

TRASPLANTE HEPÁTICO EXPERIMENTAL EN EL CERDO
CON DONANTE A CORAZÓN PARADO.
EFECTO DE DIVERSAS MODIFICACIONES DE LA BOMBA
DE DERIVACIÓN CARDIOPULMONAR
DURANTE LA RECIRCULACIÓN SOBRE LA VIABILIDAD DEL
INJERTO HEPÁTICO

PILAR SANTOS CIDÓN

**TRASPLANTE HEPÁTICO EXPERIMENTAL EN EL CERDO
CON DONANTE A CORAZÓN PARADO.
EFECTO DE DIVERSAS MODIFICACIONES DE LA BOMBA
DE DERIVACIÓN CARDIOPULMONAR
DURANTE LA RECIRCULACIÓN SOBRE LA VIABILIDAD
DEL INJERTO HEPÁTICO**

TESIS PRESENTADA POR

Pilar Santos Cidón

para optar al grado de doctor en Medicina

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE MEDICINA

Barcelona, Febrero de 2009

*A mi familia,
por estar incondicionalmente a mi lado
con infinita paciencia*

AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento para:

El **Prof. Dr. Ricard Valero**, médico del *Servei d'Anestesiologia i Reanimació del Hospital Clínic de Barcelona* y codirector de la tesis, por brindarme la oportunidad de trabajar en esta línea, por su dedicación, confianza, paciencia, su enorme sentido crítico y común y, sobre todo, por su inestimable amistad.

El **Prof. Dr. Juan Carlos García-Valdecasas**, jefe del grupo de investigación de trasplante hepático en donantes a corazón parado, Catedrático de Cirugía de la *Universitat de Barcelona* y codirector de la tesis, por la confianza depositada en mí, su apoyo siempre que lo he requerido y por su capacidad para desarrollar en la práctica lo que inicialmente parecía una utopía.

La **Prof. Dra. Carmen Gomar**, Catedrática de Anestesiología de la *Universitat de Barcelona*. Su etapa como jefa del *Servei d' Anestesiologia i Reanimació del Hospital Clínic de Barcelona* marcó profundamente mi formación como anestesióloga. Su inagotable capacidad de trabajo, dedicación, rigurosidad y entereza son un ejemplo a seguir.

El **Dr. Alejandro Miranda**, jefe del Servicio de Anestesiología del *Institut Dexeus de Barcelona*, por todas las facilidades que me brindó al inicio de mi etapa como especialista, al permitirme compaginar el trabajo asistencial con el de investigación.

El **Prof. Dr. Antonio Montero**, jefe del *Departament de Cirurgia* de la *Facultat de Medicina de Lleida*. La etapa en la que fue jefe del *Servei d' Anestesiologia de l'Hospital Universitari de Bellvitge* me permitió simultanear la tarea asistencial con la de investigación. Su talante, facilitador de las circunstancias individuales, conciliador y dialogante, fue inestimable en aquella etapa, a la par que definitivo, para que este trabajo viese la luz.

El **Prof. Dr. Antoni Sabaté**, jefe del *Servei d' Anestesiologia de l' Hospital Universitari de Bellvitge*, por la confianza que depositó en mí, su admirable inteligencia y capacidad de trabajo.

El **Dr. Julián Roldan**, jefe del *Servei d' Anestesiologia de l' Hospital General de Catalunya*, por su afectuosa acogida, su talante y su peculiar sentido de la vida. Todo ello le hace un jefe "diferente".

Los cirujanos, **Dr. Pablo Barros, Dr. Gonzalo López, Dr. Miguel Ángel López-Boado, Dr. Ernest Bombuy, Dra. Ester Mans, Dra. Joana Ferrer y Dra. Gemma Sugranyes**, por su dedicación, interés y buen hacer quirúrgico, sin los cuales este trabajo habría sido imposible.

A los Drs. **Ángel Ruiz, Ana Vilarrodona y Camino Rodríguez**, así como a todo el personal del Servicio de Coordinación de Trasplantes del Hospital Clínic, por su ayuda inestimable al colaborar activamente en la fase del donante durante todo el proceso de la recirculación.

Marc Net, Doctor en Bioquímica, por su gran sentido crítico, espíritu científico, compañerismo y por todas las horas compartidas en la preparación de las memorias de las becas FISS y Marató TV3 que nos acompañaron durante tres años.

Lluís Capdevila, veterinario becario del grupo de investigación por su sentido práctico, constancia y responsabilidad.

Florencia Suárez, becaria bioquímica de nuestro grupo, por su rigurosidad, sentido del orden y responsabilidad. Su marcha destacó su discreta pero indispensable labor.

El **Dr. Ramón Deulofeu y a la Dra. Montserrat Elena**, del *Servei de Bioquímica de l' Hospital Clínic de Barcelona*, por su colaboración en las determinaciones bioquímicas, su gran paciencia y recomendaciones.

Loli Jaén, técnico del laboratorio de bioquímica, por su eficacia, su amabilidad, capacidad de trabajo y profesionalidad. Sin ella la fase final hubiese sido enormemente complicada.

La **Dra. Rosa Miquel**, del *Servei d'Anatomía Patològica de l'Hospital Clínic de Barcelona*, por su colaboración en el procesamiento de las biopsias hepáticas. Su gran profesionalidad va paralela a la amabilidad y disposición que ha demostrado siempre.

La **Dra. América Jiménez**, del *Servei d'Estabulari de la Facultat de Medicina de la Universitat de Barcelona*, por su ayuda inestimable, su rigurosidad y su espíritu de colaboración.

Todos los becarios de cirugía, enfermería del bloque quirúrgico, técnicos de los laboratorios de urgencias, bioquímica y anatomía patológica y Criobarna del *Hospital Clínic*, así como a todo el personal del estabulario de la *Facultat de Medicina de la Universitat de Barcelona* por su buen hacer profesional, valor humano y su buen humor.

Todas y cada una de las personas que me han aportado enseñanzas, vivencias, puntos de vista, cariño y apoyo durante este largo camino.

* * * * *

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	19
1.1. Reseña histórica del trasplante.....	21
1.2. Trasplante hepático. Problemática y alternativas al déficit de injertos	23
1.3. Los donantes a corazón parado.....	29
1.3.1. Definición, clasificación y marco legal.....	29
1.3.2. Situación actual de los donantes a corazón parado.....	31
1.3.3. Lesión por isquemia-preservación-reperfusión en el injerto hepático	36
1.3.4. Sistemas defensivos frente a la isquemia-preservación-reperfusión.....	50
1.3.4.1. Sistemas fisiológicos.....	50
1.3.4.2. Utilización de sustancias citoprotectoras.....	54
1.3.4.3. Utilización de métodos de perfusión	58
1.4. Bases de la recirculación normotérmica.....	62
1.4.1. Circulación extracorpórea.....	62
1.4.2. Fisiopatología de la circulación extracorpórea a nivel sistémico.....	64
1.4.3. Fisiopatología de la circulación extracorpórea a nivel hepático	68
1.4.4. Recirculación normotérmica y donante a corazón parado.....	73
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	79
3. MATERIAL Y MÉTODOS	89
3.1. Definición, sujetos y ámbito del estudio.....	91
3.2. Grupos de estudio	92
3.3. Procedimientos en el donante y el receptor	94
3.4. Tiempos de estudio	102
3.5. Variables de estudio	104
3.6. Análisis estadístico.....	116

4. RESULTADOS.....	117
4.1. Aplicación de tres tipos de flujo de bomba durante la recirculación.....	119
4.2. Prolongación de la recirculación normotérmica	151
4.3. Supresión del periodo de recirculación hipotérmica	175
4.4. Adición de dobutamina durante la recirculación	197
4.5. Valor pronóstico del flujo de bomba y la hemodinámica hepática.....	223
5. DISCUSIÓN.....	227
5.1. Aplicación de tres tipos de flujo de bomba durante la recirculación.....	229
5.2. Prolongación de la recirculación normotérmica	241
5.3. Supresión del periodo de recirculación hipotérmica	246
5.4. Adición de dobutamina durante la recirculación	250
5.5. Valor pronóstico del flujo de bomba variable y la hemodinámica hepática	254
5.6. Tiempo de isquemia caliente.....	256
6. CONCLUSIONES	261
7. BIBLIOGRAFÍA	267
8. ANEXOS	311
8.1. Glosario de abreviaturas.....	313
8.2. Comunicaciones a congresos.....	316
8.3. Becas.....	317

***Lo que no somos capaces de cambiar
debemos, por lo menos, describirlo***

Rainer Werner Fassbinder

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Reseña Histórica del Trasplante

El trasplante de órganos, tal y como lo concebimos en la actualidad, constituye un logro terapéutico cuya historia apenas cuenta con un siglo. No obstante, se tiene noticia de los trasplantes, al menos documentalmente, gracias a un tratado de cirugía plástica escrito por un médico de Bolonia: Gaspare Tagliacozzi (1545-1599) quién describió en su tratado “*De Curtorum Chirurgia*” (Cirugía de la mutilación y del injerto; primera edición 1597) la técnica del trasplante de piel autógeno, a partir de un colgajo cutáneo del antebrazo, para la reconstrucción de las amputaciones de la nariz.¹

La era moderna de los trasplantes surgió a principios del siglo XX como una práctica experimental. Las investigaciones de Alexis Carrel (1873-1944) y de Charles Guthrie (1880-1963) en la Universidad de Chicago sobre las suturas vasculares permitieron la realización con éxito del primer trasplante heterotópico cardíaco en 1901, al suturar los grandes vasos de un corazón donante a la carótida y la yugular de un perro receptor que permaneció latiendo varias horas. Dichas investigaciones le valieron a Carrel el Premio Nobel de Medicina en 1912.²

Posteriormente numerosas aportaciones científicas contribuyeron a su avance y consolidación, como el descubrimiento de los grupos sanguíneos en 1901 por Karl Landsteiner (1868-1943),³ el desarrollo de la inmunología a partir de los trabajos de Elie Metchnikoff, (1854-1916) sobre la teoría de la inmunidad celular y de Paul Ehrlich (1854-1915), sobre la *Teoría general de la inmunidad y de la tolerancia de lo propio*,⁴ lo que permitió la puesta a punto del tipaje de los tejidos. Otras contribuciones decisivas fueron la creación de los sistemas de soporte pre-trasplante como la diálisis, las bombas de perfusión para la circulación extracorpórea (CEC),⁵ la introducción de las soluciones de preservación (Beltzer-Collins, 1960) y la medicación inmunosupresora.

El trasplante hepático tuvo su inicio de forma experimental, primero en perros^{6, 7} y posteriormente en cerdos,⁸ presentando en éste, a diferencia del trasplante de piel o de riñón, una sorprendente ausencia de fenómenos agudos por rechazo.⁹

El primer trasplante hepático en humanos fue realizado con éxito en Denver (EE. UU) por T. Starzl en 1963.¹⁰ En Europa fue Sir R. Calne, de la Universidad de Cambridge, cuya experiencia provenía del trasplante renal, quién en 1968 realizó el primer trasplante hepático.¹¹ Aunque los resultados iniciales mostraron una supervivencia de los receptores por debajo del 30% al año, la mejora en las técnicas quirúrgicas y los casos aislados de mayor supervivencia alentaron a proseguir investigando en ese campo.

Los años setenta supusieron una etapa de experimentación en aspectos tales como la técnica quirúrgica, la fase anhepática, el manejo anestésico, la incorporación de los shunts extracorpóreos y las técnicas de preservación.

En la década de los ochenta destacaron dos avances decisivos. Por un lado el descubrimiento de la Ciclosporina A (CsA)^{12, 13} y su inclusión en todos los protocolos de inmunosupresión a escala mundial. Y por otro lado, la incorporación de la derivación veno-venosa externa o bypass, que contribuyó al mantenimiento del estado hemodinámico del paciente.¹⁴

En España, desde el primer trasplante hepático en 1984, realizado en el Hospital de Bellvitge por Margarit y Jaurrieta,¹⁵ hasta el año 2006 se han incluido en el Registro Español de Trasplante Hepático un total de 13.790 trasplantes, de los que 1118 fueron retrasplantes (8,1%), constituyendo la indicación más frecuente la cirrosis hepatocelular sin hepatocarcinoma (59,9%), cuya etiología predominante se asocia al alcohol (29,8%).¹⁶

1.2. Trasplante Hepático: Problemática y Alternativas al Déficit de Injertos

El trasplante de hígado es el tratamiento de elección para los pacientes con insuficiencia hepática terminal o preterminal ya que permite su curación en casi el 90% de los casos.¹⁷ En los últimos años, a pesar del creciente aumento de las donaciones, se ha producido un mayor incremento de las indicaciones y por tanto, de los potenciales receptores, causando un déficit de órganos permanente. Parte del incremento de las indicaciones se ha debido al aumento de la infección por el virus de la hepatitis C (VHC), al causar hepatitis crónica asociada a cirrosis, incrementar la incidencia del hepatocarcinoma así como la recurrencia de la hepatitis C en hígados trasplantados. Ésta última es responsable de una de cada tres muertes en pacientes VHC en el seguimiento a largo plazo.¹⁸

Aunque España tiene una situación privilegiada en cuanto a la tasa de donación, cifrada en 33,8 donantes/millón habitantes/ durante el año 2006 y la más alta del mundo, se calcula que las necesidades de las listas de espera precisarían una tasa de donación de 50 donantes/millón habitantes/año.¹⁹

En nuestro país durante 2006 se realizaron 1051 trasplantes hepáticos, (tasa anual de 23,5 pmp) desestimándose tras la extracción 289 hígados. El fallecimiento de los pacientes en lista de espera electiva fue del 7,5 % y en lista de espera urgente supuso el 4,5%.¹⁶

Los esfuerzos destinados a incrementar el número de donantes son diversos y abarcan todas las fases del trasplante. La creación de la figura del **coordinador de trasplantes** ha permitido fundamentalmente el aumento de las donaciones gracias a la detección de donantes potenciales. Además garantiza un sistema operativo de comunicación entre las unidades generadoras de donantes (intra y extrahospitalariamente), los equipos trasplantadores y los

receptores en lista de espera, tiene un papel decisivo en la obtención del consentimiento familiar y judicial y promueve una valiosa función de concienciación social sobre el tema.

Otro de los aspectos es la ***diversificación de los tipos de donantes***. Los programas iniciales de trasplante solo utilizaban los donantes a corazón parado o en asistolia ya que el diagnóstico de muerte se basaba en la *ausencia de latidos cardíacos y de respiración espontánea*. El desarrollo de la ventilación asistida en el contexto de la medicina intensiva generó el concepto de *muerte encefálica*, definida como *la pérdida irreversible de las funciones cerebrales, tanto corticales como troncoencefálicas, en ausencia de hipotermia y/o fármacos depresores del sistema nervioso central, que conlleva a la pérdida de la función cardiocirculatoria y respiratoria, las cuales son mantenidas por métodos artificiales*.²⁰ La aceptación consensuada de la muerte encefálica en el ámbito clínico y posteriormente legal, permitió la extracción de los órganos antes de que se produjese la asistolia lo que mejoró su calidad al evitarse la lesión por isquemia caliente. Ello hizo que los donantes a corazón parado fueran sustituidos por los donantes a corazón latiente (DCL) que actualmente siguen constituyendo la principal fuente de donantes.

Hoy en día se incluyen en los programas de trasplante los *donantes cadáver de tejidos*, los más numerosos a nivel intra y extrahospitalario y potencialmente generadores de tejidos como piel, huesos, córneas, cartílago o válvulas cardíacas, y los *donantes vivos*, que donan un tejido regenerable como sangre o médula ósea, un órgano sólido como el riñón, el segmento lateral izquierdo del hígado o la cola de páncreas para receptores infantiles.

Mediante la ***ampliación de los criterios del donante ideal*** ha sido posible la inclusión de mayor número de donantes. Ello ha dado paso al denominado *donante marginal*, que constituye el 70% de los donantes, frente a un 30% de donantes ideales. Los criterios del donante marginal no se hallan consensuados por todos los equipos de trasplante y además están en permanente evolución.²¹

En el donante marginal pueden concurrir las características particulares del individuo previas al proceso que lo convirtió en donante (edad, factores de riesgo de arteriosclerosis como diabetes o hipertensión arterial e infecciones como hepatitis por VHB o VHC), las derivadas del ingreso en la unidad de críticos hasta el momento de la muerte (estado hemodinámico, soporte farmacológico con aminas simpaticomiméticas, datos bioquímicos como el aumento del sodio, transaminasas o bilirrubina y el tiempo de estancia en UCI) u otras circunstancias como el tiempo de isquemia fría (IF) prolongado, los donantes a corazón parado o los injertos procedentes de receptores de trasplante (órgano dominó) entre otros.²²

La utilización de donantes marginales en el trasplante hepático se ha asociado a un aumento de la morbi-mortalidad por fallo primario del injerto y retraso en la función del injerto identificándose numerosos factores de riesgo independientes. Éstos incluyen la esteatosis macrovesicular,²³ el tiempo de IF superior a 10 horas,^{24, 25} la dosificación de aminas simpaticomiméticas,²⁶ la asociación de varias aminas,²⁴ los valores altos de bilirrubina,²⁷ la hipernatremia,^{28, 25} el tiempo prolongado de estancia en UCI ^{24, 27} y el sobrepeso.²⁹ La edad es un factor controvertido ya que se ha vinculado a un aumento de la mortalidad^{23, 30} y a menor supervivencia del injerto y de los receptores³¹ en algunas series mientras que en otras, el uso de donantes de edad superior a 60 o incluso 70 años no se ha asociado a incrementos de la morbi-mortalidad.^{32, 33, 34} No obstante, parece que la combinación de más de tres factores marginales tendría un efecto aditivo, no solo en la lesión del injerto,^{25, 35} sino en la limitación para el tiempo de IF.³⁶

Entre los factores del donante marginal, los asociados a mejor pronóstico son la infiltración grasa microvesicular media y moderada,²⁷ la diabetes mellitus y la serología positiva para los virus VHB o VHC, específicamente utilizados para receptores seropositivos VHB o VHC.³⁷

Un caso particular de la ampliación de los criterios del donante ha permitido la realización del *trasplante hepático dominó* al utilizar el hígado extraído de un paciente con amiloidosis familiar que recibe un injerto hepático, para trasplantar a un receptor cuya esperanza de vida sea inferior al tiempo necesario para desarrollar la amiloidosis, es decir, entre 20 y 30 años.³⁸

El desarrollo de ***nuevas técnicas quirúrgicas*** ha conseguido una mejor utilización de los órganos disponibles. Las primeras experiencias sobre reducción de injertos hepáticos se dieron en trasplantes urgentes obtenidos de donantes adultos que debían adaptarse a receptores pediátricos. Ello condujo al conocimiento de la anatomía hepática y dio paso a las técnicas de partición hepática o de *“split liver”* en las que el hígado de un donante cadáver se utilizó para trasplantar a dos receptores.³⁹ Ello derivó en el *trasplante hepático de donante vivo*, realizado por primera vez en 1990 a un receptor pediátrico al que se le implantó un segmento lateral de un hígado adulto⁴⁰ y posteriormente a un receptor adulto al que se le trasplantó el lóbulo hepático derecho de un donante adulto vivo.⁴¹

El *split liver* se ha asociado a mayor número de complicaciones biliares y vasculares⁴² y menor supervivencia del injerto,⁴³ aunque con una adecuada selección del receptor constituye una buena alternativa, sobre todo en el trasplante pediátrico, en el que la escasez de donantes con menos de 15 Kg de peso es aún inferior a la del resto de donantes, aunque su utilización todavía es escasa e irregular en la mayoría de países.⁴²

El trasplante hepático de donante vivo presenta como inconveniente la morbimortalidad asociada al donante y la menor supervivencia del injerto cuando la edad, tanto de los donantes, como de los receptores, es superior a los 50 años.⁴⁴

En España, de los 1051 trasplantes hepáticos realizados durante 2006, 990 correspondieron a donantes en muerte encefálica y los 61 restantes se realizaron a expensas de

18 donantes vivos, 26 *split liver* (0,015%), 6 trasplantes dominó y 11 procedentes de donantes a corazón parado, los cuales contribuyeron a un 5% de las donaciones.¹⁶

El **desarrollo de fármacos inmunosupresores** ha disminuido la morbimortalidad asociada al rechazo agudo y crónico y el descenso de la tasa de retrasplante. La primera combinación inmunosupresora con azatioprina y corticoides fue utilizada por Calne⁴⁵ en el tratamiento del rechazo renal y extrarrenal. La utilización sistemática de la CsA⁴⁶ a partir de los años ochenta consiguió disminuir la tasa de rechazo agudo al combinarse con prednisona, al tiempo que se mantenía la capacidad defensiva frente a las infecciones bacterianas. Esto mejoró la supervivencia de los pacientes permitiendo que el trasplante se consolidase como el tratamiento de elección de las enfermedades hepáticas terminales.^{47, 48}

Posteriormente otros inmunosupresores han conseguido reducciones significativas en la tasa del rechazo agudo como el tacrolimus o FK 506,^{49, 50} el ácido micofenólico^{51, 52} y el sirolimus o rapamicina.⁵³ El uso combinado de estos agentes en dosis inferiores ha permitido un tratamiento alternativo en casos de toxicidad renal o neurológica por CsA o tacrolimus^{54, 55} así como la disminución de la toxicidad y los efectos secundarios.^{56, 57} La aparición de estos fármacos también ha beneficiado a los casos de rechazo crónico, situado en torno al 5%⁵⁸, al ampliarse las alternativas en los casos de intolerancia a la CsA o la azatioprina.

En los últimos años cabe destacar el desarrollo de **sistemas artificiales y bioartificiales de apoyo hepático** que se utilizan en situación de insuficiencia hepática aguda, como “puente” para el trasplante hepático o para facilitar la recuperación de la insuficiencia hepática aguda o crónica en fase aguda.

Estos dispositivos son capaces de eliminar toxinas, sintetizar productos como factores de coagulación y albúmina y revertir el proceso inflamatorio del hígado.⁵⁹ Inicialmente se basaron en el uso de hemodiálisis, hemofiltración y hemoperfusión. En la actualidad se trata de

sistemas bioartificiales de apoyo que utilizan hepatocitos vivos colocados dentro de un biorreactor a través del cual la sangre del paciente es bombeada a un circuito extracorpóreo. Los hepatocitos pueden ser xenógenos (porcinos) o humanos (células de hepatoblastoma bien diferenciado).^{60,61} Por el momento parece que la indicación beneficiaría solo a los pacientes con insuficiencia hepática crónica en fase aguda.⁶²

* * * * *

1.3. Los Donantes a Corazón Parado

1.3.1. Definición, Clasificación y Marco Legal

Los **Donantes a corazón parado (DCP)** se definen como aquellos donantes que han sufrido una parada cardiorrespiratoria irre recuperable, en los cuales el tiempo estimado de isquemia caliente (IC), es decir, desde que se ha producido la parada cardiaca hasta el inicio de la perfusión fría, es suficientemente reducido como para obtener órganos viables para el trasplante. Según la clasificación de Maastricht se dividen en cuatro categorías.⁶³

- **Categoría I: Ingreso cadáver a la llegada al hospital:** Pacientes que son llevados al hospital cuya muerte se ha diagnosticado fuera del mismo, sin realización de maniobras de resucitación.
- **Categoría II: Reanimación cardiopulmonar inefectiva:** Pacientes en los que las maniobras de resucitación tras sufrir una parada cardiorrespiratoria resultan ineficaces. Incluye la mayoría de los DCP en España. Los tipos I y II se denominan “*donantes no controlados*” (DCPNC) ya que la muerte ocurre de forma súbita, fuera o dentro del hospital, y el tiempo transcurrido desde la parada cardiaca se desconoce exactamente.
- **Categoría III: A la espera de la parada cardiaca:** Pacientes con daño cerebral irreversible, sin criterios de muerte encefálica. Tras ser llevados a quirófano, se desconectan del soporte ventilatorio a la espera de que ocurra la parada cardiaca. Este grupo plantea un importante problema ético ya que se decide la obtención de los órganos antes del diagnóstico de muerte. Actualmente no está aceptado en nuestro entorno, pero es el grupo de DCP mayoritario en Holanda y EE UU.

Para Kootstra esta categoría de donante permite la “*donación de DCP controlada*” (DCPC) lo cual significa que el tiempo de IC es muy corto y el hígado, páncreas e incluso los pulmones, pueden utilizarse para el trasplante.⁶⁴

- **Categoría IV: Durante el diagnóstico de muerte encefálica:** Pacientes con diagnóstico de muerte encefálica que sufren una parada cardiaca durante el proceso diagnóstico de muerte encefálica o durante el tiempo de espera previo a la extracción. En general ello se precede de importante inestabilidad hemodinámica y es relativamente previsible, por lo que también se incluyen en los DCPC. En Japón, a pesar de tener legalizada la extracción tras el diagnóstico de muerte encefálica, éstos constituyen la fuente principal de donantes.

Los DCPNC constituirían la mayor fuente de donantes potenciales, estimada en unos 5000/año⁶⁵ y los DCPC aportarían unos 1000 injertos/año para el trasplante.⁶⁶

En España, la legislación sobre trasplantes entró en vigor en 1979 con la Ley de Trasplantes.⁶⁷ Así quedó regulada la donación en el donante vivo y en el cadáver al contemplarse explícitamente la muerte encefálica. No obstante quedaba un vacío legal con el uso de DCP. La utilización clínica habitual de este tipo de donantes⁶⁸ dio paso a la adecuación legislativa respecto a los donantes en asistolia al elaborarse el Real Decreto 2070/1999, vigente en la actualidad, en el que se recogió, además del diagnóstico de muerte encefálica adaptado a las pruebas diagnósticas actuales, el de muerte por parada cardiorrespiratoria, así como todas las maniobras encaminadas al mantenimiento de la viabilidad y la preservación de los órganos extraídos de este tipo de donantes.⁶⁹

1.3.2. Situación Actual de los Donantes a Corazón Parado

Los DCP fueron la única fuente de donantes cadáver en los años sesenta, hasta la definición y aceptación de los criterios de muerte encefálica publicados por el grupo de Harvard en 1968.²⁰ Posteriormente, tras su abandono en favor de los DCL, volvieron a considerarse como alternativa para incrementar las donaciones, aunque en países como Japón, donde la muerte encefálica fue aceptada legalmente en 1999, los resultados a largo plazo de los injertos procedentes de los DCP han sido satisfactorios.⁷⁰

Los órganos que pueden ser funcionalmente suplidos por un sistema alternativo, como ocurre con el riñón y la diálisis, permitieron asumir órganos procedentes de DCP, aunque presentasen retardo en el inicio de la función o incluso disfunción primaria. Ello hizo que el uso de riñones de DCP se extendiese consiguiendo incrementos de las donaciones entre dos y cinco veces⁷¹ lo que, según estimaciones de Kootstra, supondría hasta un 20% adicional si se incluyesen rutinariamente en los programas de trasplante.⁷² Los resultados clínicos muestran, en general, mayor incidencia de función retardada del injerto⁷¹ y de ausencia de función primaria,⁷³ pero son equiparables a los obtenidos del DCL en cuanto a la función y la supervivencia del injerto a largo plazo, tanto si se trata de DCPC^{74, 75} como DCPNC.⁷¹ Sin embargo, se sigue considerando al DCP como un donante subóptimo respecto al DCL, a pesar de que algunos estudios experimentales en modelos murinos de trasplante renal y hepático postulan que fenómenos de rechazo agudo y crónico podrían hallarse en relación con la cascada inflamatoria inespecífica tiempo-dependiente desencadenada por la muerte encefálica^{76, 77, 78} y determinar un número no despreciable de episodios de ausencia y retardo de la función primaria del injerto.

El uso de injertos hepáticos de DCP es más controvertido ya que la IC adicional incrementa el riesgo de fallo primario del injerto, principalmente a causa de la lesión por

Isquemia-Reperusión (IR), situación que también se produce en los órganos de DCL y que contribuye a la mortalidad global.^{79, 80} La mayor sensibilidad de la vía biliar a la IC respecto al hepatocito compromete la viabilidad del injerto si ésta se extiende más allá de 20 min⁸¹ y es causa del incremento de la morbimortalidad en este tipo de donantes.⁸² Otras limitaciones importantes se deben a la inexistencia tanto de pruebas diagnósticas precoces con valor pronóstico sobre la viabilidad del injerto⁸³ como de sistemas suplentes de la función hepática si el injerto no es funcionante tras el trasplante. Finalmente, el uso de DCPC plantea el problema ético del tiempo necesario de suspensión entre la vida y la muerte. Existen varios protocolos con diferentes tiempos de espera (entre los 2 min del protocolo de Pittsburg y los 10 min del protocolo de Maastricht) desde la parada cardíaca hasta el inicio de la extracción de los órganos que se justifican para confirmar la irreversibilidad del presunto diagnóstico de muerte.⁶⁴

A pesar de todo lo anterior existen experiencias clínicas con el uso de injertos hepáticos de DCP y la tendencia actual demuestra que con una adecuada selección de los donantes, los receptores y la minimización de los factores de riesgo asociados a mal pronóstico, los resultados son progresivamente favorables y comparables en supervivencia a largo plazo a los injertos de DCL.^{84, 85} La contribución de los DCP al aumento de los trasplantes hepáticos oscila entre un 1,2%⁸⁶ y un 10%,^{87, 88} dependiendo de las series.

Los resultados de los estudios clínicos muestran notables diferencias según se obtengan de DCPNC o de DCPC, los cuales presentan resultados generalmente más favorables.

El uso de órganos de **DCPNC** es controvertido cuando pertenecen a la categoría I de Maastricht porque el tiempo de IC se desconoce. Los donantes tipo II de Maastricht permiten descartar aquellos casos con un período excesivo de IC previo al inicio de las maniobras de resucitación. Casavilla presentó una serie con ocho injertos hepáticos obtenidos de DCPC y seis injertos de DCPNC. Los hígados de DCPC de la categoría III de Maastricht mostraron un

100% de funcionalismo en la primera semana postrasplante y una supervivencia actuarial al año del paciente y del injerto del 50% para ambos. Los hígados obtenidos de donantes de la categoría II de Maastricht, con un tiempo medio de IC hasta el inicio de la perfusión fría de 37 min (DE de 29 min) funcionaron en un 50% a la primera semana postrasplante, aunque con un valor más elevado de ALT, y el 50% restante requirió postrasplante. La supervivencia actuarial al año del injerto y del receptor fue respectivamente del 67% y 17%.⁸⁹ Un trabajo posterior de Otero presentó la experiencia con 20 trasplantes hepáticos obtenidos de DCPNC de la categoría II de Maastricht frente a 256 trasplantes realizados con hígados procedentes de DCL. Los injertos de los DCPNC estuvieron sometidos a un tiempo máximo de IC no superior a 130 min. La supervivencia actuarial a los dos años de seguimiento del paciente y del injerto fue, respectivamente, del 80% y del 55%, mientras que en los trasplantes de DCL ambas supervivencias coincidieron (73%). No hubo ningún caso de trombosis arterial y a pesar de producirse complicaciones biliares mayores en 6 casos ninguno precisó retrasplante.⁹⁰

Los estudios con **DCPC** están realizados mayoritariamente con donantes de la categoría III de Maastricht. El grupo de Manzarbeitia mostró en un estudio retrospectivo los resultados de ocho trasplantes hepáticos procedentes de DCPC (categoría III, tiempo medio de IC 3-27 min e inicio de la perfusión fría 3-5 min) obteniendo una supervivencia del injerto y del receptor más allá del año del 100%, sin complicaciones.⁸⁷ El mismo grupo, en otro trabajo posterior, estudió comparativamente las complicaciones y la tasa de supervivencia a los dos años de los trasplantes hepáticos realizados a expensas de DCPC (19 casos) y de DCL. Obtuvieron un porcentaje de retrasplante de un 10,5% debido a la ausencia de función primaria en un caso y otro por causa biliar. La supervivencia del paciente fue del 85,3% y se hallaron complicaciones biliares y vasculares en un 15,6% y 10,5% respectivamente, sin observar diferencias significativas respecto a los trasplantes con DCL.⁸⁴

En un estudio de diseño similar D'Alessandro valoró las complicaciones y la supervivencia del receptor y del injerto en 19 trasplantes de hígado obtenidos de DCPC respecto a los resultados obtenidos en 364 injertos hepáticos de DCL. No halló diferencias significativas ni en la supervivencia del receptor (80,9%) ni en las complicaciones biliares y vasculares, pero sí observó mayor incidencia de ausencia de función primaria (10,5% vs 1,3%) y menor supervivencia del injerto (53,8% vs 80,8%).⁹¹

Actualmente existen trabajos como los de Muiesan que han utilizado los DCPC para trasplantes hepáticos convencionales y para el trasplante pediátrico mediante la técnica de *split liver* con unos resultados muy favorables. Una de las series estudió 32 trasplantes hepáticos (un *split liver*) obtenidos de DCPC de hasta 65 años de edad. Todos mostraron una correcta función, exceptuando el caso procedente del lóbulo derecho del *split liver* y una supervivencia del injerto y del paciente del 87% y 84% respectivamente, a los 15 meses de seguimiento.⁹² El estudio con una serie de siete niños sometidos a trasplante hepático con injertos segmentarios de hígados de DCPC (edad media del donante inferior a 40 años, tiempo de IC inferior a 30 min y de isquemia fría de 7,3 horas) obtuvo una supervivencia del 100% a los 20 meses del injerto y del receptor. Estos autores proponen este tipo de donantes para paliar el déficit aún más acusado de injertos hepáticos para los receptores infantiles.⁹²

Sin embargo, el estudio de Abt que analizó retrospectivamente una serie de 15 trasplantes hepáticos de DCPC (IC: 20 ± 6 min) respecto a 221 receptores de DCL halló un aumento significativo de la aparición de complicaciones mayores biliares (DCPC: 33%, DCL: 9,5%) aunque no se hallaron diferencias en la supervivencia media actuarial del paciente y del injerto a uno y tres años en la tasa de rechazo y el incremento de aminotransferasas y bilirrubina en los primeros 90 días post-trasplante.⁸² El mismo autor realizó un estudio posterior en el que siguió la cohorte de receptores (1993 hasta 2001) de injertos hepáticos

(27.000) procedentes de DCL y de DCP (DCPC: 117 casos, DCPNC: 11 casos, 16 casos: no especificado). La supervivencia del injerto en los DCP a los 60 días postrasplante fue significativamente más corta que en los DCL, pero la supervivencia valorada a 1 y 3 años fue menor en los DCP, aunque no significativa. Al separar a los DCP entre DCPC y DCPNC obtuvo una supervivencia del injerto similar y sólo los DCP no especificados presentaron peores resultados a 1 y 3 años.⁸⁵ Un reciente estudio retrospectivo que analizó los resultados de 10 trasplantes con injertos hepáticos procedentes de DCPNC (categoría II de Maastricht) y tratados mediante RN mostró una adecuada función postrasplante en 8 casos, produciéndose la pérdida de dos injertos a causa de ausencia de función primaria y de trombosis arterial.⁹³

Los factores asociados a mayor riesgo de fallo primario del injerto incluyen el tiempo de IF, el tiempo de IC y la edad. El trabajo de Abt halló que el tiempo de IF fue el factor de riesgo asociado a mayor incidencia de fallo primario del injerto durante los primeros 60 días post-trasplante. Los tiempos inferiores a 8 horas se asociaron a un 10,8% de fallo primario y cada hora de incremento aumentó el riesgo un 17%, lo que supuso una incidencia de fallo primario en injertos con más de 8 horas de preservación en frío del 30,4%, llegando hasta el 58,3% con preservaciones de más de 12 horas.⁸⁵ Sin embargo, para otros autores un tiempo de IF menor o igual a 10 horas se asociaría a buen pronóstico.^{94, 95}

Con el tiempo de IC los resultados han sido variables y se propusieron mejores resultados con tiempos inferiores a 15 min,^{95, 96, 88} entre 15 y 30 min^{86, 94} y 45 min⁹⁷ utilizando técnicas de enfriamiento rápido y recirculación normotérmica. La IC es responsable de la lesión de la vía biliar en la que se dan dos tipos de complicaciones: las de mayor incidencia son las de tipo anastomótico, (11-40%) se deben a problemas de técnica quirúrgica y se localizan en la unión de la colédoco-coledocostomía provocando fugas de líquido biliar.^{98, 99} Las complicaciones de tipo estenótico se agrupan bajo la denominada colangiopatía isquémica, se

asocian con mayor frecuencia a la IC⁹⁹ aunque también se asocian a deficiente aporte vascular, trombosis arterial, IF prolongada, rechazo o infección.¹⁰⁰ Su localización puede hallarse en la unión anastomótica y a nivel intrahepático, llegando a constituir hasta un 66% si los injertos proceden de DCP.⁸²

Sobre la edad del donante también aparecen discrepancias en cuanto al punto de corte. Parece que edades inferiores se asociarían a mejores resultados, así para Lee el factor más importante asociado a un pobre resultado del injerto fue la edad superior a 45 años, sobre todo añadido a un mal estado preoperatorio del receptor.⁹⁵ En otro trabajo la edad límite asociada a factor predictor precoz del fallo del injerto se situaría por encima de los 60 años.⁸⁵ Contrariamente a esto, los autores que compararon la supervivencia del injerto respecto a la edad en dos grupos de DCPC (edad inferior a 55 años, 20 trasplantes y edad superior o igual a 55 años, 5 trasplantes) hallaron que ésta fue superior en el grupo edad superior a 55 (80% vs 70%). Cabe destacar que el tiempo de IF fue corto en ambos grupos, pero aún menor en el grupo de mayor edad (5,4 h y 7,3 h respectivamente).¹⁰¹

1.3.3. Lesión por Isquemia-Preservación-Reperfusión en el Injerto Hepático

La lesión ***por isquemia*** se debe al desequilibrio entre el aporte y el consumo de oxígeno. En los órganos destinados al trasplante se producen distintas noxas asociadas al tipo de donante y al procedimiento en sí. La situación más favorable es la del donante vivo, al minimizarse el tiempo de la IF. La situación intermedia se da en el órgano del DCL, con un periodo de IF (isquemia e hipotermia) durante la preservación y otro breve, de IC, debido al lavado con suero caliente para la eliminación de detritus y solución preservadora. La situación más desfavorable es la del órgano de DCP con una lesión debida a la IC que aparece a causa de

la parada cardíaca. En todos los casos existe una lesión final debida a la reperfusión del injerto con sangre caliente oxigenada.

La preservación clásica de los órganos destinados al trasplante se basa en la combinación de dos estrategias para combatir la lesión por isquemia: mediante *la hipotermia* se reduciría de forma considerable el metabolismo basal, la actividad de los sistemas enzimáticos celulares y el consumo de ATP y oxígeno y con la utilización de *soluciones preservadoras* se permitiría el aporte de sustratos para el mantenimiento de la homeostasis celular.

La ***hipotermia*** proporciona protección en situación de isquemia al disminuir el metabolismo celular entre 1,5 y 2 veces por cada 10°C de descenso de la temperatura, aunque se produzca una actividad metabólica considerable incluso a 1°C.¹⁰² En la práctica clínica, el enfriamiento del hígado desde 37°C a 4°C permitiría extender entre 12 y 13 horas el tiempo de preservación.¹⁰³ No obstante, la hipotermia es capaz de provocar lesión “*per se*”, aunque se produzca un aporte adecuado de oxígeno, mediante edema o muerte celular, tanto en cultivos celulares de hepatocitos,¹⁰⁴ como de células endoteliales.¹⁰⁵ El edema se produciría por la inactivación de la homeostasis de los iones intracelulares alterando el equilibrio electroquímico de la membrana celular y mitocondrial.¹⁰⁶ La muerte celular se debería a apoptosis en hepatocitos y células endoteliales, de forma temprana durante la fase de reperfusión, y a necrosis en hepatocitos, en una fase más tardía post-reperfusión. El grado de apoptosis en ambas líneas celulares sería tiempo-dependiente y parece que el mecanismo lesional se asociaría a la formación de radicales libres, mostrando un efecto protector la hipoxia, el AMPc¹⁰⁷ y el uso de antioxidantes y quelantes de los iones. En las células endoteliales los iones intracelulares causarían la lesión, mientras que en los hepatocitos esta asociación sería tan solo parcial.¹⁰⁸

La lesión asociada a los radicales libres de oxígeno (RLO) estaría mediada por el denominado “*pool intracelular de iones redox-activos quelables*”, formado por iones no-heme y no-

ferritina. Éstos son quelables por compuestos de bajo peso molecular como el ATP, fosfato, citrato e incluso proteínas o lípidos y catalizan la formación de radicales hidroxilo (OH) altamente reactivos. Durante la hipotermia la producción de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y de anión superóxido (O₂⁻) está disminuida, pero se ha constatado un incremento muy marcado del *pool redox-activo* que, mediante la producción de radical hidroxilo, explicaría la apoptosis por RLO asociada a la hipotermia.¹⁰⁹

En el hígado la combinación de **hipotermia e hipoxia** afectaría sobre todo a las células no parenquimatosas (endotelio sinusoidal, macrófagos residentes o células de Kupffer, células del epitelio biliar y los pericitos perivascuales o células de Ito),¹¹⁰ aunque los hepatocitos también se verían afectados. Las células endoteliales mostrarían inicialmente retracción y aumento de tamaño de las fenestraciones de la línea endotelial, haciendo que las prolongaciones que contactan con las microvellosidades del hepatocito fueran adelgazando hasta romperse, descamándose hacia la luz sinusoidal, aunque la muerte celular se produciría con posterioridad.¹¹¹

El mecanismo y la gravedad de la lesión sinusoidal y parenquimatosa parecen ser tiempo-dependientes, cómo demuestran diversos estudios experimentales con modelos de injertos hepáticos murinos preservados a 4°C.^{112 113, 114} Existirían diversos mecanismos lesionales como la pérdida de la homeostasis de los iones, objetivable por el edema que aparece en las células endoteliales, el cual es reversible si el periodo de IF no supera las 4 horas. Cuando finalmente se produce la muerte celular ésta puede deberse a un mecanismo de apoptosis, predominante en las células endoteliales, incluso con periodos tan cortos como 1 hora. El otro mecanismo se debería a necrosis, aparecería tanto en las células endoteliales como en los hepatocitos y se asociaría a periodos más largos de IF, estimándose 16 horas para las células endoteliales y de 24 a 48 horas para los hepatocitos. También se ha observado otro

tipo de muerte celular activa denominada *muerte celular autofágico-lisosomal* que en condiciones normales constituye un sistema proteolítico implicado en el recambio de proteínas y organelas celulares y que parece inducirse no solo por un periodo prolongado de IF, sino por la fase temprana de la reperfusión. Los hepatocitos afectados por este proceso presentan numerosas vacuolas lisosomiales y, tras sufrir degeneración, son fagocitados por las células de Kupffer en la fase tardía de la reperfusión.¹¹⁵ El efecto combinado de disfunción de la célula endotelial y de la microcirculación puede acabar alterando la función del hepatocito.¹¹⁶

Las soluciones preservadoras, destinadas a contrarrestar los efectos nocivos de la isquemia y la hipotermia, muestran una efectividad limitada respecto al tiempo de preservación. La aparición de la solución de la Universidad de Wisconsin®¹¹⁷ (UW) mejoró la preservación hepática respecto a la solución de Collins, al permitir incrementar el tiempo de preservación de forma segura entre 12 y 24 horas.^{103, 118, 119} A pesar de ello, tras 12 horas de preservación aumenta la incidencia de complicaciones biliares,¹⁰⁰ empeora la funcionalidad del injerto y desciende la supervivencia.¹²⁰ La efectividad de la preservación en frío con UW durante periodos tan largos como 24 horas es mucho mayor para el hepatocito que para la célula endotelial hepática,¹²¹ pero parece que la gran ventaja radicaría en la capacidad de contrarrestar la lesión endotelial con mayor eficacia que otras soluciones de menor viscosidad como Celsior o HTK (Histidina-Triptófano-Cetoglutarato).¹²²

En el hígado la lesión producida por la ***isquemia caliente*** afecta predominantemente al hepatocito aunque las células endoteliales también se afecten. En situación de IC se produce un aumento del estrés oxidativo,¹¹² gran disfunción mitocondrial¹²³ y la alteración del citoesqueleto.¹²⁴ La gravedad de la lesión sería tiempo-dependiente y estaría relacionada estrechamente con el tiempo de IF posterior como demuestran diversos estudios experimentales con diferentes modelos animales.

Entre los *estudios con un modelo porcino* Schön observó buena tolerancia del hepatocito a periodos de IC de hasta 60 min con una buena función posterior.¹²⁵ Takada estudió periodos de IC entre 0 y 90 min y un periodo de IF de 4 horas en solución de Euro-Collins y halló como tiempo límite para la supervivencia los 60 min de IC, ya que todos los animales sometidos a 90 min fallecieron antes de los 4 días. Así mismo todos los animales supervivientes mostraron una completa recuperación de la carga energética y del ATP una hora después de la reperusión a diferencia de los no supervivientes.¹²⁶

Para Monbaliu períodos de IC de 0, 15, 30, 45 y 60 min y 4 horas de preservación en HTK dieron un periodo máximo aceptable de IC de 15 min compatible con una correcta función postrasplante. Los hígados sometidos a 30 y 45 min de IC presentaron ocasionalmente buena función y supervivencia y ninguno de los hígados sometidos a 60 min de IC sobrevivió a causa de ausencia de función primaria.¹²⁷

Qing evaluó el efecto de 10, 20 y 30 min de IC y su relación con el tiempo máximo de IF en UW. Para ello asignó al grupo de 10 min de IC los periodos de IF más prolongados (20, 24 y 28 horas), al grupo de 20 min de IC periodos de IF intermedios (12, 16 y 20 horas) y al grupo de 30 min de IC los periodos de IF más cortos (6, 10 y 14 horas). Obtuvo supervivencias del 100% a los 7 días post-trasplante en todos los grupos de IC cuando el tiempo de IF fue el menor de todos los asignados, es decir, con 10, 20 y 30 min de IC los tiempos máximos de preservación fueron de 20, 12 y 6 horas respectivamente.¹²⁸

El grupo del Hospital Clínic evaluó la lesión hepatocitaria, endotelial, el estado energético celular, la histología hepática y la supervivencia utilizando periodos de IC de 20, 30 y 40 min en el que intercaló un periodo de recirculación normotérmica de 30 min antes del enfriamiento corporal total. Concluyeron que la supervivencia, el daño histológico y la lesión de la vía biliar fueron inversamente proporcionales al periodo de IC cuando se utilizó la

recirculación normotérmica (100%, 70% y 50% respectivamente) y nula aún con periodos de IC de 20 min cuando no se asoció recirculación normotérmica.^{81, 129, 130, 131.}

Los estudios con *modelo experimental murino* también mostraron resultados dispares. He y colaboradores evaluaron la supervivencia a la semana, al mes y a los 3 meses, los cambios histológicos, de ultraestructura celular, de microcirculación, función hepatocitaria, sinusoidal, metabolismo energético y morbilidad post-trasplante hepático con periodos de IC de 0, 10, 15, 20, 30, 45 y 60 min. Hallaron que la lesión hepática fue reversible con tiempos inferiores a 30 min de IC respecto a todas las variables estudiadas. Con 45 min de IC se produjo una alteración importante de la microcirculación y éste se consideró como el tiempo máximo tolerable. Con 60 min de IC, tanto la funcionalidad como los daños estructurales fueron irreversibles y la supervivencia de los receptores a la semana solo fue del 8,3% y nula al mes.¹³²

El trabajo de Richter utilizó periodos de IC de 30 y 60 min respectivamente y observó la perfusión microvascular por fluorescencia para valorar un sistema de perfusión por gravedad arterial respecto a un sistema dual (arterial y venoso-portal) concluyendo que el tiempo máximo de IC en el que se pudo obtener el 100% de la perfusión acinar fue de 30 min. Los hígados sometidos a 60 min de IC mostraron al menos un déficit del 50% de la perfusión acinar y sinusoidal.¹³³

El mecanismo de la **lesión celular por isquemia** se debe a la transformación del metabolismo aerobio en anaerobio aunque, en la IF, se produce el incremento en la glucólisis¹³⁴ y una gran reducción de la fosforilación oxidativa y de la producción de ATP.

El descenso de la pO_2 se seguiría de un descenso en la concentración de ATP. Ambos fenómenos alterarían la respiración mitocondrial, mediada por la *ATP-asa* mitocondrial, e inducirían la liberación del Ca^{2+} mitocondrial al citosol produciendo un primer pico de Ca^{2+} intracitoplasmático así como la alteración de la bomba Na^+/K^+ -dependiente.^{123, 135} El segundo

incremento se debería a la entrada pasiva de Ca^{2+} por aumento de Na^+ intracitoplasmático haciendo que el sistema de transporte activo de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -ATP-dependiente actuase de forma inversa. Este aumento del Ca^{2+} activaría diversos sistemas enzimáticos¹²³ (*proteasas Ca^{2+} -dependientes*, que favorecería la aparición de radicales libres, *caspasa* que induciría la apoptosis celular, *fosfolipasa A_2* que generaría eicosanoides y PAF (factor activador plaquetar) que alteraría la cadena de transporte de electrones, la actividad de las *ATP-ases* y de las *translocasas*). Por este mecanismo la *xantina-deshidrogenasa* que cataboliza el paso de hipoxantina a xantina y ácido úrico, se transformaría en *xantina-oxidasa*, la cual en presencia del oxígeno aportado durante la reperfusión, liberaría anión superóxido contribuyendo al daño celular.¹³⁶

La alteración de la bomba Na^+/K^+ ATP-dependiente, localizada en la membrana plasmática, provocaría el aumento del Na^+ intracelular, por entrada pasiva y por activación del intercambio Na^+/H^+ , para contrarrestar la acidosis. El Na^+ arrastraría H_2O y además se produciría la salida pasiva de K^+ para mantener el equilibrio electroquímico del espacio extracelular, causando edema intracelular.¹³⁷ Además, descendería el pH intracelular por el incremento del lactato y por la salida de protones desde las vesículas intracelulares ricas en hidrogeniones (H^+).¹³⁸ Ello estimularía la activación del sistema Na^+/H^+ favoreciendo el aumento del Na^+ intracitoplasmático. La acidosis intracelular constituiría un mecanismo protector de adaptación frente a la hipoxia. En los hepatocitos retrasaría la muerte celular¹³⁹ y en las células endoteliales sinusoidales inhibiría la oxidación del NADPH, retrasando la pérdida del potencial de membrana mitocondrial y la muerte celular.^{140, 141} También aparecería un decremento en la disponibilidad de los precursores de ATP (ADP y AMP), a consecuencia del catabolismo aumentado del AMP en oxipurinas (adenosina, inosina, hipoxantina), las cuales serían permeables a la membrana celular lo que provocaría la depleción del AMP celular.¹⁴²

Figura 1.

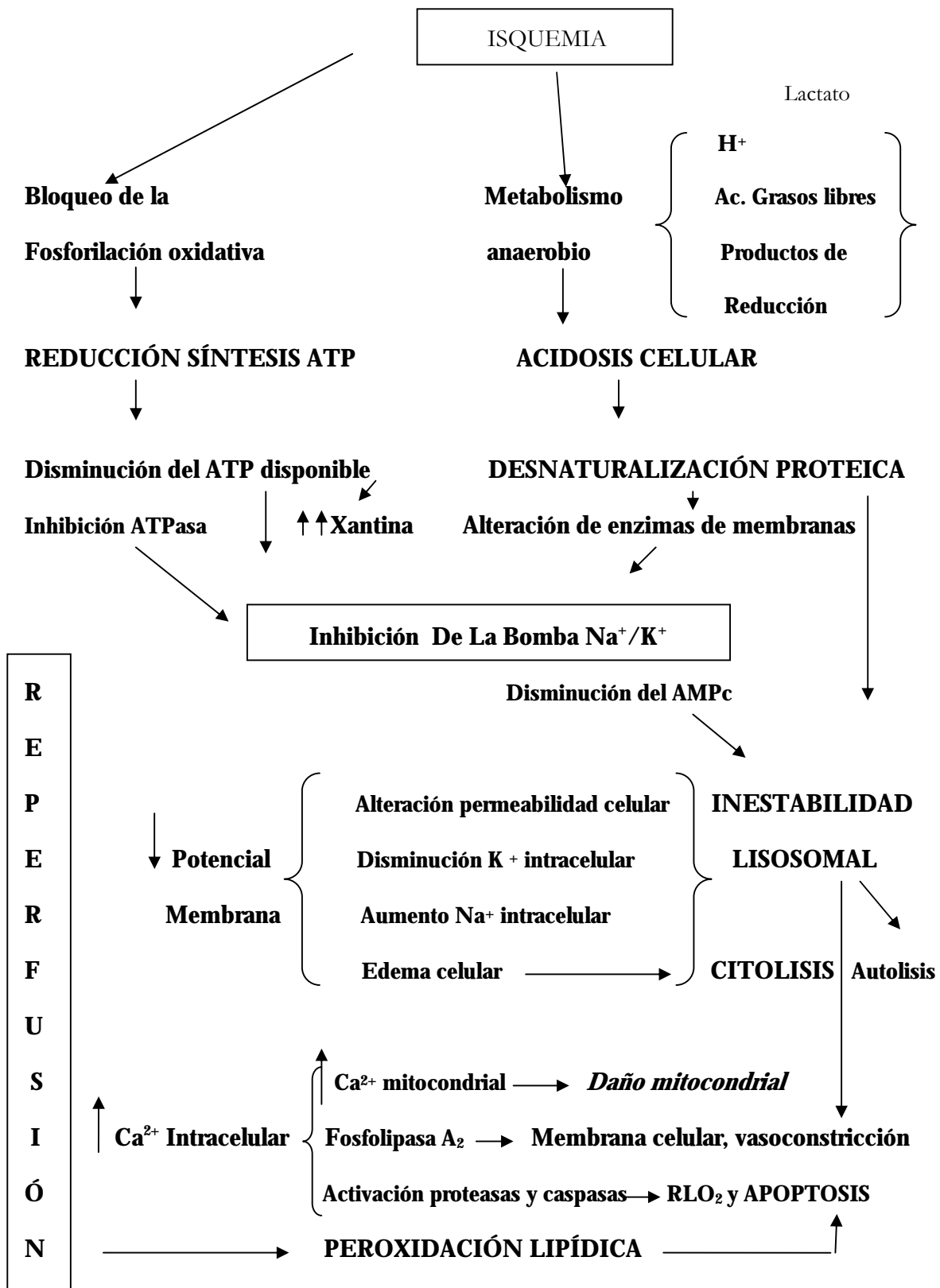


Figura 1. Esquema de la lesión por isquemia. RLO₂: Radicales libres de oxígeno.

En el hígado, la **lesión por reperfusión** se caracteriza por ser un fenómeno inflamatorio de predominio no parenquimatoso (células endoteliales y de Kupffer) que se desarrolla en dos fases. La fase precoz comprende desde el inicio de la reperfusión hasta la tercera o cuarta hora posterior. El evento principal sería la activación de las células de Kupffer lo que provocaría la producción de RLO,¹⁴³ la activación del complemento¹⁴⁴ y el reclutamiento y activación de linfocitos residentes. En la fase tardía (6-24 horas), las células de Kupffer activadas producirían citoquinas proinflamatorias como el TNF α , interleuquinas (IL-1 e IL-6), quimioquinas, mediadores vasoactivos como el óxido nítrico (NO) o las endotelinas, las moléculas de adhesión¹⁴⁵ y el complemento activado que favorecerían la adhesión y posterior infiltración de polimorfonucleares neutrófilos (PMN).¹⁴⁶⁻¹⁴⁹ La adhesión leucocitaria precisaría, además, de la expresión de receptores en la membrana endotelial. Estos receptores, denominados moléculas de adhesión, están constituidos por las ICAM-1 o moléculas de adhesión intercelular, las VCAM-1 o moléculas de adhesión vascular y la P-Selectina y L-Selectina, que son una de las principales señales de adhesión leucocitaria.^{150, 151} La síntesis de estas moléculas está inducida por citoquinas (TNF o factor de necrosis tumoral, IL-1) y eicosanoides (leucotrienos B₄ y C₄).¹⁵² El esquema se muestra en la *Figura 2*.

La activación y adhesión de las plaquetas se produce por la expresión de P-Selectina en la membrana plasmática de la plaqueta y se asociaría a la reducción del flujo sanguíneo. Esta proteína de membrana de los α -gránulos plaquetarios se distribuye hacia la membrana plasmática durante la activación y la desgranulación plaquetaria. La P-selectina favorece la agregación leucocitaria y plaquetaria existiendo correlación entre el grado de adherencia y la intensidad de la lesión por preservación.¹⁵³

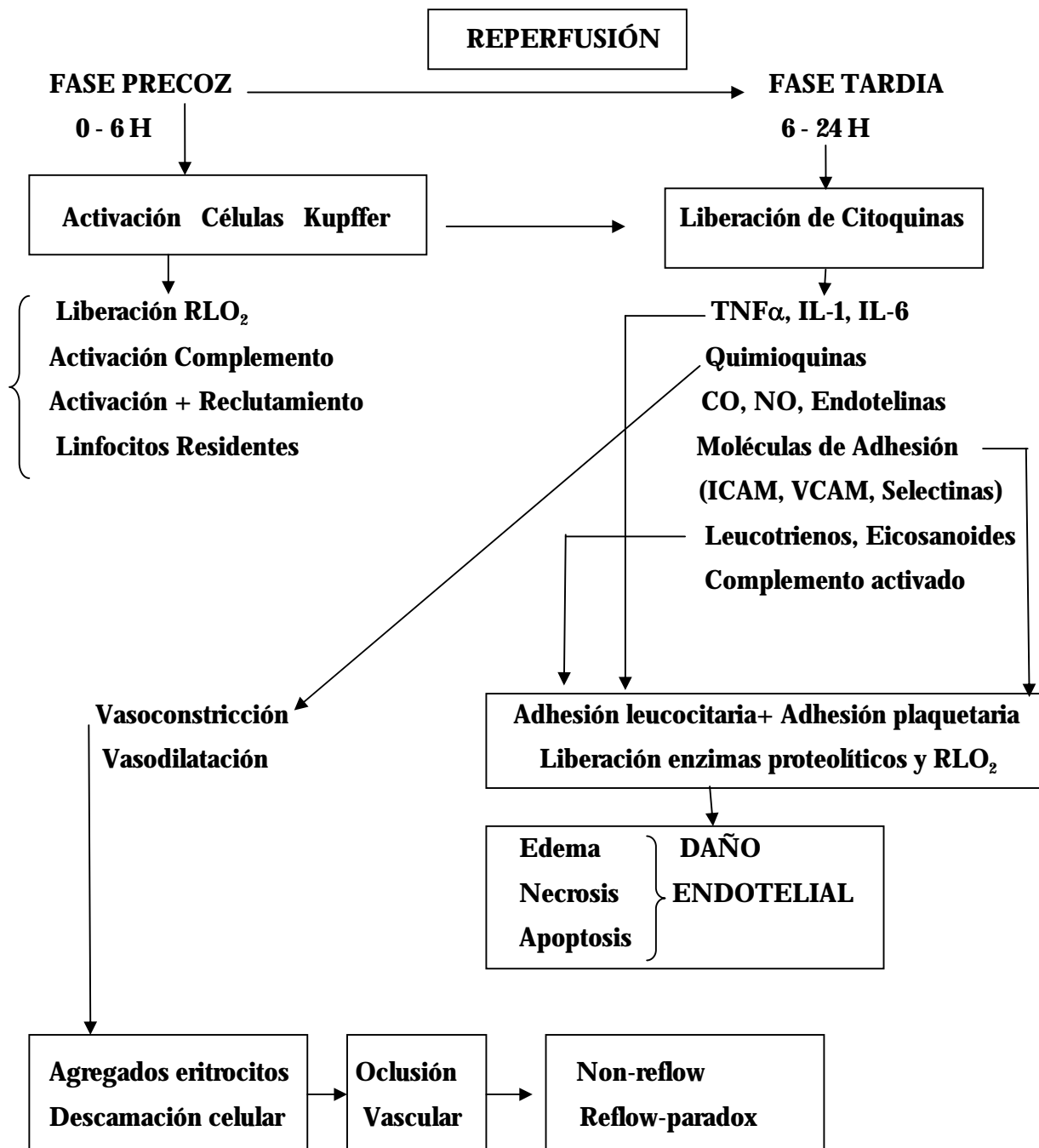


Figura 2. Esquema que representa la lesión por reperfusión. TNF α : Factor de necrosis tumoral alfa, IL: Interleukinas, CO: monóxido de carbono, NO: óxido nítrico, RLO₂: radicales libres de oxígeno

Los leucocitos, una vez adheridos al endotelio vascular, emigran y se agregan alrededor de las células endoteliales o bien, atraviesan la barrera endotelial hacia el espacio extravascular. Tras ser activados producen lesión mediante diferentes mecanismos bien establecidos. Uno de ellos es por la liberación de gran cantidad de enzimas proteolíticas¹⁵⁴ como la *colagenasa*, la *elastasa* y la *gelatinasa* que actúan a largo plazo dañando la microcirculación y provocando el acumulo intraluminal de detritus celulares.¹⁴⁷ El otro mecanismo se debe a la producción de RLO que actúan directamente como citoquinas sobre los hepatocitos y son responsables del daño endotelial precoz. Se origina por el ataque precoz del radical hidroxilo (OH) a los dobles enlaces de las colas hidrofóbicas de los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas, provocando su lipoperoxidación.¹⁵⁵ La alteración de la permeabilidad de la membrana causa edema intracelular y lisis que, junto a la lesión de las proteínas, contribuye a la necrosis tisular. Además se produce muerte celular por apoptosis en las células endoteliales por un efecto sinérgico entre plaquetas y leucocitos, adheridos a los endotelios sinusoidales y activados inicialmente por las células de Kupffer.¹⁵⁶

Existen, además, otras dos fuentes productoras de RLO. Una de ellas se da en el interior de la mitocondria hepática y la otra la ejerce el enzima *xantina-oxidasa* (XO), el cual genera radical superóxido (O_2^-) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) durante la oxidación de la hipoxantina¹⁵⁷ (*Figura 3*). Ambos favorecen el reclutamiento y la adhesión de los PMN al endotelio y el aumento del Ca^{2+} intracelular, responsable de la activación de la *fosfolipasa A*, hidrolizando los fosfolípidos de membrana y generando eicosanoides (TxA_2 , PGI_2), de acción vasoconstrictora, y el PAF que activa también a los PMN.¹⁵⁸

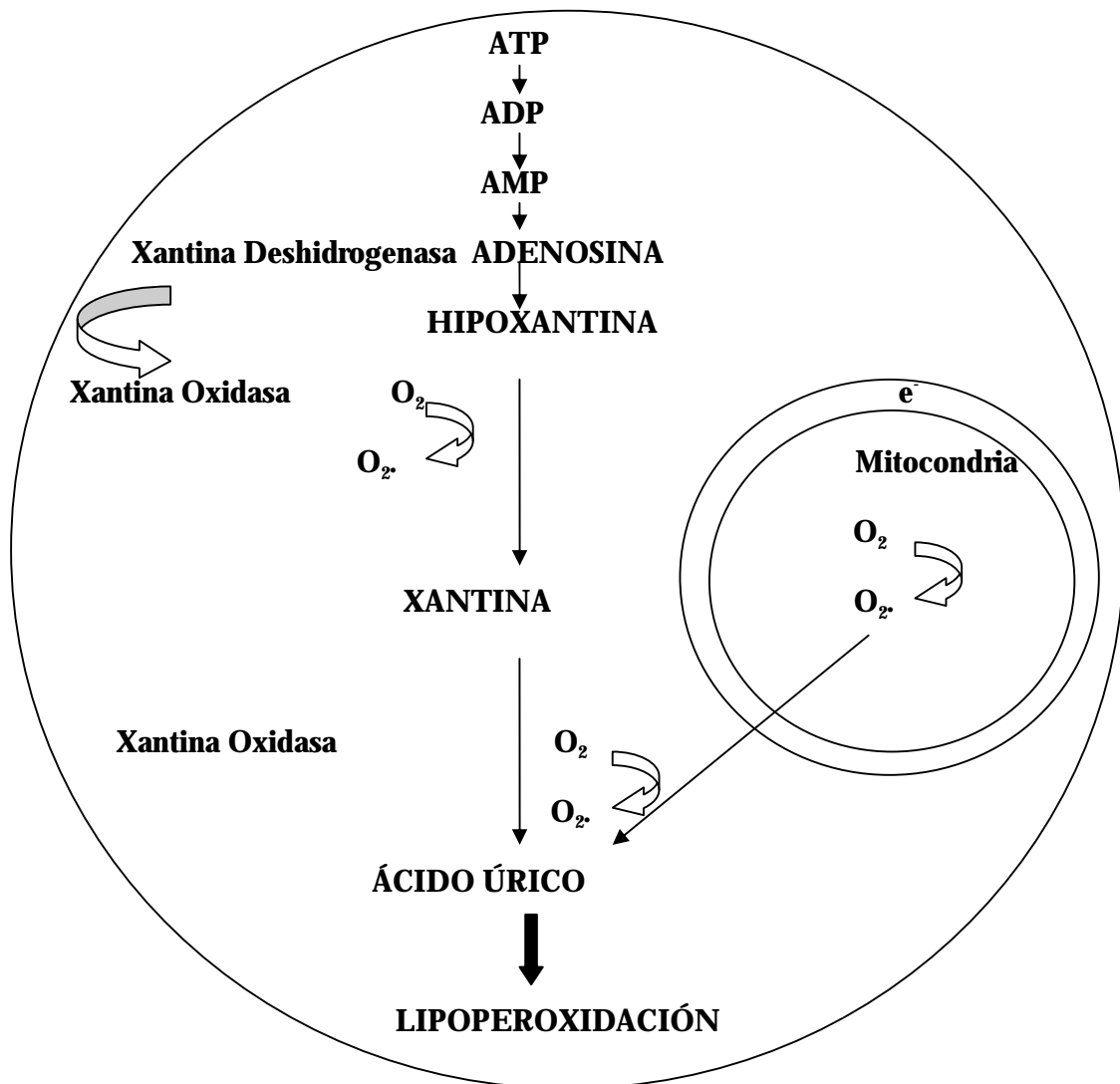


Figura 3. Esquema del proceso de generación de radicales libres en condiciones de isquemia por la acción del enzima xantina oxidasa, con el daño de la membrana celular por lipoperoxidación.

Los RLO derivados de las células de Kupffer podrían activar factores de transcripción redox-sensibles, tales como el NF- κ B (factor nuclear- κ B) y el activador-proteína 1 (AP-1) en las células endoteliales y hepatocitos, activando genes proinflamatorios y añadiéndose al daño existente.¹⁵⁹ El NF- κ B regularía la expresión de algunos genes implicados en la fase temprana de la inflamación y podría tener una doble función, bien protectora, al promover la regeneración hepática y evitar la apoptosis, o lesiva, contribuyendo a la respuesta inflamatoria por IR. Parece que un periodo prolongado de IF se relacionaría con una expresión aumentada de TNF- α , citokinas neutrófilo-dependientes e ICAM-1 mediadas por el NF- κ B, contribuyendo a la infiltración leucocitaria post-reperusión.¹⁶⁰

El efecto neto de la lesión por reperusión es la ***afectación de la microcirculación***, con una reducción del diámetro sinusoidal. El efecto mecánico se debe al estrechamiento de la luz sinusoidal. Ello es a causa de la edematización de las células endoteliales, al ensanchamiento del espacio de Disse por la disminución de la presión oncótica intersticial, al acumulo intraluminal de eritrocitos y células endoteliales descamadas y a la infiltración sinusoidal de PMN y de eritrocitos por disrupción de la integridad sinusoidal. Ello conduce a la compresión de los capilares provocando fenómenos de *non-reflow* o de falta de revascularización tras la reperusión.^{103, 161} Además se produce un fenómeno de vasoconstricción por el predominio en la producción de endotelinas, de acción vasoconstrictora, respecto al NO, de acción vasodilatadora. Las endotelinas se liberan por las células endoteliales sinusoidales, las células de Kupffer y los pericitos en respuesta a estímulos como la hipoxia, RLO, citokinas inflamatorias y lipopolisacáridos bacterianos.¹⁶² La reperusión puede interrumpirse a causa de la vasoconstricción causando el fracaso postisquémico secundario de la revascularización o *reflow paradox*.¹⁶³

Los monóxidos gaseosos como el NO o el CO (monóxido de carbono) regularían el flujo hepático, principalmente en situación de estrés. El CO es producido en el hígado por la acción del enzima *heme-oxigenasa*. De éste existen dos isoformas, la *heme-oxigenasa-1* o forma inducible por una gran variedad de estímulos como la liberación de citoquinas o la IR, y la *heme-oxigenasa-2* o forma constitutiva, presente fisiológicamente en el hígado y la de mayor actividad. El CO generado en el hígado podría alcanzar los sinusoides e inducir relajación de las células de Ito y, por tanto, del tono sinusoidal, preservando o agravando la integridad microvascular hepática.¹⁶⁴ Ambos fenómenos vendrían mediados, al menos en parte, por la liberación de RLO y conducirían a hipoxia hepatocitaria y necrosis, causando tanto la disfunción como la ausencia de función primaria del injerto.¹⁶⁵

1.3.4. Sistemas Defensivos Frente a la Isquemia-Preservación-Reperfusión

1.3.4.1. Sistemas fisiológicos

Se deberían a la activación de sistemas enzimáticos que degradan productos nocivos como los RLO, la síntesis de moléculas con acciones vasodilatadora, anti-adhesión y anti-activación leucocitaria, inhibidoras de apoptosis como las “señales de supervivencia”, el enzima *heme-oxigenasa* o el preconditionamiento isquémico.

