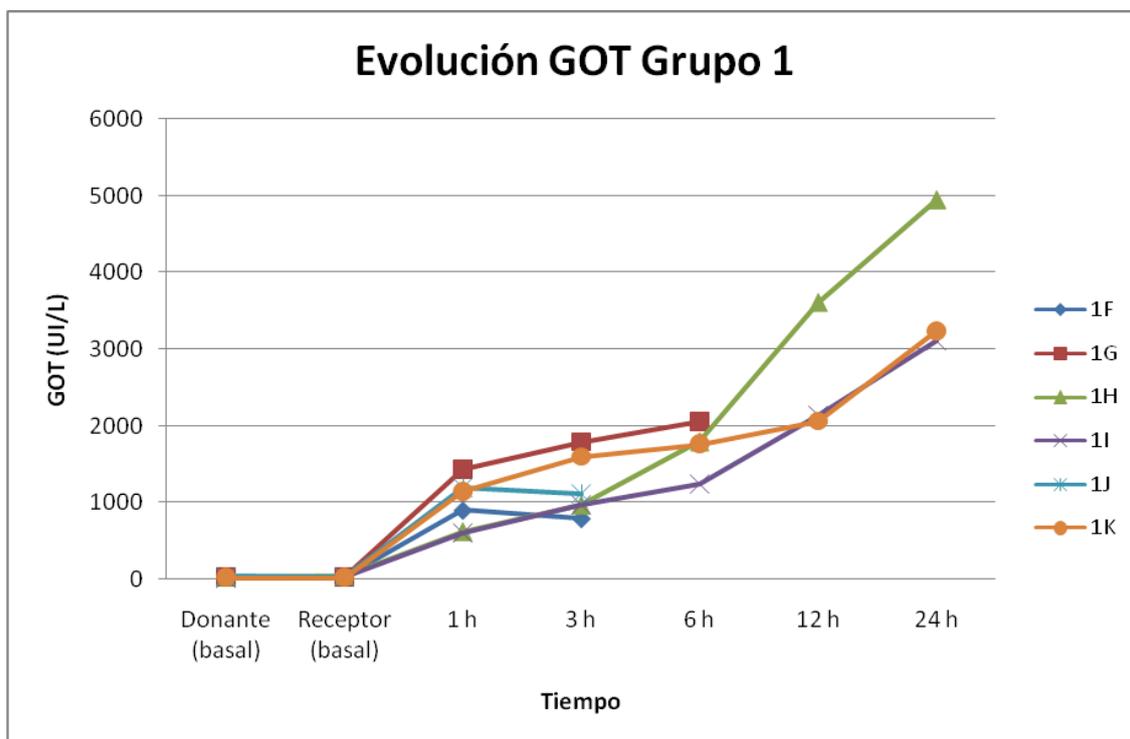


Gráfico 5: Curvas de cada animal del Grupo 1 de los niveles de GOT

En el gráfico podemos observar la tendencia de los animales de este grupo, hacia una insuficiencia hepática grave.

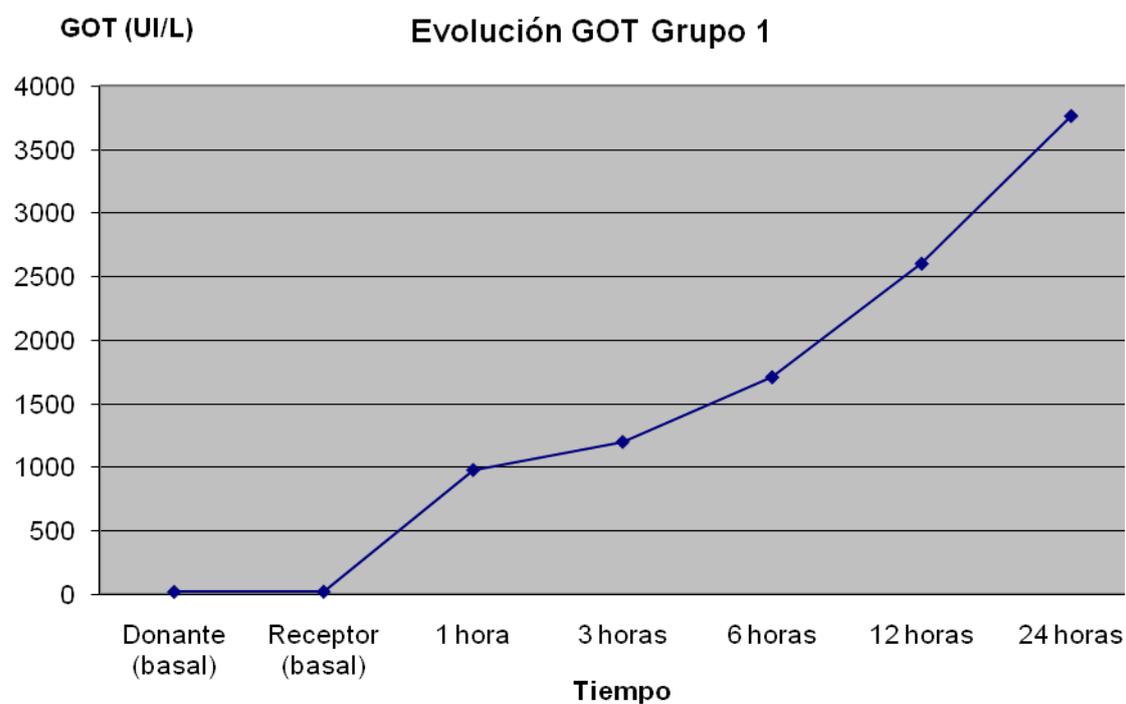


Gráfico 6: Curva de la media de los niveles de GOT en el Grupo 1

En la siguiente tabla podemos observar la evolución de la media de GOT del Grupo 1.

	Media	Desviación Típica	Error Estándar
Donante (basal)	24,80	8,526	3,813
Receptor (basal)	26,17	5,529	2,257
1 hora	983,00	332,773	135,854
3 horas	1203,67	395,999	161,666
6 horas	1712,25	339,055	169,527
12 horas	2604,00	866,903	500,507
24 horas	3764,33	1021,990	590,046

Tabla 6: Media, desviación típica y error estándar de los datos de GOT en el Grupo 1

Grupo 2:***Evolución general:***

En este grupo todos los animales excepto uno sobrevivieron los cinco días de seguimiento. Existe un daño inicial, aunque más moderado que en el Grupo 1. Hay un animal en el que este daño es más severo (2H), llegando a hacer un pico de 3000 UI/L a las 24 horas. Este fue el animal que murió a las 80 horas de seguimiento; pero, tras ese pico inicial, vemos cómo mejoran sus cifras de GOT.

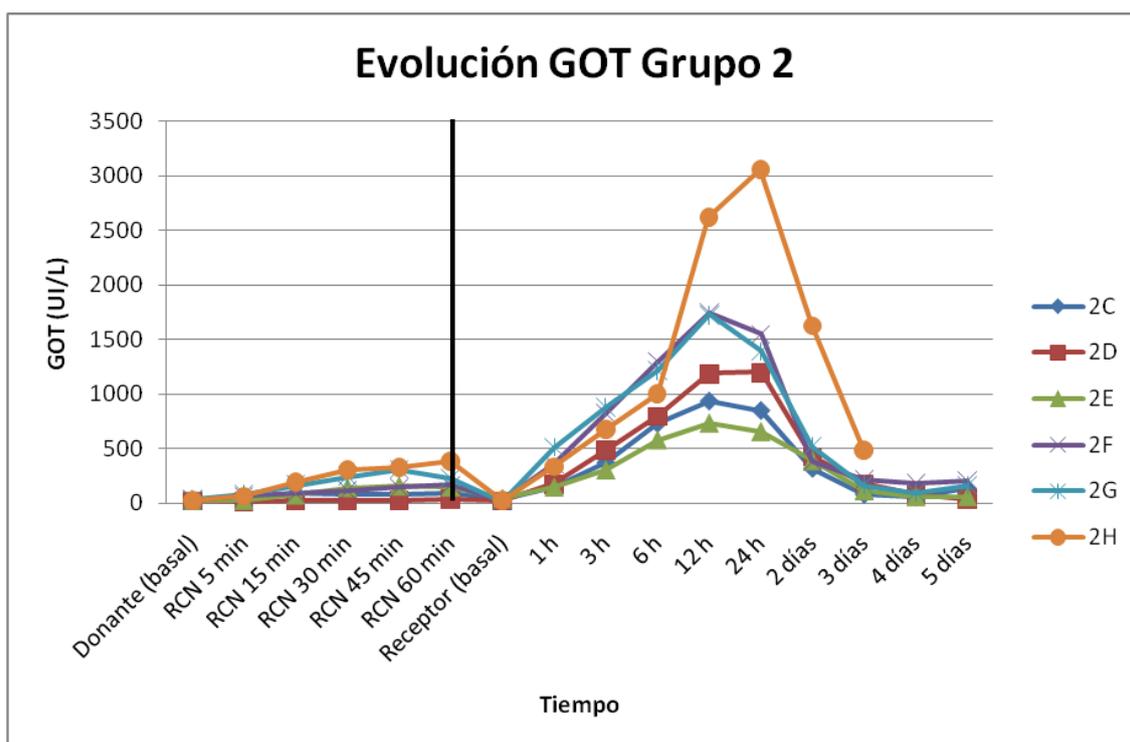


Gráfico 7: Curvas de cada animal del Grupo 2 de los niveles de GOT

La recuperación de la funcionalidad hepática en el resto del grupo se produce a partir de las 24 horas del implante, donde el daño es máximo. Esta recuperación es lenta durante los 4 días posteriores del seguimiento.

Periodo de RCN:

Durante la recirculación normotérmica (RCN) hay bastante variabilidad interindividual respecto a las cifras de GOT, con animales en los que prácticamente no se alteran las GOT (manteniéndose siempre entre 15 y 40 UI/L); y otros animales en los que las cifras rondan los 300-400 UI/L. Serán estos animales que tienen los peores valores de GOT durante la RCN los que posteriormente tendrán una peor evolución de este parámetro tras el trasplante.

Periodo post-trasplante:

El pico de transaminasas se produce a las 12-24 horas, con cifras que oscilan entre 700 y 1800 UI/L dependiendo de cada animal.

Evolución media del grupo 2:

Tomando todos los animales en conjunto, vemos que a las 12-24 horas, la media de GOT es de 1489 y 1448 UI/L. Tras este pico inicial, hay una tendencia a la recuperación de forma continua, hasta el 5º día, previo al sacrificio, donde la cifra media de GOT es de 119,80 UI/L.

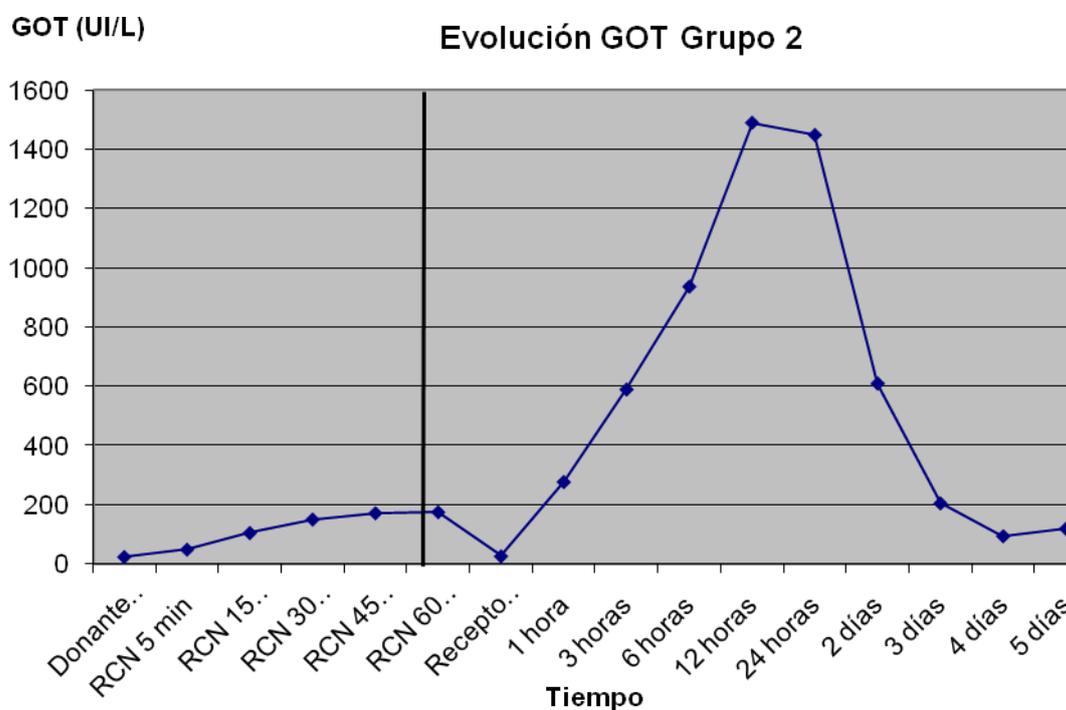


Gráfico 8: Curva de la media de los niveles de GOT en el Grupo 2

Vemos que en este grupo el injerto hepático se recupera del daño isquémico inicial, tras haber añadido, en comparación con el grupo 1, un periodo de una hora de RCN tras los 90 minutos de parada cardiaca a los que sometemos a todos los grupos.

	Media	Desviación Típica	Error Estándar
Donante (basal)	24,50	5,394	2,202
RCN 5 min	49,33	26,166	10,682
RCN 15 min	105,33	63,949	26,107
RCN 30 min	151,00	103,892	42,414
RCN 45 min	172,17	120,370	49,141
RCN 60 min	175,67	121,852	49,746
Receptor (basal)	26,83	8,495	3,468
1 hora	277,50	147,172	60,083
3 horas	589,67	239,368	97,722
6 horas	936,67	285,137	116,407
12 horas	1489,33	689,491	281,484
24 horas	1448,33	856,327	349,594
2 días	609,83	501,227	204,625
3 días	205,50	143,879	58,738
4 días	94,80	49,917	22,324
5 días	119,80	70,730	31,631

Tabla 7: Media, desviación típica y error estándar de los datos de GOT en el Grupo 2

Es interesante observar que el pico máximo no alcanza los 1500 UI/L de media, con una posterior recuperación.

Grupo 3:***Evolución general:***

En este grupo, todos los animales sobrevivieron los cinco días, con una recuperación casi completa de la función hepática. De hecho, la media al quinto día de la cifra de GOT fue de 88,83 UI/L.

El punto de mayor daño funcional se produjo también a las 12-24 horas, pero con cifras considerablemente mejores si comparamos con el grupo 2. Así, tenemos como media de GOT: 836,50 UI/L, con variaciones entre los diferentes animales que van desde 500 a 1450 UI/L.

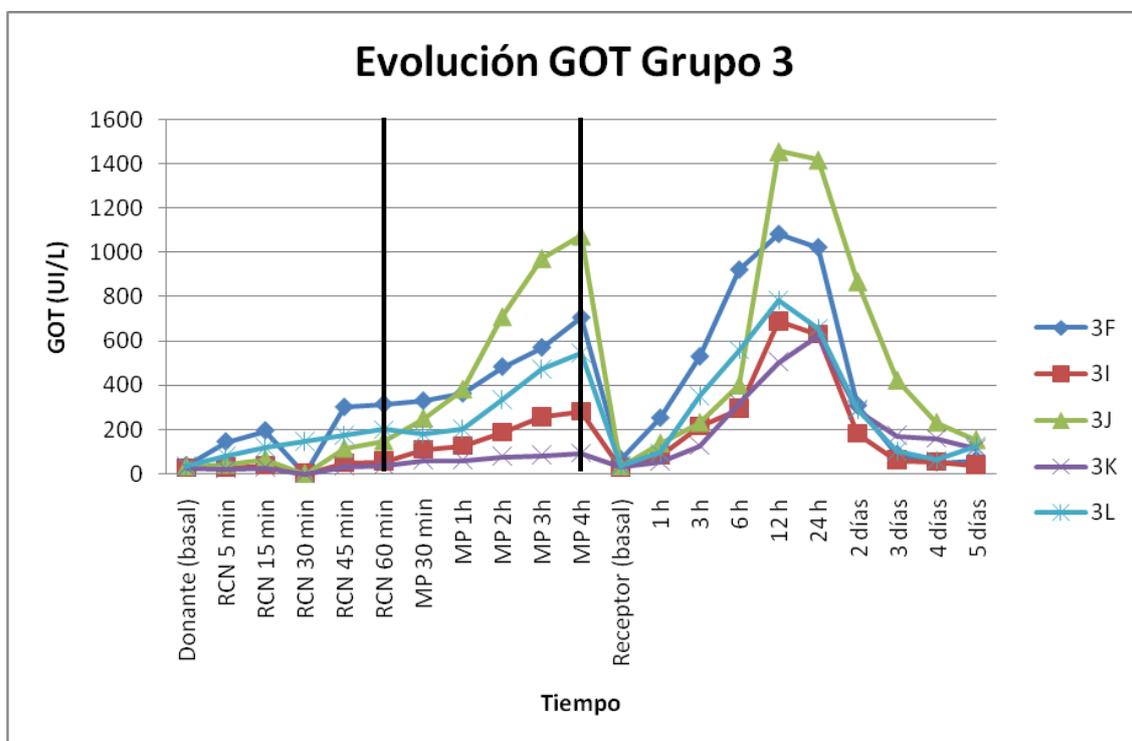


Gráfico 9: Curvas de cada animal del Grupo 3 de los niveles de GOT

Periodo de RCN:

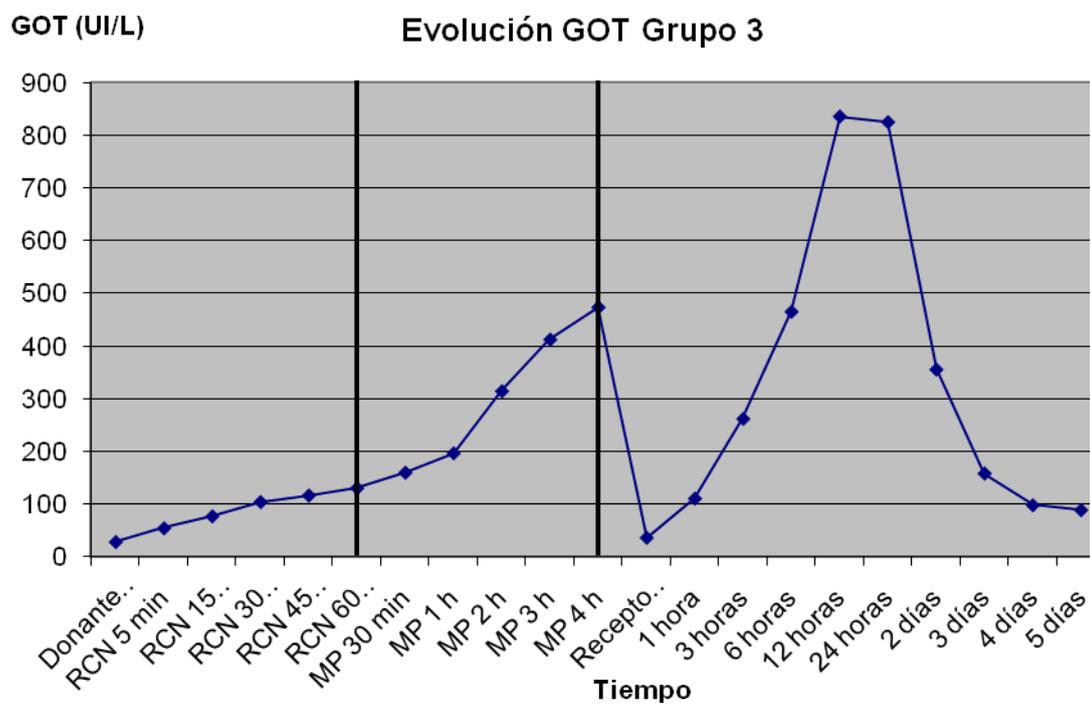
Durante el periodo de RCN hay una variabilidad también importante entre los diferentes animales del grupo, manteniéndose por debajo de 100 UI/L todos los animales excepto dos: 3L, que llega a 198 UI/L y 3F, que llega a 314 UI/L a los 60 minutos de RCN.

Periodo de MP:

Durante el periodo en el que el injerto se encuentra en la máquina de perfusión (MP), hay un aumento de los valores de GOT, con una variabilidad también importante entre los diferentes animales. Así, el animal 3K no llega a las 100 UI/L de GOT a las 4 horas de MP, y, sin embargo, el animal 3J llega a sobrepasar las 200 UI/L al final del periodo de 4 horas de MP.

Periodo post-trasplante:

En la evolución post-trasplante, es interesante observar que aquellos animales con mayor repercusión en las cifras de GOT durante el periodo de MP tuvieron también un pico más acentuado tras el implante. Así, el animal 3J tuvo un pico de GOT a las 12-24 horas de 1458 UI/L. El animal 3F, que fue el segundo que tuvo mayor incremento de las cifras de GOT durante el periodo de MP también es el que realiza el 2º pico de GOT más importante en el post-trasplante, de 1082 UI/L. El resto de los animales hicieron su pico de GOT a las 12-24 horas por debajo de 800 UI/L todos ellos. Al 5º día de seguimiento, todos los animales están con cifras de GOT por debajo de 150 UI/L.

Evolución media del grupo 3:**Gráfico 10: Curva de la media de los niveles de GOT en el Grupo 3**

	Media	Desviación Típica	Error Estándar
Donante (basal)	28,17	8,864	3,619
RCN 5 min	54,33	50,059	20,436
RCN 15 min	77,00	68,373	27,913
RCN 30 min	104,17	101,312	41,361
RCN 45 min	116,67	106,622	43,528
RCN 60 min	130,50	112,199	45,805
MP 30 min	160,00	114,783	46,860
MP 1 h	196,83	146,328	59,738
MP 2 h	314,67	247,278	100,951
MP 3 h	412,83	335,256	136,868
MP 4 h	473,83	377,380	154,065
Receptor (basal)	36,33	14,774	6,031
1 hora	110,83	76,392	31,187
3 horas	262,17	155,591	63,520
6 horas	465,67	244,200	99,694
12 horas	836,50	372,376	152,022
24 horas	825,83	331,472	135,323
2 días	355,83	256,630	104,769
3 días	158,33	134,837	55,047
4 días	98,00	79,657	32,520
5 días	88,83	48,317	19,725

Tabla 8: Media, desviación típica y error estándar de los datos de GOT en el Grupo 3

Con estos datos podemos observar que el daño hepático sufrido a las 24 horas del implante es menor que en los otros grupos. Además, la recuperación funcional durante los siguientes días es más rápida y eficaz.

Comparación entre grupos:

En este gráfico queda a la vista la evolución de cada grupo, observando la evolución de la curva del grupo 3, en comparación con los demás grupos.

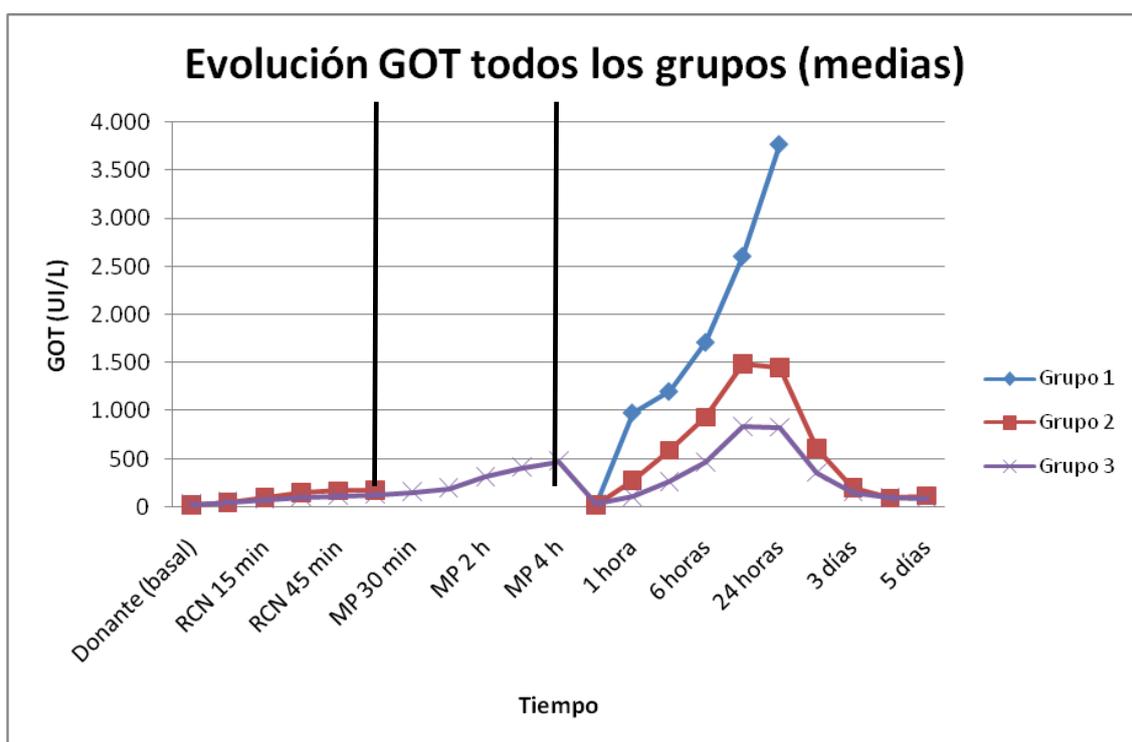


Gráfico 11: Curvas de las medias de GOT de cada grupo

Evolución general:

Vemos la potencialidad del daño isquémico inicial debido a los 90 minutos de parada cardíaca en cada grupo. No sólo podemos observar la diferencia entre cada grupo de la magnitud de ese daño, sino también la forma y el grado de recuperación de cada grupo.

Periodo de RCN:

En cuanto al periodo de RCN, no observamos diferencias (como cabe esperar) entre las curvas de los grupos 2 y 3, puesto que todos los animales de estos dos grupos han tenido exactamente el mismo procedimiento hasta ese punto.

Periodo post-trasplante:

En lo que respecta la evolución post-trasplante, es aquí donde vemos las grandes diferencias que existen entre las curvas de cada grupo. Así, el pico de GOT del grupo 3 es de 835 UI/L, el del grupo 2 llega casi a 1500 UI/L y el grupo 1 no tiene pico puesto que todos los animales fallecen en las primeras 24 horas, con un aumento progresivo de los valores de GOT.

Comparación estadística de las medias de cada grupo

Grupos 1 y 2

	Grupo 1	Grupo 2	F	p
Donante (basal)	24,80	24,50	,005	,945
Receptor (basal)	26,17	26,83	,026	,875
1 hora	983,00	277,50	22,556	,001
3 horas	1203,67	589,67	10,564	,009
6 horas	1712,25	936,67	15,371	,004
12 horas	2604,00	1489,33	4,483	,072
24 horas	3764,33	1448,33	13,048	,009

Tabla 9: Prueba ANOVA para comparación de las medias de GOT entre los grupos 1 y 2, con la distribución F y el valor p de significación estadística

Comparando las medias de GOT de los grupos 1 y 2 vemos que existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en todas las determinaciones analíticas tras el implante, excepto a las 12 horas post-reperusión. Aunque la p no es inferior a 0,05 a las 12 horas, vemos una gran diferencia entre sus medias.

Grupos 1 y 3

	Grupo 1	Grupo 3	F	p
Donante (basal)	24,80	28,17	,407	,539
Receptor (basal)	26,17	36,33	2,492	,145
1 hora	983,00	110,83	39,152	,000
3 horas	1203,67	262,17	29,380	,000
6 horas	1712,25	465,67	46,398	,000
12 horas	2604,00	836,50	19,913	,003
24 horas	3764,33	825,83	45,820	,000

Tabla 10: Prueba ANOVA para comparación de las medias de GOT entre los grupos 1 y 3, con la distribución F y el valor p de significación estadística

Al comparar las medias de GOT de los grupos 1 y 3 vemos que existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en todos los valores de GOT tras la reperfusión del injerto.

Grupos 2 y 3

	Grupo 2	Grupo 3	F	p
Donante (basal)	24,50	28,17	,749	,407
RCN 5 min	49,33	54,33	,047	,833
RCN 15 min	105,33	77,00	,550	,476
RCN 30 min	151,00	104,17	,625	,448
RCN 45 min	172,17	116,67	,715	,418
RCN 60 min	175,67	130,50	,446	,519
Receptor (basal)	26,83	36,33	1,864	,202
1 hora	277,50	110,83	6,062	,034
3 horas	589,67	262,17	7,896	,018
6 horas	936,67	465,67	9,444	,012
12 horas	1489,33	836,50	4,164	,069
24 horas	1448,33	825,83	2,757	,128
2 días	609,83	355,83	1,221	,295
3 días	205,50	158,33	,343	,571
4 días	94,80	98,00	,006	,940
5 días	119,80	88,83	,743	,411

Tabla 11: Prueba ANOVA para comparación de las medias de GOT entre los grupos 2 y 3, con la distribución F y el valor p de significación estadística

Comparando las medias de GOT de los grupos 2 y 3 observamos diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) a la hora, a las 3 horas y a las 6 horas post-reperfusión. Aunque la p no es inferior a 0,05 a las 12 y 24 horas, vemos también entre estos dos grupos una gran diferencia numérica entre sus medias.

2.2. LDH

Grupo 1:

Evolución general:

Al igual que ocurre con las GOT, los valores de LDH de este grupo siguen la misma tendencia. Existe un empeoramiento progresivo de las cifras de LDH hasta el fallecimiento de todos los animales en las primeras 24 horas.

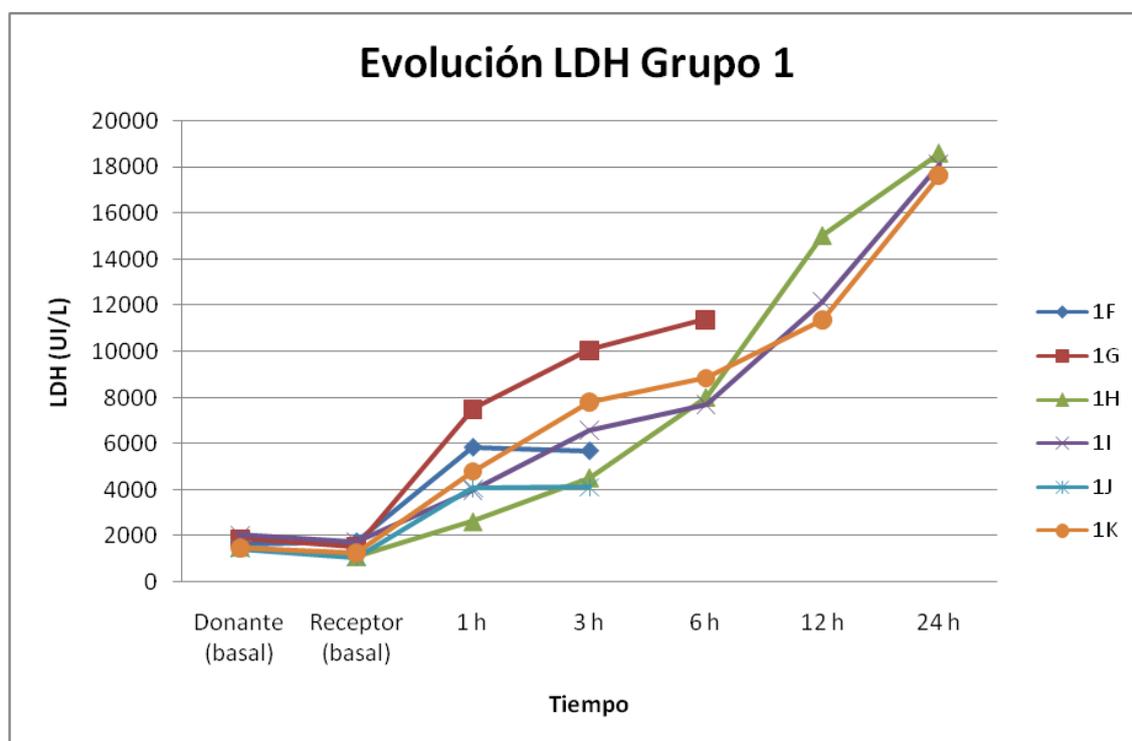
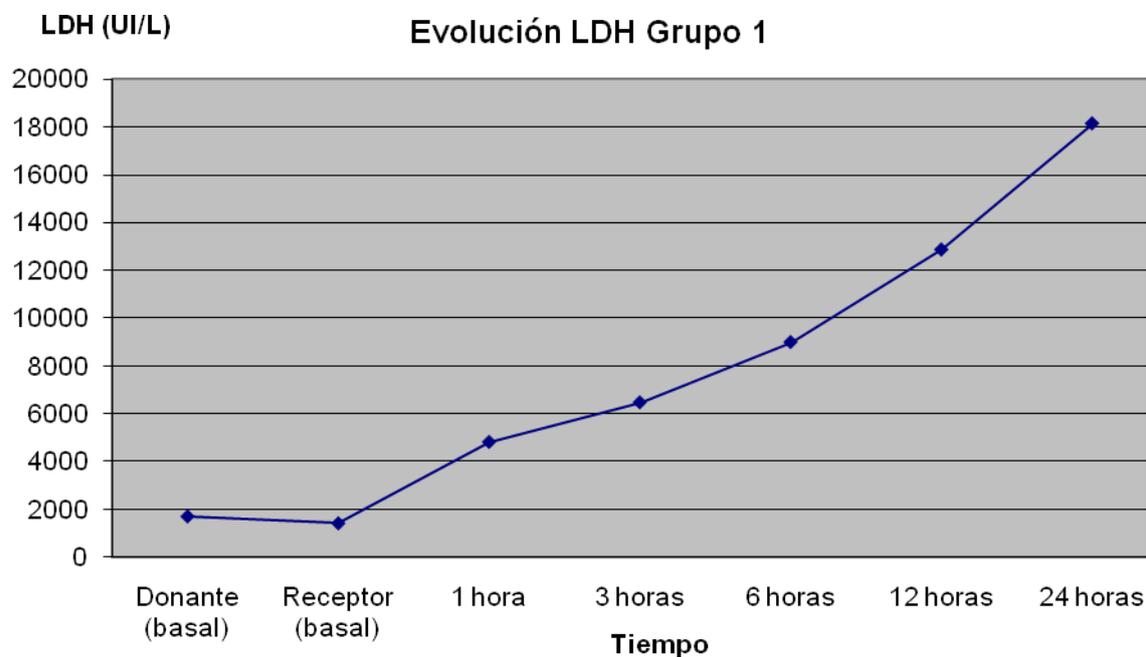


Gráfico 12: Curvas de cada animal del Grupo 1 de los niveles de LDH

Evolución media del grupo 1:**Gráfico 13: Curva de la media de los niveles de LDH en el Grupo 1**

	Media	Desviación Típica	Error Estándar
Donante (basal)	1701,40	269,652	120,592
Receptor (basal)	1413,17	311,671	127,239
1 hora	4813,83	1691,715	690,640
3 horas	6472,33	2217,571	905,320
6 horas	8991,50	1679,337	839,668
12 horas	12860,33	1926,666	1112,361
24 horas	18131,67	481,546	278,021

Tabla 12: Media, desviación típica y error estándar de los datos de LDH en el Grupo 1

En la curva de las medias y la tabla de datos podemos observar esta misma tendencia ya observada para las GOT, reflejo de una insuficiencia hepática grave.

Grupo 2:***Evolución general:***

Al igual que ocurría con las GOT también en este grupo, para las LDH se produce una situación similar. El daño inicial es muy severo, aunque no como para que se mueran los animales de este grupo. La recuperación se produce, aunque lentamente.

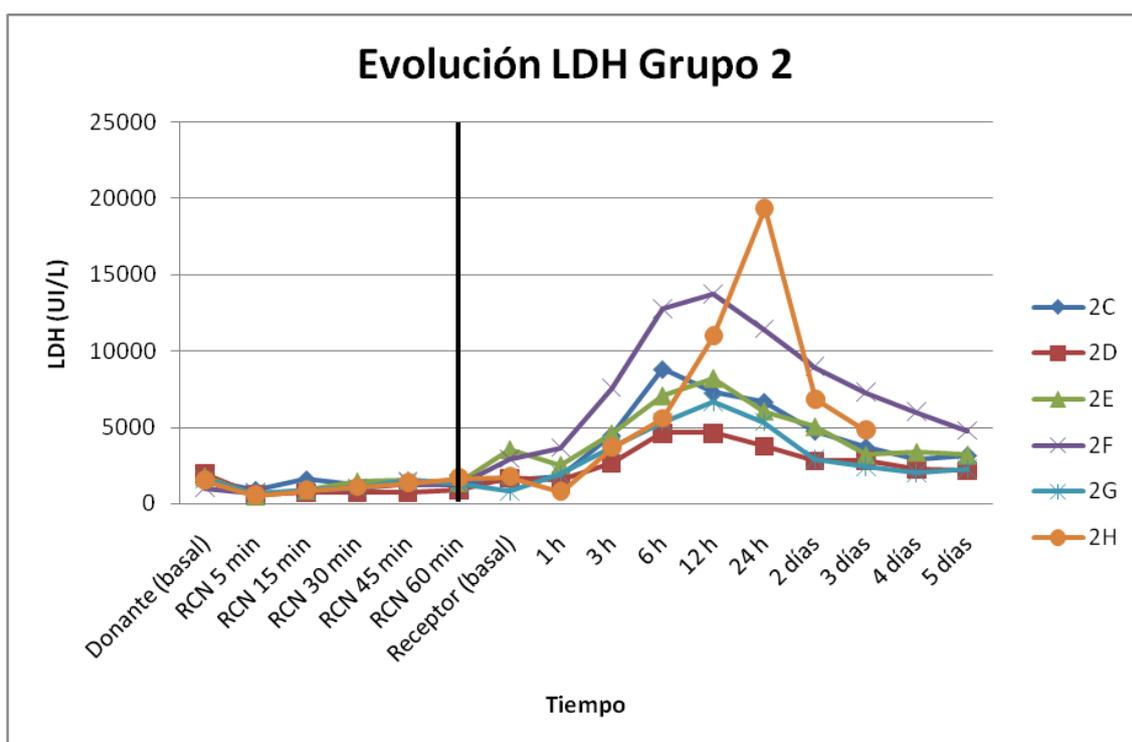


Gráfico 14: Curvas de cada animal del Grupo 2 de los niveles de LDH

Periodo de RCN:

Durante el periodo de RCN existe un aumento continuo, aunque leve, de las cifras de LDH. Las cifras de LDH durante este periodo oscilan entre 450 y 1643 UI/L. El animal 2D es el que menos sufre este aumento, con un valor de LDH 895 UI/L a los 60 minutos de la RCN. El animal que más incrementa sus valores de LDH es el animal 2H, con un valor de 1643 UI/L al final del periodo de RCN.

Periodo post-trasplante:

Respecto al periodo post-trasplante, al observar las curvas vemos que el pico de LDH se produce entre las 6 y las 12 horas, con una recuperación parcial posterior, aunque lenta durante el seguimiento. Este pico también es variable entre los diferentes animales, aunque es interesante observar cómo los animales que han tenido una mejor evolución de sus cifras de LDH durante el periodo de RCN también tienen una peor evolución tras el implante. Así, el animal 2H es el único que murió antes del 5° día de seguimiento, con el pico de LDH más pronunciado, alcanzando las 20.000 UI/L a las 24 horas. Vemos que, al revés, también se cumple que aquellos animales con mejor evolución durante la RCN tienen también una mejor evolución tras el trasplante. El animal 2D tiene un pico de LDH que no llega a las 5000 UI/L

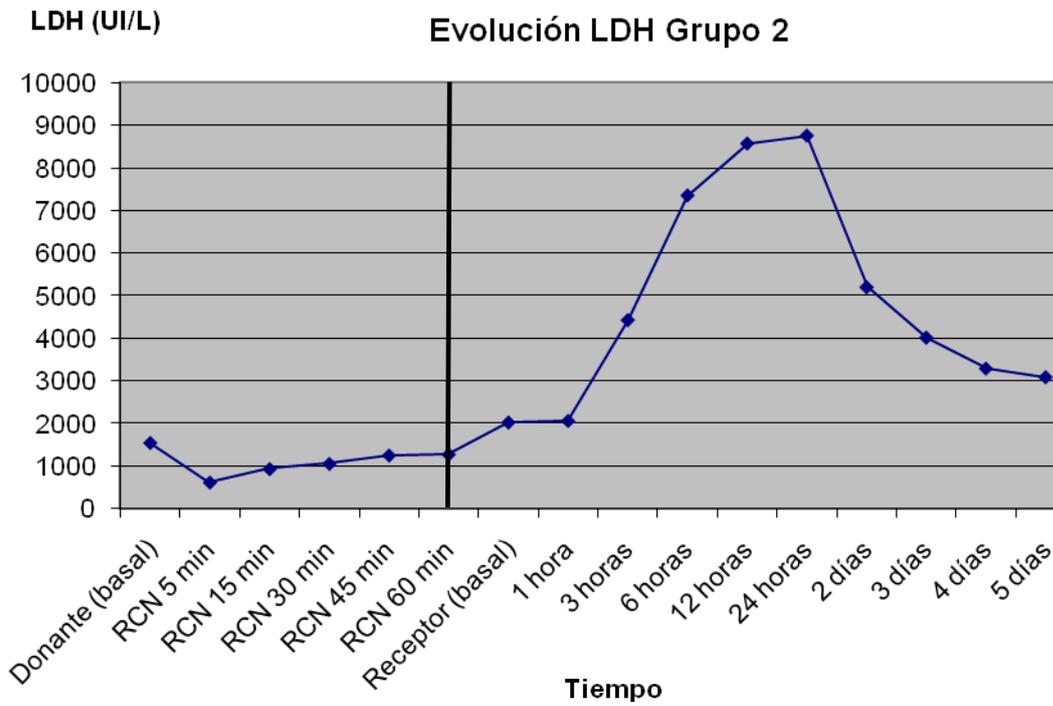
Evolución media del grupo 2:

Gráfico 15: Curva de la media de los niveles de LDH en el Grupo 2

Al observar el gráfico y la tabla de la media de los valores de LDH de los animales del grupo 2 vemos la tendencia de este grupo.

Durante la RCN existe un incremento moderado de las cifras de LDH, pasando de 618 a 1275 UI/L al final de este periodo.

Tras el implante del injerto se produce un pico medio de 8761 UI/L a las 12-24 horas, con una lenta tendencia a la recuperación, que no se produce del todo, con una cifra media de 3091 UI/L a los 5 días de seguimiento

	Media	Desviación Típica	Error Estándar
Donante (basal)	1548,17	308,403	125,905
RCN 5 min	618,33	144,198	58,869
RCN 15 min	934,33	306,459	125,111
RCN 30 min	1056,67	235,768	96,252
RCN 45 min	1254,17	299,154	122,129
RCN 60 min	1275,33	241,065	98,414
Receptor (basal)	2028,67	987,483	403,138
1 hora	2065,80	1076,260	481,318
3 horas	4431,67	1697,812	693,129
6 horas	7358,17	3054,468	1246,981
12 horas	8576,83	3290,109	1343,181
24 horas	8761,83	5796,223	2366,298
2 días	5205,33	2378,327	970,948
3 días	4020,17	1795,987	733,209
4 días	3294,60	1591,716	711,837
5 días	3091,20	1035,889	463,264

Tabla 13: Media, desviación típica y error estándar de los datos de LDH en el Grupo 2

Grupo 3:***Evolución general:***

En el grupo 3 todos los animales sobreviven los 5 días de seguimiento.

Periodo de RCN:

Durante el periodo de RCN, al igual que en el grupo 2, existen diferencias entre los animales. Hay dos animales, 3F y 3L, que son los que presentan peores cifras de LDH durante este periodo, siendo de 1485 y 1545 UI/L respectivamente a los 60 minutos de RCN. Los demás animales tienen una elevación moderada, como en el grupo 2, hasta cifras que varían desde 550 a 900 UI/L al final de este periodo.

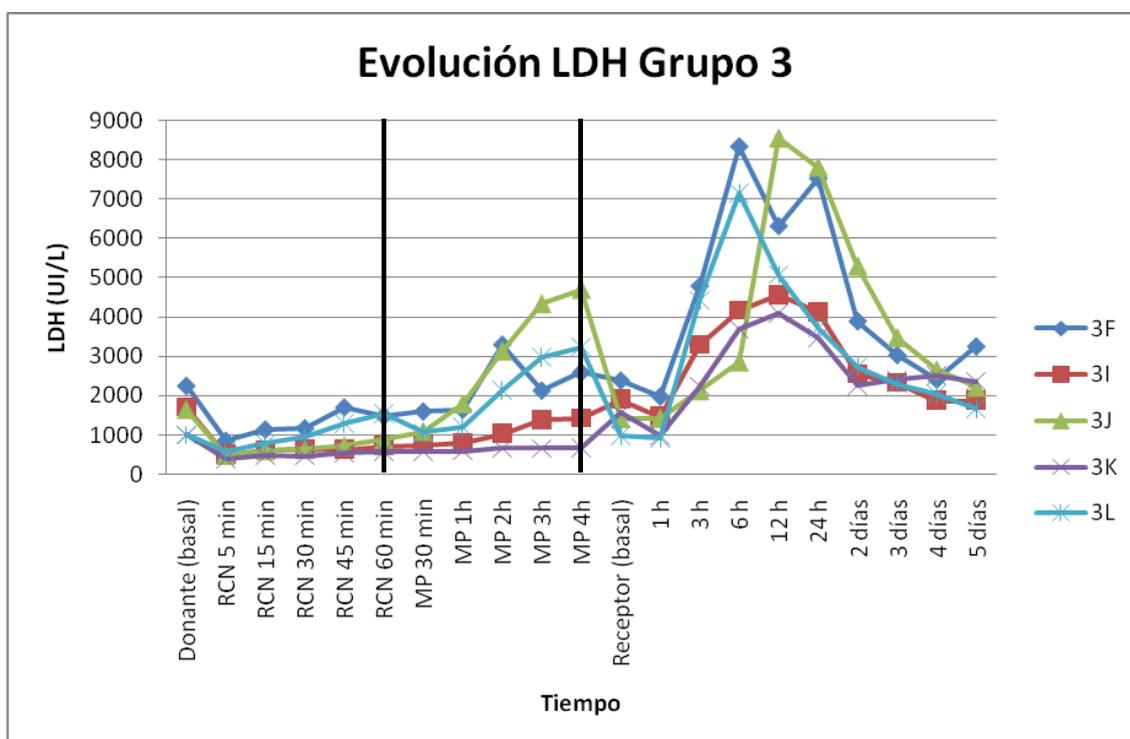


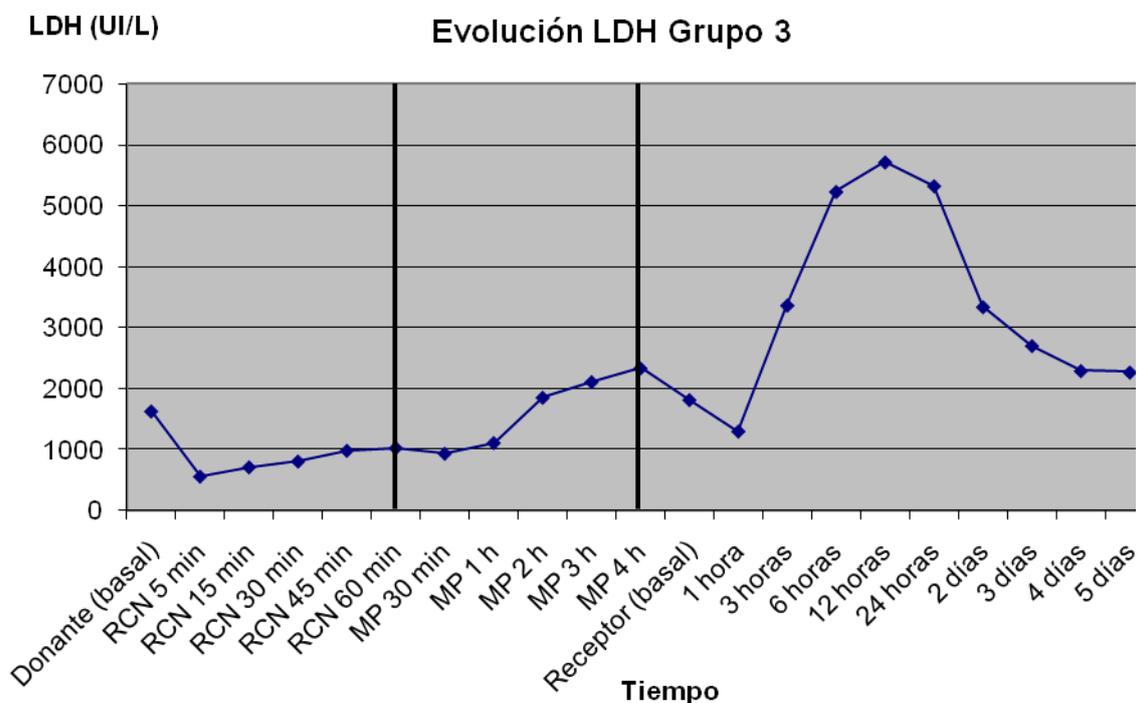
Gráfico 16: Curvas de cada animal del Grupo 3 de los niveles de LDH

Periodo MP:

En el periodo en el que el injerto está siendo perfundido en la máquina, hay tres animales que sufren una mayor elevación de sus valores de LDH. Estos animales son 3J, 3L y 3F. Estos dos últimos animales mencionados eran también los que peor evolución habían tenido sus cifras de LDH durante la RCN. A las 4 horas del periodo de MP, estos animales tienen cifras de LDH de 4700, 3200 y 2600 UI/L. Los otros dos animales, 3I y 3K, al final de las 4 horas de MP tienen unas cifras de LDH de 1400 y 670 UI/L respectivamente.