De entre los enzimas implicados en la degradación de los RLO destacan la *superóxido-dismutasa*, la *catalasa* y la *glutación-peroxidasa*, todos ellos sintetizados a nivel de las células endoteliales.¹⁶⁶

La **síntesis de moléculas** activada por condiciones de estrés incluye numerosas sustancias con diferentes acciones. Los eicosanoides (PGI₂, E₁, E₂)¹⁶⁷ disminuyen la agregación y la activación leucocitaria y tienen acción vasodilatadora mejorando la hipoxia durante la IF. El NO es un radical libre con una vida media de sólo unos segundos que se sintetiza en las células endoteliales vasculares a partir del aminoácido L-Arginina mediante la enzima *óxido nítrico sintetasa*.¹⁶⁸ Tiene efecto secuestrador del radical superóxido, es vasodilatador e inhibe la agregación plaquetar así como la adhesión leucocitaria¹⁶⁹ al disminuir la expresión de las moléculas de adhesión.^{170, 171} En el hígado, el NO parece tener efecto protector sobre la lesión microvascular causada por la isquemia-reperfusión (IR).¹⁷²⁻¹⁷⁴

Las denominadas “**señales de supervivencia**” incluirían la liberación de TNF α (factor de necrosis tumoral), cuya acción vehiculizaría la apoptosis mediada por *caspasas* además de inducir la activación de los factores de transcripción NF-kB y AP-1.¹⁷⁵ Los genes regulados por dichos factores codifican productos necesarios para la supervivencia celular como

proteínas antiapoptóticas (Bcl-2) y enzimas protectores como la *oxídonítricosintetasa inducible* o la *superóxido dismutasa*. La liberación de las interleukinas IL-1 o IL-6 mediante la inducción de la síntesis de proteínas de fase aguda en los hepatocitos también se consideraría una señal de supervivencia.¹⁷⁶

El **precondicionamiento isquémico** (PI) permitiría inducir cierta tolerancia a una noxa, generalmente isquémica, mediante la exposición repetida a breves periodos de la misma. Fue descrito inicialmente por Noble¹⁷⁷ y más tarde se utilizó para designar la protección endógena del miocardio frente a la isquemia prolongada cuando previamente se habían producido oclusiones temporales y breves de las arterias coronarias, con un efecto de disminución del área de necrosis isquémica.¹⁷⁸

Diversos estudios experimentales, basándose en la conocida tolerancia del hígado a la IC, han demostrado que periodos repetidos de isquemia seguidos de reperfusión inducen sobre éste un efecto citoprotector.^{179, 180} Recientemente se ha publicado un ensayo clínico prospectivo con hígados procedentes de DCP a los que se les realizó un clampaje del hilio durante 10 min, inmediatamente antes de la extracción del órgano. Se observó que, aunque los marcadores de daño hepático incrementaron significativamente respecto al grupo control (sin PI), el grado de apoptosis fue significativamente inferior al grupo con PI. Aunque, de forma no significativa, los hígados tratados con PI mostraron mayor incidencia de fallo primario del injerto.¹⁸¹

Parece que el número de episodios de oclusión parcial y su duración determinarían la eficacia del mecanismo protector del PI en relación a la duración del periodo de isquemia total. Las ratas sometidas a periodos de 5 a 10 min de oclusión parcial no presentaron protección frente a 60 min de oclusión total, pero el efecto protector sí se manifestó cuando la oclusión total descendió a 40 min.¹⁷⁹ Mientras que para las ratas sometidas a 1, 2 y 3 periodos de oclusión parcial de 5 min, seguidos de reperfusión de 10 min e isquemia total de 60 min, las

ventajas en términos de función hepática (LDH y ALAT) se obtuvieron significativamente en el grupo del episodio único de oclusión parcial y desaparecieron al someterlas a tres episodios de oclusión parcial.¹⁸⁰ En una línea similar estrían los resultados de un estudio que concluyó que fue más beneficioso un periodo único de oclusión parcial de 10 o 15 min que varios periodos de 2 o 5 min cuando se produjo una isquemia total de 90 min.¹⁸²

El PI presentaría en el hígado dos fases de protección. La fase temprana iría desde los primeros minutos de reperfusión hasta las 2 a 3 horas posteriores.¹⁸³ La fase tardía, descrita claramente en el corazón y no bien estudiada en el hígado, se haría evidente a las 12-24 h y persistiría durante 2 a 3 días.¹⁸⁴

Los mecanismos moleculares de hepatoprotección por PI, al igual que en el miocardio, no son bien conocidos. La isquemia induciría varios tipos de respuesta como la preservación del ATP intracelular por la activación de una kinasa AMP-dependiente¹³⁷ o la liberación de adenosina por las células endoteliales hepáticas, actuando como iniciadora del efecto. Ésta se uniría a los receptores A_2 , estimulando la síntesis de NO,¹⁸⁵ de efecto vasodilatador, que a su vez retroalimentaría la liberación de adenosina,¹⁸⁶ de acción vasodilatadora, y de endotelina de acción vasoconstrictora.^{187, 188}

Otro mecanismo asociado a hepatoprotección por PI parece depender de la inducción del enzima *heme-oxigenasa* (HO). Dicho enzima se halla en el hígado como forma constitutiva (HO-2). Actúa sobre la unión del hierro con la protoporfirina IX (grupo heme) liberando biliverdina IX α (que actúa como antioxidante), hierro divalente (Fe^{2+}), CO (de acción vasodilatadora) y el grupo heme (de acción prooxidante).¹⁸⁹ En condiciones de estrés (oxidativo, térmico, metales pesados, endotoxemia o hipoxia) se induciría la isoforma HO-1, también conocida como *proteína de shock térmico 32* (hsp 32).¹⁹⁰ Dicha isoforma tendría un papel protector sobre el hepatocito y la célula endotelial hepática, incrementando la resistencia a la

muerte por apoptosis mediada por $\text{TNF}\alpha$, y a la muerte por necrosis inducida por PMN activados, según se ha visto en un estudio con un modelo en hígado de rata sometido a endotoxemia.¹⁹¹ También presentaría un papel protector contra la lesión por IR. La HO-1 se expresaría en los hepatocitos pericentrales que constituyen el área de riesgo durante la lesión por IR. La señal extracelular iniciadora de su acción sería por estímulo de receptores β 1-adrenérgicos. Los mediadores intracelulares como el AMPc precisarían de la participación de la *protein-kinasa A* (PKA) y además parece que también se produce la unión a los factores de transcripción nucleares NF- κ B y AP-1.^{176, 190, 192} La inducción de la HO-1 en un modelo de PI en hígado de ratas se habría mostrado beneficiosa al disminuir la lesión hepatocelular.¹⁹³ Así mismo, en un modelo experimental de estrés hemorrágico en hígado de rata, la HO-1 estaría implicada en la regulación del tono vascular hepático al actuar sobre el diámetro sinusoidal mediante acción directa sobre los pericitos de los sinusoides hepáticos.¹⁹⁴

Por otro lado, la recirculación normotérmica (RN) (ver apartado 1.4.4.) habría demostrado su capacidad en la recuperación de riñones e hígados de DCP, a nivel experimental y clínico, al revertir la lesión por IC. El mecanismo atribuido se basaría en el restablecimiento de los procesos metabólicos de obtención de energía mediante el incremento de la concentración de nucleótidos de adenina y de glutatión reducido.¹⁹⁵⁻¹⁹⁷ Estudios posteriores han sugerido que el mecanismo hepatoprotector podría vincularse al PI ya que la RN conseguiría aumentar los niveles de adenosina y disminuir la xantina tisular hepática.¹⁹⁸ Posteriormente se puso de manifiesto que el mecanismo de acción de la RN se producía mediante el estímulo de los receptores A_2 por la adenosina y la síntesis de NO. La vasodilatación del lecho vascular hepático mejoraría la perfusión tisular y disminuiría la lesión histológica endotelial y hepatocelular.¹⁹⁹

1.3.4.2. Utilización de sustancias citoprotectoras

A nivel experimental se han utilizado diversas sustancias citoprotectoras añadidas en las diferentes fases de la obtención de hígados de DCP para contrarrestar los efectos nocivos asociados a la IR.

En la **fase del donante** se han ensayado numerosas sustancias con distintos modelos animales. En hígado de ratas se ha utilizado fentolamina²⁰⁰ que mejoró la perfusión sinusoidal disminuyendo la lesión celular. También se ha constatado un aumento de la supervivencia en ratas por la adición de pentoxifilina, debido a su acción sobre el descenso de TNF- α .²⁰¹ En cerdos, la utilización de milrinona (inhibidor de la *fosfodiesterasa*) y dos sustancias con capacidad para eliminar las células de Kupffer como mesilato de nafamostatato mejoraron la supervivencia postrasplante.^{202, 203} También se ha evaluado la adición de SAME, de acción antioxidante al elevar el glutatión intracelular, la L-arginina, con efecto vasodilatador al ser un precursor del NO,^{204, 205} y la glicina, con acción estabilizadora de la membrana celular y atenuadora de la activación de las células de Kupffer.²⁰⁶ Durante la RN, la adición de SAME y L-arginina se asociaría a menor lesión parenquimatosa, endotelial y biliar así como a mayor supervivencia,²⁰⁷⁻²¹⁰ mientras que el uso de glicina se conseguiría un aumento de la supervivencia y una menor lesión por reperfusión.²¹¹

Durante la **fase del receptor** hallamos estudios experimentales que utilizaron sustancias que se han asociado a supervivencia aumentada tales como los lazaroides,²¹² (inhibidores de la lipoperoxidación) el OP-2507,²¹³ (análogo de la prostaciclina, de acción vasodilatadora e inhibidora de la adhesión leucocitaria y plaquetar), los análogos de la prostaglandina I₂²¹⁴ (de acción vasodilatadora y estabilizadora de membrana), el tacrolimus o

FK-506 (reduce la liberación de TNF α) y los antagonistas del PAF²¹⁵ que disminuyen la quimiotaxis y la infiltración leucocitaria.

Durante la **fase de preservación** se ha añadido glucagón que aumentaría la señal por AMPc endógeno, y los antagonistas del receptor de la Adenosina A₂. Ambos fueron capaces de disminuir la lesión celular en modelos *ex vivo* con hígado de ratas²¹⁶. Los antagonistas de la endotelina (TAK-044) asociados con antagonistas del PAF aumentaron la supervivencia en cerdos.²¹⁷

Las catecolaminas serían otra de las alternativas citoprotectoras, dada la diversidad de sus funciones y mecanismos de acción. Los agentes inotropos actúan a través de receptores dopaminérgicos, de los cuales se conocen cinco subtipos agrupados en dos categorías, DA-1 y DA-2. Los DA-1 comprenden los receptores DA-1 y DA-5. Actúan a través del estímulo de la *adenil-ciclase*, la cual incrementa la actividad de la *protein-quinasa C* (PKC). Se distribuyen principalmente en las arterias coronarias, cerebrales, mesentéricas, gástricas y hepáticas, así como en los túbulos corticales renales. Los receptores DA-2 comprenden a los DA-2, DA-3 y DA-4 y actúan inhibiendo la *adenil-ciclase* que a su vez provoca la inhibición de la liberación de norepinefrina de las terminaciones nerviosas postganglionares simpáticas. Se localizan principalmente en los glomérulos y las arterias renales y favorecen la secreción de prolactina, inhiben la síntesis de aldosterona e inhiben la secreción de renina.²¹⁸

Sustancias como la dopamina o la dobutamina (DBT) se han utilizado ampliamente en el tratamiento del shock séptico para mejorar el deterioro de la perfusión esplácnica por hipovolemia. En esta situación se produce una redistribución del flujo sanguíneo dejando una perfusión precaria en el territorio intestinal y hepático. Esto se asocia a fenómenos de IR y a causa de la isquemia relativa se provocaría la disrupción de la barrera intestinal seguida de traslocación bacteriana.²¹⁹

Diversos estudios experimentales sobre el efecto de la DBT en el flujo esplácnico han demostrado que en situación de gasto cardiaco adecuado la DBT, a dosis de 5-10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$, incrementa los flujos de vena porta y de arteria hepática, aunque a dosis de 15 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ disminuye el flujo arterial hepático e incrementa el flujo hepático total, sin que el cociente respecto al gasto cardiaco varíe.²²⁰ En situación de bajo gasto cardiaco sin relación con endotoxemia se produce un descenso del flujo hepático, intestinal y renal y se mantiene la respuesta tampón de la arteria hepática. La DBT a dosis de 5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ es capaz de incrementar el flujo intestinal pero no modifica el flujo de la arteria hepática o renal.²²¹ Tampoco produce cambios en el aporte de oxígeno hepático ni en el cociente de extracción de oxígeno, mientras que a dosis entre 10 y 15 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ es capaz de incrementar el aporte de oxígeno, sin aumentar la captación hepática, y disminuir el cociente de extracción hepática de oxígeno.^{222, 223}

Los estudios experimentales sobre la acción de la DBT en el territorio esplácnico con modelos de shock séptico han mostrado que en perros, el tratamiento con 5 o 10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ de DBT incrementó el índice cardiaco, el flujo portal, el flujo arterial hepático, el aporte y el consumo de oxígeno hepático, la saturación venosa hepática y el consumo de lactato de forma mantenida y dosis-independiente respecto al tratamiento con reposición de volumen.²²⁴ En un trabajo con ratas la administración de DBT a 3 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ permitió el incremento del gasto cardiaco y el mantenimiento del flujo portal y sinusoidal en valores basales. En cambio, los animales con endotoxemia no tratados presentaron descensos significativos del flujo portal y sinusoidal.^{225, 226} En los estudios clínicos de shock séptico el uso de DBT también ha mostrado un efecto beneficioso sobre el incremento del flujo^{227, 228} y la oxigenación esplácnica.²²⁹

Las catecolaminas parecen hallarse implicadas en la protección contra la lesión por IR mediante un mecanismo de preconditionamiento²³⁰ que estaría regulado, entre otros, por una

señal de transducción β -adrenérgica. Se había sugerido que una de las vías de protección del PI consistiría en atenuar el incremento del AMPc durante la isquemia sostenida. También se había observado que en episodios de isquemia seguidos de reperfusión se producían incrementos cíclicos en la concentración intracelular de AMPc. El diseño de un estudio en miocardio de ratas permitió valorar la contribución de la señal β -adrenérgica como vía de transducción del PI. La isquemia mantenida fue capaz de inducir la liberación de catecolaminas como la norepinefrina al espacio extracelular, la cual al fijarse a los receptores β -adrenérgicos celulares indujo la producción de AMPc vía *proteín-quinasa A* (PKA). El AMPc provocaría una retroalimentación negativa en la señal de transducción β -adrenérgica mediante una desensibilización de los receptores β -adrenérgicos a la acción de las catecolaminas y descendería la producción de AMPc durante la isquemia sostenida.²³¹

Como se ha señalado con anterioridad, se ha visto que situaciones de estrés como la isquemia o la hemorragia son capaces de inducir en el hígado la producción de HO-1, el cual se halla implicado en la hepatoprotección por un mecanismo de PI.¹⁹⁰ La señal de transducción intracelular que regularía la expresión de la HO-1 se establecería por retroalimentación positiva por el AMPc y la PKA.

Un estudio experimental en hígado de ratas y cultivo de hepatocitos evaluó el papel de los agonistas α y β en la inducción de HO-1, así como la señal intracelular mediante la que dichos agonistas inducen la expresión del HO-1. En cultivos de hepatocitos la administración de α -1 y α -2 agonistas, así como de los β 2 y β 3 agonistas causó la expresión del enzima HO-1. Los agonistas β 1 como el isoproterenol, la dobutamina y el xamoterol sí fueron capaces de inducir HO-1. La utilización de un β -bloqueante como el metoprolol causó la atenuación de HO-1 por β 1-agonistas. En cuanto a la señal intracelular de transducción, se observó que la

administración de forskolín (inductor del AMPc) y el 8Br-cAMP, fueron capaces de causar la expresión de HO-1, mientras que la inhibición de la PKA abolió la expresión de HO-1 inducida previamente por DBT y 8Br-cAMP. En el estudio *in vivo* se indujo la expresión de HO-1 en hígado de ratas mediante la infusión de DBT durante 6 horas. Según estos datos se podría provocar hepatoprotección mediante la utilización de agonistas β_1 , ya que la activación de dichos receptores induciría una respuesta de segundo mensajero, vía PKA mediante el AMPc, así como la expresión de proteínas de shock como la HO-1 o la AP-1.¹⁹⁴

Posteriormente el mismo grupo ha publicado otro trabajo en hígado de ratas en el que se evaluó el efecto del pretratamiento con DBT tras la inducción de un shock hemorrágico sobre el funcionalismo hepático. Los animales pretratados con DBT o con un dador de CO como el triclorometano, presentaron mejor función hepática, objetivada por el aclaramiento del verde de indocianina, que los animales tratados con β -bloqueantes o bloqueantes de la HO-1. El tratamiento con DBT también mostró la expresión de HO-1 en los hepatocitos pericentrales. Según esto, la DBT tendría un efecto hepatoprotector a través de un mecanismo similar al del PI mediado por la inducción del enzima HO-1, el cual podría ejercer en parte su efecto beneficioso mediante la producción de CO.²³²

1.3.4.3. Utilización de métodos de perfusión

Los métodos iniciales de recuperación de órganos de DCP perseguían la obtención del enfriamiento rápido de los órganos para acortar al máximo el tiempo de IC. Si su aplicación se realiza en el donante, antes de la extracción, se denominan métodos *in situ*. Cuando se aplican exclusivamente sobre el órgano diana, una vez realizada la extracción del donante, se denominan métodos *ex situ*.

El primer **sistema *in situ*** utilizado fue el denominado “*perfusión in situ*” basado en la entrada por gravedad de solución preservadora fría a través de la arteria femoral. Ello permitió la obtención de riñones de DCP con éxito, inicialmente en forma experimental²³³ y después en la práctica clínica.²³⁴ Ello fue posible gracias al diseño de catéteres con balón que, introducidos por vía femoral, consiguieron aislar la circulación de los órganos intrabdominales permitiendo un enfriamiento más rápido.^{234, 235, 236}

Posteriormente, la introducción de un sistema de CEC para realizar el enfriamiento corporal total en los DCP permitió mantener una adecuada presión de perfusión, contrarrestar la vasoconstricción asociada tanto a la hipotermia como a la liberación de angiotensina²³⁷ así como obtener un enfriamiento más rápido, progresivo y uniforme del injerto. Este método, denominado *enfriamiento corporal mediante CEC*, obtuvo buenos resultados en DCP con riñones a nivel experimental²³⁸ y clínico,²³⁹ con hígados a nivel clínico^{240, 241} y en extracción multiorgánica en estudios experimentales y clínicos.²⁴²

Tras constatarse que el enfriamiento corporal mediante CEC era un método útil en la recuperación de órganos de DCP, las investigaciones de Van der Wijk sobre la introducción de un periodo de recirculación de sangre normotérmica *ex situ* antes del enfriamiento de riñones permitieron demostrar la mejora en la viabilidad de éstos órganos.²⁴³ Estudios posteriores constataron no solo resultados similares, sino que sirvieron para el conocimiento de la fisiopatología del daño tisular y del efecto protector de la RN cuando se aplicaba *in situ* en riñones procedentes de DCP. La RN constituye actualmente un método eficaz en la obtención de órganos de DCP tal y como se verá más adelante. Todos estos métodos finalizan con el almacenamiento estático de los órganos en hipotermia a 4°C con solución de preservación.

Otros sistemas se basan en la **preservación de órganos *ex situ***. Ello permite que la preservación de los órganos extraídos se realice de forma dinámica con un sistema de

perfusión continua hasta su implante en el receptor. Estos sistemas utilizan **máquinas de perfusión** que pueden oxigenar y perfundir tanto soluciones preservadoras en hipotermia como sangre en normotermia.

El uso de las máquinas de perfusión hipotérmica se halla muy extendido en la preservación renal y se ha mostrado eficaz en estudios clínicos de trasplante renal con series de DCPNC al asociarse a una menor tasa de fallo primario del injerto.²⁴⁴ También tienen aplicación en la evaluación de la viabilidad del injerto mediante el análisis del patrón de resistencia vascular y de algunos componentes del perfusato como la α -GST.²⁴⁵

La utilización de máquinas de perfusión en frío para la preservación de hígados de DCP se ha ensayado en estudios experimentales. Los más recientes utilizaron la máquina de perfusión en periodos variables (5, 10 y 24 horas) tras 30 min de IC en un modelo con ratas y lo compararon con el almacenamiento simple en frío, obteniendo una mejora en la función post-almacenamiento, en la microcirculación tras 10 horas de perfusión²⁴⁶ y el incremento de la supervivencia tras 5 horas de preservación²⁴⁷ aunque el uso de periodos de hasta 24 horas podría tener efectos desfavorables sobre el funcionalismo y la microcirculación.²⁴⁸

El sistema denominado NELP (*Normothermic Extracorporeal Liver Perfusion*) se empezó a utilizar como método estándar para la evaluación de otros sistemas de preservación y algunos estudios lo consideran un sistema válido para la preservación hepática *ex-situ*. Se basa en la perfusión de sangre oxigenada a 37°C a través del hilio hepático mediante un circuito extracorpóreo. En estudios experimentales con cerdos,^{249, 250} la utilización de 4 horas de NELP fue capaz de recuperar hígados dañados por 60 min de IC, consiguiendo una supervivencia en el receptor de 7 días, frente a la nula supervivencia de los hígados preservados con UW a 4°C. Trabajos posteriores con el mismo modelo y diferentes periodos de NELP (24, 20 y 23 horas) frente a distintos periodos de almacenamiento simple en frío con UW (0, 4 y 1 hora),

corroboraron que los hígados tratados con NELP presentaron mejor actividad metabólica, mayor producción biliar y menor daño tisular que los tratados con preservación en frío, incluso en periodos tan breves como 1 hora. También se observó que el grado de disfunción y de lesión histológica fue proporcional a la duración de la preservación en frío.²⁵¹⁻²⁵³ La NELP tendría la ventaja de evitar la lesión por IF y monitorizar la viabilidad hepática pre-trasplante mediante el análisis de la función hepática, aunque su aplicabilidad clínica está limitada por su compleja metodología.

1.4. Bases de la Recirculación Normotérmica

1.4.1. Circulación Extracorpórea

El desarrollo de los aparatos de CEC o bypass cardiopulmonar se inició a finales del siglo XIX con la creación de los oxigenadores de burbujas. Los primeros prototipos surgieron sobre 1880 y se utilizaron de forma experimental. Con el descubrimiento de la heparina en 1916 por MacLean se inició la posibilidad de poner la sangre en contacto con superficies artificiales evitando la coagulación y fue DeBakey quién a partir de 1930 diseñó un simple pero funcional sistema de bombeo.⁵ El acoplamiento de estos elementos permitió a Gibbon, en 1953, realizar el primer uso en humanos de un circuito de CEC para realizar intervenciones de cirugía cardíaca.²⁵⁴

La CEC es un método artificial utilizado habitualmente en cirugía cardíaca que permite a la sangre obviar el circuito fisiológico cardiopulmonar. Mantiene estable la temperatura del circuito, el intercambio gaseoso y la perfusión de los tejidos, aunque no evita completamente el trauma de los elementos formes de la sangre. Previamente al inicio de la CEC se precisa la anticoagulación con heparina y una estrecha monitorización del *tiempo de coagulación activado* para evitar accidentes por hipo o hipercoagulabilidad.^{255, 256}

El circuito precisa de la inserción de cánulas en la vena cava o la aurícula derecha, para el drenaje por gravedad de la sangre venosa, y en la aorta ascendente, para la llegada de la sangre arterializada. La sangre venosa se mezcla con el líquido de cebado en un reservorio que lleva incorporado un oxigenador, habitualmente de membrana, donde se realiza el intercambio gaseoso. Los oxigenadores iniciales, denominados de “contacto directo” no presentaban ninguna barrera entre la sangre y el oxígeno y se utilizaron ampliamente hasta los años ochenta.

Posteriormente se desarrollaron los oxigenadores de membrana, los cuales poseen una interfase permeable a los gases entre la sangre y el oxígeno. Esto tiene como ventaja la reducción del trauma de los hematíes debido al contacto directo con el oxigenador permitiendo un uso más prolongado de esos sistemas.^{257, 258, 259} La sangre, una vez oxigenada, es impulsada por la acción de una bomba de rodete centrífuga hacia la aorta. El circuito precisa de unos elementos accesorios como el intercambiador térmico que mantiene la temperatura elegida de forma constante y una fuente externa de oxígeno.

En el cebado del circuito interviene una mezcla de manitol, soluciones coloides (gelatinas, hidroxietilamidones) y cristaloides (Ringer lactato) causando hemodilución. Las soluciones de cebado deben ser similares al plasma en cuanto a la composición electrolítica y la osmolalidad, para evitar alteraciones como el edema intersticial a causa de pérdida de presión oncótica intravascular.^{260, 261} La hemodilución presenta inconvenientes como la alteración del volumen de distribución de los fármacos y de la fijación a las proteínas plasmáticas. Se produce hipocoagulabilidad por dilución de los factores de coagulación y de las plaquetas²⁶² y descende la concentración de hemoglobina, lo que puede causar hipoxia a nivel renal, cardíaco o cerebral si no se compensa con incrementos del gasto cardíaco.^{263, 264, 265} Durante la CEC se acepta que el hematocrito no debe descender por debajo del 20-22% en base a que la transferencia de oxígeno máxima se consigue con valores de hematocrito del 30% y ésta disminuye solo un 10% cuando el hematocrito se aproxima al 20% y al 50%. Estas cifras se obtienen al comparar el hematocrito con el transporte de oxígeno el cual resulta del producto del gasto cardíaco y la capacidad de transporte de oxígeno.²⁶⁶ Las ventajas asociadas a la hemodilución permitirían la mejora de la perfusión tisular al reducir la viscosidad sanguínea y la disminución del uso de hemoderivados, aunque la alteración de la coagulación y la plaquetopenia postoperatoria podrían incrementar los requerimientos transfusionales.^{267, 268}

1.4.2. Fisiopatología de la Circulación Extracorpórea a Nivel Sistémico

En el individuo vivo la CEC provoca una respuesta de estrés cuya fisiopatología no está bien dilucidada respecto a la contribución individual de cada una de las variables. Algunos factores como el tipo y magnitud de flujo de bomba, la duración de la CEC, la exposición de la sangre a superficies no fisiológicas, las variaciones de temperatura, los fenómenos de IR de los órganos y las alteraciones del equilibrio ácido-base son determinantes en la hemodinámica y el adecuado aporte de oxígeno a los tejidos.²⁶⁹

La **magnitud del flujo de bomba** debe permitir satisfacer las necesidades metabólicas ya que representa el gasto cardiaco en condiciones fisiológicas, correspondiendo a los litros de sangre aportados por minuto y superficie corporal (m^2). Se estima que el consumo metabólico de oxígeno a $37^\circ C$ en un adulto oscila entre 80-120 ml/min/ m^2 y suele reducirse aproximadamente a la mitad cuando la temperatura desciende ($28-25^\circ C$).²⁷⁰⁻²⁷² El método utilizado para valorar la adecuación del débito de bomba a los requerimientos metabólicos de oxígeno es la monitorización de la saturación venosa mixta que refleja indirectamente el balance entre consumo y aporte de oxígeno.^{271, 273} La magnitud del flujo de bomba en normotermia ($37^\circ C$) oscila entre 2 y 3 L/min/ m^2 ya que es similar al gasto cardiaco.²⁷⁰⁻²⁷² Durante la hipotermia, el débito de bomba suele reducirse en un 50% respecto al aplicado en normotermia. La relación entre aporte y consumo es independiente, mientras el cociente entre ambos sea superior al valor crítico por debajo del cual se origina el metabolismo anaerobio, estimándose que en el individuo sano el cociente crítico es de 1,3. El descenso de la tasa metabólica por hipotermia permite la reducción del flujo de bomba, aunque el aporte de oxígeno se reduzca,²⁷⁴ y en esas circunstancias las variaciones del consumo de oxígeno se relacionarían con la extracción de oxígeno y la redistribución del flujo sanguíneo.²⁷⁵ Durante la

aplicación de flujos bajos de bomba el consumo de oxígeno es proporcional al aporte hasta un valor de meseta en el cual, aunque se incremente el flujo de bomba, no se producirán variaciones en el consumo. Se acepta que un rango de flujo de bomba entre 1,2 y 1,5 L/min/m² permite obtener el valor meseta de consumo de oxígeno en hipotermia.^{273, 275} El cambio inducido en el consumo de oxígeno debido a la utilización de flujos bajos también se hallaría en relación a la extracción de oxígeno y la distribución del flujo sanguíneo. Parece que el uso de flujos bajos durante la hipotermia se asociaría a protección miocárdica y cerebral, aunque en otras ocasiones se haya observado una respuesta inflamatoria aumentada y concomitante con morbilidad postoperatoria no neurológica.^{273, 276-278.}

La magnitud del flujo de bomba afecta significativamente a la presión arterial media en forma directamente proporcional y a las resistencias vasculares sistémicas de manera inversa. El incremento de las catecolaminas circulantes en respuesta a la hipotensión, así como un mecanismo pasivo de oclusión capilar por un descenso en la presión crítica de cierre, podrían explicar el aumento en la resistencia vascular sistémica asociada a la utilización de un bajo flujo de bomba e hipotermia.²⁷⁹ La aplicación de flujos altos de bomba en normotermia mantendría inalterados los flujos regionales mesentérico, renal, cerebral y muscular. En cambio, en hipotermia la redistribución del flujo regional variaría en función de la magnitud del flujo. Con flujos altos de bomba el flujo sanguíneo se redistribuiría hacia el territorio músculo-esquelético a expensas del territorio cerebral, intestinal y renal, ya que el músculo esquelético puede vasodilatarse entre siete y ocho veces su valor basal. Con flujos bajos de bomba habría un descenso del flujo en todos los territorios con un ligero incremento del flujo renal y cerebral.²⁷⁰

El ***régimen del flujo de bomba*** puede ser pulsátil o continuo y representa la capacidad del sistema para reproducir la onda de pulso arterial por el efecto del ciclo cardíaco. Parecería deseable que el sistema de CEC reprodujese al máximo la función cardiocirculatoria y

que, por tanto, el flujo se administrase de forma pulsátil. En la actualidad no se dispone de resultados concluyentes sobre las verdaderas ventajas de éste respecto al no pulsátil ya que el beneficio clínico no siempre es evidente y la metodología de los estudios no permite hacerlos comparables por falta de estandarización.²⁸⁰ El flujo no pulsátil se ha asociado a mayor respuesta endocrina a nivel del sistema renina-angiotensina,^{281, 282} la vasopresina²⁸³ y la liberación de norepinefrina.²⁸⁴ El flujo pulsátil presentaría ventajas como el descenso de citoquinas como la interleukina-8 o la endotelina-1²⁸⁵ y la mejora en la perfusión esplácnica²⁸⁶ o cerebral,²⁸⁷ aunque podría incrementar la permeabilidad de la barrera hematoencefálica y por tanto el edema cerebral.²⁸⁸ No hay resultados concluyentes respecto a la hemólisis y depleción de leucocitos, plaquetas y hematíes^{289, 290} o la liberación de hormonas del eje adreno-hipofisario como el cortisol o la corticotropina.²⁹¹⁻²⁹³

La **duración de la CEC** afecta a la resistencia vascular sistémica de forma bifásica. Al inicio de la CEC se produce el descenso de las resistencias debido a la hemodilución que causa la reducción de la viscosidad de la sangre y de las catecolaminas circulantes. Posteriormente aparece el incremento progresivo de las resistencias, el cual es tiempo-dependiente y tiene un origen multicausal como la vasoconstricción por hipotermia, el cierre de algunas zonas de la microvasculatura y el aumento de las catecolaminas circulantes.²⁸⁷ Éste incremento se produce por respuesta compensatoria desde barorreceptores y quimiorreceptores localizados en pulmón y corazón al ser obviados de la circulación, aunque mediadores como la endotelina y el NO parecen tener importancia en la regulación del tono vascular durante y tras la CEC.^{294, 295}

La **salida de la sangre al circuito de CEC** conduce a la activación de la coagulación, agregación plaquetaria y activación de la fibrinólisis.^{296, 297} Además, causa la hemólisis de los hematíes con presencia de hemoglobina libre por la acción traumática del bombeo.^{298, 299} La desnaturalización de las proteínas plasmáticas altera numerosas funciones enzimáticas,

promueve la formación de agregados, principalmente a expensas de las proteínas de mayor peso molecular como las Ig M, disminuye su solubilidad plasmática aumentando la viscosidad sanguínea y favorece la aparición de lípidos libres por afectación de las lipoproteínas.^{300, 301} Induce la agregación de los PMN y monocitos en la microcirculación, así como la diapédesis hacia territorios no habituales como el corazón y el músculo esquelético, provocando neutropenia e inicio de la cascada inflamatoria.^{255, 302} Aparecen numerosos eventos con capacidad citotóxica directa como la activación del complemento,³⁰³ leucocitos y moléculas de adhesión,³⁰⁴ la liberación de citoquinas (TNF α , IL-6, IL-8),³⁰⁵ el TxA₂ y RLO. También promueve la liberación de moléculas de acción vasoconstrictora como las endotelinas,³⁰⁶ o vasodilatadora como el PAF y el NO.^{307, 308}

La regulación de la temperatura durante la CEC comprende desde la normotermia (37°C) hasta la hipotermia, la cual se clasifica como leve (34°C), moderada (28°C) y profunda (inferior a 20°C). La hipotermia altera la velocidad de las reacciones enzimáticas descendiendo la tasa metabólica del consumo de oxígeno, incrementa la viscosidad de la sangre, aunque la hemodilución compensa este efecto, modifica la curva de disociación de la hemoglobina mejorando su afinidad por el oxígeno y aumenta la solubilidad del oxígeno y del anhídrido carbónico descendiendo su presión parcial, aunque la cantidad total no varíe. El uso de hipotermia se acompaña de la disminución del flujo sanguíneo, lo cual conlleva menor trauma de los elementos formes de la sangre, permite mayor duración del periodo de CEC y aumenta la saturación venosa mixta de forma inversa al descenso de la temperatura.³⁰⁹ La hipotermia profunda se asocia al descenso de la perfusión microvascular, por lo que se favorece el edema, así como a una menor adherencia de los leucocitos al endotelio.³¹⁰

1.4.3. Fisiopatología de la Circulación Extracorpórea a Nivel Hepático

El hígado recibe el aporte sanguíneo a través de la vena porta y la arteria hepática. Ambos sistemas se complementan entre sí ya que el sistema portal contribuye con un 70-75% al flujo hepático total, lo que supone en el humano adulto unos 90 ml/min/100 g de tejido y la arteria hepática aporta el 25-30% restante, es decir, unos 30 ml/min/100 g de tejido hepático. Sin embargo, al aporte de oxígeno contribuyen ambos sistemas en un 50% aproximadamente ya que la vena porta lleva sangre parcialmente oxigenada proveniente de la parte inferior del esófago, intestino delgado, grueso, recto, páncreas y bazo.³¹¹

La mezcla de la sangre procedente de ambos sistemas se produce en el sinusoides hepático. En él confluyen dos aferencias: una de ellas comprende la conexión directa con la vénula portal terminal y la otra se debe a la arteriola hepática que entra mediante el plexo arterial periductal en los sinusoides y en las vénulas portales terminales. El sinusoides drena su contenido a la cava inferior mediante el sistema venoso hepático.³¹² En ambas aferencias se localizan unas estructuras denominadas *esfínter-like*. Una de ellas se halla en la unión de la arteriola hepática terminal con el sinusoides y correspondería al esfínter precapilar.^{313, 314} Este sistema permite reducir la presión de la sangre arterial al entrar al sinusoides a una magnitud similar al sistema portal, es decir entre 5-10 mm Hg. El otro se ubica en la unión del sinusoides con la vénula portal y está formado por pericitos específicos de la microvasculatura hepática denominados *células de Ito o células estrelladas* que recubren la pared sinusoidal y regulan el diámetro sinusoidal. La propia célula endotelial posee unas fenestraciones o poros de 100 nm de diámetro y es capaz de formar invaginaciones de la membrana plasmática que le permiten regular la permeabilidad del sinusoides hepático. Este sistema, junto con la acción del esfínter localizado a nivel de la vénula portal, se denomina *sistema fenestrado sinusoidal-endotelial* y controla

el flujo sinusoidal debido a su capacidad contráctil. La contracción se debe a la unión del calcio al sistema Ca^{2+} -calmodulina-actina-miosina.^{315, 316} La regulación de la contracción está mediada por el balance entre sustancias de acción vasoconstrictora y vasodilatadora. La endotelina-1 mediante la activación de los receptores ET-B induciría vasoconstricción. Entre los vasodilatadores se hallarían los monóxidos gaseosos como el NO, sintetizado por la acción del enzima *óxido nítrico-sintetasa endotelial* y el CO asociado a la producción de HO-1 en situación de noxas como la isquemia o la hemorragia.^{190, 193, 194}

Otros mecanismos implicados en la regulación de la hemodinámica hepática incluyen la resistencia hepática distensible,³¹⁷ los cambios del volumen sanguíneo,³¹⁸ la respuesta tampón de la arteria hepática,^{319, 320} los shunts intrahepáticos porto-sistémicos³²¹ o la respuesta hepatocardiocirculatoria,³²² aunque a nivel sinusoidal el principal regulador del flujo hepático está formado por el *sistema fenestrado sinusoidal-endotelial*.³²³

Desde el punto de vista de regulación se considera el aporte de la arteria hepática como suplementario, aunque éste es esencial para un correcto aporte de oxígeno a los sinusoides, los canalículos biliares, las vénulas portales y los nervios del tracto portal. Cuando hay un descenso del flujo portal se produce, de modo compensatorio, además de un incremento de la extracción hepática de oxígeno, un aumento del flujo de la arteria hepática y viceversa, aunque los cambios en el flujo arterial no producen una variación recíproca en el flujo portal. Este fenómeno se ha denominado “*la respuesta tampón arterial hepática*”^{319, 320, 324} y parece estar mediado, al menos parcialmente, por cambios en la concentración del ATP que estimularía la expresión de purinoreceptores-P1 permitiendo su catabolismo hacia adenosina.³²⁵ En la respuesta vasodilatadora además de la adenosina se hallaría implicado el NO,³²⁶ mientras que en la respuesta vasoconstrictora el mecanismo se atribuye en parte a una acción simpática.³²⁷

El flujo hepático se afectaría por la hipovolemia o la hipoperfusión, como se ha visto en un modelo experimental de taponamiento pericárdico en el que se redujo el flujo hepático total, con un descenso paralelo del flujo portal y del flujo arterial hepático.^{328, 329} En esta situación aparecería la respuesta tampón compensadora, no obstante si la hipovolemia o la hipoperfusión se prolonga más allá de dos horas la respuesta tampón compensadora se agota y desaparece, por lo que su efecto es limitado y tiempo dependiente.³²⁸⁻³³⁰

Las variaciones del pH también afectan al flujo hepático. La acidosis, metabólica y respiratoria, se ha asociado a flujo portal aumentado, flujo arterial disminuido y mantenimiento del flujo hepático total.^{331, 332} Con la alcalosis metabólica incrementaría el flujo portal, arterial y hepático total, sin alteraciones significativas del aporte y consumo de oxígeno, mientras que la alcalosis respiratoria induciría un descenso del flujo portal y arterial hepático.^{332, 333}

El metabolismo hepático de oxígeno representado por el aporte, el consumo y la extracción hepática de oxígeno presenta variaciones dependiendo de los flujos vasculares, del aporte de oxígeno, de la tasa metabólica hepática, de la temperatura y del pH.

El descenso selectivo del aporte de oxígeno hepático se acompaña de incrementos en la extracción de oxígeno hepático cuando se asocia a hipovolemia o hipoperfusión.³²⁹ Nagano realizó dos trabajos en los que se analizaron estos aspectos. En uno de ellos estudió la respuesta del metabolismo hepático de oxígeno en un modelo de IR con el uso de diferentes fármacos anestésicos. Tras la interrupción completa del flujo y la oxigenación hepática y su posterior restablecimiento se produjo una recuperación completa del flujo hepático, no obstante, la recuperación del aporte y consumo fue inferior a los valores pre-isquemia, pero el consumo de oxígeno mejoró cuando se utilizó fentanilo e isoflurane en lugar de pentobarbital, enflurane o halotane.³³⁴ En otro estudio valoró la extracción hepática de oxígeno en relación al descenso del flujo hepático total observando que se producía el

incremento progresivo de la extracción hepática de oxígeno. Cuando aplicó hipotermia adicional obtuvo una extracción inicial de la mitad que en normotermia y un incremento de casi tres veces en la extracción final.³³⁵

La hipotermia tendría una escasa repercusión sobre el flujo hepático cuando se aplican reducciones entre 5 y 10°C, sobre todo en el flujo de la arteria hepática. Solamente se constatarían ligeros aumentos del flujo portal atribuibles a un mecanismo de redistribución del flujo, desde la piel por vasoconstricción hacia el territorio esplácnico, dónde se produciría vasodilatación mediada por el sistema simpático.³³⁵

La acidosis, metabólica y respiratoria, causaría un descenso significativo en el aporte de oxígeno venoso y un incremento del consumo hepático de oxígeno.^{331, 332} El consumo de oxígeno descendería por la alcalosis respiratoria sin que la alcalosis metabólica lo afectase.^{331, 332}

Los **factores determinantes en la hemodinámica hepática durante la CEC** son los dependientes de la magnitud y el régimen del flujo de bomba, la temperatura y la duración de la CEC.^{336, 337} Mathie, en estudios experimentales factoriales con perros sometidos a CEC, evaluó por separado el efecto de distintos tipos de flujo (alto: 2,4 L/min/m² y bajo: 1,2 L/min/m²) y régimen de bomba (pulsátil y no pulsátil) e hipo o normotermia. Para cualquier temperatura y régimen de perfusión, la utilización de un flujo alto de bomba provocaría un flujo portal más incrementado que el arterial, preservaría mejor el flujo hepático total y no se afectaría por la pulsatilidad del flujo. Por el contrario, un flujo bajo de bomba (1,2 L/min/m²) mantendría peor el flujo hepático total y se beneficiaría del uso de la perfusión pulsátil. Según estos estudios, los beneficios del régimen pulsátil se verían disminuidos con la asociación de hipotermia y flujo de bomba alto.³³⁸

Respecto a la influencia de la temperatura, no existirían diferencias entre hipotermia moderada (28°C) y normotermia (37°C) respecto al mantenimiento del flujo hepático total,

aunque en hipotermia moderada el flujo portal aumentaría y el flujo arterial descendería, sugiriendo que la hipotermia induciría la vasodilatación del lecho vascular pre-hepático, sobre todo cuando el flujo de bomba es alto.^{338, 339}

Durante la CEC, la contribución del flujo portal y arterial hepático al flujo hepático total dependería de distintos factores. El flujo portal aumentaría con la hemodilución normovolémica, la hipercapnia, la acidosis metabólica y la hipotermia moderada y estaría mediado por una respuesta simpática. En estas circunstancias se produciría vasoconstricción arterial hepática con escasa respuesta a la hipotermia moderada. El flujo portal disminuiría con la hipotensión, paralelamente al descenso del gasto cardiaco, y con la hipocapnia. En ambos casos habría vasoconstricción de la arteria hepática y como respuesta a la hipoxia.³³⁸⁻³⁴¹

A nivel clínico también se ha estudiado la repercusión de la CEC sobre la perfusión y el funcionalismo hepático. La CEC provoca un descenso del flujo hepático que es de menor magnitud con la aplicación de flujos altos de bomba (6-8% respecto al basal) que de flujos bajos (13-30% respecto al basal), aunque la estimación depende del sistema de medida.^{336, 337, 342}

La combinación más adecuada de régimen de flujo de bomba y temperatura para optimizar la preservación hepática durante la CEC utiliza flujos altos de bomba (2,4 L/min/m²). Durante la normotermia, el uso de un flujo pulsátil o no pulsátil sería indiferente, pero en hipotermia sería más beneficioso el flujo no pulsátil al causar un descenso significativamente menor en el flujo hepático que el flujo pulsátil.^{337, 342} En el hígado, el uso de flujos altos y normotermia ha mostrado una mayor eficacia en el mantenimiento del potencial redox mitocondrial (NAD⁺/NADH), valorado por la determinación del cociente arterial y venoso de cetonas. La utilización de CEC con hipotermia se asociaría a un descenso muy marcado del cociente arterial y venoso de cetonas y una recuperación a valores por debajo del límite inferior a los dos días de la CEC. Con normotermia aparecerían valores más elevados del

cociente arterial y venoso de cetona, así como un incremento del consumo y el cociente de extracción de oxígeno hepático. El aumento del ácido hialurónico, que se observaría a nivel portal y arterial como reflejo del daño endotelial, estaría vinculado a cambios en el metabolismo hepatoesplácnico de oxígeno y no al empleo de hipo o normotermia.^{337, 343, 344}

Durante la CEC la suma de factores como una inadecuada presión de perfusión, la hemodilución o el uso de fármacos vasoconstrictores se ha asociado a la aparición de complicaciones como la hiperbilirrubinemia que aumenta la morbi-mortalidad postoperatoria. Tiene una prevalencia en torno al 20% y se observa con mayor frecuencia en pacientes con alteración hepática previa o insuficiencia cardíaca crónica sometidos a CEC.³⁴⁵

1.4.4. Recirculación Normotérmica y Donante a Corazón Parado

La RN es una aplicación particular de la CEC que permite la recuperación de órganos de donante a corazón parado dañados por la IC haciéndolos aptos para el trasplante. Este método surgió de forma simultánea a los estudios sobre el enfriamiento corporal total. El grupo de Kootstra utilizó inicialmente la CEC para el enfriamiento corporal total en la preservación de injertos renales²³⁸ y posteriormente demostró mayor viabilidad de los riñones preservados en frío al intercalar un periodo de perfusión *ex vivo* con sangre normotérmica antes del enfriamiento.²⁴³ Más tarde, estudios experimentales como los de Tojimbara en ratas³⁴⁶ y Schön²⁴⁹ y Hoshino³⁴⁷ en cerdos, obtuvieron buenos resultados en la supervivencia del receptor tras el trasplante hepático con la utilización de la RN.

El empleo de la sangre del propio individuo como líquido de perfusión, en lugar de soluciones de otra índole, presentaría algunas ventajas como el mantenimiento de la presión oncótica, evitando la expansión del espacio extracelular, el aporte de sustratos necesarios para

el metabolismo tisular, la presencia de la hemoglobina como transportador de oxígeno, la capacidad tamponadora frente a variaciones del pH y la capacidad antioxidante frente a los RLO.^{347, 348}

El grupo del Hospital Clínic estudió los efectos de la RN de forma experimental y clínica en la recuperación de órganos intraabdominales de DCP. Para los estudios experimentales se utilizó un modelo porcino con tiempos de IC entre 20 y 40 min. Tras la IC se instauró una fase de RN con oxigenación de 30 min, seguida de enfriamiento corporal total, mediante un circuito de CEC. Posteriormente, el hígado se preservó *ex situ* en solución de UW a 4° C hasta ser trasplantado en el receptor, el cual se evaluó durante cinco días.

Los estudios experimentales de este grupo demostraron que la lesión causada por periodos crecientes de IC (20, 30 y 40 min) se produjo a nivel hepatocitario, endotelial y biliar, demostrada por el incremento de la α GST, el ácido hialurónico, la alteración de la histología y el descenso de la carga energética tisular. Esta lesión pudo ser revertida por el efecto de la RN, permitiendo la normalización de estas variables y la supervivencia de los animales hasta el quinto día postrasplante.^{129, 349} La supervivencia se relacionó de forma inversa con el tiempo de IC (100%, 70% y 50% respectivamente) y fue nula cuando no se utilizó la RN.^{129, 350} El daño histológico así como la necrosis del tracto biliar fue progresivo y directamente proporcional al periodo de IC.^{81,131} Además se demostró que el mecanismo de acción del efecto beneficioso de la RN estaría mediado por la adenosina y el NO, de manera similar al del PI,¹⁹⁹ y que la adición de sustancias citoprotectoras durante la RN como la L-Arginina (precursor del NO), el SAME (capacidad antioxidante) o la glicina (estabilizador de la membrana celular y atenuador de la activación de las células de Kupffer), mejorarían las condiciones hemodinámicas de obtención del injerto disminuyendo la lesión hepática y biliar.²⁰⁷⁻²¹¹

El efecto de la RN sobre la hemodinámica hepática, el metabolismo de oxígeno y el funcionalismo hepático también fue analizado.^{351, 352} Se utilizaron tiempos crecientes de IC (20, 30 y 40 min) y un flujo de bomba variable y máximo durante toda la RN dependiente del retorno venoso, próximo a los 2,2 L/min/m², para conseguir una adecuada presión de perfusión tisular. Se obtuvo un flujo de bomba con valores similares durante toda la RN, a pesar de aplicarse en función del retorno venoso. Los animales sometidos a 20 min de IC mostraron los valores más altos de flujo de bomba respecto a los grupos con 30 y 40 min de IC. Los flujos de la arteria hepática y la vena porta se recuperaron progresivamente durante la RN, aunque no llegaron a alcanzar el valor basal previo a la asistolia. El flujo arterial fue significativamente inferior al flujo basal únicamente en el grupo con 30 min de IC. El flujo portal también se mantuvo descendido durante la RN pero solo se halló significativamente descendido respecto al flujo portal basal en los grupos con 30 y 40 min de IC. Se observó correlación entre el flujo de bomba y el flujo portal durante todos los tiempos de medida. El análisis de los flujos respecto a la supervivencia demostró que los animales supervivientes mostraron flujos de bomba, de arteria hepática y de porta más elevados que los no supervivientes y se estableció un punto de corte del flujo de bomba de 1,7 l/min/m² de elevado valor predictivo para la supervivencia de los animales (sensibilidad de 81% y especificidad de 87,5%).

El estudio del metabolismo de oxígeno reveló que, tras el inicio de la RN se produjo un descenso del contenido de oxígeno a nivel de la arteria hepática, la porta y la vena suprahepática en todos los grupos de estudio a causa de la hemodilución. El aporte de oxígeno se redujo drásticamente en todos los grupos respecto al valor basal, mientras que el consumo de oxígeno apenas sufrió variaciones, ni respecto al consumo basal ni entre grupos. Sin embargo, la extracción hepática de oxígeno fue directamente proporcional al tiempo de IC. El

análisis de la supervivencia mostró que el aporte de oxígeno fue superior y la extracción de oxígeno fue menor en los animales supervivientes respecto a los no supervivientes, pudiendo considerar a ésta última variable como un indicador precoz de viabilidad del injerto.

Los estudios en los que se realizó la adición de sustancias citoprotectoras durante la RN como el SAME^{207, 208} la L-Arginina²¹⁰ y la glicina²¹¹ mostraron variaciones respecto al comportamiento de los flujos vasculares, del flujo de bomba y del metabolismo de oxígeno. Durante la RN el flujo de bomba de vena porta y arteria hepática incrementó rápidamente en todos los grupos (control, L-Arginina y SAME). Tanto el SAME como la L-Arginina provocaron que los flujos de bomba y portales fuesen significativamente más altos que el grupo control, pero solo el SAME consiguió este mismo efecto respecto al flujo de arteria hepática y de vena suprahepática. De forma similar ocurrió con la correlación entre flujo de bomba y flujos vasculares. El grupo tratado con L-Arginina solo mostró correlación entre el flujo de bomba y el flujo portal, mientras que el grupo tratado con SAME presentó correlación entre el flujo de bomba y todos los flujos hepáticos. Los grupos tratados con SAME y L-Arginina mostraron contenido y aporte de oxígeno más bajos que los valores basales, y respecto al grupo control mostraron un aporte de oxígeno significativamente superior y la extracción hepática de oxígeno disminuida.

La vertiente clínica, vigente en la actualidad, tuvo como objetivo la identificación y obtención de injertos a expensas de DCP mediante un proyecto de investigación clínica sobre DCP que se inició en 1986. En 1998 el Comité Ético aprobó el proyecto sobre trasplante hepático de DCP. Los estudios clínicos demostraron que la utilización de la RN en la obtención de injertos renales, frente a otras técnicas como la *perfusión in situ* y el *enfriamiento corporal total mediante CEC*, permitió reducir la incidencia del retraso de función primaria del injerto, considerándola como la técnica de elección en DCP.^{353, 354} Todo ello ha permitido el

incremento de donaciones, principalmente renales,^{353, 354} y en menor medida hepáticas,^{93, 355, 356} con buenos resultados respecto a la supervivencia del injerto y del receptor a largo plazo.

La CEC causa efectos deletéreos sistémicos y hepáticos en los individuos vivos. No obstante, en los DCP la aplicación de un sistema de perfusión mediante CEC posibilita el restablecimiento de la oxigenación y la perfusión de los órganos contrarrestando los efectos nocivos de la IC previa permitiendo su utilización en el trasplante. Dado que el uso de la RN en los DCP se basa en un sistema de CEC y ésta depende principalmente de la óptima aplicación del flujo de bomba, aquellos aspectos como el tipo y magnitud del flujo de bomba, la temperatura, la duración y la utilización de diversas sustancias deberían conocerse en profundidad, al objeto de mejorar la eficacia del método para que la obtención de los órganos permita garantizar una adecuada función postrasplante así como delimitar la fiabilidad del mismo respecto al periodo máximo de IC sobre el que es capaz de actuar eficazmente. Esta idea es la que justifica y da paso al presente trabajo de investigación.

* * * * *

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Hipótesis

Una vez demostrada que la RN es un método eficaz en la obtención y recuperación de órganos para el trasplante de DCP,^{93, 198, 208, 210, 351, 353-355} el objetivo de este trabajo experimental es determinar la influencia que ejercen los distintos factores que participan en la fase de recirculación sobre la recuperación de la lesión hepática producida tras 60 min de IC.

Las características de la recirculación en el modelo experimental no se han modificado desde el inicio de la línea de investigación, mientras que el modelo clínico ha precisado adecuarse a necesidades reales, básicamente de flujos de bomba y tiempos de CEC. Para mejorar este procedimiento se requiere la realización de experimentos en los que se analice separadamente la acción del tipo y magnitud del flujo de bomba, la duración de la RN, la necesidad de la fase de recirculación en hipotermia y la adición de la dobutamina, un fármaco vasoactivo que mejora la circulación hepatoesplácnica. La optimización del método beneficiaría a los injertos con los tiempos más cortos de IC y delimitaría la eficacia del método con los tiempos más largos de IC.

Se parte de un protocolo estándar que utiliza un modelo experimental porcino de trasplante hepático cuyo donante ha sido sometido a un periodo de IC de 60 min. Antes de la extracción del órgano para su preservación, la sangre se recircula y se oxigena mediante un sistema de CEC, diferenciándose dos etapas consecutivas en función de la temperatura. La primera fase dura 30 min y la sangre se recircula en normotermia. Es posible añadir una segunda fase de una duración variable que no suele exceder de los 20 min en la que la recirculación se realiza en hipotermia hasta obtener los 15° C en la superficie hepática. Por otro lado, el *bypass* cardiopulmonar impulsa la sangre mediante una bomba con flujo no pulsátil cuya magnitud, a lo largo de la recirculación, es variable ya que depende del retorno venoso. En base a este planteamiento inicial se diseñaron cuatro grupos de trabajo con las siguientes hipótesis.

2.1.1. Primera Hipótesis

Durante la RN, los factores que determinan la hemodinámica hepática son la magnitud y régimen del flujo de bomba, junto con la temperatura y la duración de la CEC.^{336, 337} El flujo hepático total se preserva mejor cuando se utiliza un flujo de bomba alto (2,4 L/min/m²), para cualquier temperatura y régimen de perfusión, que cuando se utiliza un flujo bajo (1,2 L/min/m²).³³⁸

Hasta ahora, en el modelo experimental el flujo de bomba utilizado era una variable dependiente del retorno venoso, es decir, condicionado por el estado de las resistencias periféricas. Además, la utilización de dos situaciones térmicas diferentes mediante un periodo de Recirculación Normotérmica (RN) seguido de otro de Recirculación Hipotérmica supone que a lo largo de la recirculación se produzcan importantes variaciones de la magnitud del flujo. Con este modelo se observó que la supervivencia se asociaba a aquellos casos que habían mantenido una media del flujo de bomba superior a 1,7 L/min/m².³⁵² Puesto que el flujo alto tendría un efecto beneficioso en hígados sometidos a CEC y en injertos con lesión por IC se planteó la idea de transformar el flujo de bomba en una variable independiente con dos magnitudes (flujo alto y bajo) aplicando cada modalidad de forma constante para conocer cómo éste determinaría la hemodinámica hepática, si ésta es adecuada a los requerimientos metabólicos hepáticos y si permite la reversibilidad de la lesión tras 60 min de IC.

La primera hipótesis plantea que, una vez transformado el flujo de bomba en una variable independiente, es decir, un flujo constante, y aplicado con dos magnitudes durante toda la recirculación: flujo alto (2,4 L/min/m²) y flujo bajo (1,2 L/min/m²), la utilización de un flujo alto de bomba debería asociarse a mejores resultados que la aplicación de un flujo bajo de bomba.

2.1.2. Segunda Hipótesis

La duración del periodo de RN es una cuestión importante ya que en nuestro modelo experimental ésta se aplica durante 30 min. Sin embargo, en la práctica clínica con DCP no controlados, el tiempo de RN es mucho mayor ya que tras la declaración de muerte se precisa la obtención del consentimiento familiar, y judicial en muchos casos, para llevar a cabo la extracción, lo que puede requerir entre dos y tres horas adicionales.⁷⁰ Durante este tiempo, la RN puede prolongarse entre los 60¹⁴⁹ y los 140 min (rango: 60 - 240 min).^{90, 356} Además, en la actualidad, los sistemas *ex vivo* de preservación y recuperación de órganos procedentes de DCP (máquina de perfusión fría,²⁴⁶⁻²⁴⁸ NELP^{249, 250}), utilizan periodos de tratamiento de hasta 24 horas, con resultados muy favorables, incluso con 60 min de IC.^{93,249-253} Puesto que los métodos de preservación basados en el mantenimiento de condiciones fisiológicas (normotermia, oxigenación y uso de sangre como perfusato) durante largos periodos son útiles en la recuperación hepática, cabría plantearse si el efecto beneficioso de la RN sería tiempo-dependiente.

Por ello la segunda hipótesis plantea que prolongar la RN de 30 a 60 min podría tener un efecto beneficioso sobre la lesión hepática tras 60 min de IC.

2.1.3. Tercera Hipótesis

La RN se sigue de Recirculación Hipotérmica (RH) para conseguir un enfriamiento de forma rápida y uniforme antes del almacenamiento estático en frío. No obstante, la hipotermia tanto con normoxia como con hipoxia, produce lesiones *per se* en cultivos de células endoteliales y hepatocitos,^{104-106, 108, 110} así como en injertos hepáticos no dañados por la IC.¹¹²⁻¹¹⁴ También se ha visto que, tras someter injertos hepáticos a periodos secuenciales de IC seguidos de periodos de IF, la viabilidad hepática se ha relacionado con la duración de ambos periodos pero de forma inversamente proporcional, es decir, cuanto mayor sea el periodo de IC menor debería ser el periodo de IF.¹²⁸ Así mismo, los injertos hepáticos de DCP sometidos a breves periodos de enfriamiento antes de la preservación normotérmica *ex situ* muestran efectos deletéreos,²⁴⁹⁻²⁵¹ mientras que el uso de perfusión de sangre normotérmica y oxigenación durante periodos de hasta 24 horas se ha asociado a buenos resultados.^{249, 250}

Probablemente la recuperación de los injertos hepáticos sometidos a IC se halle menos vinculada a la duración de la isquemia y mucho más al daño adicional causado por la combinación de hipotermia, hipoxia y soluciones de preservación, aunque se trate de cortos periodos de tiempo.

Por ello la tercera hipótesis plantea que la eliminación del periodo de RH, aunque breve, podría ser beneficiosa sobre la recuperación del injerto hepático.

2.1.4. Cuarta Hipótesis

En el perfil de la dobutamina confluye un doble efecto beneficioso: mejora la perfusión del territorio esplácnico ^{219, 220} y tiene capacidad hepatoprotectora, que ejerce mediante el enzima *heme-oxigenasa* por un mecanismo de preconditionamiento isquémico. ^{193, 229, 231} El efecto de la dobutamina, añadida durante la recirculación, sobre un injerto hepático sometido a lesión por IC se desconoce. No obstante, dado que en estudios previos, la adición de sustancias citoprotectoras como SAME, L-Arginina o glicina ²⁰⁷⁻²¹¹ durante la RN ha tenido un efecto beneficioso *per se*, que se ha sumado al efecto de la RN, cabría plantearse si la utilización de dobutamina podría mejorar la calidad del injerto hepático obtenido.

Según esto, la cuarta hipótesis plantea que la administración de dobutamina durante el periodo de la recirculación podría modificar la hemodinámica hepática, esperando incrementos del flujo portal y arterial hepático. Si la RN y la dobutamina ejercen separadamente hepatoprotección por un mecanismo de preconditionamiento, cabría plantearse si su acción conjunta pudiera resultar beneficiosa.

2.2. Objetivos

2.2.1. En función del uso de tres flujos de bomba: variable, constante alto y constante bajo:

1. Conocer qué aspectos asociados a la aplicación del flujo de bomba optimizan la recirculación evaluando la calidad del injerto hepático mediante el estudio bioquímico e histológico de la función hepatocitaria, endotelial, el metabolismo energético y la supervivencia postrasplante
2. Realizar el análisis descriptivo del flujo de bomba, la hemodinámica hepática y el metabolismo hepático de oxígeno.

2.2.2. En función de la prolongación del tiempo de recirculación normotérmica:

1. Evaluar la calidad del injerto hepático a través del estudio bioquímico e histológico de la función hepatocitaria, endotelial, el metabolismo energético y la supervivencia postrasplante
2. Realizar el análisis descriptivo del flujo de bomba, la hemodinámica hepática y el metabolismo hepático de oxígeno.

2.2.3. En función de la ausencia de recirculación hipotérmica:

1. Evaluar la calidad del injerto hepático a través del estudio bioquímico e histológico de la función hepatocitaria, endotelial, el metabolismo energético y la supervivencia postrasplante.

2.2.4. En función de la administración de dobutamina durante la recirculación:

1. Evaluar la calidad del injerto hepático a través del estudio bioquímico e histológico de la función hepatocitaria, endotelial, el metabolismo energético y la supervivencia postrasplante.
2. Análisis descriptivo del flujo de bomba, la hemodinámica hepática y el metabolismo hepático de oxígeno.

2.2.5. Valor Pronóstico del Flujo de Bomba y la Hemodinámica Hepática con la Aplicación de un Flujo de Bomba Variable

1. Conocer si el empleo de un flujo de bomba variable proporciona un resultado del flujo de bomba y/o de flujo arterial hepático y/o de flujo portal con valor pronóstico precoz sobre viabilidad del injerto hepático, de forma que durante el periodo de recirculación pudiesen descartarse los injertos no viables.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Definición, Sujetos y Ámbito del Estudio

Se realizó un estudio prospectivo en modelo porcino, perteneciente a una línea de investigación experimental sobre trasplante hepático con donante a corazón parado. La asignación de los casos a los distintos grupos se hizo mediante una tabla de números aleatorios. Se consideró el cerdo como animal idóneo para este tipo de experimento porque la anatomía y la fisiología son similares a la humana, la tasa de rechazo hiperagudo por incompatibilidad es aceptablemente leve y su coste no es elevado, ya que su reproducción es fácil y numerosa. Se utilizaron cerdos Large White (donante-receptor) con un peso entre 25 y 35 Kg sin considerar el sexo. Todos los animales fueron suministrados por la misma granja especializada (Isoquimen S.A). Los animales fueron atendidos por personal especializado del Estabulario de Cirugía Experimental de la *Facultat de Medicina (Universitat de Barcelona)*. El estabulario consta de un área quirúrgica y cuatro corralinas individuales con suelo templado y suministro libre de agua y pienso.

El experimento básico consistió en la realización de un trasplante hepático con un injerto obtenido de un donante sometido a 60 min de IC después de causarle una parada cardiocirculatoria. Tras finalizar la IC se inició una fase de RN a 37° C durante 30 min, seguida de enfriamiento progresivo hasta alcanzar los 15°C en la superficie hepática (RH). A continuación se extrajo el hígado que se preservó durante 6 horas a 4°C en solución UW. Se realizó el trasplante a un receptor porcino evaluándose la supervivencia durante cinco días. Al finalizar este periodo se sacrificó al receptor. La técnica quirúrgica utilizada para el trasplante fue la descrita por Calne,³⁵⁷ con clampaje de cava previamente a la hepatectomía. Esta técnica permite buena tolerancia en el receptor durante la fase anhepática, siempre que ésta no sea superior a los 20 min.³⁵⁸

3.2. Grupos de Estudio

Constó de 6 grupos de 8 pares de cerdos (donante-receptor), excepto el grupo 30V (control), con 10 pares de animales. La modificación de cada grupo respecto al control se muestra en la Tabla 1. Los grupos de estudio se agruparon según las cuatro hipótesis de estudio.

1. El efecto del tipo y magnitud del flujo de bomba: 30A y 30B.
2. El efecto de la prolongación de la RN a 60 min: 60V.
3. El efecto de la supresión de la RH: 30NF.
4. El efecto de la adición de dobutamina durante la recirculación: 30DBT.

Grupo 30V (control), n= 10

- Periodo de isquemia caliente: **60 min.**
- Recirculación: **Normotermia durante 30 min, seguida de Hipotermia.**
- Flujo de la bomba de CEC: **variable**, en función del retorno venoso.

Grupo 30A, n= 8

- Periodo de isquemia caliente: 60 min.
- Recirculación: Normotermia durante 30 min, seguida de Hipotermia.
- Flujo de la bomba de CEC: **constante y alto** a 2,4 L/min/m².

Grupo 30B, n= 8

- Periodo de isquemia caliente: 60 min.
- Recirculación: Normotermia durante 30 min, seguida de Hipotermia.
- Flujo de la bomba de CEC: **constante y bajo** a 1,2 L/min/m².

Grupo 60V, n= 8

- Periodo de isquemia caliente de 60 min.
- Recirculación: **Normotermia durante 60 min**, seguida de Hipotermia.
- Flujo de la bomba de CEC: variable, en función del retorno venoso.

Grupo 30SRH, n= 8

- Periodo de isquemia caliente de 60 min.
- Recirculación: Normotermia durante 30 minutos, **sin Hipotermia**.
- Flujo de la bomba de CEC: variable, en función del retorno venoso.

Grupo G 30DBT, n= 8

- Periodo de isquemia caliente de 60 min.
- Recirculación: Normotermia durante 30 min, seguida de Hipotermia
- Utilización de dobutamina (DBT) a 5 µg/Kg/min (250 µg/ml en S. Glucosado 5%)
- Flujo de la bomba de CEC: variable, en función del retorno venoso.

<i>Grupos</i>	<i>Tiempo IC</i>	<i>Tiempo RN</i>	<i>RH (15°C)</i>	<i>Tipo de flujo</i>	<i>Dobutamina</i>
<i>30V (control)</i>	60 min	30 min	Sí	Variable	No
<i>30A</i>	60 min	30 min	Sí	Constante alto	No
<i>30B</i>	60 min	30 min	Sí	Constante bajo	No
<i>60V</i>	60 min	60 min	Sí	Variable	No
<i>30SRH</i>	60 min	30 min	No	Variable	No
<i>30DBT</i>	60 min	30 min	Sí	Variable	Sí

Tabla 1. Grupos de estudio. En negrita se destaca el aspecto diferente respecto al grupo control 30V.

3.3. Procedimientos en el Donante y el Receptor

3.3.1. Fase del Donante

1. Premedicación, anestesia, pesaje y monitorización.
2. Lavado, aseptización y entallado del campo quirúrgico.
3. Disección del cuello, localización y canulación de carótida y yugular externa.
4. Laparotomía media. Localización y canulación de grandes vasos.
5. Montaje y cebado de la bomba de CEC.
6. Provocación de la parada cardíaca y periodo de IC de 60 min.
7. Periodo de recirculación (RN \pm RH).
8. Aislamiento vascular del hígado, perfusión hepática con UW, hepatectomía y cirugía de banco.
9. Preservación del injerto hepático a 4° C e inicio de 6 horas de la IF.

3.3.2. Fase del Receptor

1. Incluye los cuatro primeros apartados descritos para el donante.
2. Inicio del tratamiento inmunosupresor.
3. Laparotomía y hepatectomía en el receptor e inicio de la fase anhepática.
4. Lavado del injerto con S. Ringer a temperatura ambiente (recalentamiento).
5. Implante del injerto hepático y reperusión.
6. Educción anestésica. Inicio de la analgesia postoperatoria.
7. Traslado del animal a la jaula metabólica y control postoperatorio diario.
8. Sacrificio del receptor en el quinto día postrasplante.

El proceso comenzó con la llegada de los animales del centro suministrador y su ubicación por pares en las corralinas del estabulario. Se alimentaron con pienso ecológico y las 24 horas previas al trasplante guardaron ayuno de pienso y libre ingesta de agua.

Los animales se **premedicaron** con 10 mg/kg de azaperona (Stresnil®) IM. Tras 15-20 min el animal estaba apto para ser trasladado al quirófano, dónde se canalizó la vena auricular con un catéter (Abbocath® 20) que se conectó a una perfusión de S Glucosado al 5% a un ritmo de infusión de 10 ml/kg/h.

La **inducción anestésica** se realizó EV con tiopental sódico (15 mg/kg), fentanilo (5 µg/Kg) y besilato de atracurio (0,5 mg/Kg). Una vez intubado, el animal se conectó a un respirador Servo 900 D-Siemens (FiO₂ 50%). La anestesia se mantuvo con Isoflurane® (CAM: 0,7-1).³⁶¹

3.3.3. Monitorización

En un monitor Hewlett-Packard, 78342-A se registraron las siguientes variables:

- Electrocardiograma, con dos derivaciones.
- Tensión arterial cruenta, canalizando la arteria carótida por disección del cuello.
- Presión Venosa Central (PVC): mediante un catéter central en la vena yugular interna localizada por disección del cuello.
- Capnografía. Se mantuvo EtCO₂ entre 30 y 40 mm Hg.
- Temperatura, a través de un sensor térmico introducido hasta el esófago.

En un aparato Transonic Systems® se midieron los flujos vasculares a nivel de:

- Arteria hepática (AHp) y vena porta (VP).

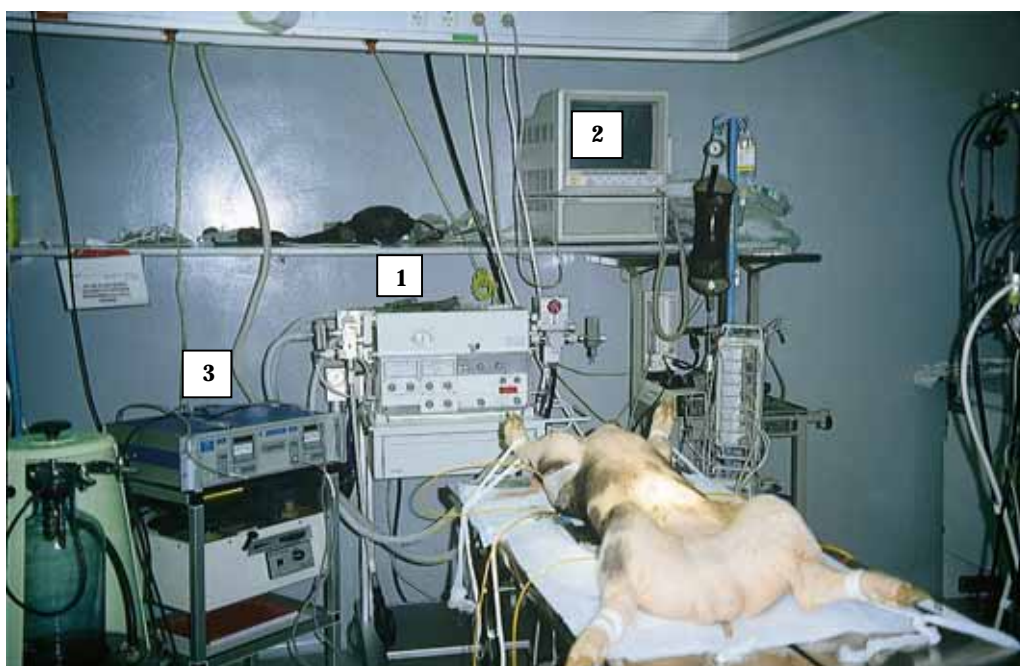


Foto 1. Colocación del animal en la mesa operatoria una vez realizada la inducción anestésica.

1: Respirador Servo 900. **2:** Monitor Hewlett-Packard. **3:** Medidor de flujos vasculares Transonic-Systems.

La **cirugía** se inició con la preparación del campo quirúrgico mediante el lavado (agua y jabón de povidona yodada), aseptización (solución alcohólica de povidona yodada -Orsan®-) y entallado del campo quirúrgico (cuello, tórax y abdomen). Se empezó por la incisión en la región lateral derecha del cuello, seccionándose el músculo *Platisma colli* para separar lateralmente el músculo esternocleidomastoideo. Una vez hallado el paquete vasculonervioso del cuello se localizaron la arteria carótida, la vena yugular interna y el nervio neumogástrico. En la carótida se insertó un catéter arterial 16G Arrow® (visualización de la curva de presión y toma de muestras de sangre arterial) y en la vena yugular interna se introdujo una cánula para la CEC (donante), o un catéter central de tres luces (receptor) para la infusión de líquidos endovenosos, la monitorización de la PVC y para la toma de muestras sanguíneas y el sacrificio del animal en el postoperatorio.

En el **donante** se realizó una laparotomía mediante incisión xifopubiana, la disección por planos y hemostasia hasta la localización del hígado. Tras verificar el buen aspecto macroscópico del hígado se disecó el pedículo hepático dónde se hallaron la AHp, la VP y la vía biliar (VB). Los transductores para la medición de los flujos vasculares se colocaron en la vena porta y la A. hepática y se realizaron las mediciones basales. Fotos 2 y 3.

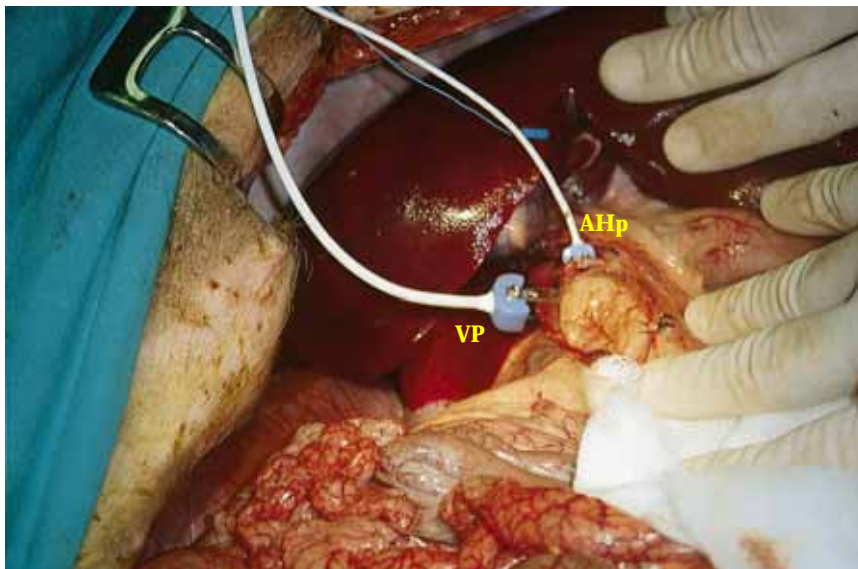


Foto 2 (Arriba): Colocación de los transductores de flujo en la vena porta (VP) y la arteria hepática (AHp).

Foto 3 (Abajo): Medición continua de los flujos de vena porta y de arteria hepática



Se obtuvieron las muestras de sangre (arterial y venosa) y tejido hepático, se administraron 3 mg/kg heparina sódica EV y después se indujo la parada cardiaca mediante 15-20 ml de CIK 2M EV. Tras verificarse la fibrilación ventricular y la caída de presión arterial se interrumpió la ventilación mecánica, iniciándose la IC durante 60 min. A continuación, se localizaron la vena cava inferior y por debajo de la salida de las arterias renales se insertó una cánula 28 French, que se pinzó hasta conectarse al circuito de CEC. Foto 4. Se procedió de la misma manera con la arteria aorta, y se insertó una cánula 16 French por encima de su bifurcación. Una vez establecidos los accesos vasculares (Vena yugular interna, Vena Cava inferior y Aorta) se conectaron al sistema de CEC quedando el circuito cerrado. Foto 5. El sistema de CEC constó de una bomba de rodillo no pulsátil (Stöckert-Shiley®), un oxigenador de membrana (William-Harvey H-1700, CR Bard Inc), previamente cebado con 500 mL de Ringer, 500 mL de Gelafundina® y 250 mL de manitol al 20% (0,5 g/Kg) y un intercambiador de temperatura (Marcusor® Sorin). Fotos 6 y 7.

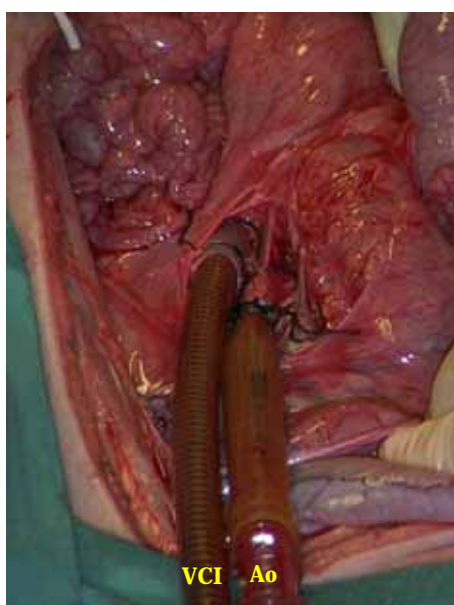


Foto 4 (Izquierda): Canulación de la Aorta y la Cava Inferior

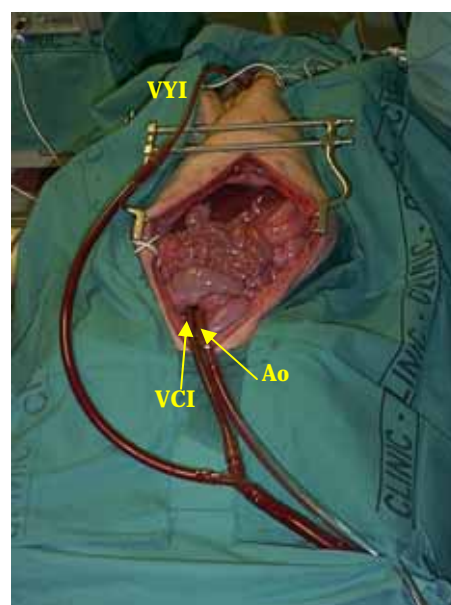


Foto 5 (Derecha): Circuito vascular constituido por la conexión al circuito de CEC de las cánulas insertadas en la vena yugular interna (VYI), la vena cava inferior (VCI) y la arteria Aorta (Ao)

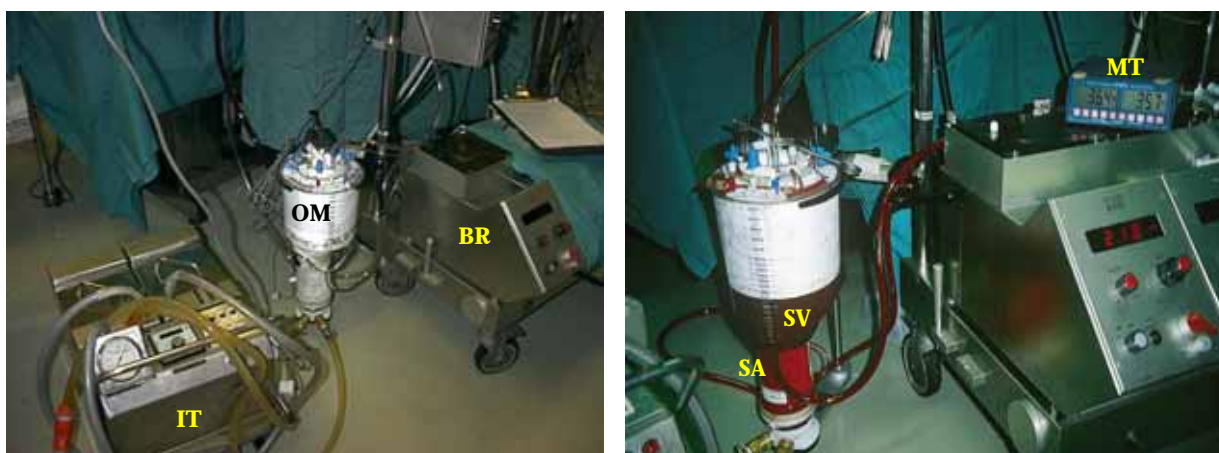


Foto 6 (Izquierda): Elementos de un sistema de CEC: **1:** Bomba de rodillo (BR), **2:** Oxigenador de membrana (OM), cebado con soluciones coloides, cristaloides y manitol, **3:** Intercambiador de temperatura (IT).

Foto 7 (Derecha): Sistema de CEC una vez iniciada la recirculación mediante la aplicación del flujo de bomba según la superficie corporal. En el reservorio se diferencia, en la parte superior la sangre venosa (SV), de color más oscuro, y en la parte inferior la sangre arterializada (SA) de color más claro. En el monitor de temperatura (MT) aparece la temperatura de la sangre del reservorio (izquierda) y de la superficie hepática (derecha).

Finalizado el periodo de 60 min de IC, se inició la RN, seguida de RH, hasta obtener 15°C en la superficie hepática. El hígado se perfundió selectivamente con solución UW a 4°C, irrigándose a través de la aorta y de la VP un litro de solución, manteniendo ligaduras en la arteria mesentérica superior y en la aorta supracelíaca. Se abrió el diafragma para seccionar la cava inferior, permitir la salida de la solución de la perfusión hepática y colocar hielo triturado en la cavidad abdominal. Se abrió la vesícula biliar, se aspiró su contenido y se lavó con solución de Ringer. Se inició la disección hepática mediante:

- Sección del colédoco, lo más próximo al duodeno.
- Sección del epiplón menor y del ligamento triangular izquierdo.
- Identificación de la AHp y seguimiento hasta el tronco celiaco y éste, a su vez, en aorta con sección de una porción circular de la misma.

- Identificación y sección de la VP en la vena cava infrahepática, a la altura de la glándula suprarrenal derecha. Sección de una porción circular del diafragma alrededor de la vena cava suprahepática.

En la **cirugía de banco** se prepararon todas las uniones del injerto al receptor:

- Disección periarteriolar de la AHP, desde el tronco celiaco hasta su bifurcación.
- Disección y liberación de todo el tejido periportal innecesario.
- Exéresis de todos los ganglios linfáticos del hilio hepático.
- Lavado cuidadoso de la VB con perfusión de suero fisiológico.
- Disección de la vena cava infrahepática y ligadura de la vena suprarrenal derecha.
- Disección de la vena cava suprahepática, exéresis del diafragma y ligadura de las venas diafragmáticas.
- Comprobación de la indemnidad vascular por inyección de suero fisiológico a través de un catéter y ligadura (Seda 3/0) de las fugas por colaterales.
- Preservación del hígado durante 6 horas, con solución UW a 4°C.
- Sutura de la laparotomía, introducción del animal en un doble saco de plástico y depósito en congelador. Recogida por un servicio especial para incineración.

En el **receptor** se realizó la sedación, anestesia, monitorización y aseptización del campo quirúrgico, así como la hidratación pre-reperfusion (Ringer 500 ml, Gelafundina® 500 ml) y post-reperfusion (Gluc 5%: 15 mL/Kg/hora), inmunosupresión (250 mg de metilprednisolona pre y post-reperfusion) y antibioterapia (1 g de Cefonicid pre-reperfusion).

3.3.4. Técnica quirúrgica

- Laparotomía en “J” y sección del ligamento falciforme hepático.
- Disección y ligadura de AHp, VP y VB seccionando el conducto hepático común en la unión del cístico con el colédoco.
- Disección de AHp derecha, izquierda y común (unión con la A. gastroduodenal).
- Disección de VP y de vena cava infra y supra y retrohepática.
- Sección vascular en el siguiente orden: vena cava infrahepática, VP lo más proximal al hígado y venas suprahepáticas, al ras del parénquima hepático, colocando previamente un clampaje en la vena cava suprahepática.
- No se requirió by-pass veno-venoso para el retorno venoso mesentérico.

Tras las 6h de IF a 4°C, el hígado se irrigó a través de la VP con 500 mL de Ringer a temperatura ambiente y se inició el implante según el siguiente orden:

- Anastomosis de la vena cava suprahepática.
- Anastomosis de la VP: al ser completada se produjo la reperfusión.
- Anastomosis de la vena cava infrahepática.
- Anastomosis de la AH: en la bifurcación con la arteria gastroduodenal.
- Todas las suturas vasculares se realizaron de forma continua con Prolene®.
- Anastomosis de la VB con sutura término-terminal entre el colédoco del injerto y el colgajo coledocal del receptor, colocación de un tutor interno y cierre de la vesícula biliar a nivel del fundus.
- Cierre abdominal y del cuello por planos previa ligadura de la arteria carótida y fijación de la vía central al dorso con sutura de seda.

Al finalizar la cirugía se interrumpió la hipnosis, se administró analgesia (10 mg de buprenorfina IM) y se extubó al animal al verificar la ventilación espontánea y mantener un EtCO₂ inferior a 35 mm Hg. El animal fue depositado en una corralina individual sobre la parte templada del suelo en decúbito lateral derecho. El acceso al agua se produjo en cuanto el animal consiguió incorporarse. Tras las primeras 24 horas se inició dieta a base de yogur y pienso. Se continuó la analgesia con buprenorfina EV y la inmunosupresión con Ciclosporina A, VO, a dosis de 20 mg/Kg/día.

Al quinto día del trasplante se extrajo sangre venosa, después se administraron 500 mg de tiopental sódico y se reabrió la laparotomía. Se valoró el aspecto del hígado, la presencia de líquido intrabdominal (hemático, seroso, bilioso) o cualquier otra anomalía y se comprobó el latido de la AHp. Tras sacrificar el animal con 20-30 mEq de ClK EV, se obtuvo un lóbulo hepático junto con el hilo que se preservó en formol. El cadáver se congeló hasta su recogida.

3.4. Tiempos de Estudio

Tiempo 1: Basal (B). Inmediatamente después de realizarse la anestesia.

Tiempo 2: Final de la IC (FIC). Traduce el daño tras 60 min de IC.

Tiempo 3: Final de la RN (FRN). Traduce el efecto de la RN sobre el injerto hepático. Las determinaciones se realizaron en el minuto 30 de la RN para todos los grupos y en el minuto 60 de la RN en el grupo 60V. Las determinaciones hemodinámicas (flujo de bomba, AHp y VP) durante la RN se determinaron cada 2 min y se evaluaron a los 5, 15 y 30 min para todos los grupos y en el grupo 60V además se recogieron a los 45 y 60 min.

Tiempo 4: Final de la RH (FRH). Al alcanzar 15° C en la superficie hepática.

Tiempo 5: 60 min post-reperusión (PRP). Valora el efecto de la IR 60 min después de la reperusión y la función inmediata del injerto.

Tiempo 6: Segundo día post-trasplante (2D). Valora la función precoz.

Tiempo 7: Quinto día post-trasplante (5D). Valora la función tardía del injerto.

Fase Donante					Fase anhepática		Fase Receptor		
Anestesia Monitorización	Parada Cardiaca	IC	RN	RH	IF	RC	RP	⊕	
		60 min	30 ó 60 min	15°C					6 h
T1		T2	T3	T4			T5	T6	T7
		5, 15, 30, 45, 60 min					60 min	2D	5D

Figura 1. Representación esquemática del experimento. El injerto hepático se obtiene de un donante al que se le produce una parada cardíaca. Tras 60 min de ausencia de circulación y oxigenación (periodo de Isquemia Caliente: **IC**) se inicia un periodo de recirculación con un sistema de derivación cardiopulmonar en dos fases, la primera a 37°C, o fase de Recirculación Normotérmica, (**RN**) que dura 30 o 60 min, según el grupo de estudio, y la segunda, o fase de Recirculación Hipotérmica (**RH**), con enfriamiento progresivo, hasta conseguir 15°C de temperatura en la superficie hepática. Finalizada ésta, el hígado se aísla de la circulación y se preserva a 4°C en solución de la Universidad de Wisconsin, denominándose este periodo de Isquemia Fría (**IF**): Transcurridas 6 horas, el injerto se reperfunde con suero caliente (fase de Recalentamiento: **RC**) y se inicia el implante en el receptor. Tras concluir las anastomosis vasculares se produce la reperusión del órgano (**RP**). El injerto se evalúa en situación basal (**T1**), al final de la isquemia caliente, para conocer la repercusión de esta noxa sobre el hígado (**T2 ó FIC**), durante la RN (determinaciones a los 5, 15 y 30 min, si la RN dura 30 min, y a los 45 y 60 min si la RN dura 60 min, para valorar la hemodinámica hepática y la bomba de derivación cardiopulmonar, así como al final de la RN (**T3 ó FRN**), y de la recirculación hipotérmica (**T4 ó FRH**), para determinar el efecto metabólico de la recirculación sobre la reversión de la lesión causada por la isquemia caliente. Una hora después de la reperusión se analiza la repercusión de la lesión por isquemia-reperusión (**T5 ó PRP**). Finalmente, al segundo y quinto día postrasplante (**T6 ó 2D** y **T7 ó 5D**) se realizan determinaciones para conocer la función hepática inmediata postrasplante, concluyendo el experimento con el sacrificio del animal (**⊕**) al quinto día postrasplante.

3.5. Variables de Estudio

3.5.1. Características morfométricas

Objetivo. Estudiar la homogeneidad de los sujetos de estudio en cada grupo.

VARIABLES MEDIDAS. El peso de los animales, en Kg.

VARIABLES CALCULADAS. La superficie corporal, en m², aplicando un nomograma pediátrico.

Método/muestras. Pesada en una balanza de estabulario.

Tiempo de medición. Basal (T1), tras verificarse una sedación efectiva.

3.5.2. Flujo de bomba

Objetivo. Estudiar la evolución del flujo de bomba en función del tipo y magnitud de flujo aplicado. Flujo variable en función del retorno venoso y flujo constante alto y bajo durante todo el periodo de recirculación.

VARIABLES MEDIDAS

- Flujo de bomba. El débito de la bomba de CEC aplicado durante la recirculación.
- Volumen de fluidos añadidos durante la fase de RN y de RH. Los requerimientos de volumen durante la recirculación se compensaron con la adición de coloides y cristaloides al 50% siempre que el nivel del reservorio descendió por debajo de 200 ml.
- Tiempo de FRH. Hasta alcanzar los 15°C de temperatura en la superficie hepática.

Variables calculadas

- Grupos de flujo constante: Para conocer el débito de bomba (en mL/min) que debía aplicarse a cada caso según se multiplicó la superficie corporal por el valor fijo de flujo de bomba.

$$\text{Flujo de bomba aplicado al grupo con flujo constante alto} = [2,4 \text{ L/min/m}^2] \times SC \text{ (m}^2\text{)}$$

$$\text{Flujo de bomba aplicado al grupo con flujo constante bajo} = [1,2 \text{ L/min/m}^2] \times SC \text{ (m}^2\text{)}$$

- Grupos de flujo variable: Para conocer el flujo de bomba corregido por la superficie corporal (L/min/m²) se dividieron los valores del flujo de bomba en la serie de cada animal por su superficie corporal.

$$\text{Flujo de bomba corregido por SC} = \text{Flujo de bomba (mL/min)} / SC \text{ (m}^2\text{)}$$

- Flujo de bomba medio corregido por la SC. Para evaluar el valor pronóstico del flujo de bomba en los grupos de flujo variable, excepto el grupo 30DBT, se calculó el flujo de bomba medio como valor único por caso mediante la inclusión de todos los valores del flujo de bomba registrados durante la RN

Método/Muestras. El valor del flujo de bomba se obtuvo continuamente de la medición visualizada en la pantalla de la bomba de rodete. Se realizaron calibraciones periódicas de la bomba.

Tiempos de medición. Las mediciones se registraron de forma continua cada 2 min durante la RN. Para los cálculos se utilizaron las mediciones obtenidas en los minutos 5, 15 y 30 de la RN (45 y 60 en el grupo 60 V) y al finalizar la RH (T4). Para los cálculos del flujo de bomba medio se incluyeron todos los datos obtenidos durante la RN.

3.5.3. Hemodinámica hepática

Objetivo. Describir el comportamiento de los flujos vasculares hepáticos en función del tipo de flujo de bomba aplicado y su evolución en el tiempo durante la recirculación.

Variables medidas

- Flujo de la arteria hepática (FAH): en mL/min, mediante un transductor de 3 mm.
- Flujo de la vena porta (FP): en mL/min, mediante un transductor de 5 mm.

Variables calculadas

Los flujos vasculares medidos se corrigieron por la superficie corporal de cada animal.

- Flujo arterial hepático (FAH) en L/min/m².
- Flujo portal (FP) en L/min/m².
- Flujo de vena suprahepática (VSH) o hepático total (FHT). Mediante la suma del flujo arterial y portal.

$$FHT = FP + FAH, \text{ en L/min/m}^2.$$

Método/Muestras: Ultrasonografía. El tiempo que tardan los ultrasonidos emitidos en atravesar un flujo laminar en un vaso de diámetro conocido, permitió determinar el flujo sanguíneo en tiempo real.

Tiempos de medición. Basal, durante la RN en los minutos 5, 15 y 30 (45 y 60 en el grupo 60V) y FRH (T4).

3.5.4. Metabolismo hepático del oxígeno

Objetivo. Valorar la eficacia de la recirculación para mantener el metabolismo aerobio.

VARIABLES MEDIDAS. Hemoglobina (Hb), Presión parcial de oxígeno (pO_2), Saturación de oxígeno (SaO_2), Flujos de A. hepática y V. porta.

VARIABLES CALCULADAS

- Contenido de oxígeno de la sangre de AHP (CaO_2), VP (CpO_2) y VSH ($CvshO_2$): se calcularon mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Contenido de oxígeno} = pO_2 \times 0,0023 + [Hb \times (\text{Sat } O_2 / 100) \times 1,31]$$

- Aporte de oxígeno hepático (HDO_2): dependiente del contenido aferente de oxígeno aportado por el flujo de AHP y VP.

$$HDO_2 = [CaO_2 \times \text{flujo arterial hepático}] + [CpO_2 \times \text{flujo portal}]$$

- Consumo de oxígeno hepático (HVO_2): se calculó restando al aporte el resultado del contenido eferente de oxígeno obtenido en el flujo de VSH.

$$HVO_2 = HDO_2 - [CvshO_2 \times \text{flujo vena suprahepática}]$$

- Cociente de extracción hepática de O_2 (HO_2ER): Relación entre el consumo y el aporte de oxígeno, expresado en porcentaje.

$$HO_2ER = [HVO_2 / HDO_2] \times 100$$

Método/Muestras. Se tomaron muestras de sangre arterial sistémica, portal y de vena suprahepática y se conservaron a 4°C. Las jeringuillas se impregnaron previamente con heparina sódica. Se procesaron en un analizador de gases Ciba Corning ®.

Tiempos de medición. Basal, durante la RN en los minutos 5, 15 y 30 (minuto 60 en el grupo 60V) y FRH (T4).

3.5.5. Marcadores de la lesión hepatocelular

Objetivo. Evaluar la evolución de la lesión hepatocitaria y la acción de la recirculación.

VARIABLES MEDIDAS. Se determinaron las aminotransferasas: ALAT y ASAT.

Método/Muestras. Se midió la concentración catalítica en suero mediante espectrometría en un analizador Dax (Bayer-Technicon). La ALAT y la ASAT se utilizan habitualmente para determinar la extensión de las lesiones por isquemia, preservación y reperfusión. El incremento de la actividad sérica de ALT y AST se inicia poco después de la reperfusión y suele ser proporcional al daño sufrido. En las primeras 24 h postrasplante aumenta entre 4 y 5 veces el valor basal incluso en casos no complicados.^{359, 360}

Tiempos de medición. Basal (T1), FRN (T3), PRP (T5), 2D (T6) y 5D (T7).

3.5.6. Marcador de la lesión endotelial

Objetivo. Evaluar la lesión del endotelio sinusoidal hepático y la acción de la recirculación.

Variables medidas. Concentración de ácido hialurónico (AH) obtenido en sangre arterial sistémica y en VSH simultáneamente.

Variables calculadas

- Extracción Hepática de Ácido Hialurónico. Representa el aclaramiento de AH y se obtiene del cociente entre la diferencia arterio-venosa de AH (EHAH) y la concentración arterial. Se expresa en porcentaje.

$$EHAH = [(AH \text{ art} - AH \text{ vsh}) / AH \text{ art}] \times 100$$

Método/Muestras. Mediante ELISA en el suero de sangre arterial sistémica y de VSH.

El ácido hialurónico es un glucosaminoglicano sintetizado por las células mesenquimatosas y forma parte de la matriz de los todos los tejidos de la economía constituyendo parte del “esqueleto tisular”. En el proceso de recambio celular se degrada pasando vía linfática a la sangre desde dónde es captado mayoritariamente por la célula endotelial hepática mediante un receptor de membrana específico. Su semivida plasmática es muy corta (2,5 – 5 min) y su concentración en el plasma refleja la función endotelial. El aclaramiento depende de la concentración plasmática³⁶¹ y en el trasplante hepático se ha utilizado como valor predictivo del buen funcionalismo del injerto.³⁶²⁻³⁶⁴ La EHAH es un buen índice de la función endotelial. Un resultado positivo indica función endotelial conservada y y un resultado negativo indica una función endotelial dañada.

Tiempos de medición. Basal (T1), FRN (T3) y PRP (T5).

3.5.7. Marcadores del estado energético hepático

Objetivo. Evaluar el metabolismo energético celular durante las distintas fases del trasplante.

Variables medidas. Nucleótidos de adenina (ATP, ADP, AMP) y sus metabolitos de degradación (xantina, hipoxantina) en un homogeneizado de tejido hepático.

Variables calculadas.

- Los resultados de cada nucleótido en cada tiempo del estudio se dividieron por el valor basal y se expresaron como fracción de 1, que fue el valor basal asumido.

$$\text{Nucleótido corregido} = \text{Nucleótido TX} / \text{Nucleótido basal}$$

- La Carga Energética se calculó según la ecuación de Atkinson y se expresó como fracción de 1, al dividirse por el valor basal.

$$\text{Carga Energética: CE} [ATP + (0,5 \times ADP)] / [ATP + ADP + AMP].$$

Método/Muestras. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Las biopsias de tejido hepático se sumergieron en N₂ líquido (-170° C) inmediatamente después de su obtención en fresco y se conservaron a -70°C. Una vez descongeladas, se homogeneizaron (Polytron®) y se centrifugaron dos veces, para separar los diferentes componentes celulares. El sobrenadante se eluyó en una columna de cromatografía de fase inversa (longitud: 20 cm, diámetro interno: 0,4 cm, empaquetada con NUCLEOSIL C18, de 5 µm de diámetro de partícula (Teknokroma), donde se produjo la separación de las diferentes moléculas. La concentración de cada nucleótido (nmol/mL) se calculó del área bajo la curva de cada pico del cromatograma, al compararla con la de su estándar calibrado (Sigma®, St Louis. Mi. USA).

Tiempos de medición. Basal (T1), FIC (T2), FRN (T3) y PRP (T5).

3.5.8. Histología hepática

Objetivo. Determinación morfológica del daño hepático.

VARIABLES MEDIDAS. Se estudiaron siete variables cualitativas.

- **Endotelitis.** Es la aparición de lesiones destructivas del endotelio vascular venoso hepático (portales y hepáticas) y se caracteriza por infiltración subendotelial por linfocitos. El mecanismo de la lesión es inmunológico y se observa tanto en procesos infecciosos (hepatitis) como en casos de rechazo agudo. Se establecieron dos categorías: 0 = ausencia, 1= presencia.
- **Dilatación sinusoidal.** Es la congestión del sinusoides hepático, que se traduce en un aumento del calibre del mismo. Se establecieron cuatro categorías: 0= ausencia, 1= leve, 2= moderada, 3= severa.
- **Infiltración leucocitaria sinusoidal.** En el sinusoides hepático existe una cierta cantidad de polimorfonucleares (PMN) y linfocitos proporcional a la cantidad circulante en sangre. La infiltración excesiva por PMN traduce la lesión por isquemia-reperusión. Se observan focos de necrosis hepatocitarios asociados a acúmulos de PMN (microabscesos). Se establecieron tres categorías: 1=leve, 2= moderada, 3= severa.
- **Infarto.** Es una zona de necrosis por oclusión vascular (arterial: isquémico, venoso: congestivo). Su distribución puede ser muy variable. Se establecieron dos categorías: 0= ausencia, 1= presencia.
- **Disociación hepatocitaria.** Es la pérdida de la morfología típica y la cohesión hepatocitaria debido a la isquemia. El edema provocado por la lesión en la membrana citoplasmática del hepatocito causa abombamiento, pérdida de la forma poligonal y de

la alineación, aumentando el espacio entre ellos y las células endoteliales. Es la lesión previa a la necrosis centrolobulillar. Se establecieron 4 categorías: 0= ausencia, 1= leve, 2= moderada, 3= severa.

- **Necrosis isquémica centrolobulillar.** Es la muerte celular a causa de la isquemia. Aparece en los hepatocitos más alejados de las zonas de aporte vascular, generalmente los próximos a la vena centrolobulillar. Se establecieron dos categorías en función del porcentaje de necrosis observado: $1 < 50\%$, $2 \geq 50\%$.
- **Colangitis isquémica.** La lesión inmunológica inicial finalmente necrosa la pared biliar. El acumulo de detritus necróticos, la inflamación y el material biliar acaban obstruyendo la luz de los conductos biliares de pequeño y gran tamaño y se produce de forma reactiva edema portal, inflamación crónica y proliferación colangiolar periportal. Se establecieron dos categorías: 0 = ausencia, 1= presencia.

Variables calculadas

- **Área de necrosis media.** Es una variable cuantitativa que se obtiene a partir de un corte representativo de parénquima. Se mide el área de tejido necrótico presente en un campo de 15,45 mm² utilizando el programa de análisis de imagen MIP de CID (Barcelona) con un microscopio lumínico Olympus BH2 conectado mediante una cámara de vídeo a un ordenador. Las áreas necróticas se dibujan en un tablero digitalizador utilizando cámara clara y puntero luminoso. Los resultados se expresan como porcentaje de área necrótica respecto al área no necrótica. La distribución del área necrótica es desigual, ya que se afectan mayoritariamente las zonas periféricas respecto a las centrales, por lo tanto el hallazgo de la lesión en mayor o menor cuantía dependerá de la zona biopsiada.

Método/Muestras. La histología hepática se determinó por visualización directa al microscopio óptico. Después del sacrificio del animal, se tomó un lóbulo hepático que incluyese el hilio y se conservó en formol al 3% hasta su procesamiento. Inicialmente la muestra se incluyó en parafina con un procesador de tejido Citadel 2000 de Shandon. Los bloques se cortaron con un microtomo de rotación (Reichert-Jung 2035) en láminas de 3 micras de espesor y tras la desparafinación, se tiñeron con hematoxilina-eosina y se visualizó al microscopio. Se excluyeron aquellos casos que fallecieron antes del 5º día y las muestras con conservación defectuosa.

Tiempos de medición. 5D (T7).

3.5.9. Estudio de la supervivencia

Objetivo. Evaluar de forma global la función primaria del injerto.

VARIABLES MEDIDAS. Variable cualitativa con dos categorías: supervivencia 5º día: Si o No.

VARIABLES CALCULADAS. La proporción entre supervivientes respecto al total de casos por grupo, expresado en porcentaje.

Método/Muestras. La evolución de cada caso según cada grupo.

Tiempos de medición. (T7).

3.5.10. Valor pronóstico precoz del flujo de bomba y hemodinámica hepática

Objetivo. Conocer si existe un valor del flujo de bomba, del flujo arterial y portal hepático con valor pronóstico precoz sobre la viabilidad del injerto hepático.

VARIABLES MEDIDAS. Flujo de bomba, flujo arterial hepático y flujo portal.

VARIABLES CALCULADAS. El flujo medio de bomba, arterial hepático y portal según la superficie corporal. Los flujos vasculares se refirieron a su valor basal y se expresaron en porcentaje.

Método/Muestras. Se analizaron los animales de los grupos de flujo de bomba variable (30V, 30SRH, 60V) y se dividieron en dos categorías: supervivientes y no supervivientes. Para todos los grupos se incluyeron los valores obtenidos durante la RN. Se excluyó el grupo 30DBT por la posible interferencia de la dobutamina sobre la hemodinámica hepática.

Tiempos de medición. Los flujos se registraron cada dos minutos durante toda la RN.

En la *Tabla 2* se muestran las variables del estudio, medidas y calculadas, con el tipo de muestra utilizada, el método de determinación y los tiempos de estudio.

	CEC	Hemodinámica hepática	Metabolismo de Oxígeno	Lesión hepatocelular	Lesión endotelial	Estado energético	Histología	Supervivencia
Variables medidas	Flujo bomba Volumen de fluidos Tiempo RH	Flujo arterial hepático Flujo portal	pO ₂ Saturación O ₂ Hemoglobina	ALAT ASAT	Ácido Hialurónico (AH)	ATP, ADP, AMP, xantina, hipoxantina	Endotelitis Inflamación Necrosis Colangitis	En días
Variables calculadas	Flujo alto Flujo bajo Flujo bomba	Flujo hepático total	Contenido O ₂ HDO ₂ , HVO ₂ HO ₂ ER	No	Extracción Hepática AH	Carga energética	Área Necrótica Media	No
Tipo muestra		A. hepática Vena Porta Bomba CEC	Sangre arterial Sangre venosa	Suero	Suero	Tejido hepático	Tejido hepático	Animal Receptor
Método		Ultrasonografía	Amperometría	Espectrometría	EIA	HPLC	Microscopía Óptica	Valoración diaria
Tiempos de estudio	T1, RN (5, 15, 30, 45, 60 min) T4	T1, RN (5, 15, 30, 45, 60 min) T4	T1, RN (5, 15, 30, 45, 60 min) T4	T1, T3, T5, T6, T7	T1, T3 y T5	T1, T3 y T5	T7	T7

Tabla 2. Variables de estudio y tiempos de medida. **CEC:** Circulación extracorpórea, **RN:** Recirculación Normotérmica, **RH:** Recirculación Hipotérmica, **ALAT:** Alaninaaminotransferasa, **ASAT:** Aspartatoaminotransferasa, **AH:** Ácido Hialurónico, **ATP:** adenosín trifosfato, **ADP:** adenosín difosfato, **AMP:** adenosín monofosfato, **HDO₂:** Aporte de oxígeno hepático, **HVO₂:** Consumo de oxígeno hepático, **HO₂ER:** Cociente de extracción hepática de oxígeno, **EIA:** Enzimoinmunoanálisis, **HPLC:** Cromatografía líquida de alta resolución. T1: tiempo basal, T2: post 60 min de IC, T3: post 30 o 60 min de RN, T4: final de la RH, T5: 60 min post-reperfusión, T6: 2º día, T7: 5º día postrasplante.

3.6. Análisis Estadístico

Las variables cualitativas (supervivencia y variables histológicas) se expresaron como porcentaje de casos respecto al total. Para la comparación estadística se utilizó la prueba de χ^2 , con la prueba exacta de Fisher.

Las variables cuantitativas se expresaron como media y desviación estándar. Para el análisis comparativo de las diferencias intra-grupo de las variables cuantitativas se utilizaron las pruebas no paramétricas de *Friedman* y *de Wilcoxon*. El análisis comparativo intergrupos de las variables cuantitativas en el estudio sobre el uso de tres tipos de flujo de bomba se realizó con el análisis de la varianza (ANOVA) y se aplicó el contraste *post-hoc* de *Bonferroni*. En estas comparaciones los resultados significativos se expresaron como intervalo de confianza del 95% (IC 95%). En las comparaciones restantes se aplicó la prueba no paramétrica de la *U de Mann-Whitney*. Se consideró un resultado estadísticamente significativo para un valor de $p < 0,05$. El análisis comparativo de los flujos medios totales de bomba, de arteria hepática y de porta se realizó mediante la prueba paramétrica de la *t de Student*. Para la comparación de los valores medios del flujo de bomba, flujo arterial y flujo portal del grupo 60V respecto a la primera y segunda etapa de la RN se utilizó la prueba paramétrica de *t de Student* para medidas repetidas. El análisis del valor pronóstico se realizó con las curvas ROC de rendimiento diagnóstico.

* * * * *

4. RESULTADOS

4.1. Aplicación de Tres Tipos de Flujo de Bomba Durante la Recirculación

4.1.1. Morfometría

Grupo	n	SC (m ²)	Peso (Kg)
30V	10	1,01 ± 0,007	28,6 ± 3,2
30A	8	0,98 ± 0,006	27,1 ± 2,7
30B	8	1,05 ± 0,009	29,2 ± 3,1

Tabla 3. Características morfométricas de los animales de estudio. Grupo 30V: grupo control. Grupo 30A: grupo con flujo de bomba alto. Grupo 30B: grupo con flujo de bomba bajo. **n**: casos por grupo, SC: superficie corporal en metros cuadrados (m²). Peso en kilogramos (Kg). Resultados en media ± desviación estándar.

4.1.2. Supervivencia

Grupo	n	Vivos/Muertos	Supervivencia (%)
30V	10	8/2	80
30A	8	5/3	62,5
30B	8	3/5	37,5

Tabla 4. Se muestra la supervivencia al quinto día postrasplante en los grupos de estudio. **n**: casos por grupo. Vivos/Muertos: casos supervivientes y casos no supervivientes al quinto día postrasplante. Supervivencia: porcentaje (%) de casos supervivientes respecto al total de casos en cada grupo de estudio.

La supervivencia del grupo 30V fue la más alta de todos los grupos de estudio, seguida por la del grupo 30A y la menor correspondió al grupo 30B, aunque no se hallaron diferencias significativas entre ellos.

4.1.3. Flujo de Bomba y Hemodinámica Hepática Durante la Recirculación

4.1.3.1. Flujo de bomba

Grupo	n	F Bomba 5 min RN	F Bomba 15 min RN	F Bomba 30 min RN	F Bomba FRH
30V	10	2,70 ± 0,53	3,25 ± 1,04 ♦	2,39 ± 0,70 ♦	1,66 ± 0,23 ♦
30A	8	2,37 ± 0,12	2,37 ± 0,12*	2,37 ± 0,12	2,37 ± 0,12*
30B	8	1,18 ± 0,06 ♣ ♣	1,19 ± 0,06 ♣ ♣	1,19 ± 0,06 ♣ ♣	1,19 ± 0,06 ♣ ♣

Tabla 5. Flujo de bomba a los 5, 15 y 30 min de recirculación normotérmica (RN) y al final de la recirculación hipotérmica (FRH), en media ± desviación estándar (L./min/m²). ♦ p ≤ 0,05 intra-grupo, * p ≤ 0,05 30V vs 30A, ♣ p ≤ 0,05 30V vs 30B, ♣ p ≤ 0,05 30A vs 30B. n: casos por grupo.

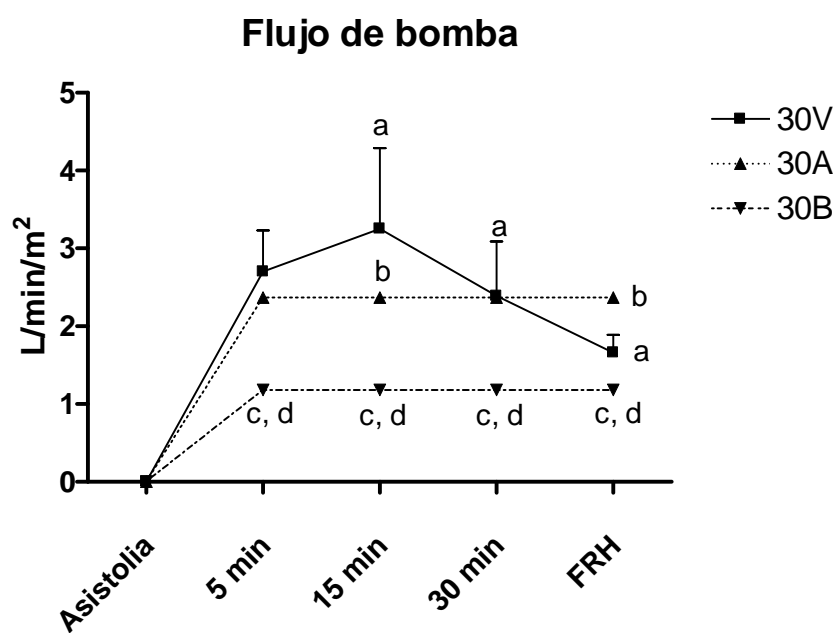


Figura 5. Flujo de bomba, iniciado tras 60 min de asistolia, a los 5, 15 y 30 min de recirculación normotérmica y al final de la recirculación hipotérmica (FRH) en L./min/m². **a:** p ≤ 0,05 intra-grupo, **b:** p ≤ 0,05 30V vs 30A, **c:** p ≤ 0,05 30V vs 30B, **d:** p ≤ 0,05 30A vs 30B.

La evolución en el tiempo de recirculación mostró un comportamiento diferente entre el grupo 30V (de flujo variable) y los grupos 30A y 30B (de flujo constante). En 30V se produjo un incremento progresivo del flujo de bomba (FB), con un valor máximo al minuto 15 de la RN ($Z = -2,1$; $p = 0,036$). A continuación, el flujo descendió progresivamente y se obtuvo el valor mínimo al final de la RH ($p \leq 0,05$ respecto a todos los tiempos durante la RN). Los FB fueron estadísticamente diferentes entre cada uno de los tiempos ($p \leq 0,05$). En los grupos de flujo constante, por definición, no hubo variaciones intra-grupo. La comparación multivariante inter-grupos mostró diferencias significativas entre los diferentes tiempos en todos los grupos durante la RN y el FRH ($p < 0,001$ en todos los tiempos). El contraste *post-hoc* con la prueba de Bonferroni mostró las siguientes diferencias significativas.

FB₅: 30V/30B (1,10-1,94) y 30A/30B (0,74-1,63)

FB₁₅: 30V/30A (0,07-1,68), 30V/30B (1,25-2,82) y 30A/30B (0,33-2,03)

FB₃₀: 30V/30B (0,65-1,74) y 30A/30B (0,60-1,75)

FB_{FRH}: 30V/30A (-0,92 y -0,5), 30V/30B (0,28-0,7) y 30A/30B (0,98-1,42)

4.1.3.2. Fluidoterapia y tiempo de enfriamiento

Grupo	n	Volumen RN	Volumen RH	Tiempo FRH
30V	10	120,3 ± 209,7 ♦	455 ± 172,3 ♦	17,10 ± 5,11
30A	8	162,5 ± 176,7 ♦	487 ± 235,6 ♦	18,75 ± 5,37
30B	8	25 ± 70,7	100 ± 192,7 ♠ ♣	20,38 ± 2,83

Tabla 6. Fluidoterapia añadida durante la recirculación normotérmica (Volumen RN) e hipotérmica (Volumen RH) en mL. Tiempo utilizado hasta la obtención de 15°C en la superficie hepática o final de la recirculación hipotérmica (Tiempo FRH), en minutos. Resultados en media ± desviación estándar. N: casos por grupo.

♦ $p \leq 0,05$ intra-grupo Volumen RN vs Volumen RH. ♠ $p \leq 0,05$ 30V vs 30B, ♣ $p \leq 0,05$ 30A vs 30B.

La comparación intra-grupo mostró que el volumen añadido durante la RN fue superior al de la RH para 30V ($Z=-2,58$; $p=0,010$) y 30A ($Z=-2,410$; $p=0,016$). En la comparación inter-grupos no se hallaron diferencias respecto al volumen añadido durante la RN, aunque 30B fue el de menor cuantía; en cambio durante la RH el volumen añadido fue inferior en 30B que en 30V ($p=0,003$; IC 95% 110,5-599,4) y a 30A ($p=0,002$; IC 95% 129,8-645,1). No se observaron diferencias inter-grupos respecto a la duración de la RH.

4.1.3.3. Flujo arterial hepático

Tabla 7. Flujo arterial hepático

Grupo	n	FAH Basal	FAH 5 min RN	FAH 15 min RN	FAH 30 min RN	FAH FRH
30V	10	176,5 ± 80,7 (100%)	159,6 ± 66,5 (90%)	176,0 ± 72,5 (100%)	156,3 ± 93,6 (88%)	132,1 ± 75,3 (83%)
30A	8	140,2 ± 34,1 (100%)	152,0 ± 48,1 (108%)	174,4 ± 52,6 (120%)	178,7 ± 62,4 (127%)	136,8 ± 44,5 (97%)
30B	8	184,5 ± 172,8 (100%)	55,2 ± 37,2 ♦ ♠ ♣ (29%)	73,6 ± 26,9 ♦ ♠ ♣ (39%)	72,3 ± 26,6 ♦ ♠ ♣ (39%)	62,4 ± 33,1 ♦ ♠ ♣ (33%)

o (FAH): basal, a los 5, 15 y 30 min de recirculación normotérmica (RN) y al final de la recirculación hipotérmica (FRH), en media ± desviación estándar (mL/min/m²). Entre paréntesis, el FHA dividido por su valor basal y expresado en porcentaje. ♦ $p \leq 0,05$ intra-grupo vs basal. * $p \leq 0,05$ 30V vs 30A, ♠ $p \leq 0,05$ 30V vs 30B, ♣ $p \leq 0,05$ 30A vs 30B. N: casos por grupo.

Durante la recirculación el flujo arterial hepático (FAH) dependió de la magnitud del flujo de bomba utilizada. Los grupos 30V y 30A recuperaron valores similares al basal durante la RN, descendiendo ligeramente al final de la RH. La comparación intra-grupo no mostró diferencias significativas durante la RN en 30A respecto a los distintos tiempos, aunque sí se obtuvieron diferencias significativas en los flujos obtenidos a los 15 y 30 min de la RN respecto al FRH ($p < 0,005$). En el grupo 30B los flujos arteriales fueron inferiores respecto al

basal durante toda la recirculación ($p < 0,05$). El análisis inter-grupos mostró que el FAH en 30B fue inferior a 30V y 30A durante la RN y la RH. El contraste *post-hoc* con la prueba de Bonferroni mostró las siguientes diferencias significativas.

FAH₅: 30V/30B: (38,8-169,8), 30A/30B: (27,7- 165,8)

FAH₁₅: 30V/30B: (33,8-170,8), 30A/30B: (28,5- 172,9)

FAH₃₀: 30A/30B: (16,6- 196,1)

FAH_{FRH}: 30V/30B: (0,85-138,4), 30A/30B: (1,8- 146,8)

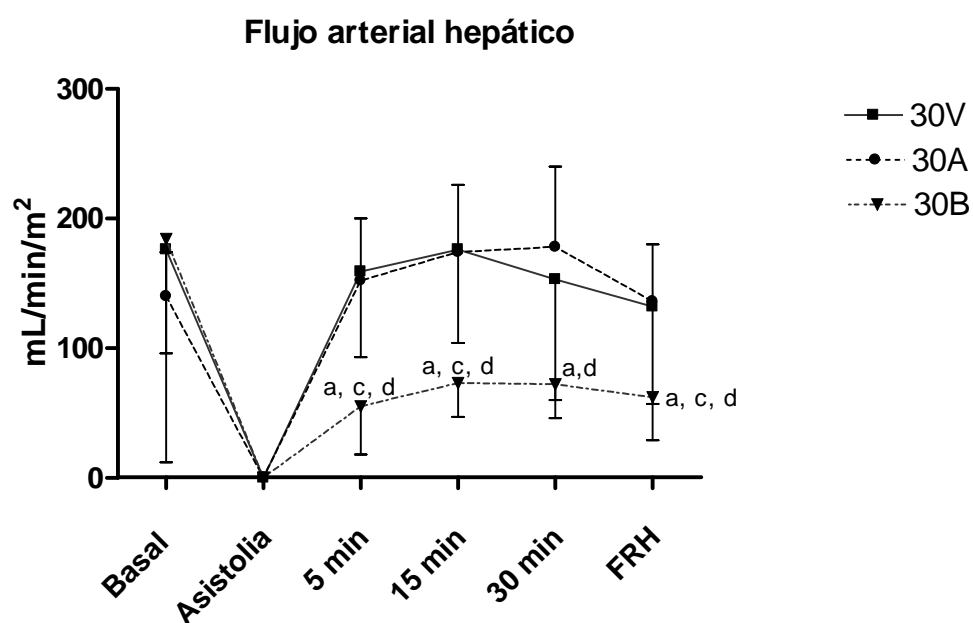


Figura 6. Flujo arterial hepático (mL/min/m²): basal, tras la asistolia, a los 5, 15 y 30 min de recirculación normotérmica y al final de la recirculación hipotérmica (FRH). **a:** $p \leq 0,05$ intra-grupo *vs* basal, **b:** $p \leq 0,05$ 30V *vs* 30A, **c:** $p \leq 0,05$ 30V *vs* 30B, **d:** $p \leq 0,05$ 30A *vs* 30B.

4.1.3.4. Flujo Portal

Grupo	n	FP Basal	FP 5 min RN	FP 15 min RN	FP 30 min RN	FP FRH
30V	10	639,1 ± 138,6 (100%)	242,5 ± 108,9♦ (37%)	287,2 ± 169,4♦ (45%)	327,3 ± 212,63♦ (51%)	231,9 ± 133,6♦ (36%)
30A	8	533,0 ± 146,7 (100%)	300,1 ± 133,7♦ (56%)	378,7 ± 215,1 (70%)	362,9 ± 196,2 (67%)	326,4 ± 116,4♦ (61%)
30B	8	712,7 ± 299,1 (100%)	187,7 ± 91,5♦ (26%)	206,3 ± 101,3♦ (28%)	194,3 ± 91,0♦ (27%)	180,4 ± 56,4♦♣ (25%)

Tabla 8. Flujo portal (FP): basal, a los 5, 15 y 30 min de recirculación normotérmica (RN) y al final de la recirculación hipotérmica (FRH), en media ± desviación estándar (mL/min/m²). Entre paréntesis, el resultado del FP durante la recirculación, dividido por su valor basal y expresado en porcentaje. ♦ p ≤ 0,05 intra-grupo vs basal, ♣ p ≤ 0,05 30A vs 30B. N: casos por grupo.

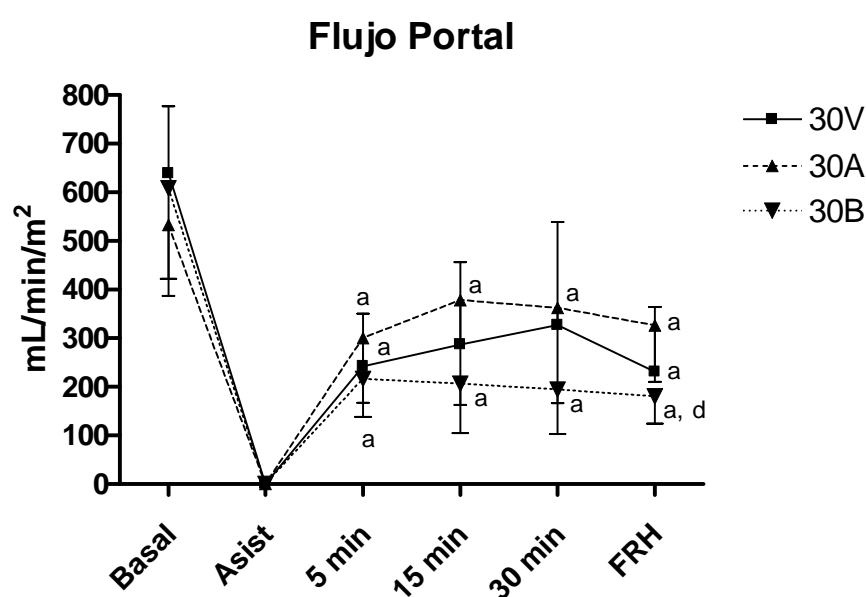


Figura 7. Flujo portal (mL/min/m²): basal, tras la asistolia, a los 5, 15 y 30 min de recirculación normotérmica y al final de la recirculación hipotérmica (FRH). **a:** p ≤ 0,05 intra-grupo vs basal; **d:** p ≤ 0,05 30A vs 30B.

El flujo portal se afectó por la magnitud del flujo de bomba. Tras el inicio de la RN los grupos 30V y 30A incrementaron progresivamente el flujo portal. El grupo 30A consiguió mayor recuperación respecto al basal que el grupo 30V, en el cual los flujos portales fueron inferiores al basal durante toda la recirculación ($p < 0,05$) y mostró menor variabilidad en el tiempo a partir del minuto 15 de la RN, ya que solo los flujos obtenidos a los 5 min y al FRH fueron significativamente inferiores respecto al basal. El grupo 30B, solo fue capaz de recuperar entre un 28% y un 25% del valor basal con valores significativamente inferiores a éste durante la RN y el FRH ($p < 0,05$). La comparación inter-grupos y el contraste *post-hoc* solo presentaron diferencias significativas al final de la RN entre 30A y 30B.

FP_{FRH}: 30A/30B: (0,8- 138,4)

4.1.3.5. Flujo hepático total

Grupo	n	FHT Basal	FHT 5 min RN	FHT 15 min RN	FHT 30 min RN	FHT FRH
30V	10	815,6±150,5 (100%)	402,1±115,6♦ (49%)	463,3 ± 169,9♦ (56%)	483,7± 244,6♦ (59%)	363,9± 148,1♦ (44%)
30A	8	673,2± 51,7 (100%)	452,1±121,3♦ (67%)	553,1 ± 224,9 (82%)	541,7± 212,5 (80%)	463,2± 132,2♦ (68%)
30B	8	897,2 ± 228,3 (100%)	242,9±124,3♦*♣ (26%)	280,0 ± 118,4♦♣ (31%)	266,6±107,3♦♣ (29%)	242,9± 85,2♦♣ (26%)

Tabla 9. Flujo hepático total (FHT): basal, a los 5, 15 y 30 min de recirculación normotérmica (RN) y al final de la recirculación hipotérmica (FRH), en media ± desviación estándar (mL/min/m²). Entre paréntesis, el FHT durante la recirculación, dividido por su valor basal y expresado en porcentaje. ♦ $p \leq 0,05$ intra-grupo vs basal. * $p \leq 0,05$ 30V vs 30A, ♣ $p \leq 0,05$ 30A vs 30B. N: casos por grupo.

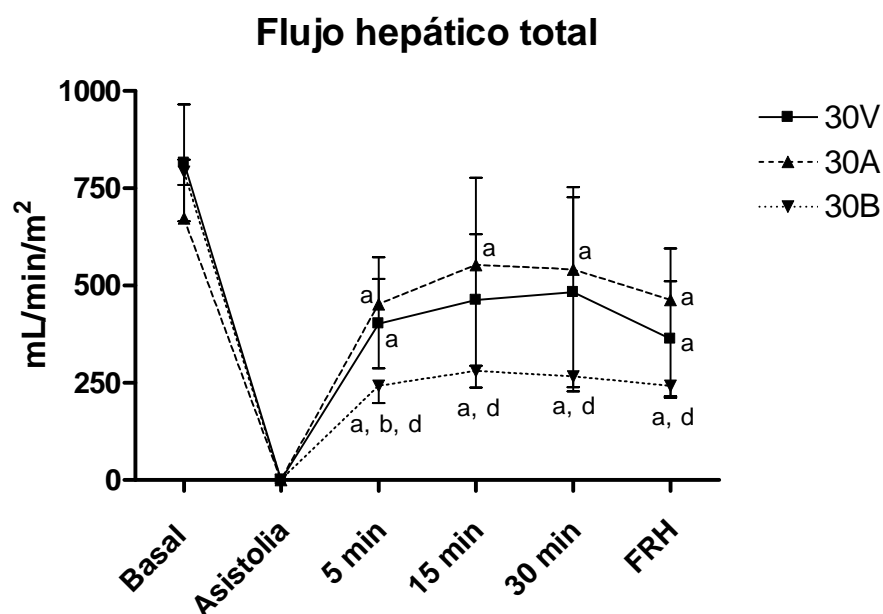


Figura 8. Flujo hepático total (mL/min/m²): basal, tras la asistolia, a los 5, 15 y 30 min de recirculación normotérmica (RN) y al final de la recirculación hipotérmica (FRH). **a:** $p \leq 0,05$ intra-grupo *vs* basal, **b:** $p \leq 0,05$ 30V *vs* 30A, **d:** $p \leq 0,05$ 30A *vs* 30B.

Durante la recirculación el flujo hepático total (FHT) se vio afectado por la magnitud del flujo de bomba aunque los grupos 30V y 30A mostraron una recuperación superior al grupo 30B. La comparación intra-grupo mostró que el basal fue significativamente superior al obtenido durante toda la recirculación en 30V ($p=0,000$) y 30B ($p=0,000$). El grupo 30A solo mostró diferencias a los 5 min de la RN y al FRH. El análisis inter-grupos y el contraste *post-hoc* mostraron que el FHT en 30B fue significativamente inferior a 30A durante la RN y RH.

FHT₅: 30A/30B: (12,1-306,3)

FHT₁₅: 30A/30B: (45,9-500,3)

FHT₃₀: 30A/30B: (14,6- 535,4)

FHT_{FRH}: 30A/30B: (56,3- 384,2)

4.1.4. Metabolismo Hepático de Oxígeno

4.1.4.1. Contenido de oxígeno de arteria hepática, vena porta y vena suprahepática

Grupo	n	CaO ₂ Basal	CaO ₂ 5 min RN	CaO ₂ 15 min RN	CaO ₂ 30 min RN	CaO ₂ FRH
30V	10	12,8 ± 2,1	7,7 ± 0,9♦	7,8 ± 1,2♦	8,1 ± 1,4	6,6 ± 0,004♦
30A	8	11,7 ± 1,0	7,1 ± 0,5♦	6,9 ± 1,7♦	7,0 ± 1,2♦	7,0 ± 0,7♦
30B	8	12,5 ± 1,6	8,8 ± 3,6♦	7,4 ± 1,6♦	7,6 ± 1,4♦	8,3 ± 1,5♦

Tabla 10. Contenido de oxígeno arterial (CaO₂): basal, durante la recirculación normotérmica (RN) y al final de la recirculación hipotérmica (FRH), en media ± desviación estándar (mL de O₂/100 mL). ♦ p ≤ 0,05 intra-grupo vs basal. n: casos por grupo.

Grupo	n	CpO ₂ Basal	CpO ₂ 5 min RN	CpO ₂ 15 min RN	CpO ₂ 30 min RN	CpO ₂ FRH
30V	10	10,4 ± 2,2	5,4 ± 1,3♦	5,8 ± 1,2♦	5,5 ± 0,7♦	5,6 ± 0,009♦
30A	8	8,2 ± 2,0	4,4 ± 0,5♦	4,3 ± 1,3♦ *	4,8 ± 1,3♦	6,1 ± 1,0♦
30B	8	8,7 ± 1,4	4,1 ± 0,9♦	4,2 ± 1,1 ♦♣	3,6 ± 0,9♦♣	6,5 ± 1,4♦

Tabla 11. Contenido de oxígeno portal (CpO₂): basal, durante la recirculación normotérmica (RN) y al final de la recirculación hipotérmica (FRH), en media ± desviación estándar (mL de O₂/100 mL). ♦ p ≤ 0,05 intra-grupo vs basal. * p ≤ 0,05 30V vs 30A, ♣ p ≤ 0,05 30V vs 30B. n: casos por grupo.

Grupo	n	CvshO ₂ Basal	CvshO ₂ 5 min RN	CvshO ₂ 15 min RN	CvshO ₂ 30 min RN	CvshO ₂ FRH
30V	10	9,4 ± 1,9	4,2 ± 1,7♦	4,7 ± 0,9♦	3,5 ± 1,5♦	5,0 ± 0,08
30A	8	7,2 ± 1,9	3,1 ± 1,3♦	2,9 ± 1,1♦*	3,3 ± 1,3♦	5,6 ± 1,5♦
30B	8	8,7 ± 1,3	1,8 ± 0,8♦♣	1,8 ± 0,4♦♣	2,3 ± 1,1♦	5,2 ± 1,9♦

Tabla 12. Contenido de oxígeno de vena suprahepática (CvshO₂): basal, durante la recirculación normotérmica (RN) y al final de la recirculación hipotérmica (FRH), en media ± desviación estándar (mL de O₂/100 mL). ♦ p ≤ 0,05 intra-grupo vs basal. * p ≤ 0,05 30V vs 30A, ♣ p ≤ 0,05 30V vs 30B. n: casos por grupo.

El contenido arterial de oxígeno (CaO_2) presentó un descenso significativo durante la RN y la RH respecto al valor basal en los tres grupos de estudio ($p < 0,05$). Tampoco se hallaron diferencias en la comparación inter-grupos.

El contenido portal de oxígeno (CpO_2) también descendió significativamente durante la RN y la RH respecto al valor basal en los tres grupos estudiados ($p < 0,05$). El análisis *post-hoc* mostró los siguientes resultados:

CpO_2 15: 30V/30A: (0,24- 3,04), 30V/30B: (0,1-2,9)

CpO_2 30: 30V/30B: (0,5- 3,1)

El contenido de vena suprahepática de oxígeno ($CvshO_2$) mostró valores inferiores al valor basal en los tres grupos estudiados ($p < 0,05$). La comparación inter-grupos halló valores significativamente inferiores en 30A y 30B respecto a 30V a los 5 y 15 min.

$CvshO_2$ 5: 30V/30B: (1,7- 4,0)

$CvshO_2$ 15: 30V/30A: (0,63- 2,85); 30V/30B: (1,75- 4,06)

4.1.4.2. Aporte de oxígeno hepático

Grupo	n	HDO ₂ Basal	HDO ₂ 5 min RN	HDO ₂ 15 min RN	HDO ₂ 30 min RN	HDO ₂ FRH
30V	10	84,4 ± 21,8	25,1 ± 8,2♦	30,6 ± 13,0♦	30,9 ± 17,3♦	22,6 ± 1,6
30A	8	60,8 ± 21,9	24,0 ± 4,8♦	29,9 ± 17,3♦	31,8 ± 18,3♦	29,9 ± 10,7♦
30B	8	76,8 ± 12,4	12,3 ± 7,7♦♠♣	14,7 ± 8,2♦	12,9 ± 6,0♦	17,6 ± 8,8♦

Tabla 13. Aporte de oxígeno hepático (HDO₂): basal, durante la recirculación normotérmica y al final de la recirculación hipotérmica (FRH), en media ± desviación estándar (mL/min/m²). ♦ $p \leq 0,05$ intra-grupo vs basal.

♠ $p \leq 0,05$ 30V vs 30B, ♣ $p \leq 0,05$ 30A vs 30B. n: casos por grupo.

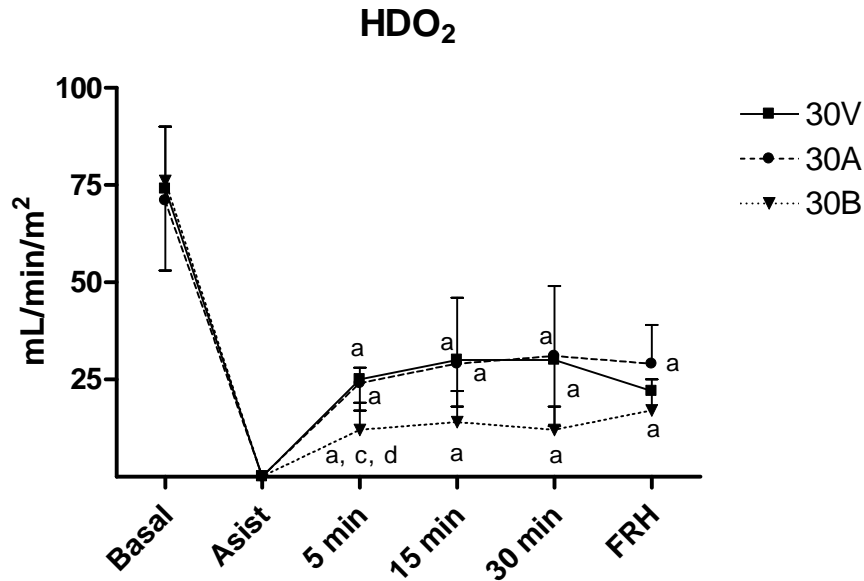


Figura 9. Aporte de oxígeno hepático (HDO_2): basal, tras la asistolia, durante los 30 min de recirculación normotérmica y al final de la recirculación hipotérmica (FRH), en mL./min./m². **a:** $p \leq 0,05$ intra-grupo *vs* basal, **c:** $p \leq 0,05$ 30V *vs* 30B, **d:** $p \leq 0,05$ 30A *vs* 30B.

El HDO_2 descendió bruscamente con la asistolia para recuperarse parcialmente con la recirculación ya que los tres grupos estudiados mostraron valores significativamente inferiores al basal durante la RN y la RH ($p < 0,000$). La comparación inter-grupos mostró que los valores de HDO_2 obtenidos durante la RN solo fueron significativamente inferiores al grupo 30V y 30A en el minuto 5 de la RN.

$HDO_{2,5}$: 30V/30B: (386,7-2156,0), 30A/30B: (234,5- 2099,5)

4.1.4.3. Consumo de oxígeno hepático

Grupo	n	HVO ₂ Basal	HVO ₂ 5 min RN	HVO ₂ 15 min RN	HVO ₂ 30 min RN	HVO ₂ FRH
30V	10	12,2 ± 5,5	8,6 ± 5,0	8,8 ± 5,7	8,5 ± 9,8	2,7 ± 0,3
30A	8	13,2 ± 6,9	9,8 ± 4,5	12,2 ± 5,4	12,0 ± 4,2	3,1 ± 1,5
30B	8	13,5 ± 7,1	8,0 ± 6,1	9,3 ± 6,5	6,0 ± 2,9	3,6 ± 2,4

Tabla 14. Consumo de oxígeno hepático (HVO₂): basal, durante los 30 min de la recirculación normotérmica (RN) y al final de la recirculación hipotérmica (FRH), en media ± desviación estándar (mL/min/m²). **n**: casos por grupo.

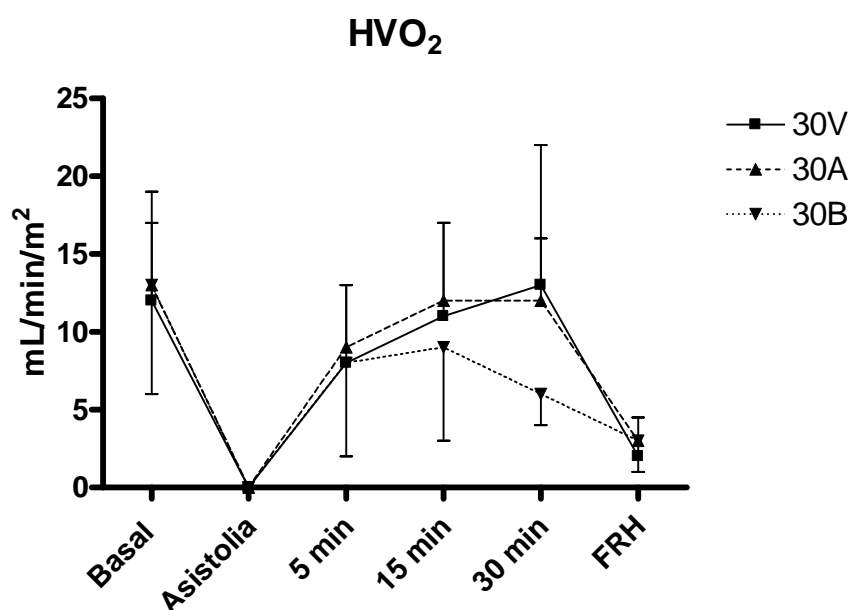


Figura 10. Consumo de Oxígeno Hepático (HVO₂): basal, tras la asistolia, durante los 30 min de recirculación normotérmica (RN) y al final de la recirculación hipotérmica (FRH), en mL/min/m². El consumo de oxígeno hepático (HVO₂) descendió bruscamente con la asistolia respecto al basal y se recuperó progresivamente hacia el final de la recirculación normotérmica, descendiendo nuevamente al FRH. A pesar de no hallarse diferencias significativas, ni intra ni inter-grupos, el grupo 30B mostró los valores más bajos, mientras que 30V y 30A presentaron valores similares durante todo el periodo de recirculación.