Periodo post-trasplante:

En cuanto al periodo de post-reperfusión del injerto hepático, el pico se produce entre las 6 y las 24 horas. Este pico es más marcado en 3 animales: 3F, 3J y 3L. En estos animales, se alcanzan cifras de LDH entre 7000 y 8500 UI/L. Recordemos que estos tres animales son los que habían tenido una peor evolución de las cifras de LDH durante el periodo de MP, y también (dos de ellos), durante el periodo de RCN. En los otros dos animales, el pico se sitúa entre 4000 y 4500 UI/L a las 12 horas post-reperfusión. La recuperación en este grupo tampoco es completa, pero ésta se produce de una forma más rápida y más eficaz, alcanzando cifras de LDH a los 5 días de seguimiento entre 1600 y 2350 UI/L para todos ellos excepto para el animal 3F, que sufre un incremento al 5º día, para subir a 3250 UI/L (después de haber estado a 2410 UI/L el 4º día de seguimiento).

Evolución media del grupo 3:**Gráfico 17: Curva de la media de los niveles de LDH en el Grupo 3**

Observando el gráfico de las medias de LDH en este grupo vemos una tendencia similar a la evolución de las GOT, aunque en el caso de las LDH, la recuperación es más lenta y no llega a ser total.

Durante la RCN, el aumento de LDH es lento pero progresivo, llegando a superar las 1000 UI/L. Una vez puesto en máquina el injerto, siguen aumentando las LDH hasta ser casi de 2350 UI/L a las 4 horas de MP. En el periodo post-trasplante, el pico medio se produce a las 12 horas tras la reperusión, con una cifra de LDH de 5722 UI/L, para ir disminuyendo progresivamente. Se observa una supuesta estabilización de

los valores en torno a 2200 UI/L durante los 2 últimos días. Al ser una media, esta supuesta estabilización se debería al aumento el último día de la cifra de LDH para el animal 3F, ya que las curvas individualizadas por animal muestra un descenso continuo, con una tendencia a la normalización (que no llegamos a ver en sólo 5 días de seguimiento).

	Media	Desviación Típica	Error Estándar
Donante (basal)	1635,17	554,474	226,363
RCN 5 min	565,83	163,958	66,935
RCN 15 min	718,83	234,711	95,820
RCN 30 min	813,67	281,607	114,966
RCN 45 min	990,33	454,431	185,521
RCN 60 min	1033,17	400,731	163,598
MP 30 min	941,33	394,272	160,961
MP 1 h	1117,17	510,987	208,609
MP 2 h	1860,33	1169,485	477,440
MP 3 h	2117,00	1354,087	552,804
MP 4 h	2341,50	1478,700	603,677
Receptor (basal)	1822,17	629,901	257,156
1 hora	1306,50	402,614	164,366
3 horas	3373,60	1225,500	548,060
6 horas	5238,60	2374,814	1062,049
12 horas	5722,40	1788,790	799,971
24 horas	5333,20	2150,142	961,573
2 días	3346,20	1256,188	561,785
3 días	2709,00	523,822	234,260
4 días	2298,00	325,373	145,511
5 días	2274,80	610,584	273,061

Tabla 14: Media, desviación típica y error estándar de los datos de LDH en el Grupo 3

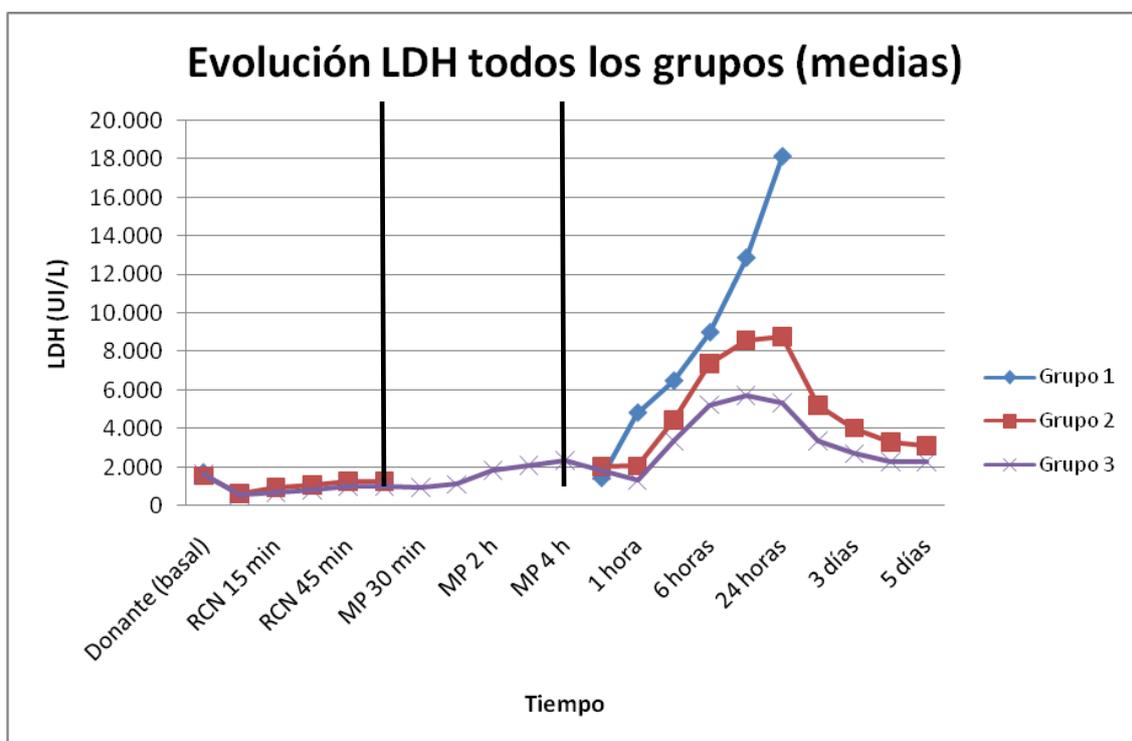
Comparación entre grupos:

Gráfico 18: Curvas de las medias de LDH de cada grupo

Evolución general:

Las curvas de las medias de los 3 grupos para las LDH es superponible al gráfico de las GOT. Vemos claramente la tendencia de cada grupo.

Periodo de RCN:

Como es de esperar, las curvas de los grupos 2 y 3 durante el periodo de RCN son superponibles.

Periodo post-trasplante:

Las diferencias las encontramos en el periodo post-trasplante.

El grupo 1 continúa teniendo un daño muy importante que condiciona la malfunción de todos los animales, con un empeoramiento progresivo de las cifras de LDH, superando las 18.000 UI/L como media a las 24 horas.

El grupo 2 sufre un daño isquémico menos importante, teniendo un pico medio de casi 9000 UI/L a las 24 horas. Este grupo tiene una tendencia posterior a la recuperación, situándose en cifras de 3000 UI/L a los 5 días.

El grupo 3 es el grupo que sufre menos lesión tras la reperfusión, con un pico medio de LDH que no llega a las 6000 UI/L a las 12 horas, estando de bajada ya a las 24 horas, para situarse al 5º día (con todos los animales vivos) con una cifra media de 2274 UI/L.

Comparación estadística de las medias de cada grupo

Grupos 1 y 2

	Grupo 1	Grupo 2	F	p
Donante (basal)	1701,40	1548,17	,752	,408
Receptor (basal)	1413,17	2028,67	2,120	,176
1 hora	4813,83	2065,80	9,785	,012
3 horas	6472,33	4431,67	3,203	,104
6 horas	8991,50	7358,17	,929	,363
12 horas	12220,67	8576,83	4,174	,080
24 horas	14314,33	8761,83	7,297	,031

Tabla 15: Prueba ANOVA para comparación de las medias de LDH entre los grupos 1 y 2, con la distribución F y el valor p de significación estadística

Comparando las medias de LDH de los grupos 1 y 2 vemos que existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) a la hora post-reperusión y las 24 horas del trasplante. Aunque la p no es inferior a 0,05 en el resto de medias, vemos que existe una diferencia cuantitativa.

Grupos 1 y 3

	Grupo 1	Grupo 3	F	p
Donante (basal)	1701,40	1635,17	,059	,814
Receptor (basal)	1413,17	1822,17	2,032	,184
1 hora	4813,83	1306,50	24,408	,001
3 horas	6472,33	3373,60	7,703	,022
6 horas	8991,50	5238,60	7,063	,033
12 horas	12220,67	5722,40	28,343	,002
24 horas	14314,33	5333,20	97,211	,000

Tabla 16: Prueba ANOVA para comparación de las medias de LDH entre los grupos 1 y 3, con la distribución F y el valor p de significación estadística

Al comparar las medias de LDH de los grupos 1 y 3 vemos que en el periodo post-trasplante todos los datos recogidos tienen una diferencia estadísticamente significativa entre grupos.

Grupos 2 y 3

	Grupo 2	Grupo 3	F	p
Donante (basal)	1548,17	1635,17	,113	,744
RCN 5 min	618,33	565,83	,347	,569
RCN 15 min	934,33	718,83	1,870	,201
RCN 30 min	1056,67	813,67	2,627	,136
RCN 45 min	1254,17	990,33	1,411	,262
RCN 60 min	1275,33	1033,17	1,609	,233
Receptor (basal)	2028,67	1822,17	,186	,675
1 hora	2065,80	1306,50	2,600	,141
3 horas	4431,67	3373,60	1,346	,276
6 horas	7358,17	5238,60	1,593	,239
12 horas	8576,83	5722,40	2,988	,118
24 horas	8761,83	5333,20	1,547	,245
2 días	5205,33	3346,20	2,452	,152
3 días	4020,17	2709,00	2,450	,152
4 días	3294,60	2298,00	1,881	,207
5 días	3091,20	2274,80	2,305	,167

Tabla 17: Prueba ANOVA para comparación de las medias de LDH entre los grupos 2 y 3, con la distribución F y el valor p de significación estadística

Al comparar las medias de LDH de los grupos 2 y 3 vemos que no existen diferencias, como cabe esperar, durante el periodo de RCN.

En el periodo post-trasplante no existen diferencias estadísticamente significativas, aunque sí que podemos ver que en todo momento las cifras de LDH son superiores cuantitativamente en el grupo 2, al compararlas con el grupo 3.

2.3. Bilirrubina

Grupo 1:

Evolución general:

El grupo 1 tiene la misma tendencia para la bilirrubina que en los parámetros previamente analizados.

Existe un incremento continuo hasta las 24 horas, donde solo quedan 3 animales vivos, con unas cifras de bilirrubina alrededor de 2,5 mg/dL; falleciendo a continuación.

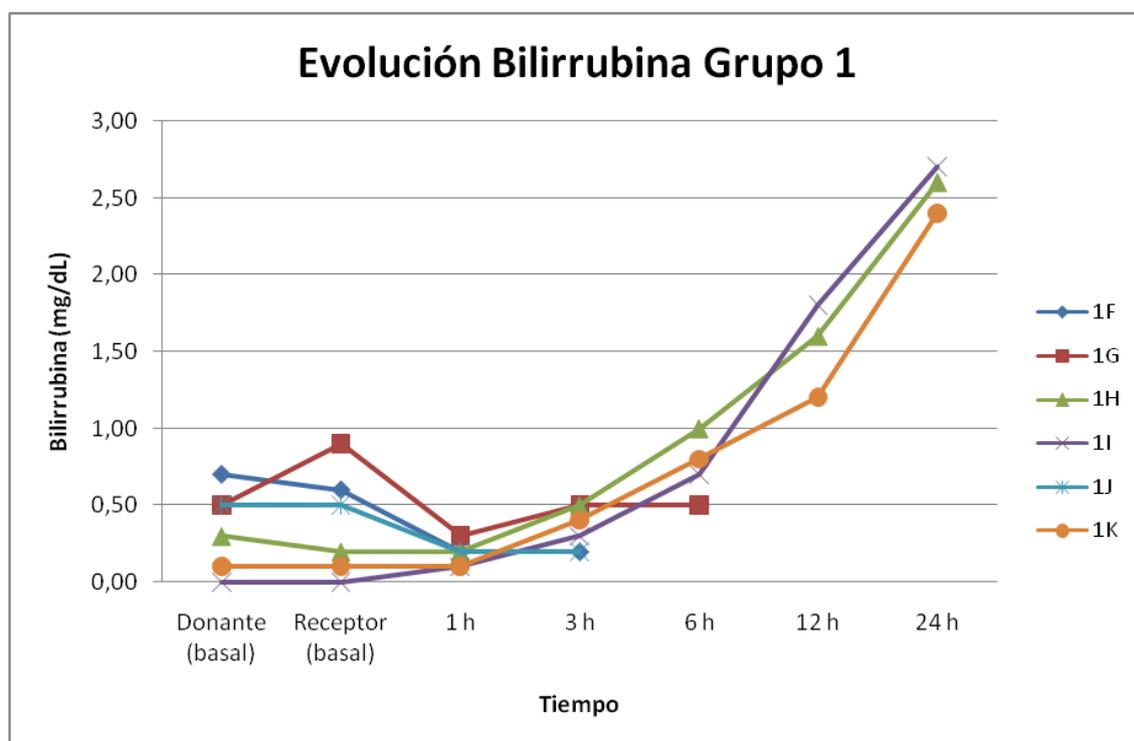
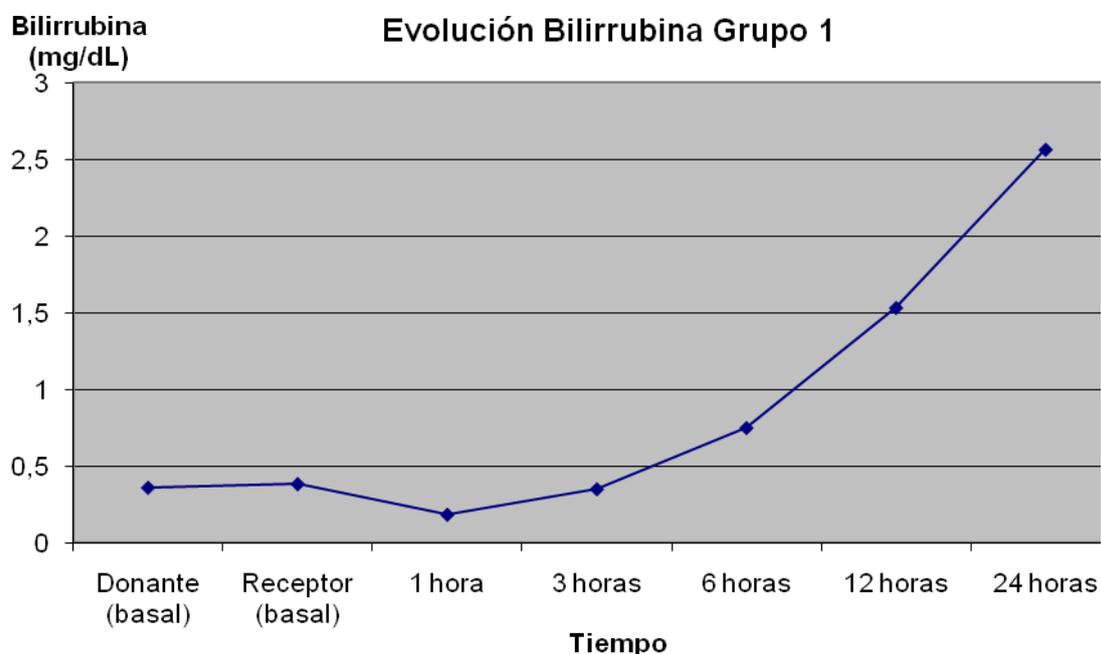


Gráfico 19: Curvas de cada animal del Grupo 1 de los niveles de Bilirrubina

Evolución media del grupo 1:**Gráfico 20: Curva de la media de los niveles de Bilirrubina en el Grupo 1**

	Media	Desviación Típica	Error Estándar
Donante (basal)	,360	,2966	,1327
Receptor (basal)	,383	,3430	,1400
1 hora	,183	,0753	,0307
3 horas	,350	,1378	,0563
6 horas	,750	,2082	,1041
12 horas	1,533	,3055	,1764
24 horas	2,567	,1528	,0882

Tabla 18: Media, desviación típica y error estándar de los datos de Bilirrubina en el Grupo 1

En este gráfico y en la tabla de datos podemos ver la bilirrubina media de los animales que quedan vivos del grupo 1. Es evidente la tendencia al fallo hepático de los animales de este grupo.

Grupo 2:***Evolución general:***

El grupo 2 sigue una evolución de sus cifras de bilirrubina inesperada.

Periodo RCN:

Durante todo el periodo de RCN se mantiene la bilirrubina en todos los animales en 0,1 mg/dL, excepto a los 60 minutos de RCN, que en el animal 2E sube a 0,2 mg/dL.

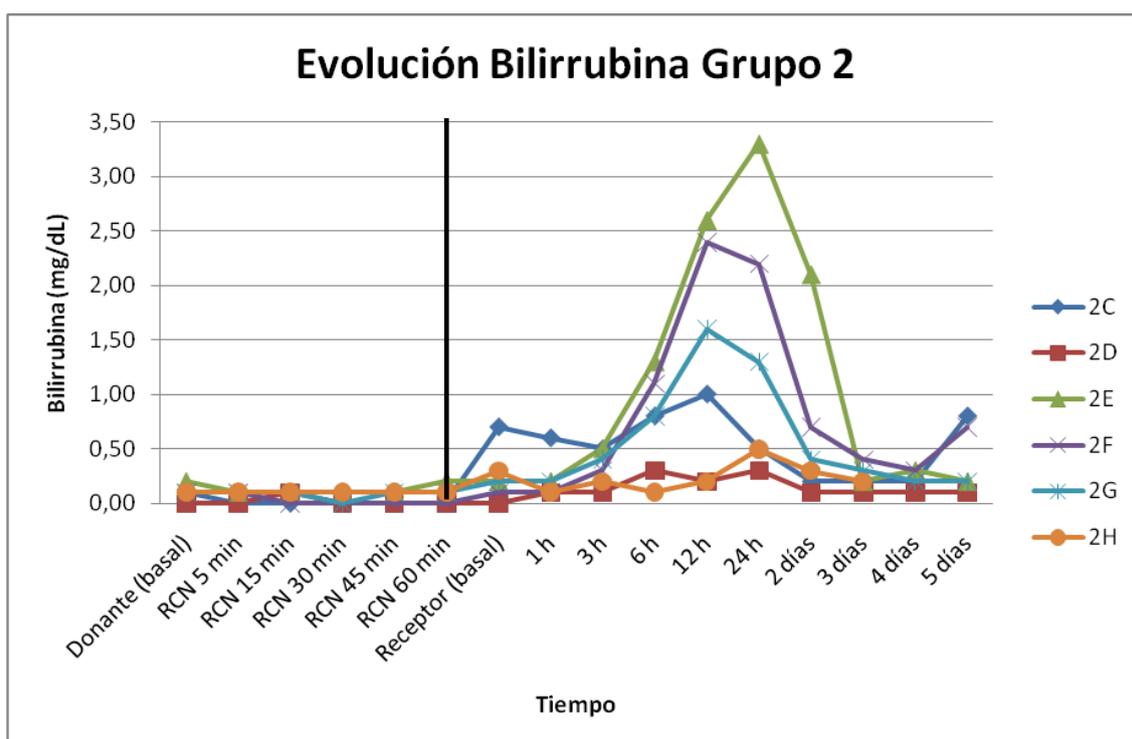


Gráfico 21: Curvas de cada animal del Grupo 2 de los niveles de Bilirrubina

Periodo post-trasplante:

En el periodo post-trasplante se produce un pico a las 12-24 horas, con normalización a los 3 días. Precisamente el animal que fallecerá a las 80 horas es de los que tienen niveles de bilirrubina más bajas, sin llegar a los 0,5 mg/dL.

A partir del 3º día todos los animales están con cifras por debajo de 0,5 mg/dL, con un aumento a 0,8 y 0,7 mg/dL en los animales 2C y 2F.

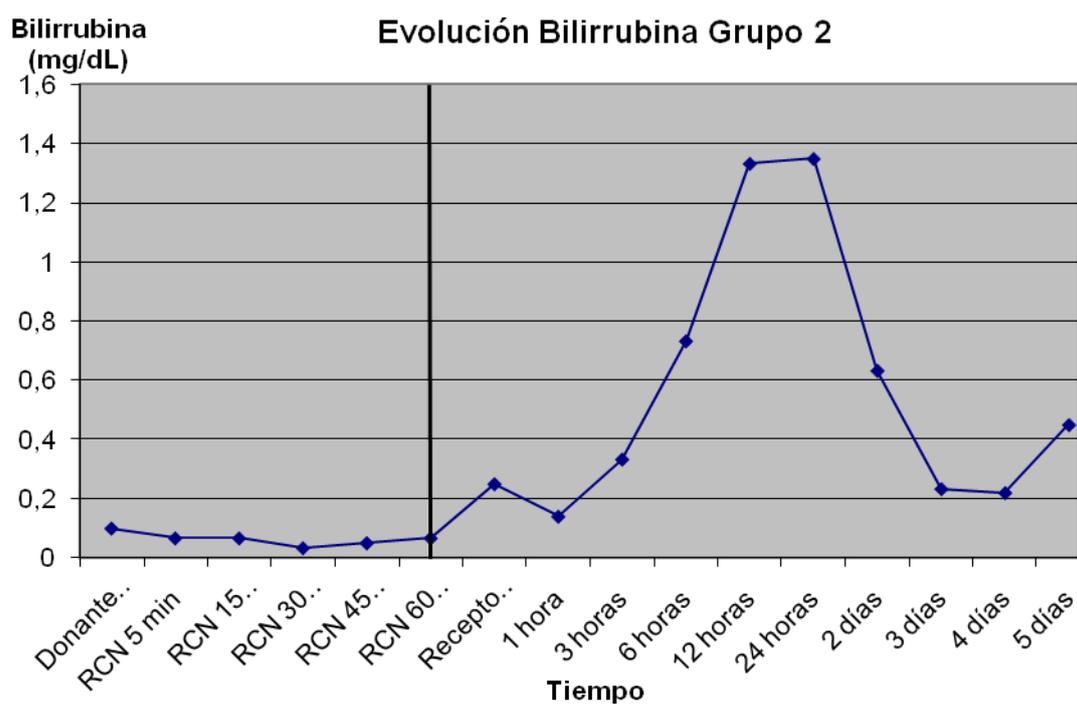
Evolución media del grupo 2:

Gráfico 22: Curva de la media de los niveles de Bilirrubina en el Grupo 2

	Media	Desviación Típica	Error Estándar
Donante (basal)	,100	,0632	0,026
RCN 5 min	,067	,0516	0,021
RCN 15 min	,067	,0516	0,021
RCN 30 min	,033	,0516	0,021
RCN 45 min	,050	,0548	0,022
RCN 60 min	,067	,0816	0,033
Receptor (basal)	,250	,2429	0,099
1 hora	,140	,0548	0,024
3 horas	,333	,1633	0,067
6 horas	,733	,4590	0,187
12 horas	1,333	1,0482	0,428
24 horas	1,350	1,1895	0,486
2 días	,633	,7474	0,305
3 días	,233	,1033	0,042
4 días	,220	,0837	0,037
5 días	,450	,3512	0,176

Tabla 19: Media, desviación típica y error estándar de los datos de Bilirrubina en el Grupo 2

Podemos ver la tendencia de la media de bilirrubina en este grupo fijándonos en el gráfico y en la tabla de valores.

Tras un leve aumento hasta las 24 horas (hasta casi 1,4 mg/dL), comienza un descenso hasta la normalización.

Grupo 3:***Evolución general:***

En el grupo 3 todos los animales se mantienen con cifras normales de bilirrubina durante todo el seguimiento.

El valor más elevado lo vemos en el animal 3F a las 6 horas post-reperusión, cuando llega a un valor de 1,1 mg/dL.

El resto de los animales no sobrepasa en ningún momento de la evolución la cifra de 0,6 mg/dL.

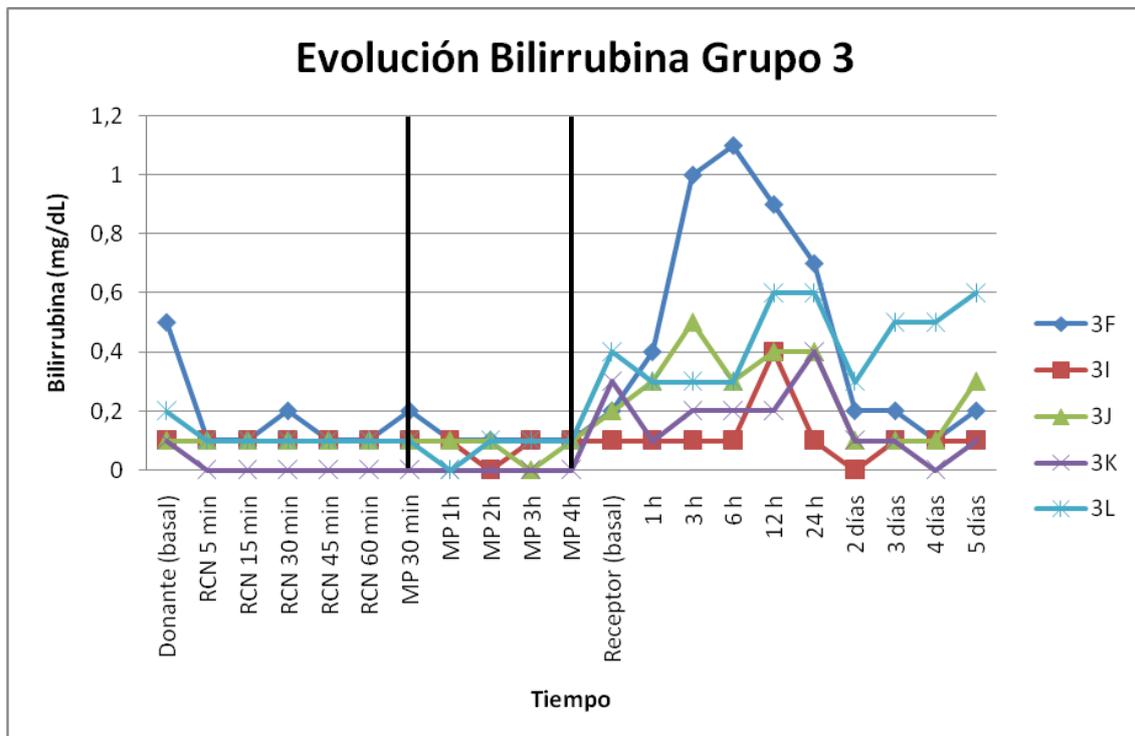


Gráfico 23: Curvas de cada animal del Grupo 3 de los niveles de Bilirrubina

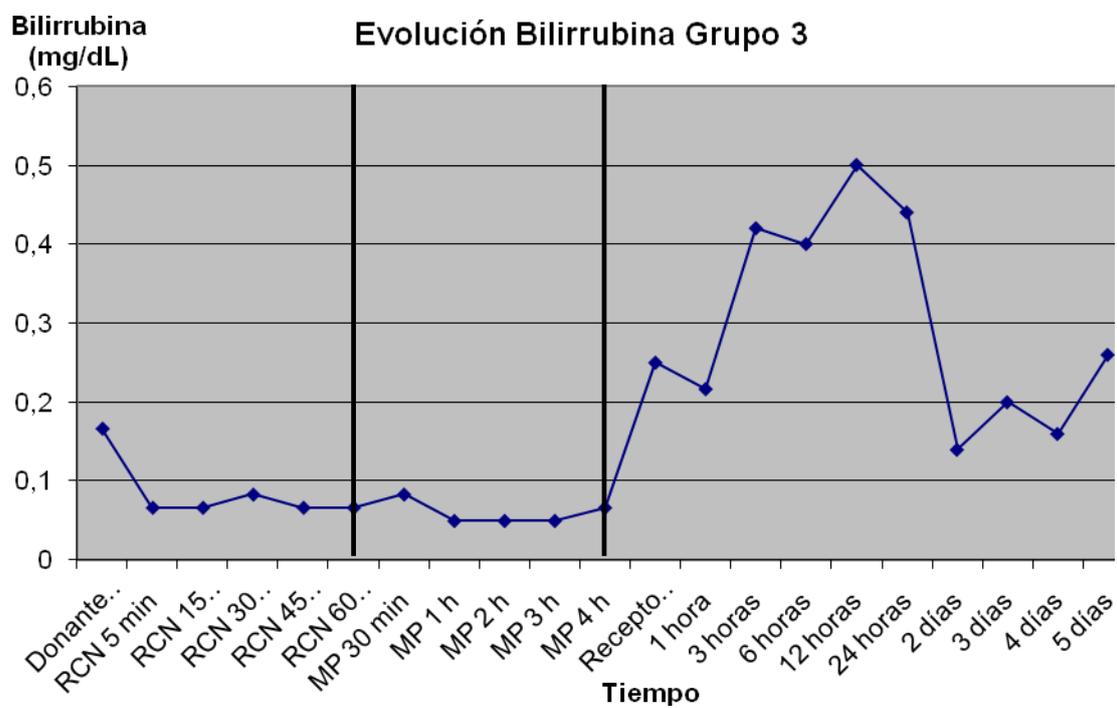
Evolución media del grupo 3:

Gráfico 24: Curva de la media de los niveles de Bilirrubina en el Grupo 3

Podemos observar la evolución de este grupo en su conjunto, cuando la cifra media más elevada es de 0,5 mg/dL a las 12 horas post-reperusión, disminuyendo posteriormente a valores medios en torno a 0,2 mg/dL.

	Media	Desviación Típica	Error Estándar
Donante (basal)	,167	,1751	0,071
RCN 5 min	,067	,0516	0,021
RCN 15 min	,067	,0516	0,021
RCN 30 min	,083	,0753	0,031
RCN 45 min	,067	,0516	0,021
RCN 60 min	,067	,0516	0,021
MP 30 min	,083	,0753	0,031
MP 1 h	,050	,0548	0,022
MP 2 h	,050	,0548	0,022
MP 3 h	,050	,0548	0,022
MP 4 h	,067	,0516	0,021
Receptor (basal)	,250	,1049	0,043
1 hora	,217	,1329	0,054
3 horas	,420	,3564	0,159
6 horas	,400	,4000	0,179
12 horas	,500	,2646	0,118
24 horas	,440	,2302	0,103
2 días	,140	,1140	0,051
3 días	,200	,1732	0,077
4 días	,160	,1949	0,087
5 días	,260	,2074	0,093

Tabla 20: Media, desviación típica y error estándar de los datos de Bilirrubina en el Grupo 3

Comparación entre grupos:

En este gráfico vemos representados todos los grupos con la cifra media de sus valores de bilirrubina.

Periodo de RCN:

Durante la RCN no se aprecian diferencias entre los grupos 2 y 3.

Periodo post-trasplante:

En el periodo post-trasplante, en los grupos 1 y 2 existen alteraciones en sus curvas medias, como hemos detallado en su apartado correspondiente.

Es interesante ver las curvas superpuestas para apreciar la evolución del grupo 3, que es prácticamente plana, sin sufrir prácticamente ninguna variación

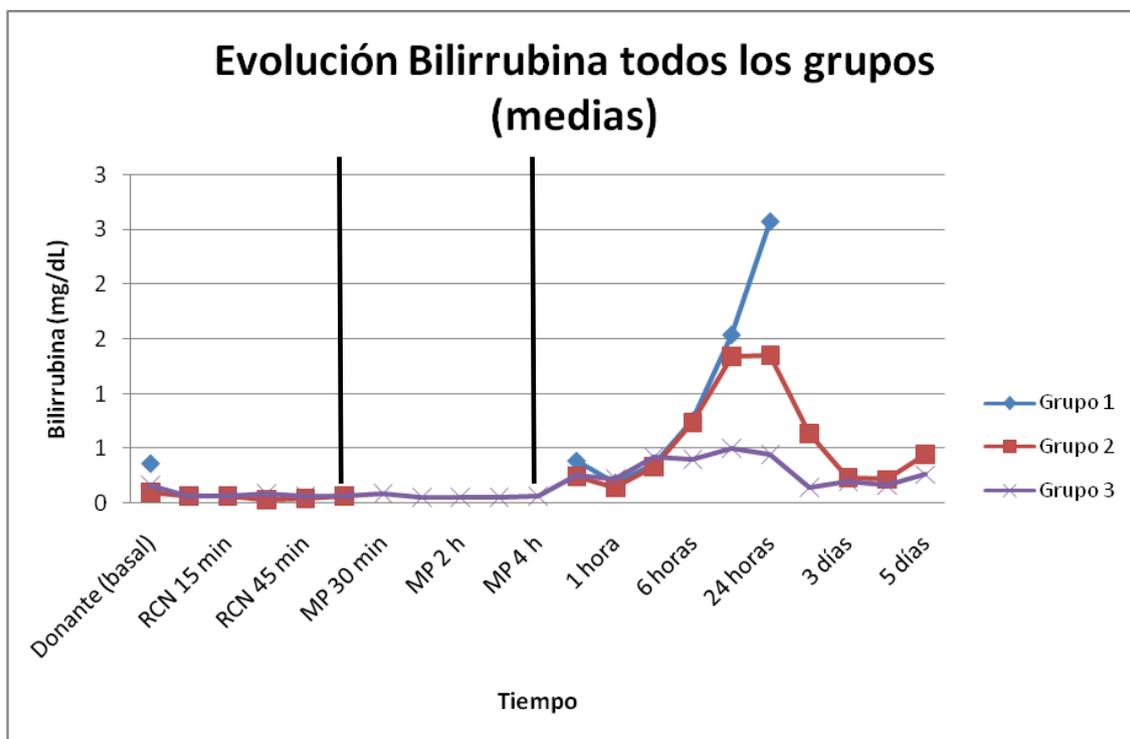


Gráfico 25: Curvas de las medias de Bilirrubina de cada grupo

Comparación estadística de las medias de cada grupo

Grupos 1 y 2

	Grupo 1	Grupo 2	F	p
Donante (basal)	,360	,100	4,460	,064
Receptor (basal)	,383	,250	,604	,455
1 hora	,183	,140	1,143	,313
3 horas	,350	,333	,036	,852
6 horas	,750	,733	,005	,948
12 horas	1,533	1,333	,099	,763
24 horas	2,067	1,350	2,910	,132

Tabla 21: Prueba ANOVA para comparación de las medias de bilirrubina entre los grupos 1 y 2, con la distribución F y el valor p de significación estadística

Comparando las medias de bilirrubina de los grupos 1 y 2 vemos que no existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Aunque la p no es inferior a 0,05 vemos que existe una diferencia cuantitativa a las 24 horas post-reperfusión.

Grupos 1 y 3

	Grupo 1	Grupo 3	F	p
Donante (basal)	,360	,167	1,816	,211
Receptor (basal)	,383	,250	,829	,384
1 hora	,183	,217	,286	,605
3 horas	,350	,420	,199	,666
6 horas	,750	,400	2,475	,160
12 horas	1,533	,500	25,741	,002
24 horas	2,067	,440	196,703	,000

Tabla 22: Prueba ANOVA para comparación de las medias de bilirrubina entre los grupos 1 y 3, con la distribución F y el valor p de significación estadística

Al comparar las medias de bilirrubina de los grupos 1 y 3, observamos diferencias estadísticamente significativas a las 12 horas y 24 horas post-reperfusión.

Grupos 2 y 3

	Grupo 2	Grupo 3	F	p
Donante (basal)	,100	,167	,769	,401
RCN 5 min	,067	,067	,000	1,000
RCN 15 min	,067	,067	,000	1,000
RCN 30 min	,033	,083	1,800	,209
RCN 45 min	,050	,067	,294	,599
RCN 60 min	,067	,067	,000	1,000
Receptor (basal)	,250	,250	,000	1,000
1 hora	,140	,217	1,438	,261
3 horas	,333	,420	,287	,605
6 horas	,733	,400	1,611	,236
12 horas	1,333	,500	2,952	,120
24 horas	1,350	,440	2,789	,129
2 días	,633	,140	2,100	,181
3 días	,233	,200	,157	,701
4 días	,220	,160	,400	,545
5 días	,450	,260	1,036	,343

Tabla 23: Prueba ANOVA para comparación de las medias de bilirrubina entre los grupos 2 y 3, con la distribución F y el valor p de significación estadística

Comparando las medias de bilirrubina de los grupos 2 y 3, observamos que no existen diferencias estadísticamente significativas, aunque sí observamos que cuantitativamente desde las 6 horas post-reperfusión hasta el 5º días de seguimiento las cifras de bilirrubina son siempre menores en el grupo 3 en comparación con el grupo 2.

2.4. Quick

Grupo 1:

Evolución general periodo post-trasplante:

En este grupo hay una afectación importante de la función de síntesis en todos los animales. Llegan algunos a niveles de tiempo de protrombina del 20%, y todos los animales fallecen durante el 1º día post-trasplante.

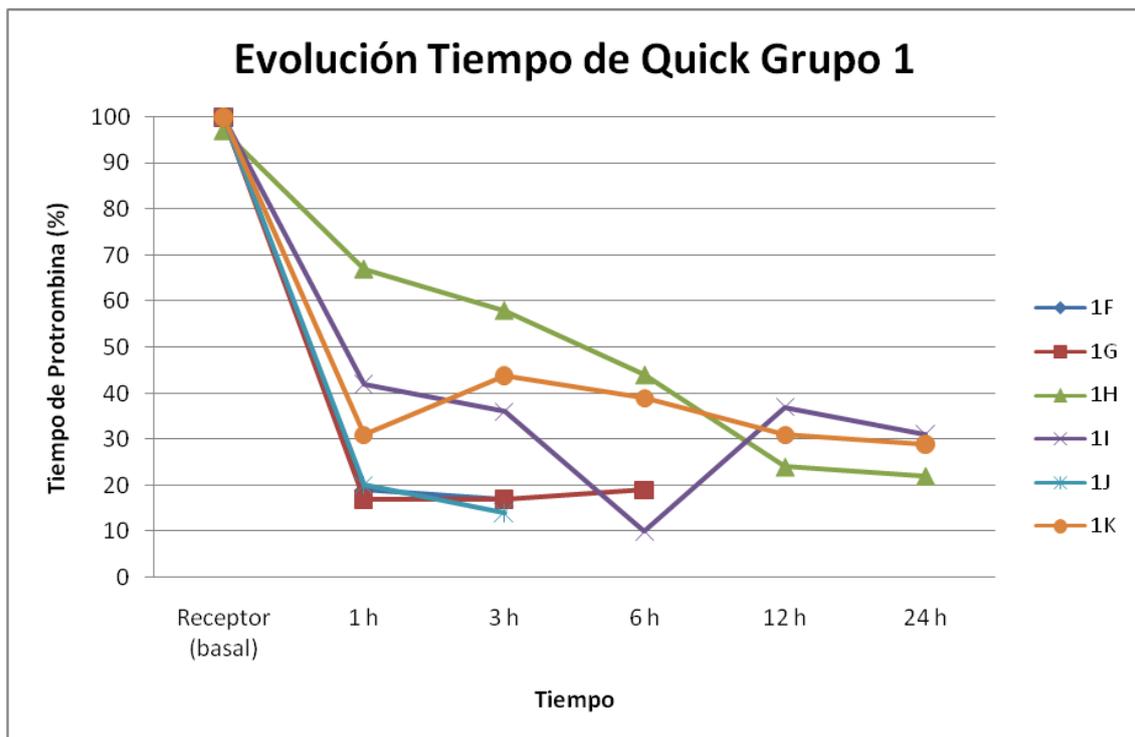
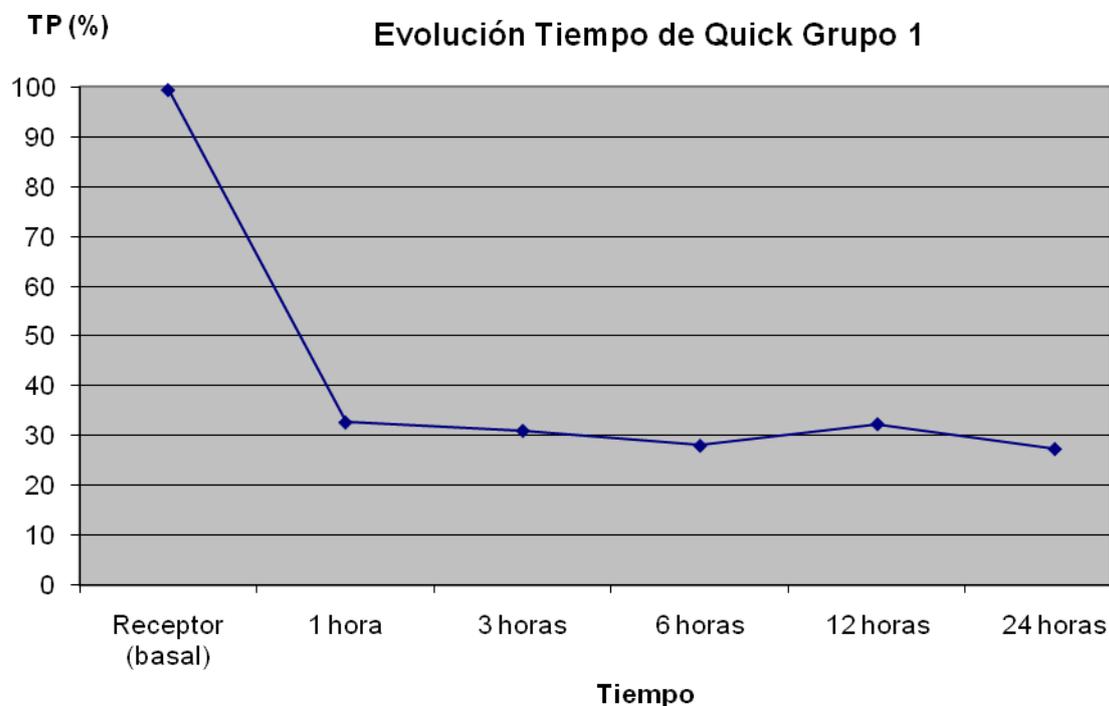


Gráfico 26: Curvas de cada animal del Grupo 1 de los niveles de Tiempo de Protrombina

Evolución media del grupo 1:**Gráfico 27:** Curva de la media de los niveles de Tiempo de Protrombina en el Grupo 1

	Media	Desviación Típica	Error Estándar
Receptor (basal)	99,50	1,225	,500
1 hora	32,67	19,294	7,877
3 horas	31,00	17,911	7,312
6 horas	28,00	16,145	8,073
12 horas	32,33	7,234	4,177
24 horas	27,33	4,726	2,728

Tabla 24: Media, desviación típica y error estándar de los datos de Tiempo de Protrombina en el Grupo 1

Podemos observar el descenso tan brusco del tiempo de Quick producido en este grupo.

Grupo 2:***Evolución general periodo post-trasplante:***

En el grupo 2 se produce una alteración del tiempo de Quick en todos los animales, con una variación entre los animales bastante amplia, sin seguir un modelo.

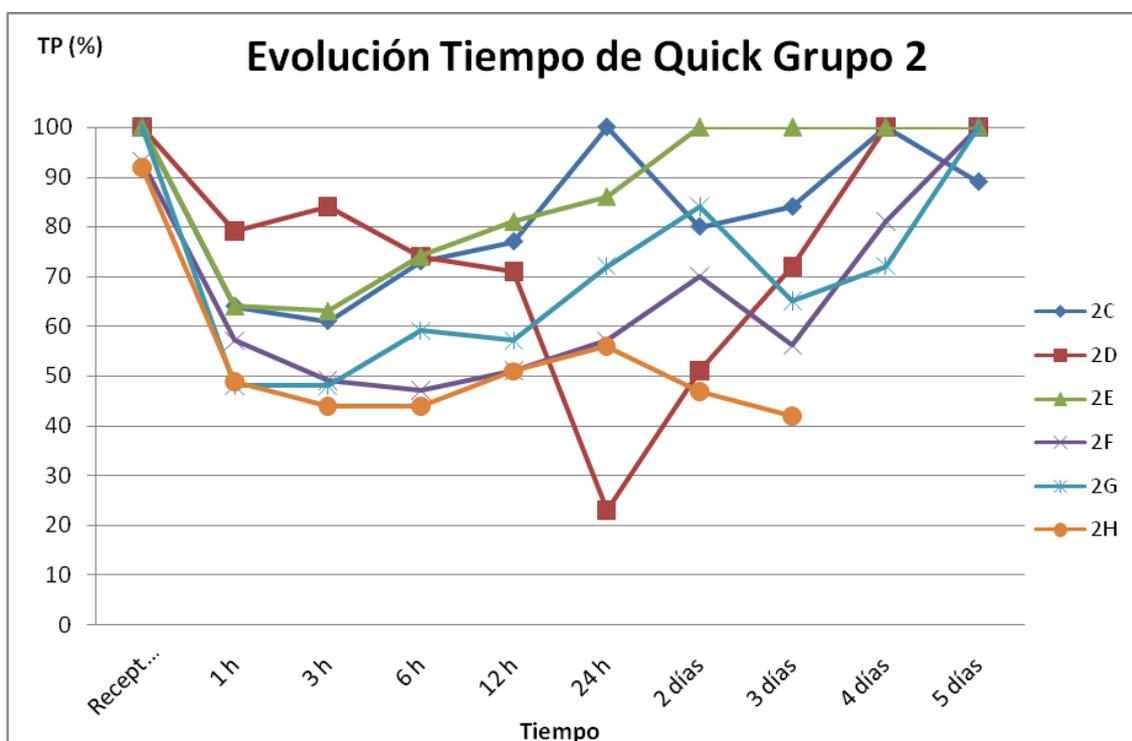


Gráfico 28: Curvas de cada animal del Grupo 1 de los niveles de Tiempo de Protrombina

El animal que fallece antes del 5^a día (2H) no recupera en ningún momento valores correctos, manteniendo un TP entre 40-50% hasta las 80 horas.

El animal 2D es el que realiza el pico más pronunciado, disminuyendo a casi el 20% a las 24 horas, mejorando posteriormente de forma gradual, hasta llegar al valor de 100% al 4º día.

El animal 2D es el que recupera de forma más rápida la función de síntesis del injerto, llegando al 100% al 2º día y manteniéndose así hasta el 5º día de seguimiento.

Los otros animales tienen una alteración marcada en los valores del tiempo de Quick, con una recuperación lenta, llegando al 100% de Quick al 4º o incluso al 5º día de seguimiento.

Evolución media del grupo 2:

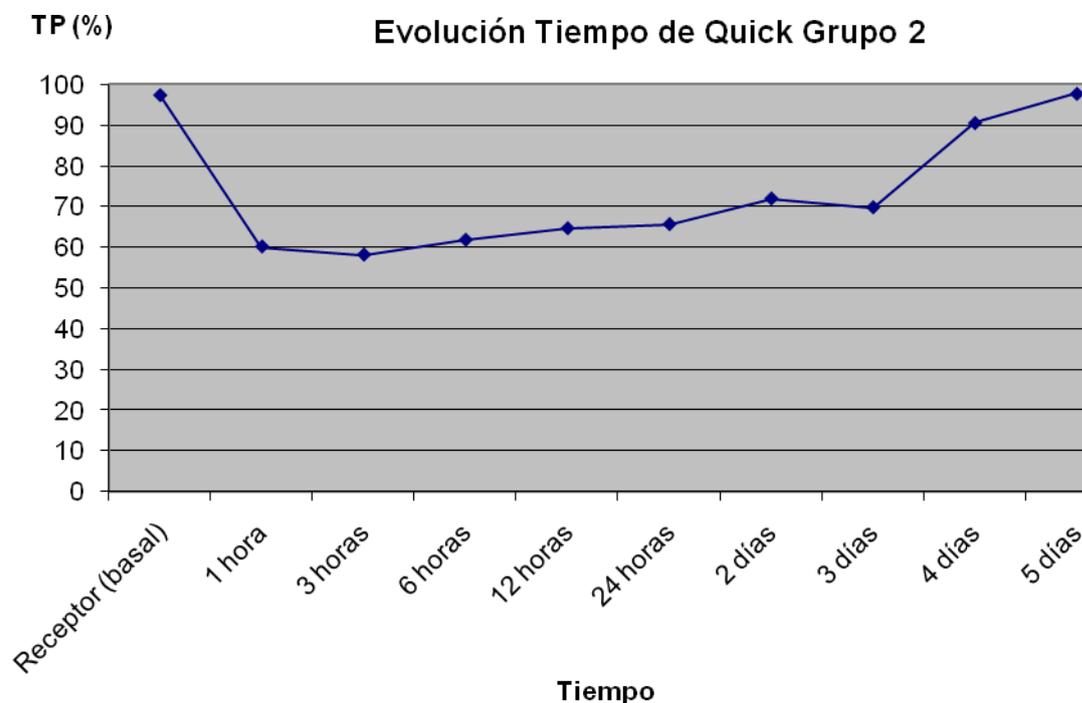


Gráfico 29: Curva de la media de los niveles de Tiempo de Protrombina en el Grupo 2

	Media	Desviación Típica	Error Estándar
Receptor (basal)	97,50	3,886	1,586
1 hora	60,17	11,548	4,715
3 horas	58,17	14,743	6,019
6 horas	61,83	13,906	5,677
12 horas	64,67	13,352	5,451
24 horas	65,67	26,912	10,987
2 días	72,00	20,308	8,291
3 días	69,83	20,517	8,376
4 días	90,60	13,259	5,930
5 días	97,80	4,919	2,200

Tabla 25: Media, desviación típica y error estándar de los datos de Tiempo de Protrombina en el Grupo 2

En la curva de la media del tiempo de Quick observamos la evolución general en este grupo de la recuperación de la función de síntesis por parte del injerto.

Esta recuperación es muy lenta, manteniéndose hasta el 3º día con valores entre el 60% y el 70%.

Grupo 3:***Evolución general periodo post-trasplante:***

En este grupo todos los animales siguen una misma tendencia.

Tras el periodo de las 12-24 horas post-reperfusión, en el que hay variaciones entre animales con 2 de ellos (3J y 3K) con un tiempo de Quick alrededor del 50%, hay una recuperación rápida y eficaz. A los 2 días todos los animales están por encima del 80% de tiempo de protrombina, y a los 5 días todos tienen un Quick del 100%.

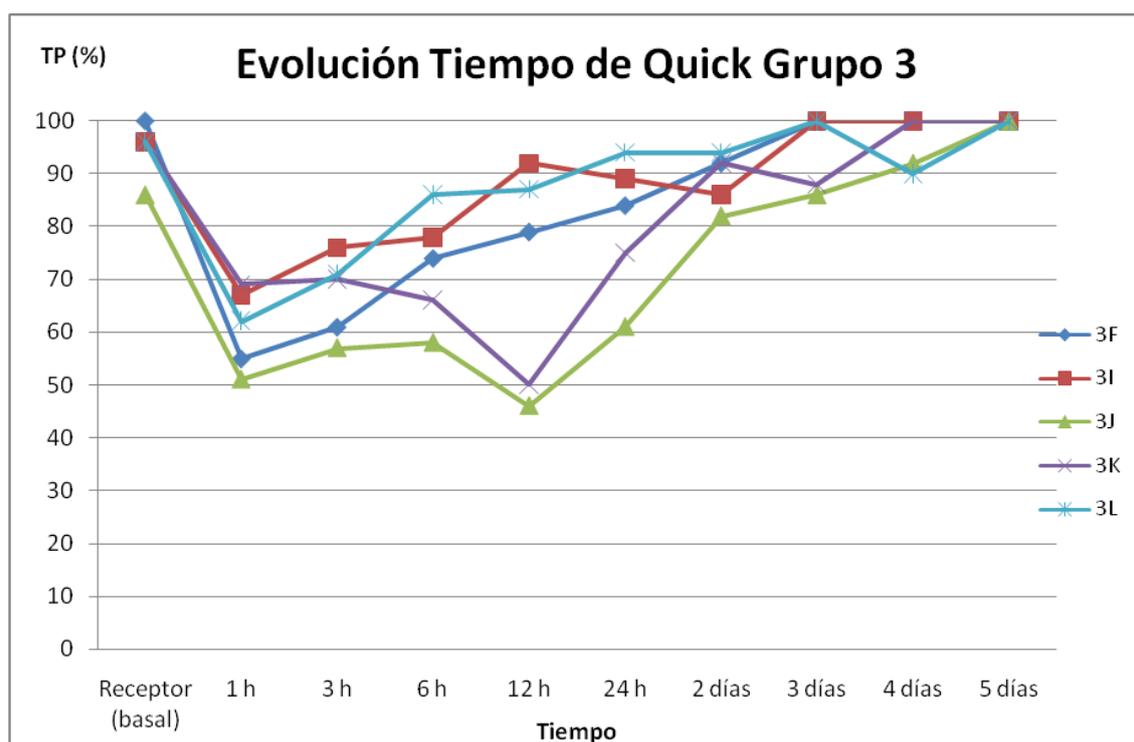
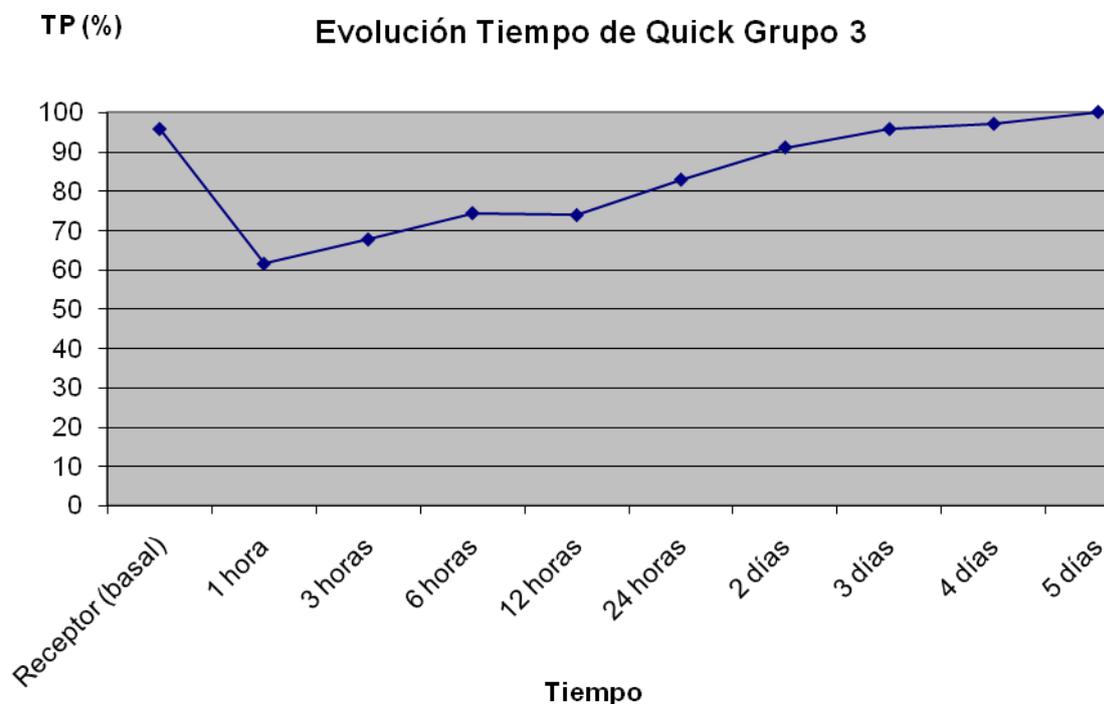


Gráfico 30: Curvas de cada animal del Grupo 3 de los niveles de Tiempo de Protrombina

Evolución media del grupo 3:**Gráfico 31: Curva de la media de los niveles de Tiempo de Protrombina en el Grupo 3**

	Media	Desviación Típica	Error Estándar
Receptor (basal)	95,67	5,125	2,092
1 hora	61,50	7,092	2,895
3 horas	67,67	7,146	2,917
6 horas	74,33	10,764	4,394
12 horas	73,83	20,508	8,372
24 horas	82,83	12,859	5,250
2 días	91,00	6,293	2,569
3 días	95,67	6,743	2,753
4 días	97,00	4,690	1,915
5 días	100,00	,000	,000

Tabla 26: Media, desviación típica y error estándar de los datos de Tiempo de Protrombina en el Grupo 3

La curva de la media presenta una tendencia a la recuperación completa de la función de síntesis por parte de los injertos de este grupo.

Comparación entre grupos:

Podemos observar cómo el grupo 3 es el primero que recupera su función de síntesis. Para el grupo 2, la recuperación es más tardía aunque completa al 5º día. Y el grupo 1 no presenta ningún tipo de recuperación de su función de síntesis.

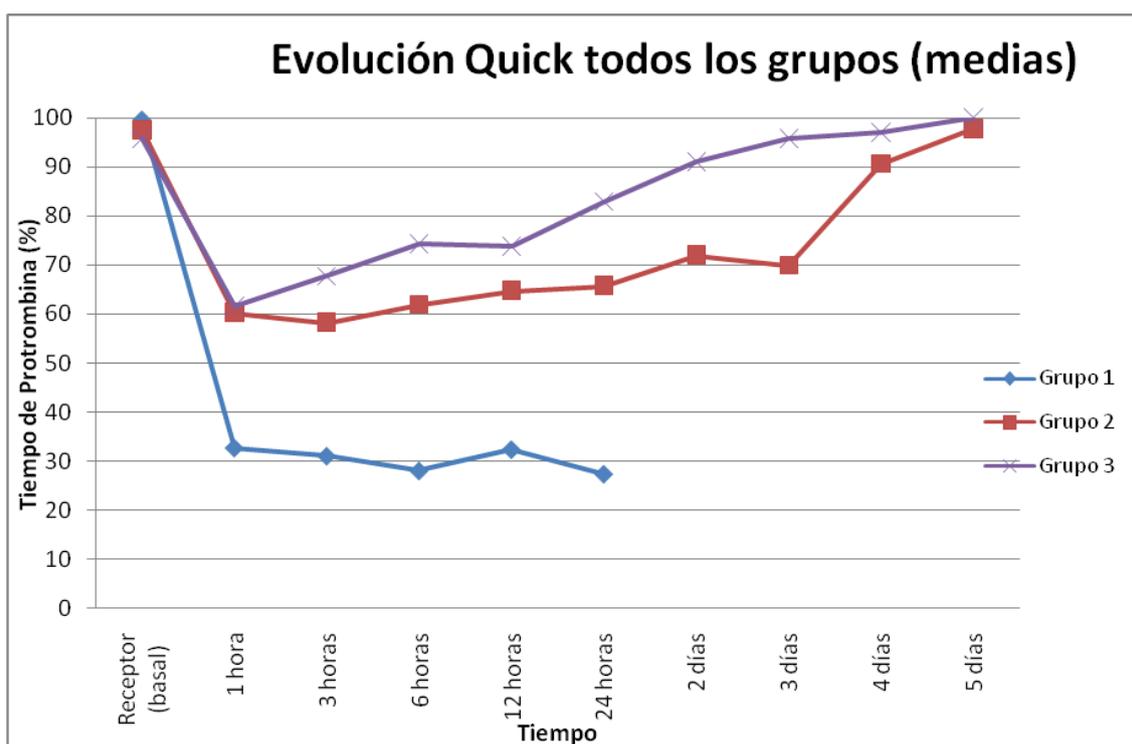


Gráfico 32: Curvas de las medias del tiempo de Quick de cada grupo

Comparación estadística de las medias de cada grupo

Grupos 1 y 2

	Grupo 1	Grupo 2	F	p
Receptor (basal)	97,50	95,67	1,446	,257
1 hora	60,17	61,50	8,974	,013
3 horas	58,17	67,67	8,228	,017
6 horas	61,83	74,33	12,567	,008
12 horas	64,67	73,83	14,695	,006
24 horas	65,67	80,17	5,612	,050

Tabla 27: Prueba ANOVA para comparación de las medias del tiempo de protrombina entre los grupos 1 y 2, con la distribución F y el valor p de significación estadística

Comparando las medias del tiempo de Quick de los grupos 1 y 2 vemos que existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en todas las determinaciones tras el implante del injerto hepático.

Grupos 1 y 3

	Grupo 1	Grupo 3	F	p
Receptor (basal)	99,50	95,67	3,175	,105
1 hora	32,67	61,50	11,804	,006
3 horas	31,00	67,67	21,692	,001
6 horas	31,50	74,33	30,278	,001
12 horas	40,67	73,83	10,923	,013
24 horas	49,00	80,17	49,482	,000

Tabla 28: Prueba ANOVA para comparación de las medias del tiempo de protrombina entre los grupos 1 y 3, con la distribución F y el valor p de significación estadística

Al comparar las medias del tiempo de Quick entre los grupos 1 y 3 observamos que existen diferencias estadísticamente significativas también en todas las determinaciones tras el implante del injerto hepático.

Grupos 2 y 3

	Grupo 2	Grupo 3	F	p
Receptor (basal)	97,50	95,67	,488	,501
1 hora	60,17	61,50	,058	,814
3 horas	58,17	67,67	2,017	,186
6 horas	61,83	74,33	3,032	,112
12 horas	64,67	73,83	,842	,380
24 horas	65,67	82,83	1,988	,189
2 días	72,00	91,00	4,792	,053
3 días	69,83	95,67	8,585	,015
4 días	90,60	97,00	1,236	,295
5 días	97,80	100,00	1,227	,297

Tabla 29: Prueba ANOVA para comparación de las medias del tiempo de protrombina entre los grupos 2 y 3, con la distribución F y el valor p de significación estadística

Al comparar las medias del tiempo de Quick entre los grupos 2 y 3 observamos que existen diferencias estadísticamente significativas a los 3 días del trasplante. De todas formas, observamos que cuantitativamente el grupo 3 tiene unos valores del tiempo de protrombina superiores al grupo 2 en toda la evolución postoperatoria.

3. ANÁLISIS COMPARATIVO DE LOS PARÁMETROS DE RNA TISULAR

3.1. Caspasa-3

Grupo 1:

Evolución general:

En el grupo 1 vemos que existe una mínima variación de la expresión génica de la caspasa-3. Tras los 90 minutos de parada cardiaca (PC) el valor medio del grupo es de $0,707 \pm 0,1583$. Tras la implantación del injerto, a la hora de la reperusión el valor asciende a $1,039 \pm 0,8568$. En el momento de la eutanasia, en las muestras tomadas de los animales 1G y 1K, el valor medio de caspasa-3 es de $0,639 \pm 0,1095$.

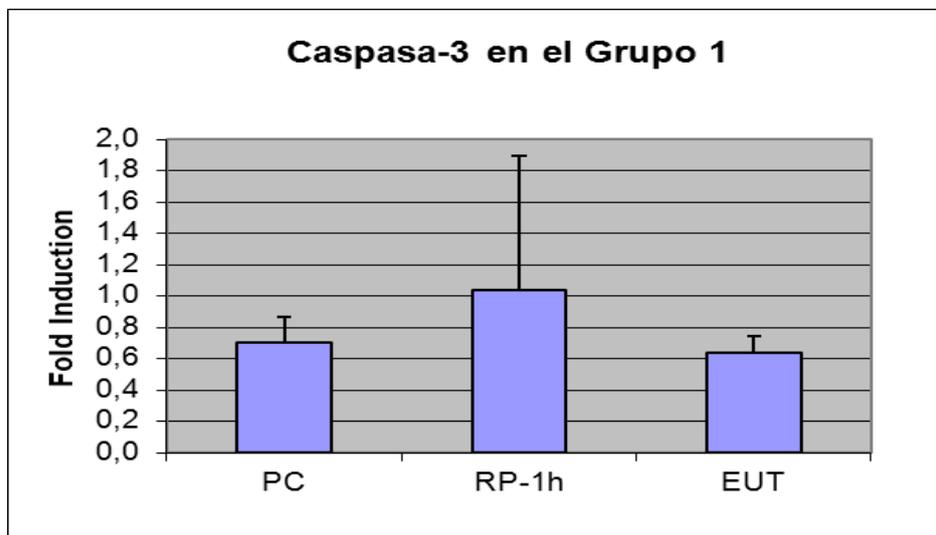


Gráfico 33: Valores medios de caspasa-3 en el grupo 1

	PC	RP-1h	EUT
1F	0,5083	0,5778	
1G	0,9485	0,8896	0,5618
1H	0,7012	0,9739	
1I	0,6586	2,7419	
1J		0,4706	
1K	0,7176	0,5824	0,7166
media	0,707	1,039	0,639
Desv. Estándar	0,1583	0,8568	0,1095

Tabla 30: Valores de la expresión génica de caspasa-3 en RNAm mediante RT-PCR en el grupo 1 en los diferentes animales

Existe una importante variación interindividual de los valores, tal como vemos en la tabla, representada en el gráfico mediante la línea de dispersión de la desviación estándar, sobre todo tras la reperusión del injerto.

A pesar de ello, vemos que no existe una gran variación en la evolución de los valores medios del grupo.

Grupo 2:***Evolución general:***

En este grupo observamos que los valores de caspasa-3 siguen una evolución bastante estable excepto en el periodo post-reperusión, en el cual hay un animal (2F) que realiza un pico considerable (12,5125).

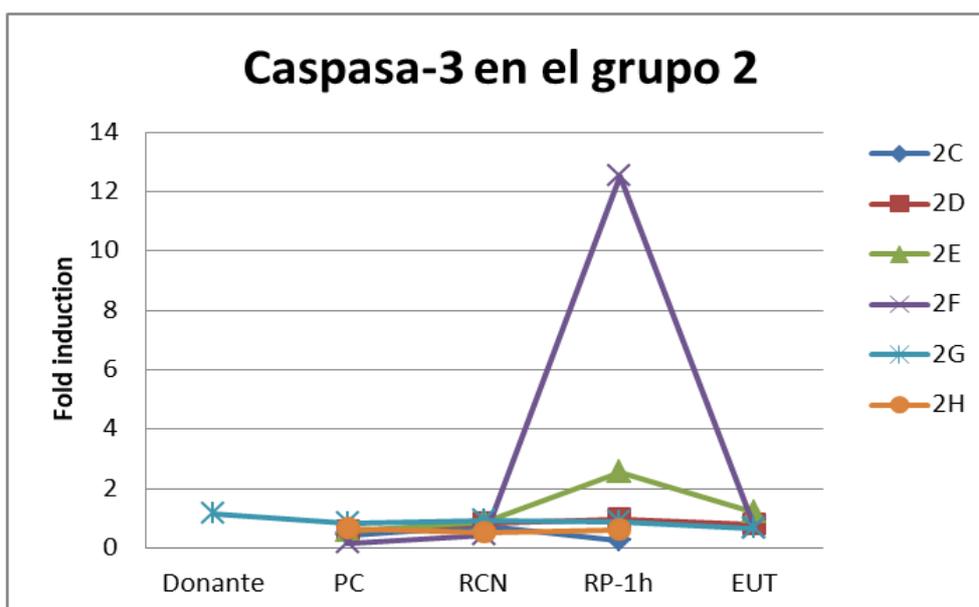


Gráfico 34: Curva de los valores de caspasa-3 en el grupo 2 por animal

Donante:

En la muestra tomada del donante tenemos unos valores anormalmente altos, que no son un reflejo correcto de la realidad, puesto que únicamente existen determinaciones de un sujeto.

Periodo PC:

A los 90 minutos de la parada cardiaca obtenemos unos valores similares a los del grupo 1, ya que hasta aquí el experimento es idéntico. El valor medio es de $0,528 \pm 0,2219$. El animal con el valor más elevado es el 2G, con una cifra de caspasa-3 de 0,8154.

Periodo RCN:

A los 60 minutos de la recirculación normotérmica mantenemos una situación muy similar al periodo PC, con unos valores que prácticamente no han variado, manteniéndose la media en $0,713 \pm 0,2011$. El animal 2G sigue presentando los valores de caspasa-3 más elevados, con una cifra de 0,9196.

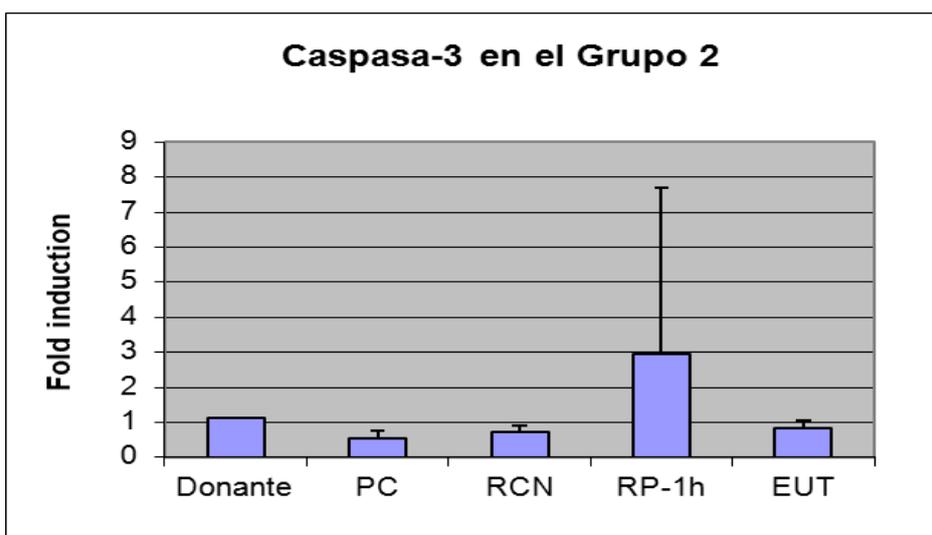


Gráfico 35: Valores medios de caspasa-3 en el grupo 2

Periodo RP-1h:

A los 60 minutos de la reperfusión del injerto hepático observamos un aumento en la expresión génica de caspasa-3, como era de esperar. La media de caspasa-3 en este periodo es de $2,950 \pm 4,7490$.

Llama la atención ver cómo un animal que seguía una evolución “normal” (en comparación con el resto del grupo) de la expresión génica de caspasa-3 realiza un pico muy pronunciado en este periodo. Se trata del animal 2F con un valor de 12,5125. Este animal fue uno de los que mayor pico de transaminasas tuvo en el periodo post-trasplante, con mayor elevación de la bilirrubina, y uno de los que más le costó recuperar la función de síntesis. Aun así, mirando los resultados de los otros animales del mismo grupo y del mismo animal en la RCN, es probable que gran parte de la sobreexpresión observada en la RP-1h sea debido a la mala valoración de esta muestra. Teniendo en cuenta que la RT-PCR es una técnica muy sensible, es posible que al no valorarse correctamente la cantidad de cDNA, haya una mayor cantidad que en las otras reacciones y por este motivo da un valor tan elevado.

Periodo EUT:

En el momento de la eutanasia de los animales de este grupo 2, los valores vuelven a disminuir hasta normalizarse. La media de caspasa-3 en este momento es de $0,819 \pm 0,2415$.

	Donante	PC	RCN	RP-1h	EUT
2C		0,4181	0,7572	0,2608	
2D		0,5751	0,8117	0,9417	0,7885
2E		0,5686	0,8579	2,5218	1,1695
2F		0,1583	0,4214	12,5125	0,6502
2G	1,132	0,8154	0,9196	0,8650	0,6684
2H		0,6328	0,5085	0,5991	
media	1,132	0,528	0,713	2,950	0,819
Desv. Estándar		0,2219	0,2011	4,7490	0,2415

Tabla 31: Valores de la expresión génica de caspasa-3 en RNAm mediante RT-PCR en el grupo 2 en los diferentes animales

Grupo 3:***Evolución general:***

La evolución de la expresión génica de caspasa-3 es poco variable entre los animales de este grupo. Aunque no existe ningún pico aislado de ningún animal y los valores siempre se mantienen entre 0 y 1 ($2^{-\Delta CT}$) (excepto tras el periodo de parada cardiaca en el animal 3F).

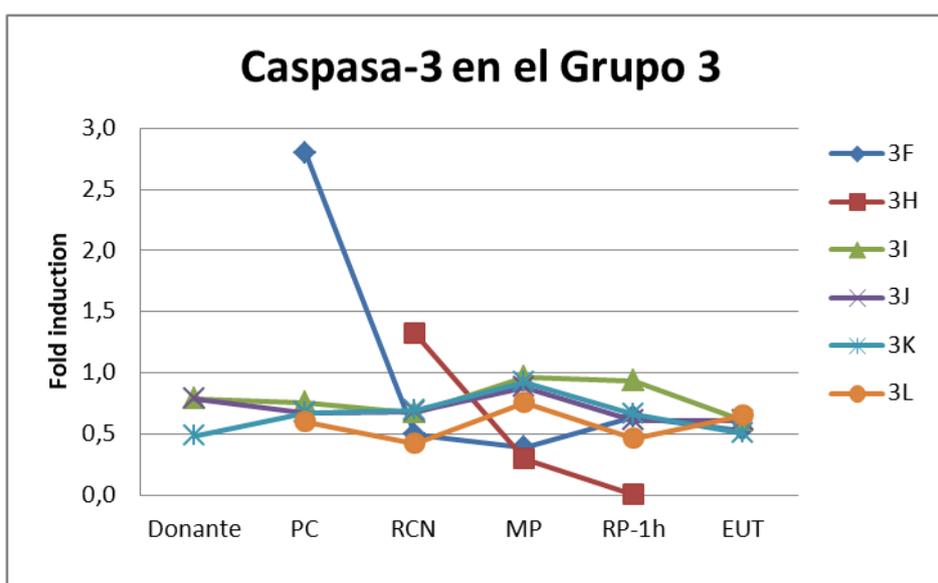


Gráfico 36: Curva de los valores de caspasa-3 en el grupo 3 por animal

Donante:

Se tomaron muestras de tejido del donante en 3 animales, con determinaciones entre 0,4 y 0,8.

Periodo PC:

A los 90 minutos de parada cardiaca, los valores de caspasa-3 de los animales de este grupo se sitúan entre 0,59 y 0,76; excepto para un animal (3F) que presenta unos valores anormalmente elevados: 2,7949 pudiendo ser debido a la misma causa descrita en el animal 2F a la hora de la reperfusión.

Periodo RCN:

A los 60 minutos de la recirculación normotérmica existe una variación entre los diferentes animales, aún manteniéndose con valores bajos. Estos se encuentran entre 0,42 y 0,7. También en este periodo hay una excepción: el animal 3H presenta una cifra de expresión génica de caspasa-3 de 1,3210. El valor medio del grupo en este periodo es de $0,7154 \pm 0,3174$.

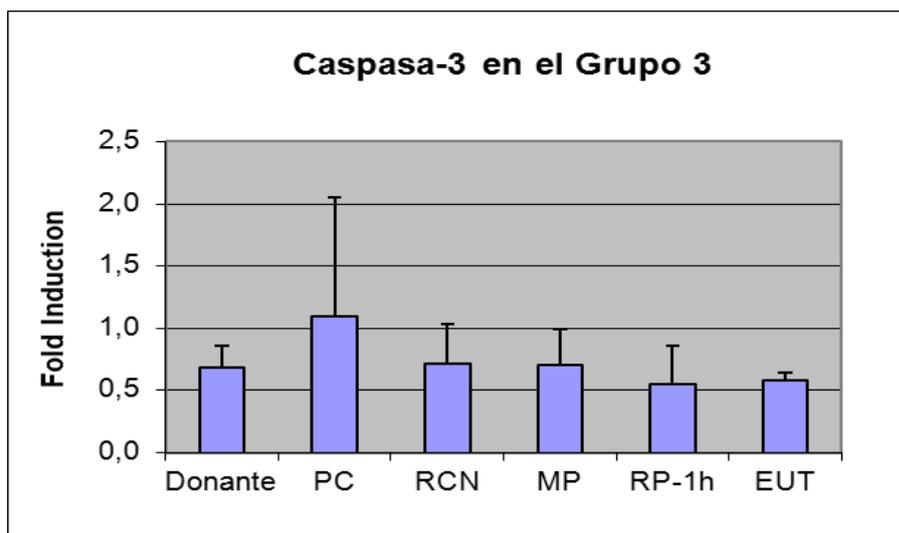


Gráfico 37: Valores medios de caspasa-3 en el grupo 3

Periodo MP:

Tras las 4 horas de perfusión en máquina del injerto hepático, la expresión génica de caspasa-3 aumenta levemente en todos los animales excepto en 3F y 3H, que disminuye a 0,3856 y 0,2946. El valor medio al final de este periodo para todos los animales de este grupo es de $0,7007 \pm 0,2894$.

Periodo RP-1h:

Tras la reperfusión del injerto hepático en el implante los valores de caspasa-3 vuelven a disminuir, con un valor medio de $0,5532 \pm 0,3102$. Disminuye en todos los animales excepto en el animal 3F que presenta un aumento de 0,3856 a 0,6432.

	Donante	PC	RCN	MP	RP-1h	EUT
3F		2,7949	0,4970	0,3856	0,6432	0,5276
3H			1,3210	0,2946	0,0014	
3I	0,7879	0,7604	0,6749	0,9602	0,9353	0,6113
3J	0,7866	0,6684	0,6792	0,8840	0,6129	0,6101
3K	0,4830	0,6731	0,6985	0,9265	0,6600	0,5061
3L		0,5979	0,4220	0,7535	0,4662	0,6506
media	0,6858	1,0989	0,7154	0,7007	0,5532	0,5812
Desv. Estándar	0,1756	0,9498	0,3174	0,2894	0,3102	0,0614

Tabla 32: Valores de la expresión génica de caspasa-3 en RNAm mediante RT-PCR en el grupo 3 en los diferentes animales

Periodo EUT:

En el momento de la eutanasia electiva de los animales de este grupo los valores tienen poca variación entre los animales. El rango de valores está comprendido entre 0,5061 y 0,6113. El valor medio de este grupo en este momento es de $0,5812 \pm 0,0614$.

Comparación entre grupos:

Al comparar los grupos 2 y 3 por el gráfico y la tabla de valores medios, vemos que en el grupo 2 se produce un pico de expresión génica de caspasa-3 tras la reperusión, cosa que no se produce en el grupo 3, en el que no existe apenas variación. Este es el dato más importante al comparar los grupos. El hecho de añadir el periodo de perfusión en máquina con sangre oxigenada a 37°C evita la hiperexpresión génica de caspasa-3 tras la reperusión.

En el momento de la eutanasia los 3 grupos presentan unos valores medios muy similares, siendo de 0,639; 0,819 y 0,5812 para los grupos 1, 2 y 3 respectivamente.

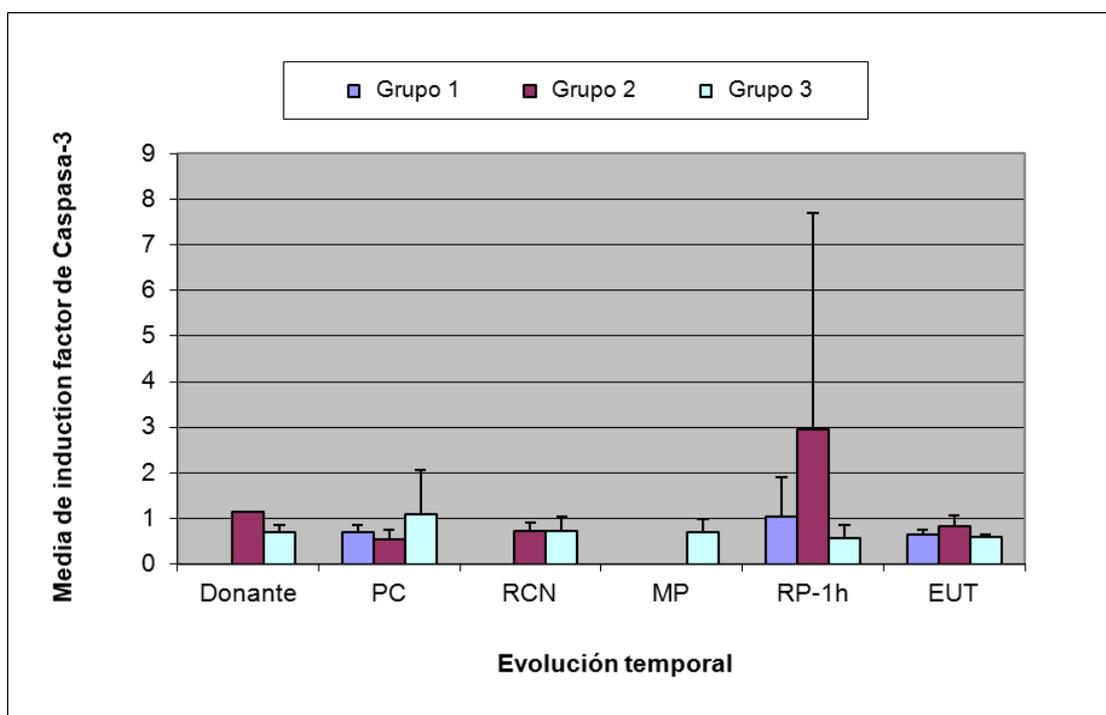


Gráfico 38: Evolución temporal de la expresión génica de caspasa-3 en los diferentes grupos. Valores medios con desviación estándar.

		Donante	PC	RCN	MP	RP-1h	EUT
Grupo 1	media		0,707			1,039	0,639
	DE		0,1583			0,8568	0,1095
Grupo 2	media	1,1320	0,5281	0,7127		2,9501	0,8192
	DE		0,2219	0,2011		4,7490	0,2415
Grupo 3	media	0,6858	1,0989	0,7154	0,7007	0,5532	0,5812
	DE	0,1756	0,9498	0,3174	0,2894	0,3102	0,0614

Tabla 33: Valores de la expresión génica de caspasa-3 en RNAm mediante RT-PCR en todos los grupos. Valores medios y desviación estándar.

Comparación estadística entre grupos:

En la siguiente tabla mostramos de forma resumida los valores medios de la expresión génica de caspasa-3 en todos los grupos, así como su desviación estándar, el error típico en cada momento, y el intervalo de confianza para la media al 95%.

		Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Donante	1
	2	1,1320
	3	0,6858	0,1757	0,1014	0,2495	1,1222
PC	1	0,7068	0,1583	0,0708	0,5102	0,9035
	2	0,5281	0,2219	0,0906	0,2952	0,7609
	3	1,0989	0,9498	0,4248	-0,0804	2,2783
RCN	1
	2	0,7127	0,2011	0,0821	0,5017	0,9238
	3	0,7154	0,3174	0,1296	0,3823	1,0485
RP1h	1	1,0394	0,8568	0,3498	0,1402	1,9385
	2	2,9502	4,7490	1,9388	-2,0336	7,9339
	3	0,5532	0,3102	0,1266	0,2276	0,8787
EUT	1	0,6392	0,1095	0,0774	-0,3443	1,6227
	2	0,8192	0,2415	0,1207	0,4349	1,2034
	3	0,5812	0,0614	0,0275	0,5049	0,6574

Tabla 34: Estudio descriptivo estadístico de la expresión génica de caspasa-3 en todos los grupos.

Grupo 1 y 2

	Grupo 1	Grupo 2	F	p
PC	0,707	0,528	2,264	0,167
RP-1h	1,039	2,950	0,941	0,355
EUT	0,639	0,819	0,924	0,391

Tabla 35: Prueba ANOVA para comparación de las medias de caspasa-3 entre los grupos 1 y 2, con la distribución F y el valor p de significación estadística

Grupo 1 y 3

	Grupo 1	Grupo 3	F	p
PC	0,707	1,099	0,829	0,389
RP-1h	1,039	0,553	1,708	0,220
EUT	0,639	0,581	0,890	0,389

Tabla 37: Prueba ANOVA para comparación de las medias de caspasa-3 entre los grupos 1 y 3, con la distribución F y el valor p de significación estadística

Grupo 2 y 3

	Grupo 2	Grupo 3	F	p
Donante	1,132	0,686	4,838	0,159
PC	0,528	1,099	2,075	0,184
RCN	0,713	0,715	0,000	0,986
RP-1h	2,950	0,553	1,522	0,246
EUT	0,819	0,581	4,637	0,068

Tabla 36: Prueba ANOVA para comparación de las medias de caspasa-3 entre los grupos 2 y 3, con la distribución F y el valor p de significación estadística

Al realizar el estudio comparativo de las medias de cada grupo, vemos que no existen diferencias estadísticamente significativas. Aunque destaca la diferencia numérica existente en el momento de la reperfusión en el grupo 3, al compararlo sobre todo con el grupo 2.

3.2. MCP-1

Grupo 1:

Evolución general:

En el grupo 1 la expresión génica de MCP-1 no sufre ninguna variación exagerada en su evolución. Sí que vemos un aumento cuantitativo considerable tras la reperfusión. Al final del periodo de 90 minutos de parada cardíaca el valor medio es de $0,2615 \pm 0,2055$. Tras la reperfusión del injerto, este valor aumenta a $0,8543 \pm 0,5132$. En el momento de la eutanasia, la media de los dos animales de los que se dispone tejido hepático presenta una expresión génica media de MCP-1 de $0,2133 \pm 0,1674$.

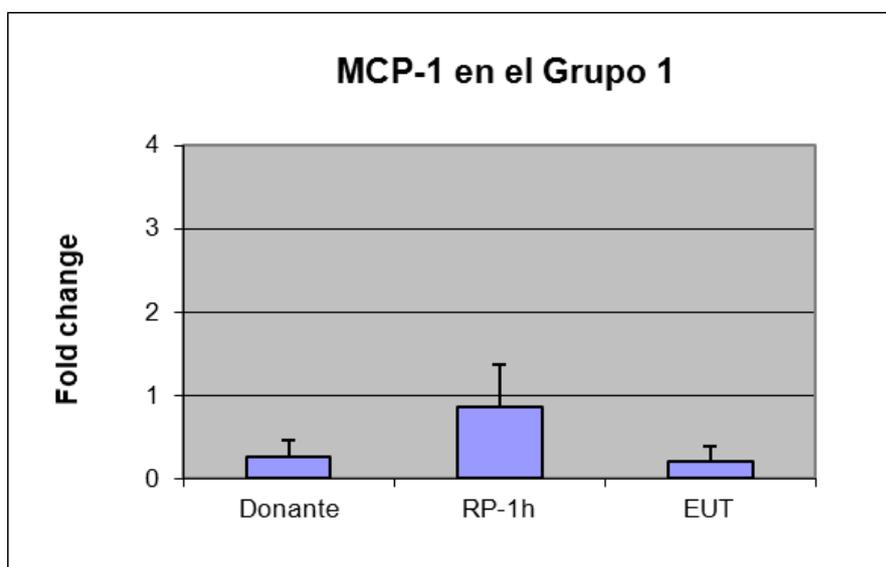


Gráfico 39: Valores medios de MCP-1 en el grupo 1

	PC	RP-1h	EUT
1F	0,1787	0,5769	
1G	0,1949	1,4728	0,3316
1H	0,6172	0,4823	
1I	0,2285	1,5549	
1J		0,4759	
1K	0,0884	0,5628	0,0949
media	0,2615	0,8543	0,2133
Desv. Estándar	0,2055	0,5132	0,1674

Tabla 38: Valores de la expresión génica de MCP-1 en RNAm mediante RT-PCR en el grupo 1 en los diferentes animales

Grupo 2:***Evolución general:***

En el grupo 2 observamos un aumento generalizado de la expresión de MCP-1 a partir del periodo de recirculación normotérmica. Este incremento tendrá su pico tras la reperusión del injerto hepático, para normalizarse posteriormente en el momento de la eutanasia.

Periodo Donante:

En la única muestra tomada del donante en el animal 2G, el valor de expresión génica de MCP-1 fue de 0,0704.

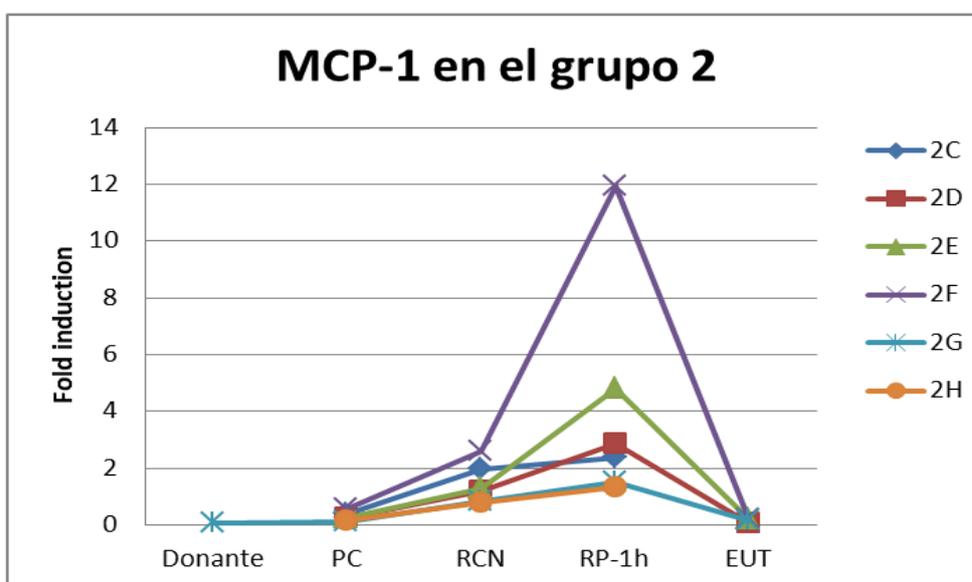


Gráfico 40: Curva de los valores de MCP-1 en el grupo 2 por animal

Periodo PC:

Tras los 90 minutos de parada cardiaca, todos los animales muestran valores similares, excepto 2C y 2F, que presentan un mayor aumento de la expresión de MCP-1 (de 0,3850 y 0,5392 respectivamente). Así, la media de los valores de los diferentes animales en este periodo es de $0,2797 \pm 0,1595$

Periodo RCN:

A los 60 minutos de la recirculación normotérmica se produce un aumento de la expresión génica de MCP-1 en todos los animales. El valor medio al final de la RCN es de $1,4357 \pm 0,6965$. Al igual que ocurría en el periodo anterior, los dos animales 2C y 2F presentan una mayor expresión génica de MCP-1, en comparación con el resto de los animales del grupo 2. Los valores son de 1,9458 y de 2,5749 respectivamente.

	Donante	PC	RCN	RP-1h	EUT
2C		0,3850	1,9458	2,3649	
2D		0,2402	1,2049	2,8636	0,0816
2E		0,2600	1,2722	4,8197	0,2018
2F		0,5392	2,5749	11,9174	0,1840
2G	0,0704	0,1195	0,8132	1,5073	0,1520
2H		0,1344	0,8034	1,3120	
media	0,0704	0,2797	1,4357	4,1308	0,1548
Desv. Estándar		0,1595	0,6965	4,0164	0,0530

Tabla 39: Valores de la expresión génica de MCP-1 en RNAm mediante RT-PCR en el grupo 2 en los diferentes animales

Periodo RP-1h:

A la hora de la reperfusión del injerto hepático es cuando los animales presentan una mayor expresión génica de MCP-1. El pico medio es de $4,1308 \pm 4,0164$. En este caso, el animal que presenta un valor más elevado es el animal 2F, con un valor de 11,9174. La sobre-expresión génica en este periodo en este animal es muy exagerada, sin poder descartar en este caso también un error de valoración de cantidad de cDNA.

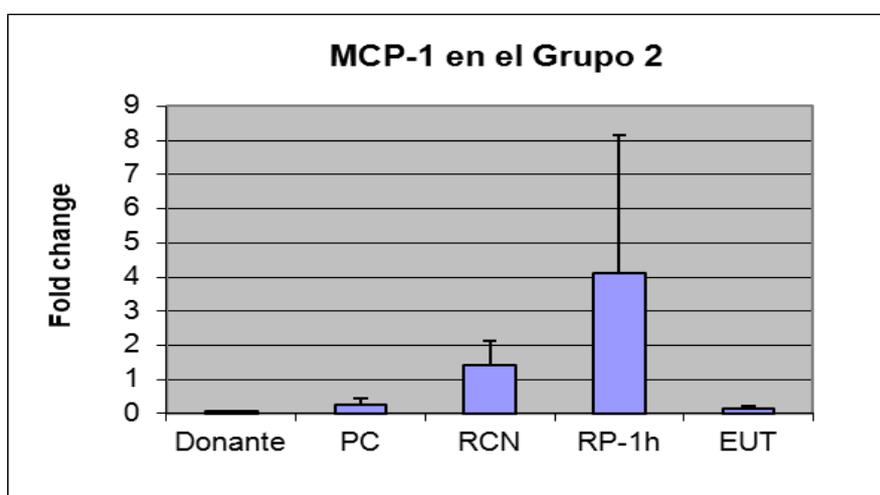


Gráfico 41: Valores medios de MCP-1 en el grupo 2

Periodo EUT:

En el momento de la eutanasia los valores de todos los animales vuelven a niveles bajos, con una media de $0,1548 \pm 0,0530$.

Grupo 3:***Evolución general:***

En el grupo 3 la evolución general es diferente a la del grupo 2, posiblemente por el papel de la perfusión en máquina. Como observamos en el gráfico, el pico de expresión de MCP-1 se produce al final del periodo de MP y llama la atención la importante disminución de los valores tras la reperfusión del injerto hepático. Al igual que en los dos grupos anteriores, en el momento de la eutanasia los valores son mínimos.

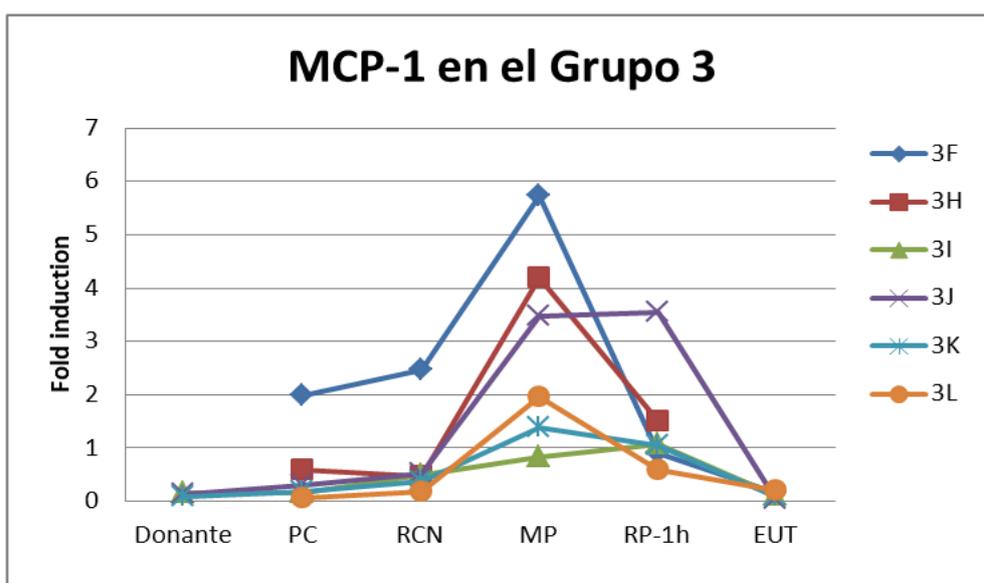


Gráfico 42: Curva de los valores de MCP-1 en el grupo 3 por animal

Periodo donante:

En las tomas realizadas en los donantes de 3 animales a modo de control, observamos en todos ellos niveles bajos, con un valor medio de $0,1247 \pm 0,0267$.