4.1.4.4. Cociente de extracción hepática de oxígeno

Grupo	n	HO ₂ ER Basal	HO ₂ ER 5 min RN	HO ₂ ER 15 min RN	HO ₂ ER 30 min RN	HO ₂ ER FRH
30V	10	23,0 ± 3,0	35,2 ± 20,7♦	28,1 ± 11,2♦	44,7 ± 19,0♦	12,2 ± 0,7
30A	8	22,7 ± 12,8	44,8 ± 19,49♦	44,3 ± 10,7♦*	42,1 ± 11,9♦	11,7 ± 6,8♦
30B	8	20,6 ± 12,4	63,5 ± 10,8♦♠	62,5 ± 11,6♦♠♣	51,0 ± 20,3♦	26,2 ± 21,7♦

Tabla 15. Cociente de extracción hepática de oxígeno (HO₂ER): basal, durante los 30 min de la recirculación normotérmica (RN) y al final de la recirculación hipotérmica (FRH), en media ± desviación estándar (porcentaje). ♦ p ≤ 0,05 intra-grupo vs basal, * p ≤ 0,05 30V vs 30A, ♠ p ≤ 0,05 30V vs 30B, ♣ p ≤ 0,05 30A vs 30B. n: casos por grupo.

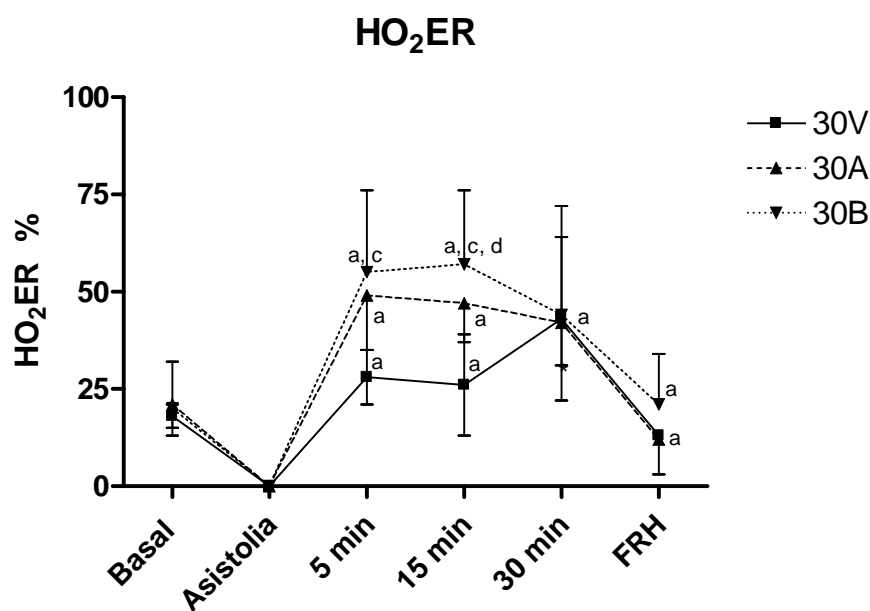


Figura 11. Cociente de extracción hepática de oxígeno (HO₂ER): basal, tras la asistolia, a los 5, 15 y 30 min de recirculación normotérmica y al final de la recirculación hipotérmica (FRH), expresado en porcentaje. **a:** p ≤ 0,05 intra-grupo vs basal, **b:** p ≤ 0,05 30V vs 30A, **c:** p ≤ 0,05 30V vs 30B, **d:** p ≤ 0,05 30A vs 30B.

La extracción hepática de oxígeno (HO_2ER) aumentó progresivamente durante la RN, alcanzando su valor máximo al inicio de la misma (minuto 5) para los grupos de flujo constante y en el minuto 30 en 30V. La comparación intra-grupo respecto al valor basal mostró que la extracción incrementó significativamente durante la recirculación en los tres grupos estudiados ($p < 0,05$). La comparación inter-grupos halló que la extracción fue significativamente superior en el grupo 30B en el minuto 5 respecto a 30V. En el minuto 15 el grupo 30B mostró la extracción hepática de oxígeno más alta respecto a 30V y a 30A. Asimismo, el grupo 30A también mostró una extracción superior a la del grupo control según mostró el análisis *post-hoc*.

HO_2ER_5 : 30V/30B: (6,2-50,4)

$\text{HO}_2\text{ER}_{15}$: 30V/30A: (1,8- 30, 5), 30V/30B: (-49,2- -19,5), 30A/30B: (-33,8- -2,5)

4.1.5. Marcadores de Lesión Hepatoceleular

4.1.5.1. ASAT

Grupo	ASAT Basal (T1)	ASAT FRN (T3)	ASAT PRP (T5)	ASAT 2D (T6)	ASAT 5D (T7)
30V	50 ± 14 n=10	93 ± 85 ♦ n=10	581 ± 329 ♦ n=10	2803 ± 1447 ♦ n=10	669 ± 599 ♦ n=8
30A	61 ± 38 n=10	111 ± 106 ♦ n=10	255 ± 81 ♦ n=10	1616 ± 934 ♦ n=6	826 ± 587 ♦ n= 5
30B	51 ± 19 n=10	156 ± 89 ♦ n=10	728 ± 620 ♦ n=10	1950 ± 1185 ♦ n=5	660 ± 228 n=3

Tabla 16. ASAT: basal (T1), al final de la recirculación normotérmica (FRN ó T3), 60 min post-reperfusión (PRP ó T5), al segundo día (2D ó T6) y al quinto día postrasplante (5D ó T7), en media ± desviación estándar ($\mu\text{kat/L}$).

♦ $p \leq 0,05$ intra-grupo vs basal. n: casos por tiempo de estudio.

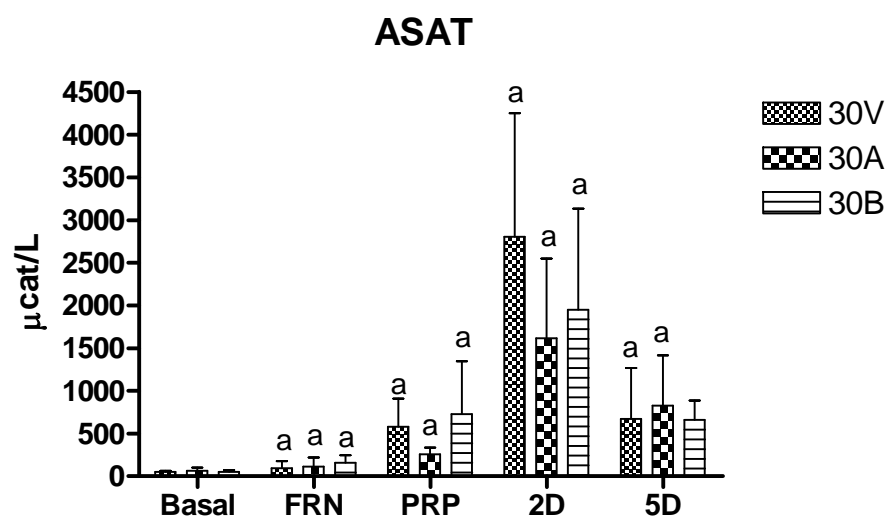


Figura 12. ASAT: basal, al final de la recirculación normotérmica (FRN), 60 min post-reperusión (PRP), al segundo día (2D) y al quinto día (5D) postrasplante. **a:** $p \leq 0,05$ intra-grupo *vs* basal.

4.1.5.2. ALAT

Grupo	ALAT Basal (T1)	ALAT FRN (T3)	ALAT PRP (T5)	ALAT 2D (T6)	ALAT 5D (T7)
30V	38 ± 10 n=10	29 ± 11 n=10	57 ± 19♦ n=10	107 ± 46♦ n=10	64 ± 15♦ n=8
30A	32 ± 9 n=10	22 ± 8♦ n=10	36 ± 4 n=10	96 ± 54♦ n=6	72 ± 55 n=5
30B	33 ± 8 n=10	29 ± 4 n=10	53 ± 28 n=10	91 ± 22♦ n=5	57 ± 10 n=3

Tabla 17. ALAT: basal (T1), al final de la recirculación normotérmica (FRN ó T3), 60 min post-reperusión (PRP ó T5), al segundo día (2D o T6) y al quinto día postrasplante (D5 ó T7), en media ± desviación estándar (μkat/L).

♦ $p \leq 0,05$ intra-grupo vs basal. **n:** casos por tiempo de estudio.

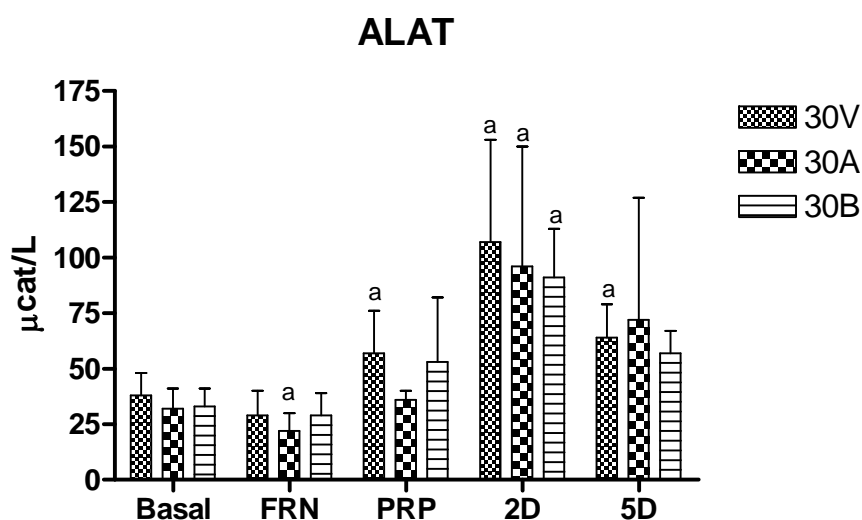


Figura 13. ALAT: basal, al final de la recirculación normotérmica (FRN), 60 min post-reperusión (PRP), al segundo día (2D) y al quinto día (5D) postrasplante. **a:** $p \leq 0,05$ intra-grupo *vs* basal.

La ASAT mostró una evolución similar en todos los grupos para los diferentes tiempos de estudio. Tras 60 minutos de IC y 30 min de RN se produjo un leve aumento de ASAT. El valor más alto se alcanzó al segundo día, descendiendo en el quinto día, pero sin recuperar el valor basal. La comparación intra-grupo mostró valores significativamente superiores respecto al basal en los tres grupos y para todos los tiempos de medida, excepto para 30B en el quinto día ($n=3$) ($p < 0,05$).

La evolución en el tiempo de la ALAT fue similar a la ASAT en los tiempos de estudio para los tres grupos, con el pico máximo al segundo día postrasplante. La comparación intra-grupo presentó diferencias estadísticamente significativas respecto al basal para todos los grupos, en los tiempos T3 ($p=0,000$) y 2D ($p=0,000$).

Ni ASAT ni ALAT mostraron diferencias significativas en la comparación inter-grupos.

4.1.6. Marcador de Lesión Endotelial Hepática

Grupo	n	EHAH Basal	EHAH FRN (T3)	EHAH PRP (T5)
30V	10	32,7 ± 10,1	-4,6 ± 19,5♦	-1,03 ± 11,4♦
30A	8	26,2 ± 8,8	-5,5 ± 16,6♦	3,5 ± 9,2♦
30B	8	34,9 ± 11,0	-0,76 ± 12,3♦	-4,3 ± 10,0♦

Tabla 18. Extracción hepática de ácido hialurónico (EHAH): basal, al final de la recirculación normotérmica (FRN ó T3) y 60 min post-reperfusión (PRP ó T5), en media ± desviación estándar. ♦: $p \leq 0,05$ intra-grupo vs basal. n: casos por grupo.

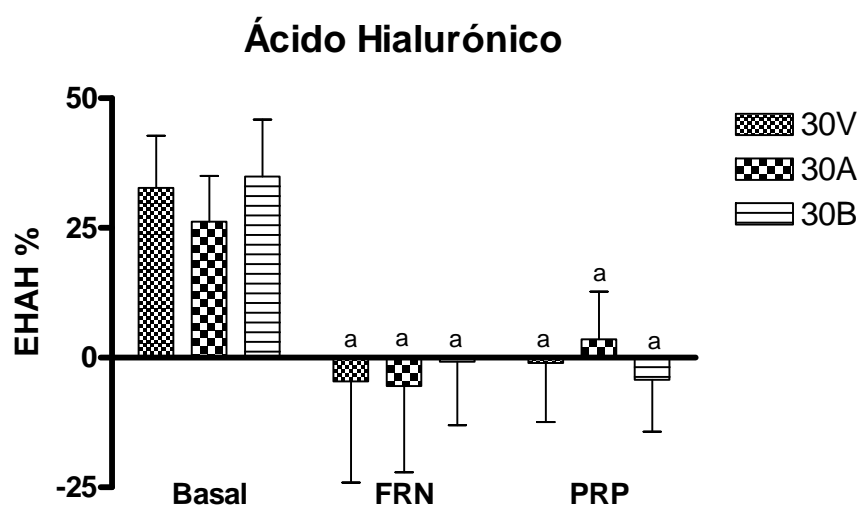


Figura 14. Extracción hepática de ácido hialurónico (EHAH): basal, al final de la recirculación normotérmica (FRN) y 60 min post-reperfusión (PRP), en porcentaje (%). a: $p \leq 0,05$ intra-grupo vs basal. La extracción hepática de ácido hialurónico (EHAH) presentó valores positivos basales y cada grupo mostró diferencias significativas entre éste y los obtenidos en los tiempos T3 y T5. ($p=0,000$). En FRN se produjo la negativización de la EHAH en todos los grupos; en PRP solo 30A presentó una extracción positiva, aunque muy inferior a la basal. El análisis inter-grupos no halló diferencias significativas.

4.1.7. Marcadores del Estado Energético Hepático

Los nucleótidos de adenina mostraron un comportamiento similar en todos los grupos durante los tiempos estudiados. Todos los grupos mostraron una reducción de la disponibilidad de los nucleótidos de adenina respecto al valor basal, aunque solo fue significativo para algunos de ellos (Figuras 15-17). La RN no produjo la mejora significativa de éstos, aunque la comparación múltiple inter-grupos mostró que el grupo 30A recuperó significativamente el ATP respecto a los grupos 30V y 30B ($p < 0,05$).

Los productos de degradación de los nucleótidos mostraron un incremento tras la IC que fue significativo solo en algunos grupos (Figuras 18 y 19).

La carga energética mostró un descenso significativo respecto al valor basal en los tres grupos sin que la RN consiguiese recuperarlos. La comparación inter-grupos no halló diferencias (Figura 20).

Todos los valores se dividieron por el basal para corregir la gran variabilidad de los resultados. El basal tomó el valor de la unidad. Los resultados obtenidos en el resto de los tiempos aparecen como fracciones de la unidad. La escala del eje Y es superior a la unidad ya que se ha visto afectada por la magnitud de la desviación estándar.

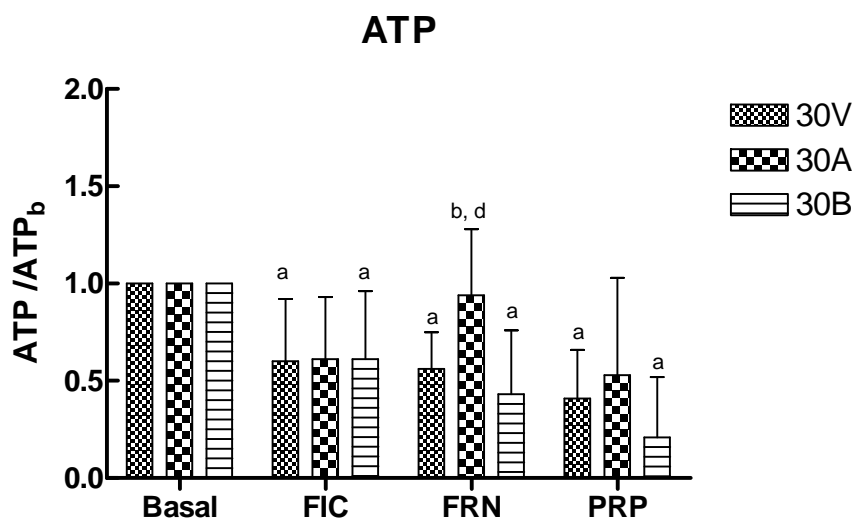


Figura 15. ATP: cada resultado se ha dividido por el valor basal y se ha expresado como fracción de unidad en media \pm desviación estándar. Determinaciones: basal, tras 60 min de isquemia caliente (FIC), al final de la recirculación normotérmica (FRN) y 60 min post-reperusión (PRP). **a:** $p \leq 0,05$ vs basal; **b:** $p \leq 0,05$ 30V vs 30A; **c:** $p \leq 0,05$ 30V vs 30B; **d:** $p \leq 0,05$ 30A vs 30B.

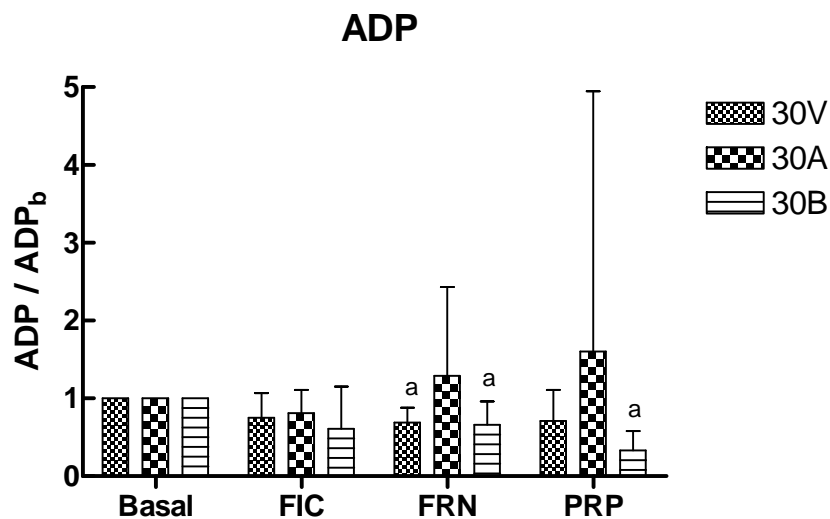


Figura 16. ADP: cada resultado se ha dividido por el valor basal y se ha expresado como fracción de unidad en media \pm desviación estándar. Determinaciones: basal, tras 60 min de isquemia caliente (FIC), al final de la recirculación normotérmica (FRN) y 60 min post-reperusión (PRP). **a:** $p \leq 0,05$ vs basal.

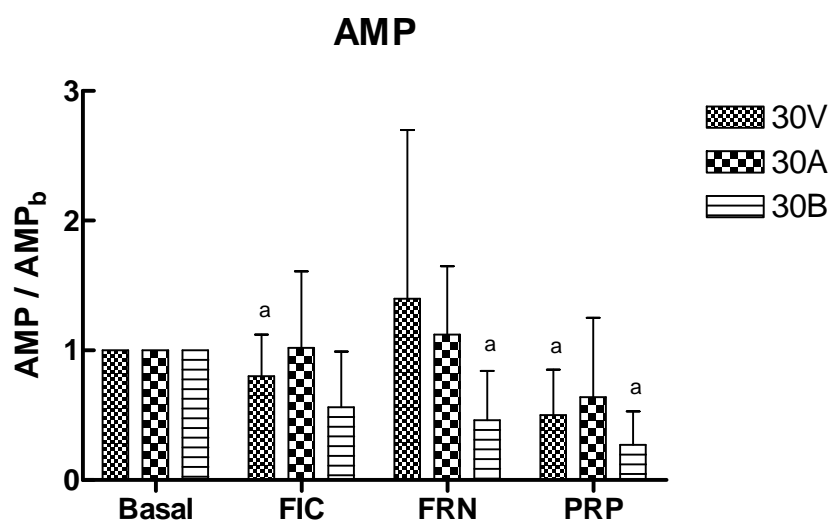


Figura 17. AMP: cada resultado se ha dividido por el valor basal y se ha expresado como fracción de unidad en media \pm desviación estándar. Determinaciones: basal, tras 60 min de isquemia caliente (FIC), al final de la recirculación normotérmica (FRN) y 60 min post-reperusión (PRP). **a:** $p \leq 0,05$ vs basal.

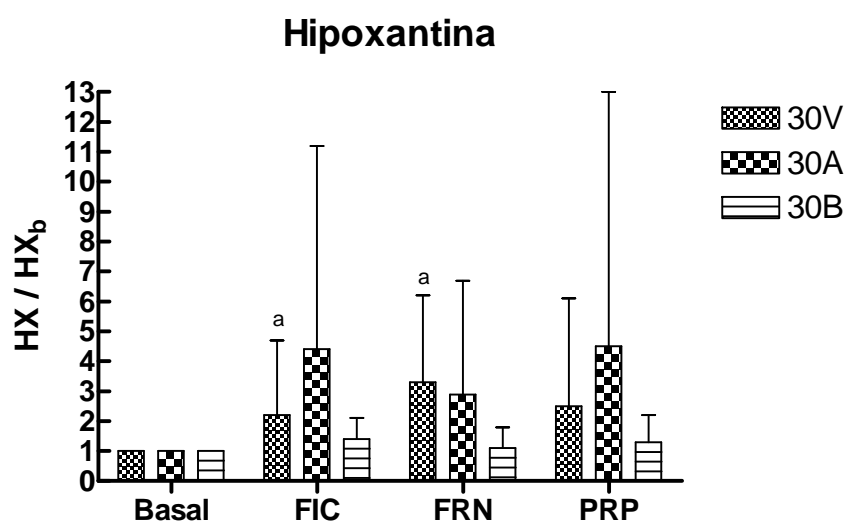


Figura 18. Hipoxantina: cada resultado se ha dividido por el valor basal y se ha expresado como fracción de unidad en media \pm desviación estándar. Determinaciones: basal, tras 60 min de isquemia caliente (FIC), tras 30 min de recirculación normotérmica (FRN) y 60 min post-reperusión (PRP). **a:** $p \leq 0,05$ vs basal.

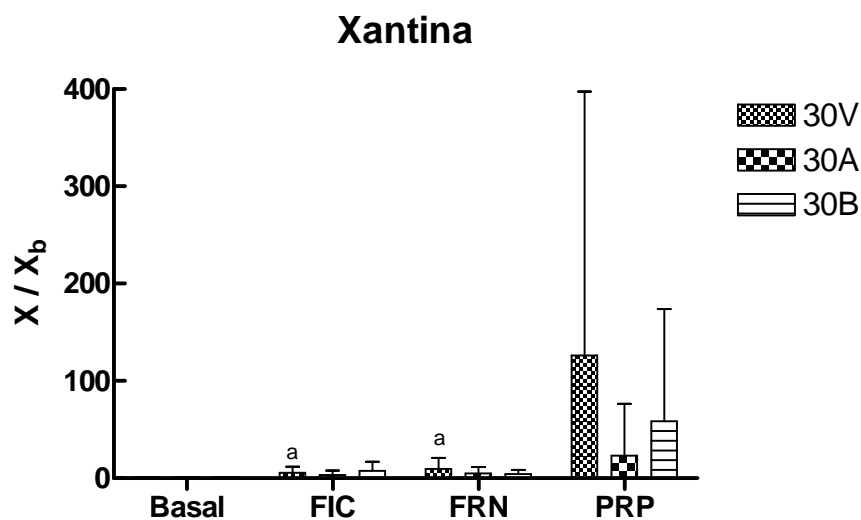


Figura 19. Xantina: cada resultado se ha dividido por el valor basal y se ha expresado como fracción de unidad en media \pm desviación estándar. Determinaciones realizadas al final de 60 min de isquemia caliente (FIC), al final de la recirculación normotérmica (FRN) y 60 min post-reperusión. **a:** $p \leq 0,05$ vs basal.

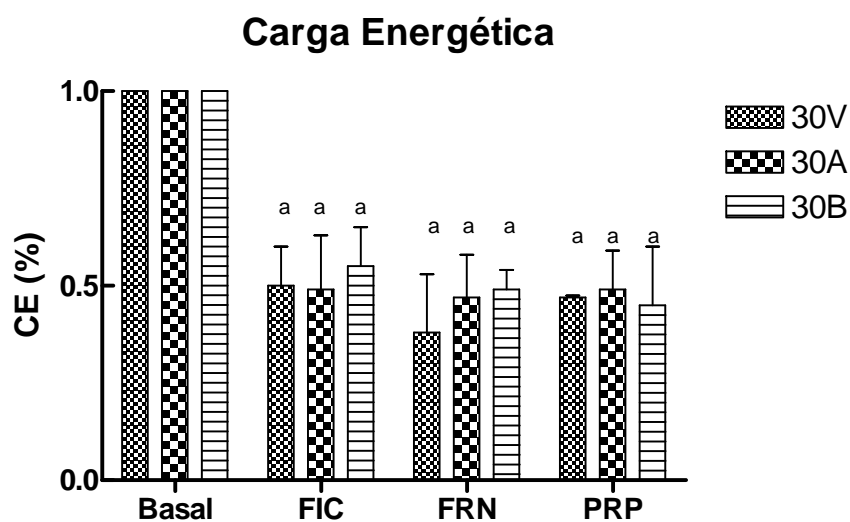


Figura 20. Carga energética: cada resultado se ha dividido por el valor basal y se ha expresado como fracción de unidad en media \pm desviación estándar. Determinaciones realizadas al final de 60 min de isquemia caliente (FIC), al final de la recirculación normotérmica (FRN) y 60 min post-reperusión. **a:** $p \leq 0,05$ vs basal.

4.1.8. Histología

Se recogieron ocho variables histológicas en las biopsias de los animales supervivientes al quinto día para determinar la lesión endotelial, hepatocitaria y biliar. En el grupo 30V se perdió una biopsia a causa de impregnación insuficiente en formol. En las tablas se detalla el número de casos por categoría y en las figuras el porcentaje de cada categoría por grupo.

4.1.8.1. Endotelitis

Se valoró mediante dos categorías: 0= ausencia; 1= presencia.

Endotelitis	30V	30A	30B
0	1	3	0
1	6	2	3
Total	n=7	n=5	n=3

Tabla 19

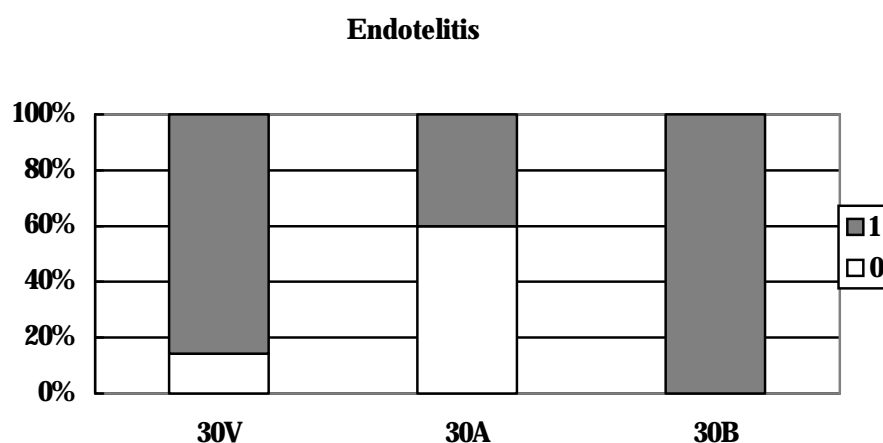


Figura 21. El hallazgo de endotelitis se dio en el total de las biopsias analizadas únicamente en el grupo 30B. No obstante, no se hallaron diferencias significativas entre los grupos.

4.1.8.2. Dilatación sinusoidal

Se establecieron cuatro categorías de dilatación: 0= ausencia, 1= leve, 2= moderada y 3= severa que se muestran en la tabla y figura inferiores.

Dilatc. sins	30V	30A	30B
0	0	3	0
1	4	2	1
2	2	0	2
3	1	0	0
Total	n=7	n=5	n=3

Tabla 20

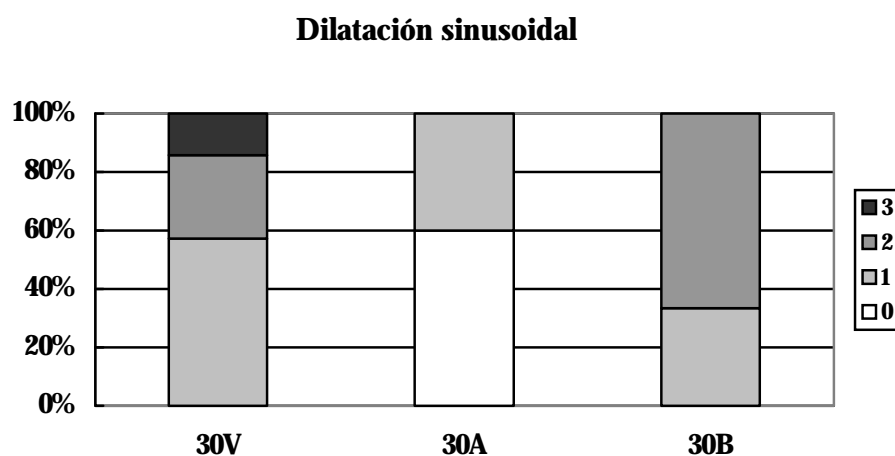


Figura 22.

El grupo 30A presentó ausencia de lesión en el 60% de las biopsias y el 40% restante mostró dilatación de grado 1. El grupo 30V presentó dilatación de tipo 1 en un 57% de las biopsias, un 28% de grado 2 y un 14% de grado 3, siendo el único grupo que mostró este tipo de lesión. El grupo 30B presentó dilatación de tipo 1 en un 33% y de grado 2 en un 66%. No se hallaron diferencias significativas entre los grupos.

4.1.8.3. Infiltración leucocitaria sinusoidal

En función del grado de infiltración por PMN y linfocitos a nivel sinusoidal se determinaron tres categorías: 1= leve, 2= moderada y 3= severa.

PMN Linf	30V	30A	30B
1	4	1	0
2	1	3	2
3	2	1	1
Total	n=7	n=5	n=3

Tabla 21

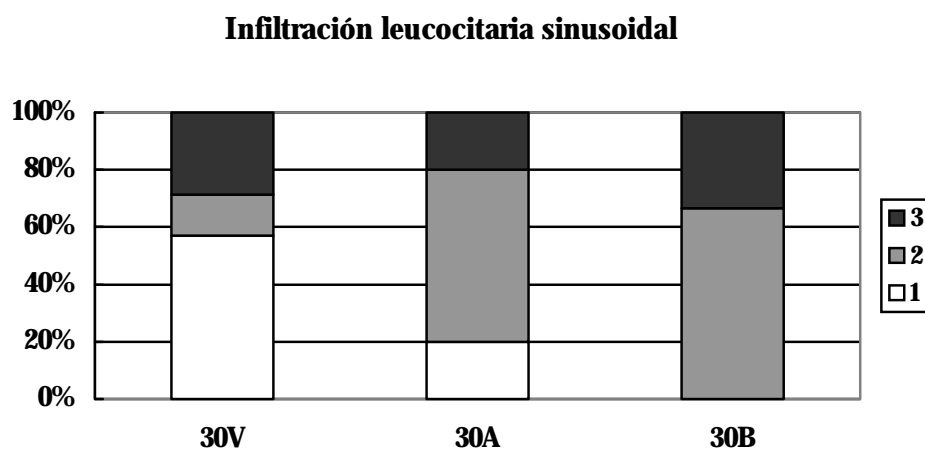


Figura 23

El grupo 30B presentó la mayor proporción de infiltración sinusoidal de grado alto ya que un 66% de los casos apareció infiltración de tipo 2 y en el 33% restante fue de tipo 3. El grupo 30V solo mostró infiltración grado 3 en un 28% y la dilatación de tipo 1 fue la predominante (57%). No obstante, no se hallaron diferencias significativas entre los grupos.

4.1.8.4. Infarto

Se valoró mediante dos categorías: 0=ausencia; 1= presencia

Infarto	30V	30A	30B
0	5	3	1
1	2	2	2
Total	n=7	n=5	n=3

Tabla 22

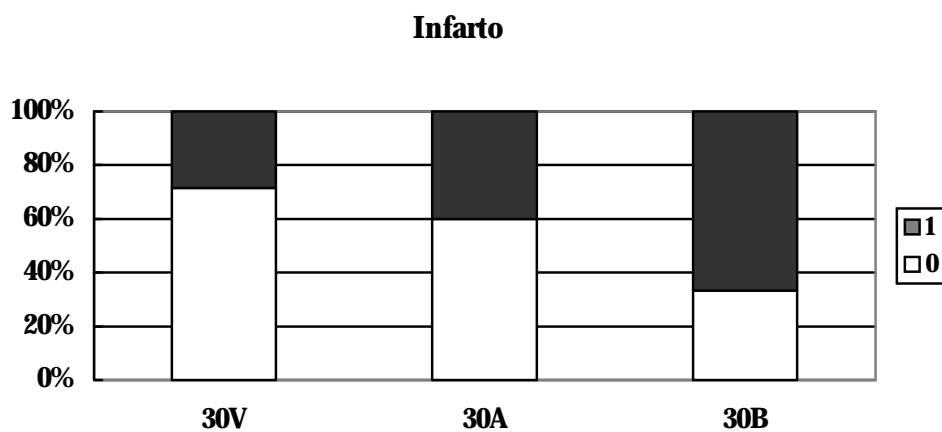


Figura 24

El grupo 30V mostró infarto en un 30% de los casos, el grupo 30A en un 40% y el grupo 30B en un 66%, sin que pudiesen demostrarse diferencias significativas entre ellos.

4.1.8.5. Disociación hepatocitaria

Se establecieron cuatro categorías: 0= ausencia; 1= leve; 2= moderada; 3= severa.

Disociación	30V	30A	30B
0	2	2	0
1	2	0	1
2	2	2	2
3	1	1	0
Total	n=7	n=5	n=3

Tabla 23

Disociación hepatocitaria

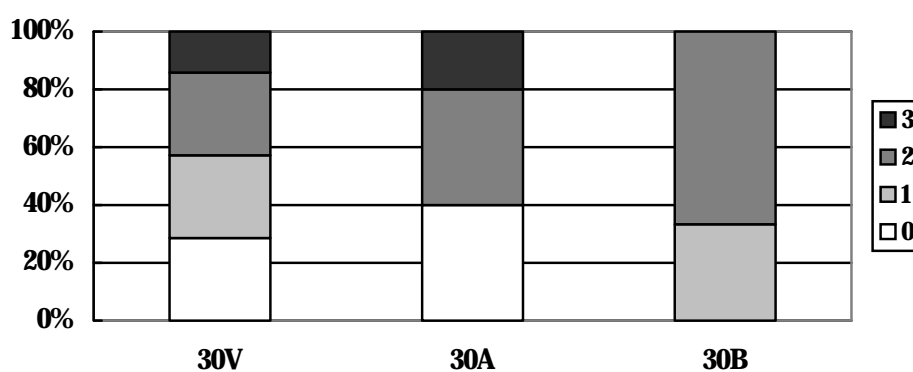


Figura 25

La disociación hepatocitaria mostró un patrón heterogéneo ya que, en el grupo 30V se hallaron lesiones de todas las categorías, en el grupo 30A no se halló afectación de tipo 1, pero la proporción de disociación de bajo grado fue de un 40%, frente a las de alto grado, que en conjunto representaron un 60%. En el grupo 30B no se observó ningún caso de ausencia de disociación, la de tipo 1 supuso un 33% y la de tipo 2 un 66%. No se observaron diferencias entre los grupos.

4.1.8.6. Necrosis isquémica centrolobulillar

Se establecieron dos categorías en función del porcentaje de necrosis isquémica: categoría 1: $\leq 50\%$; categoría 2: $> 51\%$.

Necrosis isquémica	30V	30A	30B
1	6	2	2
2	1	3	1
Total	n=7	n=5	n=3

Tabla 24

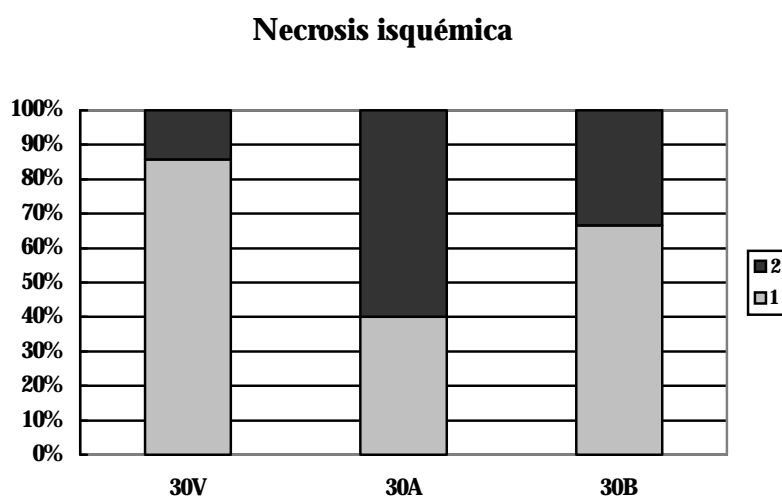


Figura 26

El grupo 30V presentó necrosis isquémica de tipo 2 en el 14% de las biopsias, es decir, con más del 50% de necrosis en las secciones analizadas; el grupo 30B presentó la categoría 1 en un 33% de los hígados analizados y el grupo 30A en 60% de los casos, sin que pudiesen hallarse diferencias significativas entre los grupos.

4.1.8.7. Área necrótica media

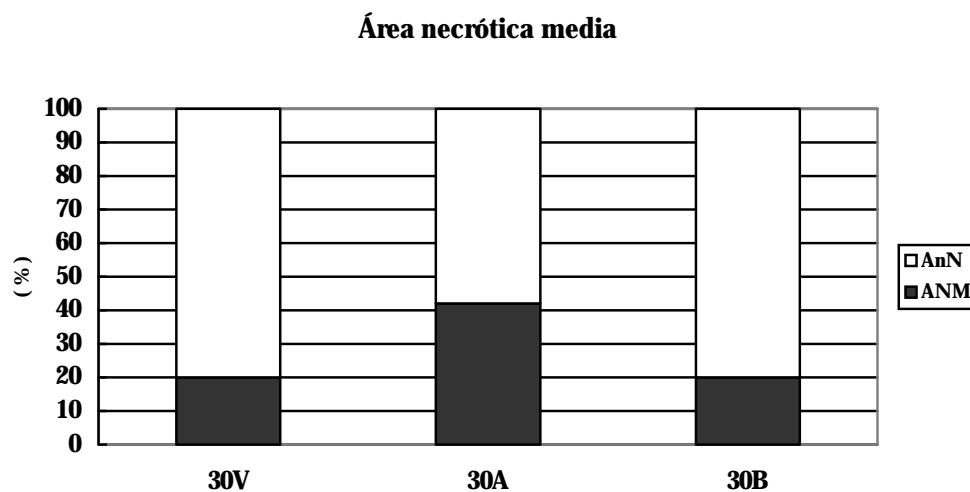


Figura 27

En la figura 27 se representa en color oscuro el porcentaje del área necrótica media (ANM) frente al área no necrótica, (AnN) en color claro. Los grupos 30V y 30B presentaron un 20% de área necrótica, mientras que el grupo 30A mostró la proporción más elevada de área necrótica media, con un 42%. No se hallaron diferencias significativas entre ambos grupos.

4.1.8.8. Colangitis isquémica

Se establecieron dos categorías: 0= ausencia y 1= presencia.

Colangitis	30V	30A	30B
0	3	1	1
1	4	4	1
Total	n=7	n=5	n=2*

Tabla 25: * En el grupo 30B una de las biopsias no pudo evaluarse al faltar el hilio hepático.

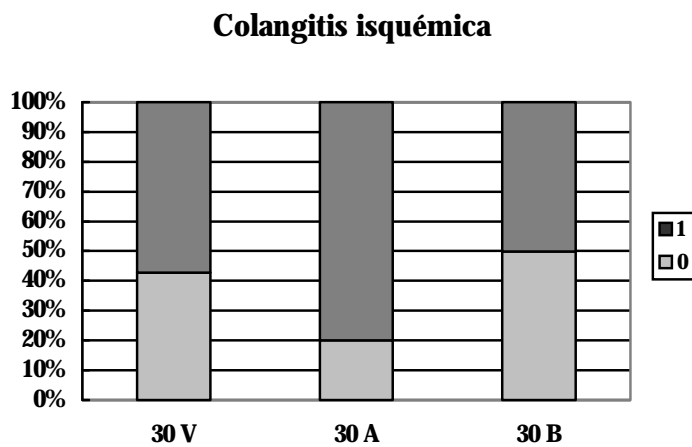


Figura 28

Tras 60 min de IC se observó ausencia de colangitis isquémica en algunos casos de todos los grupos, el grupo 30V presentó un 42% y el grupo 30A demostró ausencia solo en un 20% de los casos. No hubo diferencias significativas entre ellos.

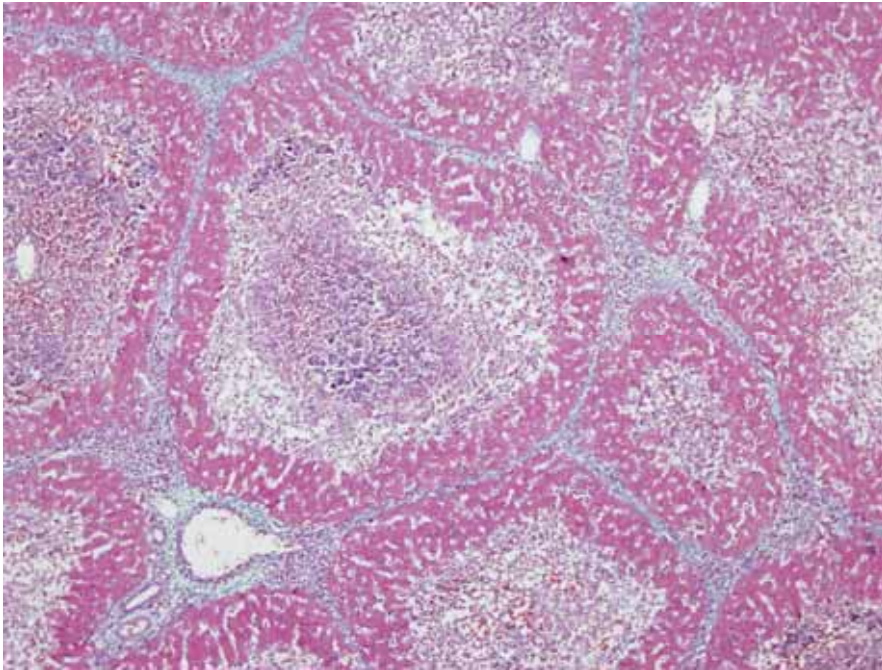


Foto 8. Grupo 30V. En esta preparación (Tricrómico) pueden verse a pequeño aumento (40x) extensas áreas de necrosis centrolobulillares confluentes (más del 70%) que afectan a la mayor parte de los lobulillos.

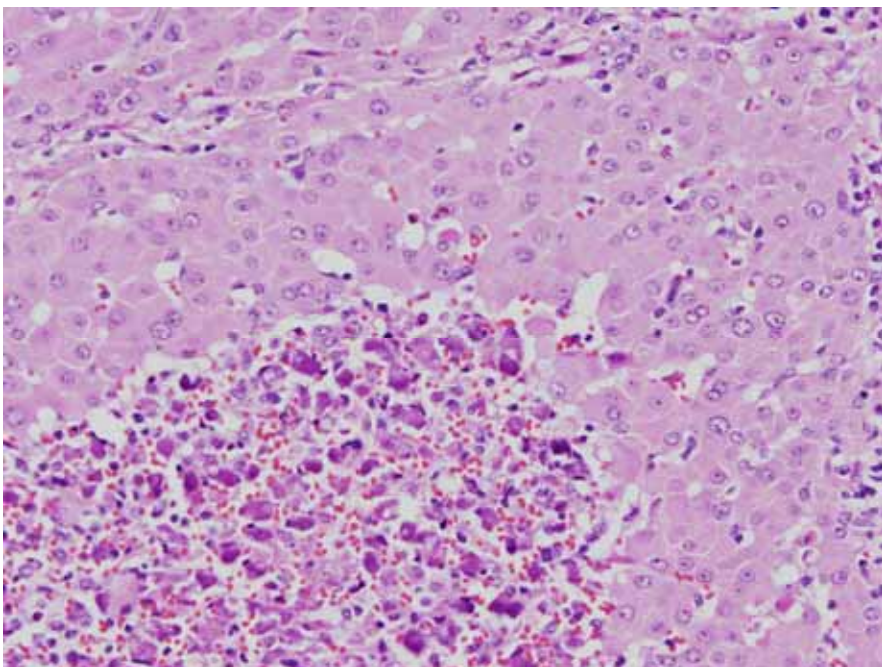


Foto 9. Grupo 30V. Se observan las áreas de necrosis coagulativa de los hepatocitos. (HE, 200x)

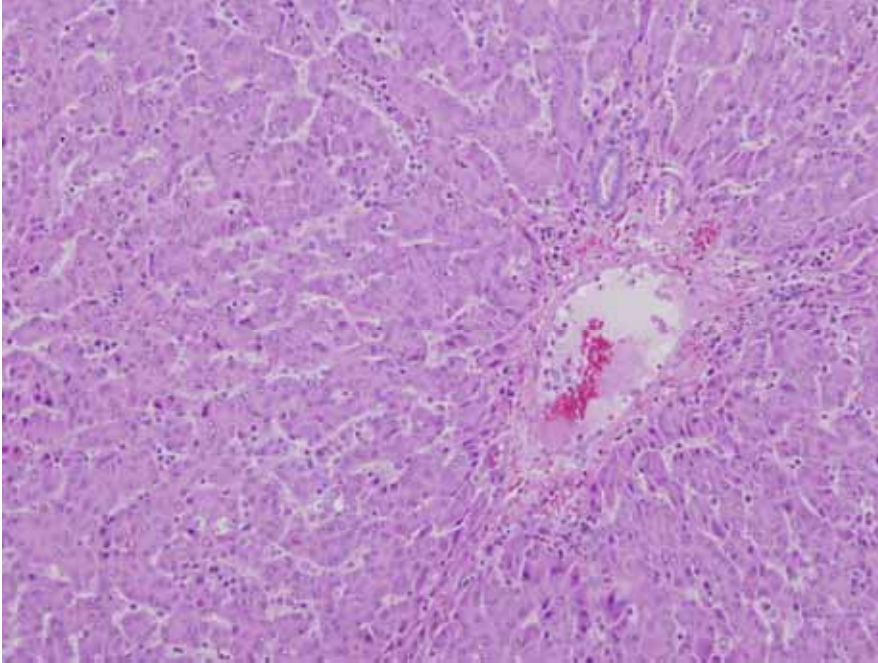


Foto 10. Grupo 30A. En esta preparación con tinción de Hematoxilina/Eosina se observa un espacio porta sin infiltrado inflamatorio destacable. Las trabéculas hepáticas muestran mínima alteración de la disposición

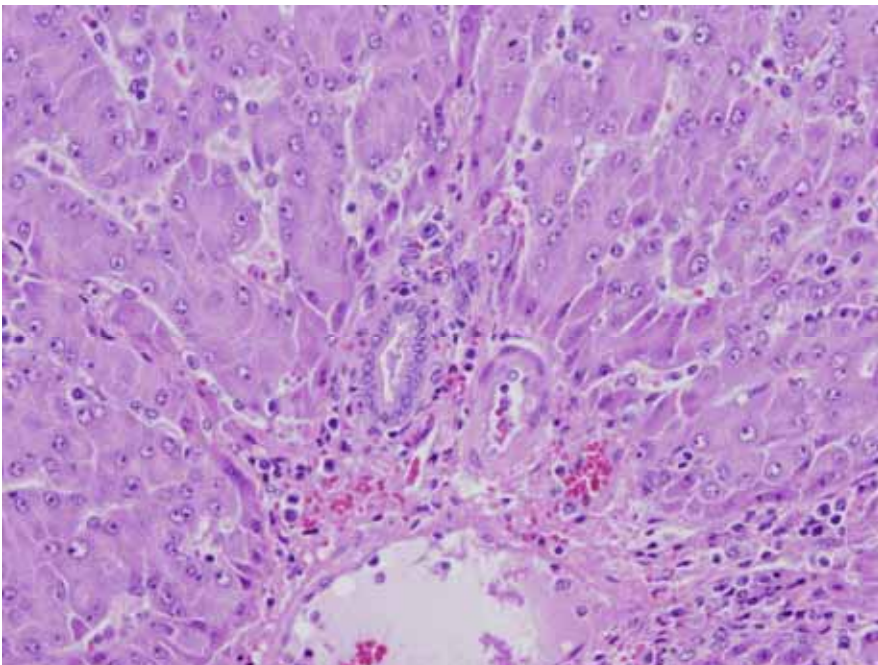


Foto 11. Grupo 30A. En esta imagen a mayor aumento (200x) con tinción de Hematoxilina/Eosina no se visualiza endotelitis.

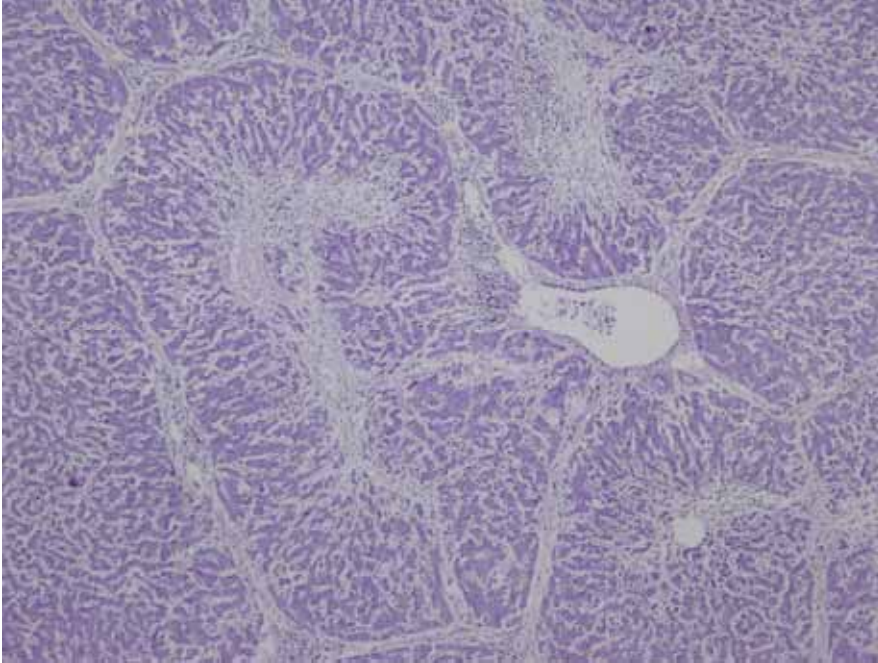


Foto 12. Grupo 30B. Preparación con tinción de Hematoxilina/Eosina a pequeño aumento. (40x). Se visualizan extensas áreas de necrosis centrolobulillar confluentes, así como una marcada dilatación sinusoidal.

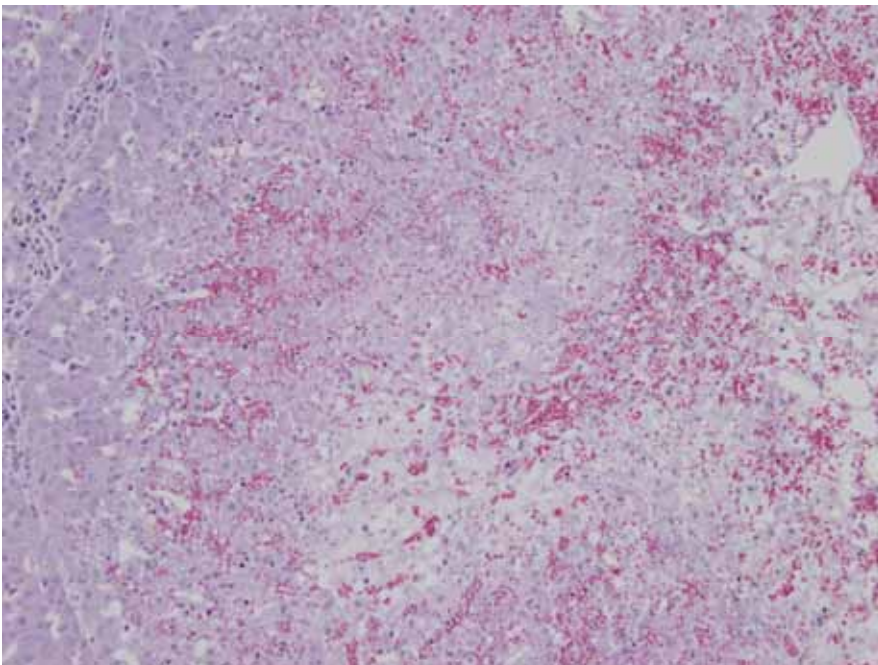


Foto 13. Grupo 30B. Se muestran áreas de necrosis centrolobulillar extensa. (Hematoxilina/Eosina a gran aumento: 100x).

4.2. Prolongación de la Recirculación Normotérmica

4.2.1. Morfometría

Grupo	n	SC (m ²)	Peso (Kg)
30V	10	1,01 ± 0,007	28,6 ± 3,2
60V	8	0,97 ± 0,001	26,6 ± 0,96

Tabla 26. Características morfométricas de los animales de estudio. Grupo 30V: grupo control. Grupo 60V: grupo con 60 minutos de recirculación normotérmica. **n**: casos por grupo, SC: superficie corporal, en metros cuadrados (m²). Peso, en Kilogramos (Kg). Resultados en media ± desviación estándar.

4.2.2. Supervivencia

Grupo	n	Vivos/Muertos	Supervivencia (%)
30V	10	8/2	80
60V	8	4/4	50

Tabla 27. Se muestra la supervivencia al quinto día postrasplante en los grupos de estudio. **n**: casos por grupo. Vivos/Muertos: casos supervivientes y casos no supervivientes al quinto día postrasplante. Supervivencia: porcentaje (%) de casos supervivientes respecto al total de casos del estudio.

4.2.3. Flujo de Bomba y Hemodinámica Hepática Durante la Recirculación

El periodo de 60 min se dividió en dos etapas: inicial, desde los 0 - 30 min de RN, y final, desde 31 - 60 min de RN. En la comparación intra-grupo se evaluó el comportamiento de la fase inicial respecto a la final. La evaluación inter-grupos solo comparó la fase inicial de la RN con el grupo control.

4.2.3.1. Flujo de bomba

Grupo	n	F Bomba 5 min RN	F Bomba 15 min RN	F Bomba 30 min RN	F Bomba 45 min RN	F Bomba 60 min RN	F Bomba FRH
30V	10	2,70 ± 0,53	3,25 ± 1,04 ♦	2,39 ± 0,70 ♦	–	–	1,66 ± 0,23 ♦
60V	8	2,97 ± 0,78	2,82 ± 0,42	2,18 ± 0,51 ♥♠	2,33 ± 0,50 ♠	2,06 ± 0,48 ♥♠•	1,58 ± 0,47 ♥♠≈•

Tabla 28. Flujo de bomba a los 5, 15, 30, 45 y 60 min de recirculación normotérmica (RN) y al final de la recirculación hipotérmica (FRH), en media ± desviación estándar (L/min/m²). ♦ p ≤ 0,05 intra-grupo 30V, ♥ p ≤ 0,05 vs FB 5 min, ♠ p ≤ 0,05 vs FB 15 min, ≈ p ≤ 0,05 vs FB 30 min, • p ≤ 0,05 vs FB 45 min. n: casos por grupo.

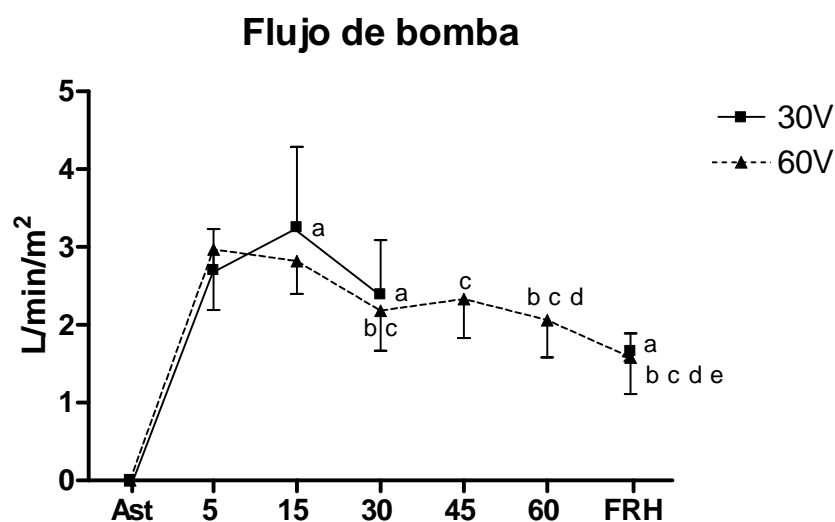


Figura 29. Flujo de bomba iniciado tras 60 min de asistolia (Ast), a los 5, 15, 30, 45 y 60 min de recirculación normotérmica y al final de la recirculación hipotérmica (FRH), en L/min/m². **a:** p ≤ 0,05 intra-grupo 30V, **b:** p ≤ 0,05 vs FB 5 min, **c:** p ≤ 0,05 vs FB 15 min, **d:** p ≤ 0,05 vs FB 30 min, **e:** p ≤ 0,05 vs FB 45 min.

La comparación intra-grupo en 60V mostró que los flujos de bomba a los 5 y 15 min fueron los más altos durante la RN y el FRH. No se hallaron diferencias inter-grupos.

4.2.3.2. Fluidoterapia y tiempo de enfriamiento

Grupo		Volumen 0-30 min RN	Volumen 30-60 min RN	Volumen RN	Volumen RH	Volumen RN+RH	Tiempo FRH
30V	10	120,3 ± 209,7	–	120,3 ± 209,7	455 ± 172,3♦	575 ± 170,3	17,10 ± 5,11
60V	8	187,5 ± 247,5	375,7 ± 173,2	562,5 ± 359,3♣	387,5 ± 204,8	950 ± 411,4♣	19,63 ± 2,50

Tabla 29. Fluidoterapia añadida durante la recirculación normotérmica (Volumen RN) e hipotérmica (Volumen RH) en mL. Tiempo FRH: Tiempo utilizado hasta la obtención de 15°C en la superficie hepática ó final de la recirculación hipotérmica, en minutos. Resultados en media ± desviación estándar. ♦ p≤ 0,05 intra-grupo Volumen RN vs Volumen RH, ♣ p≤ 0,05 30V vs 60V. n: casos por grupo.

En el grupo 30V el volumen añadido durante la RN fue significativamente inferior al añadido durante la RH (p=0,01; Z= -2,58). En el grupo 60V no se hallaron diferencias entre las dos etapas de la RN, ni respecto al volumen añadido en hipotermia. La comparación inter-grupos mostró que el grupo 60V utilizó una reposición de volumen significativamente superior durante la RN (p=0,009; Z= -2,65), al igual que el volumen total durante todo el periodo de recirculación (p=0,05; Z=-1,997). No se hallaron diferencias respecto a la duración de la RH.

4.2.3.3. Flujo arterial hepático

G	n	FAH Basal	FAH 5 min RN	FAH 15 min RN	FAH 30 min RN	FAH 45 min RN	FAH 60 min RN	FAH FRH
30V	10	176,5 ± 80,7 (100%)	159,6 ± 66,5 (90%)	176,0 ± 72,5 (100%)	156,3 ± 93,6 (88%)	–	–	132,1 ± 75,3 (83%)
60V	8	174,0 ± 37,9 (100%)	193,1 ± 68,8 (110%)	206,2 ± 107,9 (118%)	161,7 ± 69,9 (92%)	148,9 ± 46,8♥♠	134,9 ± 58,4♥♠	92,1 ± 44,8♥♠ ≈

Tabla 30. Flujo arterial hepático (FAH): basal, a los 5, 15, 30, 45 y 60 min de recirculación normotérmica (RN) y al final de la recirculación hipotérmica (FRH), en media ± desviación estándar (mL/min/m²). Entre paréntesis, el FAH dividido por su valor basal y expresado en porcentaje. ♥ p≤ 0,05 vs FA 5 min, ♠ p≤ 0,05 vs FA 15 min, ≈ p≤ 0,05 vs FA 30 min. n: casos por grupo.

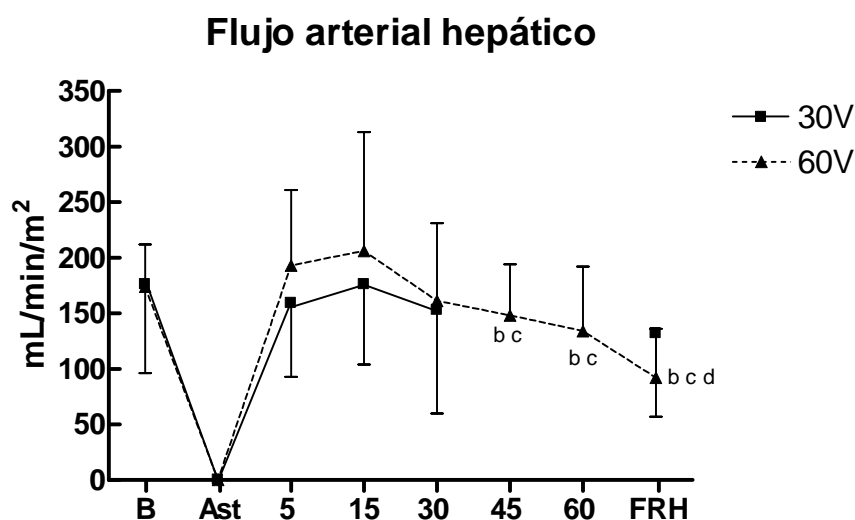


Figura 30. Flujo arterial hepático (mL/min/m²) basal (B), tras la asistolia (Ast), a los 5, 15, 30, 45 y 60 min de recirculación normotérmica y al final de la recirculación hipotérmica (FRH). **b:** $p \leq 0,05$ vs FA 5 min, **c:** $p \leq 0,05$ vs FA15 min, **d:** $p \leq 0,05$ vs FA 30 min.

4.2.3.4. Flujo Portal

G	n	FP Basal	FP 5 min RN	FP 15 min RN	FP 30 min RN	FP 45 min RN	FP 60 min RN	FP FRH
30V	10	639,1 ± 138,6 (100%)	242,5 ± 108,9 ♦ (37%)	287,2 ± 169,4 ♦ (45%)	327,3 ± 212,63 ♦ (51%)	–	–	231,9 ± 133,6 ♦ (36,1%)
60V	8	542,9 ± 136,3 (100%)	374,5 ± 253,0 (69%)	475,8 ± 221,5 (87%)	421,1 ± 173,1 ♦ (77%)	463,7 ± 128,3 (85%)	428,7 ± 110,1 ♦ (78%)	304,4 ± 139,8 ♦ (56%)

Tabla 31. Flujo portal (FP): basal, a los 5, 15, 30, 45 y 60 min de recirculación normotérmica (RN) y al final de la recirculación hipotérmica (FRH), en media ± desviación estándar (mL/min/m²). Entre paréntesis, el resultado del FP durante la recirculación, dividido por su valor basal y expresado en porcentaje. ♦ $p \leq 0,05$ intra-grupo vs basal. **n:** casos por grupo.

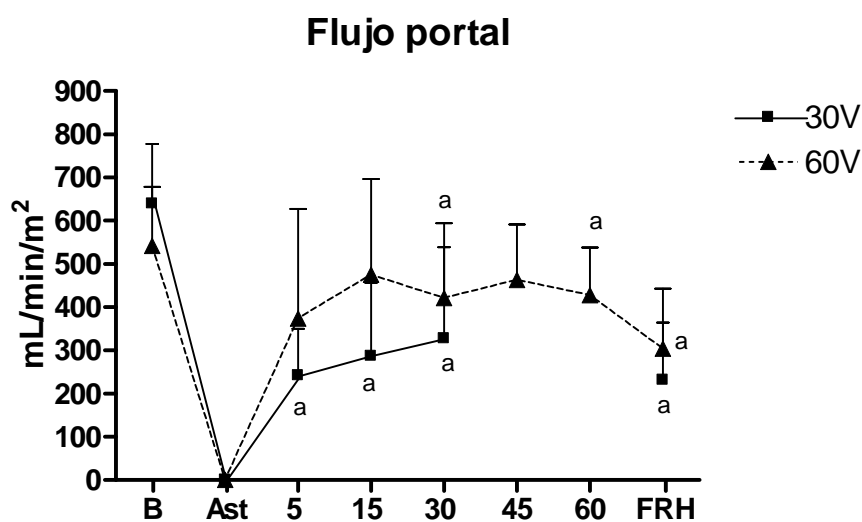


Figura 31. Flujo portal (ml/min/m²): basal (B), tras la asistolia (Ast), a los 5, 15, 30, 45 y 60 min de recirculación normotérmica y al final de la recirculación hipotérmica (FRH). **a:** $p \leq 0,05$ intra-grupo *vs* basal. La comparación inter-grupos no halló diferencias significativas.

4.2.3.5. Flujo hepático total

G	n	FHT Basal	FHT 5 min RN	FHT 15 min RN	FHT 30 min RN	FHT 45 min RN	FHT 60 min RN	FHT FRH
30V	10	815,6 ± 150,5 (100%)	402,1 ± 115,6 ♦ (49%)	463,3 ± 169,9 ♦ (56%)	483,7 ± 244,6 ♦ (59%)	—	—	363,9 ± 148,1 ♦ (44%)
60V	8	716,6 ± 133,9 (100%)	567,7 ± 242,9 (79%)	682,1 ± 218,1 (95%)	582,8 ± 159,4 ♦ (81%)	612,6 ± 103,9 (85%)	563,6 ± 118,0 ♦ (78%)	396,6 ± 157 ♦ (55%)

Tabla 32. Flujo hepático total (FHT): basal, a los 5, 15, 30, 45 y 60 min de recirculación normotérmica (RN) y al final de la recirculación hipotérmica (FRH), en media ± desviación estándar (mL./min/m²). Entre paréntesis, el FHT durante la recirculación, dividido por su valor basal y expresado en porcentaje. ♦ $p \leq 0,05$ intra-grupo *vs* basal. **n:** casos por grupo.

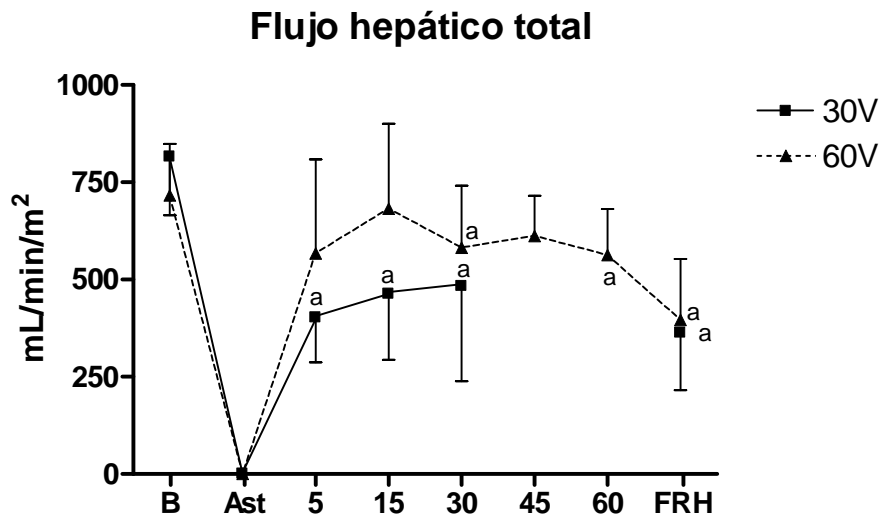


Figura 32. Flujo hepático total: basal (B), tras la asistolia (Ast), a los 5, 15, 30, 45 y 60 min durante la recirculación normotérmica y al final de la recirculación hipotérmica (FRH) en mL./min/m². **a:** $p \leq 0,05$ intra-grupo vs basal.

Ambos grupos mostraron el mismo comportamiento en la fase inicial de la RN. En la fase final de la RN se produjo un leve aumento del flujo en el minuto 45. La comparación intra-grupo mostró en 30V un valor basal superior a todos los tiempos de la RN y el FRH. ($p \leq 0,05$ en todas las comparaciones) y para 60V se hallaron solo diferencias del basal respecto a los 30 y 60 min y FRH.

4.2.3.6. Análisis de la hemodinámica hepática en función del tiempo de RN

En el grupo 60V tenía interés valorar si el flujo de bomba, el flujo arterial hepático y el flujo portal, tomados como un valor único promedio, mostraban diferencias en función del periodo de RN. Para ello se tomaron todos los datos obtenidos durante la recirculación como una variable única y se realizaron diferentes análisis. Para valorar si se producían variaciones en el flujo de bomba y los flujos vasculares respecto a la duración de la RN se dividió dicho periodo (60 min) en inicial (0-30 min) y final (31-60 min).