Periodo PC:

Tras los 90 minutos de parada cardiaca, todos los animales excepto uno (3F) presentan unos niveles similares con un rango que va desde 0,0533 hasta 0,5798. El animal 3F presenta una expresión anormalmente elevada, con un valor de 1,9766. Recordemos que el animal 3F fue uno de los que peor evolución presentó dentro de este grupo. El valor medio del grupo en este periodo es de $0,5443 \pm 0,7246$.

	Donante	PC	RCN	MP	RP-1h	EUT
3F		1,9766	2,4538	5,7287	0,9139	0,1512
3H		0,5798	0,4646	4,1992	1,5029	
3I	0,1501	0,1555	0,4967	0,8212	1,0732	0,1169
3J	0,1271	0,3126	0,5236	3,4724	3,5453	0,0429
3K	0,0968	0,1883	0,3827	1,3873	1,0503	0,0743
3L		0,0533	0,1917	1,9651	0,5807	0,2095
media	0,1247	0,5443	0,7522	2,9290	1,4444	0,1190
Desv. Estándar	0,0267	0,7246	0,8422	1,8706	1,0713	0,0652

Tabla 40: Valores de la expresión génica de MCP-1 en RNAm mediante RT-PCR en el grupo 3 en los diferentes animales

Periodo RCN:

A los 60 minutos de la RCN, la expresión génica de MCP-1 no ha variado tanto como en el grupo 2, a pesar de presentar las mismas condiciones. De hecho, obviando el animal 3F, el resto del grupo presenta un rango de valores que se sitúa entre 0,1917 y 0,5236. Para el animal 3F, el valor en este periodo es de 2,4538. El valor medio del grupo en este periodo es de $0,7522 \pm 0,8422$.

Periodo MP:

Tras las 4 horas estando el injerto perfundiéndose en la máquina, la expresión génica de MCP-1 aumenta en todos los animales de una manera sustancial. El animal 3F continúa con los valores más elevados: 5,7287. Cabe destacar que existen dos animales que presentan también un pico importante respecto al resto del grupo. Estos animales son 3H y 3J, con valores de 4,1992 y 3,4724 respectivamente. El resto del grupo se mantiene en un rango de valores que se encuentra entre 0,8212 y 1,9651. El valor medio de expresión génica de MCP-1 del grupo 3 en este periodo es de $2,9290 \pm 1,8706$.

Periodo RP-1h:

Tras la reperfusión del injerto hepático se produce un descenso importante de la expresión génica de MCP-1, aunque más elevados que tras la RCN. No observamos grandes diferencias entre los animales. El valor medio en este periodo es de $1,4444 \pm 1,0713$.

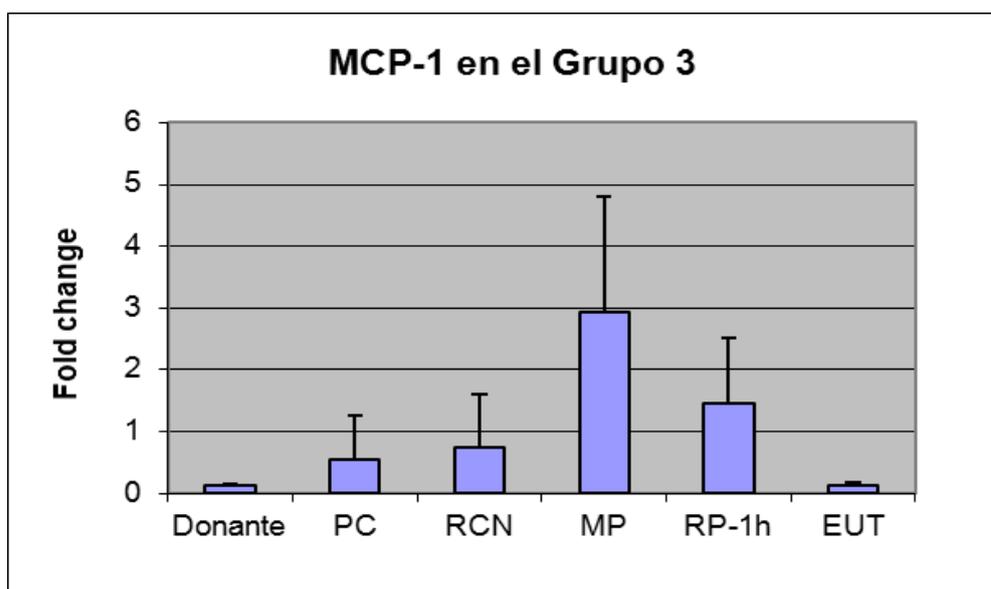


Gráfico 43: Valores medios de MCP-1 en el grupo 3

Periodo EUT:

En el momento de la eutanasia, los valores de MCP-1 en todos los animales presentan valores mínimos. Así, el valor medio de MCP-1 en este grupo en el momento de la eutanasia es de $0,1190 \pm 0,0652$.

Comparación entre grupos:

Al comparar los diferentes grupos a nivel general sobre la evolución de la expresión génica de MCP-1 podemos destacar dos aspectos:

El primero es la mínima alteración que sufre el grupo 1 durante toda la evolución. En este grupo no existe periodo de RCN ni de MP, estando el órgano directamente almacenado en frío tras el periodo de 90 minutos de parada cardiaca.

El segundo aspecto a destacar lo vemos en el grupo 3, en cómo el periodo previo de MP parece que pudiera influir en una expresión de MCP-1 mucho menor en el momento de la reperfusión, si lo comparamos con lo que ocurre en el grupo 2.

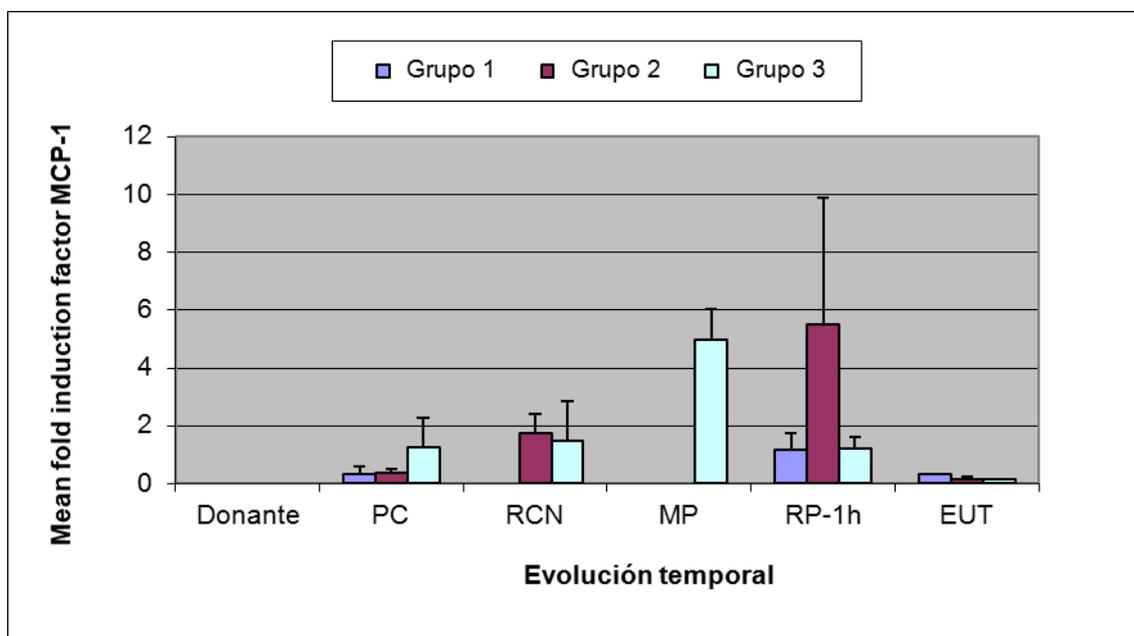


Gráfico 44: Evolución temporal de la expresión génica de MCP-1 en los diferentes grupos. Valores medios con desviación estándar.

		Donante	PC	RCN	MP	RP-1h	EUT
Grupo 1	media		0,2615			0,8543	0,2133
	DE		0,2055			0,5132	0,1674
Grupo 2	media	0,0704	0,2797	1,4357		4,1308	0,1548
	DE		0,1595	0,6965		4,0164	0,0530
Grupo 3	media	0,1247	0,5443	0,7522	2,9290	1,4444	0,1190
	DE	0,0267	0,7246	0,8422	1,8706	1,0713	0,0652

Tabla 41: Valores de la expresión génica de MCP-1 en RNAm mediante RT-PCR en todos los grupos. Valores medios y desviación estándar.

Comparación estadística entre grupos:

En la siguiente tabla mostramos de forma resumida los valores medios de la expresión génica de MCP-1 en todos los grupos, así como su desviación estándar, el error típico en cada momento, y el intervalo de confianza para la media al 95%.

		Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Donante	1
	2	0,0704
	3	0,1247	0,0267	0,0154	0,0583	0,1911
PC	1	0,2615	0,2055	0,0919	0,0064	0,5167
	2	0,2797	0,1595	0,0651	0,1124	0,4471
	3	0,5444	0,7246	0,2958	-0,2161	1,3048
RCN	1
	2	1,4357	0,6965	0,2843	0,7048	2,1666
	3	0,7522	0,8422	0,3438	-0,1316	1,6360
RP1h	1	0,8543	0,5132	0,2095	0,3157	1,3928
	2	4,1308	4,0164	1,6397	-0,0842	8,3458
	3	1,4444	1,0712	0,4373	0,3202	2,5686
EUT	1	0,2133	0,1674	0,1184	-1,2905	1,7170
	2	0,1549	0,0530	0,0265	0,0705	0,2392
	3	0,1190	0,0652	0,0292	0,0380	0,2000

Tabla 42: Estudio descriptivo estadístico de la expresión génica de MCP-1 en todos los grupos.

Grupo 1 y 2

	Grupo 1	Grupo 2	F	p
PC	0,262	0,280	,027	,872
RP-1h	0,854	4,131	3,929	,076
EUT	0,213	0,155	,499	,519

Tabla 43: Prueba ANOVA para comparación de las medias de MCP-1 entre los grupos 1 y 2, con la distribución F y el valor p de significación estadística

Grupo 1 y 3

	Grupo 1	Grupo 3	F	p
PC	0,262	0,544	,703	,424
RP-1h	0,854	1,444	1,481	,252
EUT	0,213	0,119	1,410	,288

Tabla 44: Prueba ANOVA para comparación de las medias de MCP-1 entre los grupos 1 y 3, con la distribución F y el valor p de significación estadística

Grupo 2 y 3

	Grupo 2	Grupo 3	F	p
Donante	0,070	0,125	3,090	,221
PC	0,280	0,544	,763	,403
RCN	1,436	0,752	2,347	,157
RP-1h	4,131	1,444	2,506	,144
EUT	0,155	0,119	,787	,404

Tabla 45: Prueba ANOVA para comparación de las medias de MCP-1 entre los grupos 2 y 3, con la distribución F y el valor p de significación estadística

Al realizar el estudio comparativo de los grupos entre sí, observamos que no existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Esto ocurre a pesar de las diferencias numéricas evidentes, tal y como pasaba con la expresión génica de caspasa-3 en el apartado anterior.

3.3. IL-6

Grupo 1:

Evolución general:

En el grupo 1, al igual que en los parámetros analizados previamente, no observamos grandes diferencias en los valores de IL-6 de los diferentes periodos.

Tras el periodo de parada cardiaca, el valor medio de IL-6 es de $0,2156 \pm 0,1092$.

Vemos un aumento de la expresión génica de IL-6 tras la reperfusión del injerto, llegando a un valor medio de $0,7806 \pm 0,5383$. En el momento de la eutanasia, el valor medio de IL-6 de los 3 animales de los que disponemos muestras es de $0,0661 \pm 0,0015$.

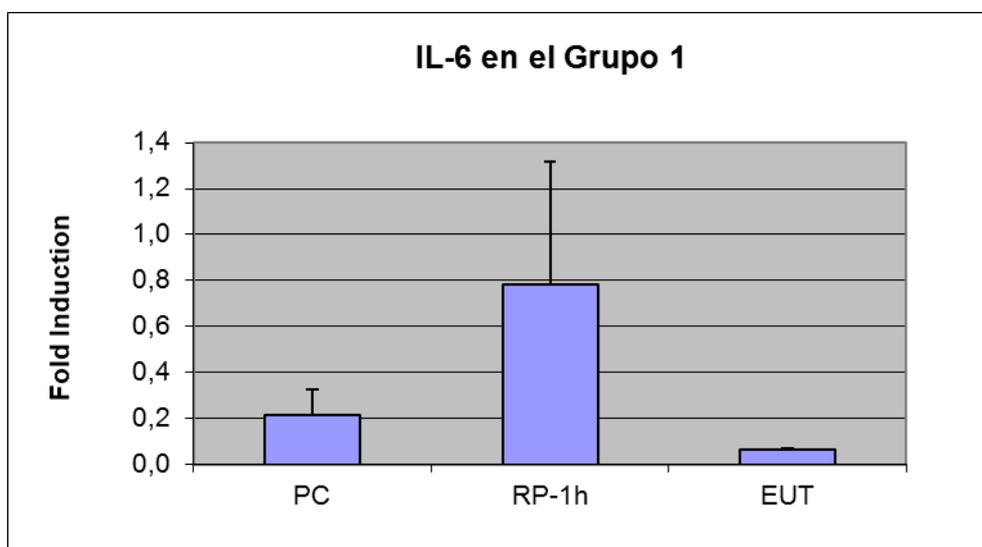


Gráfico 45: Valores medios de IL-6 en el grupo 1

	PC	RP-1h	EUT
1F	0,3740	1,1953	
1G	0,1933	1,6192	0,0651
1H	0,2244	0,2250	
1I	0,0671	0,3675	
1J		0,4746	
1K	0,2194	0,8018	0,0672
media	0,2156	0,7806	0,0661
Desv. Estándar	0,1092	0,5383	0,0015

Tabla 46: Valores de la expresión génica de IL-6 en RNAm mediante RT-PCR en el grupo 1 en los diferentes animales

Grupo 2:***Evolución general:***

En el grupo 2 se produce un aumento de los niveles de IL-6 en todos los animales, siendo máximo en el momento del periodo RP-1h. Posteriormente, los valores disminuirán hasta normalizarse en el momento de la eutanasia.

Periodo Donante:

En la única muestra de control realizada en este grupo para el donante, el valor de expresión génica de IL-6 fue de 0,2022.

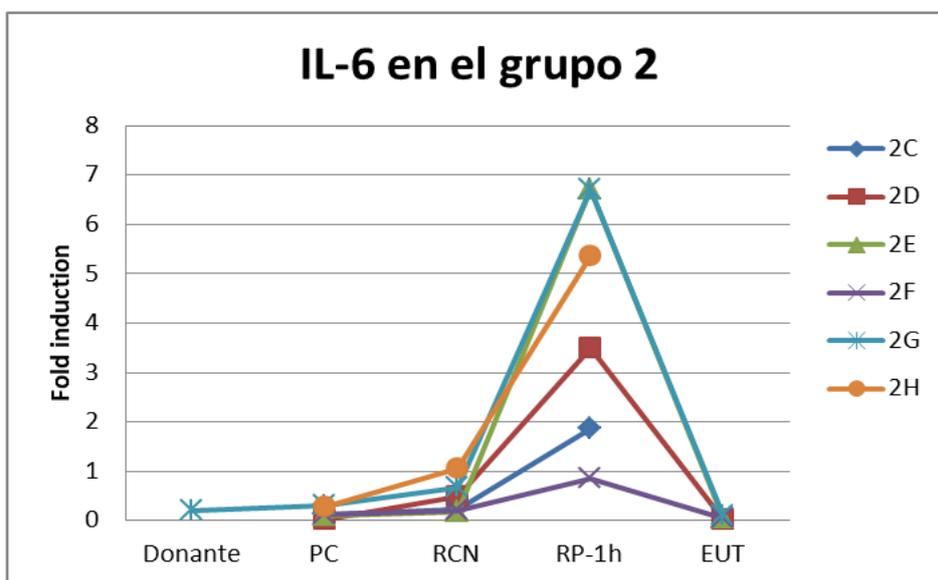


Gráfico 46: Curva de los valores de IL-6 en el grupo 2 por animal

Periodo PC:

A los 90 minutos de la parada cardíaca, no existe variación apenas de la expresión génica de IL-6, ni siquiera entre los distintos animales. El valor medio en este periodo es de $0,1608 \pm 0,1141$.

Periodo RCN:

A los 60 minutos de la RCN existe un incremento de la expresión génica de IL-6. La variación entre los diferentes animales no es amplia, con un rango de valores situado entre 0,2017 y 1,0521 para el animal 2H. El valor medio en este periodo es de $0,4646 \pm 0,3484$.

	Donante	PC	RCN	RP-1h	EUT
2C		0,1300	0,2234	1,8716	
2D		0,0119	0,4742	3,4844	0,0294
2E		0,1097	0,1632	6,7196	0,0549
2F		0,1190	0,2017	0,8572	0,0481
2G	0,2022	0,3117	0,6733	6,7134	0,0847
2H		0,2826	1,0521	5,3513	
media	0,2022	0,1608	0,4646	4,1663	0,0543
Desv. Estándar		0,1141	0,3484	2,4937	0,0230

Tabla 47: Valores de la expresión génica de IL-6 en RNAm mediante RT-PCR en el grupo 2 en los diferentes animales

Periodo RP-1h:

A la hora de la reperusión del injerto hepático la expresión génica de IL-6 se incrementa de manera considerable en todos los animales de este grupo. El animal 2E es el que realiza un pico más elevado, con un valor de IL-6 de 6,7196. El valor medio de IL-6 en este periodo es de $4,1663 \pm 2,4937$.

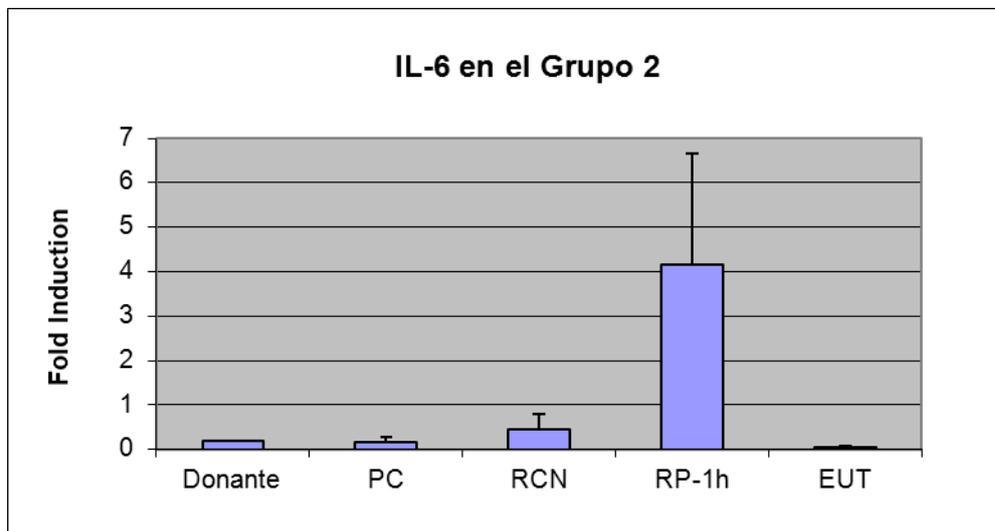


Gráfico 47: Valores medios de IL-6 en el grupo 2

Periodo EUT:

En el momento de la eutanasia los valores de IL-6 en este grupo están en un nivel mínimo, con una media de $0,0543 \pm 0,0230$.

Grupo 3:***Evolución general:***

En el grupo 3 la evolución de la expresión génica de IL-6 no sigue un patrón homogéneo entre los diferentes animales. Hay animales que presentan el pico mayor en el periodo MP (3J, 3L y 3H). Otros animales presentan el pico de IL-6 en el periodo RP-1h (3K y 3I).

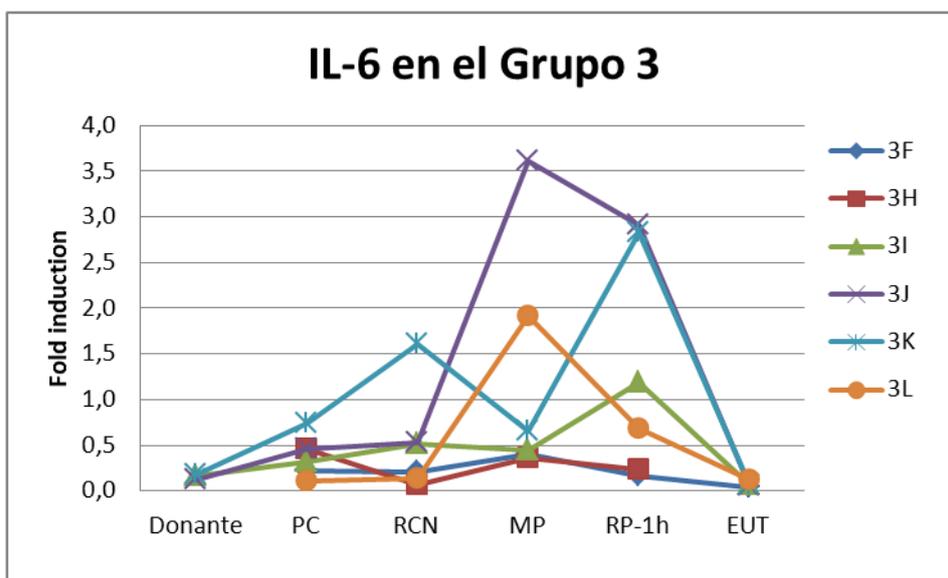


Gráfico 48: Curva de los valores de IL-6 en el grupo 3 por animal

Periodo Donante:

Las tres muestras que tenemos de control del donante en este grupo son muy homogéneas en cuanto a sus valores, con un valor medio de $0,1567 \pm 0,0262$.

Periodo PC:

A los 90 minutos de la parada cardiaca, la expresión génica de IL-6 se sitúa en un rango entre 0,1031 y 0,7347 para el animal 3K. El valor medio es de $0,3807 \pm 0,2214$.

Periodo RCN:

A los 60 minutos de la RCN, la expresión génica de IL-6 es muy variable entre los diferentes animales. El animal 3H presenta una disminución muy importante de la expresión de IL-6, situándose en un valor de 0,0706. Pero para la mayoría de los animales se produce un incremento en la expresión de IL-6. El que presenta un mayor aumento es el animal 3K, con un valor de 1,6083. El valor medio de todos los animales en este periodo es de $0,5135 \pm 0,5700$.

	Donante	PC	RCN	MP	RP-1h	EUT
3F		0,2168	0,2087	0,4101	0,1614	0,0426
3H		0,4553	0,0706	0,3681	0,2395	
3I	0,1638	0,3155	0,5219	0,4451	1,1917	0,0743
3J	0,1277	0,4588	0,5278	3,6168	2,9099	0,0558
3K	0,1786	0,7347	1,6083	0,6503	2,8305	0,0741
3L		0,1031	0,1438	1,9161	0,6770	0,1244
media	0,1567	0,3807	0,5135	1,2344	1,3350	0,0742
Desv. Estándar	0,0262	0,2214	0,5700	1,3065	1,2448	0,0311

Tabla 48: Valores de la expresión génica de IL-6 en RNAm mediante RT-PCR en el grupo 3 en los diferentes animales

Periodo MP:

Tras 4 horas en la máquina de perfusión, la evolución de la expresión génica de IL-6 también es muy dispar. El animal 3K presenta una disminución notable en sus niveles de IL-6, siendo de 0,6503. El animal 3I mantiene su mismo nivel de expresión génica (levemente disminuido). Para el resto de los animales se produce un aumento de la expresión de IL-6. Cabe destacar el pico que se produce en los animales 3J y 3L, con unos valores de 3,6168 y 1,9161 respectivamente. Para el resto, la expresión de IL-6 se sitúa en un rango comprendido entre 0,3681 y 0,4101. El valor medio en este periodo es de $1,2344 \pm 1,3065$.

Periodo RP-1h:

A la hora de la reperusión, también encontramos una evolución heterogénea entre los diferentes animales. Los animales 3I y 3K presentan un pico en este periodo, con valores de 1,1917 y de 2,8305. Por contra, los animales 3H y 3L presentan una disminución en la expresión de IL-6, con valores de 0,2395 y de 0,6770. El valor medio en este periodo es $1,3350 \pm 1,2448$.

Periodo EUT:

En el momento de la eutanasia, hay una disminución brusca de la expresión génica de IL-6 en todos los animales de los que disponemos muestras. Así, el valor medio en este periodo de IL-6 es de $0,0742 \pm 0,0311$.

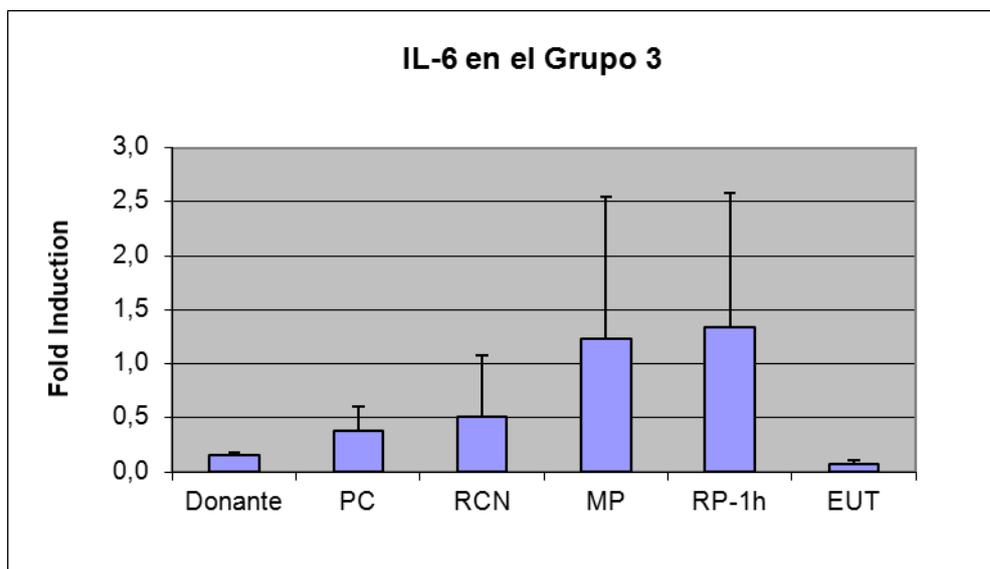


Gráfico 49: Valores medios de IL-6 en el grupo 3

En el gráfico de los valores medios de IL-6 en el grupo 3 observamos un aumento medio de la expresión de IL-6 hasta el periodo MP, manteniéndose con un leve incremento en el periodo RP-1h, para disminuir bruscamente en el momento de la eutanasia.

Comparación entre grupos:

Al comparar la expresión génica de IL-6 en los 3 grupos destacan los mismos aspectos que en la expresión de MCP-1, a saber:

La mínima alteración que sufre el grupo 1 durante toda la evolución.

Al comparar los grupos 2 y 3 seguimos observando que tras la reperfusión del injerto, la expresión génica de IL-6 es mucho menor en el grupo 3 que en el grupo 2. De hecho, los niveles del grupo 3 son más próximos al grupo 1 que al grupo 2.

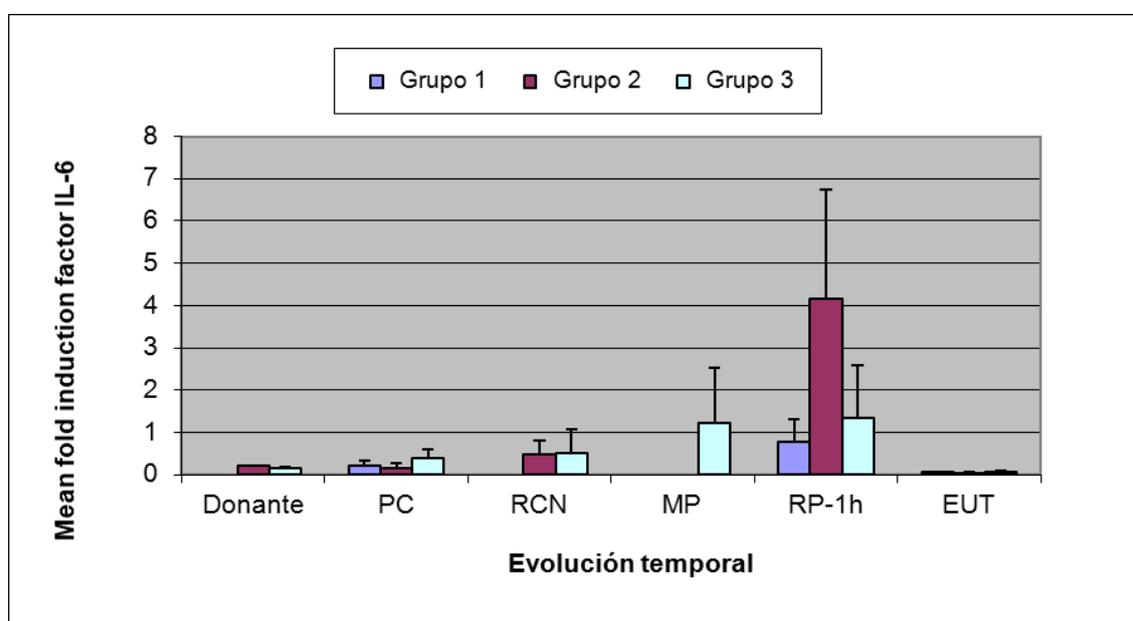


Gráfico 50: Evolución temporal de la expresión génica de IL-6 en los diferentes grupos. Valores medios con desviación estándar.

		Donante	PC	RCN	MP	RP-1h	EUT
Grupo 1	media		0,2156			0,7806	0,0661
	DE		0,1092			0,5383	0,0015
Grupo 2	media	0,2022	0,1608	0,4646		4,1663	0,0543
	DE		0,1141	0,3484		2,4937	0,0230
Grupo 3	media	0,1567	0,3807	0,5135	1,2344	1,3350	0,0742
	DE	0,0262	0,2214	0,5700	1,3065	1,2448	0,0311

Tabla 49: Valores de la expresión génica de IL-6 en RNAm mediante RT-PCR en todos los grupos. Valores medios y desviación estándar.

Comparación estadística entre grupos:

En la siguiente tabla mostramos de forma resumida los valores medios de la expresión génica de IL-6 en todos los grupos, así como su desviación estándar, el error típico en cada momento, y el intervalo de confianza para la media al 95%.

		Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Donante	1
	2	0,2022
	3	0,1567	0,0262	0,0151	0,0917	0,2217
PC	1	0,2156	0,1092	0,0489	0,0800	0,3513
	2	0,1608	0,1141	0,0466	0,0411	0,2805
	3	0,3807	0,2214	0,0904	0,1483	0,6131
RCN	1
	2	0,4647	0,3484	0,1422	0,0990	0,8303
	3	0,5135	0,5700	0,2327	-0,0847	1,1117
RP1h	1	0,7806	0,5383	0,2197	0,2157	1,3454
	2	4,1663	2,4937	1,0180	1,5493	6,7832
	3	1,3350	1,2448	0,5082	0,0286	2,6414
EUT	1	0,0662	0,0015	0,0011	0,0528	0,0795
	2	0,0543	0,0230	0,0115	0,0177	0,0908
	3	0,0742	0,0311	0,0139	0,0357	0,1128

Tabla 50: Estudio descriptivo estadístico de la expresión génica de IL-6 en todos los grupos.

Grupo 1 y 2

	Grupo 1	Grupo 2	F	p
PC	0,216	0,161	,654	,440
RP-1h	0,781	4,166	10,568	,009
EUT	0,066	0,054	,474	,529

Tabla 51: Prueba ANOVA para comparación de las medias de IL-6 entre los grupos 1 y 2, con la distribución F y el valor p de significación estadística

Grupo 1 y 3

	Grupo 1	Grupo 3	F	p
PC	0,216	0,381	2,283	,165
RP-1h	0,781	1,335	1,003	,340
EUT	0,066	0,074	,121	,742

Tabla 52: Prueba ANOVA para comparación de las medias de IL-6 entre los grupos 1 y 3, con la distribución F y el valor p de significación estadística

Grupo 2 y 3

	Grupo 2	Grupo 3	F	p
Donante	0,202	0,157	2,265	,271
PC	0,161	0,381	4,675	,056
RCN	0,465	0,514	,032	,861
RP-1h	4,166	1,335	6,192	,032
EUT	0,054	0,074	1,140	,321

Tabla 53: Prueba ANOVA para comparación de las medias de IL-6 entre los grupos 2 y 3, con la distribución F y el valor p de significación estadística

En el análisis estadístico comparativo entre grupos encontramos diferencias estadísticamente significativas a la hora de la reperfusión al comparar el grupo 2 con los otros dos grupos.

3.4. TNF- α

Grupo 1:

Evolución general:

En el grupo 1 la expresión del TNF- α tiene un pico también en el momento de la reperfusión del injerto. La media en este periodo es de $1,2131 \pm 0,8490$. En el periodo PC y en el periodo EUT, los valores medios son $0,0475 \pm 0,0240$ y $0,0593 \pm 0,0693$ respectivamente.

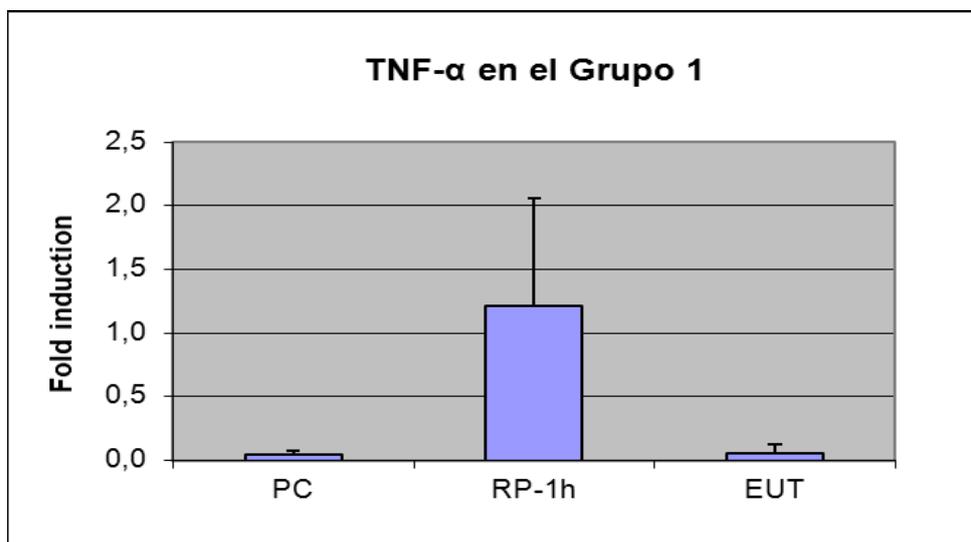


Gráfico 51: Valores medios de TNF- α en el grupo 1

	PC	RP-1h	EUT
1F	0,0343	1,4924	
1G	0,0287	1,0241	0,0103
1H	0,0754	0,5345	
1I	0,0716	2,7686	
1J		0,4626	
1K	0,0273	0,9967	0,1083
media	0,0475	1,2131	0,0593
Desv. Estándar	0,0240	0,8490	0,0693

Tabla 54: Valores de la expresión génica de TNF- α en RNAm mediante RT-PCR en el grupo 1 en los diferentes animales

Grupo 2:***Evolución general:***

En el grupo 2 los animales presentan un pico de expresión génica de TNF- α en el periodo RCN, que se mantiene en el periodo RP-1h, para disminuir hasta casi normalizarse en el momento de la eutanasia.

Periodo Donante:

De la muestra de control tomada en el animal 2G, el valor de la expresión de TNF- α fue de 0,0617.

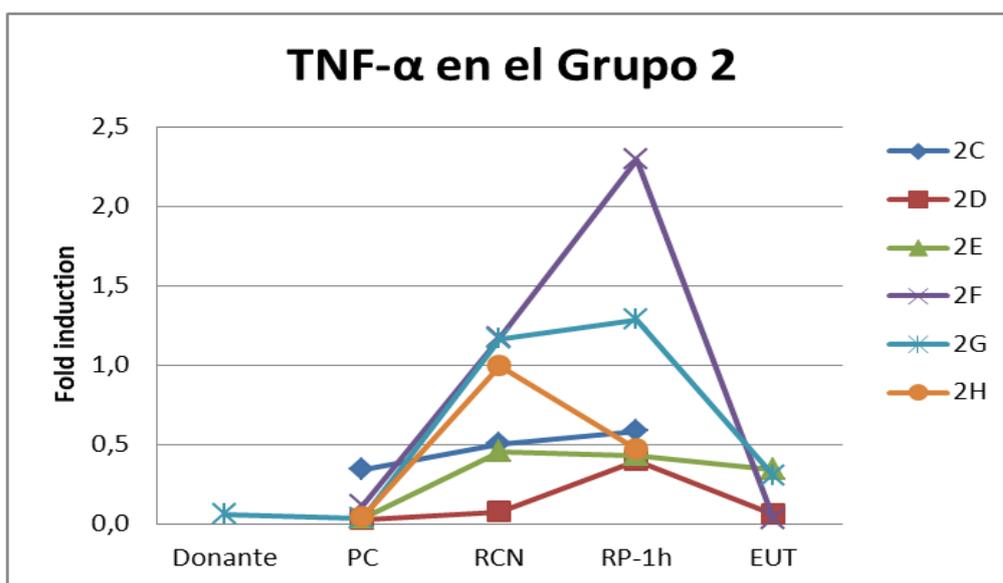


Gráfico 52: Curva de los valores de TNF- α en el grupo 2 por animal

Periodo PC:

A los 90 minutos de la parada cardiaca la variación entre los diferentes animales se mueve entre cifras muy bajas. En este periodo el valor medio es de $0,0988 \pm 0,1247$. Vemos que el aumento en la expresión de TNF- α en este periodo es mínimo.

Periodo RCN:

Tras los 60 minutos de RCN, todos los animales presentan un aumento en la expresión génica de TNF- α . Los tres animales que presentan un pico más elevado son los animales 2F, 2G y 2H, con cifras de 1,1675; 1,1597 y 0,9938 respectivamente. Para los otros tres animales (2C, 2D y 2E) los valores fueron de 0,5046; 0,0756 y 0,4533 respectivamente. El valor medio de la expresión génica de PCR en este periodo es de $0,7257 \pm 0,4475$.

	Donante	PC	RCN	RP-1h	EUT
2C		0,3447	0,5046	0,5794	
2D		0,0274	0,0756	0,3998	0,0599
2E		0,0312	0,4533	0,4304	0,3380
2F		0,1135	1,1675	2,2894	0,0228
2G	0,0617	0,0348	1,1597	1,2873	0,2980
2H		0,0413	0,9938	0,4738	
media	0,0617	0,0988	0,7257	0,9100	0,1797
Desv. Estándar		0,1247	0,4475	0,7530	0,1613

Tabla 55: Valores de la expresión génica de TNF- α en RNAm mediante RT-PCR en el grupo 2 en los diferentes animales

Periodo RP-1h:

Tras la reperfusión del injerto, la expresión de TNF- α se mantiene elevada, e incluso aumenta en los animales 2D, 2C, 2F y 2G. En el animal 2E hay una muy leve disminución, pero en el animal 2H se produce una disminución bastante brusca, con un valor de TNF- α de 0,4738. El valor medio de la expresión génica de TNF- α en este periodo es de $0,9100 \pm 0,7530$.

Periodo EUT:

En el momento de la eutanasia la expresión génica de TNF- α es bastante baja, con un valor medio de $0,1797 \pm 0,1613$.

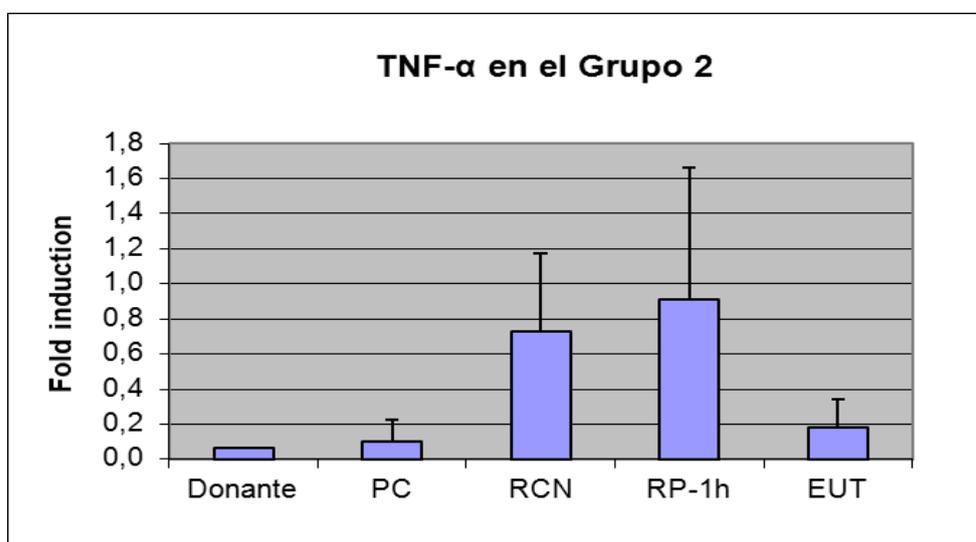


Gráfico 53: Valores medios de TNF- α en el grupo 2

En este gráfico podemos observar claramente la evolución media de la expresión génica de TNF- α en el grupo 2. Hay un leve aumento tras los 90 minutos de parada cardiaca, pero el pico de expresión se produce tras los 60 minutos de recirculación normotérmica. Este pico se mantiene, e incluso aumenta tras la reperfusión del injerto, para seguir una evolución con tendencia a la normalización en el momento de la eutanasia, al 5º día de seguimiento.

Grupo 3:***Evolución general:***

En el grupo 3 se observa que a nivel general todos los animales siguen un mismo patrón en cuanto a la expresión génica de TNF- α . En el periodo de RCN se produce un aumento de los valores de TNF- α en todos los animales, que sigue incrementándose hasta realizar un pico en el periodo MP. Tras este pico, los valores de TNF- α disminuyen de forma importante en el periodo RP-1h. Recordemos que ésto mismo ocurría al analizar la expresión de MCP-1 en este grupo. En el momento de la eutanasia hay un leve aumento de la expresión de TNF- α en comparación con el periodo anterior, aun manteniéndose en valores muy bajos, similares a los otros grupos.

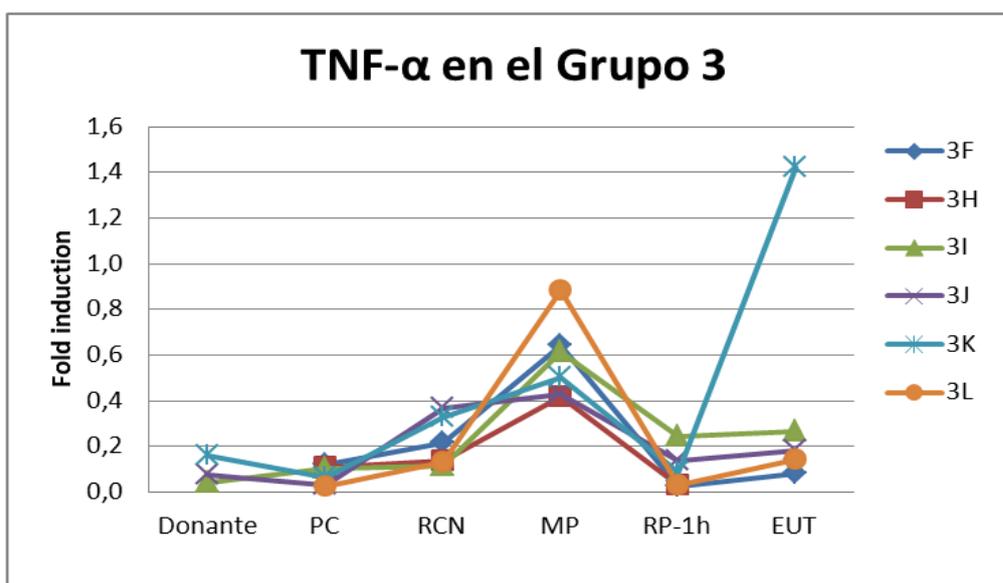


Gráfico 54: Curva de los valores de TNF- α en el grupo 3 por animal

Periodo Donante:

De las tres muestras recogidas en el donante de este grupo, el valor medio de expresión de TNF- α es de $0,0918 \pm 0,0598$.

Periodo PC:

A los 90 minutos de la parada cardiaca existe muy poca variación de los valores de TNF- α entre los diferente animales. El valor medio se mantiene bajo, incluso más bajo que en el periodo donante, siendo de $0,0751 \pm 0,0419$.

Periodo RCN:

A los 60 minutos de la RCN se produce un incremento en todos lo animales de la expresión génica de TNF- α . En dos animales el incremento es más marcado, aunque de forma absoluta el valor es bastante bajo. Estos animales son 3J y 3K, con unos valores de TNF- α de 0,3657 y de 0,3252. El valor medio de todo el grupo en este periodo es de $0,2134 \pm 0,1089$.

	Donante	PC	RCN	MP	RP-1h	EUT
3F		0,1210	0,2142	0,6441	0,0228	0,0779
3H		0,1077	0,1345	0,4175	0,0307	
3I	0,0420	0,1053	0,1117	0,6133	0,2448	0,2652
3J	0,0752	0,0290	0,3657	0,4288	0,1343	0,1807
3K	0,1581	0,0613	0,3252	0,5031	0,0849	1,4221
3L		0,0263	0,1292	0,8801	0,0319	0,1412
media	0,0918	0,0751	0,2134	0,5811	0,0915	0,4174
Desv. Estándar	0,0598	0,0419	0,1089	0,1735	0,0864	0,5657

Tabla 56: Valores de la expresión génica de TNF- α en RNAm mediante RT-PCR en el grupo 3 en los diferentes animales

Periodo MP:

A las 4 horas de estar el injerto perfundiéndose en la máquina es cuando se produce el pico de expresión de TNF- α en todos los animales. Este pico es más marcado en el animal 3L, con un valor de 0,8801. El valor medio de todo el grupo en este periodo es de $0,5811 \pm 0,1735$.

Periodo RP-1h:

A la hora de la reperfusión del injerto hepático, la expresión génica de TNF- α disminuye bruscamente. De hecho, obtenemos un valor medio en este periodo de $0,0915 \pm 0,0864$.

Periodo EUT:

En el momento de la eutanasia vuelve a haber un aumento de la expresión de TNF- α , en comparación con el periodo previo (RP-1h). Todos los animales presentan este aumento, aun manteniéndose en cifras absolutas bastante bajas. Existe una hiperexpresión de TNF- α desproporcionada en el animal 3K, con un valor de 1,4221. El valor medio de TNF- α en este periodo es de $0,4174 \pm 0,5657$.

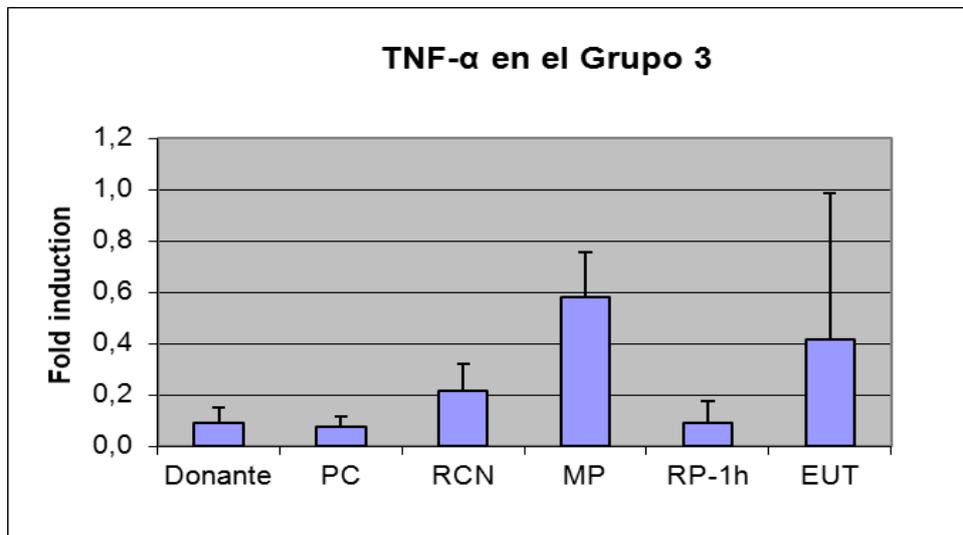


Gráfico 55: Valores medios de TNF- α en el grupo 3

En este gráfico podemos observar la evolución de los valores medios de TNF- α en el grupo 3. Tal como describíamos por periodos y animales, vemos este aumento progresivo hasta el pico realizado en el periodo MP. Llama la atención la disminución brusca de TNF- α en el momento de la reperusión, como si el periodo de perfusión en máquina de cierta forma “protegiera” frente a la reperusión. Este fenómeno también lo observamos previamente al describir la evolución de la expresión génica de MCP-1 en este grupo.

Comparación entre grupos:

En el siguiente gráfico está representada la evolución de los valores medios de expresión génica de TNF- α de los 3 grupos.

Es muy interesante observar el pico tan importante sufrido por el grupo 1 en el periodo RP-1h, en comparación con los otros grupos que han tenido un periodo adicional de RCN. Igual de interesante es la diferencia que vemos entre los grupos 2 y 3 en este mismo periodo. El grupo 3 apenas presenta sobre-expresión génica de TNF- α en este periodo, tras haber tenido un periodo adicional de perfusión en máquina durante 4 horas. Al final del seguimiento, en la eutanasia, también se mantiene una diferencia de expresión de TNF- α entre estos dos grupos.

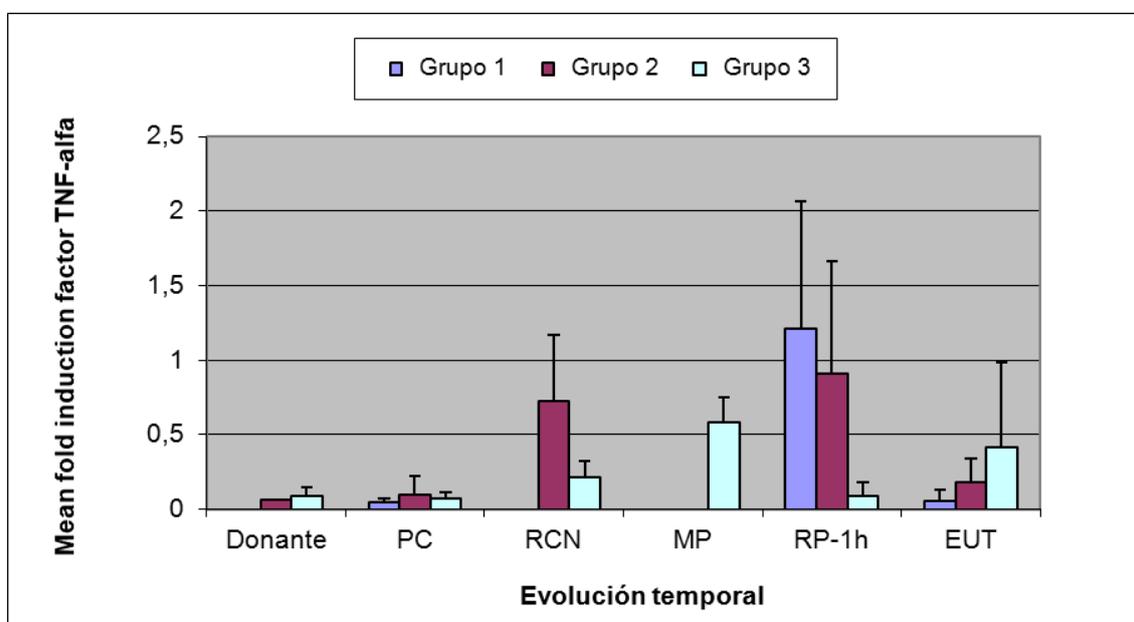


Gráfico 56: Evolución temporal de la expresión génica de TNF- α en los diferentes grupos. Valores medios con desviación estándar.

		Donante	PC	RCN	MP	RP-1h	EUT
Grupo 1	media		0,0475			1,2131	0,0593
	DE		0,0240			0,8490	0,0693
Grupo 2	media	0,0617	0,0988	0,7257		0,9100	0,1797
	DE		0,1247	0,4475		0,7530	0,1613
Grupo 3	media	0,0918	0,0751	0,2134	0,5811	0,0915	0,4174
	DE	0,0598	0,0419	0,1089	0,1735	0,0864	0,5657

Tabla 57: Valores de la expresión génica de TNF- α en RNAm mediante RT-PCR en todos los grupos. Valores medios y desviación estándar.

Comparación estadística entre grupos:

En la siguiente tabla mostramos de forma resumida los valores medios de la expresión génica de TNF- α en todos los grupos, así como su desviación estándar, el error típico en cada momento, y el intervalo de confianza para la media al 95%.

		Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Donante	1
	2	0,0617
	3	0,0918	0,0598	0,0345	-0,0568	0,2403
PC	1	0,0475	0,0240	0,0107	0,0177	0,0772
	2	0,0988	0,1247	0,0509	-0,0320	0,2297
	3	0,0751	0,0419	0,0171	0,0311	0,1191
RCN	1
	2	0,7258	0,4475	0,1827	0,2562	1,1953
	3	0,2134	0,1090	0,0445	0,0991	0,3278
RP1h	1	1,2132	0,8490	0,3466	0,3222	2,1041
	2	0,9100	0,7530	0,3074	0,1198	1,7002
	3	0,0916	0,0864	0,0353	0,0009	0,1823
EUT	1	0,0593	0,0693	0,0490	-0,5633	0,6819
	2	0,1797	0,1613	0,0806	-0,0769	0,4363
	3	0,4174	0,5657	0,2530	-0,2850	1,1199

Tabla 58: Estudio descriptivo estadístico de la expresión génica de TNF- α en todos los grupos.

Grupo 1 y 2

	Grupo 1	Grupo 2	F	p
PC	0,047	0,099	,809	,392
RP-1h	1,213	0,910	,428	,528
EUT	0,059	0,180	,933	,389

Tabla 59: Prueba ANOVA para comparación de las medias de TNF- α entre los grupos 1 y 2, con la distribución F y el valor p de significación estadística

Al comparar el grupo 1 y con el grupo 2 no encontramos diferencias estadísticamente significativas.

Grupo 1 y 3

	Grupo 1	Grupo 3	F	p
PC	0,047	0,075	1,693	,225
RP-1h	1,213	0,092	10,364	,009
EUT	0,059	0,417	,713	,437

Tabla 60: Prueba ANOVA para comparación de las medias de TNF- α entre los grupos 1 y 3, con la distribución F y el valor p de significación estadística

Al comparar el grupo 1 con el grupo 3 encontramos diferencias estadísticamente significativas en el periodo RP-1h, con una $p=0,009$.

Grupo 2 y 3

	Grupo 2	Grupo 3	F	p
Donante	0,062	0,092	,190	,706
PC	0,099	0,075	,195	,668
RCN	0,726	0,213	7,425	,021
RP-1h	0,910	0,092	6,996	,025
EUT	0,180	0,417	,647	,448

Tabla 61: Prueba ANOVA para comparación de las medias de TNF- α entre los grupos 2 y 3, con la distribución F y el valor p de significación estadística

Al comparar el grupo 2 con el grupo 3 encontramos diferencias estadísticamente significativas en el periodo RCN y en el periodo RP-1h. En el periodo RCN la p es de 0,021 y en el periodo RP-1h la p es de 0,025.

En el periodo RCN no debería existir esta diferencia estadística puesto que la metodología es la misma para ambos grupos hasta este periodo.

3.5. E-selectina

Grupo 1:

Evolución general:

En el grupo 1 partimos de unos valores medios de E-selectina a los 90 minutos de la parada cardiaca de $0,0659 \pm 0,0473$. Se produce un aumento de los valores de E-selectina en el momento de la reperfusión, con una media de $0,7169 \pm 0,4358$. En la eutanasia realizada en los dos animales 1G y 1K, el valor medio de E-selectina es de $0,0812 \pm 0,0109$.

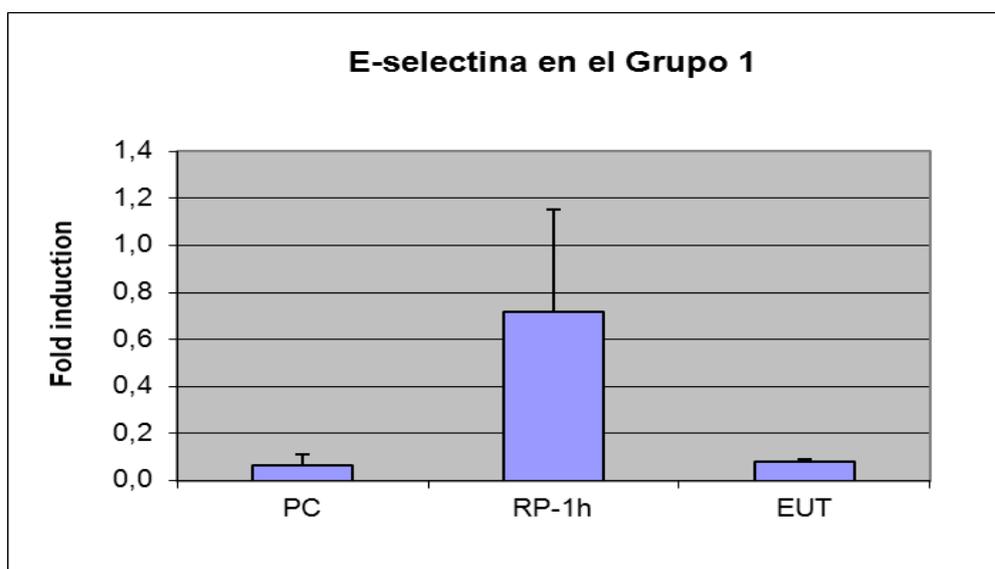


Gráfico 57: Valores medios de E-selectina en el grupo 1

	PC	RP-1h	EUT
1F	0,0553	0,5905	
1G	0,1358	1,1424	0,0735
1H	0,0247	0,2344	
1I	0,0891	0,6305	
1J		0,3642	
1K	0,0246	1,3397	0,0889
media	0,0659	0,7169	0,0812
Desv. Estándar	0,0473	0,4358	0,0109

Tabla 62: Valores de la expresión génica de E-selectina en RNAm mediante RT-PCR en el grupo 1 en los diferentes animales

Grupo 2:***Evolución general:***

En el grupo 2 se mantienen unos niveles bajos de expresión de E-selectina hasta el momento de la reperusión, donde se produce un aumento en todos los animales. En el momento de la eutanasia volvemos a encontrar unos niveles similares a los que existían previo al trasplante.

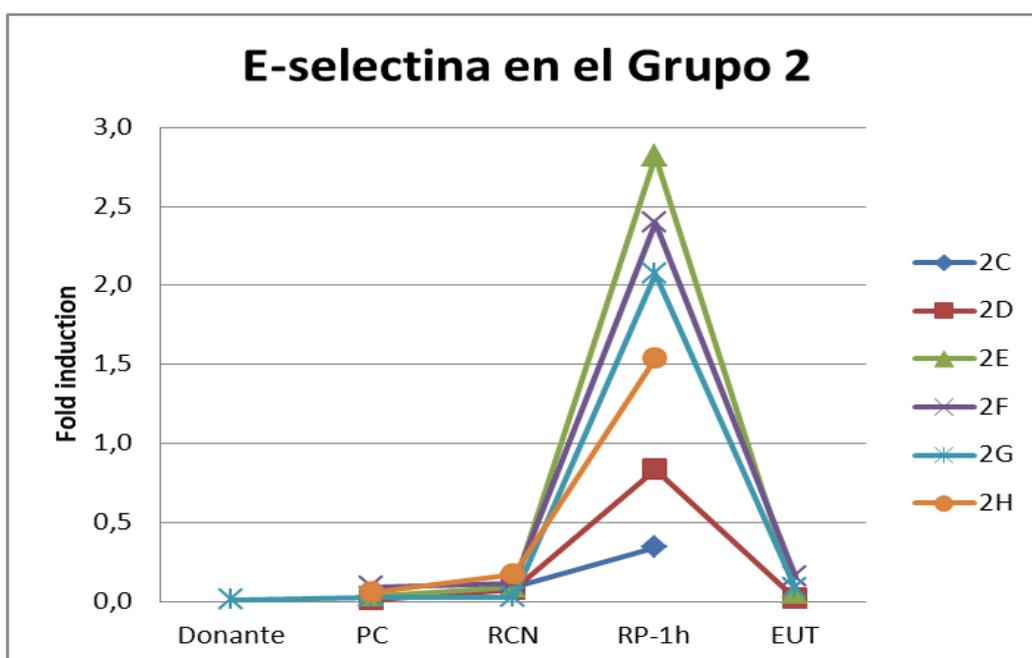


Gráfico 58: Curva de los valores de E-selectina en el grupo 2 por animal

Periodo Donante:

En el animal 2G, en el que se tomó una muestra de tejido en el donante, observamos un valor de E-selectina de 0,0111.

Periodo PC:

A los 90 minutos de la parada cardiaca, todos los animales tienen unos niveles de expresión génica de E-selectina muy similares. El valor medio en este periodo es de $0,0411 \pm 0,0291$.

Periodo RCN:

A los 60 minutos de la RCN, se produce un leve aumento en la expresión genética de E-selectina. El nivel medio de expresión en este periodo es de $0,0954 \pm 0,0467$.

Periodo RP-1h:

A la hora de la reperfusión se produce un incremento importante en todos los animales de este grupo. El animal 2E es el que realiza el pico de expresión más acusado, con un valor de 2,8174. Para el conjunto del grupo, el valor medio es de $1,6668 \pm 0,9456$.

	Donante	PC	RCN	RP-1h	EUT
2C		0,0265	0,0944	0,3447	
2D		0,0094	0,0771	0,8377	0,0195
2E		0,0363	0,0944	2,8174	0,0528
2F		0,0918	0,1124	2,3970	0,1521
2G	0,0111	0,0270	0,0253	2,0679	0,0861
2H		0,0557	0,1687	1,5363	
media	0,0111	0,0411	0,0954	1,6668	0,0776
Desv. Estándar		0,0291	0,0467	0,9456	0,0566

Tabla 63: Valores de la expresión génica de E-selectina en RNAm mediante RT-PCR en el grupo 2 en los diferentes animales

Periodo EUT:

En el momento de la eutanasia, la expresión de E-selectina vuelve a estar en niveles similares a los previos al trasplante. Hay una disminución de la expresión génica en todos los animales, con un valor medio de $0,0776 \pm 0,0566$.

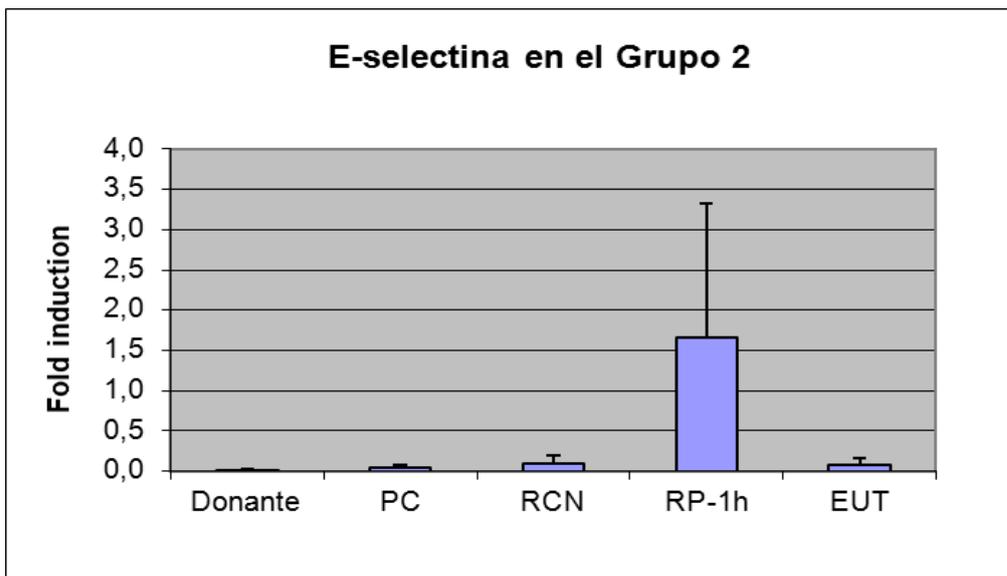


Gráfico 59: Valores medios de E-selectina en el grupo 2

En este gráfico vemos la evolución de los valores medios de la expresión génica de E-selectina en el grupo 2. El pico que se produce a la hora de la reperusión del injerto es considerable, para volver posteriormente a niveles similares a los previos.

Grupo 3:***Evolución general:***

En el grupo 3, aunque no observemos un patrón idéntico en todos los animales, sí que hay una tendencia general. Ésta es la misma que observamos al analizar la expresión de MCP-1 y TNF- α . Ocurre también con la E-selectina un aumento en la expresión en el periodo MP (a las 4 horas de estar el injerto perfundiéndose en la máquina ex -situ a 37°C con sangre oxigenada), para disminuir posteriormente en el periodo RP-1h. En este momento, la expresión de E-selectina es muy baja.

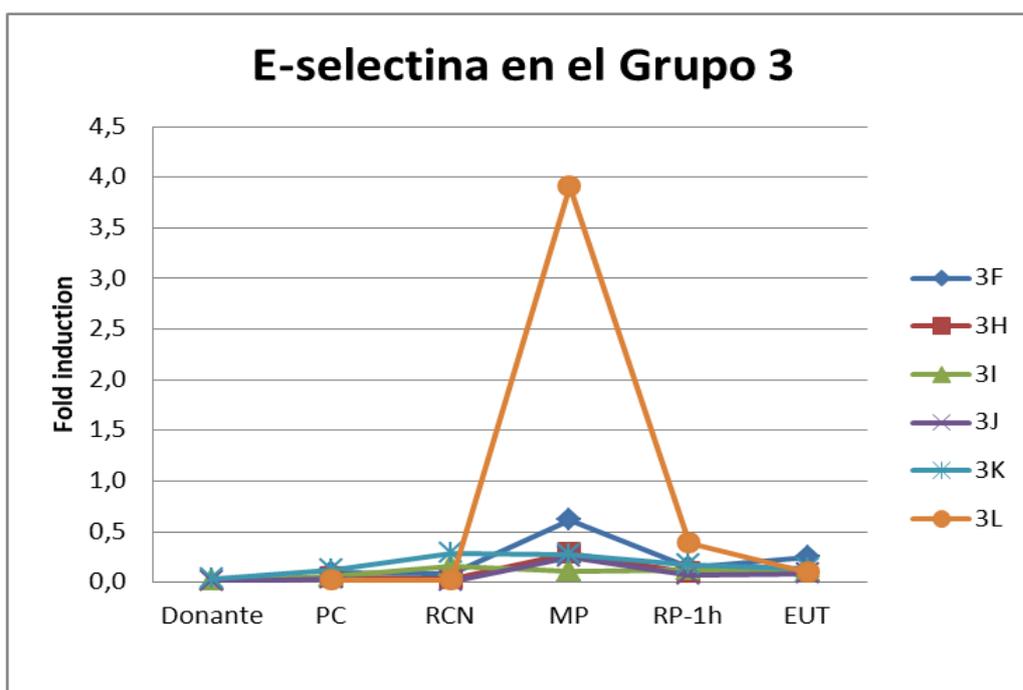


Gráfico 60: Curva de los valores de E-selectina en el grupo 3 por animal

Periodo Donante:

En las muestras tomadas en el donante en los animales 3I, 3J y 3K, el valor medio de expresión de E-selectina es de $0,0180 \pm 0,0099$.

Periodo PC:

A los 90 minutos de la parada cardiaca, tal como ocurre en los otros grupos, la expresión de E-selectina se ve aumentada, pero manteniéndose en unos niveles bajos. El valor medio en este periodo es de $0,0618 \pm 0,0406$.

Periodo RCN:

A los 60 minutos de la RCN, la expresión génica de E-selectina continúa aumentando, aunque manteniéndose también en niveles bajos. El valor medio es de $0,0984 \pm 0,1068$. Existe un animal, 3K que presenta unos niveles mucho más altos que el resto de su grupo. El valor de E-selectina en este animal es de 0,2837.

	Donante	PC	RCN	MP	RP-1h	EUT
3F		0,1029	0,0800	0,6124	0,1443	0,2531
3H		0,0434	0,0290	0,2846	0,1003	
3I	0,0182	0,0564	0,1638	0,1045	0,1201	0,1096
3J	0,0080	0,0293	0,0127	0,2503	0,0771	0,0879
3K	0,0279	0,1194	0,2837	0,2683	0,1758	0,1407
3L		0,0192	0,0212	3,9147	0,3836	0,0974
media	0,0180	0,0618	0,0984	0,9058	0,1669	0,1377
Desv. Estándar	0,0099	0,0406	0,1068	1,4835	0,1116	0,0675

Tabla 64: Valores de la expresión génica de E-selectina en RNAm mediante RT-PCR en el grupo 3 en los diferentes animales

Periodo MP:

A las 4 horas de estar el injerto perfundiéndose en la máquina ex -situ es cuando encontramos un incremento notable en la expresión génica de E-selectina. Esto se produce en todos los animales excepto en el animal 3K y 3I, que disminuyen sensiblemente su nivel de expresión génica a valores de 0,1045 y 0,2683 respectivamente. En este periodo MP, el animal 3L presenta un pico muy acentuado, con un valor de 3,9147; esta sobre-expresión podría deberse a las mismas causas técnicas que las observadas en el animal 2F a la hora de la reperfusión respecto a la medición de expresión génica de caspasa-3, ya que observamos que los valores anteriores y posteriores en este mismo animal no difieren tampoco respecto a los valores del resto de animales del mismo grupo. El valor medio de expresión de E-selectina en todo el grupo 3 en este periodo MP es de $0,9058 \pm 1,4835$.

Periodo RP-1h:

A la hora de la reperfusión del injerto se produce una disminución de la expresión de E-selectina en todos los animales. Así, el valor medio en este periodo es de $0,1669 \pm 0,1116$.

Periodo EUT:

En el momento de la eutanasia al 5º día, existe una disminución de la expresión de E-selectina en todos los animales, excepto en el animal 3F, que aumenta a 0,2531. El valor medio para todo el grupo en este periodo es de $0,1377 \pm 0,0675$.

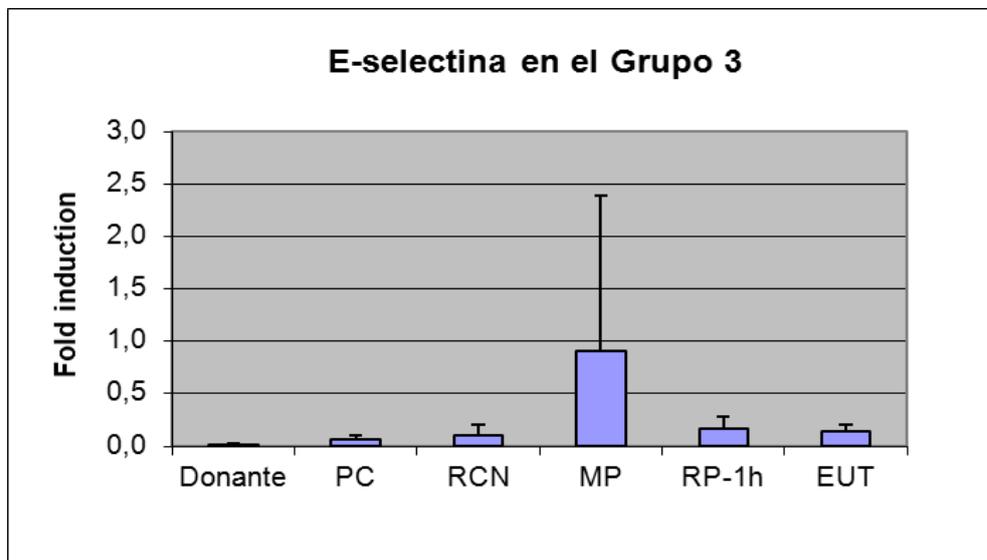


Gráfico 61: Valores medios de E-selectina en el grupo 3

En el gráfico de los valores medios vemos claramente lo que hemos expuesto previamente: este incremento en la expresión génica de E-selectina en el periodo MP, para después disminuir considerablemente en el momento de la reperusión hepática, obteniendo unos valores que no observamos en los grupos 1 y 2 en este periodo.

Comparación entre grupos:

Al comparar los tres grupos observamos el mismo fenómeno que ocurre al analizar la expresión de MCP-1 y de TNF- α . Como cabe esperar, no observamos grandes diferencias en los periodos de donante, parada cardiaca y RCN. Pero en el grupo 3, tras haber estado los injertos hepáticos 4 horas perfundiéndose en máquina, en el momento de la reperfusión de este injerto la repercusión en la expresión génica de E-selectina es mínima, si lo comparamos con el grupo 2 que no tiene el periodo adicional de perfusión ex-situ en máquina. En el momento de la eutanasia, la expresión génica de E-selectina es muy baja para todos los animales de cualquier grupo.

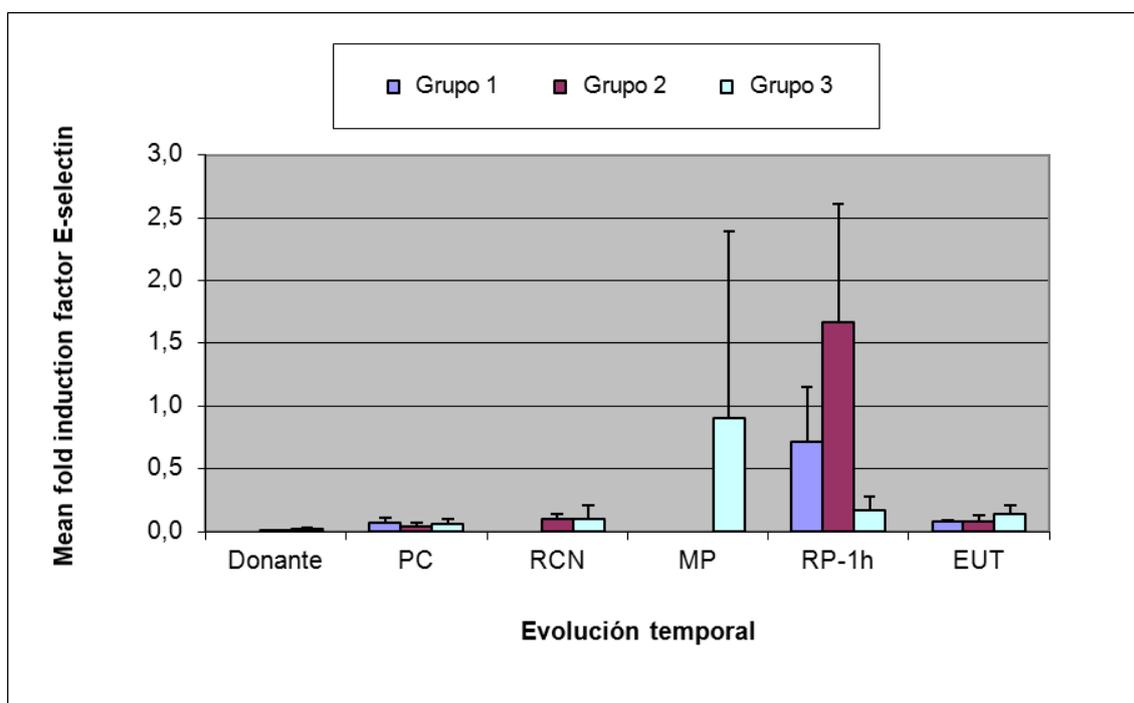


Gráfico 62: Evolución temporal de la expresión génica de E-selectina en los diferentes grupos. Valores medios con desviación estándar.

		Donante	PC	RCN	MP	RP-1h	EUT
Grupo 1	media		0,0659			0,7169	0,0812
	DE		0,0473			0,4358	0,0109
Grupo 2	media	0,0111	0,0411	0,0954		1,6668	0,0776
	DE		0,0291	0,0467		0,9456	0,0566
Grupo 3	media	0,0180	0,0618	0,0984	0,9058	0,1669	0,1377
	DE	0,0099	0,0406	0,1068	1,4835	0,1116	0,0675

Tabla 65: Valores de la expresión génica de E-selectina en RNAm mediante RT-PCR en todos los grupos. Valores medios y desviación estándar.

Comparación estadística entre grupos:

En la siguiente tabla mostramos de forma resumida los valores medios de la expresión génica de E-selectina en todos los grupos, así como su desviación estándar, el error típico en cada momento, y el intervalo de confianza para la media al 95%.

		Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Donante	1
	2	0,0111
	3	0,0180	0,0100	0,0057	-0,0067	0,0428
PC	1	0,0659	0,0473	0,0211	0,0072	0,1246
	2	0,0411	0,0291	0,0119	0,0106	0,0716
	3	0,0618	0,0406	0,0166	0,0191	0,1044
RCN	1
	2	0,0954	0,0467	0,0191	0,0464	0,1444
	3	0,0984	0,1068	0,0436	-0,0137	0,2105
RP1h	1	0,7170	0,4358	0,1779	0,2596	1,1743
	2	1,6668	0,9456	0,3860	0,6745	2,6591
	3	0,1669	0,1116	0,0455	0,0498	0,2840
EUT	1	0,0812	0,0109	0,0077	-0,0166	0,1790
	2	0,0776	0,0566	0,0283	-0,0124	0,1677
	3	0,1377	0,0675	0,0302	0,0539	0,2215

Tabla 66: Estudio descriptivo estadístico de la expresión génica de E-selectina en todos los grupos.

Grupo 1 y 2

	Grupo 1	Grupo 2	F	p
PC	0,066	0,041	1,145	0,312
RP-1h	0,717	1,667	4,994	0,049
EUT	0,081	0,078	0,007	0,937

Tabla 67: Prueba ANOVA para comparación de las medias de E-selectina entre los grupos 1 y 2, con la distribución F y el valor p de significación estadística

Grupo 1 y 3

	Grupo 1	Grupo 3	F	p
PC	0,066	0,062	0,024	0,879
RP-1h	0,717	0,167	8,972	0,013
EUT	0,081	0,138	1,245	0,315

Tabla 68: Prueba ANOVA para comparación de las medias de E-selectina entre los grupos 1 y 3, con la distribución F y el valor p de significación estadística

Grupo 2 y 3

	Grupo 2	Grupo 3	F	p
Donante	0,0111	0,018	0,364	0,608
PC	0,0411	0,0618	1,026	0,335
RCN	0,0954	0,0984	0,004	0,951
RP-1h	1,6668	0,1669	14,892	0,003
EUT	0,0776	0,1377	2,020	0,198

Tabla 69: Prueba ANOVA para comparación de las medias de E-selectina entre los grupos 2 y 3, con la distribución F y el valor p de significación estadística

Al comparar los diferentes grupos entre sí, encontramos diferencias estadísticamente significativas en el momento de la reperfusión hepática.

4. ANÁLISIS COMPARATIVO DE LOS PARÁMETROS OBTENIDOS DE SUERO

4.1. ELISA: Factor de vonWillebrand (vWF)

Factor de von Willebrand:

Es una glicoproteína presente en el plasma sanguíneo y producida esencialmente por el endotelio vascular, los megacariocitos y el tejido conectivo subendotelial. El vWF es un marcador de daño endotelial, incrementándose en plasma cuando existe una lesión endotelial. En los mecanismos de isquemia-reperfusión hay una activación y lesión de las células endoteliales sinusoidales, lo que se traduce en un aumento en la expresión de moléculas de adhesión, entre las que se encuentra el factor de vonWillebrand.

Grupo 1:***Evolución general:***

En el grupo 1 existe un aumento progresivo del vWF en suero desde el momento de la reperfusión. Todos los animales tienen este incremento hasta el momento de su fallecimiento, en las primeras 33 horas.

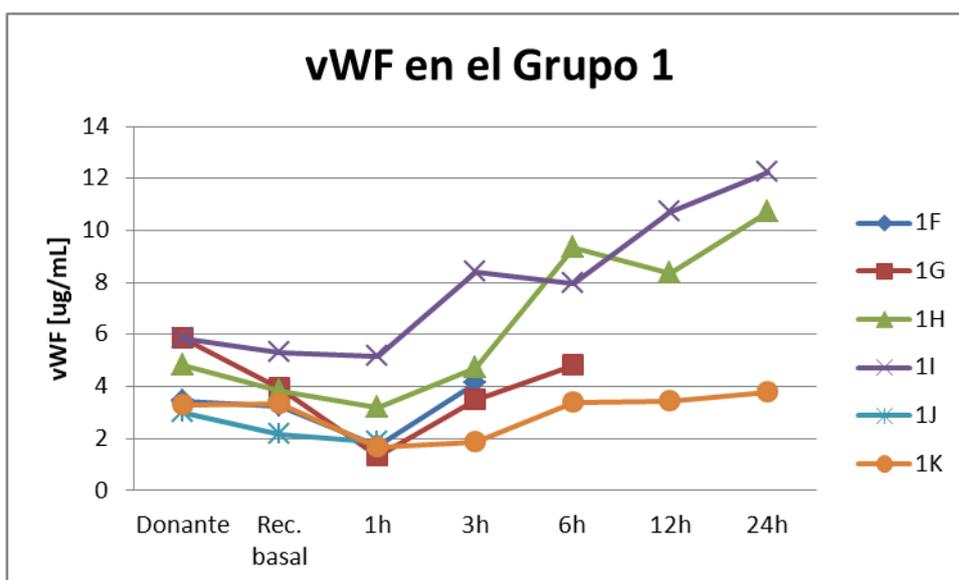


Gráfico 63: Curva de los valores de Factor de vonWillebrand en el grupo 1 por animal

Los tres animales que sobreviven 24 horas, los animales 1H, 1J y 1K, presentan en el momento de su fallecimiento cifras de vWF de 10,71; 12,23 y 3,80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente.

	Donante	Rec. basal	1h	3h	6h	12h	24h
1F	3,45	3,23	1,71	4,12			
1G	5,82	3,93	1,34	3,49	4,81		
1H	4,79	3,84	3,18	4,74	9,36	8,34	10,71
1I	5,86	5,28	5,15	8,38	7,95	10,73	12,23
1J	3,00	2,18	1,87				
1K	3,27	3,34	1,65	1,88	3,41	3,43	3,80
media	4,4	3,6	2,5	4,5	6,4	7,5	8,9
DE	1,3	1,0	1,5	2,4	2,7	3,7	4,5
EE	0,6	0,5	0,7	1,2	1,6	2,6	3,2

Tabla 70: Valores de Factor de vonWillebrand en suero mediante ELISA en el grupo 1

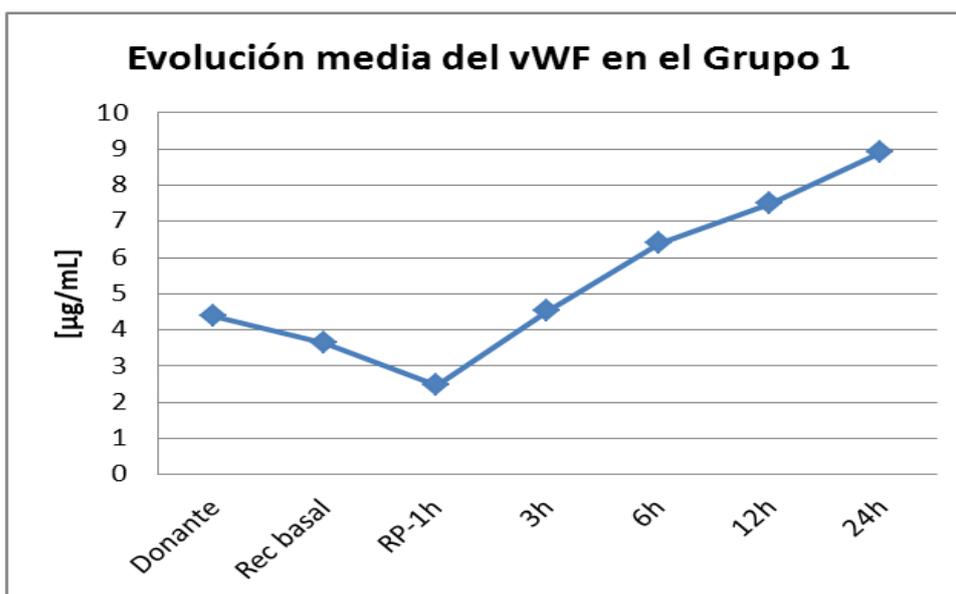


Gráfico 64: Valores medios de Factor de vonWillebrand en suero en el grupo 1

Grupo 2:***Evolución general:***

En el grupo 2 la evolución general de la concentración de vWF en suero es muy heterogénea. No sigue ningún patrón común, por lo que describiremos la evolución diferenciada por animal de manera individual.

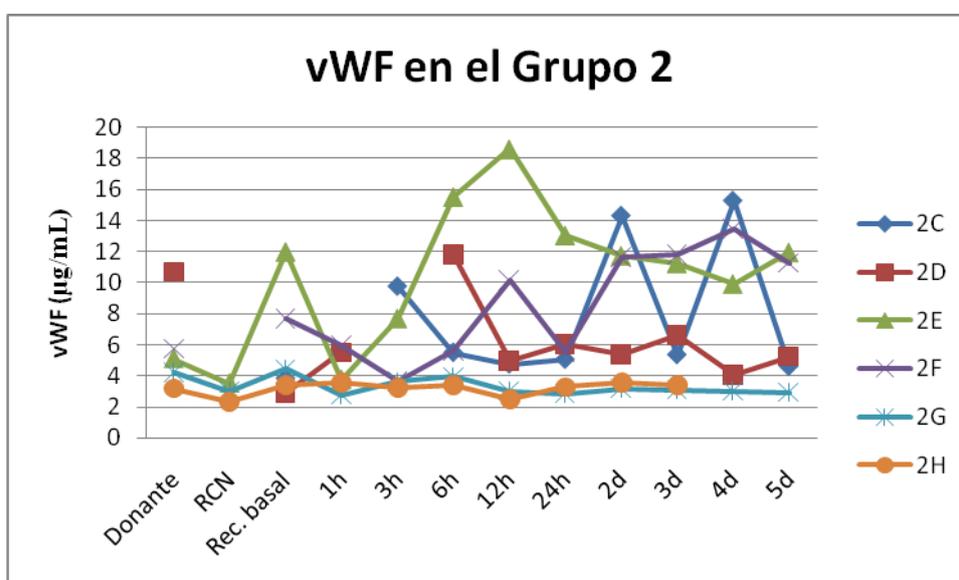


Gráfico 65: Curva de los valores de Factor de vonWillebrand en el grupo 2 por animal

Los animales 2G y 2H son los que mantienen unos valores más estables a lo largo de la evolución, sin apenas variaciones, permaneciendo en valores entre 2 y 4 µg/mL durante toda el seguimiento post-trasplante (hasta el 3º día en el caso del animal 2H, cuando fallece).

El animal 2E presenta un pico de 11,98 $\mu\text{g/mL}$ en la determinación basal en el receptor, para disminuir posteriormente tras la reperfusión, a 3,74 $\mu\text{g/mL}$, y presentar posteriormente una evolución ascendente. Realiza un pico de 18,62 $\mu\text{g/mL}$ a las 12 horas tras la reperfusión. Tras este pico, hay una disminución, hasta estabilizarse desde el 2º día en cifras que oscilan entre 10 y 12 $\mu\text{g/mL}$ hasta el 5º día.

El animal 2D presenta unos valores máximos de vWF en el donante basal y a las 6 horas tras la reperfusión, siendo aquí de 11,84 $\mu\text{g/mL}$. A continuación, el valor de vWF en suero en este animal disminuirá para mantenerse entre 4 y 6 $\mu\text{g/mL}$ hasta el 5º día de seguimiento.

El animal 2F presenta una disminución del valor de vWF tras la reperfusión hasta las 3 horas, siendo en ese momento de 3,66 $\mu\text{g/mL}$. Posteriormente presenta un aumento continuo, con un pico de 10,18 $\mu\text{g/mL}$ a las 12 horas. El valor de vWF disminuye a 5,53 a las 24 horas, para volver a tener una rápida evolución en ascenso al 2º día, y estabilizarse hasta el 5º día, donde presenta un valor de vWF de 11,27 $\mu\text{g/mL}$.

El animal 2C presenta unos valores de vWF en descenso hasta las 24 horas tras la reperfusión. A partir de este momento realiza el primero de los 2 picos que presenta en su evolución. Éstos son al 2º y al 4º día, con unos valores de 14,33 y 15,31 $\mu\text{g/mL}$. Llama la atención tanto el aumento brusco como su disminución brusca en estos dos picos, pasando a 5,35 y 4,59 $\mu\text{g/mL}$ al 3º y al 5º día respectivamente.

	Donante	RCN	Rec. basal	1h	3h	6h	12h	24h	2d	3d	4d	5d
2C	3,18		3,81		9,77	5,49	4,74	5,04	14,33	5,35	15,31	4,59
2D	10,72		2,92	5,53		11,84	4,98	6,09	5,42	6,65	4,11	5,27
2E	5,11	3,51	11,98	3,74	7,68	15,53	18,62	13,05	11,73	11,25	9,91	11,94
2F	5,77		7,73	6,01	3,66	5,62	10,18	5,53	11,63	11,83	13,47	11,27
2G	4,23	3,03	4,43	2,77	3,62	3,95	3,00	2,84	3,16	3,10	3,00	2,92
2H	3,16	2,29	3,39	3,52	3,21	3,36	2,48	3,25	3,54	3,37		
media	5,4	2,9	5,7	4,3	5,6	7,6	7,3	6,0	8,3	6,9	9,2	7,2
DE	2,8	0,6	3,5	1,4	3,0	4,9	6,2	3,7	4,8	3,8	5,5	4,1
EE	1,2	0,3	1,4	0,6	1,2	2,0	2,5	1,5	2,0	1,6	2,5	1,8

Tabla 71: Valores de Factor de vonWillebrand en suero mediante ELISA en el grupo 2

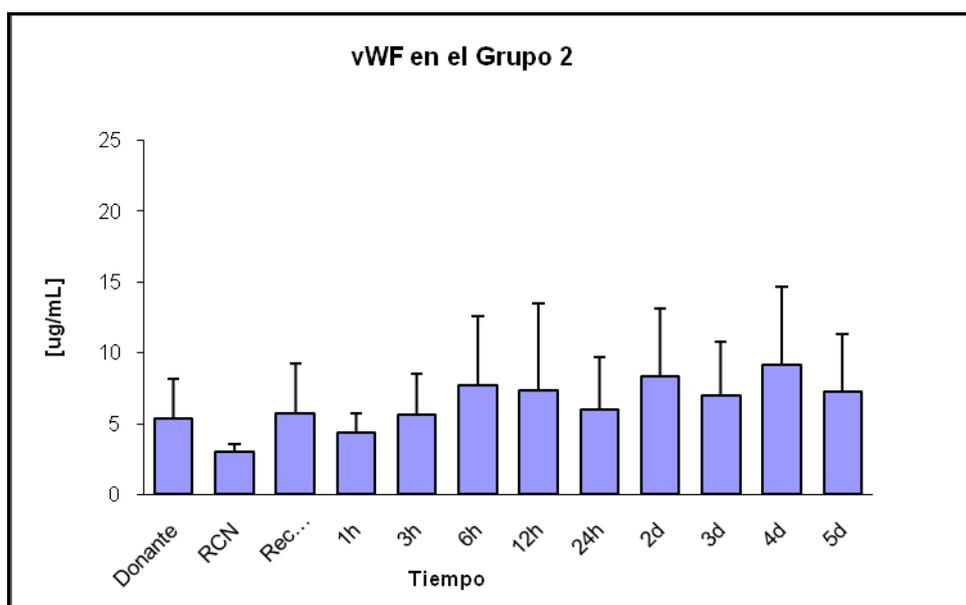


Gráfico 66: Valores medios de Factor de vonWillebrand en suero en el grupo 2

El gráfico de los valores medios nos permite observar entre qué cifras de vWF se encuentran los animales de este grupo, a pesar de la importante dispersión entre animales. Vemos que la mayoría del tiempo presentan cifras entre 5 y 10 $\mu\text{g/mL}$.

Grupo 3:***Evolución general:***

En el grupo 3, todos los animales excepto uno presentan una evolución muy homogénea durante los 5 días de seguimiento. Desde el momento del trasplante todos los animales, excepto el animal 3F, presentan cifras en suero de vWF entre 3 y 5 $\mu\text{g/mL}$, hasta el momento de la eutanasia al 5^o día..

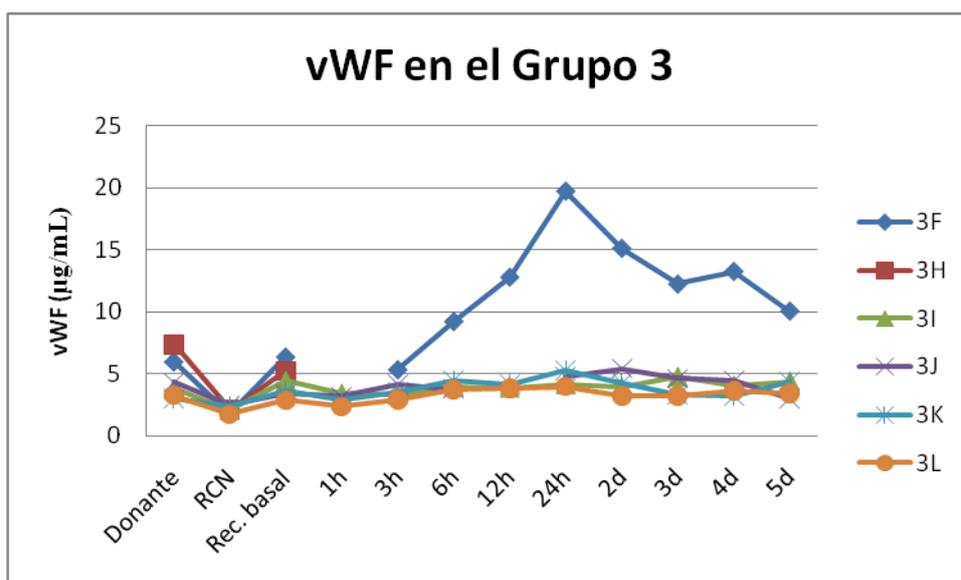


Gráfico 67: Curva de los valores de Factor de vonWillebrand en el grupo 3 por animal

El animal 3F presenta un aumento continuo del vWF tras la reperfusión, hasta realizar el pico máximo a las 24 horas. El pico es de 19,76 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Posteriormente irá disminuyendo, hasta llegar al 5º día a un valor de 10,06 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

	Donante	RCN	Rec. basal	1h	3h	6h	12h	24h	2d	3d	4d	5d
3F	5,94	1,73	6,34		5,31	9,22	12,81	19,76	15,13	12,25	13,27	10,06
3H	7,39	2,06	5,24									
3I	3,77	2,05	4,43	3,41	3,31	3,95	3,85	4,15	3,91	4,76	4,06	4,39
3J	4,33	2,46	3,37	3,18	4,15	3,76		4,78	5,42	4,63	4,45	3,00
3K	3,04	2,39	3,67	2,86	3,58	4,46	4,18	5,30	4,27	3,28	3,18	4,34
3L	3,24	1,72	2,86	2,33	2,91	3,73	3,85	3,98	3,22	3,21	3,64	3,42
media	4,6	2,1	4,3	2,9	3,9	5,0	6,2	7,6	6,4	5,6	5,7	5,0
DE	1,7	0,3	1,3	0,5	0,9	2,4	4,4	6,8	5,0	3,8	4,2	2,9
EE	0,7	0,1	0,5	0,2	0,4	1,0	1,8	2,8	2,0	1,5	1,7	1,2

Tabla 72: Valores de Factor de vonWillebrand en suero mediante ELISA en el grupo 3

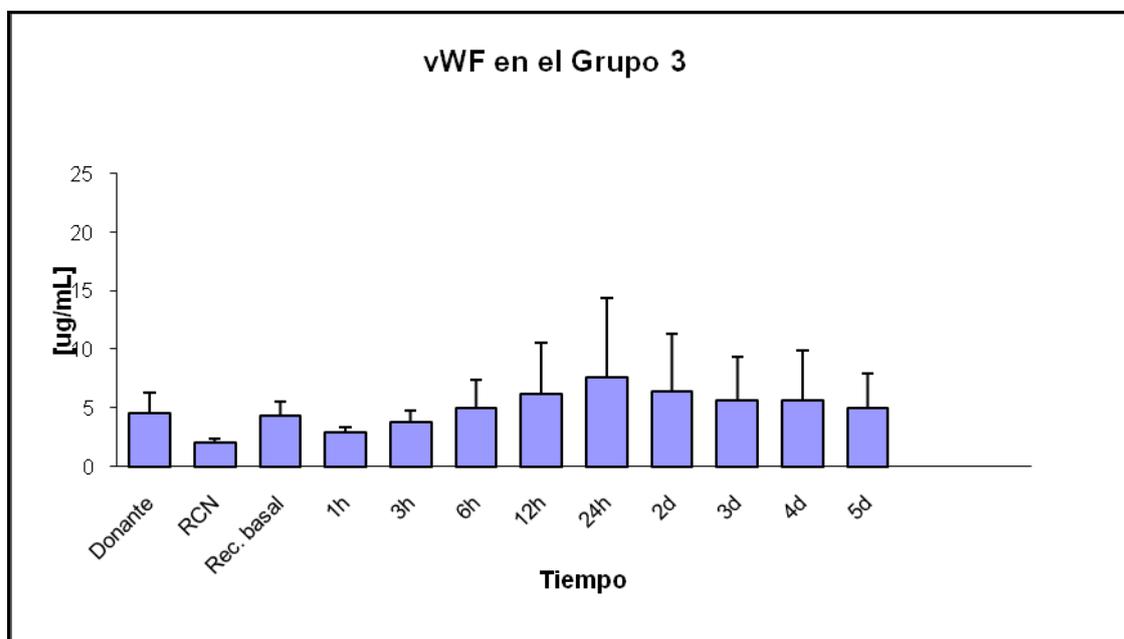


Gráfico 68: Valores medios de Factor de vonWillebrand en suero en el grupo 3

Comparación entre grupos:

El grupo 1 sigue una evolución media en ascenso hasta el fallecimiento de los animales de este grupo a las 24 horas. Para los grupos 2 y 3, el valor medio a partir de las 48 horas tras el trasplante es siempre superior en el grupo 2 respecto al grupo 3.