Grupo 60 V	N	Flujo bomba	Flujo arterial	Flujo portal
RN Inicial	8	2,61 ± 0,6 *	195,0 ± 87,0*	422,4 ± 219,9*
RN Final	8	2,03 ± 0,5 *	161,4 ± 55,5*	419,7 ± 133,3*

Tabla 33. Se muestran los valores del flujo de bomba (L/min/m²) y de los flujos arterial y portal (mL/min/m²) en media ± desviación estándar del grupo 60V obtenidos durante los 60 min de la RN. N: número de casos participantes. La RN se ha dividido en dos periodos: Inicial: de 0 a 30 min y Final: de 31 a 60 min. * p ≤ 0,05 RN 0-30 min. Todos los flujos fueron significativamente superiores en la etapa inicial respecto a la etapa final.

El análisis de los datos reveló que el flujo de bomba en la etapa inicial de la RN fue significativamente superior al de la etapa final (t=6, 24; p=0,000; IC 95%: 0,39-0,76). Lo mismo ocurrió con el flujo arterial hepático (t=5,44; p=0,000; IC 95%: 32,0 - 69,1) y el flujo portal (t=2,06; p=0,043; IC 95%: 1,83 - 113,7)

4.2.4. Metabolismo Hepático de Oxígeno

4.2.4.1. Contenido de oxígeno de arteria hepática, vena porta y vena suprahepática

Grupo	n	CaO ₂ Basal	CaO ₂ 5 min RN	CaO ₂ 15 min RN	CaO ₂ 30 min RN	CaO ₂ 60 min RN	CaO ₂ FRH
30V	10	12,8 ± 2,1	7,7 ± 0,9 ♦	7,8 ± 1,2 ♦	8,1 ± 1,4	–	6,6 ± 0,004 ♦
60V	8	11,2 ± 0,7	7,4 ± 1,2 ♦	6,9 ± 1,1 ♦	7,1 ± 1,8	6,7 ± 2,1 ♦	6,5 ± 2,09 ♦

Tabla 34. Contenido de oxígeno arterial (CaO₂): basal, durante la recirculación normotérmica (RN) y al final de la recirculación hipotérmica (FRH), en media ± desviación estándar (mL de O₂/100 mL). ♦ p ≤ 0,05 intra-grupo vs basal. **n**: casos por grupo.

Grupo	n	CpO ₂ Basal	CpO ₂ 5 min RN	CpO ₂ 15 min RN	CpO ₂ 30 min RN	CpO ₂ 60 min RN	CpO ₂ FRH
30V	10	10,4 ± 2,2	5,4 ± 1,3 ♦	5,8 ± 1,2 ♦	5,5 ± 0,7 ♦	–	5,6 ± 0,009
60V	8	8,2 ± 0,6	4,9 ± 1,1 ♦	4,7 ± 1,3 ♦	4,2 ± 0,8 ♦	4,0 ± 2,0 ♦	5,6 ± 1,8 ♦

Tabla 35. Contenido de oxígeno portal (CpO₂): basal, durante la recirculación normotérmica (RN) y al final de la recirculación hipotérmica (FRH), en media ± desviación estándar (mL de O₂/100 mL). ♦ p ≤ 0,05 intra-grupo vs basal. **n**: casos por grupo.

Grupo	n	CvshO ₂ Basal	CvshO ₂ 5 min RN	CvshO ₂ 15 min RN	CvshO ₂ 30 min RN	CvshO ₂ 60 min RN	CvshO ₂ FRH
30V	10	9,4 ± 1,9	4,2 ± 1,7 ♦	4,7 ± 0,9 ♦	3,5 ± 1,5 ♦	–	5,0 ± 0,08
60V	8	6,2 ± 1,1	3,5 ± 1,2 ♦	3,6 ± 0,9 ♦	3,4 ± 1,7 ♦	2,7 ± 1,4	5,2 ± 1,7

Tabla 36. Contenido de oxígeno de vena suprahepática (CvshO₂): ≤ basal, durante la recirculación normotérmica (RN) y al final de la recirculación hipotérmica (FRH), en media ± desviación estándar (mL de O₂/100 mL). ♦ p ≤ 0,05 intra-grupo vs basal. **n**: casos por grupo.

4.2.4.2. Aporte, consumo y cociente de extracción hepático de oxígeno

Grupo	n	HDO ₂ Basal	HDO ₂ 5 min RN	HDO ₂ 15 min RN	HDO ₂ 30 min RN	HDO ₂ 60 min RN	HDO ₂ FRH
30V	10	84,4 ± 21,8	25,1 ± 8,2 ♦	30,7 ± 13,0 ♦	30,9 ± 17,3 ♦	–	22,6 ± 1,6
60V	8	64,1 ± 11,4	35,0 ± 19,1 ♦	39,1 ± 19,0 ♦	30,8 ± 12,0 ♦	27,9 ± 15,1 ♦	23,3 ± 10,2 ♦

Tabla 37. Aporte de oxígeno hepático (HDO₂) basal, durante la recirculación normotérmica (RN) y al final de la recirculación hipotérmica (FRH), en media ± desviación estándar (mL./min/m²). ♦ p ≤ 0,05 intra-grupo vs basal. **n:** casos por grupo.

Grupo	n	HVO ₂ Basal	HVO ₂ 5 min RN	HVO ₂ 15 min RN	HVO ₂ 30 min RN	HVO ₂ 60 min RN	HVO ₂ FRH
30V	10	12,2 ± 5,5	8,6 ± 5,04	8,8 ± 5,7	8,5 ± 9,8	–	2,7 ± 0,3
60V	8	18,1 ± 6,6	12,6 ± 7,7	17,7 ± 12,3	11,6 ± 7,5	11,8 ± 10,5	2,1 ± 1,1

Tabla 38. Consumo de oxígeno hepático (HVO₂) basal, durante la recirculación normotérmica (RN) y al final de la recirculación hipotérmica (FRH), en media ± desviación estándar (mL./min/m²). **n:** casos por grupo.

Grupo	n	HO ₂ ER Basal	HO ₂ ER 5 min RN	HO ₂ ER 15 min RN	HO ₂ ER 30 min RN	HO ₂ ER 60 min RN	HO ₂ ER FRH
30V	10	23,0 ± 3,0	35,2 ± 20,7 ♦	28,1 ± 11,2 ♦	44,7 ± 19,4 ♦	–	12,2 ± 9,7
60V	8	24,9 ± 14,4	39,7 ± 19,7	43,5 ± 15,4	40,1 ± 15,8	36,7 ± 24,0	10,3 ± 5,5

Tabla 39. Cociente de extracción hepática de oxígeno (HO₂ER) basal, durante los 30 min de la recirculación normotérmica (RN) y al final de la recirculación hipotérmica (FRH), en media ± desviación estándar (porcentaje). ♦ p ≤ 0,05 intra-grupo vs basal. **n:** casos por grupo.

Durante la RN, el aporte y consumo de oxígeno (Tablas 36 y 37) descendieron respecto al basal en ambos grupos (p < 0,05). La extracción hepática de oxígeno (Tabla 38) incrementó durante la RN y descendió durante la RH. No se hallaron diferencias inter-grupos en ninguna de estas variables de estudio.

4.2.5. Marcadores de Lesión Hepatoceleular

4.2.5.1. ASAT

Grupo	ASAT Basal	ASAT 30 FRN (T3)	ASAT 60 FRN (T3bis)	ASAT PRP (T5)	ASAT 2D (T6)	ASAT 5D (T7)
30V	50 ± 14 n=10	93 ± 85 ♦ n=10	–	581 ± 329 ♦ n=10	2803 ± 1447 ♦ n=10	669 ± 599 ♦ n=8
60V	67 ± 48 n=8	183 ± 188 ♦ n=8	221 ± 198 ♦ n=8	526 ± 381 ♦ n=8	1572 ± 1465 ♦ n=8	192 ± 217 ♦ n=4

Tabla 40. ASAT: basal, a los 30 y 60 min de recirculación normotérmica (30 FRN ó T3 y 60 FRN ó T3 bis), 60 min post-reperusión (PRP ó T5), segundo día (2D ó T6) y quinto día postrasplante (5D ó T7). ♦ $p \leq 0,05$ intra-grupo vs basal, en media ± desviación estándar ($\mu\text{kat/L}$). n: casos por tiempo de estudio.

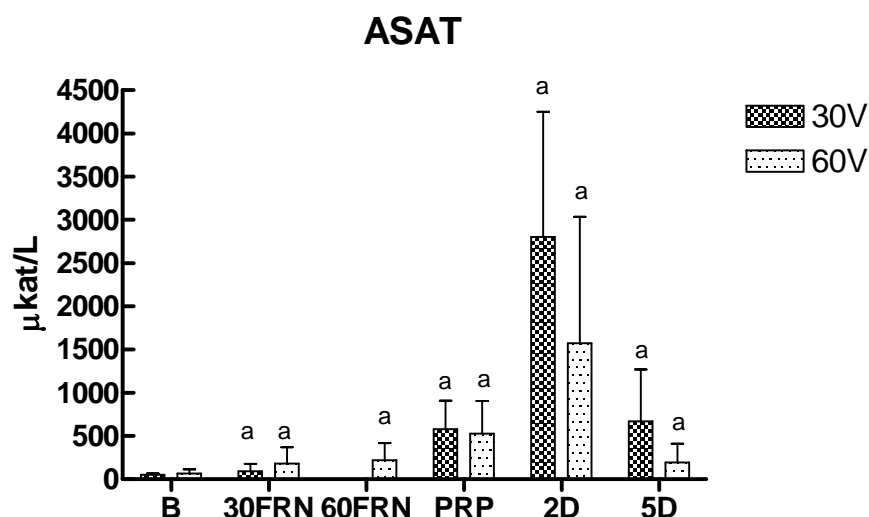


Figura 33. ASAT: basal, a los 30 y 60 min de recirculación normotérmica (30 FRN ó T3 y 60 FRN ó T3 bis), 60 min post-reperusión (PRP ó T5), al segundo día (2D ó T6) y quinto día (5D ó T7) postrasplante. a: $p < 0,05$ intra-grupo vs basal, en media ± desviación estándar ($\mu\text{kat/L}$). No se hallaron diferencias en la comparación inter-grupos.

4.2.5.2. ALAT

Grupo	ALAT Basal	ALAT 30 FRN (T3)	ALAT 60 FRN (T3 bis)	ALAT PRP (T5)	ALAT 2D (T6)	ALAT 5D (T7)
30V n=10	38 ± 10 n=10	29 ± 11 n=10	–	57 ± 19♦ n=10	107 ± 46♦ n=10	64 ± 15♦ n=8
60V n=8	44 ± 18 n=8	27 ± 9♦ n=8	27 ± 9♦ n=8	47 ± 15 n=8	91 ± 42♦ n=8	35 ± 9♣ n=4

Tabla 41. ALAT: basal, a los 30 y 60 min de recirculación normotérmica (30 FRN ó T3 y 60 FRN ó T3 bis), 60 min post-reperusión (PRP ó T5), segundo y quinto día postrasplante (2D ó T6 y 5D ó T7), en media ± desviación estándar (μ kat/L). ♦ $p < 0,05$ intra-grupo vs basal, ♣ $p < 0,05$ 30V vs 60V. n: casos por tiempo de estudio.

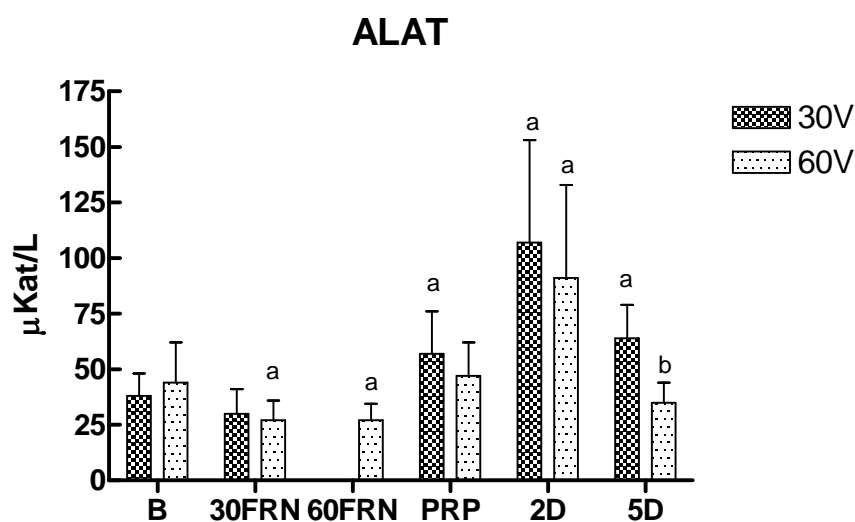


Figura 34: ALAT basal, a los 30 y 60 min de recirculación normotérmica (30 FRN ó T3 y 60 FRN ó T3 bis), 60 min post-reperusión (PRP ó T5), segundo y quinto día postrasplante (2D ó T6 y 5D ó T7), en media desviación ± estándar (μ kat/L.) a: $p < 0,05$ intra-grupo vs basal, b: $p < 0,05$ 30V vs 60V.

En la determinación de ALAT el grupo 60V fue comparable al grupo 30V en la fase inicial de RN pero se halló un valor significativamente inferior en 5D ($p=0,024$). La comparación intra-grupo mostró diferencias entre el basal y el resto de tiempos del estudio en el grupo 30V ($p=0,000$) y 60V ($p=0,000$). En 60V no se hallaron diferencias entre T3 y T3bis.

4.2.6. Marcador de Lesión Endotelial Hepática

Grupo	n	EHAH Basal	EHAH 30FRN (T3)	EHAH 60 FRN (T3 bis)	EHAH PRP (T5)
30V	10	32,7 ± 10,1	-4,6 ± 19,5♦	–	-7,9 ± 24,4♦
60V	8	26,0 ± 11,8	-10,4 ± 27,9♦	6,4 ± 12,2♦	7,8 ± 7,1♦

Tabla 42. Extracción hepática de ácido hialurónico (EHAH), expresado en porcentaje como media desviación estándar. Valores obtenidos en tiempo basal, al final de 30 y 60 min de recirculación normotérmica (30FRN ó T3 y 60FRN ó T3bis) y 60 min post-reperusión. ♦ $p < 0,05$ vs basal. n: casos por grupo.

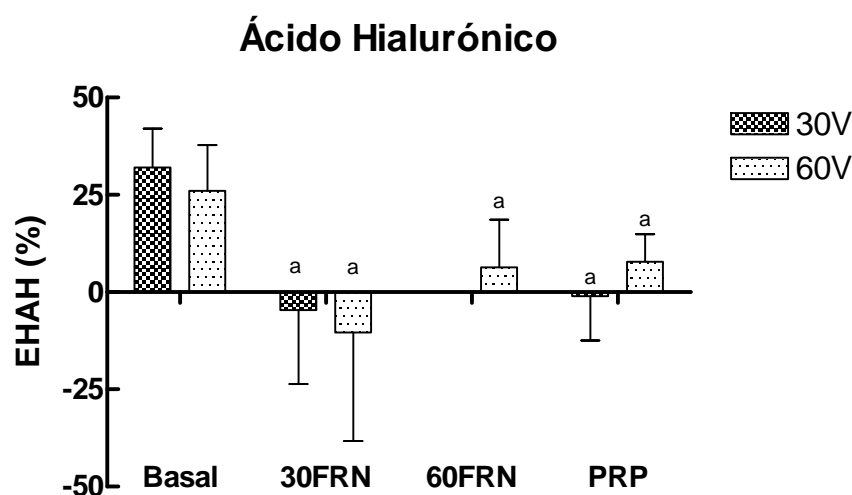


Figura 35. Extracción hepática de ácido hialurónico (EHAH) basal, al final de la recirculación normotérmica (FRN) y 60 min post-reperusión (PRP), en porcentaje (%). **a:** $p \leq 0,05$ intra-grupo vs basal. Ambos grupos fueron comparables en la extracción basal de ácido hialurónico (ns). La comparación intra-grupo mostró que los valores hallados en T3 y T5 fueron significativamente distintos al basal para 30V ($p < 0,005$) y para 60V se halló diferencia respecto a T3, T3bis y T5 ($p < 0,003$). En 60V T3bis fue positivo frente a T3 (ns). No se hallaron diferencias inter-grupos.

4.2.7. Marcadores del Estado Energético Hepático

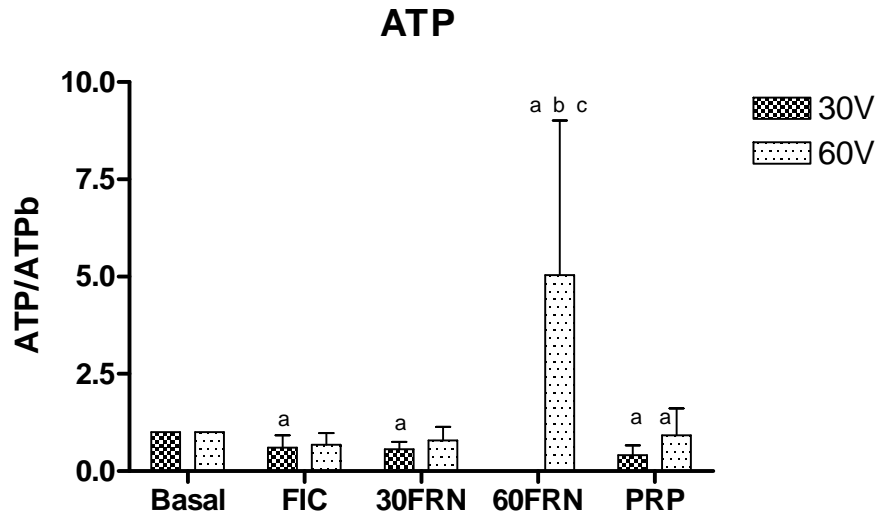


Figura 36. ATP: cada resultado se ha dividido por el valor basal y se ha expresado como fracción de unidad en media \pm desviación estándar. Determinaciones: basal, tras 60 min de isquemia caliente (FIC), tras 30 y 60 min de recirculación normotérmica (30FRN y 60FRN) y 60 min post-reperusión (PRP). **a:** $p \leq 0,05$ intra-grupo vs basal, **b** (grupo 60V) $p \leq 0,05$ 30FRN vs 60FRN, **c** (grupo 60V) $p \leq 0,05$ 60FRN vs PRP.

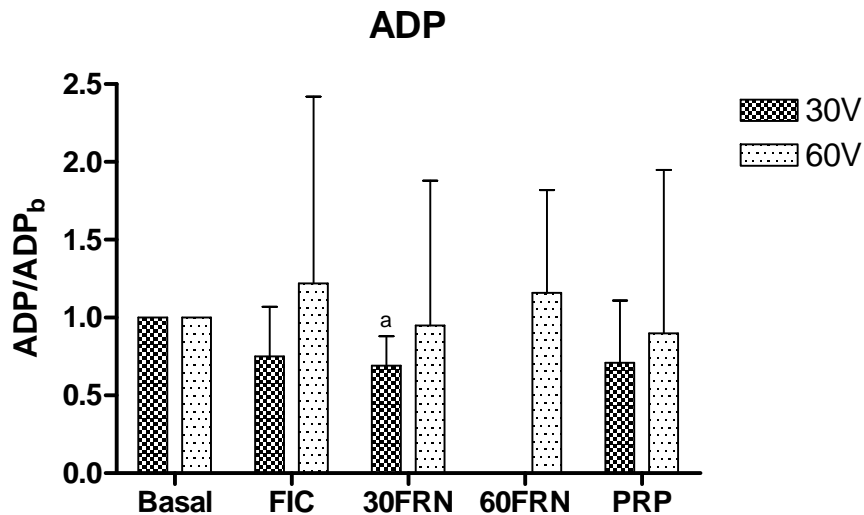


Figura 37. ADP: cada resultado se ha dividido por el valor basal y se ha expresado como fracción de unidad en media \pm desviación estándar. Determinaciones: basal, tras 60 min de isquemia caliente (FIC), tras 30 y 60 min de recirculación normotérmica (30FRN y 60FRN) y 60 min post-reperusión (PRP). **a:** $p < 0,05$ vs basal.

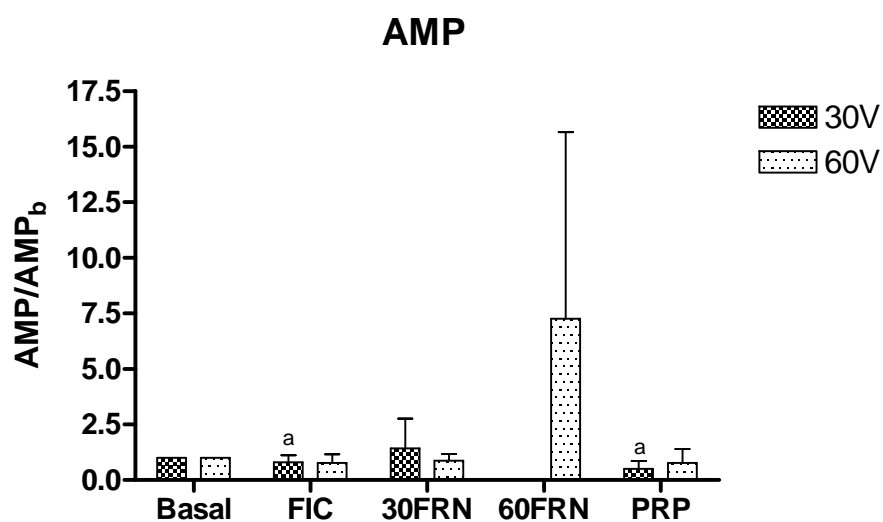


Figura 38. AMP: cada resultado se ha dividido por el valor basal y se ha expresado como fracción de unidad en media \pm desviación estándar. Determinaciones: basal, tras 60 min de isquemia caliente (FIC), tras 30 y 60 min de recirculación normotérmica (30FRN y 60FRN) y 60 min post-reperusión (PRP). **a:** $p < 0,05$ *vs* basal.

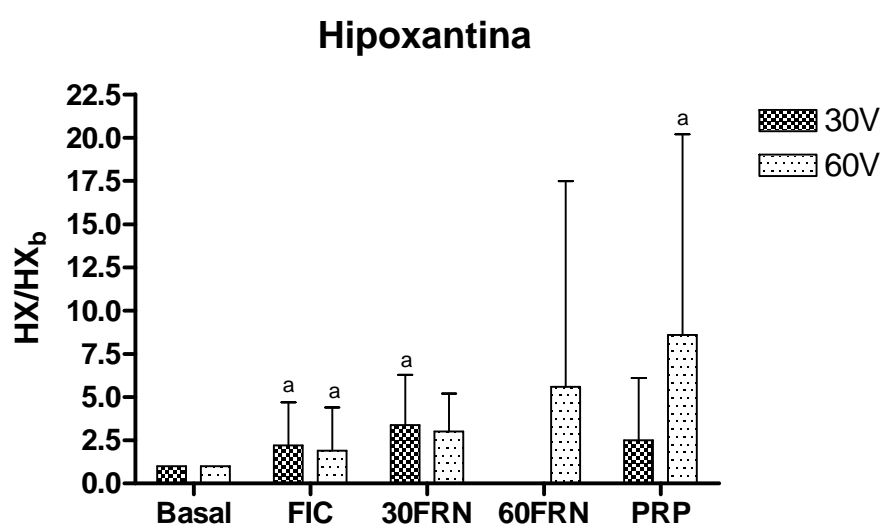


Figura 39. Hipoxantina: cada resultado se ha dividido por el valor basal y se ha expresado como fracción de unidad en media \pm desviación estándar. Determinaciones: basal, tras 60 min de isquemia caliente (FIC), tras 30 y 60 min de recirculación normotérmica (30FRN y 60FRN) y 60 min post-reperusión (PRP). **a:** $p < 0,05$ *vs* basal.

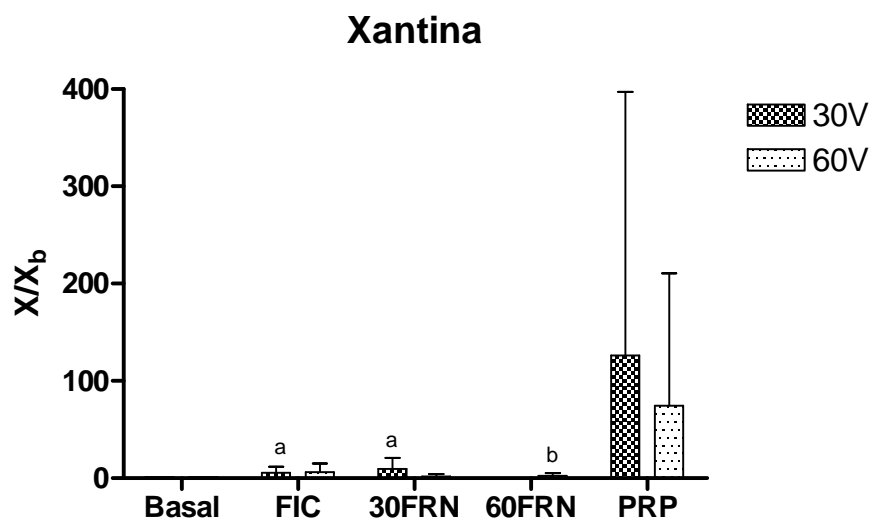


Figura 40. Xantina: cada resultado se ha dividido por el valor basal y se ha expresado como fracción de unidad en media \pm desviación estándar. Determinaciones: basal, tras 60 min de isquemia caliente (FIC), tras 30 y 60 min de recirculación normotérmica (30FRN y 60FRN) y 60 min post-reperusión (PRP). **a:** $p < 0,05$ vs basal. **b** (grupo 60V) $p < 0,05$ 30FRN vs 60FRN.

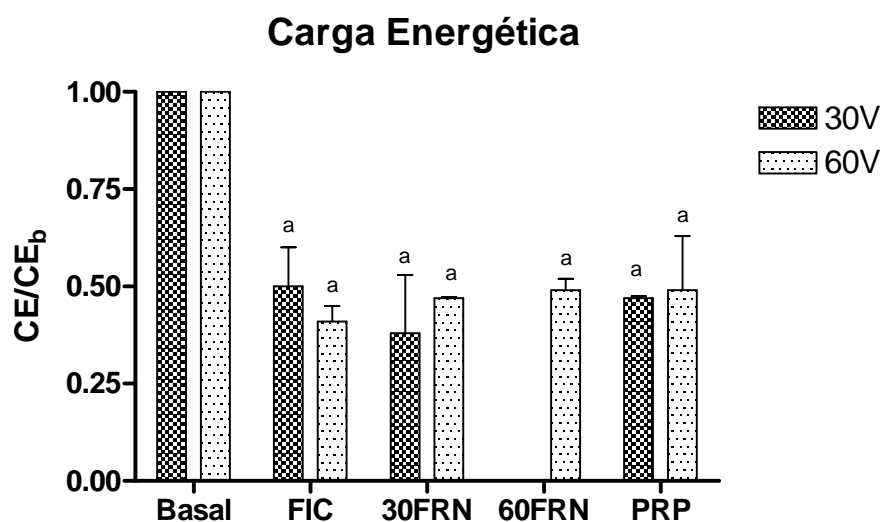


Figura 41. Carga energética: cada resultado se ha dividido por el valor basal y se ha expresado como fracción de unidad en media \pm desviación estándar. Determinaciones: basal, tras 60 min de isquemia caliente (FIC), tras 30 y 60 min de recirculación normotérmica (30FRN y 60FRN) y 60 min post-reperusión (PRP). **a:** $p < 0,05$ vs basal.

4.2.8. Histología

Se realizó en las biopsias hepáticas de los animales supervivientes al quinto día. Se analizaron ocho variables en cada grupo de estudio y los resultados se compararon con los obtenidos en el grupo 30V.

4.2.8.1. Endotelitis

Se utilizaron dos categorías: 0= ausencia de endotelitis; 1= presencia de endotelitis.

Endotelitis	30V	60V
0	1	0
1	6	4
Total	n=7	n=4

Tabla 43

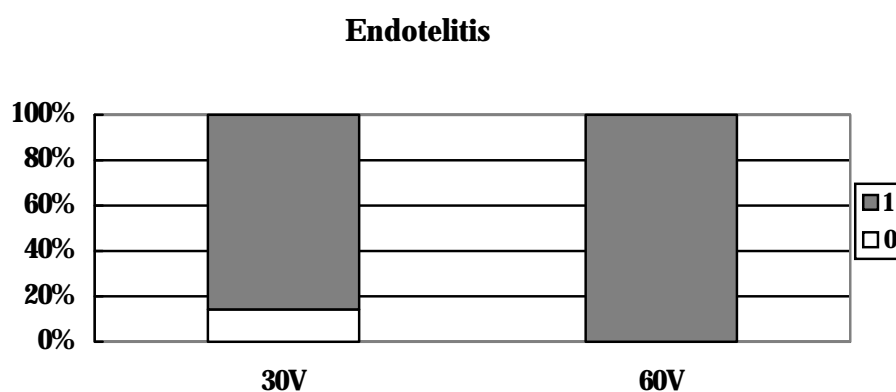


Figura 42

En el grupo 30V, el 14% de las biopsias mostraron ausencia de endotelitis, mientras que en el grupo 60V el 100% de las biopsias presentaron endotelitis. Sin embargo, no se hallaron diferencias significativas entre grupos.

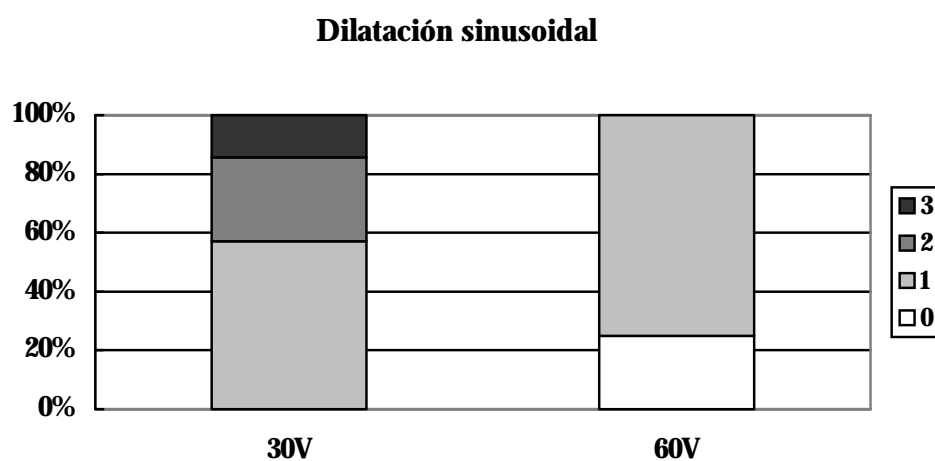
4.2.8.2. Dilatación sinusoidal

Se establecieron 4 categorías: 0= ausencia de dilatación; 1= dilatación leve; 2= dilatación moderada; 3= dilatación severa.

Dilatación sinusoidal	30V	60V
0	0	1
1	4	3
2	2	0
3	1	0
Total	n=7	n=4

Tabla 44

Figura 43



El grupo 30V presentó dilatación sinusoidal de tipo 1 en un 57% de las biopsias, de tipo 2 en un 28% y de tipo 3 en un 14%. Por el contrario el grupo 60V mostró ausencia de dilatación sinusoidal en el 25% de las biopsias analizadas y dilatación de tipo 1 en el 75% restante, sin que se hallasen diferencias significativas entre ambos grupos.

4.2.8.3. Infiltración leucocitaria sinusoidal

Se definieron tres categorías para valorar la infiltración por PMN y linfocitos a nivel sinusoidal:

1=leve, 2= moderada y 3= severa.

PMN Linf	30V	60V
1	4	0
2	1	2
3	2	2
Total	n=7	n=4

Tabla 45

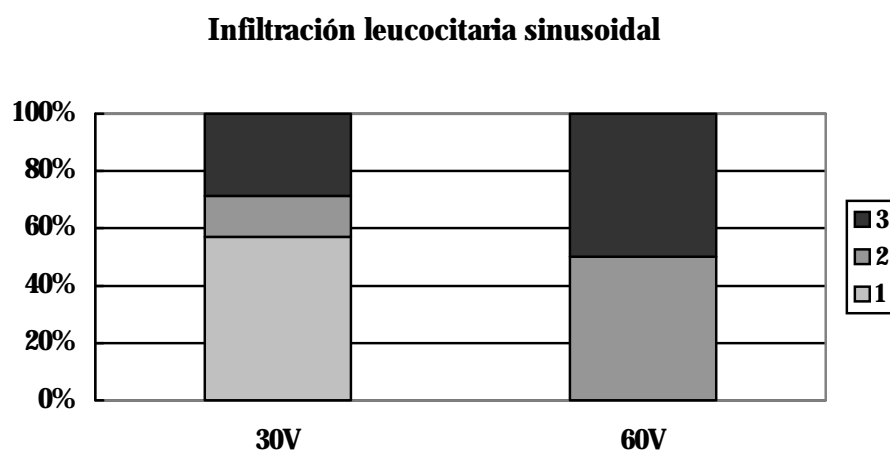


Figura 44

El grupo 30V mostró infiltración leve de tipo 1 en el 57% de los casos, de tipo 2 en el 14% y de tipo 3 en el 28%. El grupo 60V presentó mayor grado de infiltración sinusoidal ya que, en el 50% de los casos fue de tipo 2 y en el 50% restante fue de tipo 3, aunque no se hallaron diferencias significativas entre ambos grupos.

4.2.8.4. Infarto

Se establecieron dos categorías: 0=ausencia; 1= presencia.

Infarto	30V	60V
0	5	3
1	2	1
Total	n=7	n=4

Tabla 46

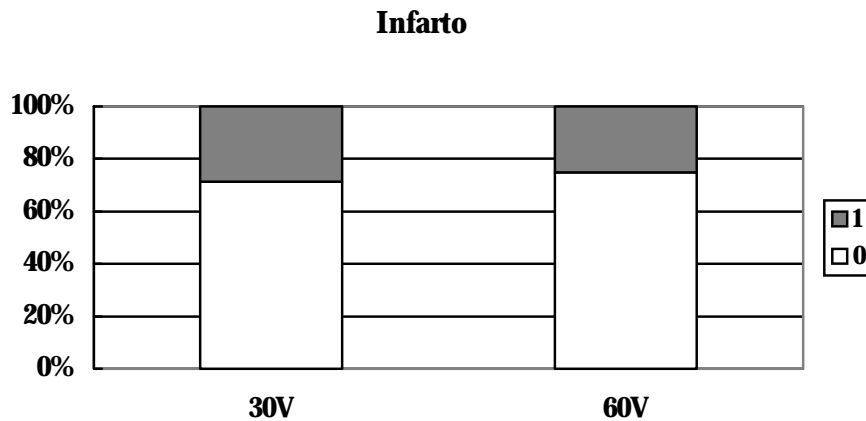


Figura 45

El grupo 30V presentó ausencia de infarto en un 71% de los casos y presencia en el 29% restante. En el grupo 60V se hallaron resultados muy similares, con ausencia de infarto en el 75% de las biopsias y presencia en el 25% restante. No se hallaron diferencias significativas en la comparación inter-grupos.

4.2.8.5. Disociación hepatocitaria

Se establecieron cuatro categorías: 0= ausencia; 1= leve; 2= moderada; 3= severa.

Disociación	30V	60V
0	2	1
1	2	2
2	2	1
3	1	0
Total	n=7	n=4

Tabla 47

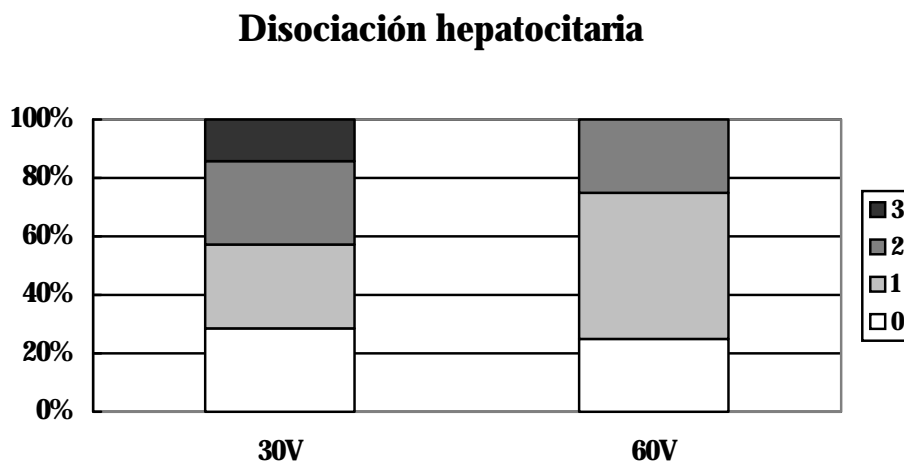


Figura 46

La disociación hepatocitaria mostró un patrón muy heterogéneo en el grupo 30V sin predominancia de lesiones, ya que se produjo ausencia de disociación en el 28% de las biopsias, de tipo 1 en el 28%, de tipo 2 en el 28% y de tipo 3 en el 14%. En el grupo 60V hubo predominio de disociación tipo 1 (50%) y los tipos 0 y 2 aparecieron en un 25% cada uno, sin disociación de tipo 3. No se hallaron diferencias significativas entre ambos.

4.2.8.6. Necrosis isquémica centrolobulillar

Se establecieron dos categorías en función del porcentaje de necrosis isquémica: tipo 1: $\leq 50\%$ y tipo 2: $> 51\%$.

Necrosis	30V	60V
1	6	4
2	1	0
Total	n=7	n=4

Tabla 48

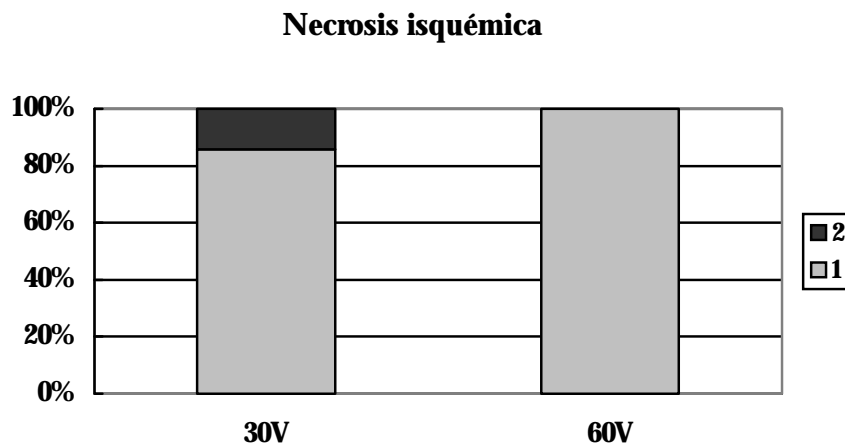


Figura 47

El grupo 30V mostró un 14% de necrosis isquémica de tipo 2 frente al grupo 60V que solo presentó necrosis isquémica de tipo 1 en el 100% de las biopsias analizadas. No se hallaron diferencias significativas.

4.2.8.7. Área necrótica media

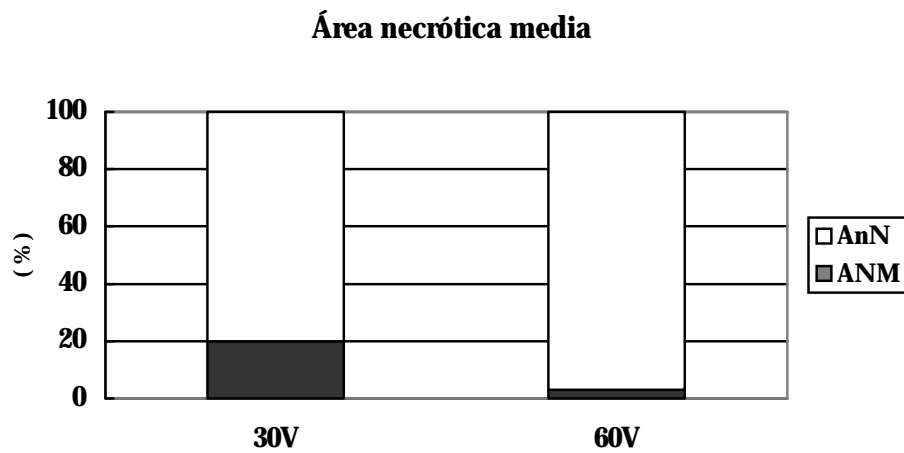


Figura 48. Porcentaje de área necrótica media (ANM) respecto al área no necrótica (AnN).

El área necrótica media fue significativamente menor en el grupo 60V (3%) que en el grupo 30V (20%). (F 6,66; $p=0,027$).

4.2.8.8. Colangitis isquémica

Se establecieron dos categorías: 0= ausencia; 1= presencia.

Colangitis	30V	60V
0	3	2
1	4	2
Total	n=7	n=4

Tabla 49

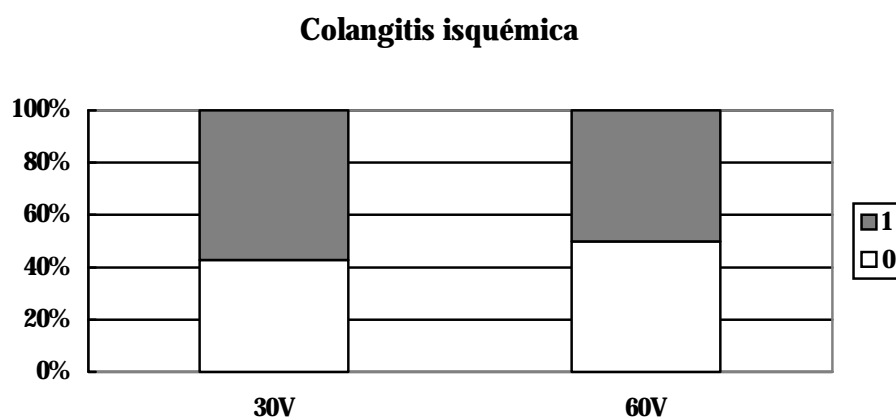


Figura 49

Se produjo ausencia de colangitis isquémica en un 42% de los casos del grupo 30V y en un 50% de los casos del grupo 60V, sin que se hallaran diferencias significativas en la comparación entre ambos.

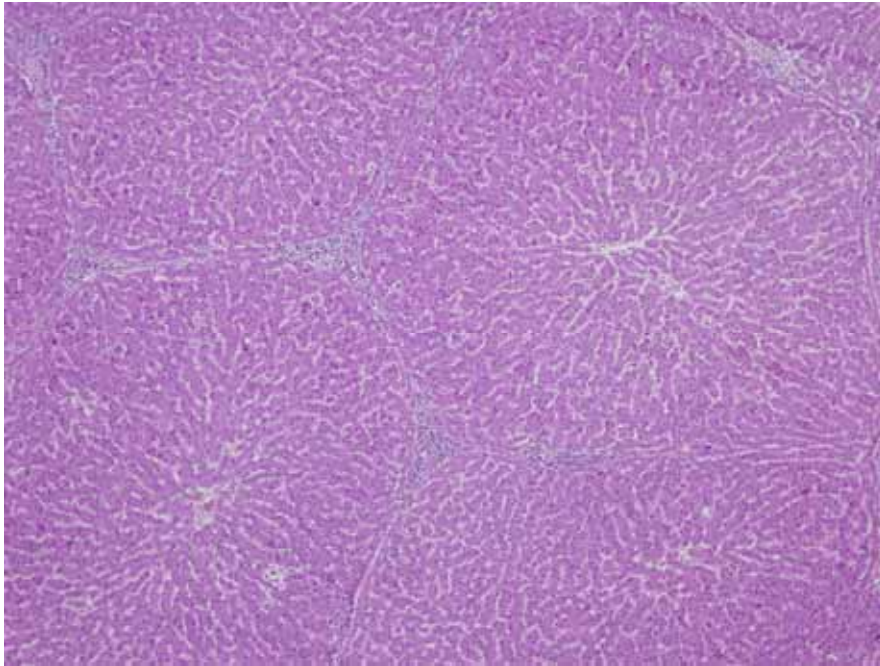


Foto 14. Grupo 60V. En esta preparación con Hematoxilina/Eosina se observa a pequeño aumento (40x) la preservación de la arquitectura hepática con una mínima alteración de la organización trabecular.

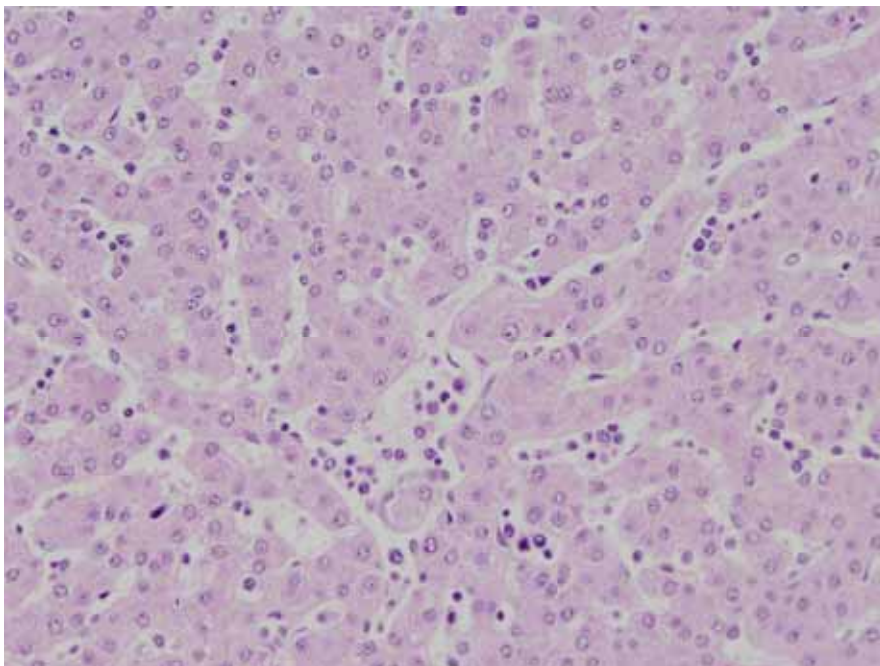


Foto 15. Grupo 60V. A gran aumento (100x) en una preparación con Hematoxilina/Eosina puede observarse una zona centrolobulillar. Las trabéculas hepáticas están bien ordenadas. Se aprecia un leve infiltrado inflamatorio intrasinusoidal predominantemente linfoide.

4.3. Supresión del Periodo de Recirculación Hipotérmica

4.3.1. Morfometría

Grupo	n	SC (m ²)	Peso (Kg)
30V	10	1,01 ± 0,007	28,6 ± 3,2
30SRH	8	0,98 ± 0,005	27,7 ± 2,9

Tabla 50. Características morfométricas de los animales de estudio. Grupo 30V: grupo control, Grupo 30SRH: grupo con supresión del periodo de recirculación hipotérmica. **n**: número de casos por grupo, SC: superficie corporal en metros cuadrados (m²). Peso en kilogramos (Kg). Resultados en media ± desviación estándar.

4.3.2. Supervivencia

Grupo	n	Vivos/Muertos	Supervivencia (%)
30V	10	8/2	80
30SRH	8	6/2	75

Tabla 51. Se muestra la supervivencia al quinto día postrasplante en los grupos de estudio. n: casos por grupo. Vivos/Muertos: casos supervivientes y casos no supervivientes al quinto día postrasplante. Supervivencia: porcentaje (%) de casos supervivientes respecto al total de casos del estudio.

4.3.3. Flujo de Bomba y Hemodinámica Hepática Durante la Recirculación

Ambos grupos se comportaron de forma similar durante la RN, como cabía esperar, ya que no se varió ningún aspecto durante ese periodo. La comparación intra-grupo obtuvo las mismas diferencias durante la RN en el grupo 30V y 30SRH respecto al flujo de bomba, el flujo portal y el flujo hepático total. La comparación inter-grupos no halló diferencias significativas en las variables hemodinámicas y en el volumen de fluidos añadidos durante la RN. En las siguientes tablas aparecen los valores medios por grupo de estudio.

4.3.3.1. Flujo de bomba

Grupo	n	F Bomba 5 min RN	F Bomba 15 min RN	F Bomba 30 min RN	F Bomba FRH
30V	10	2,70 ± 0,53	3,25 ± 1,04 ♦	2,39 ± 0,70 ♦	1,66 ± 0,23 ♦
30SRH	8	2,92 ± 0,66	3,64 ± 0,89 ♦	2,91 ± 1,01 ♦	

Tabla 52. Flujo de bomba a los 5, 15 y 30 min de recirculación normotérmica (RN) y al final de la recirculación hipotérmica (FRH), en media ± desviación estándar (L./min/m²). ♦ p ≤ 0,05 intra-grupo vs basal. n: casos por grupo.

4.3.3.2. Fluidoterapia y tiempo de enfriamiento

Grupo	n	Volumen RN	Volumen RH	Tiempo FRH
30V	10	120,3 ± 209,7 ♦	455 ± 172,3 ♦	17,10 ± 5,11
30SRH	8	62,5 ± 176,7	0	0

Tabla 53. Fluidoterapia añadida durante la recirculación normotérmica (Volumen RN) e hipotérmica (Volumen RH) en mL. Tiempo FRH: Tiempo utilizado hasta la obtención de 15°C en la superficie hepática o final de la recirculación hipotérmica, en minutos. Resultados en media ± desviación estándar. ♦ p ≤ 0,05 intra-grupo Volumen RN vs Volumen RH. N: casos por grupo.

4.3.3.3. Flujo arterial hepático

Grupo	n	FAH Basal	FAH 5 min RN	FAH 15 min RN	FAH 30 min RN	FAH FRH
30V	10	176,5 ± 80,7	159,6 ± 66,5	176,0 ± 72,5	156,3 ± 93,6	132,1 ± 75,3
30SRH	8	182,6 ± 74,9	150,4 ± 69,3	181,9 ± 107,2	144,6 ± 55,5	

Tabla 54. Flujo arterial hepático (FAH): basal, a los 5, 15 y 30 min de recirculación normotérmica (RN) y al final de la recirculación hipotérmica (FRH), en media ± desviación estándar (mL./min/m²). n: casos por grupo.

4.3.3.4. Flujo Portal

Grupo	n	FP Basal	FP 5 min RN	FP 15 min RN	FP 30 min RN	FP FRH
30V	10	639,1 ± 138,6	242,5 ± 108,9♦	287,2 ± 169,4♦	327,3 ± 212,63♦	231,9 ± 133,6♦
30SRH	8	650,8 ± 98,2	307,9 ± 135,0♦	360,0 ± 199,3♦	408,3 ± 209,1♦	

Tabla 55. Flujo portal (FP): basal, a los 5, 15 y 30 min de recirculación normotérmica (RN) y al final de la recirculación hipotérmica (FRH), en media ± desviación estándar (mL/min/m²). ♦ p ≤ 0,05 intra-grupo vs basal.

n: casos por grupo

4.3.3.5. Flujo Hepático Total

Grupo	n	FHT Basal	FHT 5 min RN	FHT 15 min RN	FHT 30 min RN	FHT FRH
30V	10	815,6 ± 150,5	402,1 ± 115,6♦	463,3 ± 169,9♦	483,7 ± 244,6♦	363,9 ± 148,1♦
30SRH	8	813,4 ± 106,6	458,4 ± 171,4♦	542,0 ± 253,2♦	553,0 ± 238,8♦	

Tabla 56. Flujo hepático total (FHT): basal, a los 5, 15 y 30 min de recirculación normotérmica (RN) y al final de la recirculación hipotérmica (FRH), en media ± desviación estándar (mL/min/m²). ♦ p ≤ 0,05 intra-grupo vs basal.

n: casos por grupo.

4.3.4. Metabolismo hepático de oxígeno

Los contenidos de oxígeno en arteria, porta y vena suprahepática, así como el aporte de oxígeno mostraron una reducción significativa respecto al valor basal en ambos grupos durante la RN (Tablas 56, 57, 58 y 59). El consumo de oxígeno no mostró variaciones durante la RN respecto al valor basal (Tabla 60), mientras que la extracción hepática de oxígeno incrementó significativamente tanto en 30V como en 30SRH con relación al valor basal (Tabla 61). No se hallaron diferencias en la comparación inter-grupos.

4.3.4.1. Contenido de oxígeno de arteria hepática, vena porta y vena suprahepática

Grupo	n	CaO ₂ Basal	CaO ₂ 5 min RN	CaO ₂ 15 min RN	CaO ₂ 30 min RN	CaO ₂ FRH
30V	10	12,8 ± 2,1	7,7 ± 0,9♦	7,8 ± 1,2♦	8,1 ± 1,4	6,6 ± 0,004♦
30SRH	8	11,4 ± 1,8	7,9 ± 1,1♦	7,2 ± 1,2♦	7,4 ± 1,9♦	

Tabla 57. Contenido de oxígeno arterial (CaO₂): basal, durante la recirculación normotérmica (RN) y al final de la recirculación hipotérmica (FRH), en media ± desviación estándar (mL de O₂/100 mL). ♦ p ≤ 0,05 intra-grupo vs basal. **n**: casos por grupo.

Grupo	n	CpO ₂ Basal	CpO ₂ 5 min RN	CpO ₂ 15 min RN	CpO ₂ 30 min RN	CpO ₂ FRH
30V	10	9,4 ± 1,1	5,4 ± 1,3♦	5,8 ± 1,2♦	5,5 ± 0,7♦	5,6 ± 0,009
30SRH	8	8,1 ± 1,9	5,4 ± 1,5♦	5,4 ± 1,0♦	5,2 ± 1,6♦	

Tabla 58. Contenido de oxígeno portal (CpO₂): basal, durante la recirculación normotérmica (RN) y al final de la recirculación hipotérmica (FRH), en media ± desviación estándar (mL de O₂/100 mL). ♦ p ≤ 0,05 intra-grupo vs basal. **n**: casos por grupo.

Grupo	n	CvshO ₂ Basal	CvshO ₂ 5 min RN	CvshO ₂ 15 min RN	CvshO ₂ 30 min RN	CvshO ₂ FRH
30V	10	9,4 ± 1,9	4,2 ± 1,7♦	4,7 ± 0,9♦	3,5 ± 1,5♦	5,0 ± 0,08
30SRH	8	7,2 ± 1,3	4,1 ± 1,3♦	3,9 ± 0,9♦	3,6 ± 0,7♦	

Tabla 59. Contenido de oxígeno de vena suprahepática (CvshO₂): basal, durante la recirculación normotérmica (RN) y al final de la recirculación hipotérmica (FRH), en media ± desviación estándar (mL O₂/100 mL). ♦ p ≤ 0,05 intra-grupo vs basal. **n**: casos por grupo.

4.3.4.2. Aporte, consumo y cociente de extracción hepático de oxígeno

Grupo	n	HDO ₂ Basal	HDO ₂ 5 min RN	HDO ₂ 15 min RN	HDO ₂ 30 min RN	HDO ₂ FRH
30V	10	84,4 ± 21,8	25,3 ± 8,2♦	30,6 ± 13,0♦	30,9 ± 17,3♦	23,6 ± 1,6
30SRH	8	59,4 ± 16,9	30,0 ± 14,0♦	33,3 ± 17,7♦	31,8 ± 15,8♦	

Tabla 60. Aporte de oxígeno hepático (HDO₂): basal, durante la recirculación normotérmica (RN) y al final de la recirculación hipotérmica (FRH), en media ± desviación estándar (mL/min/m²). ♦ p ≤ 0,05 intra-grupo vs basal.

n: casos por grupo.

Grupo	n	HVO ₂ Basal	HVO ₂ 5 min RN	HVO ₂ 15 min RN	HVO ₂ 30 min RN	HVO ₂ FRH
30V	10	11,7 ± 5,5	8,6 ± 5,0	8,8 ± 5,7	8,5 ± 9,3	2,7 ± 0,3
30SRH	8	9,9 ± 4,1	9,7 ± 5,9	11,6 ± 8,3	11,9 ± 9,0	

Tabla 61. Consumo de oxígeno hepático (HVO₂): basal, durante la recirculación normotérmica (RN) y al final de la recirculación hipotérmica (FRH), en media ± desviación estándar (mL/min/m²). **n:** casos por grupo.

Grupo	n	HO ₂ ER Basal	HO ₂ ER 5 min RN	HO ₂ ER 15 min RN	HO ₂ ER 30 min RN	HO ₂ ER FRH
30V	10	13,0 ± 3,0	35,2 ± 20,7♦	28,1 ± 11,2♦	44,7 ± 19,4♦	12,2 ± 0,7
30SRH	8	14,7 ± 3,9	33,4 ± 13,2♦	34,0 ± 15,5♦	35,4 ± 12,8♦	

Tabla 62. Cociente de extracción hepática de O₂ (HO₂ER): basal, durante la recirculación normotérmica y al final de la recirculación hipotérmica (FRH), en media ± desviación estándar (porcentaje) ♦ p ≤ 0,05 intra-grupo vs basal.

n: casos por grupo.

4.3.5. Marcadores de Lesión Hepatocelular

4.3.5.1. ASAT

Grupo	ASAT Basal	ASAT FRN (T3)	ASAT PRP (T5)	ASAT 2D (T6)	ASAT 5D (T7)
30V	50 ± 14 n=10	93 ± 85 ♦ n=10	581 ± 329 ♦ n=10	2803 ± 1447 ♦ n=10	669 ± 599 ♦ n=8
30SRH	46 ± 13 n=8	95 ± 47 ♦ n=8	593 ± 349 ♦ n=8	1085 ± 711 ♦♣ n=7	275 ± 209 ♦ n=6

Tabla 63. ASAT: basal, al final de la recirculación normotérmica (FRN ó T3), 60 min post-reperusión (PRP ó T5), al segundo día (2D ó T6) y al quinto día postrasplante (5D ó T7), en media ± desviación estándar (μkat/L). ♦ p ≤ 0,05 intra-grupo vs basal, ♣ p ≤ 0,05 30v vs 30SRH. n: casos por tiempo de estudio. El valor de ASAT en 2D resultó significativamente inferior en 30SRH respecto a 30V (Z=-2,59 p=0,008).

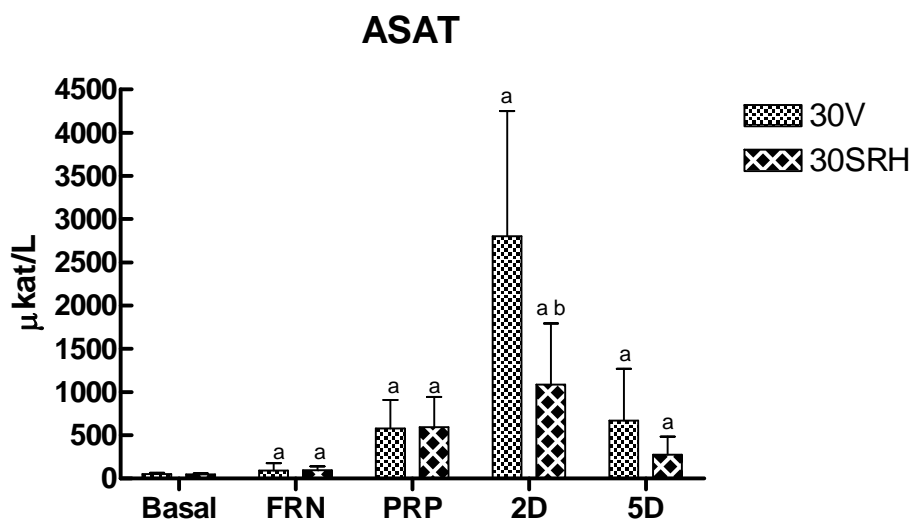


Figura 50. ASAT: basal, al final de la recirculación normotérmica (FRN), 60 min post-reperusión (PRP), al segundo y al quinto día postrasplante (2D y 5D respectivamente). **a:** p ≤ 0,05 intra-grupo vs basal, **b:** p ≤ 0,05 30V vs 30SRH.

4.3.5.2. ALAT

Grupo	ALAT Basal	ALAT FRN (T3)	ALAT PRP (T5)	ALAT 2D (T6)	ALAT 5D (T7)
30V	38 ± 10 n=10	29 ± 11 n=10	57 ± 19♦ n=10	107 ± 46♦ n=10	64 ± 15♦ n=8
30SRH	43 ± 18 n=8	23 ± 10♦ n=8	41 ± 10 n=8	58 ± 32♣ n=7	40 ± 20♣ n=6

Tabla 64. Valores de ALAT basal, al final de la recirculación normotérmica (FRN ó T3), 60 min post-reperusión (PRP ó T5), al segundo día postrasplante (2D ó T6) y al quinto día postrasplante (5D ó T7) en media ± desviación estándar ($\mu\text{kat/L}$). ♦ $p \leq 0,05$ intra-grupo vs basal ♣ $p \leq 0,05$ 30v vs 30SRH. n casos por tiempo de estudio. El valor de ALAT en 2D y 5D resultó significativamente inferior en 30SRH respecto a 30V (ALAT 2D: $Z = -2,04$, $p = 0,013$; ALAT 5D: $Z = -2,01$, $p = 0,05$)

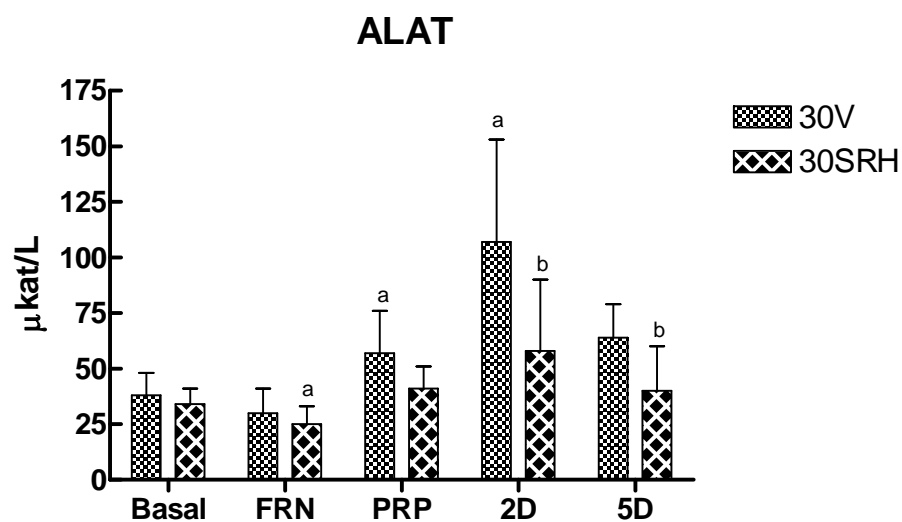


Figura 51. Valores de ASAT obtenidos en tiempo basal, al final de la recirculación normotérmica (FRN), 60 min post-reperusión (PRP), al segundo y al quinto día postrasplante (2D y 5D respectivamente). **a:** $p \leq 0,05$ intra-grupo vs basal, **b:** $p \leq 0,05$ 30V vs 30SRH.

4.3.6. Marcador de Lesión Endotelial Hepática

Grupo	n	EHAH Basal	EHAH FRN (T3)	EHAH PRP (T5)
30V	10	32,7 ± 10,1	-4,6 ± 19,5♦	-1,0 ± 11,4♦
30SRH	8	22,1 ± 8,5	-0,4 ± 9,5♦	5,3 ± 14,9♦

Tabla 65. Extracción hepática de ácido hialurónico (EHAH): basal, al final de la recirculación normotérmica (FRN ó T3) y 60 min post-reperfusión (PRP ó T5), en media ± desviación estándar. ♦ $p \leq 0,05$ intra-grupo vs basal. n: casos por grupo.

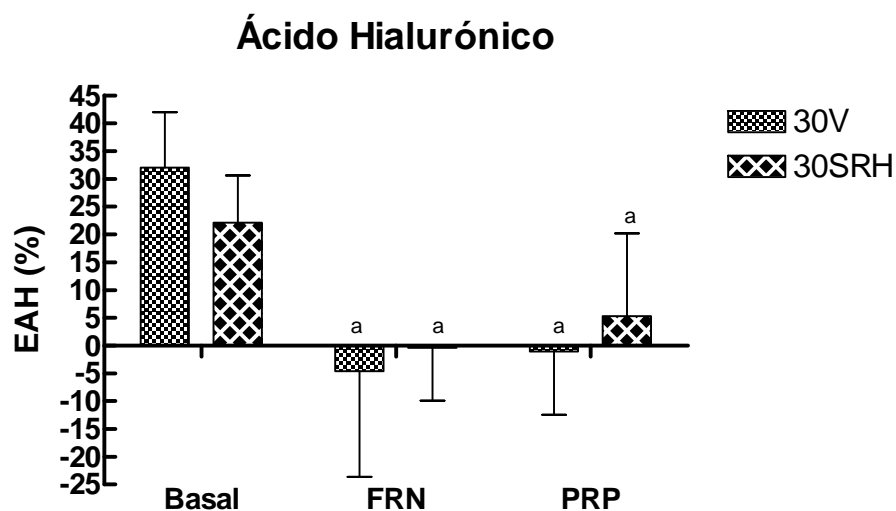


Figura 52. Extracción hepática de ácido hialurónico (EHAH) basal, al final de la recirculación normotérmica (FRN) y 60 min post-reperfusión (PRP), en porcentaje (%). **a:** $p \leq 0,05$ intra-grupo vs basal. Ambos grupos mostraron que los valores hallados tras la RN y 60 min post-reperfusión fueron significativamente inferiores a los basales y diferentes entre sí ($p < 0,05$). En la comparación inter-grupos no se hallaron diferencias estadísticas aunque, tras la reperfundión, el grupo 30SRH mostró una EAH positiva, frente al valor negativo del grupo 30V.

4.3.7. Marcadores Del Estado Energético Hepático

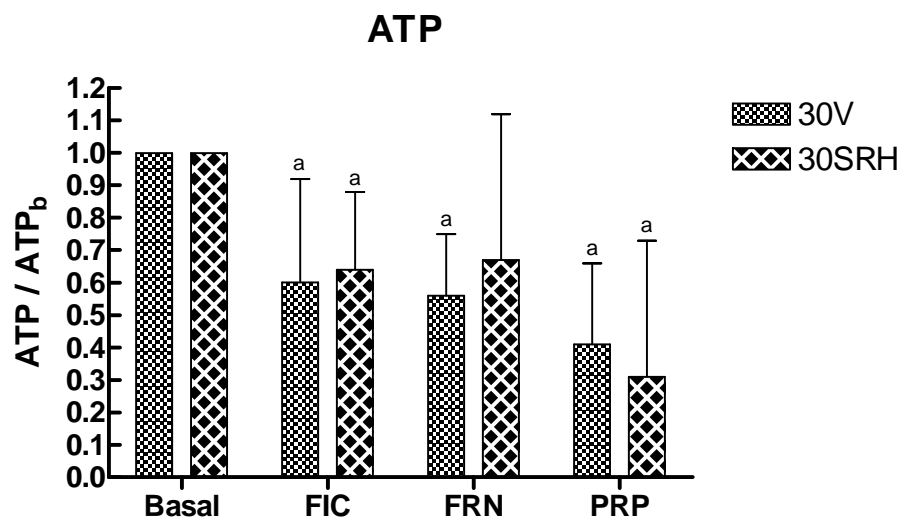


Figura 53. ATP: cada resultado se ha dividido por el valor basal y se ha expresado como fracción de unidad en media \pm desviación estándar. Se determinaron tras 60 min de isquemia caliente (FIC), al final de la recirculación normotérmica (FRN) y 60 min post-reperusión (PRP) **a:** $p \leq 0,05$ intra-grupo *vs* basal. Sin diferencias inter-grupos.

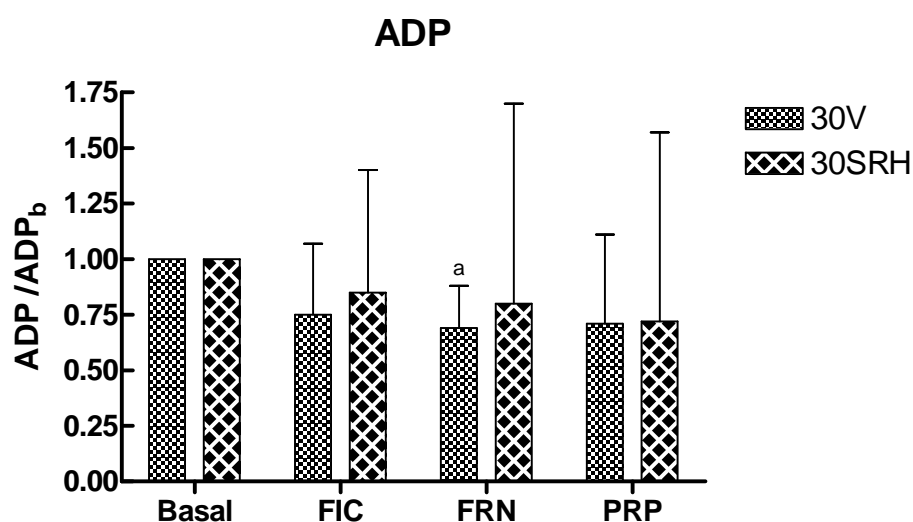


Figura 54. ADP: cada resultado se ha dividido por el valor basal y se ha expresado como fracción de unidad en media \pm desviación estándar. Se determinaron tras 60 min de isquemia caliente (FIC), al final de la recirculación normotérmica (FRN) y 60 min post-reperusión (PRP) **a:** $p \leq 0,05$ intra-grupo *vs* basal. Sin diferencias inter-grupos.