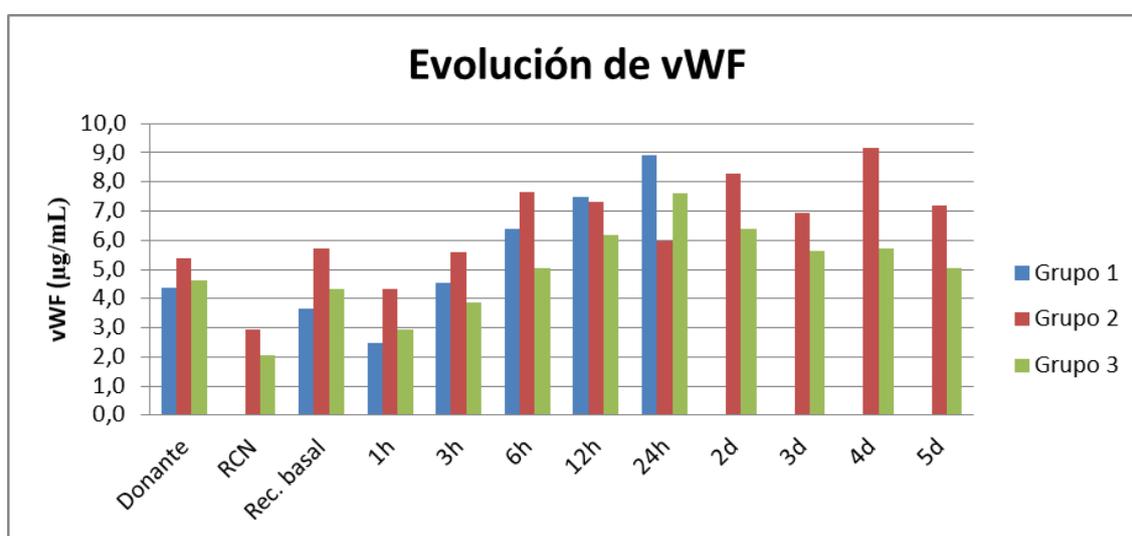


Gráfico 69: Evolución temporal del factor de vonWillebrand en los diferentes grupos.

		Donante	RCN	Rec. basal	1h	3h	6h	12h	24h	2d	3d	4d	5d
Grupo 1	media	4,4		3,7	2,5	4,5	6,4	7,5	8,9				
	DE	1,3		1,0	1,5	2,4	2,7	3,7	4,5				
Grupo 2	media	5,4	2,9	5,7	4,3	5,6	7,6	7,3	6,0	8,3	6,9	9,2	7,2
	DE	2,8	0,6	3,5	1,4	3,0	4,9	6,2	3,7	4,8	3,8	5,5	4,1
Grupo 3	media	4,6	2,1	4,3	2,9	3,9	5,0	6,2	7,6	6,4	5,6	5,7	5,0
	DE	1,7	0,3	1,3	0,5	0,9	2,4	4,4	6,8	5,0	3,8	4,2	2,9

Tabla 73: Valores de Factor de vonWillebrand mediante ELISA en todos los grupos. Valores medios y desviación estándar.

Comparación estadística entre grupos:

		Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Donante	1	4,3650	1,29863	,53016	3,0022	5,7278
	2	5,3617	2,82239	1,15224	2,3997	8,3236
	3	4,6183	1,71013	,69816	2,8237	6,4130
RCN	1
	2	2,9433	,61460	,35484	1,4166	4,4701
	3	2,0683	,31403	,12820	1,7388	2,3979
Rec Basal	1	3,6333	1,02011	,41646	2,5628	4,7039
	2	5,7100	3,51591	1,43537	2,0203	9,3997
	3	4,3183	1,29580	,52901	2,9585	5,6782
1 h	1	2,4833	1,45412	,59364	,9573	4,0093
	2	4,3140	1,38735	,62044	2,5914	6,0366
	3	2,9450	,46794	,23397	2,2004	3,6896
3 h	1	4,5220	2,40512	1,07560	1,5356	7,5084
	2	5,5880	2,96271	1,32497	1,9093	9,2667
	3	3,8520	,93135	,41651	2,6956	5,0084
6 h	1	6,3825	2,74658	1,37329	2,0121	10,7529
	2	7,6317	4,90977	2,00440	2,4792	12,7842
	3	5,0240	2,36380	1,05712	2,0890	7,9590
12 h	1	7,5000	3,72179	2,14877	-1,7454	16,7454
	2	7,3333	6,16585	2,51720	,8627	13,8040
	3	6,1725	4,42773	2,21387	-,8730	13,2180
24 h	1	8,9133	4,49302	2,59405	-2,2479	20,0746
	2	5,9667	3,69850	1,50991	2,0853	9,8480
	3	7,5940	6,82119	3,05053	-,8756	16,0636
2 días	1
	2	8,3017	4,82879	1,97135	3,2342	13,3692
	3	6,3900	4,95031	2,21385	,2434	12,5366
3 días	1
	2	6,9250	3,81024	1,55552	2,9264	10,9236
	3	5,6260	3,77360	1,68760	,9405	10,3115
4 días	1
	2	9,1600	5,48656	2,45366	2,3475	15,9725
	3	5,7200	4,24703	1,89933	,4466	10,9934
5 días	1
	2	7,1980	4,11971	1,84239	2,0827	12,3133
	3	5,0420	2,86788	1,28255	1,4811	8,6029

Tabla 74: Estudio descriptivo estadístico de vWF en suero en todos los grupos.

En la tabla de la página anterior mostramos de forma resumida los valores medios del factor de vonWillebrand en todos los grupos, así como su desviación estándar, el error típico en cada momento, y el intervalo de confianza para la media al 95%.

Grupo 1 y 2

	Grupo 1	Grupo 2	F	p
Donante	4,4	5,4	,617	,450
Rec basal	3,6	5,7	1,931	,195
RP-1h	2,5	4,3	4,502	,063
3h	4,5	5,6	,390	,550
6h	6,4	7,6	,209	,660
12h	7,5	7,3	,002	,967
24h	8,9	6,0	1,118	,326

Tabla 75: Prueba ANOVA para comparación de las medias de factor de vonWillebrand entre los grupos 1 y 2, con la distribución F y el valor p de significación estadística

Grupo 1 y 3

	Grupo 1	Grupo 3	F	p
Donante	4,4	4,6	,084	,778
Rec basal	3,6	4,3	1,035	,333
RP-1h	2,5	2,9	,364	,563
3h	4,5	3,9	,337	,577
6h	6,4	5,0	,638	,451
12h	7,5	6,2	,175	,693
24h	8,9	7,6	,086	,779

Tabla 76: Prueba ANOVA para comparación de las medias de factor de vonWillebrand entre los grupos 1 y 3, con la distribución F y el valor p de significación estadística

Al comparar el grupo 1 con los otros dos grupos no encontramos ninguna diferencia estadísticamente significativa, a pesar de las diferencias numéricas de las medias.

Grupo 2 y 3

	Grupo 2	Grupo 3	F	p
Donante	5,4	4,6	,304	,593
RCN	2,9	2,1	8,585	,022
Rec basal	5,7	4,3	,828	,384
RP-1h	4,3	2,9	3,489	,104
3h	5,6	3,9	1,562	,247
6h	7,6	5,0	1,168	,308
12h	7,3	6,2	,104	,755
24h	6,0	7,6	,255	,625
2 días	8,3	6,4	,418	,534
3 días	6,9	5,6	,320	,586
4 días	9,2	5,7	1,229	,300
5 días	7,2	5,0	,922	,365

Tabla 77: Prueba ANOVA para comparación de las medias de factor de vonWillebrand entre los grupos 2 y 3, con la distribución F y el valor p de significación estadística

Al comparar los grupos 2 y 3, únicamente encontramos diferencias estadísticamente significativas tras el periodo de RCN, con una $p=0,022$. En el resto de la evolución, aunque las diferencias numéricas entre las medias son bastante evidentes, sobre todo al 4º y 5º días, no existe significación estadística.

4.2. TBars: Thiobarbiturate reactive substances

Son productos finales de bajo peso molecular, cuyo principal componente es el malondialdehído (MDA), que se forma durante la descomposición de los productos de la peroxidación lipídica. La concentración en plasma o en orina de los Tbars es utilizada como un índice de la peroxidación lipídica y reflejo del estrés oxidativo. La peroxidación lipídica hace referencia a la degradación oxidativa de los lípidos. Éste es el proceso por el cual los radicales libres se adueñan de electrones procedentes de los lípidos de las membranas celulares, llevando al daño celular y a la necrosis celular. Los productos iniciales en las células vivas son los radicales libres de oxígeno, generados durante la isquemia. Tras la reperfusión, el oxígeno induce la peroxidación lipídica. La medición de los Tbars es un reflejo del nivel de peroxidación de la membrana plasmática, lo que equivale al estrés oxidativo generado durante la isquemia.

Grupo 1:***Evolución general:***

En el grupo 1 observamos una curva similar en todos los animales, con un aumento progresivo del valor de Tbars en todos ellos hasta el fallecimiento en las primeras 33 horas.

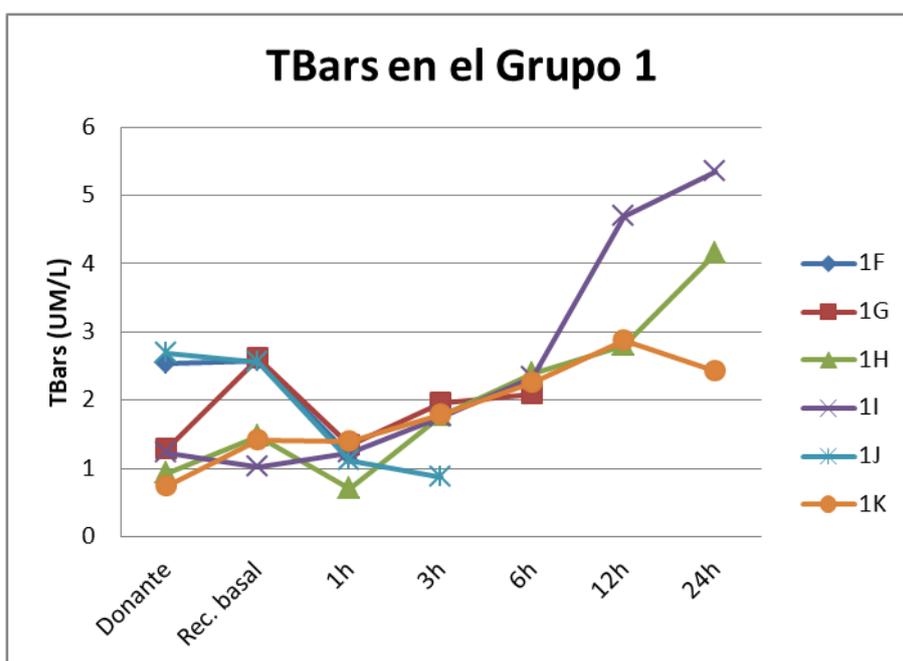


Gráfico 70: Curva de los valores de TBars en el grupo 1 por animal

	Donante	Rec. basal	1h	3h	6h	12h	24h
1F	2,54	2,58	1,20				
1G	1,28	2,62	1,34	1,96	2,09		
1H	0,92	1,48	0,71	1,78	2,38	2,80	4,15
1I	1,23	1,02	1,22	1,75	2,34	4,69	5,35
1J	2,69	2,56	1,12	0,88			
1K	0,75	1,42	1,39	1,79	2,25	2,87	2,43
media	1,569	1,947	1,164	1,632	2,265	3,453	3,977
DE	0,836	0,719	0,243	0,428	0,129	1,072	1,468

Tabla 78: Valores de TBars en suero en el grupo 1



Gráfico 71: Valores medios de TBars en suero en el grupo 1

En el gráfico de valores medios vemos claramente esta evolución en ascenso continuo previo al fallecimiento de los animales, siendo de 3,977 UM/L a las 24 horas.

Grupo 2:***Evolución general:***

En el grupo 2, los valores de TBars no siguen un patrón común en la evolución de cada experimento.

Así, los animales 2E y 2F presentan un aumento tras la reperusión hasta presentar un pico a las 24 horas, de 4,20 y 3,21 UM/L respectivamente. Posteriormente los Tbars irán en descenso continuo, para estabilizarse al 3° día, hasta el momento de la eutanasia al 5° día, donde presentan unos valores similares al resto de animales del grupo, siendo de 1,98 y de 2,04 UM/L respectivamente.

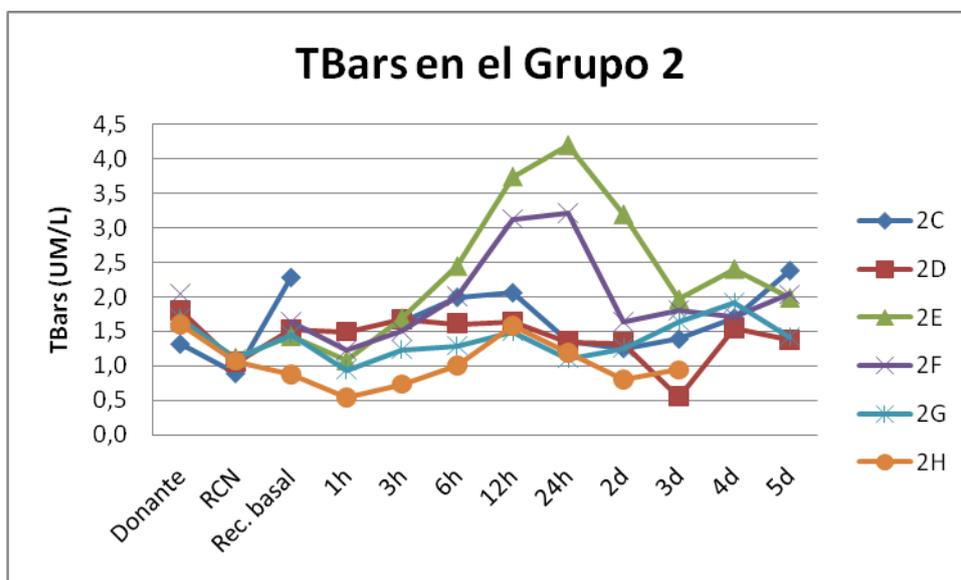


Gráfico 72: Curva de los valores de TBars en el grupo 2 por animal

El resto de los animales del grupo que llegan al 5° día no sufren grandes variaciones en los valores de TBars, manteniéndose durante casi toda la evolución con cifras por debajo de 2 UM/L.

Llama la atención que el animal 2H, que es el único que fallece en este grupo se mantiene durante toda la evolución con las cifras más bajas de TBars.

	Donante	RCN	Rec. basal	1h	3h	6h	12h	24h	2d	3d	4d	5d
2C	1,32	0,90	2,27		1,63	1,99	2,05	1,36	1,25	1,39	1,69	2,37
2D	1,80	1,05	1,53	1,49	1,67	1,61	1,64	1,35	1,33	0,55	1,54	1,38
2E	1,66	1,11	1,42	1,07	1,69	2,44	3,74	4,20	3,19	1,96	2,40	1,98
2F	2,04		1,64	1,23	1,51	2,00	3,12	3,21	1,64	1,80	1,71	2,04
2G	1,88	1,12	1,95	0,63	1,24	1,99	2,95	2,29	1,36	1,76	1,59	2,22
2H	1,44	0,77	2,10	1,04	1,50	1,26	1,35	1,23	1,40	1,40		
media	1,690	0,990	1,818	1,092	1,540	1,882	2,475	2,273	1,695	1,477	1,786	1,998
DE	0,272	0,151	0,339	0,314	0,167	0,402	0,937	1,214	0,744	0,508	0,350	0,378

Tabla 79: Valores de TBars en suero en el grupo 2

En el gráfico de valores medios del grupo vemos el pico que señalamos a las 12 horas tras la reperusión, con una disminución posterior. Se produce después un aumento en los 2 últimos días de seguimiento. El pico medio de las 12 horas es de 2,475 UM/L y el valor medio de TBars al 5° día de seguimiento es de 1,998 UM/L.

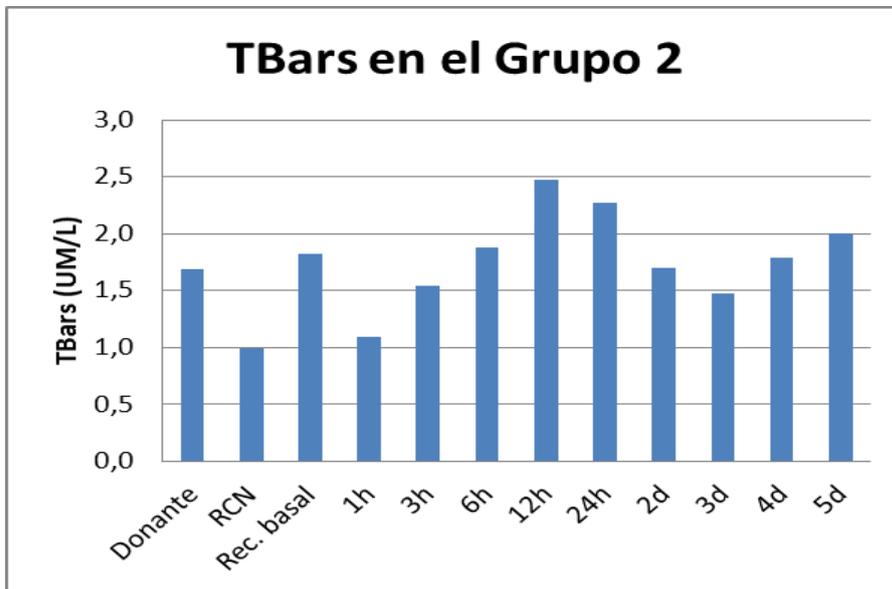


Gráfico 73: Valores medios de TBars en suero en el grupo 2

Grupo 3:***Evolución general:***

En el grupo 3, podemos observar que la RCN provoca una disminución de Tbars en suero en todos los animales. La evolución posterior en el trasplante presenta variaciones entre animales, pero manteniéndose en un rango durante su evolución post-operatoria con ciertas variaciones.

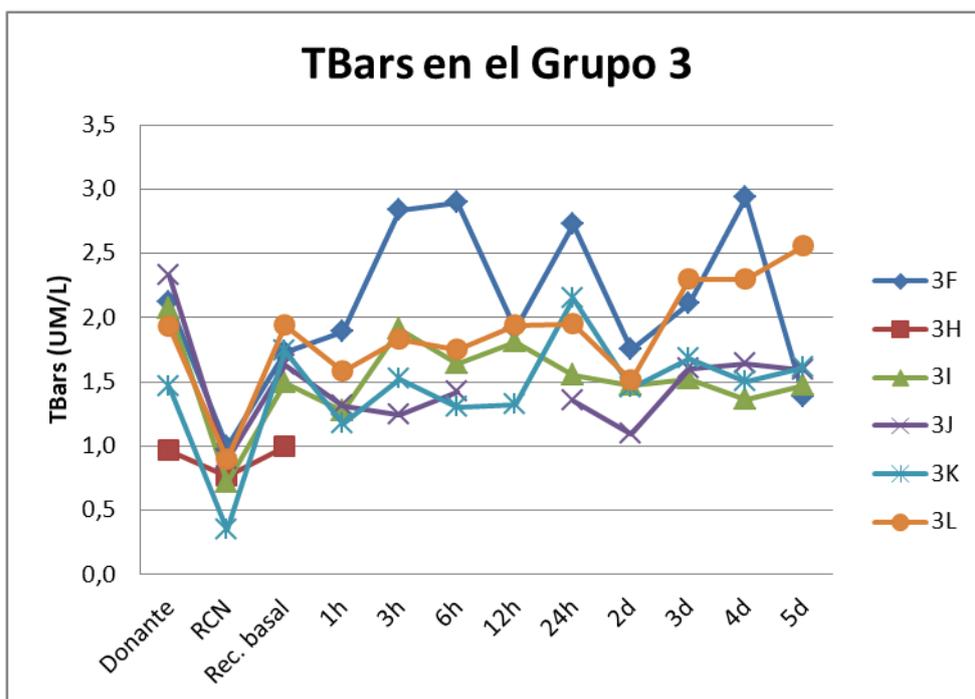


Gráfico 74: Curva de los valores de TBars en el grupo 3 por animal

Tras el implante del injerto hepático en el receptor se produce un aumento de los TBars en los animales, que realizan una serie de picos durante su evolución, de forma heterogénea. Al final de los 5 días, los TBars están comprendidos en un rango entre 1,38 y 2,56 UM/L.

	Donante	RCN	Rec. basal	1h	3h	6h	12h	24h	2d	3d	4d	5d
3F	2,11	0,99	1,73	1,89	2,83	2,89	1,91	2,73	1,75	2,10	2,94	1,38
3H	0,96	0,76	0,99									
3I	2,07	0,72	1,49	1,27	1,91	1,64	1,81	1,55	1,47	1,52	1,36	1,47
3J	2,33	0,89	1,63	1,31	1,24	1,42		1,35	1,09	1,60	1,64	1,59
3K	1,46	0,35	1,74	1,17	1,52	1,30	1,32	2,15	1,45	1,68	1,50	1,61
3L	1,93	0,89	1,94	1,58	1,83	1,75	1,94	1,95	1,51	2,30	2,30	2,56
media	1,810	0,767	1,587	1,444	1,866	1,800	1,745	1,946	1,454	1,840	1,948	1,722
DE	0,507	0,226	0,327	0,292	0,601	0,635	0,289	0,540	0,236	0,341	0,661	0,478

Tabla 80: Valores de TBars en suero en el grupo 3

En el gráfico de los valores medios vemos que los valores de TBars se mantienen estables, por debajo de 1,5 UM/L hasta las 3 horas tras la reperusión del injerto. En la evolución posterior los valores medios se mantienen estables en un rango entre 1,5 y 2 UM/L, sin presentar ningún pico.

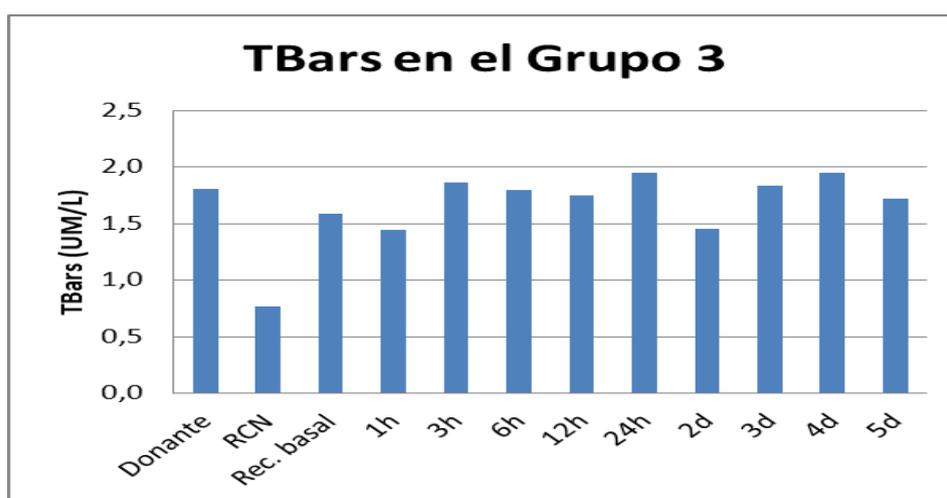


Gráfico 75: Valores medios de TBars en suero en el grupo 3

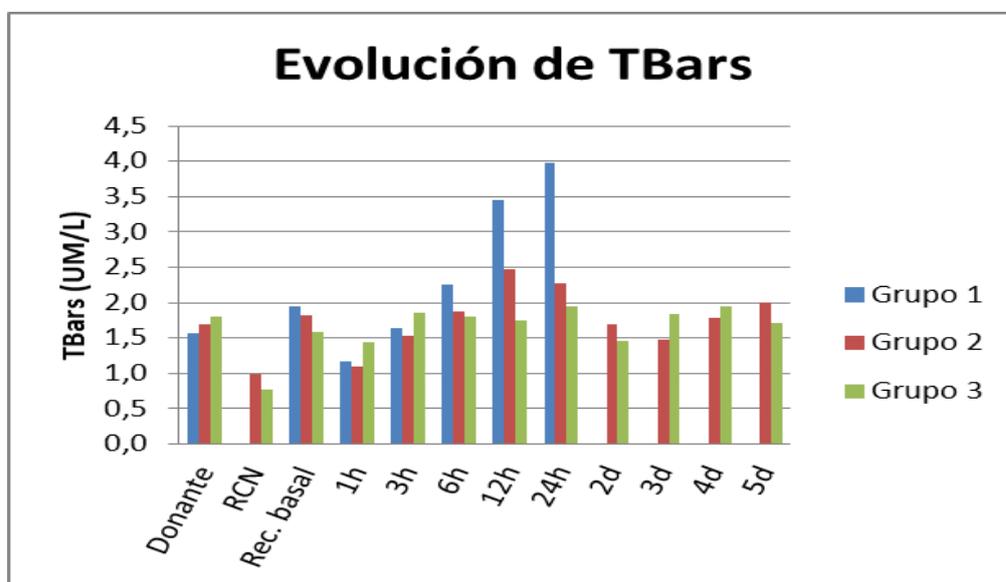
Comparación entre grupos:

Gráfico 76: Evolución temporal de TBars en suero en los diferentes grupos.

Al comparar los diferentes grupos vemos que no existen muchas diferencias entre los valores medios de los grupos 2 y 3. En el grupo control (1), el aumento es continuo hasta el fallecimiento de todos sus animales en las primeras 33 horas. El grupo 2 realiza un pico a las 12-24 horas para disminuir posteriormente. A partir del 2º día post-trasplante los grupos 2 y 3 mantienen cifras similares, hasta el momento de la eutanasia, en el que el valor de TBars en el grupo 2 es levemente superior al del grupo 3 (1,998 versus 1,722).

		Donante	RCN	Rec. basal	1h	3h	6h	12h	24h	2d	3d	4d	5d
Grupo 1	media	1,569		1,947	1,164	1,632	2,265	3,453	3,977				
	DE	0,836		0,719	0,243	0,428	0,129	1,072	1,468				
Grupo 2	media	1,690	0,990	1,818	1,092	1,540	1,882	2,475	2,273	1,695	1,477	1,786	1,998
	DE	0,272	0,151	0,339	0,314	0,167	0,402	0,937	1,214	0,744	0,508	0,350	0,378
Grupo 3	media	1,810	0,767	1,587	1,444	1,866	1,800	1,745	1,946	1,454	1,840	1,948	1,722
	DE	0,507	0,226	0,327	0,292	0,601	0,635	0,289	0,540	0,236	0,341	0,661	0,478

Tabla 81: Valores de TBars en suero en todos los grupos. Valores medios y desviación estándar.

Comparación estadística entre grupos:

		Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Donante	1	1,5683	,83545	,34107	,6916	2,4451
	2	1,6900	,27240	,11121	1,4041	1,9759
	3	1,8100	,50742	,20716	1,2775	2,3425
RCN	1
	2	,9900	,15116	,06760	,8023	1,1777
	3	,7667	,22633	,09240	,5291	1,0042
Rec Basal	1	1,9467	,71896	,29352	1,1922	2,7012
	2	1,8183	,33891	,13836	1,4627	2,1740
	3	1,5867	,32745	,13368	1,2430	1,9303
1 h	1	1,1633	,24271	,09908	,9086	1,4180
	2	1,0920	,31388	,14037	,7023	1,4817
	3	1,4440	,29186	,13052	1,0816	1,8064
3 h	1	1,6320	,42833	,19156	1,1002	2,1638
	2	1,5400	,16733	,06831	1,3644	1,7156
	3	1,8660	,60086	,26871	1,1199	2,6121
6 h	1	2,2650	,12871	,06436	2,0602	2,4698
	2	1,8817	,40236	,16426	1,4594	2,3039
	3	1,8000	,63455	,28378	1,0121	2,5879
12 h	1	3,4533	1,07156	,61866	,7914	6,1152
	2	2,4750	,93652	,38233	1,4922	3,4578
	3	1,7450	,28873	,14437	1,2856	2,2044
24 h	1	3,9767	1,46770	,84738	,3307	7,6226
	2	2,2733	1,21367	,49548	,9997	3,5470
	3	1,9460	,54044	,24169	1,2749	2,6171
2 días	1
	2	1,6950	,74412	,30378	,9141	2,4759
	3	1,4540	,23639	,10572	1,1605	1,7475
3 días	1
	2	1,4767	,50804	,20741	,9435	2,0098
	3	1,8400	,34088	,15245	1,4167	2,2633
4 días	1
	2	1,7860	,35033	,15667	1,3510	2,2210
	3	1,9480	,66130	,29574	1,1269	2,7691
5 días	1
	2	1,9980	,37805	,16907	1,5286	2,4674
	3	1,7220	,47767	,21362	1,1289	2,3151

Tabla 82: Estudio descriptivo estadístico de TBars en suero en todos los grupos.

Grupo 1 y 2

	Grupo 1	Grupo 2	F	p
Donante	1,569	1,690	,115	,742
Rec. Basal	1,947	1,818	,156	,701
1 h	1,164	1,092	,181	,680
3 h	1,632	1,540	,238	,638
6 h	2,265	1,882	3,284	,108
12 h	3,453	2,475	2,005	,200
24 h	3,977	2,273	3,480	,104

Tabla 83: Prueba ANOVA para comparación de las medias de TBars entre los grupos 1 y 2, con la distribución F y el valor p de significación estadística

Entre el grupo 1 y el grupo 2 no encontramos diferencias estadísticamente significativas. Tan sólo diferencias numéricas entre sus valores medios en todas las determinaciones realizadas tras el implante.

Grupo 1 y 3

	Grupo 1	Grupo 3	F	p
Donante	1,569	1,810	,367	,558
Rec. Basal	1,947	1,587	1,246	,290
1 h	1,164	1,444	3,044	,115
3 h	1,632	1,866	,503	,498
6 h	2,265	1,800	2,026	,198
12 h	3,453	1,745	9,823	,026
24 h	3,977	1,946	8,471	,027

Tabla 84: Prueba ANOVA para comparación de las medias de TBars entre los grupos 1 y 3, con la distribución F y el valor p de significación estadística

Entre el grupo 1 y el grupo 3 sí que encontramos diferencias estadísticamente significativas, a las 12 y a las 24 horas tras el implante. En estos dos periodos, la p es de 0,026 y 0,027 respectivamente.

Grupo 2 y 3

	Grupo 2	Grupo 3	F	p
Donante	1,690	1,810	,260	,621
RCN	0,990	0,767	3,523	,093
Rec. Basal	1,818	1,587	1,450	,256
1 h	1,092	1,444	3,372	,104
3 h	1,540	1,866	1,647	,231
6 h	1,882	1,800	,068	,801
12 h	2,475	1,745	2,207	,176
24 h	2,273	1,946	,308	,592
2 días	1,695	1,454	,476	,507
3 días	1,477	1,840	1,846	,207
4 días	1,786	1,948	,234	,641
5 días	1,998	1,722	1,026	,341

Tabla 85: Prueba ANOVA para comparación de las medias de TBars entre los grupos 2 y 3, con la distribución F y el valor p de significación estadística

Al comparar los grupos 2 y 3 no encontramos diferencias estadísticamente significativas. Aunque sí que observamos diferencias en las medias numéricas, sobre todo a las 12 horas tras el implante, debido al pico que observamos en el grupo 2, que no existe en el grupo 3.

4.3. Quimioluminiscencia: Sales biliares

Las sales biliares están producidas en el hígado por la degradación oxidativa del colesterol. La bilis porcina contiene principalmente ácido hyocólico, hyodesoxicólico y quemodesoxicólico. Se ha encontrado que los ácidos biliares son un parámetro más sensible y reflejan de manera más temprana la función hepática incipiente del injerto hepático que los parámetros convencionales de función hepática

Grupo 1:***Evolución general:***

En el grupo 1 se produce un incremento continuo en la determinación de sales biliares. Tan sólo el animal 1K presenta una disminución en la última determinación, a las 24 horas, antes de su fallecimiento, con un valor de 88,4 uM. Los otros dos animales que llegan a las 24 horas tras el implante (1H y 1I) presentan cifras de sales biliares de 583,8 y de 488,3 uM respectivamente.

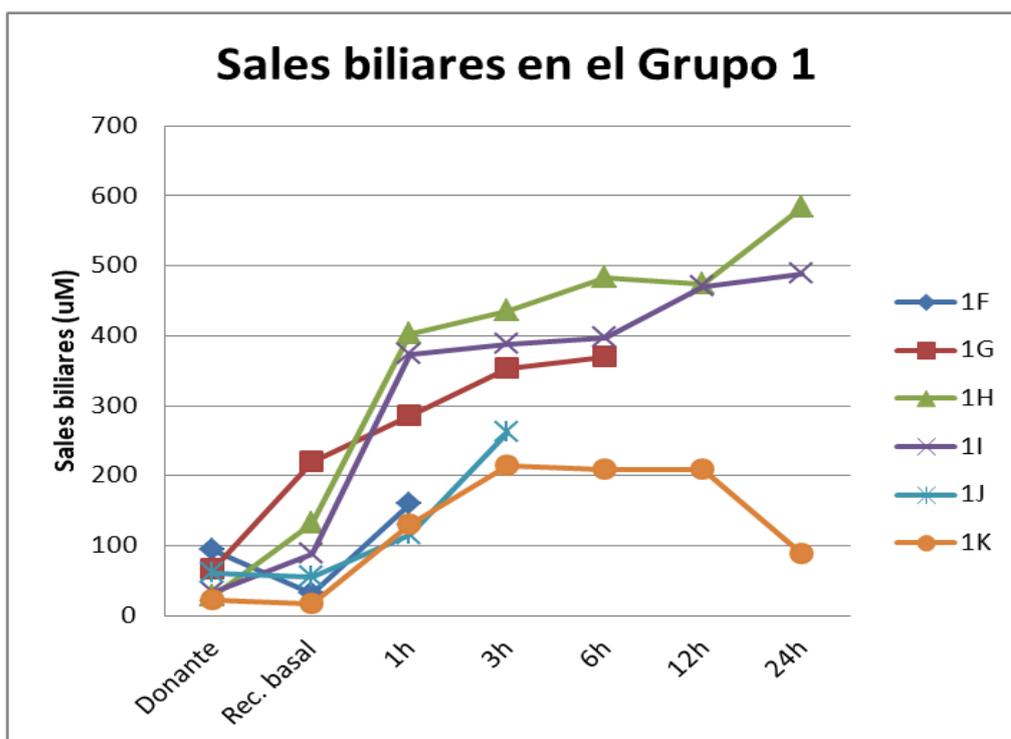


Gráfico 77: Curva de los valores de Sales biliares en el grupo 1 por animal

	Donante	Rec. basal	1h	3h	6h	12h	24h
1F	94,3	30,6	158,4				
1G	66,2	220,1	286,2	353,5	368,7		
1H	27,9	132,4	402,8	435,8	482,6	474,1	583,8
1I	33,5	87,5	373,4	387,9	397,7	469,9	488,3
1J	59,7	55,8	115,0	261,2			
1K	21,6	17,5	129,8	213,6	209	208,6	88,4
media	50,52	90,65	244,26	330,41	364,49	384,21	386,83
DE	27,88	75,75	127,09	91,36	114,39	152,10	262,82

Tabla 86: Valores de Sales biliarres en suero en el grupo 1

En el gráfico de los valores medios vemos este incremento continuo de las cifras de sales biliarres en suero en el grupo 1. Esta cifra llega a 386,83 uM de media a las 24 horas tras la reperfusion.



Gráfico 78: Valores medios de Sales biliarres en suero en el grupo 1

Grupo 2:***Evolución general:***

En el grupo 2 volvemos a observar una evolución poco homogénea para los diferentes animales que lo componen.

Todos los animales presentan un aumento de los valores de sales biliares tras la recirculación normotérmica, con valores entre 100 y 170 uM aproximadamente.

Tras la reperusión del injerto, los animales 2E y 2F presentan un pico de forma rápida, que se inicia a la hora, para mantenerse durante 24 horas y empezar a disminuir al 2º día de seguimiento. Al 3º día de seguimiento, para el animal 2E, el valor de sales biliares es normal: 36,8 uM; estando aún algo elevado en el animal 2F (129,7 uM). Este animal, 2F, presentará un nuevo aumento en la determinación de sales biliares en el momento de la eutanasia, siendo aquí de 212,1 uM.

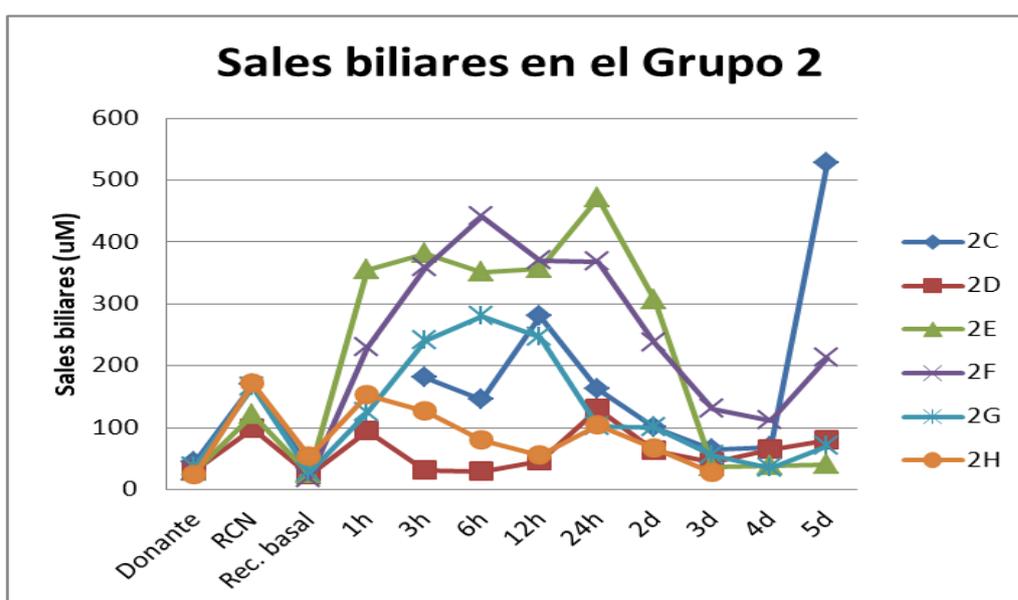


Gráfico 79: Curva de los valores de Sales biliares en el grupo 2 por animal

El animal 2D apenas presenta variaciones importante de las sales biliarres en suero durante su evolución. Presenta un pico a las 24 horas de 130,1 uM para disminuir posteriormente. Los últimos días presenta una tendencia suave al incremento, para alcanzar un valor de 80,5 uM en el 5° día.

El animal 2C presenta un pico tardío a las 12 horas, con un valor de 280,2 uM. La evolución posterior es una disminución continua hasta el 4° día con un valor de 68,8 uM. En el momento de la eutanasia presenta un aumento muy brusco en las sales biliarres, con una cifra de 527,2 uM.

	Donante	RCN	Rec. basal	1h	3h	6h	12h	24h	2d	3d	4d	5d
2C	43,7	170,3	35,6		181,2	145,5	280,2	163,0	100,9	65,3	68,8	527,2
2D	31,2	98,4	23,2	94,0	31,0	28,8	46,0	130,1	62,4	44,8	65,7	80,5
2E	29,1	121,6	26,3	355,5	381,9	351,7	356,5	471,3	306,0	36,8	38,6	39,9
2F	29,3		17,1	229,5	358,9	441,7	369,7	368,1	237,4	129,7	112,4	212,1
2G	37,1	166,5	28,2	123,9	240,9	281,0	247,0	101,6	100,7	56,0	35,0	69,9
2H	24	172,4	54,1	152,8	126,8	79,3	54,9	104,9	67,3	27,3		
media	32,40	145,84	30,75	191,13	220,13	221,33	225,71	223,16	145,78	59,98	64,12	185,91
DE	6,97	33,78	12,94	104,77	135,54	162,56	143,32	157,24	101,20	36,71	31,07	201,90

Tabla 87: Valores de Sales biliarres en suero en el grupo 2

En el gráfico de la siguiente página observamos la evolución de los valores medios de sales biliarres en el grupo 2. Observamos este pico que se produce tras el periodo de RCN, con un valor medio de 145,84 ($\pm 33,78$). El segundo pico se inicia justo después de la reperusión, y se mantiene durante 24 horas, donde presenta un valor medio de 223,16 ($\pm 157,24$). A partir del 2° día disminuyen los valores de las sales

biliares en suero hasta el 4º día. En el momento de la eutanasia se produce de nuevo otro pico de sales biliares, con un valor medio de 185,91 ($\pm 201,90$).

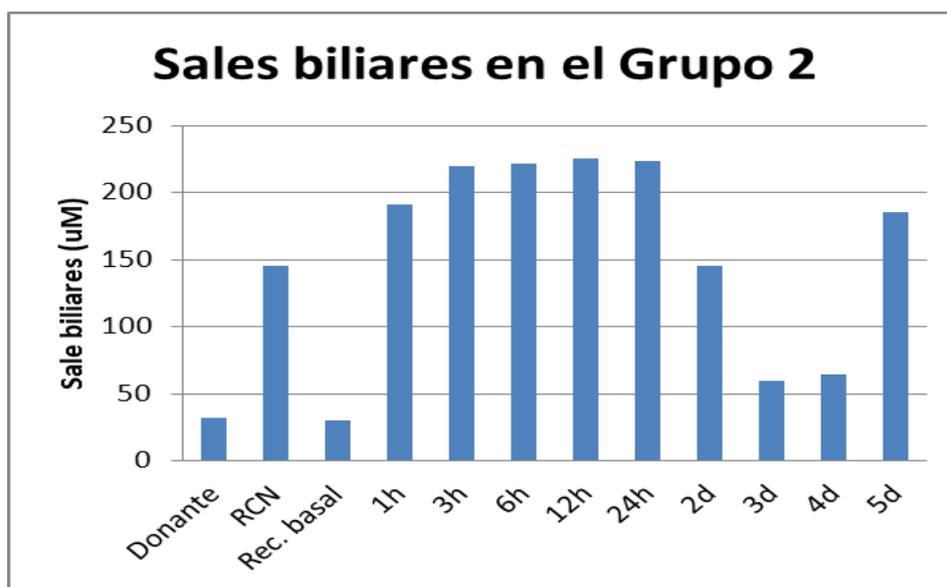


Gráfico 80: Valores medios de Sales biliares en suero en el grupo 2

Grupo 3:***Evolución general:***

Al observar las curvas de los diferentes animales de este grupo no podemos concluir sobre una evolución general de conjunto. Parece que en general no hay gran variación al observar los animales 3I, 3J y 3K, que no presentan ningún pico, y con unos valores que oscilan entre 0 y 100 μM , para estabilizarse en 50 μM a los 5 días de seguimiento.

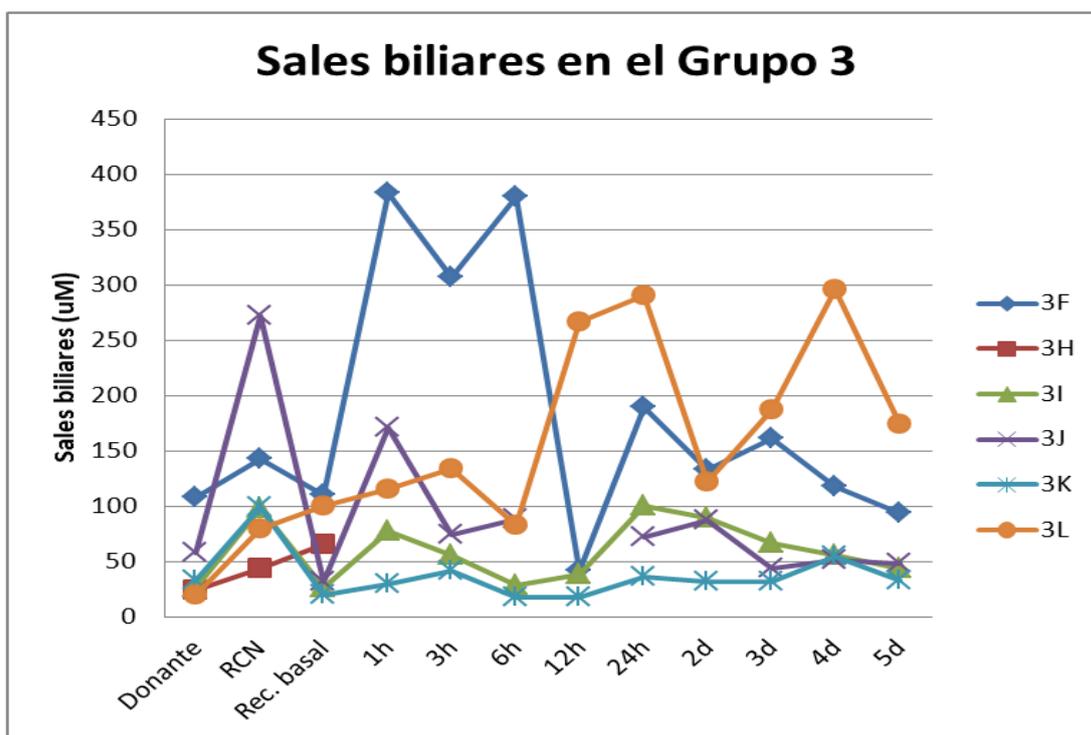


Gráfico 81: Curva de los valores de Sales biliares en el grupo 3 por animal

Sin embargo, existen 2 animales que alteran este patrón de grupo:

El animal 3F presenta su pico máximo justo después de la reperfusión del injerto hepático, con un valor de 383,1 uM. A pesar de disminuir levemente a las 3 horas de la reperfusión (307,2 uM), podemos decir que el pico se mantiene hasta las 6 horas después de la reperfusión, con un valor de 379,1 uM. A las 12 horas se produce una caída brusca del valor de las sales biliares en suero, con una cifra de 41,3 uM. A las 24 horas, vuelven a aumentar las sales biliares en suero, a 189,5 uM. A partir de este momento la tendencia es hacia la disminución hasta el momento de la eutanasia al 5° día, con un valor de sales biliares en suero de 94,2 uM.

El animal 3L presenta una evolución muy diferente. De hecho, hasta las 6 horas post-reperfusión, el valor de sales biliares en suero no presenta ninguna variación importante, con cifras en torno a 100 uM. El pico en este animal se produce a las 12-24 horas tras el implante, con un valor de 290,1 uM. Tras disminuir bruscamente al 2° día su valor de sales biliares a 121,9 uM, vuelve a incrementarse hasta realizar un 2° pico al 4° día de 295,7 uM y disminuir finalmente en el momento de la eutanasia al 5° día hasta 174,5 uM.

	Donante	RCN	Rec. basal	1h	3h	6h	12h	24h	2d	3d	4d	5d
3F	107,5	143,0	110,4	383,1	307,2	379,1	41,3	189,5	133,0	161,0	118,1	94,2
3H	24,5	43,7	65,2									
3I	26,9	98,4	26,7	77,3	56,3	29,1	38,4	100,2	89,5	66,7	56,1	43,4
3J	58,1	272,1	31,9	171,5	74,5	87,9		71,9	87,0	43,9	51,7	48,2
3K	33,1	99,4	19,6	29,9	41,9	17,3	18,0	36,0	31,5	32,2	55,1	33,1
3L	19,9	80,0	100,3	116,1	133,7	83,5	266,7	290,1	121,9	187,3	295,7	174,5
media	45,0	122,8	59,0	155,6	122,7	119,4	91,1	137,5	92,6	98,2	115,3	78,7
DE	33,5	79,9	39,3	137,4	108,9	148,6	117,5	102,4	39,6	71,0	104,6	58,5

Tabla 89: Valores de Sales biliares en suero en el grupo 3

El gráfico de barras de la evolución media de las sales biliares en el grupo 3 nos muestra una evolución con un pico medio a la hora de la reperusión y a las 24 horas. Resulta interesante observar cómo estos “picos” no alcanzan la cifra de 160 y 140 uM respectivamente.

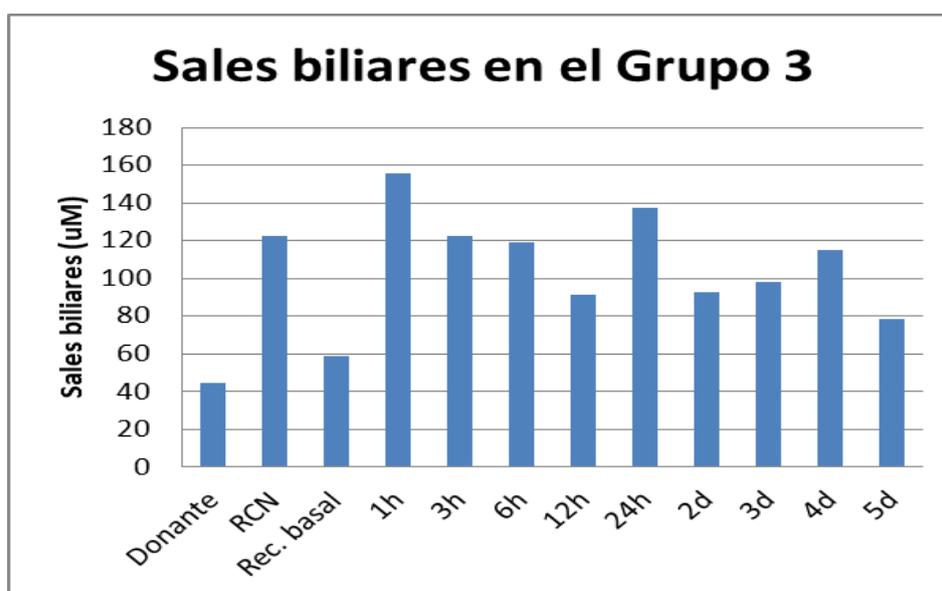
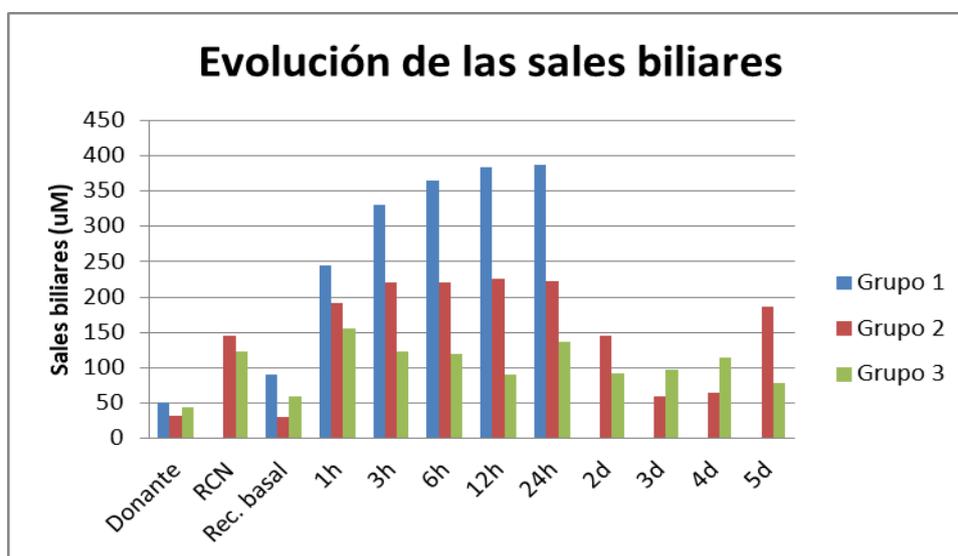


Gráfico 82: Valores medios de Sales biliares en suero en el grupo 3

Comparación entre grupos:**Gráfico 83: Evolución temporal de las sales biliares en suero en los diferentes grupos.**

En este gráfico observamos esta disminución de las sales biliares en suero que se produce en el grupo 3 desde la 1ª hora tras la reperusión, y que no observamos en los otros grupos. Se puede valorar cómo se mantiene en el grupo 2 el pico de sales biliares hasta las 24 horas, con cifras muy por encima de las del grupo 3.

Respecto al grupo 1, la evolución es un incremento continuo hasta el fallecimiento de todos sus animales a las 24 horas.

		Donante	RCN	Rec. basal	1h	3h	6h	12h	24h	2d	3d	4d	5d
Grupo 1	media	50,52		90,65	244,26	330,41	364,49	384,21	386,83				
	DE	27,88		75,75	127,09	91,36	114,39	152,10	262,82				
Grupo 2	media	32,40	145,84	30,75	191,13	220,13	221,33	225,71	223,16	145,78	59,98	64,12	185,91
	DE	6,97	33,78	12,94	104,77	135,54	162,56	143,32	157,24	101,20	36,71	31,07	201,90
Grupo 3	media	45,0	122,8	59,0	155,6	122,7	119,4	91,1	137,5	92,6	98,2	115,3	78,7
	DE	33,5	79,9	39,3	137,4	108,9	148,6	117,5	102,4	39,6	71,0	104,6	58,5

Tabla 90: Valores de sales biliares en suero en todos los grupos. Valores medios y desviación estándar.

Comparación estadística entre grupos:

		Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Donante	1	50,533	27,8730	11,3791	21,282	79,784
	2	32,400	6,9610	2,8418	25,095	39,705
	3	45,000	33,4585	13,6594	9,888	80,112
RCN	1
	2	145,840	33,7961	15,1141	103,877	187,803
	3	122,767	79,9126	32,6242	38,904	206,630
Rec Basal	1	90,650	75,7387	30,9202	11,167	170,133
	2	30,750	12,9489	5,2864	17,161	44,339
	3	59,017	39,2840	16,0376	17,791	100,243
1 h	1	244,267	127,0844	51,8820	110,900	377,634
	2	191,140	104,7772	46,8578	61,042	321,238
	3	155,580	137,3869	61,4413	-15,008	326,168
3 h	1	330,400	91,3508	40,8533	216,973	443,827
	2	220,117	135,5391	55,3336	77,877	362,356
	3	122,720	108,8831	48,6940	-12,476	257,916
6 h	1	364,500	114,3791	57,1896	182,497	546,503
	2	221,333	162,5486	66,3602	50,749	391,918
	3	119,380	148,5796	66,4468	-65,106	303,866
12 h	1	384,200	152,0886	87,8084	6,391	762,009
	2	225,717	143,3411	58,5187	75,289	376,144
	3	91,100	117,5249	58,7624	-95,908	278,108
24 h	1	386,833	262,8249	151,7420	-266,060	1039,726
	2	223,167	157,2404	64,1931	58,153	388,180
	3	137,540	102,4544	45,8190	10,326	264,754
2 días	1
	2	145,783	101,2150	41,3209	39,565	252,002
	3	92,580	39,5753	17,6986	43,441	141,719
3 días	1
	2	59,983	36,7172	14,9897	21,451	98,516
	3	98,220	71,0271	31,7643	10,028	186,412
4 días	1
	2	64,100	31,0427	13,8827	25,555	102,645
	3	115,340	104,5534	46,7577	-14,480	245,160
5 días	1
	2	185,920	201,8993	90,2921	-64,771	436,611
	3	78,680	58,4671	26,1473	6,084	151,276

Tabla 91: Estudio descriptivo estadístico de las sales biliares en suero en todos los grupos.

Grupo 1 y 2

	Grupo 1	Grupo 2	F	p
Donante	50,52	32,40	2,390	,153
Rec. Basal	90,65	30,75	3,646	,085
1 h	244,26	191,13	,556	,475
3 h	330,41	220,13	2,384	,157
6 h	364,49	221,33	2,297	,168
12 h	384,21	225,71	2,360	,168
24 h	386,83	223,16	1,433	,270

Tabla 92: Prueba ANOVA para comparación de las medias de sales biliares entre los grupos 1 y 2, con la distribución F y el valor p de significación estadística

Al comparar los grupos 1 y 2 no se encuentran diferencias estadísticamente significativas. Aunque numéricamente el valor de las sales biliares en el grupo 1 es siempre bastante más elevado respecto al grupo 2, la p nunca es inferior a 0,05.

Grupo 1 y 3

	Grupo 1	Grupo 3	F	p
Donante	50,52	45,0	,097	,762
Rec. Basal	90,65	59,0	,825	,385
1 h	244,26	155,6	1,236	,295
3 h	330,41	122,7	10,676	,011
6 h	364,49	119,4	7,328	,030
12 h	384,21	91,1	8,396	,034
24 h	386,83	137,5	3,881	,096

Tabla 93: Prueba ANOVA para comparación de las medias de sales biliares entre los grupos 1 y 3, con la distribución F y el valor p de significación estadística

Al comparar los grupos 1 y 3 sí encontramos diferencias estadísticamente significativas, a las 3, 6 y 12 horas de la reperusión, con una $p=0,011$; $p=0,030$ y $p=0,034$.

Grupo 2 y 3

	Grupo 2	Grupo 3	F	p
Donante	32,40	45,0	,816	,388
RCN	145,84	122,8	,358	,564
Rec. Basal	30,75	59,0	2,802	,125
1 h	191,13	155,6	,212	,658
3 h	220,13	122,7	1,672	,228
6 h	221,33	119,4	1,158	,310
12 h	225,71	91,1	2,413	,159
24 h	223,16	137,5	1,087	,324
2 días	145,78	92,6	1,209	,300
3 días	59,98	98,2	1,333	,278
4 días	64,12	115,3	1,104	,324
5 días	185,91	78,7	1,301	,287

Tabla 94: Prueba ANOVA para comparación de las medias de sales biliares entre los grupos 2 y 3, con la distribución F y el valor p de significación estadística

Al comparar los grupos 2 y 3 no encontramos diferencias estadísticamente significativas. A las 12 horas es donde esperábamos encontrar diferencias estadísticamente significativas por la gran diferencia numérica: 225,71 versus 91,1. Pero en este periodo la p es de 0,159 por lo que no existe significación estadística.

5. ANÁLISIS HISTOLÓGICO DE LAS MUESTRAS DE TEJIDO

5.1. Necrosis coagulativa

La necrosis coagulativa hepática se produce a causa de la isquemia tisular, que genera una coagulación de las proteínas intracelulares, haciéndola inviable. La necrosis coagulativa es una forma de muerte celular en la cual los hepatocitos pierden la cohesión entre ellos y el núcleo sufre una degeneración cariolítica. Estos cambios son típicos de las lesiones isquémicas.

Durante la isquemia, se interrumpe el aporte de oxígeno al órgano y se detiene la cadena respiratoria mitocondrial, lo que comporta una depleción en los valores de ATP. La degradación de ATP estimula la glucólisis anaeróbica con la consiguiente formación de ácido láctico. La acidosis resultante, además de alterar la cinética normal de las enzimas, supone un sistema menos efectivo para producir ATP y las células se ven privadas de la energía necesaria para mantener la homeostasis. El fallo en la homeostasis celular se caracteriza por la pérdida de gradiente de los iones de sodio y de calcio a través de las membranas celulares. Este hecho provoca un edema intracelular y el consiguiente hinchamiento de las células de Kupffer y las células endoteliales. Estos fenómenos inducen una alteración en los orgánulos citoplasmáticos y en la integridad de la membrana, y pueden desencadenar la muerte celular.

Hemos utilizado una escala semicuantitativa para valorar el grado de necrosis coagulativa en las muestras de tejido tomadas. Así:

- 0 : ausencia de necrosis coagulativa
- 1 : 1/3 del campo con necrosis coagulativa
- 2 : 2/3 del campo con necrosis coagulativa
- 3 : > 2/3 del campo con necrosis coagulativa

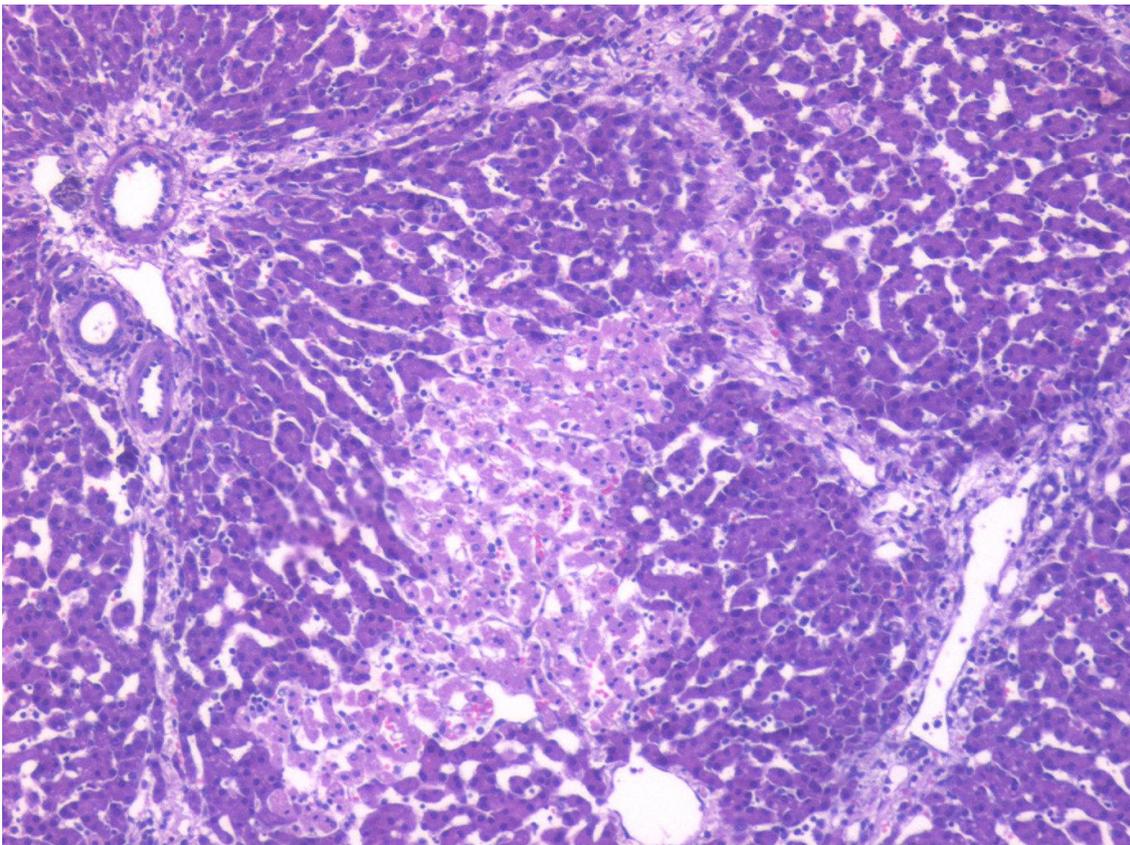


Foto 20: Necrosis coagulativa centrolobulillar (grado 1)

Grupo 1:

En el grupo 1 vemos que, tras 90 minutos de parada cardiaca y 4 horas de almacenamiento en frío, todos los injertos presentan cierto grado de necrosis a la hora de la reperfusión. Para los animales 1F, 1H y 1I esta necrosis coagulativa debida a isquemia ocupa 1/3 del parénquima hepático. En el animal 1G la necrosis ocupa hasta 2/3 del parénquima hepático; y en los animales 1J y 1K la necrosis es extensa, siendo superior a 2/3 del parénquima hepático. Esta afectación histológica observada en todos los animales de este grupo se ve correlacionada con la mortalidad precoz (en las primeras 33 horas) de todos ellos.

	PC	RP-1h
1F	0	1
1G	0	2
1H	0	1
1I	0	1
1J	0	3
1K	0	3

Tabla 95: Valores de escala semicuantitativa de presencia de necrosis coagulativa (0 a 3) en el grupo 1

Grupo 2:

	PC	RCN	RP-1h	Eut
2C	0	0	0	0
2D	0	0	1	0
2E	0	1	1	1
2F	0	0	1	2
2G	0	1	1	0
2H	0	1	2	

Tabla 96: Valores de escala semicuantitativa de presencia de necrosis coagulativa (0 a 3) en el grupo 2

En el grupo 2 la evolución de la presencia de necrosis coagulativa es totalmente diferente a la del grupo 1.

Parada Cardíaca:

Al igual que en el grupo 1 (y, como veremos, en el grupo 3), tras 90 minutos de parada cardíaca no existen signos histológicos de necrosis coagulativa en ninguno de los animales.

Recirculación Normotérmica:

Tras 60 minutos de recirculación normotérmica, vemos una afectación isquémica discreta, tan sólo en la mitad de los animales. De hecho, los animales 2C, 2D y 2F no presentan ninguna alteración histológica en cuanto a la evaluación de la necrosis coagulativa. En los animales 2E, 2G y 2H existe una afectación necrótica hasta

1/3 del campo de evaluación.

Reperusión:

A la hora de la reperusión, tan solo el animal 2C no presenta ninguna afectación isquémica estructural del parénquima hepático. Los animales 2D y 2F ya presentan una afectación necrótica de hasta 1/3 del campo evaluado. Los animales que ya presentaban una afectación necrótica tras la RCN, siguen manteniendo su grado de necrosis (2E y 2G), e incluso, en el animal 2H hay un empeoramiento, con un aumento en la extensión de la necrosis a 2/3 del parénquima hepático.

Eutanasia:

En el momento de la eutanasia electiva (todos los animales excepto 2H, que falleció a las 80 horas tras la reperusión), el animal 2C continúa sin presentar ningún área de necrosis coagulativa en la muestra de tejido hepático analizado. En los animales 2D y 2G, que habían presentado un grado 1 de necrosis coagulativa a la hora de la reperusión, en las muestras de la eutanasia electiva no se observan signos de necrosis coagulativa. El animal 2E continúa presentando una afectación de 1/3 del parénquima hepático analizado. Y el animal 2F presenta un empeoramiento histológico al 5º día del trasplante, con una afectación de 2/3 del parénquima hepático.

Grupo 3:

	PC	RCN	MP	RP-1h	Eut
3F	0	1	0	1	0
3H	0	0	0	0	0
3I	0	0	0	0	0
3J	0	0	1	1	0
3K	0	0	0	0	0
3L	0	0	1	0	0

Tabla 97: Valores de escala semicuantitativa de presencia de necrosis coagulativa (0 a 3) en el grupo 3

En el grupo 3 el análisis de la necrosis coagulativa presenta también una evolución totalmente diferente a los grupos previos.

Parada Cardiaca:

Igual que en los grupos anteriores, no observamos cambios necróticos isquémicos a nivel histológico en las muestras tomadas a los 90 minutos de la parada cardiaca.

Recirculación Normotérmica:

Tras 60 minutos de recirculación normotérmica observamos cambios necróticos a nivel histológico únicamente en el animal 3F, con un grado 1 de necrosis.

Máquina de Perfusión “ex –situ”:

Tras 4 horas de estar el injerto hepático perfundiéndose en la máquina con sangre oxigenada a 37°C, observamos pocos cambios en las muestras. El animal 3F, que presentaba un grado 1 de necrosis, no presenta ningún signo de necrosis isquémico en este momento. Tan solo los animales 3J y 3L presentan una necrosis coagulativa grado 1, estando ausente en los otros 4 animales.

Reperusión:

A la hora de la reperusión del injerto observamos un grado 1 de necrosis coagulativa en los animales 3F y 3J. En el resto de los animales hay ausencia de necrosis en este periodo.

Eutanasia:

Al realizar la eutanasia electiva al 5º día en todos los animales de este grupo, las muestras histológicas no presentaban ningún tipo de necrosis. Se observa una normalidad histológica completa en este aspecto.

Comparación entre grupos:

	PC	RCN	MP	RP-1h	Eut
1F	0			1	
1G	0			2	
1H	0			1	
1I	0			1	
1J	0			3	
1K	0			3	
2C	0	0		0	0
2D	0	0		1	0
2E	0	1		1	1
2F	0	0		1	2
2G	0	1		1	0
2H	0	1		2	
3F	0	1	0	1	0
3H	0	0	0	0	0
3I	0	0	0	0	0
3J	0	0	1	1	0
3K	0	0	0	0	0
3L	0	0	1	0	0

Tabla 98: Valores de escala semicuantitativa de presencia de necrosis coagulativa (0 a 3) en los 3 grupos

En el grupo 1 fallecen todos los animales antes de las 33 horas post-reperfusión. Esto nos impide comparar histológicamente las muestras de la necropsia, puesto que no fueron procedimientos electivos. Los animales estaban muertos y las muestras presentaban una grave alteración necrótica en ese momento. Lo que sí observamos es un importante daño isquémico reflejado en las muestras tomadas tras la reperfusión del injerto hepático que no ha tenido un periodo de recirculación normotérmica tras los 90 minutos de parada cardíaca.

Al comparar los grupos 2 y 3 vemos que en el momento de la reperfusión del injerto ya implantado, el daño isquémico a nivel histológico es bastante mayor en el grupo 2, comparado con el grupo 3, que apenas presenta necrosis en las muestras de tejido. En este grupo, los injertos han estado 4 horas en la máquina de perfusión, y tras este periodo previo al implante, tampoco existía necrosis coagulativa en 4 de los 6 animales del grupo. En el momento de la eutanasia electiva al 5º día los animales del grupo 2 presentan necrosis coagulativa grado 1 y 2 en 2 de los animales que han sobrevivido (de los 6 iniciales). En el grupo 3, en la eutanasia electiva no existe ningún rastro de necrosis en ninguna de las muestras analizadas.

5.2. Microvesiculación citoplasmática hepatocelular

A nivel celular, otro de los cambios histológicos asociados a la isquemia y a la necrosis isquémica es la microvesiculación citoplasmática hepatocelular. Ésta puede estar presente en algunas células aisladas, o puede llegar a ser difusa, en relación también a las consecuencias del daño isquémico sobre la célula. Este tipo de lesión histológica se observa de forma más temprana que la necrosis coagulativa en las lesiones por isquemia. Por ello hemos utilizado la misma escala semicuantitativa para cuantificar el grado de microvesiculación citoplasmática hepatocelular. Así:

0 : ausencia de microvesiculación citoplasmática hepatocelular

1 : 1/3 del campo con microvesiculación citoplasmática hepatocelular

2 : 2/3 del campo con microvesiculación citoplasmática hepatocelular

3 : > 2/3 del campo con microvesiculación citoplasmática hepatocelular

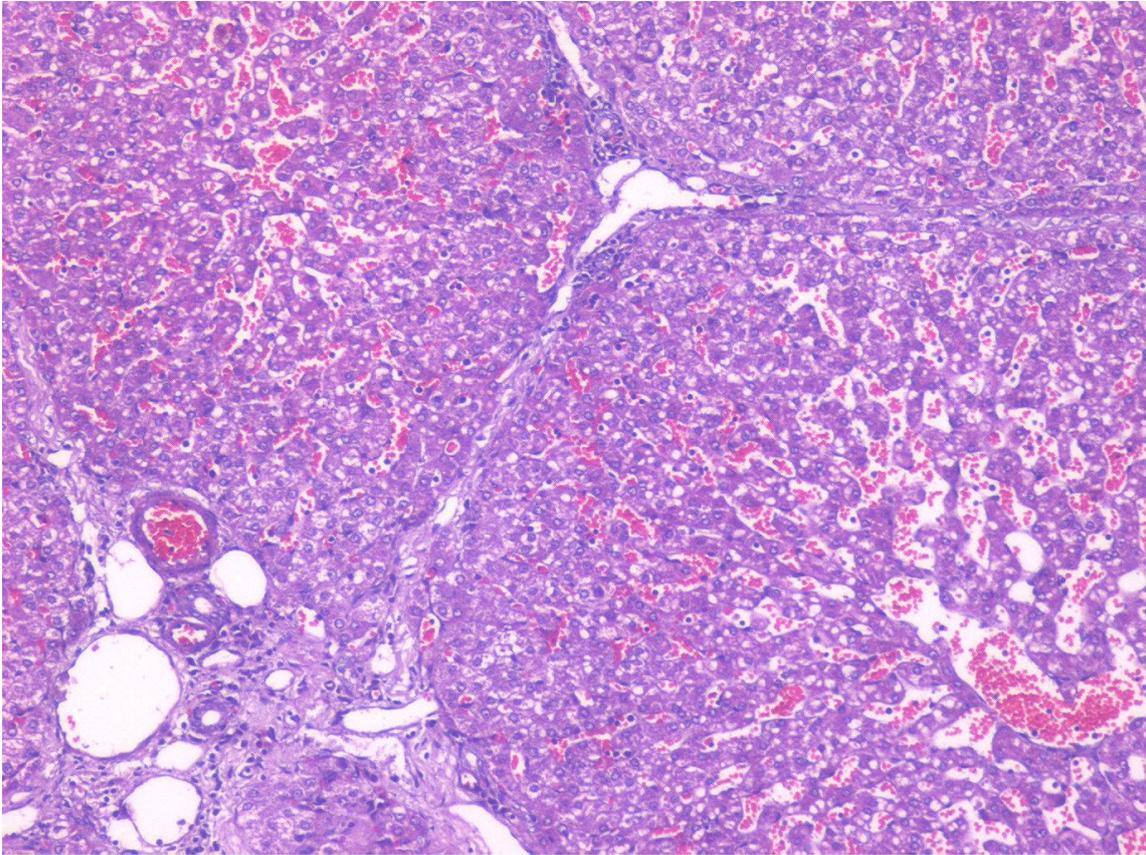


Foto 21: Microvesiculación citoplasmática hepatocelular difusa (grado 3)

Grupo 1:

	PC	RP-1h
1F	3	3
1G	3	3
1H	3	2
1I	3	3
1J	3	2
1K	1	3

Tabla 99: Valores de escala semicuantitativa de presencia de microvesiculación citoplasmática hepatocelular (0 a 3) en el grupo 1

Parada Cardíaca:

Tras 90 minutos de parada cardíaca, todos los animales de este grupo excepto uno (1K) presentan una microvesiculación citoplasmática hepatocelular difusa. En el animal 1K tan solo está afecto 1/3 de los hepatocitos.

Reperusión:

A la hora de la reperusión del hígado todas las muestras presentan una afectación extensa Hay 2 animales que presentan microvesiculación en 2/3 de los hepatocitos. Los otros 4 animales presentan una microvesiculación citoplasmática hepatocelular difusa.

Grupo 2:

	PC	RCN	RP-1h	Eut
2C	2	2	3	0
2D	2	2	2	0
2E	3	3	3	1
2F	3	3	3	1
2G	3	3	3	2
2H	3	2	2	

Tabla 100: Valores de escala semicuantitativa de presencia de microvesiculación citoplasmática hepatocelular (0 a 3) en el grupo 2

Parada Cardíaca:

Al igual que en el grupo 1, existe una afectación importante en todos los animales de este grupo en cuanto a microvesiculación citoplasmática hepatocelular tras los 90 minutos de parada cardíaca. En todos los animales excepto en dos (2C y 2D) la afectación es difusa. En estos 2 animales la afectación es de 2/3 de los hepatocitos.

Recirculación Normotérmica:

Tras los 60 minutos de recirculación normotérmica las muestras de tejido presentan el mismo grado de microvesiculación citoplasmática hepatocelular que tras la parada cardíaca. Tan sólo el animal 2H presenta una variación del grado de microvesículas. Se observan en este caso menos, pasando de un grado 3 a un grado 2.

Reperusión:

A la hora del implante del injerto el grado de microvesiculación citoplasmática hepatocelular continúa siendo el mismo para los diferentes animales, excepto para uno (2C). El animal 2C ha pasado de tener microvesículas citoplasmáticas en 2/3 de sus hepatocitos, a presentar una extensión difusa de microvesículas. Así, tras la reperusión del injerto, la microvesiculación citoplasmática hepatocelular es difusa en 4 de los 6 animales, presentando una extensión de 2/3 en 2 animales.

Eutanasia:

Al 5º día de seguimiento, en el momento de la eutanasia electiva, hay una mejoría global importante en todos los animales. De los 5 animales que quedan vivos al 5º día en este grupo, 2 de ellos (2C y 2D) no presentan microvesículas citoplasmáticas en sus hepatocitos. En 2 animales más (2E y 2F) tan sólo se observan microvesículas en los citoplasmas de 1/3 de sus hepatocitos. Y en 1 animal (2G) se observan en 2/3 de los hepatocitos (en este animal se habían observado en las muestras tisulares anteriores siempre una extensión difusa).

Grupo 3:

	PC	RCN	MP	RP-1h	Eut
3F	3	3	2	3	0
3H	1	1	0	1	0
3I	2	1	3	2	0
3J	3	2	1	1	0
3K	0	2	1	1	0
3L	3	3	1	1	0

Tabla 101: Valores de escala semicuantitativa de presencia de microvesiculación citoplasmática hepatocelular (0 a 3) en el grupo 3

Parada Cardíaca:

En el periodo post-parada cardíaca todos los animales excepto uno (3K) tienen una afectación por microvesiculación de causa isquémica. En la mitad de los animales (3F, 3J y 3L) la afectación es difusa. En los animales 3H y 3I la microvesículas citoplasmáticas se observan en 1/3 y 2/3 de los hepatocitos respectivamente.

Recirculación Normotérmica:

Tras los 60 minutos de recirculación normotérmica, todos los animales presentan microvesículas en los citoplasmas de sus hepatocitos, de forma más o menos extensa. En 2 animales (3H y 3I) hay 1/3 de los hepatocitos afectados. En otros 2 animales (2J y 2K) hay 2/3 de sus hepatocitos afectados. Y en otros 2 animales (3F y 3L) la afectación hepatocitaria es difusa.

Máquina de Perfusión “ex –situ”:

Tras las 4 horas de perfusión en máquina y previo al implante del injerto hepático, observamos una mejoría histológica global (excepto en 1 animal: 3I) del porcentaje de hepatocitos con microvesiculación citoplasmática. El animal 3H no presenta microvesículas en sus hepatocitos. Los animales 3J, 3K y 3L presentan solo microvesículas en 1/3 de sus hepatocitos (tras la RCN: 2, 2 y 3). Y el animal 3F presenta una afectación de 2/3 de sus hepatocitos (siendo la afectación difusa tras el periodo de RCN). El animal 3I es el que ha presentado un empeoramiento histológico, con una afectación difusa tras el periodo de MP, siendo de 1/3 antes de este periodo.

Reperfusión:

Tras el implante del injerto hepático no observamos casi variaciones en cuanto a la microvesiculación citoplasmática. Todas las muestras tienen una afectación histológica, aunque menos extensa que los otros grupos. Hay 4 animales en los que se observan microvesículas citoplasmáticas en 1/3 de sus hepatocitos (3H, 3J, 3K y 3L). En un animal (3F), la afectación es difusa, siendo de 2/3 previo al implante. Y en un animal (3I), la afectación es de 2/3 de los hepatocitos, siendo difusa previo al implante.

Eutanasia:

En el momento de la eutanasia electiva al 5º día de seguimiento en todas las muestras hay ausencia de microvesículas citoplasmáticas.

Comparación entre grupos:

	PC	RCN	MP	RP-1h	Eut
1F	3			3	
1G	3			3	
1H	3			2	
1I	3			3	
1J	3			2	
1K	1			3	
2C	2	2		3	0
2D	2	2		2	0
2E	3	3		3	1
2F	3	3		3	1
2G	3	3		3	2
2H	3	2		2	
3F	3	3	2	3	0
3H	1	1	0	1	0
3I	2	1	3	2	0
3J	3	2	1	1	0
3K	0	2	1	1	0
3L	3	3	1	1	0

Tabla 102: Valores de escala semicuantitativa de presencia de microvesiculación citoplasmática hepatocelular (0 a 3) en los 3 grupos

Al comparar los 3 grupos, tras los 90 minutos de parada cardiaca existe una afectación histológica importante de presencia de microvesículas citoplasmáticas. En

todos los grupos hay afectación difusa en la mayoría de sus animales. Tan solo alguna excepción aislada de poca afectación, o nula, como los animales 1K, 3H y 3K.

Tras el periodo de recirculación normotérmica no existe casi ninguna variación en cuanto al grado de afectación de microvesículas en las muestras de los grupos 2 y 3.

A la hora de la reperusión del injerto hepático, tanto el grupo 1 como el grupo 2 presentan una importante afectación histológica. En los 2 grupos, 4 de los 6 animales presentan una afectación difusa de sus hepatocitos, y en los 2 animales restantes las microvesículas afectan 2/3 de sus hepatocitos. En cambio, en el grupo 3 no existe una afectación tan importante. Las lesiones han revertido en algunos de los casos. De los 6 animales del grupo, 4 de ellos presentan una afectación de 1/3 de los hepatocitos, hay un animal con una afectación difusa, y otro en el que las microvesículas están presentes en 2/3 de los hepatocitos. En este grupo 3, que tiene un periodo añadido de 4 horas de perfusión en máquina, ya existe esta mejoría histológica tras este periodo. Es en este periodo en el que hay una mejoría de las lesiones histológicas.

Por último, en el momento de la eutanasia electiva realizada en los grupos 2 y 3 vemos que en el grupo 3 no existen microvesículas citoplasmáticas en ninguno de los animales, mientras que éstas están presentes en 3 de los 5 animales que sobreviven a los 5 días del grupo 2. En los dos animales restantes no existe afectación histológica.

5.3. Epitelio biliar

El epitelio biliar es muy sensible a la isquemia. Se producen lesiones degenerativas de los conductos biliares, con afectación tanto intra como extrahepática de forma relativamente temprana (no precoz). En las muestras de tejido hepático se ha valorado la presencia (=1) o ausencia (=0) de lesiones degenerativas de los conductos biliares intrahepáticos.

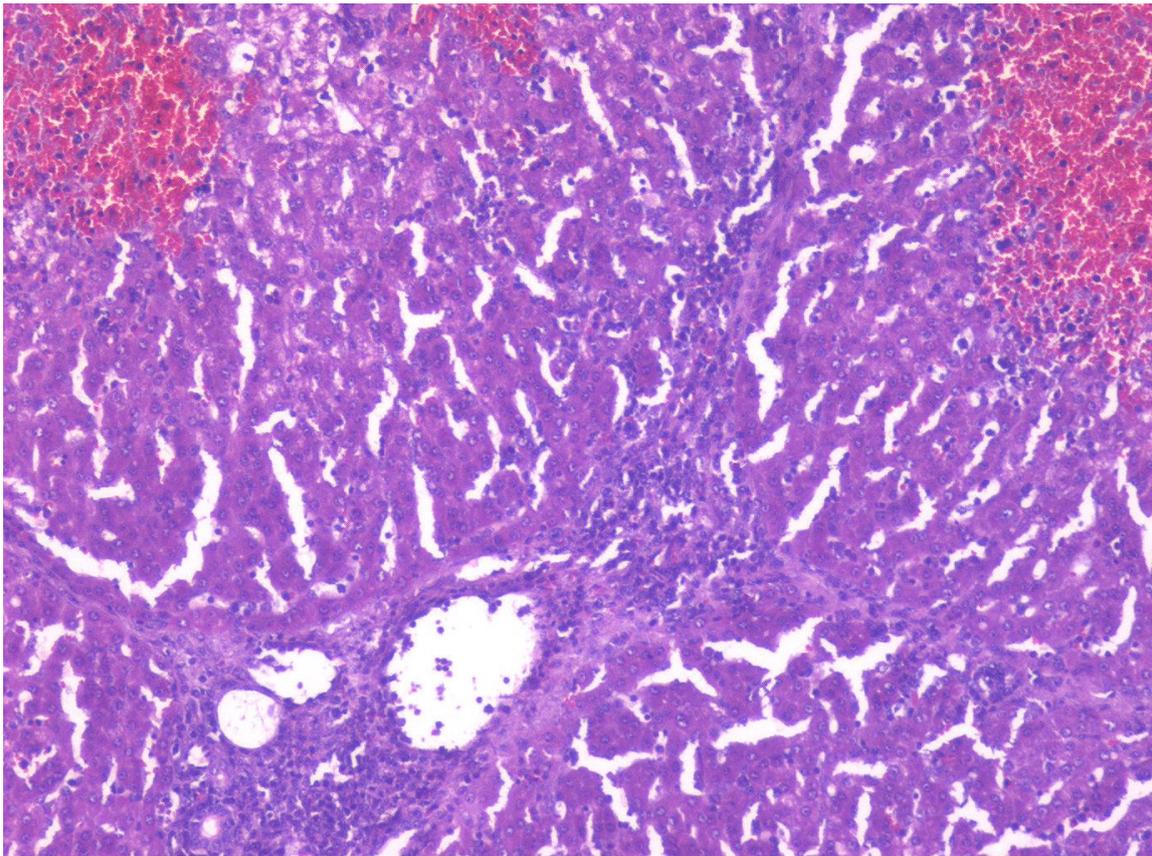


Foto 22: Lesiones degenerativas del epitelio biliar

Grupo 1:

	PC	RP-1h
1F	0	0
1G	0	0
1H	0	0
1I	0	0
1J	0	0
1K	0	0

Tabla 103: Valores de escala semicuantitativa de presencia de lesiones degenerativas del epitelio biliar debidas a isquemia (0-1) en el grupo 1

En el grupo 1 no observamos alteraciones histológicas degenerativas del epitelio biliar en ninguna de las muestras obtenidas tras los 90 minutos de parada cardíaca, ni tras la reperusión del injerto hepático en el implante.

Grupo 2:

	PC	RCN	RP-1h	Eut
2C	0	0	0	1
2D	1	0	1	1
2E	0	0	0	1
2F	0	0	0	1
2G	0	0	0	1
2H	0	0	0	

Tabla 104: Valores de escala semicuantitativa de presencia de lesiones degenerativas del epitelio biliar debidas a isquemia (0-1) en el grupo 2

En el grupo 2 vemos un patrón similar al grupo 1, en el que no existen lesiones histológicas biliares durante el día del trasplante. No se observan lesiones de este tipo ni tras los 90 minutos de parada cardíaca, ni tras los 60 minutos de recirculación normotérmica, ni a la hora de la reperusión tras el implante del injerto hepático. Tan sólo en 1 animal (2D) de forma aislada se observa el epitelio biliar lesionado en las muestras de la parada cardíaca (PC) y de la reperusión (RP-1h).

En el momento de la eutanasia, todas las muestras de este grupo presentan lesiones degenerativas del epitelio biliar, consecuencia del daño isquémico inicial.

Grupo 3:

	PC	RCN	MP	RP-1h	Eut
3F	0	0	0	0	0
3H	0	0	0	0	0
3I	0	0	0	0	0
3J	0	0	0	0	0
3K	0	0	0	0	1
3L	0	0	0	0	1

Tabla 105: Valores de escala semicuantitativa de presencia de lesiones degenerativas del epitelio biliar debidas a isquemia (0-1) en el grupo 3

En el grupo 3 vemos el mismo patrón que en los demás grupos en los periodos peri-trasplante. Así, no observamos ninguna alteración estructural del epitelio biliar en ninguna de los periodos siguientes: post-parada cardíaca, tras la recirculación normotérmica, después de las 4 horas en máquina de perfusión, ni tras la reperusión del injerto hepático en el receptor.

En el momento de la eutanasia vemos que la afectación isquémica del epitelio biliar está presente en tan sólo 2 de los 6 animales de este grupo, presentando los otros 4 animales unos conductillos biliares histológicamente normales.

Comparación entre grupos:

	PC	RCN	MP	RP-1h	Eut
1F	0			0	
1G	0			0	
1H	0			0	
1I	0			0	
1J	0			0	
1K	0			0	
2C	0	0		0	1
2D	1	0		1	1
2E	0	0		0	1
2F	0	0		0	1
2G	0	0		0	1
2H	0	0		0	
3F	0	0	0	0	0
3H	0	0	0	0	0
3I	0	0	0	0	0
3J	0	0	0	0	0
3K	0	0	0	0	1
3L	0	0	0	0	1

Tabla 106: Valores de escala semicuantitativa de presencia de lesiones degenerativas del epitelio biliar debidas a isquemia (0-1) en los 3 grupos

Las lesiones degenerativas del epitelio biliar las observamos en el momento de la eutanasia en los grupos 2 y 3. No es un cambio histológico precoz tras el daño isquémico, puesto que se habrían observado en las muestras de los periodos anteriores estudiados.

La comparación, por lo tanto, de esta alteración histológica la podemos hacer únicamente en el momento de la eutanasia electiva. Esto es, entre los grupos 2 y 3. En el grupo 2 vemos que el 100% de sus animales (los cinco que están vivos al 5º día) presentan lesiones degenerativas del epitelio biliar. En cambio, en el grupo 3, sólo vemos que están afectados 1/3 de los animales del grupo, presentando una histología normal los 2/3 restantes.

5.4. Dilatación-Congestión sinusoidal

La isquemia hepática puede conducir a una atrofia centrolobulillar por la mayor afectación inicial del área 3 de Rappaport. Esta atrofia causa una dilatación sinusoidal, la cual puede crear una apariencia de congestión (por la existencia de sinusoides dilatados repletos de células sanguíneas).

Para valorar la dilatación sinusoidal por un lado, y la congestión sinusoidal por otro, hemos utilizado la misma escala semicuantitativa que para la necrosis coagulativa y la microvesiculación citoplasmática hepatocelular. Así:

- 0 : ausencia de dilatación/congestión sinusoidal
- 1 : 1/3 del campo con dilatación/congestión sinusoidal
- 2 : 2/3 del campo con dilatación/congestión sinusoidal
- 3 : > 2/3 del campo con dilatación/congestión sinusoidal

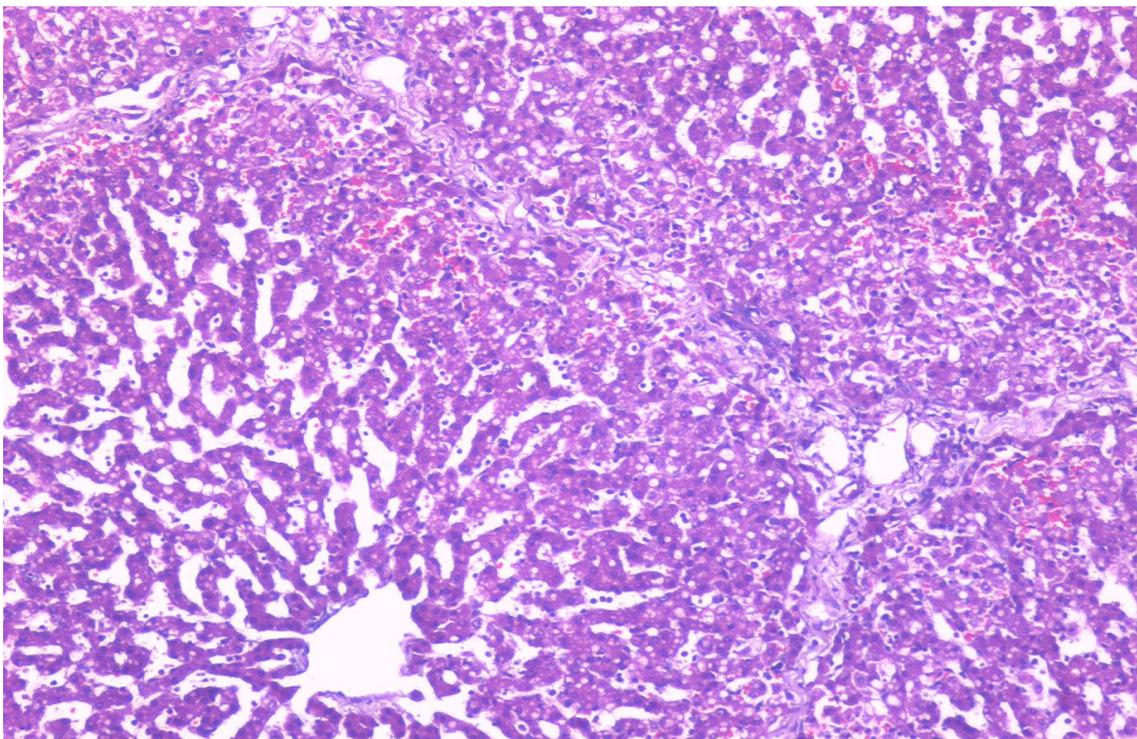


Foto 23: Dilatación sinusoidal

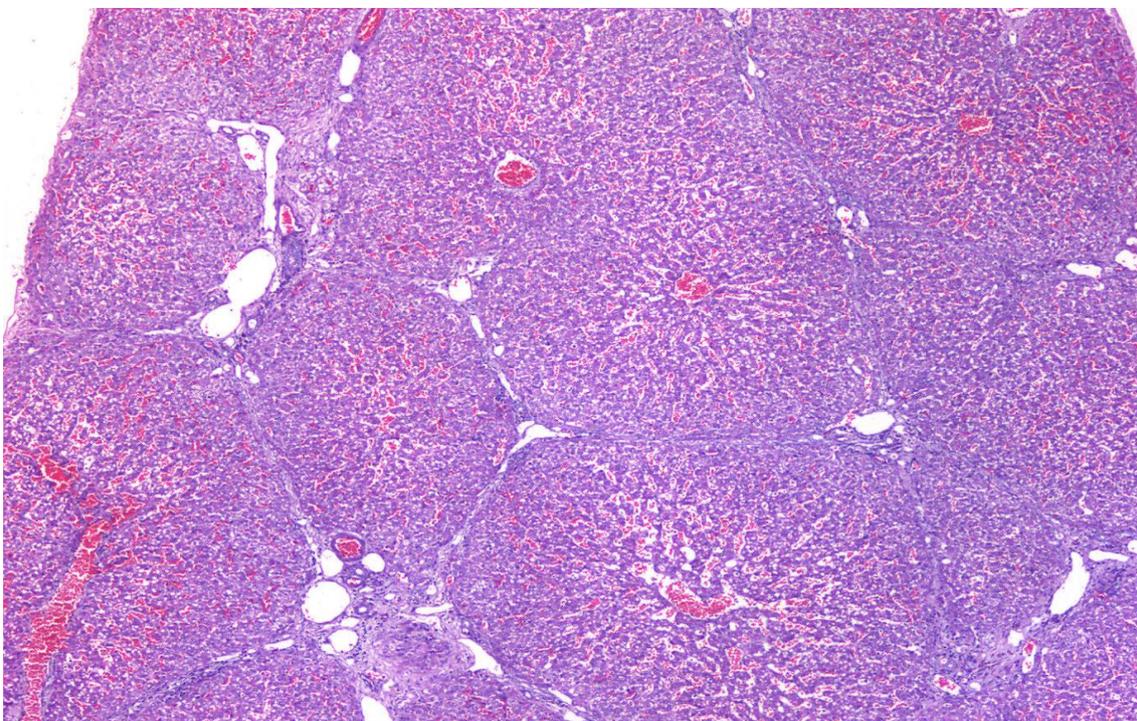


Foto 24: Congestión sinusoidal

5.4.1. Dilatación sinusoidal:

Grupo 1:

	PC	RP-1h
1F	0	3
1G	1	3
1H	2	2
1I	2	2
1J	0	3
1K	1	2

Tabla 107: Valores de escala semicuantitativa de presencia de dilatación sinusoidal (0-3) en el grupo 1

En el grupo 1 vemos que la dilatación sinusoidal es un cambio histológico que ya aparece de forma temprana tras un daño isquémico.