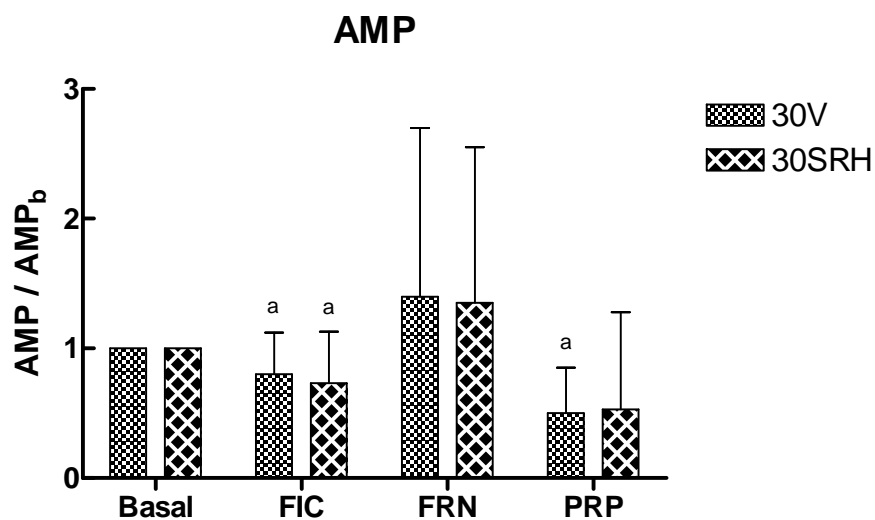


Figura 55. AMP: cada resultado se dividió por el valor basal y se ha expresado como fracción de unidad en media \pm desviación estándar. Se determinaron tras 60 min de isquemia caliente (FIC), al final de la recirculación normotérmica (FRN) y 60 min post-reperusión (PRP) **a**: $p \leq 0,05$ intra-grupo *vs* basal. Sin diferencias inter-grupos.

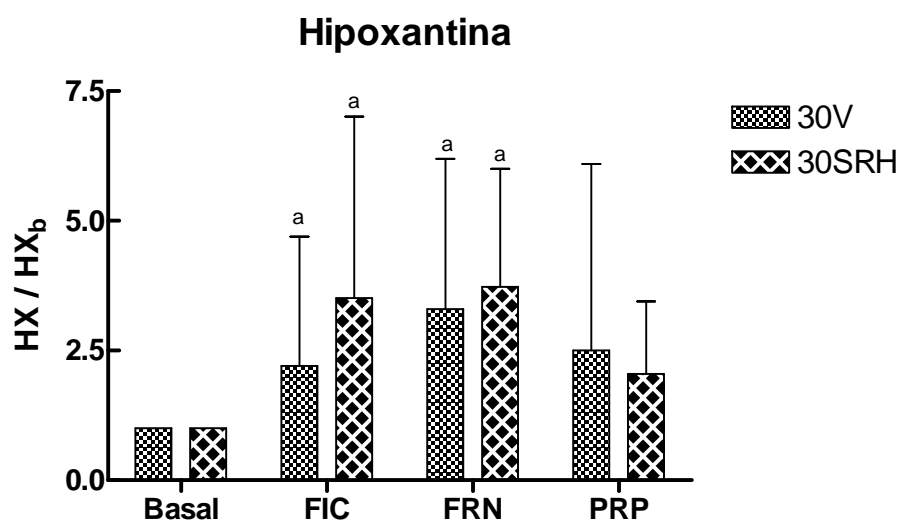


Figura 56. Hipoxantina: cada resultado se ha dividido por el valor basal y se ha expresado como fracción de unidad en media \pm desviación estándar. Se determinaron tras 60 min de isquemia caliente (FIC), al final de la recirculación normotérmica (FRN) y 60 min post-reperusión (PRP) **a**: $p \leq 0,05$ intra-grupo *vs* basal. Sin diferencias inter-grupos.

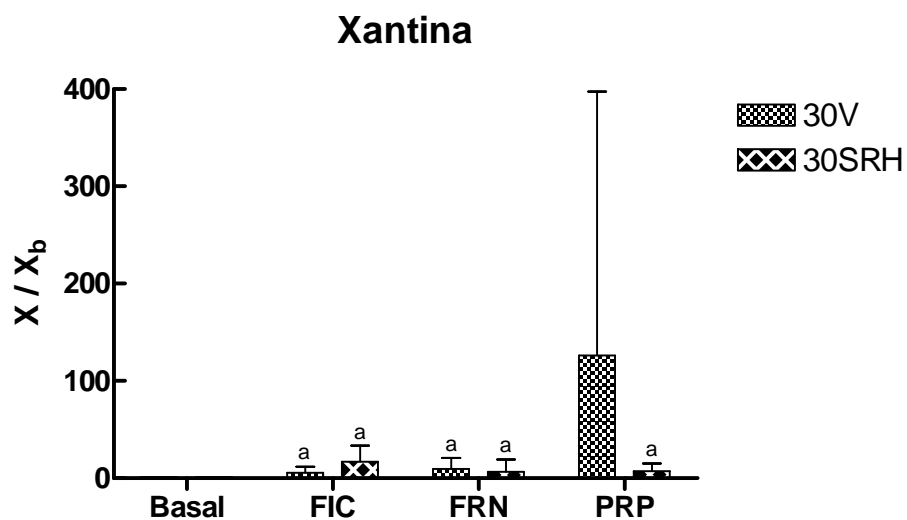


Figura 57. Xantina: cada resultado se ha dividido por el valor basal y se ha expresado como fracción de unidad en media \pm desviación estándar. Se determinaron tras 60 min de isquemia caliente (FIC), al final de la recirculación normotérmica (FRN) y 60 min post-reperusión (PRP) **a:** $p \leq 0,05$ intra-grupo *vs* basal. Sin diferencias inter-grupos.

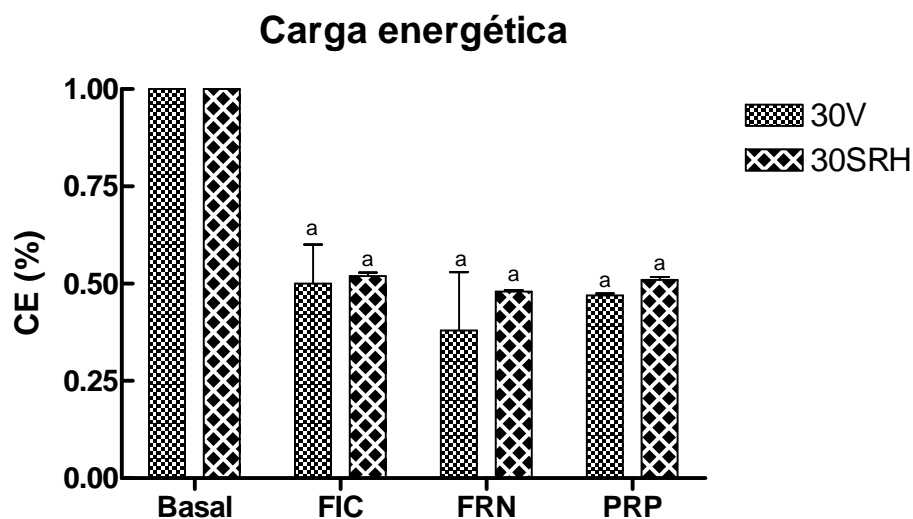


Figura 58. Carga energética: cada resultado se ha dividido por el valor basal y se ha expresado como fracción de unidad en media \pm desviación estándar. Se determinaron tras 60 min de isquemia caliente (FIC), al final de la recirculación normotérmica (FRN) y 60 min post-reperusión (PRP) **a:** $p \leq 0,05$ intra-grupo *vs* basal. Sin diferencias inter-grupos.

4.3.8. Histología

4.3.8.1. Endotelitis

Se establecieron dos categorías: 0= ausencia; 1= presencia de endotelitis.

Endotelitis	30V	30SRH
0	1	3
1	6	3
Total	n=7	n=6

Tabla 66

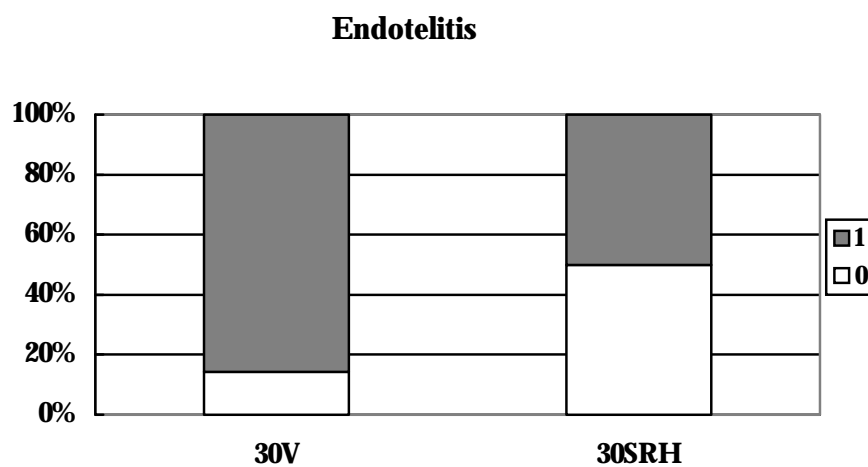


Figura 59

En el grupo 30V se halló endotelitis en el 85% de los casos y en el grupo 30SRH en el 50% de los casos. No se hallaron diferencias significativas entre los grupos.

4.3.8.2. Dilatación sinusoidal

Se establecieron cuatro categorías: 0= ausencia, 1= leve, 2= moderada y 3= severa.

Dilatación Sinusoidal	30V	30SRH
0	0	1
1	4	2
2	2	3
3	1	0
Total	n=7	n=6

Tabla 67

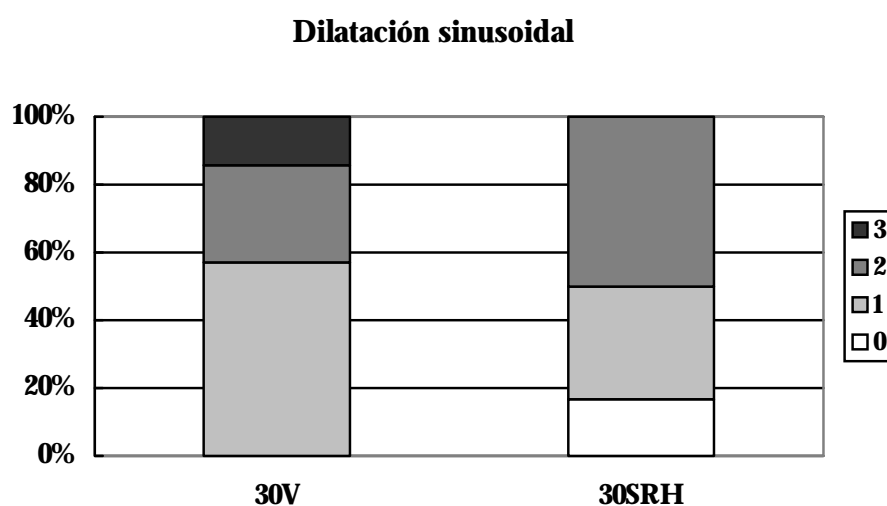


Figura 60

El grupo 30SRH presentó una lesión de menor intensidad que el grupo 30V, ya que el 16% de las biopsias no presentaron dilatación sinusoidal, el 33% mostró dilatación de grado 1 y el 50% restante mostró dilatación de grado 2. No se halló ningún caso con dilatación de grado 3. El grupo 30V no mostró ningún caso con ausencia de lesión, presentó dilatación de tipo 1 en un 57% de las biopsias, un 28% de grado 2 y un 14% de grado 3. No se hallaron diferencias significativas entre los grupos.

4.3.8.3. Infiltración leucocitaria sinusoidal

Se definieron tres categorías para valorar la infiltración por polimorfonucleares y linfocitos a nivel sinusoidal: 1= leve, 2= moderada y 3= severa.

PMN Linf	30V	30SRH
1	4	4
2	1	1
3	2	1
Total	n=7	n=6

Tabla 68

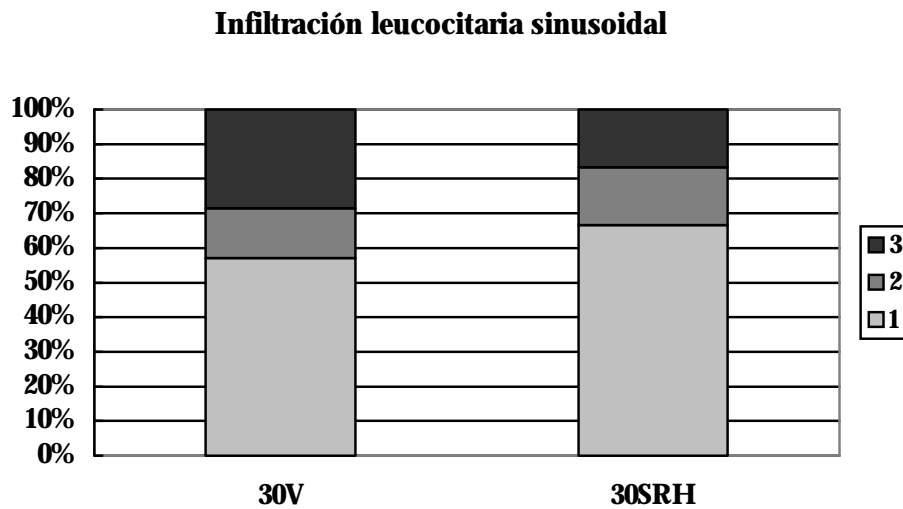


Figura 61

El grupo 30SRH mostró una proporción de lesión leve de tipo 1 superior al grupo 30V (66% frente a un 57%), y menor proporción de lesión grave de tipo 3 que el grupo 30V (28% frente a un 16%). No se hallaron diferencias significativas entre los grupos.

4.3.8.4. Infarto

Se establecieron dos categorías: 0=ausencia; 1= presencia.

Infarto	30V	30SRH
0	5	6
1	2	0
Total	n=7	n=6

Tabla 69

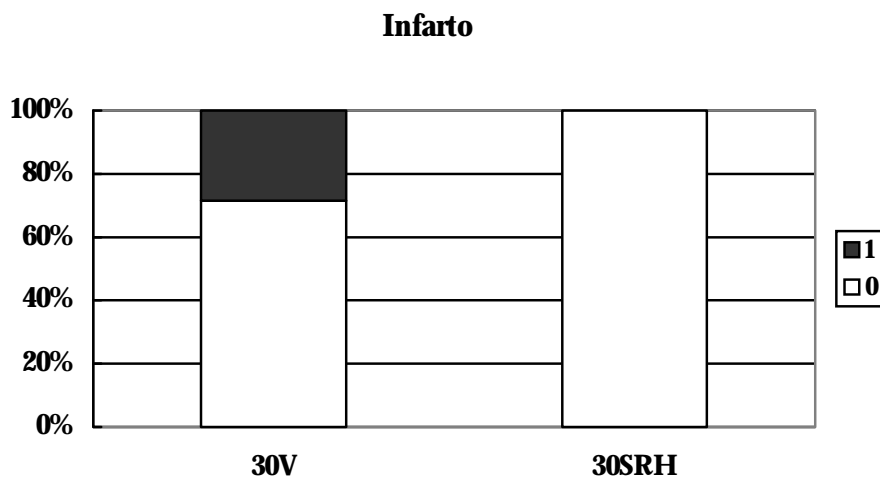


Figura 61

El grupo 30V mostró infarto en un 30% de los casos, a diferencia del grupo 30 NF en el que no se detectó en ninguna de las biopsias analizadas. No obstante, no se hallaron diferencias significativas entre ellos.

4.3.8.5. Disociación hepatocitaria

Se establecieron cuatro categorías: 0= ausencia, 1= leve, 2= moderada y 3= severa.

Disociación	30V	30SRH
0	2	4
1	2	1
2	2	1
3	1	0
Total	n=7	n=6

Tabla 70

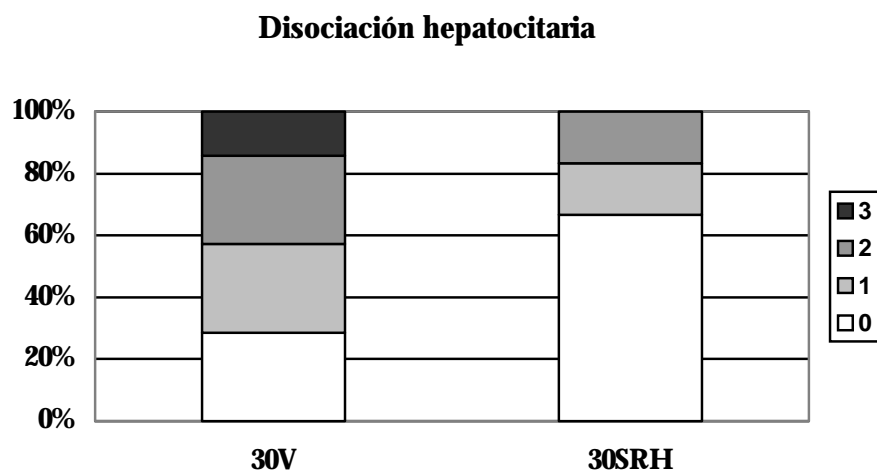


Figura 63

La disociación hepatocitaria mostró un patrón heterogéneo en el grupo 30V ya que se encontraron todas las categorías de lesión. En el grupo 30SRH, en cambio, se halló ausencia de disociación en el 66% de las biopsias, se encontró lesión de tipo 1 en el 16,6% de las biopsias y de tipo 2 en el 16,6% restante, aunque no se observaron diferencias entre los grupos.

4.3.8.6. Necrosis isquémica centrolobulillar

Se establecieron 2 categorías que valoraron el porcentaje de necrosis isquémica como categoría 1 \leq 50% y categoría 2 $>$ 51%.

Necrosis	30V	30SRH
1	6	5
2	1	1
Total	n=7	n=6

Tabla 71

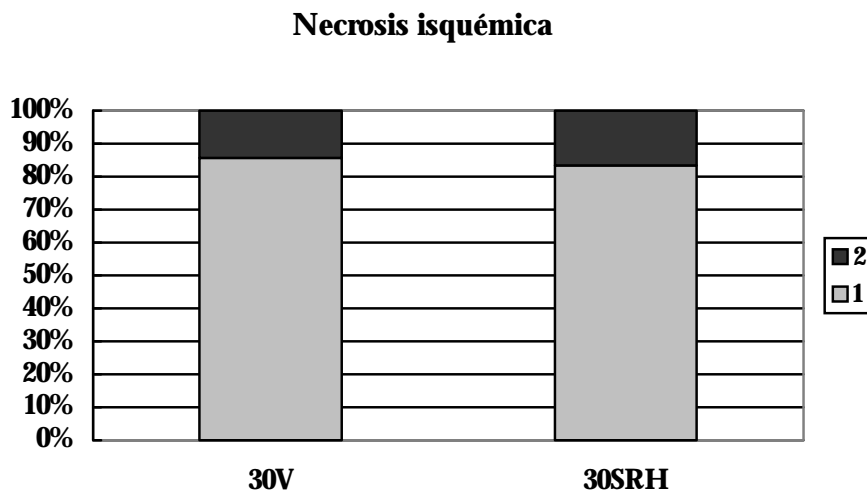


Figura 64

El grupo 30V presentó en el 14% de las biopsias una necrosis superior al 50%. En el grupo 30SRH la necrosis de tipo 2 se observó en el 16,6% de los casos. No se hallaron diferencias significativas entre los grupos.

4.3.8.7. Área necrótica media

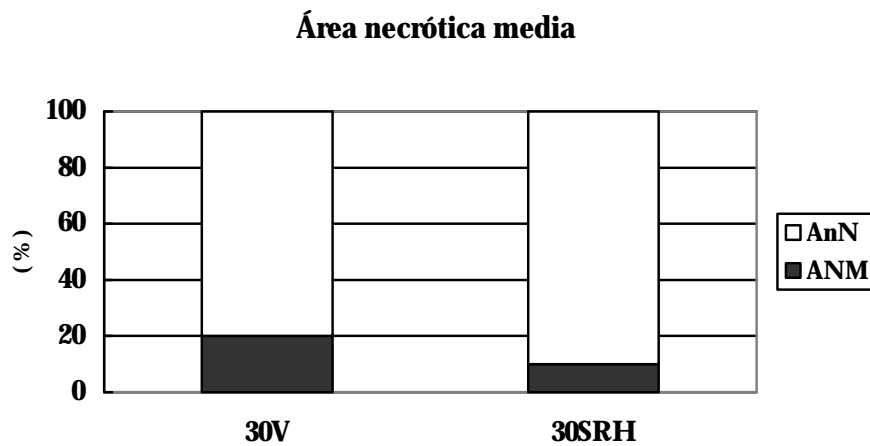


Figura 65. En la figura se representa en color oscuro el porcentaje del área necrótica media (ANM) frente al área no necrótica (AnN) en color claro.

El grupo 30V presentó un 20% de área necrótica, mientras que el grupo 30SRH mostró una proporción del 10%. No se hallaron diferencias significativas entre ambos grupos.

4.3.8.8. Colangitis isquémica

Se establecieron 2 categorías: 0= ausencia; 1= presencia.

Colangitis	30V	30SRH
0	3	2
1	4	4
Total	n=7	n=6

Tabla 72

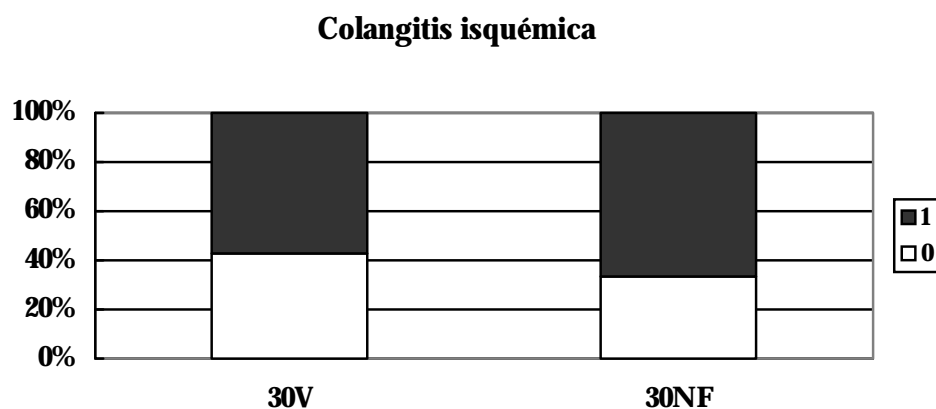


Figura 66

Tras 60 minutos de isquemia caliente se observó ausencia de colangitis isquémica en el 42% de los casos del grupo 30V. En el grupo 30SRH, la ausencia de colangitis isquémica se dio en el 33% de los casos. No hubo diferencias significativas entre ellos.

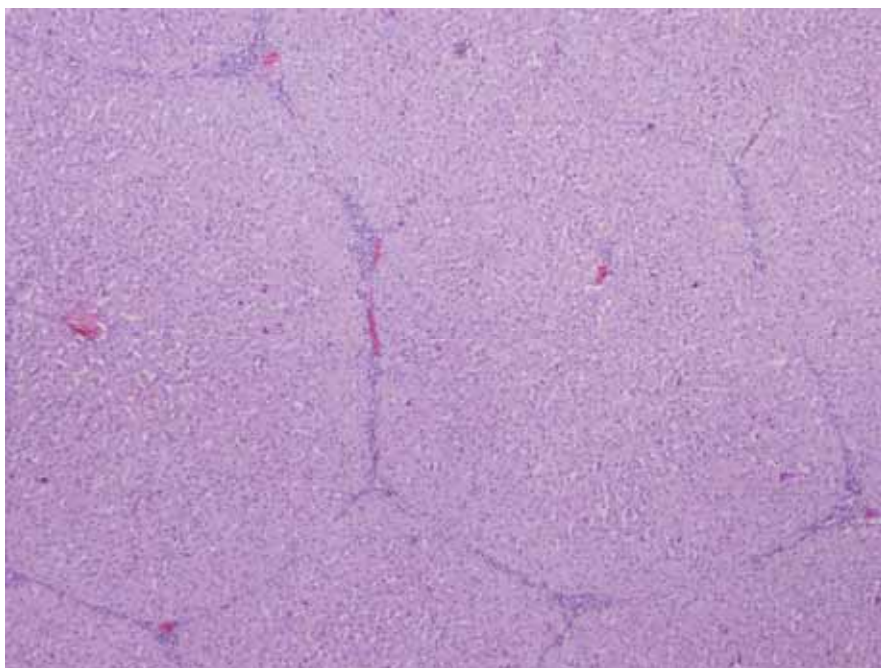


Foto 16. Grupo 30SRH. A pequeño aumento (40x) en una tinción de Hematoxilina/Eosina puede verse la arquitectura hepática completamente preservada.

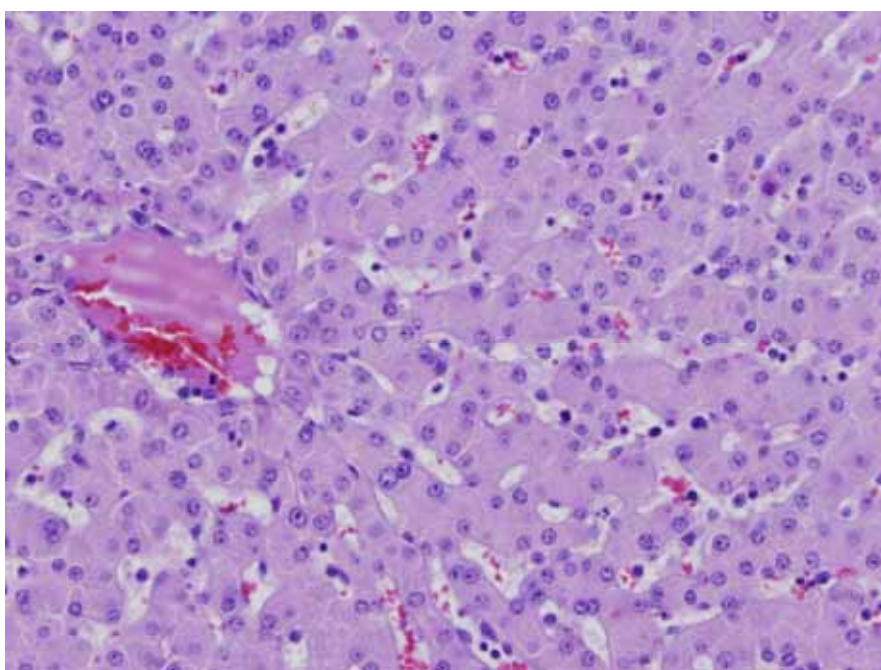


Foto 17. Grupo 30SRH. A gran aumento (200x) en una tinción de Hematoxilina/Eosina se observan las trabéculas hepáticas y la preservación de la vena centrolobulillar sin endotelitis, ni necrosis hepatocelular. Tampoco se observa dilatación sinusoidal significativa.

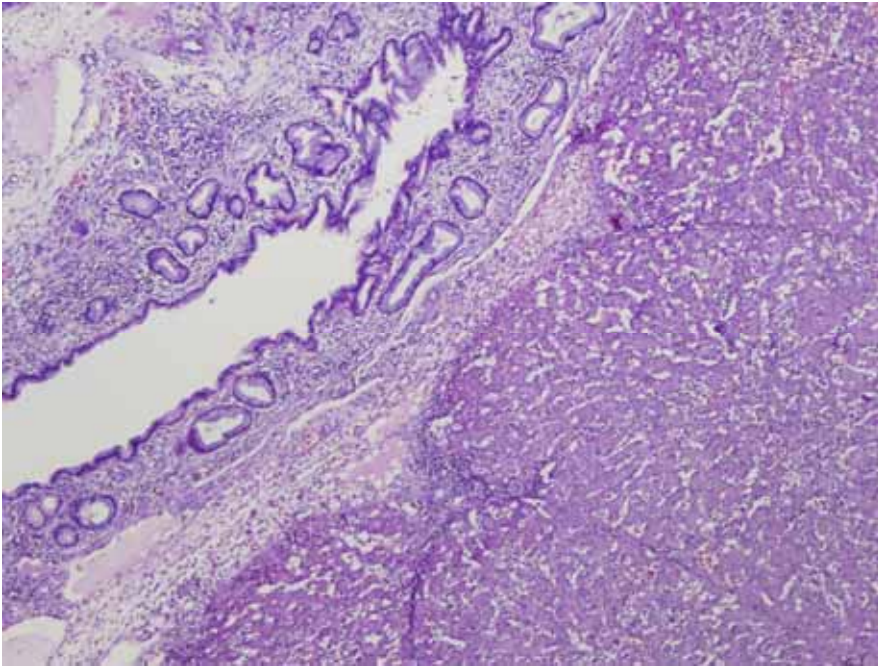


Foto 18. Grupo 30SRH. A pequeño aumento (40x) en una tinción de Hematoxilina/Eosina puede verse la vía biliar hiliar, sin fenómenos de colangitis isquémica.

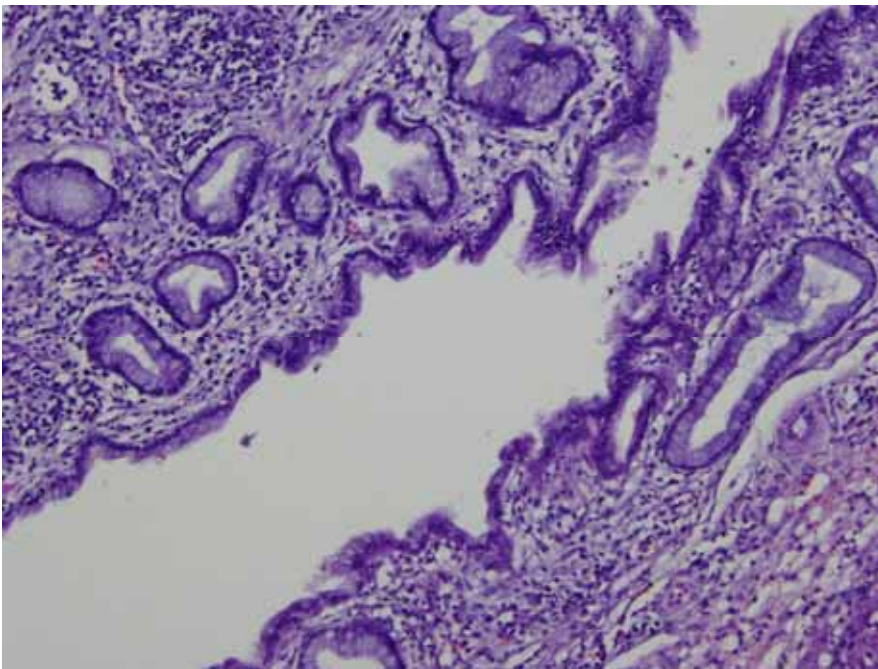


Foto 19. Grupo 30SRH. A gran aumento (200x) en una tinción de Hematoxilina/Eosina se muestra la preservación del epitelio biliar sin interrupción, ni necrosis.

4.4. Adición de Dobutamina Durante la Recirculación

4.4.1. Morfometría

Grupo	n	SC (m ²)	Peso (Kg)
30V	10	1,01 ± 0,007	28,6 ± 3,2
30DBT	8	1,04 ± 0,008	29,5 ± 3,4

Tabla 73. Características morfométricas de los animales de estudio. Grupo 30V: grupo control. Grupo 30DBT: grupo con adición de dobutamina durante la recirculación. **n**: casos por grupo, SC: superficie corporal en metros cuadrados (m²). Peso en kilogramos (Kg). Resultados en media ± desviación estándar.

4.4.2. Supervivencia

Grupos	n	Vivos/Muertos	Supervivencia (%)
30V	10	8/2	80
30DBT	8	5/3	62,5

Tabla 74. Se muestra la supervivencia al quinto día postrasplante en los grupos de estudio. **n**: casos por grupo. Vivos/Muertos: casos supervivientes y casos no supervivientes al quinto día postrasplante. Supervivencia: porcentaje (%) de casos supervivientes respecto al total de casos por grupo de estudio.

4.4.3. Flujo de Bomba y Hemodinámica Hepática Durante la Recirculación

4.4.3.1. Flujo de bomba

Grupo	n	F Bomba 5 min RN	F Bomba 15 min RN	F Bomba 30 min RN	F Bomba FRH
30V	10	2,70 ± 0,53	3,25 ± 1,04♦	2,39 ± 0,70♦	1,66 ± 0,23 ♦
30DBT	8	2,28 ± 0,40	2,75 ± 0,29♦	2,12 ± 0,25	1,74 ± 0,63♦

Tabla 75. Flujo de bomba a los 5, 15 y 30 min de recirculación normotérmica (RN) y al final de la recirculación hipotérmica (FRH), en media ± desviación estándar (L./min/m²). ♦ p ≤ 0,05 intra-grupo. n: casos por grupo.

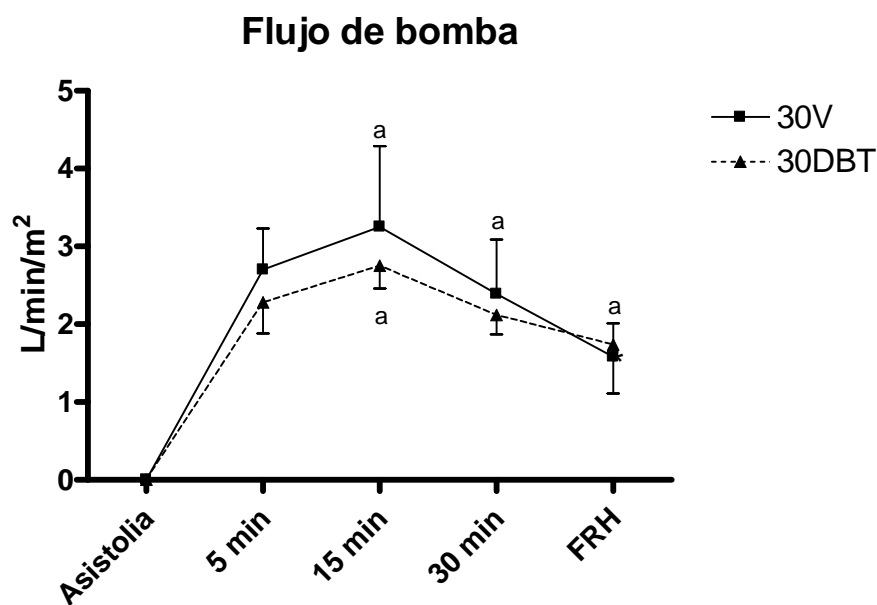


Figura 67. Flujo de bomba, iniciado tras 60 min de asistolia, a los 5, 15 y 30 min de recirculación normotérmica y al final de la recirculación hipotérmica (FRH) en L./min/m². a: p ≤ 0,05 intra-grupo. El flujo de bomba más alto se obtuvo a los 15 min de RN para ambos grupos de estudio y el más bajo al final de la RH respecto al obtenido en el minuto 15, también en ambos grupos. No se hallaron diferencias significativas intergrupos.

4.4.3.2. Fluidoterapia y tiempo de enfriamiento

Grupo	n	Volumen RN	Volumen RH	Tiempo FRH
30V	10	120 ± 209,7	455 ± 172,3♦	17,10 ± 5,11
30DBT	8	87,5 ± 121,7	381,2 ± 232,9♦	20,00 ± 2,93

Tabla 76. Fluidoterapia añadida durante la recirculación normotérmica (Volumen RN) e hipotérmica (Volumen RH) en mL. Tiempo FRH: tiempo utilizado hasta la obtención de 15°C en la superficie hepática o final de la recirculación hipotérmica, en minutos. Resultados en media ± desviación estándar. **n**: casos por grupo. ♦ p≤ 0,05 intra-grupo Volumen RN vs Volumen RH.

La comparación intra-grupo halló que el volumen añadido durante la RH fue significativamente superior al utilizado durante la RN para el grupo 30V (Z= -2,58; p=0,01) y el grupo 30DBT (Z= -1,97; p=0,049). La comparación inter-grupo no mostró diferencias.

4.4.3.3. Flujo arterial hepático

Grupo	n	FAH Basal	FAH 5 min RN	FAH 15 min RN	FAH 30 min RN	FAH FRH
30V	10	176,5 ± 80,7	159,6 ± 66,5	176,0 ± 72,5	156,3 ± 93,6	132,1 ± 75,3
30DBT	8	137,6 ± 36,2	149,3 ± 49,7	161,0 ± 57,5	140,9 ± 55,0	133,0 ± 103,4

Tabla 77. Flujo arterial hepático (FAH) basal, a los 5, 15 y 30 min de recirculación normotérmica (RN) y al final de la recirculación hipotérmica, en media ± desviación estándar (mL/min/m²). **n**: casos por grupo.

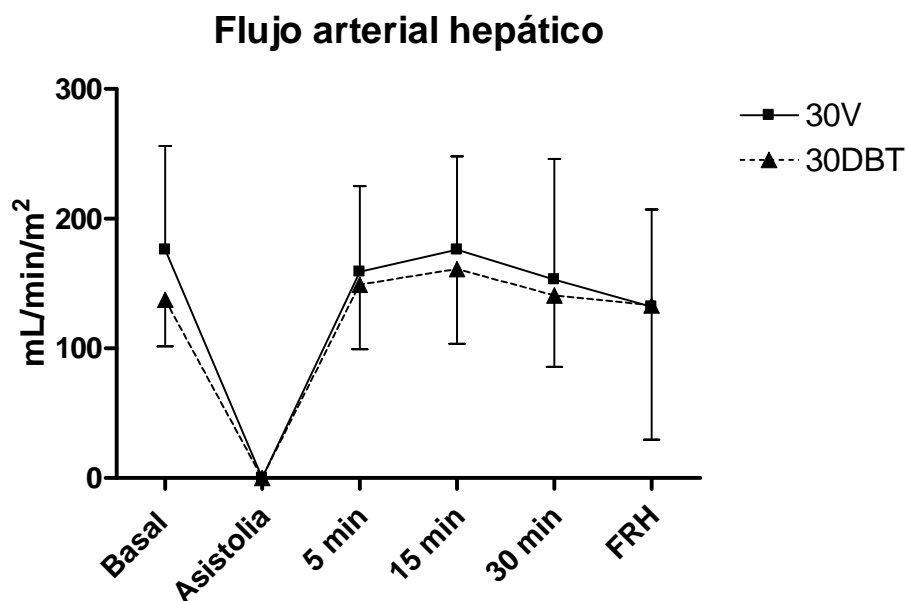


Figura 68. Flujo arterial hepático (mL/min/m²) basal, tras la asistolia, a los 5, 15 y 30 min de recirculación normotérmica y al final de la recirculación hipotérmica (FRH).

Los valores del flujo arterial hepático se muestran en la Tabla 76. Los grupos no mostraron diferencias intra-grupos ni inter-grupos. Ambos grupos mostraron un perfil similar en la evolución del flujo arterial hepático durante todos los tiempos de estudio. (Figura 68).

4.4.3.4. Flujo Portal

Grupo	n	FP Basal	FP 5 min RN	FP 15 min RN	FP 30 min RN	FP FRH
30V	10	639,1 ± 138,6	242,5 ± 108,9♦	287,2 ± 169,4♦	327,3 ± 212,6♦	231,9 ± 133,6♦
30DBT	8	576,4 ± 240,3	380,8 ± 211,0	538,8 ± 291,3	450,0 ± 202,8	373,0 ± 203,6

Tabla 78. Flujo portal (FP): basal, a los 5, 15 y 30 min de recirculación normotérmica (RN) y al final de la recirculación hipotérmica, en media ± desviación estándar (mL/min/m²). ♦ p ≤ 0,05 intra-grupo vs basal. n: casos por grupo.

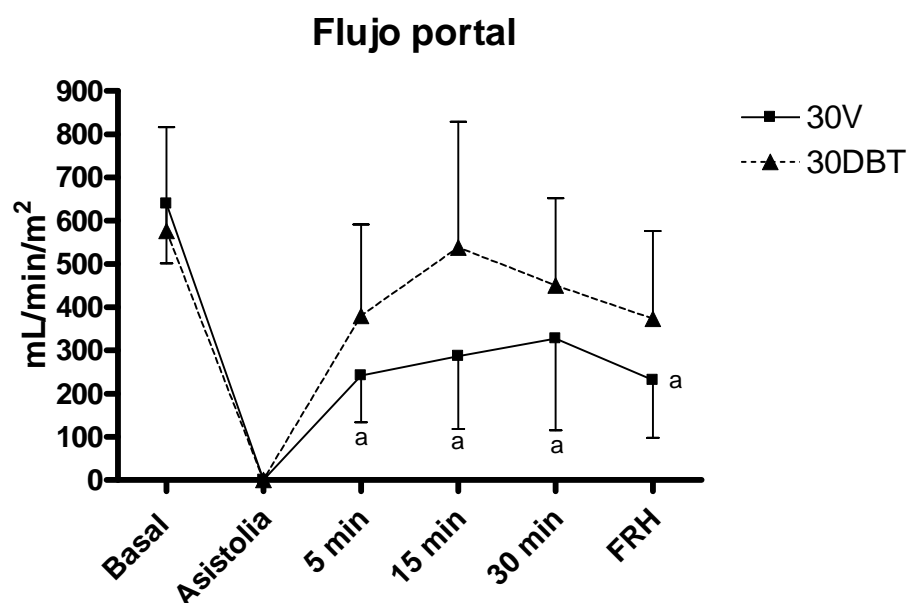


Figura 69. Flujo portal basal, tras la asistolia, a los 5, 15 y 30 min de recirculación normotérmica y al final de la recirculación hipotérmica (FRH), en media \pm desviación estándar (mL/min/m²). **a:** $p \leq 0,05$ intra-grupo *vs* basal. Solo el grupo 30V mostró valores significativamente inferiores al basal. No se hallaron diferencias en la comparación inter-grupos.

4.4.3.5. Flujo hepático total

Grupo	n	FHT Basal	FHT 5 min RN	FHT 15 min RN	FHT 30 min RN	FP FRH
30V	10	815,6 \pm 150,5	402,1 \pm 115,6 \blacklozenge	463,3 \pm 169,9 \blacklozenge	483,7 \pm 244,6 \blacklozenge	363,9 \pm 148,1 \blacklozenge
30DBT	8	714,1 \pm 150,5	530,1 \pm 220,2	673,3 \pm 314,2	599,8 \pm 233,2	500,2 \pm 279,3

Tabla 79. Flujo hepático total (FHT) basal, tras la asistolia, a los 5, 15 y 30 min de recirculación normotérmica y al final de la recirculación hipotérmica (FRH), en media \pm desviación estándar (mL/min/m²). \blacklozenge $p \leq 0,05$ intra-grupo *vs* basal. **n:** casos por grupo.

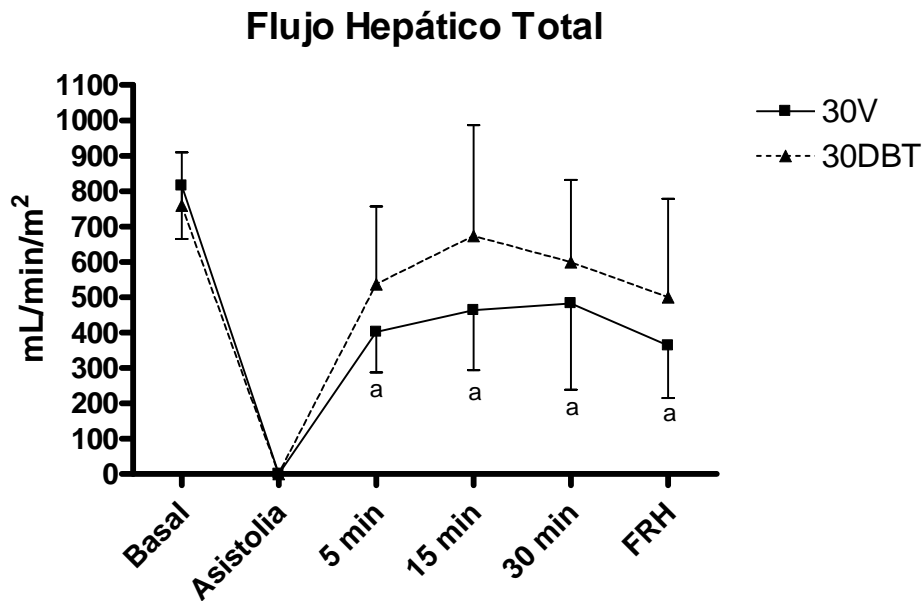


Figura 70. Flujo hepático total basal, tras la asistolia, a los 5, 15 y 30 min de recirculación normotérmica y al final de la recirculación hipotérmica (FRH), en media \pm desviación estándar (mL/min/m²) **a:** $p \leq 0,05$ intra-grupo *vs* basal.

El flujo hepático total descendió tras la asistolia significativamente respecto al basal solo en 30V (Tabla 77 y Figura 70). Durante la RN el flujo portal no alcanzó los valores basales en ninguno de los tiempos estudiados ($p < 0,05$). En 30DBT la evolución en el tiempo fue similar a la del grupo 30V pero no se hallaron diferencias significativas en la comparación intra-grupo. Tampoco se hallaron diferencias significativas en la comparación inter-grupos.

4.4.4. Metabolismo hepático de oxígeno

4.4.4.1. Contenido de oxígeno de arteria hepática, vena porta y vena suprahepática

Grupo	n	CaO ₂ Basal	CaO ₂ 5 min RN	CaO ₂ 15 min RN	CaO ₂ 30 min RN	CaO ₂ FRH
30V	10	12,8 ± 2,1	7,7 ± 0,9 ♦	7,8 ± 1,2 ♦	8,1 ± 1,4	6,6 ± 0,004 ♦
30DBT	8	13,5 ± 1,7	8,5 ± 1,0 ♦	7,7 ± 0,9 ♦	8,1 ± 1,2 ♦	7,6 ± 1,4 ♦

Tabla 80. Contenido de oxígeno arterial (CaO₂): basal, durante la recirculación normotérmica (RN) y al final de la recirculación hipotérmica (FRH) en media ± desviación estándar (mL O₂/100 mL). ♦ p ≤ 0,05 intra-grupo vs basal. n: casos por grupo.

Grupo	n	CpO ₂ Basal	CpO ₂ 5 min RN	CpO ₂ 15 min RN	CpO ₂ 30 min RN	CpO ₂ FRH
30V	10	9,4 ± 1,1	5,4 ± 1,3 ♦	5,8 ± 1,2 ♦	5,5 ± 0,7 ♦	5,6 ± 0,009
30DBT	8	9,6 ± 1,0	5,5 ± 1,4 ♦	5,2 ± 1,4 ♦	5,2 ± 1,1 ♦	6,7 ± 1,4 ♦

Tabla 81. Contenido de oxígeno portal (CpO₂): basal, durante la recirculación normotérmica (RN) y al final de la recirculación hipotérmica (FRH), en media ± desviación estándar (mL O₂/100 mL). ♦ p ≤ 0,05 intra-grupo vs basal. n: casos por grupo.

Grupo	n	CvshO ₂ Basal	CvshO ₂ 5 min RN	CvshO ₂ 15 min RN	CvshO ₂ 30 min RN	CvshO ₂ FRH
30V	10	9,4 ± 1,9	4,2 ± 1,7 ♦	4,7 ± 0,9 ♦	3,5 ± 1,5 ♦	5,0 ± 0,08
30DBT	8	8,1 ± 1,1	3,2 ± 1,1 ♦	3,5 ± 0,9 ♦ ♣	3,2 ± 1,4 ♦	6,2 ± 1,3

Tabla 82. Contenido de oxígeno suprahepático (CvshO₂): basal, durante la recirculación normotérmica (RN) y al final de la recirculación hipotérmica (FRH) en media ± desviación estándar (mL O₂/100 mL). ♦ p ≤ 0,05 intra-grupo vs basal, ♣ p ≤ 0,05 30V vs 30DBT. N: casos por grupo. La comparación inter-grupos mostró que el CvshO₂ fue significativamente inferior en 30DBT respecto a 30V en el minuto 15 de la RN (Z=-2,04; p=0,041).

4.4.4.2. Aporte de oxígeno hepático

Grupo	n	HDO ₂ Basal	HDO ₂ 5 min RN	HDO ₂ 15 min RN	HDO ₂ 30 min RN	HDO ₂ FRH
30V	10	84,4 ± 21,8	25,1 ± 8,2 ♦	30,7 ± 13,0 ♦	30,9 ± 17,3 ♦	22,6 ± 1,6
30DBT	8	75,2 ± 29,4	37,8 ± 17,0 ♦ ♣	38,9 ± 22,5 ♦	34,8 ± 17,2 ♦	33,4 ± 21,6 ♦

Tabla 83. Aporte de oxígeno hepático (HDO₂): basal, durante la recirculación normotérmica (RN) y al final de la recirculación hipodérmica (FRH), en media ± desviación estándar (mL./min./m²). ♦ p ≤ 0,05 intra-grupo vs basal, ♣ p ≤ 0,05 30V vs 30DBT. n: casos por grupo.

El aporte de oxígeno hepático descendió significativamente respecto al basal durante el periodo de RN en ambos grupos (p < 0,05). En la comparación inter-grupos 30DBT obtuvo un valor significativamente superior a 30V en el minuto 5 de la RN (Z = -2,049, p = 0,043).

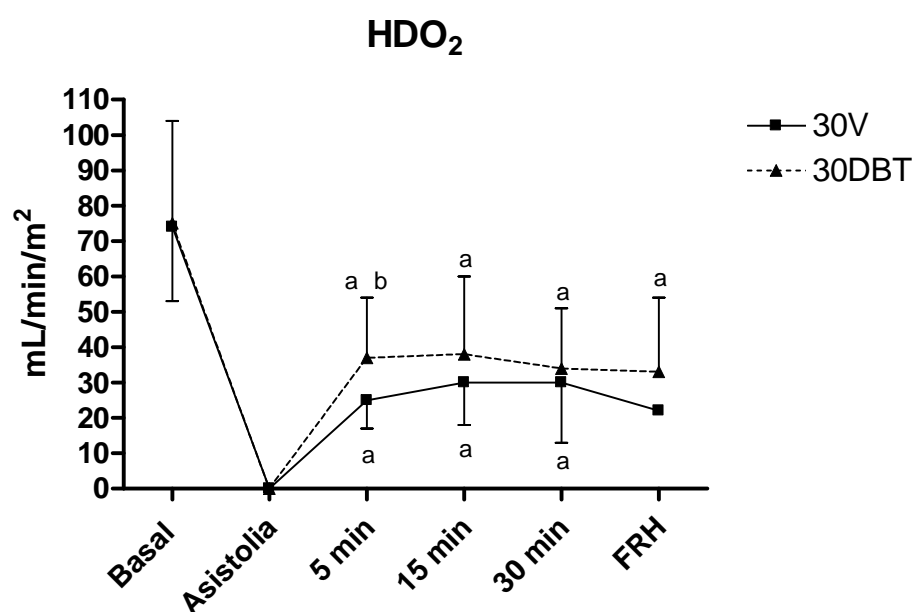


Figura 71. Aporte de oxígeno hepático (HDO₂): basal, tras la asistolia, durante los 30 min de recirculación normotérmica (RN) y al final de la recirculación hipotérmica (FRH), en mL./min./m². a: p ≤ 0,05 intra-grupo vs basal, b: p ≤ 0,05 30V vs 30DBT.

4.4.4.3. Consumo de oxígeno hepático

Grupo	n	HVO ₂ Basal	HVO ₂ 5 min RN	HVO ₂ 15 min RN	HVO ₂ 30 min RN	HVO ₂ FRH
30V	10	12,2 ± 5,5	8,6 ± 5,0	11,7 ± 5,2	13,4 ± 9,8	2,7 ± 0,3
30DBT	8	16,4 ± 10,4	17,5 ± 8,2♣	14,4 ± 10,1	14,8 ± 5,9	3,2 ± 0,9

Tabla 84. Consumo de oxígeno hepático (HVO₂): basal, durante la recirculación normotérmica (RN) y al final de la recirculación hipotérmica (FRH), en media ± desviación estándar (mL./min/m²). ♣ p ≤ 0,05 30V vs 30DBT.

n: casos por grupo.

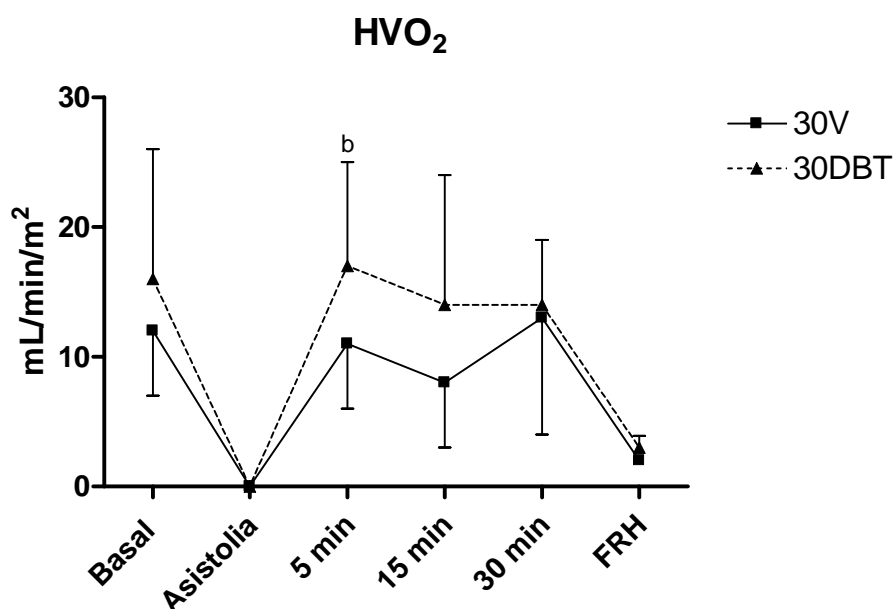


Figura 72. Consumo de Oxígeno Hepático (HVO₂): basal, tras la asistolia, durante los 30 min de recirculación normotérmica (RN) y al final de la recirculación hipotérmica (FRH), en mL./min/m². **b:** p ≤ 0,05 30V vs 30DBT.

El consumo de oxígeno hepático (Tabla 83 y Figura 72) siguió una evolución similar en ambos grupos, recuperando valores similares al basal durante la RN. El grupo 30DBT mostró un incremento significativo del consumo de oxígeno respecto al grupo 30V a los 5 minutos de la RN ($Z = -2,34$; $p = 0,019$).

4.4.3.4. Cociente de extracción hepática de oxígeno

Grupo	n	HO ₂ ER Basal	HO ₂ ER 5 min RN	HO ₂ ER 15 min RN	HO ₂ ER 30 min RN	HO ₂ ER FRH
30V	10	23,0 ± 3,0	35,2 ± 20,7 ♦	28,1 ± 11,2 ♦	44,7 ± 19,0 ♦	12,2 ± 0,7
30DBT	8	22,3 ± 12,4	47,3 ± 12,0 ♦	36,3 ± 9,5	46,2 ± 17,3 ♦	12,0 ± 6,5

Tabla 85. Cociente de extracción hepática de oxígeno (HO₂ER): en media ± desviación estándar en porcentaje (%). ♦ p ≤ intra-grupo 0,05 vs basal. n: casos por grupo.

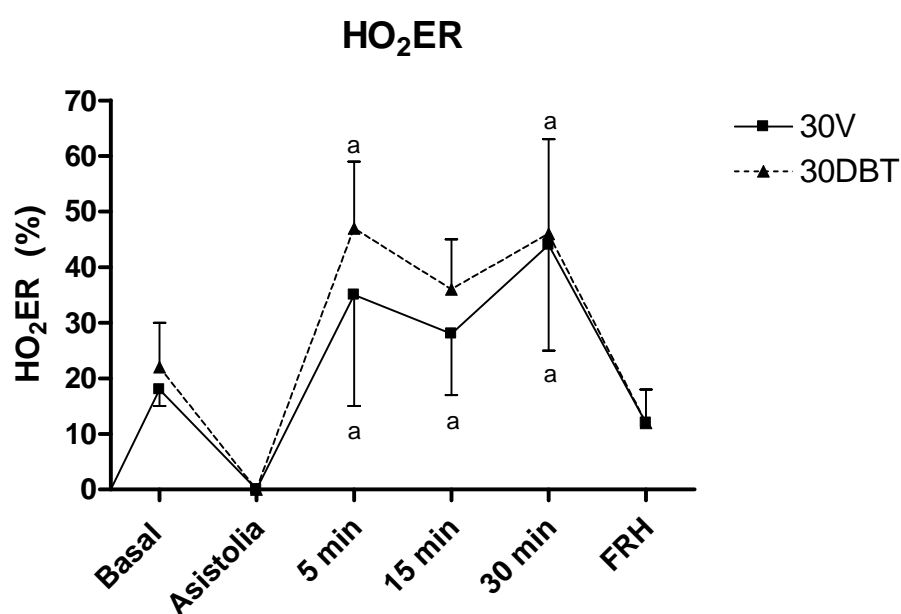


Figura 73. Cociente de extracción hepática de oxígeno (HO₂ER): basal, tras la asistolia, a los 5, 15 y 30 min de recirculación normotérmica y al final de la recirculación hipotérmica (FRH), expresado en porcentaje. a: p ≤ 0,05 intra-grupo vs basal.

4.4.5. Marcadores de Lesión Hepatoceular

4.4.5.1. ASAT

Grupo	ASAT Basal	ASAT FRN (T3)	ASAT PRP (T5)	ASAT 2D (T6)	ASAT 5D (T7)
30V	50 ± 14 n=10	93 ± 85 ♦ n=10	581 ± 329 ♦ n=10	2803 ± 1447 ♦ n=10	669 ± 599 ♦ n=8
30DBT	50 ± 13 n=8	132 ± 75 ♦ n=8	829 ± 807 ♦ n=8	1253 ± 567 ♦ ♣ n=8	255 ± 129 ♦ n=5

Tabla 86. ASAT: basal, al final de la recirculación normotérmica (FRN o T3), 60 min post-reperfusión (PRP o T5), al segundo día (2D o T6) y al quinto día postrasplante (D5 o T7), en media ± desviación estándar (μkat/L).

♦ p ≤ 0,05 intra-grupo vs basal, ♣ p ≤ 0,05 30V vs 30DBT. 5D. n: casos por tiempo de estudio.

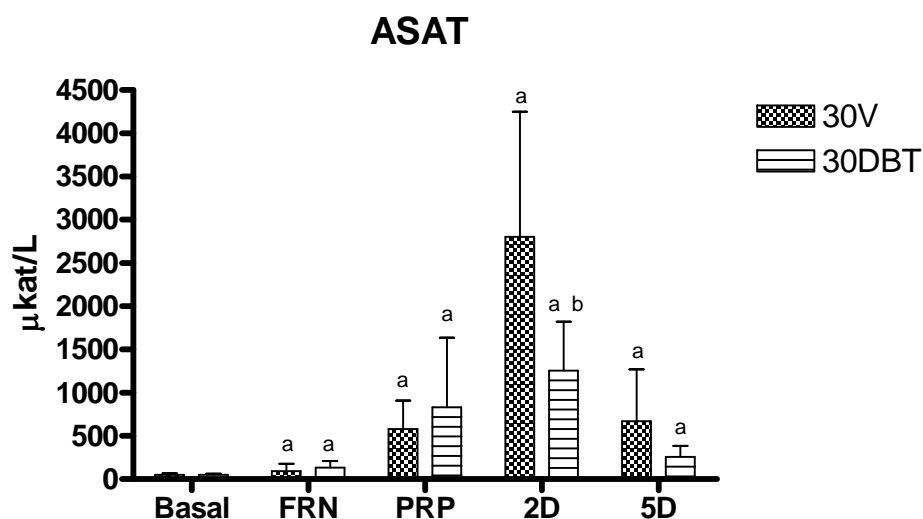


Figura 75. ASAT: basal, al final de la recirculación normotérmica (FRN), 60 min post-reperfusión (PRP), al segundo (2D) y quinto día postrasplante (5D). **a:** p ≤ 0,05 intra-grupo vs basal, **b:** p ≤ 0,05 30V vs 30DBT. El análisis inter-grupos evidenció un descenso significativo de la ASAT en el grupo 30DBT respecto al grupo 30V en 2D (Z=-2,226; p= 0,027).

4.4.5.2. ALAT

Grupo	ALAT Basal	ALAT FRN (T3)	ALAT PRP (T5)	ALAT 2D (T6)	ALAT 5D (T7)
30V	38 ± 10 n=10	29 ± 11 n=10	57 ± 19 ♦ n=10	107 ± 46 ♦ n=10	64 ± 15 n=8
30DBT	34 ± 7 n=8	22 ± 9 n=8	54 ± 36 n=8	64 ± 18 ♦ ♣ n=8	37 ± 12 ♣ n=5

Tabla 87. ALAT: basal, al final de la recirculación normotérmica (FRN o T3), 60 min post-reperusión (PRP o T5), al segundo día (2D o T6) y al quinto día postrasplante (D5 o T7) en media ± desviación estándar (μkat/L).

♦ p ≤ 0,05 intra-grupo vs basal, ♣ p ≤ 0,05 30V vs 30DBT. 5D. n: número de casos en cada tiempo de estudio.

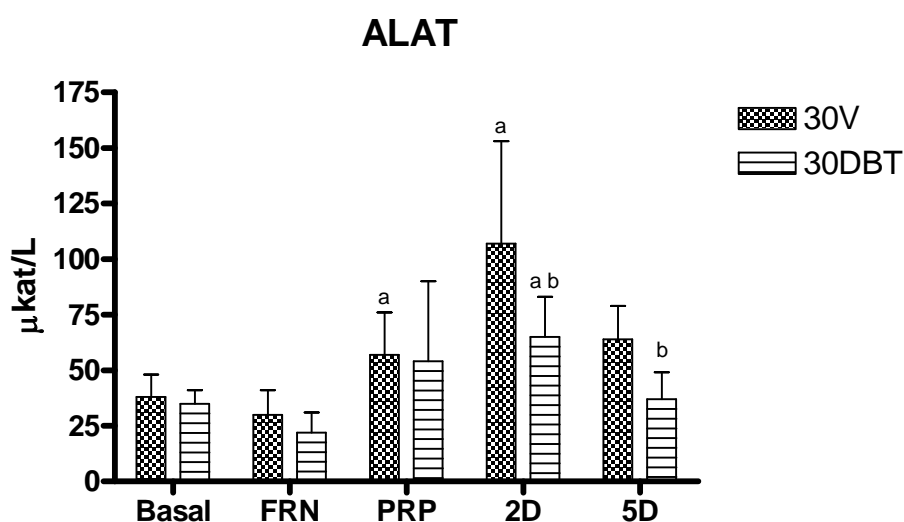


Figura 75. ALAT: basal, al final de la recirculación normotérmica (FRN), 60 min post-reperusión (PRP), al segundo (2D) y quinto día postrasplante (5D). **a:** p ≤ 0,05 intra-grupo vs basal, **b:** p ≤ 0,05 30V vs 30DBT. La concentración de ALAT mostró su valor máximo al segundo día postrasplante. La comparación intra-grupo respecto al basal solo halló diferencias significativas en 30V en T3 y T6. La comparación inter-grupos mostró valores significativamente inferiores en 30DBT respecto a 30V en 2D (Z= -2,226; p=0,026) y en 5D (Z=-2,36; p=0,018).

4.4.6. Marcador de Lesión Endotelial Hepática

Grupo	n	EAH Basal	EAH FRN (T3)	EAH PRP (T5)
30V	10	32,7 ± 10,1	-4,6 ± 19,5♦	-1,0 ± 11,4♦
30DBT	8	29,3 ± 10,2	1,2 ± 7,7♦	12,8 ± 26,6♦

Tabla 88. Extracción hepática de ácido hialurónico (EHAH): basal, al final de la recirculación normotérmica (FRN o T3) y 60 min post-reperfusión (PRP o T5), en media ± desviación estándar. **a:** $p < 0,05$ intra-grupo *vs* basal. N: casos por grupo. **n:** casos por grupo.

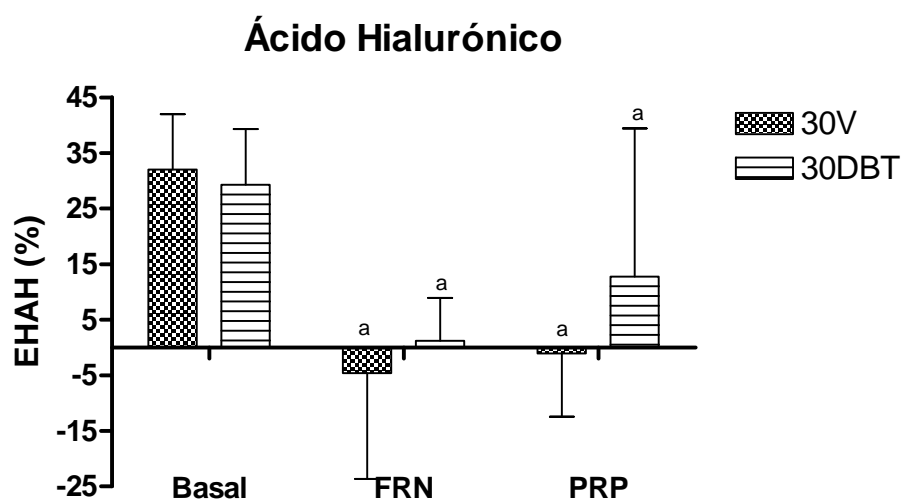


Figura 76. Extracción hepática de ácido hialurónico (EHAH) basal, al final de la recirculación normotérmica (FRN) y 60 min post-reperfusión (PRP), en porcentaje (%). **a:** $p \leq 0,05$ intra-grupo *vs* basal. La extracción hepática de ácido hialurónico (EHAH) presentó valores positivos basales y cada grupo mostró diferencias significativas entre éste y los obtenidos en los tiempos FRN y PRP. ($p=0,000$). En FRN y PRP solo el grupo 30DBT mostró valores positivos. No obstante el análisis inter-grupos no halló diferencias significativas.

4.4.7. Marcadores del estado energético hepático

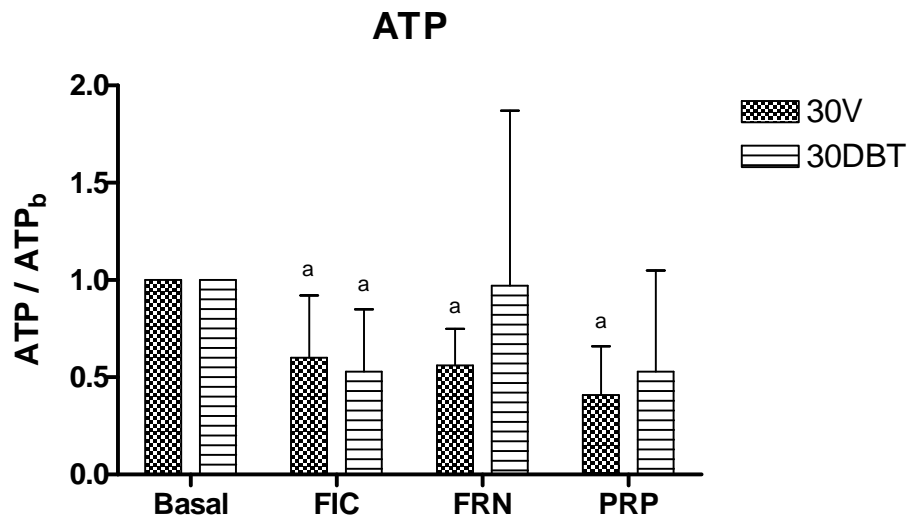


Figura 77. ATP: cada resultado se ha dividido por el valor basal y se ha expresado como fracción de unidad en media \pm desviación estándar. Determinaciones: basal, tras 60 min de isquemia caliente (FIC), tras 30 min de recirculación normotérmica (FRN) y 60 min post-reperusión (PRP). **a:** $p \leq 0,05$ vs basal.

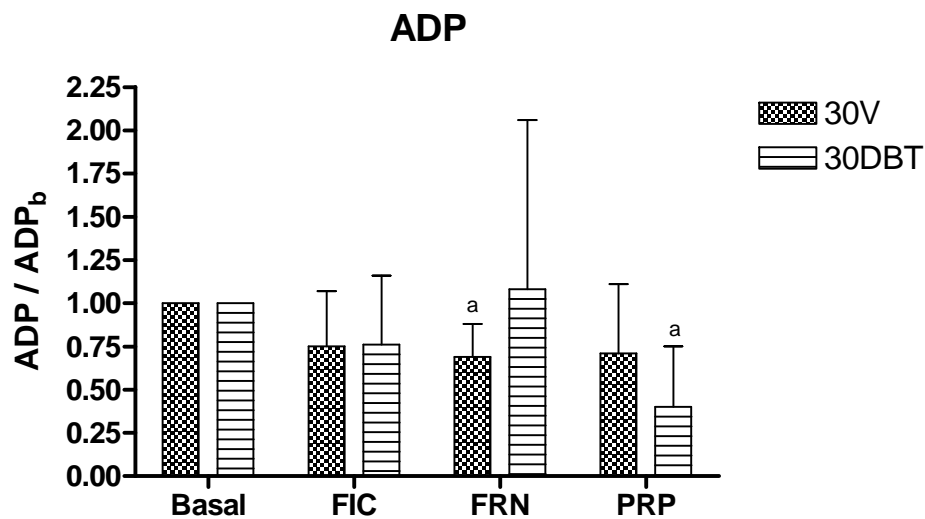


Figura 78. ADP: cada resultado se ha dividido por el valor basal y se ha expresado como fracción de unidad en media \pm desviación estándar. Determinaciones: basal, tras 60 min de isquemia caliente (FIC), tras 60 min de recirculación normotérmica (FRN) y 60 min post-reperusión (PRP). **a:** $p \leq 0,05$ vs basal.

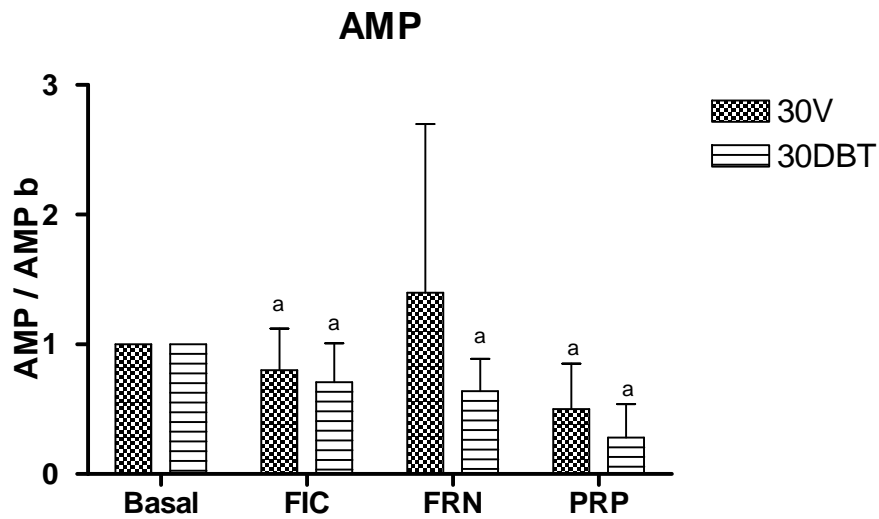


Figura 79. AMP: cada resultado se ha dividido por el valor basal y se ha expresado como fracción de unidad en media \pm desviación estándar. Determinaciones: basal, tras 60 min de isquemia caliente (FIC), tras 30 min de recirculación normotérmica (FRN) y 60 min post-reperusión (PRP). **a:** $p \leq 0,05$ vs basal.

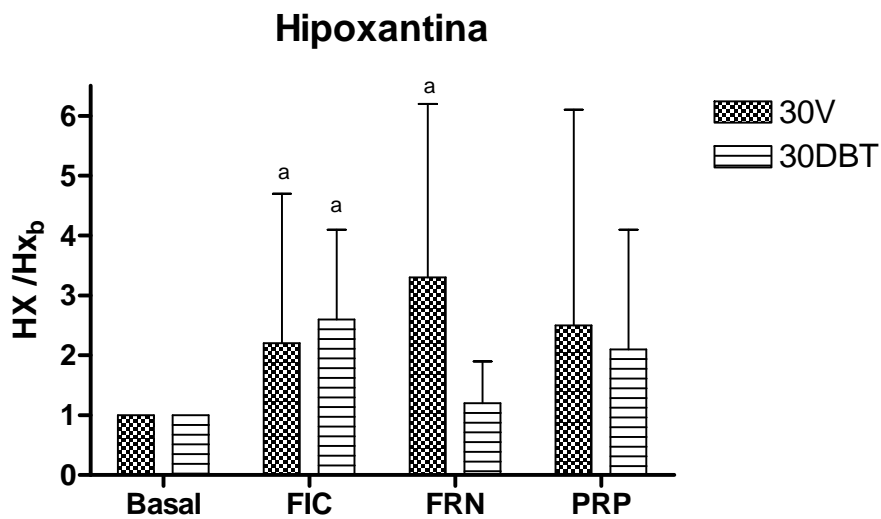


Figura 80. Hipoxantina: cada resultado se ha dividido por el valor basal y se ha expresado como fracción de unidad en media \pm desviación estándar. Determinaciones: basal, tras 60 min de isquemia caliente (FIC), tras 30 min de recirculación normotérmica (FRN) y 60 min post-reperusión (PRP). **a:** $p \leq 0,05$ vs basal.

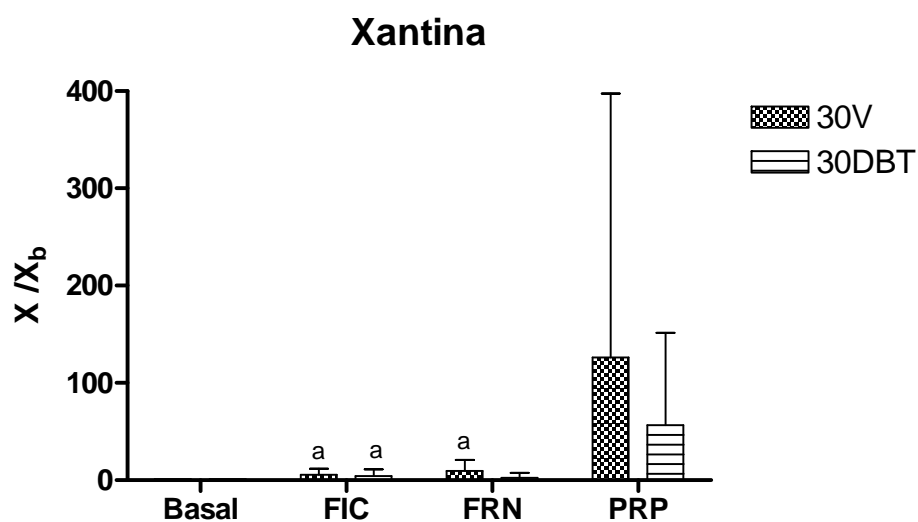


Figura 81. Xantina: cada resultado se ha dividido por el valor basal y se ha expresado como fracción de unidad en media \pm desviación estándar. Determinaciones: basal, tras 60 min de isquemia caliente (FIC), tras 30 min de recirculación normotérmica (FRN) y 60 min post-reperusión (PRP). **a:** $p \leq 0,05$ vs basal.

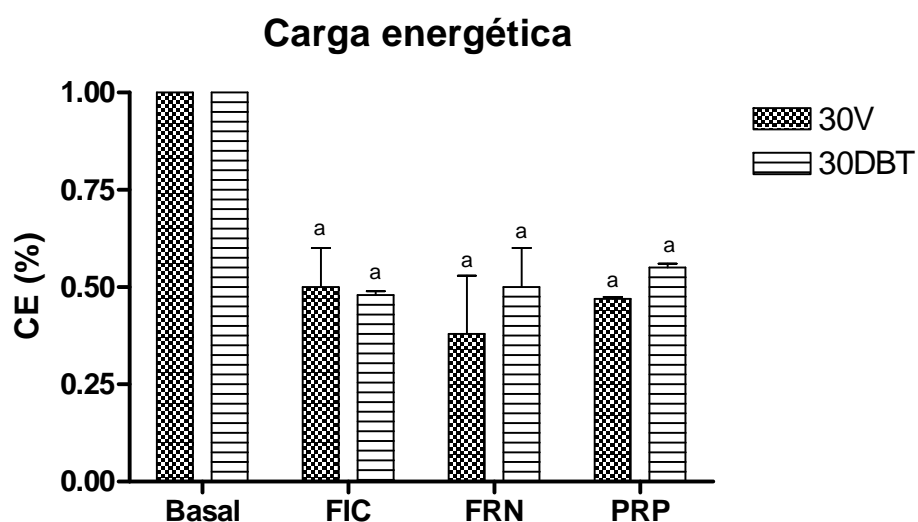


Figura 82. Carga energética: cada resultado se ha dividido por el valor basal y se ha expresado como fracción de unidad en media \pm desviación estándar. Determinaciones: basal, tras 60 min de isquemia caliente (FIC), tras 30 min de recirculación normotérmica (FRN) y 60 min post-reperusión (PRP). **a:** $p \leq 0,05$ vs basal.

4.4.8. Histología

En la tabla se detalla el número de casos correspondiente a cada categoría y en la figura se observa el porcentaje de cada categoría por grupo. En la figura, el color en sigue un degradado ascendente al igual que las categorías.

4.4.8.1. Endotelitis

Se establecieron dos categorías: 0= ausencia y 1= presencia.

Endotelitis	30V	30DBT
0	1	1
1	6	4
Total	n=7	n=5

Tabla 89

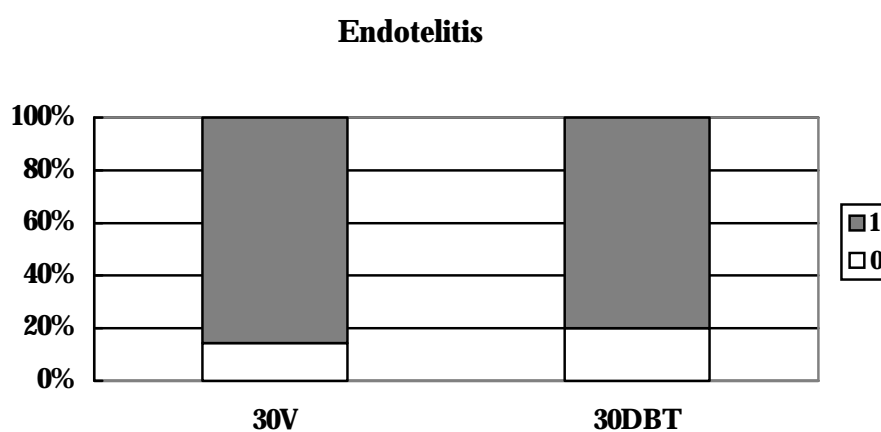


Figura 83

El hallazgo de endotelitis se dio en todas las biopsias analizadas. En el grupo 30V se halló en el 85% de los casos y en el grupo 30DBT en el 20% de los casos. No se hallaron diferencias significativas entre los grupos.

4.4.8.2. Dilatación sinusoidal

Se establecieron cuatro categorías: 0= ausencia, 1= leve, 2= moderada y 3= severa.

Dilatación sinusoidal	30V	30DBT
0	0	4
1	4	0
2	2	1
3	1	0
Total	n=7	n=5

Tabla 90

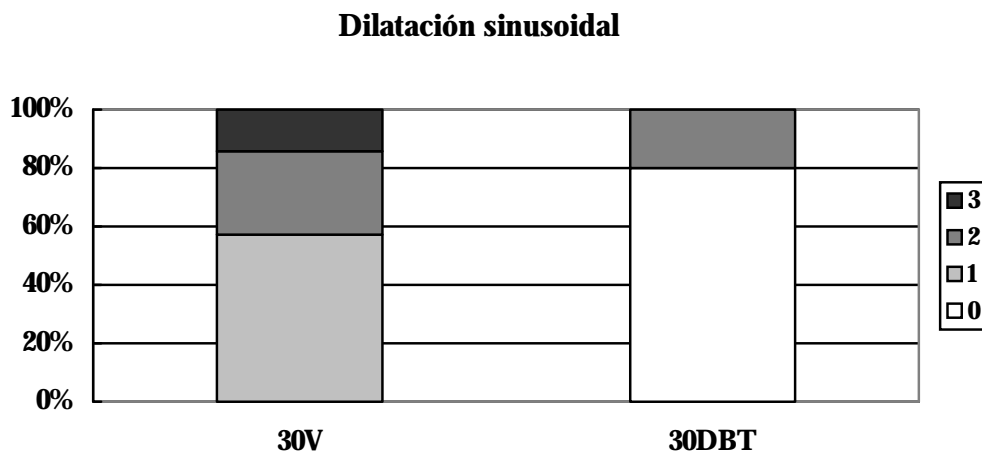


Figura 84

El grupo 30DBT presentó una lesión de menor intensidad que el grupo 30V, ya que el 80% de las biopsias no presentaron dilatación sinusoidal y el 20% restante mostró dilatación de grado 2. El grupo 30V presentó dilatación de tipo 1 en un 57% de las biopsias, de grado 2 en un 28% de y de grado 3 en un 14%. No se hallaron diferencias significativas entre los grupos.

4.4.8.3. Infiltración leucocitaria sinusoidal

Se definen tres categorías según la infiltración por PMN y linfocitos a nivel sinusoidal: 1= leve, 2= moderada y 3= severa.

PMN Linf	30V	30DBT
1	4	1
2	1	3
3	2	1
Total	n=7	n=5

Tabla 91

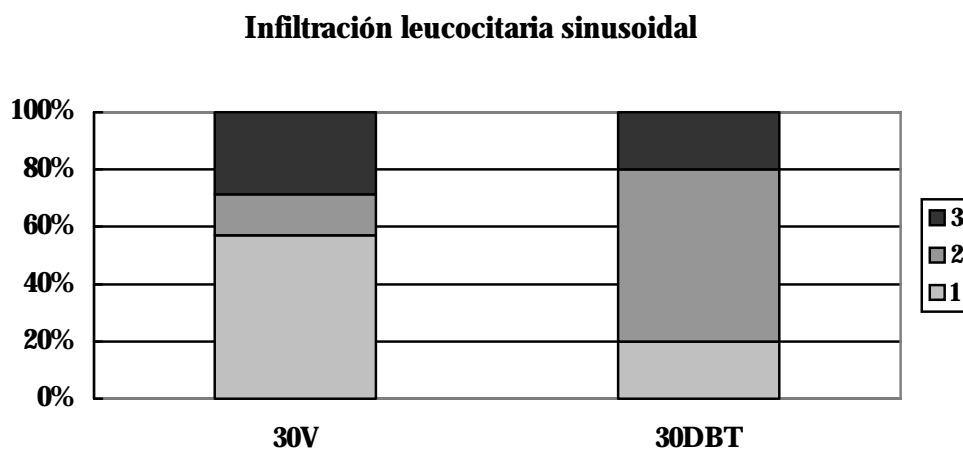


Figura 85

Los resultados mostraron que el grupo 30 V mostró una proporción de lesión leve de del 57%, mientras que en 30DBT la lesión predominante fue la de tipo 2 (60%). No obstante, no se hallaron diferencias entre ambos grupos en la comparación estadística.

4.4.8.4. Infarto

Se establecieron dos categorías: 0=ausencia y 1= presencia.

Infarto	30V	30DBT
0	5	5
1	2	0
Total	n=7	n=5

Tabla 92

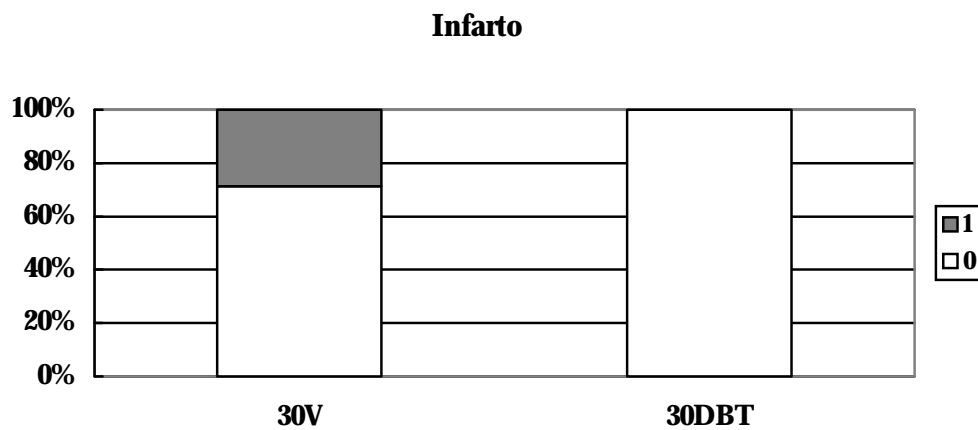


Figura 86

El grupo 30V mostró infarto en un 30% de los casos, a diferencia del grupo 30DBT en el que no se detectó en ninguna de las biopsias analizadas. No obstante, no se hallaron diferencias significativas entre ellos.

4.4.8.5. Disociación hepatocitaria

Se establecieron cuatro categorías: 0= ausencia, 1= leve, 2= moderada y 3= severa.

Disociación	30V	30DBT
0	2	4
1	2	1
2	2	0
3	1	0
Total	n=7	n=5

Tabla 93

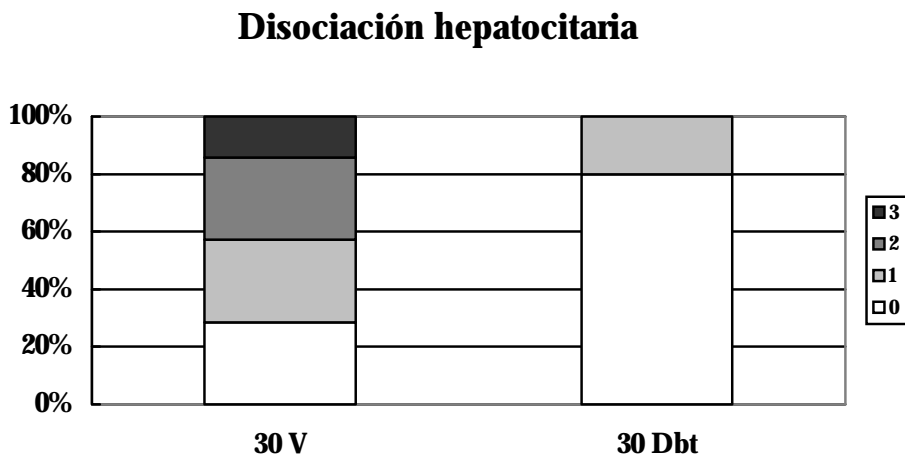


Figura 87

La disociación hepatocitaria mostró un patrón heterogéneo en el grupo 30V ya que se encontraron todas las categorías de lesión. En el grupo 30DBT se halló ausencia de disociación en el 80% de las biopsias y la lesión encontrada en el 20% restante fue de tipo 1, aunque no se observaron diferencias entre los grupos.

4.4.8.6. Necrosis isquémica centrolobulillar

Se establecieron dos categorías respecto al porcentaje de necrosis:: categoría 1 $\leq 50\%$ y categoría 2 $> 51\%$.

Necrosis	30V	30DBT
1	6	5
2	1	0
Total	n=7	n=5

Tabla 94

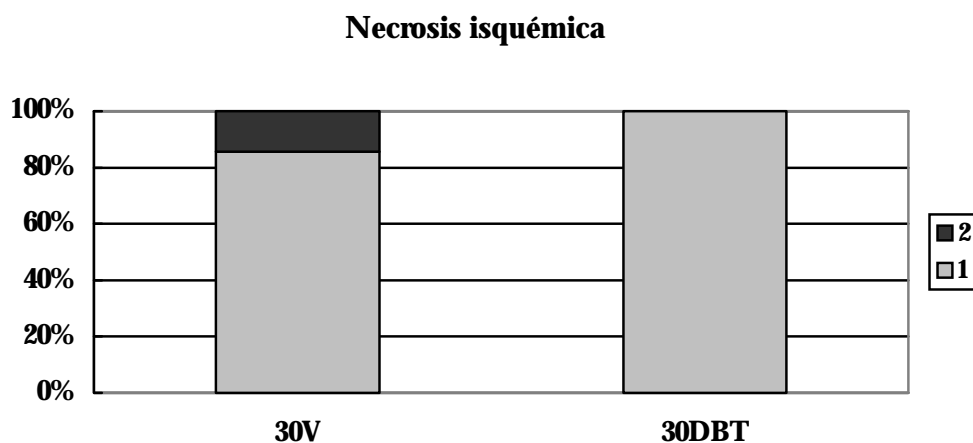


Figura 88

El grupo 30V presentó necrosis isquémica de tipo 2 en el 14% de las biopsias, es decir, el 14% de los casos presentaron en las secciones analizadas una necrosis superior al 50%; en el grupo 30DBT la necrosis hallada fue de tipo 1 en el 100% de los casos. Por lo tanto en el 100% de los casos la necrosis fue inferior al 50% del área analizada, sin hallarse diferencias significativas entre los grupos.

4.4.8.7. Área necrótica media

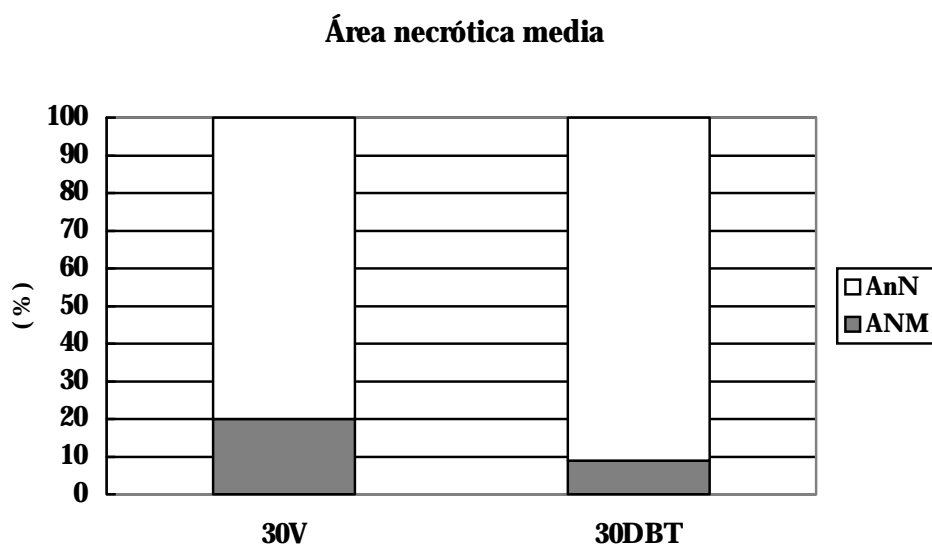


Figura 89. En color oscuro se observa el porcentaje de área necrótica media (ANM) y en color claro el área no necrótica (AnN).

El grupo 30V presentó un 20% de área necrótica, mientras que el grupo 30DBT mostró una proporción del 10%. No se hallaron diferencias significativas entre ambos grupos.

4.4.8.8. Colangitis isquémica

Se establecieron dos categorías: 0= ausencia; 1= presencia.

Colangitis	30V	30DBT
0	3	5
1	4	0
Total	n=7	n=5

Tabla 95

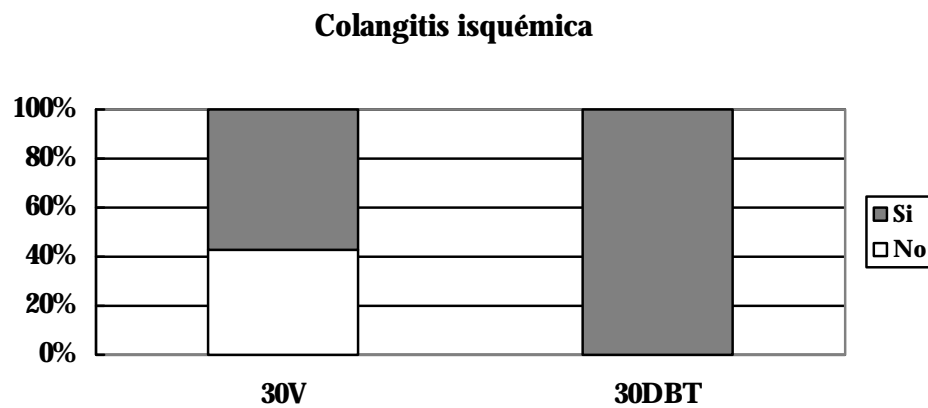


Figura 90

Tras 60 minutos de isquemia caliente se observó presencia de colangitis isquémica en el 60% de los casos del grupo 30V, y en el 100% de los casos del grupo DBT. No hubo diferencias significativas entre ellos.

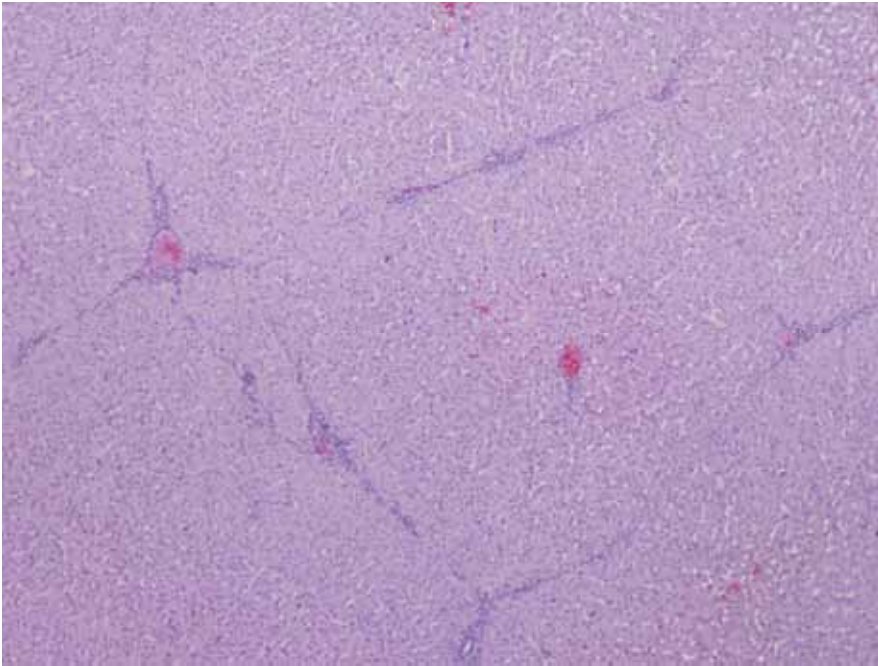


Foto 20. Grupo 30DBT. A pequeño aumento (40x) puede observarse en una tinción de Hematoxilina/Eosina la preservación completa de la estructura del parénquima hepático.

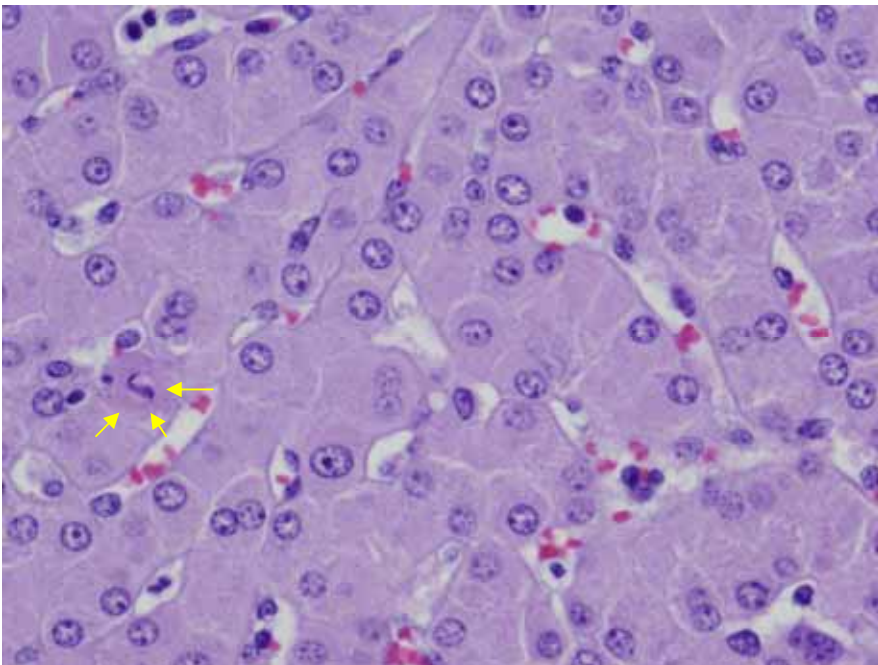


Foto 21. Grupo 30DBT. A gran aumento (400x) se observan las trabéculas hepáticas con mínima alteración de la disposición celular. Las flechas indican una muerte celular por apoptosis.

4.5. Valor Pronóstico del Flujo de Bomba y la Hemodinámica Hepática

Para determinar si el flujo de bomba, de arteria hepática y vena porta podían predecir la viabilidad del injerto hepático durante la RN se analizó el valor promedio obtenido durante la RN en los grupos de flujo variable (30V, 30SRH y 60V; n=26) y se relacionó con la supervivencia al quinto día postrasplante. El grupo 30DBT se excluyó por la posible alteración de la dobutamina sobre la hemodinámica hepática.

4.5.1. Flujo de Bomba, Flujo Arterial y Flujo Portal

Grupo	n	F Bomba Medio	F Arterial Medio	F Portal Medio
Supervivientes	18	2,89 ±0,96 ♦	183,1±89,8 ♦	383, 0± 166 ♦
No supervivientes	8	2,66 ±0,57 ♦	145,7±36,7 ♦	345,5±199,3 ♦

Tabla 96. Flujo de bomba (L/min/m²), flujo arterial hepático y flujo portal (mL/min/m²) en los animales supervivientes y no supervivientes, en media ± desviación estándar. ♦ p≤ 0,05 inter-grupo.

Tanto el flujo de bomba, como el flujo arterial medio (F=74,07, p=0,000, IC 95%: 20,0 - 54,6), como el flujo portal medio (F=9,72; p=0,002; IC 95%: 3,32 - 71,52) obtenido durante toda la RN fue significativamente superior en los animales supervivientes que en los no supervivientes. Para ninguna de las variables estudiadas pudo hallarse un valor pronóstico de la supervivencia. Las curvas ROC mostraron un área bajo la curva algo por encima del 50%, lo que implica que el porcentaje de falsos positivos fue casi similar al de verdaderos positivos.

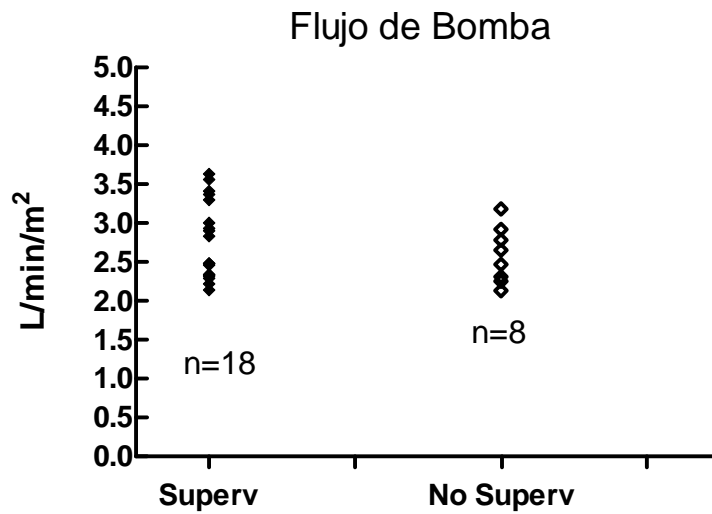


Figura 91. Flujo de bomba medio obtenido durante la RN en los animales supervivientes y no supervivientes. En cada caso se obtuvo un valor promedio único, como la media aritmética de cada uno de los valores del flujo obtenidos durante la RN. La distribución de los valores muestra un solapamiento de los mismos respecto a la supervivencia.

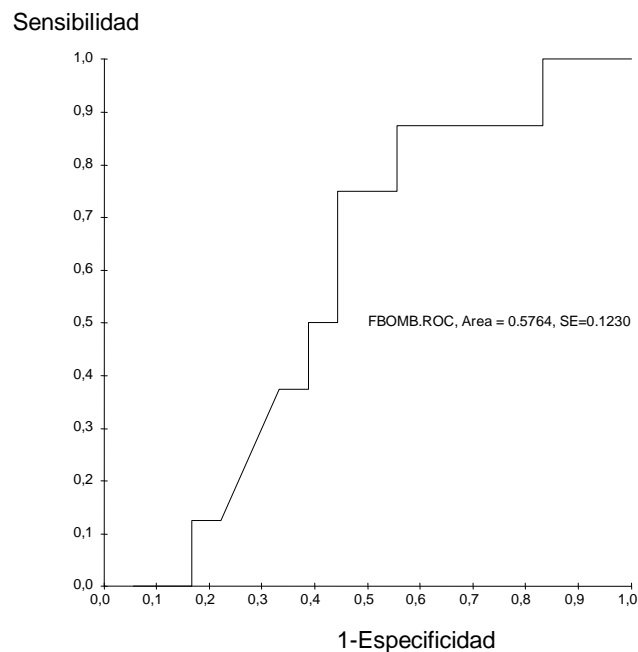


Figura 92. Curva de rendimiento diagnóstico (ROC) respecto al valor predictivo del flujo de bomba durante la RN en los grupos de flujo variable. S=Sensibilidad (% de verdaderos positivos) 1-E= 1-Especificidad (% de falsos positivos). No pudo determinarse ningún valor predictivo de supervivencia.

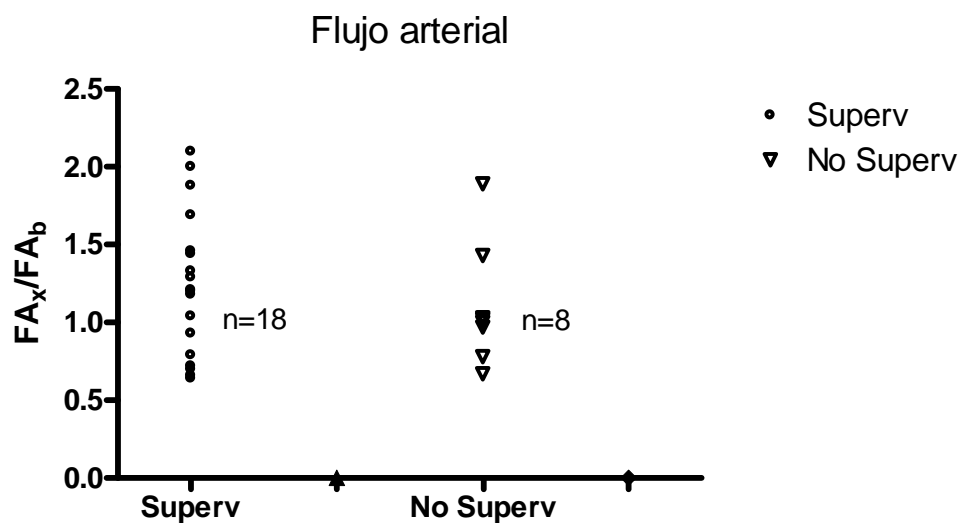


Figura 93. Distribución del flujo arterial hepático en los animales supervivientes (n=18) y en los animales no supervivientes (n=8). FA_x/FA_b : En cada caso se obtuvo un valor promedio único como la media aritmética de cada uno de los valores del flujo obtenidos durante la RN y divididos por su basal (valor porcentual). La distribución de los flujos medios porcentuales mostró una amplia variabilidad en ambos grupos.

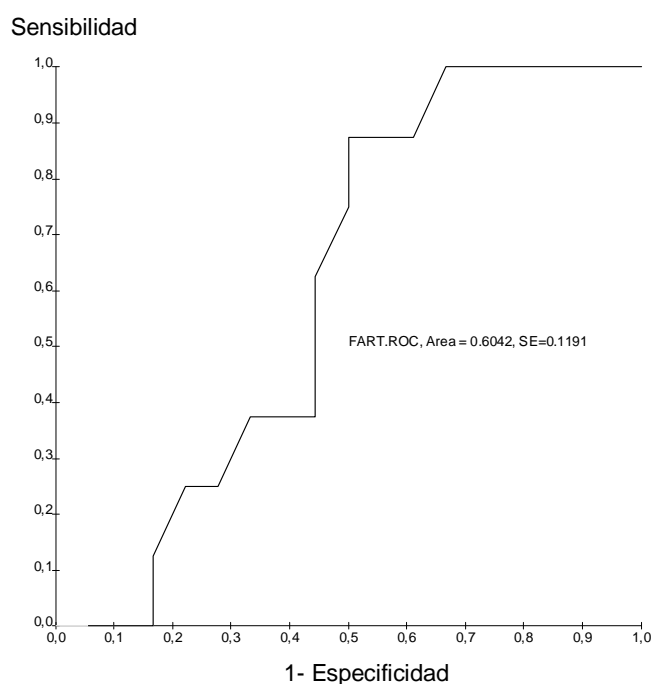


Figura 94. Curva de rendimiento diagnóstico (ROC) respecto al valor predictivo del flujo arterial hepático durante la RN en los grupos de flujo variable. S=Sensibilidad (% de verdaderos positivos) 1-E= 1-Especificidad (% de falsos positivos). La curva obtenida no muestra ningún punto de corte valorable.

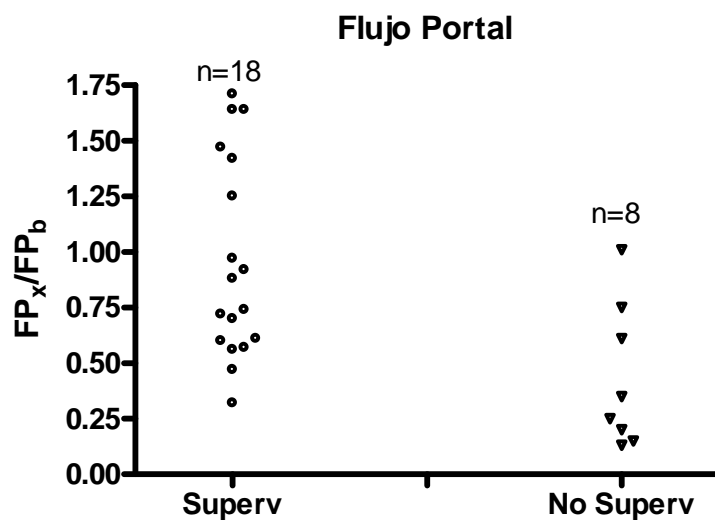


Figura 95. Distribución del Flujo Portal en los animales supervivientes (n=18) y en los animales no supervivientes (n=8). FP_x/FP_b: En cada caso se obtuvo un valor promedio único como la media aritmética de cada uno de los valores del flujo obtenidos durante la RN y divididos por su basal (valor porcentual).

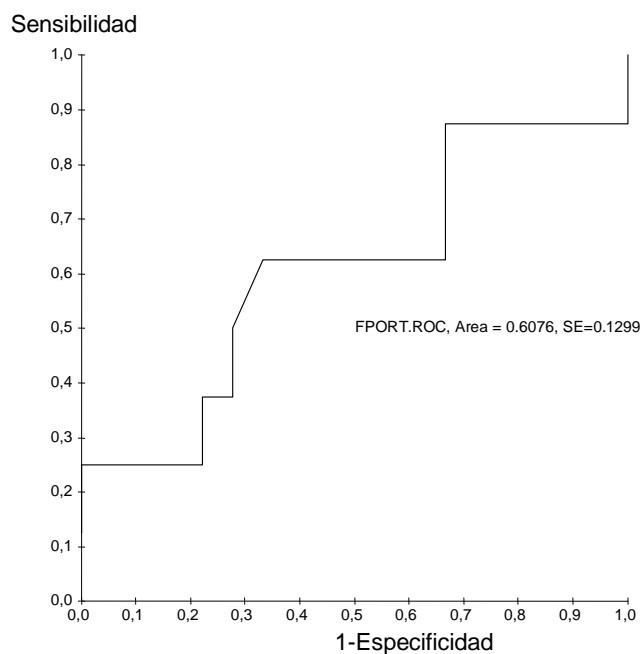


Figura 96. Curva de rendimiento diagnóstico (ROC) respecto al valor predictivo del flujo portal hepático durante la RN en los grupos de flujo variable. S=Sensibilidad (% de verdaderos positivos) 1-E= 1-Especificidad (% de falsos positivos). La curva obtenida, al igual que las anteriores, muestra un área bajo la curva próxima al 50%, indicando la falta de sensibilidad y especificidad.

5. DISCUSIÓN

Es indudable que el trasplante hepático constituye actualmente la mejor alternativa terapéutica en la insuficiencia hepática terminal.¹⁷ Los DCP son una fuente potencial de incremento para las donaciones, aunque en la práctica clínica la utilización de injertos hepáticos de este tipo de donantes sigue siendo controvertida ya que la limitación impuesta por el tiempo de IC reduce su viabilidad, asociándose su uso a mayor incidencia de fallo primario del injerto.

82, 85, 89, 91

Estudios experimentales^{125, 126, 127} sugieren que el hígado puede tolerar hasta 60 min de IC, no obstante, en el trasplante, el injerto se somete posteriormente a la agresión isquémica de la preservación y el recalentamiento lo que conlleva a un efecto lesivo amplificado. De las numerosas estrategias destinadas a incrementar la viabilidad de los injertos hepáticos procedentes de DCP,^{200-217, 234-253} la RN, intercalada antes del periodo de preservación en frío, se ha mostrado eficaz a nivel clínico, tanto con injertos renales^{353, 354} como hepáticos.^{93, 129, 207-}

211, 349, 350

5.1. Aplicación de Tres Tipos de Flujo de Bomba Durante la Recirculación

El uso de un sistema de perfusión de sangre oxigenada mediante un circuito de CEC debe garantizar una perfusión tisular adecuada a la demanda metabólica de oxígeno para asegurar el metabolismo aerobio y los procesos de regeneración de la energía celular. En este sistema, el flujo de bomba constituye un aspecto fundamental, por ello su optimización es imprescindible en la recuperación del daño causado por la IC. El efecto beneficioso de un flujo óptimo puede valorarse directamente a través del comportamiento de la hemodinámica

hepática, e indirectamente mediante la evaluación de marcadores del metabolismo de oxígeno y de lesión hepatocelular y endotelial.

En estudios previos con DCP y RN³⁵¹⁻³⁵² en los que se utilizaron tiempos crecientes de IC (20, 30 y 40 min) se aplicó un flujo variable. Éste, característicamente dependiente del retorno venoso, se halla relacionado con la volemia y el estado de las resistencias vasculares periféricas. Durante la CEC, la resistencia vascular sistémica desciende inicialmente a causa de la reducción de la viscosidad sanguínea y de las catecolaminas circulantes, todo ello por hemodilución. En las fases iniciales de la RN se reproduce el mismo patrón aunque, probablemente, existan otros mecanismos asociados como la acidosis y la hipoxemia, debida al periodo de IC, que no se producen en el individuo vivo sometido a CEC.

Durante la RN, el descenso del retorno venoso inicial logra restablecerse, al menos en parte, gracias a la oxigenación progresiva, aunque el cierre de algunas zonas de la microvasculatura, el aumento de las catecolaminas circulantes y el balance entre vasoconstrictores como la endotelina y vasodilatadores como el NO también podrían estar implicados.^{294, 295}

El objetivo fundamental durante la RN fue la obtención del mayor flujo de bomba posible para aproximarse al gasto cardiaco y conseguir un aporte suficiente de oxígeno. Puesto que el retorno venoso condicionaba el flujo de bomba, ello se compensó mediante el uso, por separado o simultáneo, de la reducción del débito de bomba y la reposición de volumen. No obstante, ambas maniobras podrían reducir el aporte de oxígeno. La primera, por falta de una correcta presión de perfusión tisular y la segunda, por hemodilución excesiva. El perfil del flujo de bomba durante la RN mostró valores progresivamente incrementados hasta un pico máximo a los 15 min, a partir del que se produjo un ligero descenso. En estos mismos estudios se constató que este comportamiento estaba asociado al efecto de la CEC y era similar para

cualquier tiempo de IC. Lo que sí parecía determinar la IC era tanto la magnitud de los flujos medios como la supervivencia. Los animales supervivientes presentaron tiempos de IC inferiores y flujos de bomba medios más altos que los no supervivientes. La información proporcionada por el retorno venoso y por consiguiente, por el flujo de bomba, se mostró útil como factor predictivo de supervivencia, hallándose que está asociada a flujos de bomba medios por encima de $1,7 \text{ L/min/m}^2$.³⁵²

En nuestro trabajo, la aplicación de un flujo de bomba variable mostró una morfología superponible al de estudios previos. A diferencia de los trabajos anteriores, con el uso de 60 min de IC, el flujo medio de bomba durante toda la RN fue superior al obtenido con tiempos menores de IC. No hemos podido constatar la volemia utilizada durante la RN en dichos trabajos previos. No obstante, sería poco probable atribuir a una adición excesiva de volemia la consecución de flujos de bomba elevados ya que, indirectamente, la hemodilución excesiva hubiese condicionado el descenso del aporte de oxígeno y éste fue concordante con los obtenidos en dichos trabajos.^{351, 352}

El perfil en el tiempo del flujo de bomba constante con dos magnitudes (alta y baja) mostró una morfología rectilínea y nos permitió describir la influencia de la magnitud del flujo de bomba sobre los flujos vasculares hepáticos.

Durante la CEC, la magnitud del flujo de bomba, entre otros, es un factor determinante de la hemodinámica hepática, principalmente del flujo portal. La CEC produce la reducción del flujo hepático total,^{338, 340, 342} preservándose mejor el flujo portal cuando se emplean flujos altos de bomba (del orden de $2,4 \text{ L/min/m}^2$) lo que permite obviar el efecto de la pulsatilidad del flujo. El uso de flujos bajos ($1,2 \text{ L/min/m}^2$) causaría un descenso importante del flujo hepático total y en ese caso, sería más beneficiosa la aplicación de un flujo de bomba pulsátil,^{338, 339} siempre que no se asociase a hipotermia. Para esa situación parece ser mas

adecuado el empleo de un flujo no pulsátil. En nuestro estudio no utilizamos flujo pulsátil porque no parece ser beneficioso para las circunstancias del experimento ya que el periodo de normotermia nos obliga al uso de flujos de bomba elevados y además el segundo periodo transcurre en hipotermia.

Por otra parte, la contribución del flujo portal y de la arteria hepática al flujo hepático total durante la CEC depende de factores como la hemodilución, la hipercapnia, la acidosis metabólica, la respuesta simpática y la hipotermia. Todas esas situaciones incrementan el flujo portal y causan vasoconstricción arterial hepática, lo cual sugiere que la respuesta tampón de la arteria hepática se mantendría a pesar de la CEC.

En nuestro estudio hallamos que durante la RN se produjo la reducción de todos los flujos vasculares hepáticos y que la magnitud del flujo de bomba determinó dicho descenso, aunque éste fue mucho mayor a nivel portal que de arteria hepática, dando como resultado una disminución del flujo hepático total.

El uso de un flujo de bomba alto mostró una mejor preservación de los todos los flujos hepáticos. No obstante, la aplicación de un régimen constante (grupo 30A) permitió una mayor recuperación tanto del flujo portal (56-70% del basal en 30A *vs* 37%-51% del basal en 30V) como del flujo de la arteria hepática (108-127% del basal en 30A *vs* 83-100% del basal en 30V) aunque estas diferencias no fuesen significativas.

La aplicación de un flujo de bomba bajo causó reducciones drásticas en los todos los flujos hepáticos. En todos los casos, los descensos del flujo portal conllevaron incrementos del flujo de la arteria hepática, sugiriendo que la aplicación de RN a los DCP no impidió la respuesta fisiológica tampón de la arteria hepática. La hipotermia apenas tuvo repercusión en la reducción de los flujos de arteria hepática y fue muy escasa en los grupos de flujo variable, independientemente de la magnitud del flujo de bomba.

Durante la CEC se utiliza la saturación venosa mixta para valorar la adecuación del débito de bomba a los requerimientos metabólicos de oxígeno, que refleja indirectamente el balance entre aporte y consumo de oxígeno.^{271, 273} Durante la RN sería aventurado extrapolar los valores hallados en el individuo vivo respecto al aporte y consumo de oxígeno, ya que el donante es sometido a un periodo variable de IC, lo que conlleva a hipoxia, acidosis metabólica, acidosis respiratoria y descenso del ATP intracelular. Por su parte, la CEC altera el hematocrito por hemodilución, la presión parcial de oxígeno por el uso de altas concentraciones de oxígeno, la temperatura y el débito de bomba, lo cual repercute en la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno y en la cantidad de oxígeno diluido en la sangre, ambos determinantes del aporte de oxígeno.³⁶⁵

Otro tanto ocurre con la relación entre aporte y consumo de oxígeno, la cual es independiente hasta que el aporte desciende por debajo de un valor crítico, momento en el que el consumo se vuelve dependiente del aporte. En estudios previos se ha constatado cómo el descenso del aporte de oxígeno se acompaña de incrementos en la extracción de oxígeno cuando se asocia a hipovolemia, hipoperfusión, reducciones del flujo hepático total o tras la reperfusión.^{326, 331, 332} En el DCP se ha utilizado la extracción hepática de oxígeno como medida indirecta de la oxigenación tisular, demostrándose que ésta aumenta si el aporte es insuficiente y se ha visto que es un marcador precoz, no solo del deficiente aporte de oxígeno, sino también de la supervivencia.³⁵²

En este estudio pudimos objetivar que durante la RN se produjo el descenso del contenido de oxígeno arterial, portal y suprahepático en todos los grupos, así como del aporte y consumo de oxígeno, aunque la reducción fue superior en el aporte que en el consumo, mientras que la extracción de oxígeno se vio afectada por el tipo de flujo y la magnitud del flujo de bomba, presentando la menor extracción el grupo 30V y la máxima el grupo 30B. Éste

último obtuvo la supervivencia más baja, lo que concordaría con el estudio anterior en el que también se halló una asociación entre el incremento de la extracción de oxígeno y la mortalidad.³⁵² La hipotermia apenas varió el aporte en los grupos de flujo constante y fue más relevante con el uso del flujo variable.

La α -GST, las transaminasas y el ácido hialurónico son indicadores útiles en el seguimiento de la lesión hepática producida por la IC en los DCP y la recuperación de la misma cuando se aplica un periodo de RN, verificándose que el descenso tras la lesión inicial ha mostrado una relación inversamente proporcional con la supervivencia.⁸¹

En nuestro estudio, la evolución de las transaminasas presentó unos resultados concordantes con los datos hallados previamente.^{208, 210, 350} El efecto de la magnitud y tipo de flujo de bomba solo mostró diferencias entre grupos 1 hora después de la reperfusión, dónde el grupo 30A mostró los valores más bajos de ASAT y el grupo 30B los más altos, hallándose diferencias significativas entre ambos. No obstante, la alta mortalidad del grupo 30B, observada en las primeras 48h postrasplante, podría asociarse a una gran insuficiencia hepatocelular debida a daño isquémico revertido de forma nula o incompleta por la RN cuando se utilizó un flujo bajo de bomba bajo y que no se habría detectado todavía en los tiempos de medida intermedios del estudio. A pesar de existir correlación entre la duración de la IC, la extensión del daño parenquimatoso y la supervivencia,^{81, 359, 360} el valor más alto de ASAT al segundo día correspondió al grupo 30V, que obtuvo finalmente la mayor supervivencia. Esto podría relacionarse con el número de casos supervivientes al segundo día.

El marcador más sensible y precoz de lesión endotelial es el ácido hialurónico, el cual se correlaciona con el tiempo de IC, mostrando un pico máximo arterial una hora después de la reperfusión en el receptor, ya que las células endoteliales dañadas por la isquemia-reperfusión son incapaces de su captación y metabolización.^{363, 366, 367} El aclaramiento de ácido

hialurónico se ha mostrado útil en la valoración del daño endotelial asociado a la lesión por isquemia-reperfusión ³⁶² y en los DCP también se ha utilizado para valorar la evolución del daño endotelial en relación a la RN. ^{81, 350}

Una hora después de la reperfusión el único grupo con valores positivos de ácido hialurónico se dio en el grupo 30A. El grupo 30B obtuvo los valores más bajos y el grupo 30V mostró valores negativos, pero inferiores al grupo 30B. A pesar de ello, no se hallaron diferencias significativas entre ningún grupo. La gran dispersión de los datos, debida a la variabilidad de la técnica analítica, junto al pequeño tamaño de muestra podría justificar la falta de significancia estadística. Si nos centramos en observar las tendencias de las medias en todos los tiempos de medida, afectados igualmente por los factores antes mencionados, observamos que el flujo de bomba alto y variable mostraría un efecto beneficioso precoz que se pondría de manifiesto durante la RN, mientras que el flujo alto y constante induciría una discreta mejora en la función endotelial que se manifestaría de más tardíamente tras la reperfusión en el receptor.

Estudios previos en trasplante hepático han demostrado que el estado energético hepático puede ser un marcador útil en la supervivencia del injerto ya que el ATP y la carga energética disminuyen tras los periodos de isquemia y se recuperan después de la reperfusión. ^{368, 369} Los estudios realizados con modelos de trasplante hepático experimental en DCP y RN han hallado que los nucleótidos de adenina y la carga energética disminuyen tras la IC y la carga energética se recupera con la RN, hecho que también ha podido constatar nuestro grupo. ^{126, 129, 195, 350} En este trabajo, los nucleótidos de adenina descendieron tras la IC y la RN permitió su recuperación, salvo en el grupo 30B, en el que se observó un empeoramiento progresivo tiempo-dependiente, probablemente porque la RN con bajo flujo de bomba no fue capaz de restaurar los procesos metabólicos de regeneración de los nucleótidos y persistió la situación de

isquemia. Los grupos de flujo alto restablecieron de forma algo desigual los nucleótidos. Mientras que el grupo 30V recuperó el AMP al final de la recirculación normotérmica, el grupo 30A incrementó el ATP, de forma significativa. Sin embargo, la estimación de la carga energética apreció el descenso tras la IC, pero no su recuperación tras la recirculación, ni diferencias entre los grupos. Las diferencias observadas deben considerarse con cautela debido a la gran variabilidad analítica asociada a la técnica de determinación. Estos hallazgos han sido consistentes con estudios previos en los que la RN recuperó los nucleótidos descendidos tras la IC y ha mostrado que la RN aplicada en condiciones subóptimas condujo al descenso progresivo los nucleótidos al no permitirse su regeneración.^{349, 350}

Durante la isquemia la conversión del enzima *xantina deshidrogenasa* en *xantina oxidasa* genera radical superóxido al actuar sobre la hipoxantina para metabolizarla a xantina, causando el acumulo de ambas, aunque su evolución en el tiempo es diferente ya que la hipoxantina se acumula durante la isquemia disminuyendo tras la reperfusión y la xantina incrementa progresivamente a lo largo del trasplante. La relación entre los nucleótidos de adenina y sus productos de degradación se ha estudiado en el mecanismo de la hepatoprotección mediada por el preconditionamiento concluyendo que la xantina juega un papel importante como responsable de la lesión.¹⁸² Nuestro grupo de investigación ha relacionado el tiempo de IC con altos contenidos de xantina y éstos, a su vez, con una pobre supervivencia en el receptor, mientras que valores bajos se han relacionado con una mejora de la supervivencia.^{208, 370}

En este estudio, la evolución de la hipoxantina y la xantina reprodujeron los hallazgos de trabajos previos.^{349, 350} En el grupo 30B los valores más bajos de hipoxantina podrían atribuirse a una lesión más extensa, debido al insuficiente flujo de bomba que impediría la recuperación de los mecanismos de restablecimiento del ATP. Por el contrario, el grupo 30A

mostró valores altos de hipoxantina y bajos de xantina tras la reperfusión, lo que podría indicar una actividad disminuida del enzima *xantinaoxidasa*.

La lesión histológica hepática en DCP sometidos a 60 min de IC y diferentes tipos de flujo de bomba no ha sido descrita anteriormente. El grupo 30A presentó lesión endotelial y colangitis isquémica de menor gravedad que el grupo control. Probablemente el endotelio se benefició de la aplicación de un flujo de bomba alto y constante tanto en la RN como en la RH por un efecto más mecánico que metabólico. Este hecho no pudo demostrarse en este estudio por que el diseño no contempló la valoración dinámica de la microcirculación. El estrés mecánico ha sido estudiado experimentalmente en hígados de rata sometidos a preservación hipotérmica mediante perfusión continua de solución de Krebs-Henseleit durante 24 horas. Periodos tan prolongados de preservación hipotérmica con presión de perfusión continua causan fenómenos de abalonamiento endotelial que posteriormente favorecen el depósito de PMN durante la reperfusión. A pesar de que el diámetro endotelial no varió, estos autores hallaron un aumento de la presión portal, sugiriendo la disminución del área total hepática, el incremento de la resistencia vascular hepática y la velocidad de flujo, causando el mencionado estrés mecánico.²⁴⁸ En el presente trabajo, la perfusión normotérmica de sangre autóloga oxigenada con un flujo continuo alto evitaría el incremento de las resistencias vasculares asociado a la hipotermia así como la alteración de la osmolalidad, manteniendo una distribución homogénea de la perfusión y contribuyendo a recuperar la integridad endotelial sin que el daño inicial se hiciese irreversible. El efecto beneficioso del uso de un flujo constante y alto sobre el endotelio se evidenció precozmente por una captación positiva de ácido hialurónico tras la reperfusión y que persistió al quinto día postrasplante, lo cual podría verse apoyado por el hallazgo de menor presencia de endotelitis, dilatación e infiltración leucocitaria sinusoidal.

La lesión sobre la vía biliar mostró que a pesar de 60 min de IC se hallaron biopsias sin presencia de colangitis, lo que parece contradecir parcialmente los resultados previos de nuestro grupo de trabajo. Según éstos, la lesión de la vía biliar sería irreversible a partir de los 20 min de IC.^{81, 350} No obstante, la falta de valoración de la supervivencia más allá del quinto día postrasplante podría enmascarar lesiones más tardías, tanto biliares como parenquimatosas, que hiciesen inviable el trasplante.

Por el contrario, el grupo 30B asoció mayor severidad en la lesión de la vía biliar, endotelial y hepatocitaria, respecto a los grupos 30V y 30A. La imposibilidad de satisfacer las demandas metabólicas de oxígeno en normotermia, asociado a un probable efecto mecánico de acumulo de eritrocitos, distribución heterogénea del flujo sanguíneo y alteraciones en el diámetro vascular por presión de perfusión insuficiente, cierre de zonas de la microvasculatura y variaciones en las resistencias vasculares impedirían el restablecimiento del daño inicial por la IC, sobreponiéndose a la lesión por isquemia fría y reperfusión. En este grupo, todos los casos mostraron colangitis isquémica, la cual parece hallarse relacionada, además de con el tiempo de IC, con el tipo y magnitud de la perfusión durante la RN.

La supervivencia de los grupos 30V y 30^a fue muy superior a la del grupo 30B, aunque no se hallaron diferencias significativas. El escaso número de la muestra es el factor más relevante, ya que al quinto día el grupo 30B solo contaba con 3 casos. No obstante, el resultado del grupo 30B es concordante con los estudios en los que se postula que para el mantenimiento de la hemodinámica hepática durante la CEC en normotermia se precisaría de flujos de bomba similares al gasto cardíaco, así como con aquéllos en los que se asoció la supervivencia con la obtención de flujos altos durante la RN.

En definitiva, el uso de tres tipos de flujo de bomba durante 30 min de RN, para recuperar hígados que han sido sometidos a 60 min de isquemia caliente, ha mostrado que la recirculación permite la recuperación parcial de los flujos vasculares hepáticos. Dicha recuperación depende directamente de la magnitud del flujo de bomba, tanto en normotermia como en hipotermia. El flujo portal y el flujo hepático total serían los más afectados por la magnitud del flujo de bomba. Durante la recirculación, y a pesar de 60 min de isquemia caliente, la arteria hepática parece conservar su respuesta tampón fisiológica. La aplicación de un flujo de bomba alto permitiría un adecuado metabolismo de oxígeno al reducir el cociente de extracción hepático de oxígeno.

Así mismo, la magnitud del flujo de bomba determina el daño hepatocitario, endotelial y biliar. El flujo de bomba bajo, durante la RN, afectaría principalmente al hepatocito, a causa de un bajo aporte de oxígeno, y la lesión se manifestaría precozmente mediante un incremento muy marcado de la extracción hepática de oxígeno y de la mortalidad en las primeras 48 horas postrasplante. El flujo de bomba alto, durante la RN, permitiría un adecuado aporte de oxígeno con un leve incremento de la extracción hepática de oxígeno, la recuperación tisular de los nucleótidos de adenina, el descenso de xantina, la recuperación precoz del funcionalismo endotelial y menor lesión biliar.

La utilización de un flujo de bomba variable o constante, siempre que se asocie a un débito de bomba alto, no parece mostrar claras ventajas de uno sobre otro. En este estudio, el flujo variable ha obtenido el cociente de extracción hepática de oxígeno más bajo, mientras que el flujo constante ha sido capaz de recuperar el ATP, ADP y AMP al final de la RN y, tras la reperusión, mejorar la extracción del ácido hialurónico y disminuir la xantina, indicando la regeneración aerobia de los nucleótidos de

adenina. El efecto beneficioso precoz se ha mostrado compatible con los cambios histológicos observados al quinto día postrasplante, en dónde se ha asociado a lesión endotelial y biliar de menor gravedad que con el uso de flujo variable y de flujo constante y bajo. Por tanto, durante la fase de RN, el flujo óptimo de bomba debería tener una magnitud alta, es decir, similar al gasto cardíaco para que el restablecimiento de los procesos metabólicos sea posible sin comprometer el metabolismo aerobio. Ello estaría apoyado por la mayor supervivencia obtenida en los grupos de flujo alto, en contraposición con la supervivencia más baja del grupo de flujo bajo.

5.2. Prolongación de la Recirculación Normotérmica

En nuestro país la fuente principal de DCP la constituyen los donantes no controlados de la categoría II de Maastricht^{70, 90, 356}, ya que la legislación no contempla a los donantes controlados de tipo III. Entre otros factores, la obtención de todos los requerimientos legales previos a la extracción dilata el tiempo del mantenimiento del donante y, por consiguiente la aplicación de los métodos de recuperación hasta la extracción. En la actualidad se puede constatar que el empleo de DCP no controlados obliga a utilizar tiempos medios hasta la extracción que frecuentemente superan los 120 minutos.^{70, 90, 354, 356} Puesto que la duración de la RN se estableció en base a criterios arbitrarios y que la situación clínica habría superado ampliamente los 30 min de RN del protocolo experimental inicial se creyó conveniente valorar la repercusión que pudiera tener la ampliación del tiempo de RN sobre el injerto.

En nuestro trabajo, el grupo 60V precisó de la adición de volemia para el mantenimiento de flujos de bomba por encima de $1,7 \text{ L/min/m}^2$ ³⁵² durante los 30 min finales. Ello supuso la utilización de casi el doble de volumen de reposición al final de la RN. A pesar de mayor hemodilución, los contenidos de oxígeno, el aporte y el consumo de oxígeno no sufrieron un descenso significativo respecto a los valores hallados a los 30 minutos de RN. Tampoco se produjo un incremento significativo de la extracción hepática de oxígeno por lo que es presumible que se garantizó un correcto aporte. Todos los flujos vasculares hepáticos mostraron una leve reducción en los 30 min finales pero la recuperación de los valores respecto al basal se mantuvo sin diferencias significativas entre la primera y la segunda mitad de la RN.

La duración de la CEC afectaría a la resistencia vascular sistémica en el individuo vivo. Inicialmente se produciría un descenso a causa de hemodilución que también disminuiría las

catecolaminas circulantes. Progresivamente las resistencias incrementarían en respuesta al cierre de áreas vasculares y al aumento de catecolaminas circulantes. En el uso clínico de la CEC durante la cirugía cardíaca, las oscilaciones de las resistencias periféricas se compensan por la adición de volemia y por el apoyo de fármacos vasoconstrictores. Teniendo en cuenta que en nuestro modelo partimos de una situación con acidosis metabólica, hipoxemia, hemodilución progresiva, una liberación de mediadores inflamatorios mayor y sin el apoyo de fármacos vasoactivos, no cabe esperar sino el descenso progresivo de las resistencias periféricas. No obstante, el mantenimiento de un flujo de bomba alto permitió la recuperación de los flujos vasculares hepáticos en una magnitud similar al de tiempos de RN más cortos, por lo que se puede afirmar que se garantiza el aporte de oxígeno y una presión de perfusión tisular adecuada. En hipotermia, el flujo portal se elevó más tras normotermia de 60 min que de 30 min, lo cual podría estar en parte justificado por la hemodilución adicional ya que la vasodilatación venosa esplácnica compensadora de la vasoconstricción arterial mediada por respuesta simpática y la reducción del metabolismo, ambas causadas por la hipotermia, también se dieron en el grupo 30V.

En este trabajo, la RN durante 60 min no incrementó el daño hepatocelular, ya que la ASAT y la ALAT mostraron valores similares a los obtenidos al final de 30 min de RN. Dichos valores en el grupo 60V, y teniendo en cuenta únicamente el concepto de “final de RN”, fueron similares a los del grupo 30V. Tampoco hallamos diferencias entre los valores encontrados a los 30 o a los 60 min de RN dentro del grupo 60V. Ello iría a favor de que periodos más prolongados de perfusión con sangre normotérmica no parecen tener un efecto deletéreo inmediato sobre la función hepatocelular. El beneficio de un mayor tiempo de RN se evidenció más tardíamente, ya que en el grupo 60V, la ASAT mostró un descenso significativo en el segundo y en el quinto día postrasplante respecto a 30V, y la ALAT mostró valores

inferiores al grupo 30V desde la reperfusión, llegando a normalizarse al quinto día postrasplante. Ello concuerda con estudios previos *ex vivo* realizados con hígados de DCP sometidos a 60 min de IC y largos periodos (4 h y 24 h de NELP) de perfusión normotérmica de sangre oxigenada en los que se ha demostrado el efecto beneficioso mediante la producción de bilis, valores más bajos de liberación de transaminasas y mayor recuperación en la función endotelial.^{250, 251}

La utilización de 30 min adicionales de RN parece beneficiar a la recuperación de la lesión endotelial, ya que a los 30 min de RN se obtuvo un valor descendido en ambos grupos. En cambio, a los 60 min de RN se consiguió recuperar el aclaramiento del ácido hialurónico de forma precoz y mantenida, incluso tras una hora de reperfusión, que se objetivó por el ascenso del aclaramiento en el grupo 60 V, frente a un valor negativo tras la reperfusión en el grupo 30V. Desconocemos en que momento del periodo comprendido entre los 31 y los 60 min de la RN comenzó a restablecerse la función endotelial, lo cual marcaría un límite respecto al tiempo mínimo imprescindible de RN para recuperar una lesión provocada por 60 min de IC. Tampoco podemos valorar el efecto neto de 60 min de RN, puesto que la utilización de RH, seguida de preservación estática en frío podría reducir eficacia al efecto beneficioso de la prolongación de la RN. No existen estudios en la literatura sobre la acción exclusiva de la RN sobre injertos hepáticos dañados por 60 min de IC. Los estudios que han intentado valorar el efecto de la normotermia y la hipotermia por separado en hígados sometidos a 60 min de IC presentan diferencias metodológicas notables respecto al nuestro ya que utilizaron un sistema de preservación *ex vivo* mediante perfusión de sangre oxigenada, los hígados no fueron trasplantados posteriormente, se evaluó la composición del perfusato e histología y tanto el orden en el uso de la NELP como la preservación en frío fueron inversos al de nuestro estudio. No obstante, un periodo de preservación en frío tan corto como una hora seguido de

23 h de NELP restó eficacia a la NELP objetivándose daño significativo hepatocelular, endotelial y de las células de Kupffer.²⁵³

Este estudio demostró que los valores de nucleótidos hallados en el minuto 60 de la RN fueron superiores a los hallados en el minuto 30 de la RN, aunque solo el ascenso del ATP fue significativo. La producción de hipoxantina incrementó progresivamente, sin afectarse por la duración de la RN, mientras que la xantina sí disminuyó en el grupo 60V tras la reperfusión lo podría sugerir el restablecimiento precoz del metabolismo oxidativo mitocondrial a través de la recuperación de los nucleótidos de adenina en lugar de su catabolismo. La carga energética mostró el descenso característico tras la IC, sin que el tiempo de RN influyese en su recuperación. Probablemente, el largo periodo de IC y la variabilidad del método analítico hayan impedido observar diferencias destacables que sí aparecieron en la determinación por separado de los nucleótidos y sus metabolitos.

En resumen, los hallazgos bioquímicos han demostrado que 60 min de RN permitieron la reducción del daño endotelial, hepatocitario y la recuperación de los nucleótidos de adenina de forma precoz respecto al grupo 30V.

La histología presentó cambios comparables en ambos grupos en la lesión asociada a rechazo (endotelitis e infarto). Por el contrario, las variables relacionadas con la lesión por isquemia-reperfusión mostraron mejores resultados en el grupo 60V. La disociación hepatocitaria, la necrosis isquémica centrolobulillar y el área necrótica media, todas ellas representativas del daño hepatocitario, fueron de menor intensidad en el grupo 60V, correspondiéndose con valores medios de ASAT y ALAT al segundo y quinto día postrasplante. La lesión endotelial solo evidenció mejora en el grupo 60V respecto a la dilatación sinusoidal, ya que la infiltración leucocitaria fue más intensa que en el grupo 30V. Teniendo en cuenta que la evaluación histológica se hizo al quinto día con las biopsias de los

supervivientes cabe observar dos efectos, por un lado la superposición del daño provocado en las diferentes etapas del proceso y por otra la notable reducción del tamaño de la muestra lo que limita notablemente las conclusiones.

La aplicación de 60 minutos de RN mediante un flujo de bomba variable, con un débito de bomba por encima de 2,2 L/min/m², precisó de fluidoterapia adicional, sin que ello condicionase los contenidos, el aporte, consumo y la extracción hepática de oxígeno. La prolongación del tiempo de RN no consiguió remontar los flujos vasculares hepáticos a los valores basales y asoció un descenso leve y progresivo del flujo de bomba y de todos los flujos vasculares hepáticos.

Se evidenció un efecto beneficioso en la reversión de la lesión por 60 minutos de isquemia caliente de forma precoz ya que, tras finalizar la RN, se produjo la recuperación parcial de la lesión endotelial y de los nucleótidos de adenina, mejorando los resultados obtenidos tras 30 minutos de RN. Tras la reperfusión, el beneficio endotelial persistió claramente, observándose además una disminución de la xantina. La protección hepatocitaria pudo demostrarse tardíamente por la disminución de las transaminasas al segundo y quinto día postrasplante y por la menor afectación histológica.

5.3. Supresión del Periodo de Recirculación Hipotérmica

El protocolo actual de recirculación aplicado al DCP utiliza un periodo adicional de recirculación con hipotermia progresiva hasta alcanzar 15°C de temperatura en la superficie hepática, derivado del protocolo histórico en el que solo se realizaba enfriamiento corporal total. Teóricamente, la recirculación con hipotermia causaría el enfriamiento progresivo y homogéneo mediante una adecuada presión de perfusión y oxigenación antes de extraer el órgano y preservarlo en frío asociando el descenso del metabolismo basal, lo que permitiría mayor tolerancia a la isquemia. A pesar de ello, la hipotermia se ha asociado al empeoramiento de las condiciones reológicas y de perfusión de los órganos y el uso de enfriamiento corporal total a la prolongación del tiempo de isquemia fría.

En este estudio se mantuvo una RN idéntica a la del protocolo estándar, variando solo el periodo de hipotermia, por lo que las diferencias eran solo esperables a partir del final de la RN.