Parada Cardíaca:

Tras los 90 minutos de parada cardíaca, de los animales de este grupo hay 2 en los que no se observa ninguna dilatación de los sinusoides hepáticos. Hay 2 animales más en los que la presencia de dilatación sinusoidal se ve hasta en un 1/3 del parénquima hepático. En los 2 animales restantes, la afectación sinusoidal ocupa hasta 2/3 de las muestras examinadas. No existe ningún animal con una afectación difusa.

Reperusión:

A la hora de la reperusión, la mitad de los animales presentan una afectación de 2/3 de los sinusoides y la otra mitad presenta una afectación difusa de prácticamente todos los sinusoides (grado 3).

Grupo 2:

	PC	RCN	RP-1h	Eut
2C	2	2	3	1
2D	2	1	3	0
2E	0	2	3	1
2F	3	3	3	2
2G	1	2	2	1
2H	1	2	3	

Tabla 108: Valores de escala semicuantitativa de presencia de dilatación sinusoidal (0-3) en el grupo 2

Parada Cardíaca:

En el grupo 2, tras los 90 minutos de parada cardíaca se observa una afectación también bastante variable. Existe un animal (2E) en el que no existe ninguna alteración histológica. Hay dos animales (2G y 2H) en los que existe dilatación en 1/3 de los sinusoides hepáticos. En otros dos animales (2C y 2D) la afectación ocupa 2/3 de los sinusoides hepáticos. Y en el animal 2F la dilatación sinusoidal es difusa.

Recirculación Normotérmica:

Tras el periodo de 60 minutos de recirculación normotérmica, en 2 animales (2C y 2F) no ha habido variación en cuanto a las lesiones ya existentes. En 3 animales (2E, 2G y 2H) existe un empeoramiento de la afectación sinusoidal. Y en el animal 2D existe

una mejoría histológica, pasando de una afectación de 2/3 de los sinusoides hepáticos tras el periodo PC a una afectación de 1/3 de los sinusoides hepáticos tras la RCN.

Reperusión:

A la hora de la reperusión del injerto hepático la dilatación sinusoidal es difusa en la mayoría de los casos. Ésto lo observamos en 5 de los 6 animales de este grupo, con una afectación grado 2 en el animal 2G.

Eutanasia:

En el momento de la eutanasia electiva realizada en este grupo hay una mejoría importante de las lesiones observadas tras la reperusión del injerto. De hecho, en el animal 2D no existe ninguna afectación de dilatación sinusoidal. En los animales 2C, 2E y 2G existe una afectación de 1/3 de los sinusoides hepáticos. En el animal 2F, la dilatación se observa en 2/3 de los sinusoides hepáticos.

Grupo 3:

	PC	RCN	MP	RP-1h	Eut
3F	0	1	2	2	0
3H	2	1	2	2	0
3I	2	1	2	2	1
3J	1	2	2	1	0
3K	1	0	1	2	0
3L	1	2	1	2	1

Tabla 109: Valores de escala semicuantitativa de presencia de dilatación sinusoidal (0-3) en el grupo 3

Parada Cardíaca:

En el grupo 3, tras la parada cardíaca también observamos una afectación variable entre los diferentes animales. Así, el animal 3F no presenta ninguna alteración histológica del tipo dilatación sinusoidal. Los animales 3J, 3K y 3L presentan una dilatación de 1/3 de los sinusoides hepáticos. Y en los animales 3H y 3I están afectos 2/3 de los sinusoides hepáticos.

Recirculación Normotérmica:

Tras los 60 minutos de recirculación normotérmica, la respuesta histológica también es variable en este grupo. Así, en los animales 3F, 3J y 3L existe un empeoramiento del grado de afectación sinusoidal, y en los animales 3H, 3I y 3K hay

una mejoría del grado histológica de dilatación sinusoidal, como observamos en la tabla.

Máquina de Perfusión “ex –situ”:

A las 4 horas de estar el injerto en la máquina de perfusión ex-situ, todos los animales presentan una afectación histológica de sus sinusoides hepáticos. Hay 2 animales (3K y 3L) con un grado 1 de dilatación sinusoidal y 4 animales (3F, 3H, 3I y 3J) con un grado 2. En general ha habido un empeoramiento histológico tras este periodo de perfusión en máquina.

Reperusión:

A la hora de la reperusión, en 5 de los 6 animales del grupo la afectación sinusoidal ocupa 2/3 de la muestra histológica. En 1 animal (3J), la afectación tan sólo es de 1/3 de los sinusoides.

Eutanasia:

En el momento de la eutanasia electiva al 5º día de seguimiento, la recuperación es global en todos los animales, con una mejoría histológica respecto al periodo RP-1h. Observamos que en 4 de los 6 animales del grupo hay ausencia de lesión histológica, y en los otros 2 animales, la afectación es tan sólo de 1/3 de los sinusoides hepáticos.

Comparación entre grupos:

	PC	RCN	MP	RP-1h	Eut
1F	0			3	
1G	1			3	
1H	2			2	
1I	2			2	
1J	0			3	
1K	1			2	
2C	2	2		3	1
2D	2	1		3	0
2E	0	2		3	1
2F	3	3		3	2
2G	1	2		2	1
2H	1	2		3	
3F	0	1	2	2	0
3H	2	1	2	2	0
3I	2	1	2	2	1
3J	1	2	2	1	0
3K	1	0	1	2	0
3L	1	2	1	2	1

Tabla 110: Valores de escala semicuantitativa de presencia de dilatación sinusoidal (0-3) en los 3 grupos

Al comparar los diferentes grupos hemos de fijarnos, primero en el periodo tras la reperfusión del injerto, y después en el momento de la eutanasia.

Reperfusion:

A la hora de la reperfusión del injerto hepático, la afectación histológica de los grupos 1 y 2 es casi idéntica. En lo que respecta la dilatación sinusoidal, no hay diferencias entre estos 2 grupos a pesar del periodo de RCN al que están sometidos los animales del grupo 2. En cuanto al grupo 3, la afectación histológica es menor, presentando 5 de sus 6 animales una afectación de 2/3 de los sinusoides hepáticos, y el sexto animal una afectación de 1/3. No existe en este grupo ningún caso con una afectación difusa (grado 3), que es algo común en los otros grupos.

Eutanasia:

En el momento de la eutanasia, en el grupo 3 la mayoría de sus animales han revertido la lesión histológica, con una ausencia de dilatación sinusoidal en 4 de los 6 animales del grupo. En el grupo 2 tan sólo vemos 1 animal sin lesiones histológicas, predominando el grado 1 (en 3 animales), y un caso de grado 2.

5.4.2. Congestión sinusoidal:

Comparación entre grupos:

	PC	RCN	MP	RP-1h	Eut
1F	0			2	
1G	1			2	
1H	2			0	
1I	2			1	
1J	2			2	
1K	3			2	
2C	2	0		0	0
2D	3	0		1	0
2E	3	1		1	0
2F	3	1		2	2
2G	0	0		1	0
2H	1	0		3	
3F	3	0	0	2	0
3H	2	0	0	1	0
3I	2	2	0	2	0
3J	2	0	0	2	0
3K	2	0	0	1	0
3L	2	0	0	1	0

Tabla 111: Valores de escala semicuantitativa de presencia de congestión sinusoidal (0-3) en los 3 grupos

La congestión sinusoidal es una afectación histológica que no presenta, como vemos en la tabla comparativa entre grupos, diferencias importantes entre los 3 grupos. El único dato que escapa a la normalidad es el grado 2 de congestión en el animal 2F en el momento de la eutanasia. Pero esta valoración histológica también puede variar en la toma de la muestra.

En general, la congestión sinusoidal es importante y casi difusa en algunos casos tras los 90 minutos de parada cardíaca. A los 60 minutos de la recirculación normotérmica (grupos 2 y 3) no se suele observar ningún tipo de congestión en los sinusoides hepáticos. Tras 4 horas de perfusión en máquina (grupo 3), la congestión sinusoidal es nula. Tras la reperfusión del injerto hepático se observa de nuevo una congestión más o menos variable en casi todos los animales, siendo en general de grado 1 o 2. Y, a los 5 días de seguimiento, en el momento de la eutanasia electiva, tampoco observamos congestión sinusoidal en las muestras de tejido hepático analizadas.

VI. DISCUSIÓN

1. Donante a corazón parado: problemática actual

Como ya hemos desarrollado en la introducción, los donantes a corazón parado son una fuente de injertos hepáticos.

Esta fuente, por un lado, es una fuente real, ya que aumenta el número de trasplantes anuales. Con las mejorías de la coordinación de los diferentes servicios involucrados, cada año aumenta no sólo el número de donantes potenciales, sino también el número de trasplantes efectivos realizados.

Además, esta fuente de órganos es una fuente segura y eficaz con el protocolo actual. Siguiendo y respetando los tiempos de seguridad de reanimación básica, RCP avanzada, puesta en RCN,... etc., así como los intervalos de seguridad de flujos de bomba y evolución de parámetros bioquímicos, se llevan a cabo trasplantes hepáticos con injertos válidos. Estos trasplantes realizados no han presentado más morbilidad o mortalidad que los trasplantes convencionales de donantes en muerte encefálica.

De todas formas, para acabar de implementar los trasplantes de donante a corazón parado como otra fuente igual de válida que los donantes de muerte encefálica, y que los DCP no sean una alternativa “marginal” o “subóptima”, hay que centrarse en dos puntos claves: aumentar la seguridad y aumentar la eficacia de estos trasplantes.

La problemática actual de la donación a corazón parado se basa en recuperar los hígados no válidos. Al mejorar estos dos puntos conseguiríamos aumentar el número de injertos trasplantados.

2. Recuperación de hígados no válidos

A pesar de que se respeten los tiempos de seguridad de un potencial donante a corazón parado, en el momento de la extracción existen aspectos subjetivos de no validez del injerto. Estos criterios se pueden dividir en 2 apartados: por un lado el aspecto macroscópico del hígado, teniendo en cuenta la coloración, consistencia, aspecto de la vía biliar, esteatosis, fibrosis, traumatismo, perfusión,...etc. y, por otro lado, el funcionamiento en bomba de RCN, es decir, la evolución de los flujos vasculares y la evolución de los parámetros bioquímicos durante el tiempo en RCN previo a la extracción.

Existen injertos hepáticos no válidos en el momento de realizar la extracción. Injertos procedentes de donantes que cumplían los criterios de inclusión pero que, ya sea por una mala evolución de las transaminasas, ya sea por el aspecto macroscópico del hígado, etc., finalmente se descartan y se pierden.

El propósito de esta tesis doctoral es encontrar la forma de mejorar los injertos hepáticos. Y esta cuestión tiene respuesta en la bomba de perfusión ex-situ. Hace una década, con nuestros trabajos experimentales ya quedó demostrada la eficacia de la recirculación normotérmica tras un periodo de isquemia caliente para poder recuperar injertos hepáticos válidos para el trasplante. Actualmente es imprescindible la utilización de la RCN. A pesar del esfuerzo, el número de injertos que se utilizan son una minoría. Es por ello que se introduce ahora la máquina de perfusión ex-situ como

método de preservación, frente al almacenamiento en frío convencional, que permita la evaluación objetiva y recuperación de potenciales injertos.

3. Resultados del experimento

3.1. Supervivencia:

El estudio experimental diseñado confirma la hipótesis planteada inicialmente, en donde se sugería que la posibilidad de perfundir el órgano ex-situ mejoraría las posibilidades de utilizar estos órganos para trasplante. La supervivencia, cuando se utiliza la bomba de perfusión ex-situ, aumenta de forma drástica y sugiere un papel extraordinario de este tipo de perfusión en los mecanismos de reversibilidad del injerto dañado por la parada cardíaca.

3.1.1. Importancia del tiempo de isquemia

En el diseño del estudio, el período de parada cardíaca utilizado es de especial importancia. Se decidió utilizar un período en donde las posibilidades de supervivencia eran aparentemente nulas. Estudios previos señalan la importancia del tiempo de parada cardíaca en la evolución post-trasplante. Monbaliu, García-Valdecasas y Fukao han demostrado previamente cómo la supervivencia disminuía en función del tiempo de isquemia caliente.

Monbaliu y cols.⁵⁵ realizaron un modelo experimental de trasplante de donante a corazón parado en cerdos con tiempos de parada cardíaca que iban de 0 a 60 minutos.

Tras preservación en frío durante 4 horas previo al trasplante pudo comprobar que la supervivencia disminuía de forma progresiva. De tal forma, el grupo de 60 minutos presentó una supervivencia de 0%. Mientras, en el grupo de 0 y de 15 minutos la supervivencia fue de 100% y 83% a los 4 días.

Nuestro grupo, en un modelo experimental en cerdos de trasplante hepático de donante a corazón parado, también dividió los grupos en función del tiempo de parada cardiaca al que habían sido sometidos: 20, 30 y 40 min⁴⁸. Posteriormente entraban en un periodo de 30 minutos de recirculación normotérmica, para ser extraídos a continuación y almacenados en frío. Estos 3 grupos presentaron supervivencias de 100%, 70% y 50% respectivamente.

En el trabajo de Fukao y cols.⁵⁶ se reproduce un modelo experimental de trasplante de donante a corazón parado en cerdo utilizando 4 grupos con diferentes tiempos de parada cardiaca (0, 30, 60 y 90 minutos). Tras el periodo de parada cardiaca, el hígado se extraía para ser preservado mediante almacenamiento en frío. Si bien en el grupo de 60 minutos algunos animales sobrevivieron, lo que quedó claro es que con 90 minutos ningún animal sobrevivió más allá de 12 horas.

Es importante resaltar este periodo de 90 minutos de parada cardiaca aparentemente incompatible con la vida.

3.1.2. Valor de la Recirculación Normotérmica (RCN)

Un hecho sorprendente de nuestros resultados es el efecto positivo de la RCN. Mientras que en los animales mantenidos con isquemia fría ninguno sobrevivió, el mero hecho de colocar estos órganos en RCN durante 1 hora permitió conseguir una supervivencia para nosotros sorprendente. Este hecho confirma la importancia de obtener los órganos mediante esta metodología.

En la actualidad, la utilización sistemática en la clínica de la RCN tras la parada cardiaca nos ha permitido obtener órganos para trasplante de una calidad relativamente buena. Nuestros resultados han sido publicados en 2007. Más recientemente, en 2009, Jiménez-Galanes y cols⁴², utilizando nuestra metodología, han podido confirmar nuestros resultados en la clínica, con una supervivencia acumulada al año de 85,5% para el paciente y de 80% para el injerto.

Ateniéndonos únicamente a la supervivencia, nuestros resultados nos permiten sugerir que la RCN es capaz de mejorar por sí sola la calidad de los injertos provenientes de donante a corazón parado, confirmado inicialmente por la experimentación con resultados anteriores, así como por la práctica clínica a posteriori.

3.2. Efecto de la bomba de perfusión ex-situ

3.2.1. Función hepática:

3.2.1.1. Función hepatocelular

El estudio de la funcionalidad del injerto, reflejado por un lado en los valores analíticos de bioquímica hepática y de coagulación, apoya de forma consistente la hipótesis inicial. Las diferencias entre los grupos son tan importantes que no cabe duda sobre el papel beneficioso de la bomba ex-situ, obteniendo un órgano óptimo para el trasplante.

Como hemos visto en los resultados, al analizar estos cuatro parámetros de función hepática (GOT, LDH, bilirrubina y tiempo de Quick), podemos decir que, en el grupo control sin RCN ni MP, en el que la supervivencia de sus animales se limita a las primeras 33 horas, éstos van asociados a una malfunción hepática. Esta malfunción hepática se refleja en el empeoramiento progresivo de los valores analíticos estudiados en todos los animales del grupo, asociado al daño isquémico inicial de 90 minutos en parada cardiaca. Este periodo de isquemia caliente, seguido de la extracción del injerto hepático para el almacenamiento en frío durante 4 horas previo al implante es lo suficientemente deletéreo como para que la recuperación del injerto sea imposible. Este

método de preservación tras un periodo de isquemia caliente inicial no es válido para asegurar la viabilidad y supervivencia del injerto trasplantado.

Tal como ya se estudió en los trabajos experimentales de nuestro grupo la pasada década, desarrollados en la introducción de este trabajo, es necesario un periodo de recirculación normotérmica tras el periodo de isquemia caliente inicial en el modelo de donante a corazón parado. En el grupo 2, en el que existe este periodo de RCN de 60 minutos tras los 90 minutos de parada cardíaca, se logra una supervivencia del 83% a los 5 días. En cuanto a la funcionalidad del injerto trasplantado, vemos que existe una recuperación tras el implante con una buena evolución post-trasplante, tras un pico de los valores analíticos a las 24 horas. La recuperación posterior es satisfactoria, siendo más o menos rápida y efectiva según el animal estudiado. Comparar este grupo con el grupo control nos sirve para reafirmar la RCN como un periodo indispensable tras un periodo de parada cardíaca más o menos prolongado en el modelo de donante a corazón parado.

Respecto al experimento actual, en el que se introduce un periodo adicional de perfusión normotérmica en máquina ex-situ durante 4 horas, los resultados en cuanto a función hepática son muy positivos. En comparación con el grupo 2, vemos que la recuperación del daño isquémico inicial en el grupo 3 es mucho más rápida y eficaz en los parámetros analizados. Este periodo de perfusión en máquina ex-situ con sangre

oxigenada a 37°C permite mejorar el funcionalismo del injerto hepático tras el trasplante. Los resultados son mucho mejores globalmente que en el grupo 2.

En el experimento de Fukao⁵⁶ se determinan GOT y LDH en el seguimiento. Las diferencias entre los grupos son importantes. A las 4 horas post-reperfusión, en el grupo de 90 minutos de parada cardíaca, la GOT y la LDH se sitúan por encima de 2500 y 8000 UI/L respectivamente. Estas cifras superan los valores medios obtenidos en nuestro diseño experimental, en el que vemos el papel beneficioso, de reversibilidad de lesión, de la máquina de perfusión ex-situ asociado a la RCN.

En nuestros trabajos experimentales anteriores ya observamos el daño hepatocelular provocado por la isquemia caliente en el injerto trasplantado. En el grupo de animales con RCN tras el periodo de parada cardíaca se vieron unos picos de transaminasas a los 3 días del trasplante (determinaciones analíticas post-implante: tras la perfusión, a los 3 días y a los 5 días), con una normalización posterior a los 5 días. Este pico era mayor en función del tiempo de parada cardíaca (20, 30 o 40 minutos). El grupo de animales sin RCN tras la parada cardíaca, como ya hemos dicho anteriormente, no sobrevivió más de 12 horas.

En resumen, persiste una lesión tras la utilización de la bomba. La lesión es sensiblemente inferior a cuando no se utiliza la bomba y esto se traduce en una menor cifra de transaminasas, LDH, bilirrubina y una cifra de tiempo de Quick mayor. Todo

esto es consecuencia de una recuperación de la célula hepática durante la RCN y la bomba de perfusión ex-situ.

De nuevo los resultados obtenidos del estudio de la función hepática en los análisis de sangre nos respaldan y confirman que la mejor forma de poder recuperar un hígado procedente de un donante a corazón parado es por medio de la utilización de la RCN. Si además se añade la perfusión normotérmica ex-situ como método de preservación, el daño hepatocelular resultante de la isquemia caliente inicial disminuye considerablemente y la función hepática se restablece de una forma mucho más rápida y eficaz.

3.2.1.2. Función de la célula endotelial

También se ha estudiado la funcionalidad hepática del injerto analizando 3 parámetros en suero: Factor de vonWillebrand, Tbars y sales biliares.

Como ya hemos descrito previamente, la isquemia caliente provoca una activación y lesión de las células endoteliales sinusoidales, lo que se traduce en un aumento en la expresión de moléculas de adhesión, entre las que se encuentra el factor de vonWillebrand. Ya en 1999 Basile y cols.⁵⁷ en un estudio clínico de trasplante hepático establecieron una correlación entre los niveles de factor de vonWillebrand post-trasplante y la funcionalidad precoz del injerto hepático.

Durante el proceso de isquemia caliente se generan radicales libres de oxígeno. Cuando se reperfunde el injerto hepático, el oxígeno induce la peroxidación lipídica. El grado de peroxidación lipídica se correlaciona con la concentración de Tbars en plasma o en orina, y nos permite medir de forma indirecta el daño celular y la necrosis celular producida. La medición de los Tbars es un reflejo del estrés oxidativo generado durante la isquemia.

En cuanto a la medición de las sales biliares, en los trabajos experimentales de Monbaliu⁵⁸ utilizando un modelo porcino de donante a corazón parado se observó que los hígados expuestos a periodos prolongados de isquemia caliente tenían un mayor riesgo de presentar un fallo primario del injerto, mayor riesgo de muerte del receptor, y mayor formación de sales biliares (sobrepasando los niveles tóxicos) tras el trasplante.

En el trabajo experimental de Porte⁵⁹ con modelo porcino de DCP se sugiere que la toxicidad por las sales biliares contribuye a la patogénesis de la lesión de la vía biliar tras un trasplante hepático con un injerto procedente de un DCP.

Por esta razón, cuando nosotros analizamos en los animales las sales biliares, la medición, además de ser un reflejo del daño isquémico producido, nos sirve también como marcador predictor de colangiopatía isquémica.

Del análisis de nuestros resultados se desprende que de nuevo se confirma la primera hipótesis, al observar la evolución de estos parámetros cuando un injerto es sometido a almacenamiento en frío tras un periodo prolongado de isquemia caliente. El periodo de RCN es indispensable para asegurar la viabilidad del injerto procedente de un donante a corazón parado.

Estos parámetros están directamente relacionados con el daño isquémico producido tras la parada cardiaca del animal y con la funcionalidad del injerto hepático. Al añadir el periodo de RCN tras la isquemia caliente conseguimos atenuar este daño. Esto queda reflejado en una menor lesión isquémica y una funcionalidad hepática menos afectada.

Al comparar los 2 grupos en los que existe el periodo de RCN (con o sin periodo de MP posterior), no observamos diferencias, excepto en las determinaciones de factor de vonWillebrand, relacionado con la lesión endotelial por la isquemia. Aquí sí que observamos diferencias, en beneficio de los animales en los que el injerto hepático se ha perfundido ex-situ con sangre oxigenada a 37°C mediante la máquina de perfusión. Existe un menor daño isquémico a este nivel con una recuperación más precoz. Estos datos apoyan el hecho de que la perfusión ex-situ con sangre oxigenada a 37°C tras una isquemia caliente prolongada presenta un papel protector del injerto frente al daño isquémico inicial.

En 2005, Rogiers y cols.⁶⁰ también realizaron un estudio clínico valorando la evolución de los niveles de factor de vonWillebrand en los receptores de un trasplante hepático previo a dicho trasplante y durante el implante del injerto. Se establecieron 2 grupos de receptores en función del daño hepatocelular posterior (mayor o menor), observando que los niveles de factor de vonWillebrand podían servir como marcador de lesión hepática.

En los resultados experimentales obtenidos, por un lado vemos de nuevo cómo la utilización de la bomba de RCN tras un periodo de isquemia caliente disminuye el daño hepatocelular producido por ésta. Como marcador de funcionalidad del injerto, el vWF presenta una mayor expresión cuando no existe el periodo de RCN. Y en los dos grupos en los que se utiliza la RCN, la expresión de vWF es mayor cuando no existe la

perfusión ex-situ con sangre oxigenada a 37°C. Este método de preservación es el que mantiene el injerto hepático en las condiciones más óptimas para ser trasplantado.

3.2.2. *Histología:*

El tejido hepático sometido a un periodo más o menos prolongado de isquemia caliente sufre unos cambios histológicos evidentes. Se han analizado los cambios relacionados con este tipo de agresión, a saber, la necrosis coagulativa, la microvesiculación citoplasmática hepatocelular, la lesión degenerativa del epitelio biliar, y la dilatación-congestión sinusoidal. Estos hallazgos están relacionados con la fase aguda de la lesión, con la función hepática y con la lesión a largo plazo (en relación a la vía biliar).

En cada uno de estos apartados hemos visto un patrón similar de respuesta histológica en las muestras de cada grupo.

Cuando se realiza el almacenamiento en frío tras la parada cardíaca, sin periodo adicional de RCN, en las muestras obtenidas tras la reperfusión del injerto lo que existe es un daño histológico importante y generalmente difuso. Se pueden considerar estos hallazgos patológicos como cambios histológicos irreversibles secundarios a la isquemia caliente.

Al introducir el periodo de RCN tras el periodo inicial de isquemia caliente (en el grupo de animales sin MP), hay un daño importante con una afectación histológica en las muestras obtenidas tras la reperfusión del injerto. Este daño isquémico no suele ser

tan extenso como cuando no existe RCN y, de hecho, con una supervivencia del 83% de los animales, se observa en las muestras de la eutanasia electiva del 5° día de seguimiento una reversibilidad de las lesiones previas. Esta mejoría es evidente, aunque no suele ser completa ni global (no se observa, ni en todos los animales ni en todos los parámetros analizados).

Al añadir el periodo de perfusión ex-situ del injerto hepático tras la RCN, con sangre oxigenada a 37°C, observamos que estos injertos hepáticos presentan un menor grado de lesión histológica tras la reperfusión del órgano. Tras este periodo en MP, el injerto hepático presenta un menor grado de daño isquémico tras la reperfusión en el implante. La afectación es menor que con RCN sin MP en cuanto a intensidad y extensión de las lesiones. A los 5 días de seguimiento, en la eutanasia electiva, observamos que en la mayoría de los animales existe una reversibilidad completa de las lesiones histológicas observadas.

Desde el punto de vista histológico, por un lado podemos confirmar que la RCN es un periodo indispensable para asegurar la viabilidad de un injerto hepático que ha sufrido un periodo de isquemia caliente prolongado. No sólo se observa un daño histológico de naturaleza isquémica de menor gravedad, sino que estas lesiones son reversibles, con un menor grado de afectación a los 5 días de seguimiento.

Además, podemos decir también que el periodo de perfusión ex-situ con sangre oxigenada permite al injerto hepático procedente de un donante a corazón parado asegurar un menor grado de daño histológico isquémico y una reversibilidad completa de estas lesiones a los 5 días de seguimiento.

Monbaliu y cols.⁶¹ estudiaron en 2008 la extensión de los hallazgos histopatológicos en un modelo porcino de DCP y su relación con el tiempo de isquemia caliente; además de su capacidad de predecir la aparición de fallo primario del injerto, daño hepatocelular y supervivencia. Teniendo en cuenta en la valoración AP tras una isquemia caliente la vacuolización hepatocelular, la necrosis hepatocitaria y la congestión-dilatación sinusoidal, se centraron sobre todo en la vacuolización hepatocelular, como marcador de viabilidad del injerto, utilizando como escala un score semicuantitativo (de 0 a 3).

Utilizaron 5 grupos según el diferente tiempo de isquemia caliente (de 0 a 60 minutos). El método de preservación era el almacenamiento en frío durante 4 horas previo al implante. Se observó que la vacuolización del citoplasma hepatocitario (la extensión) estaba asociado a un incremento del tiempo de isquemia caliente, un mayor riesgo de desarrollar un FPI conduciendo a la muerte del receptor y el concomitante daño hepatocelular.

En los trabajos realizados previamente por nuestro grupo en modelo porcino de donante a corazón parado, ya se pudo observar la correlación entre el tiempo de isquemia caliente y el daño histológico^{48,62}. Se evaluaron 4 parámetros histológicos: dilatación-congestión sinusoidal, vacuolización hepatocelular, necrosis hepatocitaria y degeneración de la vía biliar. Se observaron diferencias histopatológicas a los 5 días de seguimiento en los animales que habían sobrevivido: 100%, 70% y 50% de los 3 grupos establecidos según el tiempo de parada cardíaca: 20, 30 y 40 minutos. El grado de lesiones histológicas estaba directamente relacionado con el tiempo de isquemia caliente.

Hu y cols⁶³ también investigaron en 2006 la histología del injerto hepático procedente de rata, tras sufrir diferentes tiempos de isquemia caliente, con el objetivo de establecer el límite máximo que puede tolerar el tejido hepático la isquemia caliente. Utilizaron 7 grupos según el diferente tiempo de isquemia caliente (de 0 a 60 minutos). Se realizaron valoraciones histológicas tras el implante, a las 6, 24 y 48 horas. En los grupos con tiempos de isquemia caliente hasta 30 minutos observaron varios grados de degeneración hepatocitaria, sin signos de necrosis. En el grupo de 45 minutos se encuentra ya necrosis focal centrolobulillar en las muestras tomadas. Y en los injertos de las ratas de 60 minutos de isquemia caliente, la necrosis era difusa o parcheada en algunos casos, con alteraciones histológicas también a nivel de los sinusoides (dilatación y congestión). Establecieron que cuando el periodo de isquemia caliente está comprendido entre 0 y 30 minutos, el daño producido es reversible, siendo crítico a los 45 minutos, e irreversible a los 60 minutos.

En el trabajo de Fukao y cols de 1997⁵⁶ también se realizó una evaluación histológica de los 4 grupos de animales según el diferente tiempo de isquemia (de 0 a 90 minutos). Los injertos procedentes de cerdos eran preservados en frío durante 4 horas antes del implante. La valoración histológica se realizó a la hora de la reperfusión del injerto hepático. El grupo sin periodo de isquemia caliente no presentaba alteración de la estructura hepatocitaria. En los grupos sometidos a isquemia caliente ya se observaba vacuolización citoplasmática leve (en el grupo de 15 minutos), siendo cada vez más grave y difusa conforme se prolongaba el periodo de isquemia caliente. En el grupo de 90 minutos, la afectación era difusa, así como la necrosis hepatocitaria y la dilatación sinusoidal. Recordemos que en este grupo todos los animales murieron en las primeras 12 horas tras el trasplante.

Al comparar los trabajos publicados con los resultados descritos, vemos que, al añadir el periodo de RCN tras el periodo de isquemia caliente, podemos prolongar de forma considerable lo que tanto se ha estudiado en los modelos experimentales de donante a corazón parado: el límite tolerable de tiempo de isquemia caliente.

Al añadir como periodo de preservación el periodo de perfusión ex-situ con sangre oxigenada a 37°C, se consigue alcanzar el segundo objetivo marcado por los estudios histológicos experimentales de donante a corazón parado: la reversibilidad histológica de las lesiones producidas por el daño isquémico inicial. Esta reversibilidad histológica se produce de una manera más rápida y con una eficacia demostrada en las muestras histológicas, además de los parámetros analíticos, clínicos y de expresión de citoquinas, como veremos a continuación.

3.2.3. Respuesta inflamatoria:

Tras un periodo de isquemia caliente se provoca un estrés oxidativo en los hepatocitos y la estimulación de las células de Kupffer después de la I/R. La intensidad del estrés oxidativo en la celular hepática y el nivel de activación de la célula de Kupffer dependen del tiempo de isquemia al que ha estado sometido el hígado. A mayor tiempo de isquemia existirá una mayor respuesta inflamatoria tras la reperfusión del injerto hepático, reflejado en una mayor concentración de citoquinas.

En un estudio experimental de donante a corazón parado en modelo porcino publicado por Monbaliu en 2007⁶⁴ se estudian los parámetros implicados en el desarrollo del fallo primario del injerto (FPI). Se utilizaron diferentes periodos de isquemia caliente. Las citoquinas estudiadas fueron TNF- α e IL-6. En los animales que desarrollaron un FPI, las concentraciones de estas dos citoquinas eran mucho mayores que en los animales sin FPI.

Por lo tanto, nuestro interés en estudiar determinadas citoquinas mediante PCR-RNA en tejido hepático se debe a la relación existente entre la respuesta inflamatoria que se produce tras la I/R y la funcionalidad posterior del injerto hepático trasplantado. A menor lesión, funcionará mejor el hígado.

Cuando se utiliza el periodo de RCN tras la isquemia caliente, al comparar los injertos que fueron almacenados en frío con los injertos que fueron perfundidos con la bomba ex-situ, observamos que hay un patrón de comportamiento que se repite para la mayoría de los valores analizados. Tras el periodo de parada cardiaca de 90 minutos y los 60 minutos de RCN, en los injertos almacenados en frío se produce un pico importante de estos factores pro-inflamatorios tras la reperfusión, como cabía esperar. En cambio, al utilizar la perfusión ex-situ con sangre oxigenada a 37°C, existe un patrón diferente. Tras este periodo de perfusión en máquina, se produce el pico de expresión de todas las citoquinas analizadas, para encontrar niveles de expresión muy inferiores tras la reperfusión del injerto. En este punto, al analizar estos dos métodos de preservación, la diferencia numérica de expresión es importante. El periodo de perfusión ex-situ en máquina jugaría un papel “protector”, permitiendo que tras la reperfusión la respuesta inflamatoria sea mucho menor.

En el reciente trabajo de Mortensen y cols.⁶⁵ de 2009 se describen los cambios de las citoquinas durante un periodo de isquemia caliente de 60 minutos en un modelo experimental en cerdo, mediante clampaje del hilio hepático. Las citoquinas analizadas fueron: IL-6, IL-8, IL-10 y TNF- α . Al cabo de 60 minutos se observan unos valores de interleuquinas levemente aumentadas en comparación con el valor basal. No así el TNF- α , que aumenta inicialmente a los 30 minutos, para después disminuir a los 60 minutos, a valores incluso inferiores al basal. Este estudio no presenta un seguimiento tras la

reperfusión más allá de 3 horas, describiendo las variaciones de citoquinas durante el fenómeno de I/R tras una isquemia caliente. Las variaciones de transaminasas, tiempo de Quick y bilirrubina observadas son mínimas y en un periodo muy breve de tiempo de seguimiento tras la reperfusión.

Satomi y cols.⁶⁶ realizaron un modelo experimental de donante a corazón parado en ratas, utilizando un periodo de isquemia caliente de 30 minutos seguido de 6 horas de almacenamiento en frío previo a la reperfusión del injerto in vitro en un sistema de perfusión. El grupo control no presentaba un periodo de isquemia caliente. Este sistema utilizaba una solución bicarbonatada tampón, oxigenada, perfundida por la vena porta con un flujo continuo durante 60 minutos. Las citoquinas analizadas fueron TNF- α , IL-1 e IL-6. Las determinaciones fueron a nivel basal, tras el periodo de isquemia caliente y tras la reperfusión del injerto. Los valores de las citoquinas eran superiores (el doble para las interleuquinas) en el grupo de DCP, con mínima variación para el TNF- α . No se analizaron transaminasas ni tiempo de Quick, debido al diseño del estudio. En cambio, sí que se realizó un estudio histológico de muestras de tejido hepático. En el grupo control sin isquemia caliente, la estructura hepatocelular estaba bien conservada, con una ligera alteración en el área perisinusoidal. En el grupo con periodo de isquemia caliente, la estructura del sinusoides hepático estaba muy deteriorada, con cambios hidrópicos en el parénquima hepatocitario.

Vemos que van paralelos el nivel de expresión de las citoquinas y el daño del injerto hepático. En este caso es el daño estructural, aunque podemos decir que a mayor

expresión de este tipo de citoquinas, se puede esperar una funcionalidad del injerto hepático más mermada. El nivel de expresión de citoquinas podríamos utilizarlo como marcador predictor de la funcionalidad del injerto hepático tras el trasplante.

Los trabajos publicados son descriptivos en cuanto a las variaciones de las citoquinas durante el mecanismo de isquemia-reperfusión (I/R) en el trasplante hepático. Otros trabajos muestran cómo se puede atenuar esta respuesta mediante sustancias citoprotectoras o actuando directamente a nivel de las células de Kupffer. En nuestro trabajo vemos cómo evolucionan los parámetros de las citoquinas utilizando 2 modelos diferentes de preservación. Por un lado, nuestro sistema convencional de preservación tras una isquemia caliente: RCN y almacenamiento en frío. Por otro lado, la perfusión ex-situ con sangre oxigenada a 37°C tras el periodo de RCN. Únicamente podemos comparar estos 2 modelos de preservación, con los resultados que ya hemos observado: una menor respuesta inflamatoria cuando utilizamos la perfusión ex-situ como método de preservación.

VII. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Se confirma el valor de la recirculación normotérmica en la obtención de injertos procedentes de donantes a corazón parado.
2. Contestando la hipótesis de trabajo, la bomba de perfusión ex-situ es capaz de mejorar las condiciones de los injertos hepáticos obtenidos a corazón parado, permitiendo su evaluación y realización del trasplante con seguridad, mediante la reversión de las lesiones producidas durante la isquemia caliente.
3. Estaríamos en condiciones de iniciar la aplicación clínica de esta metodología.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Margarit C, Jaurrieta E, Maestre P et al. [Orthotopic hepatic transplant in a patient with hepatocarcinoma]. *Rev Esp Enferm Apar Dig* 1984; 66:234-239.
2. <http://www.ont.es>
3. <http://www.unos.org/data/>
4. <http://www.eltr.org>
5. Russell PS. Understanding resource use in liver transplantation. *JAMA* 1999; 281:1431-1432.
6. Busuttill RW, Tanaka K. The utility of marginal donors in liver transplantation. *Liver Transpl* 2003; 9:651-663.
7. Clavien PA. How far can we go with marginal donors? *J Hepatol* 2006; 45:483-484.
8. Trotter JF. Expanding the donor pool for liver transplantation. *Curr Gastroenterol Rep* 2000; 2:46-54.
9. Mueller AR, Platz KP, Krause P et al. Is the use of marginal liver grafts justified? *Transplant Proc* 1999; 31:401-402.
10. Montalti R, Nardo B, Bertelli R et al. Donor pool expansion in liver transplantation. *Transplant Proc* 2004; 36:520-522.
11. Hashimoto K, Miller C. The use of marginal grafts in liver transplantation. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2008; 15:92-101.

12. Grande L, Matus D, Rimola A et al. Expanded liver donor age over 60 years for hepatic transplantation. *Clin Transpl* 1998;297-301.
13. Velidedeoglu E, Desai NM, Campos L et al. The outcome of liver grafts procured from hepatitis C-positive donors. *Transplantation* 2002; 73:582-587.
14. Testa G, Goldstein RM, Netto G et al. Long-term outcome of patients transplanted with livers from hepatitis C-positive donors. *Transplantation* 1998; 65:925-929.
15. Briceno J, Ciria R, Pleguezuelo M et al. Contribution of marginal donors to liver transplantation for hepatitis C virus infection. *Transplant Proc* 2007; 39:2297-2299.
16. Foster R, Zimmerman M, Trotter JF. Expanding donor options: marginal, living, and split donors. *Clin Liver Dis* 2007; 11:417-429.
17. Murcia J, Vazquez J, Lopez SM et al. Innovative techniques in pediatric liver transplantation: reduced-, split- and living-donor related liver transplantation. *Eur J Pediatr Surg* 1996; 6:152-154.
18. Tanaka K, Ogura Y. "Small-for-size graft" and "small-for-size syndrome" in living donor liver transplantation. *Yonsei Med J* 2004; 45:1089-1094.
19. Malago M, Testa G, Marcos A et al. Ethical considerations and rationale of adult-to-adult living donor liver transplantation. *Liver Transpl* 2001; 7:921-927.
20. Kyoden Y, Tamura S, Sugawara Y et al. Incidence and management of biliary complications after adult-to-adult living donor liver transplantation. *Clin Transplant* 2009.

21. Marsh JW, Gray E, Ness R et al. Complications of right lobe living donor liver transplantation. *J Hepatol* 2009; 51:715-724.
22. Renz JF, Yersiz H, Reichert PR et al. Split-liver transplantation: a review. *Am J Transplant* 2003; 3:1323-1335.
23. Monteiro E, Freire A, Barroso E. Familial amyloid polyneuropathy and liver transplantation. *J Hepatol* 2004; 41:188-194.
24. Feinfeld DA, Levine RD, Levine SD et al. Ligandin in perfusates from transplanted kidneys: a test for tubular necrosis. *Nephron* 1978; 21:38-41.
25. Codd JE, Garvin PJ, Morgan R et al. Allograft viability determined by enzyme analysis. *Transplantation* 1979; 28:447-450.
26. Stephenson TP, O'Donoghue EP, Hendry WF et al. Preservation of human kidneys for transplantation: preliminary results with a Gambro perfusion machine. *Br Med J* 1973; 1:379-381.
27. Opelz G, Terasaki PI. Advantage of cold storage over machine perfusion for preservation of cadaver kidneys. *Transplantation* 1982; 33:64-68.
28. Kootstra G, Daemen JH, Oomen AP. Categories of non-heart-beating donors. *Transplant Proc* 1995; 27:2893-2894.
29. REAL DECRETO 2070/1999 de 30 de Diciembre sobre "Obtención y utilización clínica de órganos humanos y la coordinación territorial en materia de donación y trasplante de órganos y tejidos" B.O.E. 4 de enero de 2000: 179-190. 69. Disponible en www.boe.es

30. Abt PL, Desai NM, Crawford MD et al. Survival following liver transplantation from non-heart-beating donors. *Ann Surg* 2004; 239:87-92.
31. Reich DJ, Munoz SJ, Rothstein KD et al. Controlled non-heart-beating donor liver transplantation: a successful single center experience, with topic update. *Transplantation* 2000; 70:1159-1166.
32. Casavilla A, Ramirez C, Shapiro R et al. Experience with liver and kidney allografts from non-heart-beating donors. *Transplantation* 1995; 59:197-203.
33. UNOS: United Network for Organ Sharing. Disponible en www.unos.org
34. Institute of Medicine, National Academy of Sciences. Non-heart-beating organ transplantation: medical and ethical issues in procurement. Washington, DC: National Academy Press, 1997.
35. Koogler T, Costarino AT, Jr. The potential benefits of the pediatric nonheartbeating organ donor. *Pediatrics* 1998; 101:1049-1052.
36. Kootstra G, Arnold RM, Bos MA, et al. Round table discussion on non-heart-beating donors. *Transplant Proc.* 1995; 27: 2935-2939.
37. Herdman R, Potts JT. Non-Heart-Beating Organ Transplantation: Medical and Ethical Issues in Procurement. Institute of Medicine, 1997.
38. Nathan HM, Jarrell BE, Broznik B et al. Estimation and characterization of the potential renal organ donor pool in Pennsylvania. Report of the Pennsylvania Statewide Donor Study. *Transplantation* 1991; 51:142-149.

39. Abt P, Crawford M, Desai N et al. Liver transplantation from controlled non-heart-beating donors: an increased incidence of biliary complications. *Transplantation* 2003; 75:1659-1663.
40. Alvarez J, del BR, Arias J et al. Non-heart-beating donors: estimated actual potential. *Transplant Proc* 2001; 33:1101-1103.
41. Nunez JR, Del RF, Lopez E et al. Non-heart-beating donors: an excellent choice to increase the donor pool. *Transplant Proc* 2005; 37:3651-3654.
42. Jimenez-Galanes S, Meneu-Diaz MJ, Elola-Olaso AM et al. Liver transplantation using uncontrolled non-heart-beating donors under normothermic extracorporeal membrane oxygenation. *Liver Transpl* 2009; 15:1110-1118.
43. Quintela J, Gala B, Baamonde I et al. Long-term results for liver transplantation from non-heart-beating donors maintained with chest and abdominal compression-decompression. *Transplant Proc* 2005; 37:3857-3858.
44. Tabet J, Garcia-Valdecasas JC, Rull R et al. Non-heart-beating donor pigs: the feasibility of liver donation. *Transplant Proc* 1997; 29:1374-1375.
45. Tabet J, Garcia-Valdecasas JC, Net M et al. Evaluation of ischemic liver injury during graft procurement from non-heart-beating donor pigs. *Transplant Proc* 1997; 29:3482-3483.
46. Lopez-Boado MA, Garcia-Valdecasas JC, Ordi J et al. Histological changes during and after liver transplantation from non-heart-beating donor pig. *Transplant Proc* 1997; 29:3471.

47. Gonzalez FX, Garcia-Valdecasas JC, Lopez-Boado MA et al. Adenine nucleotide liver tissue concentrations from non-heart-beating donor pigs and organ viability after liver transplantation. *Transplant Proc* 1997; 29:3480-3481.
48. Garcia-Valdecasas JC, Tabet J, Valero R et al. Liver conditioning after cardiac arrest: the use of normothermic recirculation in an experimental animal model. *Transpl Int* 1998; 11:424-432.
49. Net M, Garcia-Valdecasas JC, Deulofeu R et al. S-adenosyl L-methionine effect on hepatic allografts procured from non-heart-beating donor pigs. *Transplant Proc* 1999; 31:1063-1064.
50. Net M, Valero R, Almenara R et al. Hepatic preconditioning after prolonged warm ischemia by means of S-adenosyl-L-methionine administration in pig liver transplantation from non-heart-beating donors. *Transplantation* 2003; 75:1970-1977.
51. Lopez-Boado MA, Ordi J, Garcia-Valdecasas JC et al. L-arginine during liver procurement from non-heart-beating donor pigs: histological evaluation. *Transplant Proc* 1999; 31:1069.
52. Valero R, Garcia-Valdecasas JC, Net M et al. L-arginine reduces liver and biliary tract damage after liver transplantation from non-heart-beating donor pigs. *Transplantation* 2000; 70:730-737.
53. Barros-Schelotto P, Net M, Valero R et al. Reduced reperfusion injury by glycine in a porcine liver transplantation model with non-heart-beating donors. *Transplant Proc* 2002; 34:1114-1117.

-
54. Fondevila C, Hessheimer AJ, Ruiz A et al. Liver transplant using donors after unexpected cardiac death: novel preservation protocol and acceptance criteria. *Am J Transplant* 2007; 7:1849-1855.
 55. Monbaliu D, Crabbe T, Roskams T et al. Livers from non-heart-beating donors tolerate short periods of warm ischemia. *Transplantation* 2005; 79:1226-1230.
 56. Takada Y, Taniguchi H, Fukunaga K et al. Hepatic allograft procurement from non-heart-beating donors: limits of warm ischemia in porcine liver transplantation. *Transplantation* 1997; 63:369-373.
 57. Basile J, Busuttil A, Sheiner PA et al. Correlation between von Willebrand factor levels and early graft function in clinical liver transplantation. *Clin Transplant* 1999; 13:25-31.
 58. Monbaliu D, Vekemans K, Hoekstra H et al. Multifactorial biological modulation of warm ischemia reperfusion injury in liver transplantation from non-heart-beating donors eliminates primary nonfunction and reduces bile salt toxicity. *Ann Surg* 2009; 250:808-817.
 59. Yska MJ, Buis CI, Monbaliu D et al. The role of bile salt toxicity in the pathogenesis of bile duct injury after non-heart-beating porcine liver transplantation. *Transplantation* 2008; 85:1625-1631.
 60. van Esch JS, Tustas RY, Robson SC et al. Recipient levels and function of von Willebrand factor prior to liver transplantation and its consumption in the course of grafting correlate with hepatocellular damage and outcome. *Transpl Int* 2005; 18:1258-1265.

61. Monbaliu D, Libbrecht L, De VR et al. The extent of vacuolation in non-heart-beating porcine donor liver grafts prior to transplantation predicts their viability. *Liver Transpl* 2008; 14:1256-1265.
62. Lopez-Boado MA, Garcia-Valdecasas JC, Ordi J et al. Histological changes during and after liver transplantation from non-heart-beating donor pig. *Transplant Proc* 1997; 29:3471.
63. Ma Y, Wang GD, Wu LW et al. Dynamical changing patterns of histological structure and ultrastructure of liver graft undergoing warm ischemia injury from non-heart-beating donor in rats. *World J Gastroenterol* 2006; 12:4902-4905.
64. Monbaliu D, van PJ, De VR et al. Primary graft nonfunction and Kupffer cell activation after liver transplantation from non-heart-beating donors in pigs. *Liver Transpl* 2007; 13:239-247.
65. Kannerup AS, Gronbaek H, Funch-Jensen P et al. Cytokine changes during warm ischemia and reperfusion of the pig liver with or without preconditioning. *Eur Surg Res* 2009; 42:216-222.
66. Oikawa K, Ohkohchi N, Sato M et al. Kupffer cells play an important role in the cytokine production and activation of nuclear factors of liver grafts from non-heart-beating donors. *Transpl Int* 2002; 15:397-405.