Durante la CEC, la hipotermia permite teóricamente la reducción del flujo de bomba para adecuar el aporte al consumo de oxígeno y aproximarlos al valor meseta, en virtud del cual, aunque se proporcione mayor cantidad de oxígeno, el consumo permanece invariable.^{271, 273-275} Los flujos vasculares hepáticos se modificarían con la hipotermia moderada mostrando un aumento del flujo portal y vasoconstricción arterial hepática. Sin embargo, el descenso del flujo sanguíneo asociado al descenso del flujo de bomba propiciaría la reducción de la perfusión microvascular y la aparición de edema.³¹⁰

La hipotermia asociada a la CEC afectaría también el metabolismo de oxígeno hepático mediante la reducción del metabolismo basal. Esto sería objetivable por el descenso del consumo y la extracción de oxígeno, haciendo que incrementase la saturación venosa mixta de

forma inversa al descenso de temperatura. También descendería el aporte de oxígeno como consecuencia de la disminución de los flujos vasculares hepáticos. La hemodilución no parece afectar el contenido de oxígeno, que probablemente permanece estable, ya que el descenso de temperatura aumentaría la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno así como su solubilidad en el plasma.

Según estudios experimentales y clínicos la combinación más adecuada para la preservación hepática durante la CEC comprende la utilización de flujos altos de bomba. Durante la normotermia el uso del un flujo pulsátil o no pulsátil sería indiferente, pero en hipotermia sería más beneficioso emplear el flujo no pulsátil, al causar un descenso significativamente menor en el flujo hepático que el flujo pulsátil.^{336, 337, 342}

En este trabajo se evidenció que el periodo de RH incrementó el tiempo medio de hipotermia en 18 minutos, lo que, considerando el tiempo total de isquemia fría (6 horas), supuso un aumento relativo muy escaso (0,05 al 0,07%). Durante la RH se produjo un descenso en el flujo de bomba, al ser éste dependiente del retorno venoso. Se observó igualmente, un descenso marcado del flujo arterial, el flujo portal y el flujo hepático total respecto a los obtenidos en normotermia. Sin embargo, el contenido de oxígeno arterial, portal y suprahepático no varió en relación a los contenidos de oxígeno durante la normotermia, a pesar de la adición de una media de 450 mL de volumen suplementario para compensar el descenso del retorno venoso. El aporte, consumo y extracción de oxígeno hepático mostraron una reducción no significativa frente a los valores hallados en normotermia.

La lesión hepatocitaria y endotelial asociada a la IF y la preservación se halla ampliamente descrita. La hipotermia es capaz de provocar lesión *per se*,¹⁰⁴ en cultivos de células endoteliales^{105, 108} y de hepatocitos.^{104, 107} Además causa muerte celular por apoptosis en hepatocitos y células endoteliales de forma precoz y, tras la reperfusión, induce muerte celular

por necrosis de predominio hepatocitario.¹⁰⁷ El mecanismo de la apoptosis se asocia a la producción de RLO^{108, 109} y la necrosis se vincula la alteración del gradiente electroquímico de membrana por inactivación de los sistemas de transporte de iones.¹⁰⁶ La IF tiene un efecto deletéreo tiempo-dependiente sobre las células endoteliales^{112, 113} y los hepatocitos.^{112, 114} Las soluciones preservadoras, aunque encaminadas a contrarrestar la lesión por isquemia, no tienen un efecto inocuo sobre el hígado y la vía biliar, sobre todo cuando se utilizan durante periodos prolongados.^{100, 119, 120} Así mismo, se ha cuestionado la utilidad de la preservación estática en frío en los hígados de DCP con tiempos diversos de IC, frente a la preservación dinámica fría mediante el uso de máquinas de perfusión hipotérmica. La preservación dinámica hipotérmica muestra ventajas frente a la preservación estática, pero largos periodos de utilización se asocian a edema endotelial, acumulo de hematíes y rotura vascular por estrés mecánico.^{246, 247} Parece que incluso breves periodos de almacenamiento estático en frío previos a la perfusión normotérmica de sangre oxigenada pueden empeorar el funcionalismo hepático y la histología.^{252, 253} Por el contrario, los sistemas basados en la preservación *ex vivo* mediante la perfusión de sangre normotérmica muestran resultados muy alentadores en la reversión de las lesiones causadas por tiempos de IC de hasta 75 min.^{250, 251, 264}

En nuestro estudio, la supresión de la RH tuvo una repercusión muy beneficiosa a nivel hepatocitario y endotelial al hallarse una reducción significativa de las transaminasas a partir del segundo día postrasplante y un valor positivo en la extracción hepática del ácido hialurónico, tras la reperfusión, a diferencia del grupo control.

Respecto a la recuperación de los nucleótidos de adenina y de la carga energética, el único dato destacable lo aportó la xantina, que en el grupo 30SRH se halló en valores superiores al basal tras la reperfusión, pero marcadamente inferiores a los del grupo 30V. Ello

podría indicar una restauración parcial de la capacidad regeneradora del ATP y la disminución en la actividad de la *xantinaoxidasa*.

El grupo 30SRH mostró una disminución de la lesión histológica asociada a rechazo, ya que la endotelitis y el infarto fueron inferiores al grupo control. La lesión endotelial fue más leve, a expensas de menor intensidad en la infiltración leucocitaria y menor dilatación sinusoidal. A pesar de no existir datos histológicos concluyentes, los obtenidos han sido concordantes con los hallazgos bioquímicos de mejora de la lesión endotelial tras la reperfusión y de la lesión hepatocitaria al segundo y quinto día postrasplante.

El grupo 30SRH mostró una supervivencia del 75% asociando, además, menor daño endotelial, hepatocitario e histológico y menor acumulo de xantina tras la reperfusión que el grupo control. La RN se muestra como un método efectivo en la recuperación de injertos hepáticos sometidos a 60 min de IC. No obstante, la adición de un periodo de RH previa a un periodo de IF de 6h no parece añadir beneficios a un injerto que ha sufrido previamente una lesión importante por IC, que ha podido revertirse parcialmente por la RN. En este caso, la RH podría empeorar significativamente la lesión hepatocitaria y endotelial, por lo que debería limitarse su uso, o reducir el periodo de IF estática.

Nuestro estudio ha mostrado que la utilización de un breve periodo adicional de RH (20 minutos de media) tras la RN, antes de 6 horas de preservación hipotérmica estática, empeora la lesión hepática causada por 60 minutos de isquemia caliente y resta eficacia a la acción beneficiosa de la RN. La supresión de este periodo permitiría optimizar el efecto hepatoprotector de la RN de manera prolongada en el tiempo, valorable por la disminución bioquímica e histológica de la lesión hepatocitaria, endotelial y del estrés oxidativo.

5.4. Adición de Dobutamina Durante la Recirculación

La adición de sustancias con efecto citoprotector durante la RN se ha asociado a mejoría de la función del injerto. Existen numerosos estudios experimentales en los que se han utilizado diferentes sustancias con mecanismos diversos para combatir la lesión asociada a la isquemia-reperfusión.

La dobutamina es un fármaco inotropeo con un efecto favorable sobre la perfusión y oxigenación del territorio esplácnico en condiciones fisiológicas²²⁰ y patológicas como el shock séptico,²²²⁻²²⁹ donde se producen fenómenos de hipoperfusión y activación de la cascada inflamatoria. Dicha fisiopatología guarda similitudes con la del síndrome por isquemia-reperfusión en el trasplante. Además del efecto vascular esplácnico, la dobutamina añade un efecto hepatoprotector similar al del preconditionamiento ya que, *per se*, es capaz de inducir al enzima heme-oxigenasa 1 (HO-1),¹⁹⁴ el cual también se induce en condiciones de estrés como la isquemia o la hemorragia.¹⁹⁰ Todo ello hace suponer, al menos teóricamente, que la utilización de dobutamina durante la recirculación podría resultar beneficiosa en la obtención de injertos hepáticos de DCP dañados por un periodo prolongado de IC.

En este trabajo, la adición de la dobutamina durante todo el periodo de recirculación a dosis de 5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$, con un flujo de bomba dependiente del retorno venoso, no ha modificado significativamente el flujo de bomba y ha incrementado el flujo hepático total a expensas del flujo portal, mientras que el flujo de la arteria hepática se ha mantenido en valores muy similares al del grupo control. En los trabajos realizados con modelo de shock séptico la dobutamina a dosis de 3 $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{min}$ incrementó el flujo portal y sinusoidal, sin modificar el flujo arterial significativamente.^{225, 226} A dosis más elevadas (entre 5 y 10 $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{min}$) incrementó los flujos de porta y de A. hepática.²²⁴ En ambos trabajos se constató el aumento

del gasto cardiaco, lo que pudiera justificar el aumento de los flujos vasculares hepáticos. En nuestro estudio, en el que se inicia un proceso inflamatorio sistémico por la isquemia y la reperfusión subsiguiente durante la RN, hemos obtenido un comportamiento similar al de los estudios de shock séptico tratados con dosis bajas de dobutamina, es decir, el incremento del flujo portal sin modificación del flujo arterial hepático. No hemos demostrado que ello haya sido a expensas del aumento del débito de bomba por incremento del retorno venoso. En primer lugar, porque los flujos de bomba no fueron significativamente diferentes respecto al grupo 30V y en segundo lugar, porque la adición de volemia entre ambos grupos también fue comparable. En nuestro caso es posible que el incremento del flujo portal se hallase más en relación con fenómenos de redistribución del flujo esplácnico y con mecanismos vasomotores relacionados con la liberación de sustancias vasoactivas.

En cuanto al metabolismo de oxígeno, el uso de de 5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ de dobutamina durante la recirculación aumentó el aporte, el consumo y la extracción de oxígeno hepático, tanto en normotermia como en hipotermia. El incremento del aporte fue más moderado que el del consumo, produciéndose las diferencias significativas para ambos a los 5 min de la RN. El incremento en el aporte podría justificarse por el aumento del flujo hepático total ya que no modificó los contenidos de oxígeno arterial y portal. El aumento del consumo de oxígeno, probablemente, sea independiente del aporte gracias a la utilización de flujos altos de bomba durante la RN. Ello también se ha visto en estudios experimentales con perros y modelos de shock hiperdinámico en los que, con un rango de dosis entre 5 y 10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ de dobutamina, se produjo el aumento del aporte y del consumo de oxígeno, del índice cardiaco y de los flujos de arteria hepática y porta.^{222, 223} En los modelos con descenso del gasto cardiaco no asociado a endotoxemia, solo dosis altas de dobutamina (10-15 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) aumentaron el aporte de oxígeno, sin modificar el consumo y causaron el descenso de la extracción hepática

de oxígeno. Ello sugiere integridad celular y un consumo fisiológico aporte-dependiente, mientras que en el modelo del shock o trasplante, el daño de los mecanismos de homeostasis celular causarían un consumo y extracción patológicos aporte-dependiente.

La dobutamina fue capaz de mejorar la lesión hepatocitaria, al disminuir las concentraciones de transaminasas a partir del segundo día, con normalización de la ALT al quinto día postrasplante. Así mismo resultó eficaz, de forma precoz, en la recuperación de la lesión a nivel endotelial, objetivándose al final de la RN y se mantuvo una hora después de la reperfusión.

La dobutamina asociada al periodo total de recirculación permitió la recuperación del ATP y ADP intracelular a valores basales al final de la RN, a diferencia del grupo 30V, en el que se mantuvieron descendidos, aunque tras la reperfusión todos ellos permanecieron descendidos, sin diferencias entre los grupos. El grupo 30DBT mostró resultados significativamente inferiores de hipoxantina y xantina al final de la RN, aunque este efecto precoz no logró mantenerse tras la reperfusión, indicando una disminución parcial del estrés oxidativo. La carga energética solo mostró una leve recuperación al final de la RN en el grupo 30 DBT manteniendo esa tendencia incluso tras la reperfusión, pero sin diferencias significativas respecto al grupo 30 V.

La lesión histológica asociada al grupo 30DBT fue de menor intensidad en casi todas las variables analizadas respecto al grupo control, aunque no se hallaron diferencias significativas. Se observó menor afectación asociada al rechazo; la endotelitis fue similar al grupo 30V pero no se hallaron áreas de infarto en ninguna de las biopsias analizadas. La lesión hepatocitaria, valorada por la disociación hepatocitaria, la necrosis isquémica y el área necrótica media, fue de menor gravedad en el grupo 30DBT. La lesión endotelial en el grupo 30DBT, al

igual que en otros grupos de estudio, fue menos concluyente ya que, aunque apenas se dio dilatación sinusoidal, se observó mayor grado de infiltración leucocitaria.

Este efecto hepatoprotector probablemente esté influido por más de un mecanismo. La dobutamina mediante su acción vasomotora mejora el flujo hepático total, aumenta el aporte y consumo de oxígeno. El estímulo β -1 podría potenciar la síntesis hepática del enzima hemo-oxigenasa-1, probablemente ya inducida por el efecto de la IC, y provocar vasodilatación local mediada por la producción de CO, además del efecto antioxidante de la biliverdina, y causar un efecto sinérgico con el del preconditionamiento isquémico que se atribuye a la RN. Este estudio corrobora trabajos anteriores sobre el efecto protector de la dobutamina en el hígado con distintos modelos de lesión.^{192, 231, 232}

La supervivencia hallada en el grupo 30DBT fue del 62,5% frente al 80% del grupo control. En este caso tampoco se hallaron diferencias significativas, que como en el resto de los estudios, podría atribuirse al escaso tamaño de muestra.

En los hígados sometidos a 60 minutos de isquemia caliente, el empleo de dobutamina durante la recirculación parece aumentar el flujo hepático total a expensas del flujo portal sin afectar directamente al flujo de bomba e incrementa el aporte, el consumo y la extracción hepática de oxígeno. Presumiblemente ambos factores, junto con el efecto hepatoprotector intrínseco de la dobutamina, podrían ser los responsables de la mejora precoz de la función endotelial, la recuperación de los nucleótidos de adenina y el descenso los productos del metabolismo de la xantinaoxidasa. El efecto beneficioso tardío se valoraría por la reducción significativa de las transaminasas desde el segundo día postrasplante y por la menor afectación histológica respecto al grupo control.

5.5. Valor Pronóstico del Flujo de Bomba Variable y la Hemodinámica Hepática

El análisis del flujo de bomba medio no reveló un punto de corte que determinase un valor predictivo con buena sensibilidad y especificidad. La curva de rendimiento diagnóstico, tomando diferentes valores para el punto de corte, mostró una tendencia lineal en la que los verdaderos positivos y los falsos positivos estaban equiparados. De acuerdo al estudio previo de nuestro grupo, se obtuvo un valor discriminante para el flujo de bomba de 1,7 L/min/m² en relación a la supervivencia.³⁵¹ En cambio, en el presente trabajo destaca, en primer lugar, el elevado flujo de bomba obtenido, incluso en los animales no supervivientes, con una media de 2,89 L/min/m², situándose todos los no supervivientes por encima del teórico 1,7 L/min/m² del estudio previo. En segundo lugar, hay que resaltar el solapamiento del valor medio del flujo de bomba entre los no supervivientes y los supervivientes. Ambos hechos pueden estar relacionados con un tiempo medio de IC superior al obtenido en el trabajo de Valero et al., en el que la contribución de animales supervivientes fue desigual e inversamente proporcional al tiempo de IC (20 min: 100% supervivencia, 30 min: 75% supervivencia y 40 min: 50% de supervivencia). La menor lesión inflamatoria asociada a un tiempo de IC más corto podría asociarse a menor repercusión hemodinámica. En nuestro trabajo, tras 60 min de IC y posterior RN, la utilización de flujos más elevados podría estar relacionada, en parte, con el uso de mayor fluidoterapia, no cuantificada en el estudio anterior, con fenómenos de redistribución vascular, principalmente asociada al territorio esplácnico, y con la liberación de mayor cantidad de mediadores inflamatorios.

En cuanto al flujo vascular arterial y portal, dado que la variabilidad interindividual juega un papel importante, nos pareció inadecuado hablar de un punto de corte referido a un

flujo concreto y preferimos hallar el valor discriminante por el que el flujo de bomba variable permitiese recuperar una proporción determinada del flujo basal. Si bien los flujos medios fueron superiores en los supervivientes, no se hallaron puntos de corte adecuados en ningún caso. Se encontró una gran dispersión de los valores del flujo arterial en ambos grupos, mientras que el flujo portal mostró valores más próximos e inferiores en los no supervivientes. Como se vio en el análisis de la hemodinámica individual por grupos, la RN con flujo variable consiguió recuperar el flujo arterial hepático a valores basales e incluso ligeramente superiores. En cambio, solo pudo recuperar parcialmente el flujo portal. En ninguno de ellos las curvas de rendimiento diagnóstico pudieron hallar un valor porcentual discriminante, ya que al igual que con el flujo de bomba, los diferentes puntos de corte mostraron valores similares de falsos positivos y verdaderos positivos.

La magnitud del flujo de bomba variable durante 30 minutos de RN, así como la recuperación porcentual del flujo arterial y portal, no han permitido determinar, en este modelo, un punto de corte con valor pronóstico sobre la supervivencia del injerto.

5.6. Tiempo de Isquemia Caliente

La duración de la IC se considera un factor de riesgo para la disfunción posterior del injerto en el trasplante hepático y, aunque algunos estudios experimentales sugieren que el hígado puede tolerar hasta 60 min de IC,¹²⁶ debe valorarse la lesión añadida por preservación y reperfusión. Los resultados de los distintos estudios experimentales respecto al tiempo máximo de tolerancia del hígado a la isquemia caliente muestran resultados dispares. No obstante, hay que apuntar que dichas diferencias pueden explicarse por el empleo de modelos animales distintos, por el uso o no de métodos para la reversión de la lesión isquémica y porque no todos valoran la función postrasplante en el mismo periodo de tiempo.

Nuestro estudio aplicó en todos los grupos 60 min de IC, 6 horas de IF en solución de UW® y 20 min de fase anhepática en el receptor. Con esas condiciones y el protocolo estándar, es decir RN durante 30 min, con flujo variable y RH, el grupo 30V obtuvo una supervivencia al quinto día del 80%. La supervivencia global teniendo en cuenta todos los grupos del estudio fue del 62%.

Previamente, estudios realizados en cerdos y en perros sometidos a 30 min de IC y tratados mediante RN permitió, a los primeros, la recuperación del ATP en hígados y riñones¹⁹⁵ y a los segundos, la recuperación funcional de corazón, hígado y riñones.³⁷¹ En nuestro grupo experimental, los cerdos sometidos a 20, 30 y 40 min de IC sobrevivieron de forma proporcional a la duración de la IC (100%, 75% y 50% respectivamente) mediante el uso de 30 min de RN y se obtuvo la regeneración de la energía tisular.^{81, 350} Mas tarde, otros trabajos en la misma línea experimental basados en la adición de sustancias citoprotectoras durante la RN, en hígados sometidos a 40 min de IC, mostraron supervivencias del grupo control (sin tratamiento) del 60% y de los grupos “tratamiento” del 80% en cada uno.^{207, 208, 210}

En nuestro estudio, a pesar de haber incrementado el tiempo de IC a 60 min, no hallamos una supervivencia global inferior a la obtenida después de 40 min de IC (50⁸¹ y 60%^{207, 209, 210} respectivamente). Si tenemos en cuenta la supervivencia por grupos de estudio, el primer hecho relevante es no haber hallado diferencias significativas entre ellos, en segundo lugar, que solo el grupo 30B mostró una supervivencia inferior al 50% (37,5%) y en tercer lugar, que la supervivencia máxima correspondió al grupo control (80%). Teniendo en cuenta que el flujo de bomba utilizado en normotermia fue de 1,2 L/min/m² y asumiendo que era insuficiente para mantener el metabolismo aerobio porque estaba muy por debajo del gasto cardiaco, se podría pensar que tampoco podría revertir la lesión causada previamente por la IC, lo que podría justificar dicho resultado. Asumiendo que el escaso tamaño de la muestra puede ser responsable de esta disparidad de resultados habría que tener en cuenta que, de forma global, los datos analíticos de lesión hepatocitaria, endotelial o histológica no han hallado peores resultados que los de estudios previos^{81, 207, 209, 210} por lo que no puede negarse que la RN es eficaz incluso tras 60 min de IC en la recuperación hepática. Los factores que han contribuido a la alta supervivencia global en este estudio pueden explicarse, además de por la eficacia de la RN en la reversión del daño isquémico, por el perfeccionamiento de la técnica quirúrgica, que ha permitido trabajar en el receptor con un tiempo medio de fase anhepática de 20 min y un sangrado no superior a 250 mL, así como un tiempo relativamente corto de preservación estática en frío (6h) y al empleo de la solución de UW®. No obstante, como la evaluación se realizó solo hasta el quinto día postrasplante las conclusiones estarían notablemente limitadas.

Otros estudios experimentales con modelos murinos y tiempos crecientes de IC evaluaron la función postrasplante a más largo plazo y establecieron el límite de la viabilidad hepática en 45 minutos. Estos trabajos, basándose en criterios histológicos, de ultraestructura

de organelas intracelulares, de distribución de la perfusión y de supervivencia a corto y largo plazo, establecieron lesiones reversibles histológicas, celulares, mitocondriales y la actividad de la ATP-asa en función del tiempo de IC. Las lesiones se exacerbaron entre las 6 - 24 h post-reperfusión y comenzaron a remitir a las 48 horas post-reperfusión. Con 45 min de IC quedaría establecido el límite de viabilidad hepática y con 60 min de IC el daño sería irreversible.³⁷² Con 30 min de IC la supervivencia fue prolongada (1 semana: 83%, 1 mes: 58% y 3 meses: 50%), mientras que con 60 min la supervivencia a la semana fue del 8% y nula posteriormente.^{132 373} Ninguno de estos modelos utilizó técnicas de reversión de la lesión por IC, emplearon un tiempo de IF de 50 min, una fase anhepática de 20 min y usaron como solución preservadora Ringer Lactato a 4°C; todo ello pudo condicionar una viabilidad disminuida con tiempos mas bajos de IC.

Estudios experimentales con un modelo porcino de DCP y tiempos crecientes de IC han cifrado la viabilidad en tiempos máximos de 15,¹²⁷ 30,¹²⁸ y 60 min.¹²⁶ Mientras que Takada halló una supervivencia a los 4 días del 100% en hígados sometidos a 60 min de IC,¹²⁶ Qing demostró que la supervivencia a la semana fue del 100% al seleccionar tiempos de IC e IF inversamente proporcionales, es decir, solo los hígados con tiempos muy bajos de IC (10 min) permitieron tiempos de IF tan prolongados como 20 horas y con 30 min de IC, la IF debió reducirse a 6 h.¹²⁸ En cambio Monbaliu halló una supervivencia nula cuando los hígados superaron los 15 min de IC.¹²⁷ La baja tolerancia a tiempos relativamente cortos de IC podría deberse a que en ninguno de los trabajos mencionados se utilizaron previamente técnicas de recuperación del injerto, al empleo secuencial de tiempos prolongados de IF y a la utilización de diferentes soluciones preservadoras.

Los estudios experimentales que han utilizado métodos de perfusión para revertir la lesión por IC se han mostrado útiles en la recuperación de hígados sometidos a diferentes

tiempos de IC. En estos estudios tampoco se han hallado resultados concluyentes y, al igual que se mencionó anteriormente, ello podría explicarse en parte por la variabilidad del modelo animal, por las diferentes consideraciones en la evaluación de la viabilidad, por el tiempo de IF, por el tipo de las soluciones de preservación utilizadas y por la diferencia en los tiempos de la aplicación de los métodos de perfusión.^{125, 133, 196, 240, 250}

De todo ello podría concluirse que la viabilidad del injerto hepático de donante a corazón parado, tras producirse una lesión por isquemia caliente, se hallaría determinada solo en parte por este hecho, ya que el tiempo límite estaría condicionado por otros factores como el sistema de obtención y preservación de los órganos y la participación en ambos de estrategias eficaces en la reversibilidad de las lesiones iniciales por isquemia caliente. En ese sentido, los estudios actuales muestran que parece tener mayor relevancia el método utilizado en la recuperación de los órganos que el tiempo de isquemia en sí.

* * * * *

6. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos puede concluirse que:

1. Durante la RN, el flujo arterial hepático, el flujo portal y el flujo hepático total dependieron de la magnitud del flujo de bomba aplicado. La variabilidad de los flujos vasculares y la eficacia de la RN están determinadas fundamentalmente por la magnitud del flujo de bomba y no por el tipo de flujo utilizado.
2. El flujo de bomba óptimo debería tener una magnitud superior o igual a 2,4 L/min/m² evitando las oscilaciones asociadas al retorno venoso.
3. La magnitud del flujo de bomba modificó el contenido de oxígeno portal y hepático total y tuvo una relación directamente proporcional con el aporte e inversamente proporcional con la extracción hepática de oxígeno.
4. Durante la RN, la magnitud del flujo de bomba determinó de manera inversamente proporcional el daño hepatocitario, endotelial y biliar, constándose a nivel bioquímico e histológico. El flujo de bomba constante podría tener un efecto beneficioso sobre la lesión endotelial, sobre la recuperación de los nucleótidos de adenina y el descenso de sus productos de degradación, sin que la histología pueda confirmarlo.
5. **La prolongación de la RN a 60 minutos** conllevó un descenso progresivo del flujo de bomba y de los flujos vasculares hepáticos que respondió a la reposición de volemia sin afectación del metabolismo de oxígeno.

6. **La prolongación de la RN a 60 minutos** mejoró la calidad del injerto hepático a nivel del aclaramiento del ácido hialurónico, la recuperación de los nucleótidos de adenina, el descenso de la xantina y de las transaminasas. La histología corroboró una lesión menos severa al quinto día postrasplante.
7. **La supresión del periodo de recirculación hipotérmica** mejoró la calidad del injerto hepático, al reducir la lesión hepatocitaria, endotelial y la xantina. Las variables histológicas estudiadas corroboraron los hallazgos analíticos.
8. **La utilización de dobutamina** durante la recirculación permitió aumentar el flujo hepático total a expensas del flujo portal, sin afectar al flujo arterial hepático.
9. **La utilización de dobutamina** durante la recirculación incrementó el aporte, el consumo y la extracción hepática de oxígeno, sin modificar los contenidos, lo cual se relaciona con el aumento del flujo hepático total a expensas del flujo portal.
10. **La adición de dobutamina durante la recirculación** mejoró la calidad del injerto hepático objetivándose un efecto beneficioso precoz en la recuperación del aclaramiento del ácido hialurónico, los nucleótidos de adenina y la disminución de xantina. También se observó un efecto beneficioso tardío sobre la lesión hepatocitaria por el descenso de las trasaminasas y los marcadores histológicos.
11. La RN ha demostrado ser útil en la recuperación de injertos hepáticos en este modelo experimental de DCP cuando el tiempo de isquemia caliente es de 60

minutos. Ello ha permitido obtener una supervivencia media del 62% y una supervivencia por grupos del 80% en el control, del 75% en el grupo 30 NF, del 62,5% en los grupos 30 A y 30 DBT, siendo la más baja la del grupo 30 B, del 37,5%, dato que está en concordancia con la hipótesis inicial.

12. Durante la recirculación normotérmica, el flujo de bomba, el flujo arterial hepático y el flujo portal hepático mostraron valores más altos en los supervivientes que en los no supervivientes, sin embargo, no se halló ningún valor discriminante en ninguna de las variables mencionadas que fuese predictivo de la supervivencia.

Finalmente y en vista de lo anterior puede decirse que la recuperación de los injertos hepáticos obtenidos de donantes porcinos a corazón parado, tras 60 minutos de isquemia caliente, mediante recirculación normotérmica, con el uso de un sistema de derivación cardiopulmonar, se ha optimizado con la utilización por separado de flujos de bomba altos, la prolongación del periodo de recirculación a 60 minutos, la supresión de la recirculación hipotérmica y la administración de dobutamina.

Adendum: Durante la realización de esta tesis y hasta la fecha se han llevado a cabo en el Hospital Clinic 18 trasplantes hepáticos procedentes de donante a corazón parado utilizando la recirculación normotérmica como método de recuperación de los injertos. Parte de los resultados han sido ya publicados en 2007⁹³ y confirman la idoneidad de esta metodología para la obtención de hígados de donantes a corazón parado. Ello es lo que nos alenta a seguir mejorando en este camino.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Ortiz Monasterio F. Gaspare Tagliacozzi: cirujano del Renacimiento. Elementos 2001; 42 (8): 33-38.
2. [http: www.historiadelamedicina.org/carrel.html](http://www.historiadelamedicina.org/carrel.html)
3. [http:// medicine.4to.com/nobel1930.html](http://medicine.4to.com/nobel1930.html)
4. [http:// www.chu.es/oivmoral/IOtema1.html](http://www.chu.es/oivmoral/IOtema1.html)
5. DeBakey ME. A simple continuous-flow blood transfusion instrument. N. Orleans Med Surg J. 1934: 87:386.
6. Welch CS. A note on transplantation of the whole liver in dogs. Transplant Bull. 1955; 2: 54-55.
7. Goodrich EO, Welch HF, Nelson JA, et al. Homotransplantation of the canine liver. Surgery. 1956; 39: 244.
8. Calne RY, White HJO, Yoffa DE, et al. Observation of orthotopic liver transplantation in the pig. Br Med J. 1967; 2: 478.
9. Calne RY, White HJO, Binns RM, et al. Immunosuppressive effects of the orthotopically transplanted porcine liver. Transplant Proc. 1969; 1: 321.
10. Starzl T, Marchioro T, Von Kanlla G, Brittain R, Waddel W. Homotransplantation of the liver in humans. Surg Gynecol Obstet. 1963; 117: 659.
11. Calne R, Williams R. Liver transplantation in man. Observations on technique and organization in five cases. Brit Med J. 1968; 4: 535.
12. Borel J. Effects of the new antilymphocytic peptide cyclosporine A in animals. Immunology. 1977; 32: 1017-1025.
13. Borel JF. Cyclosporin. A present experimental status. Transplant Proc. 1981; 13:344.
14. Shaw BW Jr., Martin DJ, Marquez JM, et al. Veno-venous bypass in clinical liver transplantation. Ann Surg. 1984; 200: 524-534.

15. Margarit C, Jaurieta E, Maestre P. Trasplante hepático ortotópico en una paciente con hepatocarcinoma. *Rev Esp Enferm Apar Dig.* 1984; 66: 234-239.
16. Organización Nacional de Trasplantes. <http://www.ONT.es/esp/estadísticas/hígado>
17. Russell PS. Understanding resource use in liver transplantation. *JAMA.* 1999. 281:1431-1432.
18. Neumann UP, Berg T, Bahra M, et al. Long-term outcome of liver transplants for chronic hepatitis C: a 10-year follow-up. *Transplantation.* 2004; 77: 226-231.
19. Manyalich M, Cabrer C, Sánchez R, Valero R, López-Coll S, Paredes D. Expanded donor pool. En J.L. Touraine et al. editors. *Organ Allocation.* Kluwer Academic Publishers. 1998. p. 147-166.
20. Report of the Ad-hoc Committee of The Harvard Medical School to Examine the Definition of Brain Death. A definition of Irreversible Coma. *JAMA.* 1968; 205:337-340.
21. Casavilla A, Mazariegos G, Fung JJ. Cadaveric liver donors: What are the limits? *Transplant Proc.* 1996; 28: 21-23.
22. López-Navidad A, Caballero F. Extended criteria for organ acceptance. Strategies for achieving organ safety and for increasing organ pool. *Clin Transplant.* 2003; 17: 308-324.
23. Scuderi V, Ceriello A, Maida P, et al. The marginal donor: a single center experience in orthotopic liver transplantation. *Transplant Proc.* 2006; 38: 1069-1073.
24. Kizilisik TA, Al-Sebayel M, Ramírez CB, et al. Analysis of donor criteria and its implications on the outcome of clinical liver transplants. *Transplant Proc.* 1997; 29: 2836-2838

25. Pokorny H, Langer F, Herkner H, et al. Influence of cumulative number of marginal number of marginal donor criteria on primary organ dysfunction in liver recipients. *Clin Transplant*. 2005; 19:532-536.
26. De Carlis L, Sansalone CV, Rondinara GF, et al. Is the use of marginal donors justified in liver transplantation? Analysis of results and proposal of modern criteria. *Transpl Int*. 1996; 9 Suppl 1: S414- 417.
27. Fishbein TM, Fiel M I, Emre S, et al. Use of livers with microvesicular fat safely expands the donor pool. *Transplantation*. 1997; 64: 248-251.
28. Briceño J, López-Cillero P, Rufián S. Impact of marginal quality donors on the outcome of liver transplantation. *Transplant Proc*. 1997; 29: 477-80.
29. Plotkin JS, Ridge L, Kuo PC, et al. Extending the boundaries of acceptable organ donors: a means of expanding the donor pool for liver transplantation. *Transplant Proc*. 1997; 29: 3288.
30. Tisone G, Manzia TM, Zazza S, et al. Marginal donors in liver transplantation. *Transplant Proc*. 2004; 36: 525-526.
31. Washburn WK, Johnson LB, Lewis WD, et al. Graft function and outcome of older (> or = 60 years) donor livers. *Transplantation*. 1996; 61: 1062-1066.
32. Zhao Y, Lo CM, Liu CL et al. Use of elderly donors (>60 years) for liver transplantation. *Asian J Surg*. 2004; 27:114-119.
33. Borchert D, Glanemann M, Mogl M. Older liver graft transplantation, cholestasis and synthetic graft function. *Transpl Int*. 2005; 18: 709-715.
34. Mor E, Shmueli N, Bar-Nathan E, et al. Utilization of liver allografts from donors older than 60 in Israel: benefits and risks. *Transplant Proc*. 1997; 29: 3079-3080.

35. Briceño J, Solorzano G, Pera C. A proposal for scoring marginal liver grafts. *Transpl Int.* 2000; 13 Suppl 1: S249-252.
36. Briceño J, Marchal T, Padillo J, et al. Influence of marginal donors on liver preservation injury. *Transplantation.* 2002; 74: 522-526.
37. Renz JF, Kin C, Kinkhabwala M, et al. Utilization of extended donor criteria liver allografts maximizes donor use and patient access to liver transplantation. *Ann Surg.* 2005; 242: 556-563.
38. Takei Y, Ikeda S, Ikegami T, et al. Ten years of experience with liver transplantation for familial amyloid polyneuropathy in Japan: Outcomes of living donor liver transplantation. *Internal Medicine.* 2005; 44: 1151- 1156.
39. Cerdà J, Calleja J, Vázquez J. Técnicas inusuales: trasplante reducido, segmentario y bipartición hepática. En: J Berenguer, P Parrilla, editores. *Trasplante hepático.* Elba SA, 1999. p. 139-143
40. Strong RW, Lynch SV, Ong TH, et al. Successful liver transplantation from a living donor to her son. *N Engl J Med.* 1990; 322: 1505-1507.
41. Trotter JF, Wachs M, Everson GT, et al. Adult-to-adult transplantation of the right hepatic lobe from a living donor. *N Engl J Med.* 2002; 346: 1074-1082.
42. Renz JF, Yersiz H, Reichert PR, et al. Split-liver transplantation. A review. *Am J Transplant.* 2003; 3: 1323- 1335.
43. de Ville de Goyet J. Split liver transplantation in Europe. 1983-93. *Transplantation.* 1995; 59: 1371-1376.
44. Wiesner RH, Rakela J, Ishitani MB, et al. Recent advances in liver transplantation. *Mayo Clinic Proceedings.* 2003; 78: 197-210.
45. Calne RY. Renal transplantation in man. A review. *Br J Surg.* 1964; 51: 282-283.

46. Borel JF, Feurer C, Gubler HU, et al. Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocyte agent. *Agents Actions*. 1976; 468-475.
47. National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: Liver Transplantation. June 20-23. *Hepatology*. 1984; 4: 1075.
48. Iwatsuki S, Starzl TE, Todo S, et al. Experience in 1000 liver trasplants under cyclosporine-steroid therapy: a survival report. *Transplant Proc*. 1988; 20:498-504.
49. Todo S, Fung J, Starzl TE. Simple-center experience with primary orthotopic liver transplantation with FK 506 immunosuppression. *Ann Surg*. 1994; 220: 297-308.
50. Mc Alister VC, Haddad E, Renouf E, et al. Cyclosporin versus tacrolimus as primary immunosuppressant after liver transplantation: a meta-analysis. *Am J Transplant*. 2006; 6: 1578-1585
51. Bardsley-Elliot A, Noble S, Foster RH. Mycophenolate mofetil: a review of its use in the management of solid organ transplantation. *Bio Drugs*. 1999; 12: 363-410.
52. Jain A, Kashyap R, Dodson F, et al. A prospective randomized trial of tacrolimus and prednisone versus tacrolimus, prednisone and mycophenolate mofetil in primary adult liver transplantation: a single center report. *Transplantation*. 2001; 72: 1091- 1097.
53. Watson CJ, Friend PJ, Jamieson NV, et al. Sirolimus: a potent new immunosuppressant for liver transplantation. *Transplantation*. 1999; 67: 505-509.
54. Kniepeiss D, Iberer F, Grasser B, et al. Sirolimus and mycophenolate mofetil after liver transplantation. *Transpl Int*. 2003; 16: 504-509.
55. Reich DJ, Clavien PA, Hodge EE, et al. Mycophenolate mofetil for renal dysfunction in liver transplant recipients on cyclosporine or tacrolimus: randomized, prospective, multicenter pilot study results. *Transplantation*. 2005; 80: 18-25.

-
56. Padbury RT, Toogood GJ, McMaster P. Withdrawal of immunosuppression in liver allograft recipients. *Liver Transpl Surg.* 1998; 4: 242-248.
 57. McAlister VC, Peltekian KM, Malatjalian DA, et al. Orthotopic liver transplantation using low-dose tacrolimus and sirolimus. *Liver Transpl.* 2001; 7: 701-708.
 58. Perry I, Neuberger J. Immunosuppression: towards a logical approach in liver transplantation. *Clin Exp Immunol.* 2005; 139: 2-10.
 59. Rahman TM, Hodgson HJ. Review article: liver support systems in acute hepatic failure. *Aliment Pharmacol Ther.* 1999; 13:1255-1272.
 60. Hughes RD, Williams R. Use of bioartificial and artificial liver support devices. *Semin Liver Dis.* 1996; 16: 435-444.
 61. Adham M. Extracorporeal liver support: waiting for the deciding role. *ASAIO J.* 2003; 49: 621-632
 62. Liu JP, Gluud LL, Als-Nielsen B, Gluud C. Sistemas artificiales y bioartificiales de apoyo para la insuficiencia hepática (Revisión Cochrane traducida). En: La Biblioteca Cochrane Plus, 2005 Número 2. Oxford: Update Software Ltd. Disponible en: <http://www.update-software.com>
 63. Statements and Recommendations on Non-Heart-Beating Donors. *ETCO-Newsletter.* November 1995; 13: 69.
 64. Kootstra G, Daemen JHC, Oomen APA. Categories of non-heart-beating donors. *Transplant Proc.* 1995; 27: 2893-2894.
 65. 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.

-
66. Kootstra G, Arnold RM, Bos MA, et al. Round table discussion on non-heart beating donors. *Transplant Proc.* 1995; 27: 2935-2939.
 67. Real Decreto 426/1980, de 22 de febrero que desarrolla la Ley 30/1979 de 27 de Octubre, sobre extracción y trasplante de órganos.
 68. Documento de Consenso Español sobre donación de órganos en asistolia de 27 de Noviembre de 1995.
 69. Real Decreto 2070/1999, de 30 de Diciembre. BOE nº 3, 4 de enero 2000: 179-190.
 70. Arias-Díaz J, Alvarez J, del Barrio MR, Balibrea JL. Non-heart beating donation: Current state of the art. *Transplant Proc.* 2004; 36: 1891-1893.
 71. Sánchez-Fructuoso AI, Marques MM, Prats D, et al. Non-heart-beating donors: experience from the Hospital Clínico of Madrid. *J Nephrol.* 2003; 16: 387-392.
 72. Kootstra G. The asystolic or non-heart beating donor. *Transplantation.* 1997; 63: 917-921.
 73. Kokkinos C, Antcliffe D, Nanidis T, et al. Outcome of kidney transplantation from nonheart-beating versus heart-beating cadaveric donors. *Transplantation.* 2007; 83: 1193-1199.
 74. Daemen JW, Kootstra G, Wijnen RM, et al. Non heart-beating donors: the Maastricht experience. *Clin Transpl.* 1994; 303-316.
 75. Nicholson ML, Metcalfe MS, White SA, et al. A comparison of the results of renal transplantation from non-heart beating, conventional cadaveric and living donors. *Kidney Int.* 2000; 58: 2585-2591.
 76. Pratschke J, Koala G, Wilhem MK, et al. Improvements in early behavior of rat kidney allografts after treatment of the brain-dead donor. *Ann Surg.* 2001; 234: 732-740.

-
77. Gasser M, Waaga AM, Kist-Van Holthe, et al. Normalization of brain death-induced injury to rat renal allografts by recombinant soluble P-Selectin glycoprotein ligand. *J Am Soc Nephrol.* 2002; 13: 1937-1945.
 78. van der Hoeven J, Ter Horst GJ, Molema G, et al. Effects of brain death and hemodynamic status on function and immunologic activation of the potential donor liver in the rat. *Ann Surg.* 2000; 232: 804-813.
 79. Ploeg RJ, D'Alessandro AM, Knechtle SJ, et al. Risk factors for primary dysfunction after liver transplantation. A multivariate analysis. *Transplantation.* 1993; 55: 807-813.
 80. Serracino-Inglott F, Habib NA, Mathie RT. Hepatic-ischemia reperfusion injury. *Am J Surg.* 2001; 181: 160- 166.
 81. García-Valdecasas JC, Tabet J, Valero R, et al. Evaluation of ischemic injury during liver procurement from non-heart-beating donors. *Eur Surg Res.* 1999; 31: 447-456.
 82. 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.
 83. Vilca Melendez H, Rela M, Murphy G, et al. Assessment of graft function before liver transplantation: quest for the lost ark? *Transplantation.* 2000; 70: 560-565.
 84. Manzarbeitia CY, Ortiz JA, Jeon H, et al. Long-term outcome of controlled, non-heart-beating donor liver transplantation. *Transplantation.* 2004; 78: 211-215.
 85. Abt PL, Desai NM, Crawford MD, et al. Survival following liver transplantation from non-heart beating donors. *Ann Surg.* 2004; 239: 87-92.
 86. Yanaga K, Kakizoe S, Ikeda T, et al. Procurement of liver allografts from non-heart-beating donors. *Transplant Proc.* 1990; 22: 275-278.

-
87. Reich DJ, Muñoz 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.
 88. Muiesan P, Girlanda R, Jassem W, et al. Single-center experience with liver transplantation from controlled non-heartbeating donors. *Ann Surg*. 2005; 242: 732-738.
 89. Casavilla A, Ramírez C, Shapiro D, et al. Liver and kidney transplantation from non-heart beating donors: The Pittsburgh experience. *Transplant Proc*. 1995; 27: 710-712.
 90. Otero A, Gómez-Gutierrez M, Suárez F, et al. Liver transplantation from Maastricht category 2 non-heart-beating donors. *Transplantation*. 2003; 76: 1068-1073.
 91. D'Alessandro AM, Hoffmann RM, Knechtle SJ, et al. Liver transplantation from controlled non-heart-beating donors. *Surgery*. 2000; 128: 579-588.
 92. Muiesan P, Jassem W, Girlanda R, et al. Segmental liver transplantation from non-heart beating donors- an early experience with implications for the future. *Am J Transplant*. 2006; 6: 1012-1016.
 93. Fondevila C, Hesseimer 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.
 94. Mateo R, Cho Y, Singh G, et al. Risk factors for graft survival after liver transplantation from donation after cardiac death donors: an analysis of OPTN/UNOS data. *Am J Transplant*. 2006; 6: 791-796.
 95. Lee KW, Simpkins CE, Montgomery RA, et al. Factors affecting graft survival after liver transplantation from donation after cardiac death donors. *Transplantation*. 2006; 82: 1683-1688.

-
96. Gómez M, García-Buitron JM, Fernandez-García A, et al. Liver transplantation with organs from non-heart-beating donors. *Transplant Proc.* 1997; 29: 3478-3479.
 97. Hong HQ, Yin HR, Zhu SL, et al. The results of transplant livers from selected non-heart-beating cadaver donors. *Hiroshima J Med Sci.* 1991; 40: 87-91.
 98. Greif F, Bronsther OL, Van Thiel DH, et al. The incidence, timing and management of biliary tract complications after orthotopic liver transplantation. *Ann Surg.* 1994; 219: 40-45.
 99. Amador A, Charco R, Martí J, et al. Mil trasplantes hepáticos en el Hospital Clínic i Provincial de Barcelona. *Cir Esp.* 2005; 78: 231-237.
 100. Sánchez-Urdazpal L, Gores G, Ward E, et al. Ischemic-type biliary complications after orthotopic liver transplantation. *Hepatology.* 1992; 16: 49-53.
 101. Fukumori T, Kato T, Levi D, et al. Use of older controlled non-heart-beating donors for liver transplantation. *Transplantation.* 2003; 75: 1171-1174.
 102. Clavien PA, Harvey PR, Strasberg SM. Preservation and reperfusion injuries in liver allografts. An overview and synthesis of current studies. *Transplantation.* 1992; 53: 957-978.
 103. Belzer FO, Southard JH. Principles of solid-organ preservation by cold storage. *Transplantation.* 1988; 45: 673-676.
 104. Stefanovich P, Ezzell RM, Sheehan SJ, et al. Effects of hypothermia on the function, membrane integrity, and cytoskeletal structure of hepatocytes. *Cryobiology.* 1995; 32: 389-403.
 105. Hansen TN, Dawson PE, Brockbank KG. Effects of hypothermia upon endothelial cells: mechanisms and clinical importance. *Cryobiology.* 1994; 31: 101-106.

-
106. Carini R, De Cesaris MG, Bellomo G, et al. Intracellular Na⁺ accumulation and hepatocyte injury during cold storage. *Transplantation*. 1999; 68: 294-297.
 107. Akbar S, Minor T. Significance and molecular targets of protein kinase A during cAMP-mediated protection of cold stored liver grafts. *Cell Mol Life Sci*. 2001; 58: 1708-1714.
 108. Rauen U, Polzar B, Stephan H, et al. Cold-induced apoptosis in cultured hepatocytes and liver endothelial cells: mediation by reactive oxygen species. *FASEB J*. 1999; 13: 155-168.
 109. Rauen U, Petrat F, Li T, et al. Hypothermia injury/cold-induced apoptosis—evidence of an increase in chelatable iron causing oxidative injury in spite of low O₂⁻ /H₂O₂ formation. *FASEB J*. 2000; 14: 1953-1963.
 110. Ikeda T, Yanaga K, Kishikawa K, et al. Ischemic injury in liver transplantation: difference in injury sites between warm and cold ischemia in rats. *Hepatology*. 1992; 16: 454-461.
 111. Caldwell-Kenkel JC, Thurman RG, Lemasters JJ. Selective loss of nonparenchymal cell viability after cold ischemic storage of rat livers. *Transplantation*. 1988; 45: 834-37.
 112. Miyagawa Y, Imamura H, Soeda J, et al. Fate of hepatocyte and sinusoidal lining cell function and kinetics after extended cold preservation and transplantation of the rat liver. *Liver Transpl*. 2002; 8: 370-381.
 113. McKeown CM, Edwards V, Philips MJ, et al. Sinusoidal lining cell damage: the critical injury in cold preservation of liver allografts in the rat. *Transplantation*. 1988; 46: 178-191.

-
114. Huet PM, Nagaoka MR, Desbiens G, et al. Sinusoidal endothelial cell and hepatocyte death following cold ischemia-warm reperfusion of the rat liver. *Hepatology*. 2004; 39: 1110-1119.
 115. Lu Z, Dono K, Gotoh K, et al. Participation of autophagy in the degeneration process of rat hepatocytes after transplantation following prolonged cold preservation. *Arch Histol Cytol*. 2005; 68: 71-80.
 116. Imamura H, Brault A, Huet PM. Effects of extended cold preservation and transplantation on the rat liver microcirculation. *Hepatology*. 1997; 25: 664-671.
 117. Kalayoglu M, Sollinger HW, Stratta RJ, et al. Extended preservation of the liver for clinical transplantation. *Lancet*. 1988; 1: 617-619.
 118. Gulian JM, Dalmaso C, Desmoulin F, et al. Twenty-four-hour hypothermic preservation of rat liver with Euro-Collins and UW solutions. A comparative evaluation by ³¹P NMR spectroscopy, biochemical assays, and light microscopy. *Transplantation*. 1992; 54: 599-603.
 119. Belzer FO, D'Alessandro AM, Hoffmann RM, et al. The use of UW solution in clinical transplantation. A 4-year experience. *Ann Surg*. 1992; 215: 579-585.
 120. Adam R, Bismuth H, Diamond T, et al. Effect of extended cold ischemia with UW solution on graft function after liver transplantation. *Lancet*. 1992; 340:1373-1376.
 121. Sutto F, Brault A, Lepage R, et al. Metabolism of hyaluronic acid by liver endothelial cells: effect of ischemia-reperfusion in the isolated perfused rat liver. *J Hepatol* 1994; 20: 611-616.
 122. Janssen H, Janssen PH, Broelsch CE. UW is superior to Celsior and HTK in the protection of human liver endothelial cells against preservation injury. *Liver Transpl*. 2004; 10: 1514-23.

123. Fujii Y, Johnson ME, Gores GJ. Mitochondrial dysfunction during anoxia/reoxygenation injury of liver sinusoidal endothelial cells. *Hepatology*. 1994; 20: 177-185.
124. Jurado F, Buján J, Mora NP, et al. A histopathological study of anoxic-resuscitated liver allografts. *Histol Histopathol*. 1997; 12: 123-133.
125. Schön MR, Hunt CJ, Pegg DE et al. The possibility of resuscitation livers after warm ischemia injury. *Transplant Proc*. 1991; 23: 2456-2458.
126. Takada Y, Taniguchi H, Fukunaga K et al. Hepatic allograft procurement from non-heart-beating donors. *Transplantation*. 1997; 63: 369-73.
127. 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.
128. Qing DK. Prolonging warm ischemia reduces the cold preservation limits of liver grafts in swine. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2006; 5: 515-520.
129. Tabet J, García-Valdecasas JC, Rull R, et al. Non-heart-beating donor pigs: the feasibility of liver donation. *Transplant Proc*. 1997; 29: 1374- 1375.
130. Tabet J, García-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.
131. López-Boado MA, García-Valdecasas JC, Ordi J, et al. Histological changes during and after liver transplantation from non-heart-beating donor pig. *Transplant Proc*. 1997; 29: 3471.
132. He XS, Ma Y, Wu LW, et al. Safe time to warm ischemia and posttransplant survival of liver graft from non-heart-beating donors. *World J Gastroenterol*. 2004; 10: 3157-3160.

-
133. Richter S, Yamauchi J, Minor T, et al. Effect of warm ischemia time and organ perfusion technique on liver microvascular preservation in a non-heart-beating rat model. *Transplantation*. 2000; 69: 20-24.
134. Mochida S, Arai M, Ohno A, et al. Oxidative stress in hepatocytes and stimulatory state of Kupffer cells after reperfusion differ between warm and cold ischemia in rats. *Liver*. 1994; 14: 234-240.
135. Gasbarrini A, Borle AB, Farghali H, et al. Effect of anoxia on intracellular ATP, Na⁺i, Ca²⁺i, Mg²⁺i, and cytotoxicity in rat hepatocytes. *J Biol Chem*. 1992; 267: 6654-6663.
136. Marzi I, Zhi ZN, Zimmerman FA. Xanthine and hypoxanthine accumulation during storage may contribute to reperfusion injury following liver transplantation in the rat. *Transplant Proc*. 1989; 21: 1319-1320.
137. Carini R, Autelli R, Bellomo G, et al. Alterations of cell volume regulation in the development of hepatocyte necrosis. *Exp Cell Res*. 1999; 248: 280-293.
138. Bronk SF, Gores GJ. Efflux of protons from acidic vesicles contributes to cytosolic acidification of hepatocytes during ATP depletion. *Hepatology*. 1991; 14: 626-633.
139. Gores GJ, Nieminen AL, Wray BE, et al. Intracellular pH during "chemical hypoxia" in cultured rat hepatocytes. Protection by intracellular acidosis against the onset of cell death. *J Clin Invest*. 1989; 83: 386-396.
140. Bronk SF, Gores GJ. Acidosis protects against lethal oxidative injury of liver sinusoidal endothelial cells. *Hepatology*. 1991; 14: 150-157.
141. Nishimura Y, Romer LH, Lemasters JJ. Mitochondrial dysfunction and cytoskeletal disruption during chemical hypoxia to cultured rat hepatic sinusoidal endothelial cells: the pH paradox and cytoprotection by glucose, acidotic pH and glycine. *Hepatology*. 1998; 27: 1039-1049.

-
142. Mela L. Mitochondrial function in shock, ischemia and hypoxia. En: Cowlwy RA TB editors. Pathophysiology of shock, anoxia and ischemia. Baltimore: Williams& Wilkins Company 1982. p. 84-94.
143. Jaeschke H, Farhood A. Neutrophil and Kupffer cell-induced oxidant stress and ischemia-reperfusion injury in rat liver. *Am J Physiol.* 1991; 260: G355-G362.
144. Jaeschke H, Farhood A, Bautista AP, et al. Complement activates Kupffer cells and neutrophils during reperfusion after hepatic ischemia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 1993; 264: G801-G809.
145. Colletti LM, Cortis A, Lukacs N, et al. Tumor necrosis factor up-regulates intercellular adhesion molecule 1, which is important in the neutrophil-dependent lung and liver injury associated with hepatic ischemia and reperfusion in the rat. *Shock.* 1998; 10: 182-191.
146. Wanner GA, Ertel W, Muller P, et al. Liver ischemia and reperfusion induces a systemic inflammatory response through Kupffer cell activation. *Shock.* 1996; 5: 34-40.
147. Vollmar B, Richter S, Menger MD. Liver ischemia/reperfusion induces an increase of microvascular leukocyte flux, but not heterogeneity of leukocyte trafficking. *Liver.* 1997; 17: 93-98.
148. Bilzer M, Gerbes AL. Preservation injury of the liver: mechanisms and novel therapeutic strategies. *J Hepatol.* 2000; 32: 508-515.
149. Jaeschke H, Farhood A, Smith CVW. Neutrophils contribute to ischemia-reperfusion injury in rat liver in vivo. *FASEB J.* 1990; 4: 3355-3359.
150. Sawaya DE Jr, Zibari GB, Minardi A, et al. P-Selectin contributes to the initial recruitment of rolling and adherent leukocytes in hepatic venules after ischemia-reperfusion. *Shock.* 1999; 12: 227-232.

-
151. Yadaw SS, Howell DN, Gao W, et al. L-Selectin and ICAM-1 mediate reperfusion injury and neutrophil adhesion in the warm ischemic mouse liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 1998; 275: 1341-1352.
 152. Jaeschke H, Smith CW, Clemens MG, et al. Mechanisms of inflammatory liver injury: adhesion molecules and cytotoxicity of neutrophils. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1996; 139: 213-226.
 153. Iu S, Harvey PRC, Makowka L, et al. Markers of allograft viability in the rat: Relationship between transplantation viability and liver function in the isolated perfused liver. *Transplantation.* 1987; 44: 562-569.
 154. Lichtman SN, Lemasters JJ. Role of cytokines and cytokine-producing cells in reperfusion injury to the liver. *Semin Liver Dis.* 1999; 19: 171-187.
 155. Risby TH, Maley W, Scott RP, et al. Evidence for free radical-mediated lipid peroxidation at reperfusion of human orthotopic liver transplants. *Surgery.* 1994; 115: 94-101.
 156. Sindram D, Porte RJ, Hoffman MR, et al. Synergism between platelets and leukocytes in inducing endothelial cell apoptosis in the cold ischemic rat liver: a Kupffer cell-mediated injury. *FASEB J.* 2001; 15: 1230-1232.
 157. González-Flecha B, Cutrin JC, Boveris A. Time course and mechanism of oxidative stress and tissue damage in rat liver subjected to in vivo ischemia-reperfusion. *J Clin Invest.* 1993; 91: 456-464.
 158. Rhoden E, Pereira-Lima L, Lucas M, et al. The effects of allopurinol in hepatic ischemia and reperfusion: experimental study in rats. *Eur Surg Res.* 2000; 32: 215-222.
 159. Essani NA, McGuire GM, Manning AM, et al. Endotoxin-induced activation of the nuclear transcription factor kappa B and expression of E-selectin messenger RNA in

- hepatocytes, Kupffer cells, and endothelial cells in vivo. *J Immunol.* 1996; 156: 2956-2963.
160. Gu XP, Jiang Y, Xu FT, et al. Effect of cold-ischemia time on nuclear factor- κ B activation and inflammatory response in graft after orthotopic liver transplantation in rats. *World J Gastroenterol.* 2004; 10: 1000-1004.
161. Koo A, Komatsu H, Tao G, et al. Contribution of no-reflow phenom to hepatic injury after ischemia-reperfusion: evidence for a role for superoxide anion. *Hepatology.* 1992; 15: 507-514.
162. Zhang JX, Bauer M, Clemens MG. Vessel- and target cell-specific actions of endothelin-1 and endothelin-3 in rat liver. *Am J Physiol.* 1995; 269: G269-G277.
163. Muller JM, Vollmar B, Menger MD. Pentoxifylline reduces venular leukocyte adherence (“reflow paradox”) but no microvascular “no reflow” in hepatic ischemia-reperfusion. *J Surg Res.* 1997; 71: 1-6.
164. Suematsu M, Wakabayashi Y, Ishimura Y. Gaseous monoxides: a new class of microvascular regulator in the liver. *Cardiovasc Res.* 1996; 32: 679-686.
165. Vollmar B, Glasz J, Leiderer R, et al. Hepatic microcirculatory perfusion failure is a determinant of liver dysfunction in warm ischemia-reperfusion. *Am J Path.* 1994; 145: 1421-1431.
166. Arthur MJ, Bentley IS, Tanner AR. Oxygen-derived free radicals promote hepatic injury in the rat. *Gastroenterology.* 1985; 89: 1114-1122.
167. Post S, Goering M, Otto G, et al. Rapid increase in the activity of enzymes of eicosanoids synthesis in hepatic and extrahepatic tissues after experimental liver transplantation. *Transplantation.* 1991; 51: 1058-1065.

-
168. Moncada S, Higgs A. The L-Arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med.* 1993; 329: 2002-2012.
169. Gaboury J, Woodman R, Granger D, et al. Nitric oxide prevents leukocyte adherence: role of superoxide. *Am J Physiol.* 1993; 265: H862-867.
170. Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S. An L-arginine/Nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990; 87: 5193-5197.
171. Lefer A, Siegfried M, Ma XL. Protection of ischemia-reperfusion injury by sydnonimine NO donors via inhibition of neutrophil-endothelium interactions. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1993; 22 Suppl 7: S27-33.
172. Koepfel TA, Thies JC, Schemmer P, et al. Inhibition of nitric oxide synthesis in ischemia/reperfusion of the rat liver is followed by impairment of hepatic microvascular blood flow. *J Hepatol.* 1997; 27: 163-169.
173. Nilsson B, Yoshida T, Delbro D, et al. Pretreatment with L-arginine reduces ischemia/reperfusion injury. *Transplant Proc.* 1997; 29: 3111-3112.
174. Cottart CH, Do L, Blanc MC, et al. Hepatoprotective effect of endogenous nitric oxide during ischemia-reperfusion in the rat. *Hepatology.* 1999; 29: 809-813.
175. Tsukamoto H. Redox regulation of cytokine expression in Kupffer cells. *Antioxid Redox Signal.* 2002; 4: 741-748.
176. Romanque P, Uribe M, Videla LA. Mecanismos moleculares en el daño por isquemia-reperfusion hepática y en el preconditionamiento isquémico. *Rev Med Chile.* 2005; 133: 469-476.
177. Noble RL. The development of resistance by rats and guinea pigs to amounts of trauma usually fatal. *Am J Physiol.* 1943; 138: 346.

-
178. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*. 1986; 74: 1124-1136.
179. Yoshizumi T, Yanaga K, Soejima Y, et al. Amelioration of liver injury by ischaemic preconditioning. *Br J Surg*. 1998; 85: 1636-1640.
180. Lloris-Carsi JM, Cejalvo D, Toledo-Pereyra LH, et al. Preconditioning: effect upon lesion modulation in warm liver ischemia. *Transplant Proc*. 1993; 25: 3303-3304.
181. Amador A, Grande L, Martí J. Ischemic pre-conditioning in deceased donor liver transplantation: a prospective randomized clinical trial. *Am J Transplant*. 2007; 7: 2180-2189.
182. Peralta C, Closa D, Xaus C, et al. Hepatic preconditioning in rats is defined by a balance of adenosine and xanthine. *Hepatology*. 1998; 28: 768-773.
183. Cutrin JC, Perrelli MG, Cavalieri B, et al. Microvascular dysfunction induced by reperfusion injury and protective effect of ischemic preconditioning. *Free Radic Biol Med*. 2002; 33: 1200-1208.
184. Bolli R. The late phase of preconditioning. *Circulation Res*. 2000; 87: 972-983.
185. Peralta C, Closa D, Hotter G et al. The protective role of adenosine by inducing nitric oxide synthesis in rat liver ischemia preconditioning is mediated by activation of adenosine A2 receptors. *Hepatology*. 1999; 29: 126-132.
186. McKie LD, Bass BL, Dunkin BJ, et al. Nitric oxide mediates the blood flow response to intravenous adenosine in the rabbit. *Circ Shock*. 1994; 43: 103-106.
187. Peralta C, Closa D, Hotter G et al. Liver ischemic preconditioning is mediated by the inhibitory action of nitric oxide on endothelin. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996; 229: 264-270.

-
188. Peralta C, Prats N, Xaus C, et al. Protective effect of liver ischemic preconditioning on liver and lung injury induced by hepatic ischemia-reperfusion in the rat. *Hepatology*. 1999; 30: 1481-1489.
189. Bauer M, Bauer I. Heme oxygenase-1: redox regulation and the role in the hepatic response to oxidative stress. *Antiox Redox Signal*. 2002; 4: 749-758.
190. Amersi F, Buelow R, Kato H, et al. Upregulation of heme oxygenase-1 protects genetically fat Zucker rat livers from ischemia/reperfusion injury. *J Clin Invest*. 1999; 104: 1631-1639.
191. Dorman RB, Bajt ML, Farhood A, et al. Heme oxygenase-I induction in hepatocytes and non-parenchymal cells protects against liver injury during endotoxemia. *Comparative Hepatology*. 2004, 3 (Suppl I): S42.
192. Rensing H, Bauer I, Kubulus D, et al. Heme oxygenase-1 gene expression in pericentral hepatocytes through β 1-adrenoceptor stimulation. *Shock*. 2004; 21: 376-387.
193. Lai IR, Ma MC, Chen CF, Chang KJ. The protective role of heme-oxygenase 1 on the liver after hypoxic preconditioning in rats. *Transplantation*. 2004; 77: 1004-1008.
194. Rensing H, Bauer I, Zhang JX, et al. Endothelin-1 and heme oxygenase-1 as modulators of sinusoidal tone in the stress-exposed rat liver. *Hepatology*. 2002; 36: 1453-1465.
195. Arias Díaz J, Alvarez J, Gómez M, et al. Changes in adenina nucleotides and lipid hydroperoxides during normothermic cardiopulmonary bypass in a porcine model of type II non-heart-beating donor. *Transplant Proc*. 1997; 29: 3486-3487.

-
196. Endoh T, Ohkohchi N, Katoh H et al. Graft conditioning of liver in non heart-beating donors by an artificial heart and lung machine in situ. *Transplant Proc.* 1996; 20: 110-115.
197. Hoshino T, Koyama I, Taguchi Y et al. A new method for safe liver transplantation from non-heart beating donors: In situ liver oxygenation by cardiopulmonary bypass. *Proceedings of World Congress of the Transplantation Society.* Kyoto. Japan. 1994: 280.
198. Net M, Valero R, Almenara R, et al. The effect of normothermic recirculation is mediated by ischemic preconditioning in NHBD liver transplantation. *Am J Transplant.* 2005; 5: 2385-2392.
199. Barros Schelotto HPL. Papel del óxido nítrico durante la recirculación normotérmica en el trasplante hepático experimental en cerdos con donantes a corazón parado. 2001. Tesis Doctoral. Universitat de Barcelona.
200. Richter S, Yamauchi J, Minor T, et al. Heparin and phentolamine combined, rather than heparin alone, improves hepatic microvascular procurement in a non-heart-beating donor rat-model. *Transpl Int.* 2000; 13: 225-229.
201. Astarcioglu H, Karademir S, Unek T, et al. Beneficial effects of pentoxifylline pre-treatment in non-heart-beating donors in rats. *Transplantation.* 2000; 69: 93-98.
202. Ikegami T, Nishizaki T, Hiroshige S, et al. Experimental study of a type 3 phosphodiesterase inhibitor on liver graft function. *Br J Surg.* 2001; 88: 59-64.
203. Tsukamoto S, Ohkohchi N, Fukumori T, et al. Elimination of Kupffer cells and nafamostat mesilate rinse prevent reperfusion injury in liver grafts from agonal non-heart-beating donors. *Transplantation.* 1999; 67: 1396-1403.

-
204. Palmer RMJ, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*. 1988; 333: 664-666.
205. Calabrese F, Valente M, Pettenazzo E, et al. The protective effects of L-arginine after liver ischemia/reperfusion injury in a pig model. *J Pathol*. 1997; 183: 477-485.
206. Schemmer P, Bradford BU, Rose ML, et al. Intravenous glycine improves survival in rat liver transplantation. *Am J Physiol*. 1999; 276: 924-932.
207. Net M, García-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.
208. 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.
209. López-Boado MA, Ordi J, García-Valdecasas et al. L-arginine during liver procurement from non-heart-beating donor pigs: histological evaluation. *Transplant Proc*. 1999; 31: 1069.
210. Valero R, García-Valdecasas JC, Net M. L-arginine reduces liver and biliary tract damage after liver transplantation from non-heart-beating donor pigs. *Transplantation*. 2000; 70: 730-737.
211. 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.
212. Xu HS, Stevenson WC, Pruett TL, et al. Donor lazaroïd pre-treatment improves viability of livers harvested from non-heart beating rats. *Am J Surg*. 1996; 171: 113-116.

-
213. Kim YI, Kawano K, Goto S, et al. Efficacy of prostacyclin analogue (OP-2507) in viable hepatic grafts from pigs with non-beating hearts. *Transpl Int.* 1994; 7 (Suppl 1): S199-S203.
214. Ejiri S, Eguchi Y, Kishida A, et al. Cellular distribution of thrombomodulin as an early marker for warm ischemic liver injury in porcine liver transplantation: protective effect of prostaglandin I2 analogue and taurourdeoxycholic acid. *Transplantation.* 2001; 71: 721-726.
215. Takada Y, Taniguchi H, Fukunaga K, et al. Prolonged hepatic warm ischemia in non-heart-beating donors: protective effects of FK-506 and a platelet activating factor antagonist in porcine liver transplantation. *Surgery.* 1998; 123: 692-698.
216. Minor T, Akbar S. Enhancement of endogenous cyclic AMP signal: a new approach to allow for cold preservation of rat livers from non-heart-beating donors? *Transplantation.* 1998; 66: 990-994.
217. Gu M, Takada Y, Fukunaga K, et al. Pharmacologic graft protection without donor pre-treatment in liver transplantation from non-heart-beating donors. *Transplantation.* 2000; 70: 1021-1025.
218. Lisbon A. Dopexamine, dobutamine and dopamine increase splanchnic blood flow. What is the evidence? *Chest.* 2003; 123: 460S-463S.
219. Mythen MG and Webb AR. The role of gut mucosal hypoperfusion in the pathogenesis of post-operative organ dysfunction. *Intensive Care Med.* 1994; 20: 203-209.
220. Kinoshita G, Washizu M, Murata N, et al. The selective effects of dopamine and dobutamine on liver circulation in the dog. *J Vet Med Sci.* 1995; 57: 293-297.

-
221. Brander L, Jacob SM, Knuesel R, et al. Effects of low abdominal blood flow and dobutamine on blood flow distribution and on the hepatic arterial buffer response in anaesthetized pigs. *Shock*. 2006; 25: 402-413.
222. Kinoshita G, Washizu M, Murata N, et al. The effects of dopamine and dobutamine on liver oxygen supply uptake relationship in the dog. *J Vet Med Sci*. 1995; 57: 287-291.
223. Priebe HJ, Noldge GF, Armbruster K, et al. Differential effects of dobutamine, dopexamine and noradrenaline on splanchnic haemodynamics and oxygenation in the pig. *Acta Anaesthesiol Scand*. 1995; 39:1088-1096.
224. De Backer D, Zhang H, Cherkhaoui S, et al. Effects of dobutamine on hepato-splanchnic hemodynamics in an experimental model of hyperdynamic endotoxic shock. *Shock*. 2001; 15: 208-214.
225. Secchi A, Ortanderl JM, Schmidt W, et al. Effects of dobutamine and dopexamine on hepatic micro-and macrocirculation during experimental endotoxemia: an intravital microscopic study in the rat. *Crit Care Med*. 2001; 29: 597-600.
226. Neviere R, Chagnon JL, Vallet B, et al. Dobutamine improves gastrointestinal mucosal blood flow in a porcine model of endotoxic shock. *Crit Care Med*. 1997; 25: 1371-1377.
227. Creteur J, De Backer D and Vincent JL. A dobutamine test can disclose hepatosplanchnic hypoperfusion in septic patients. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999; 160: 839-845.
228. Levy B, Bollaert BP, Lucchelli JP, et al. Dobutamine improves the adequacy of gastric mucosal perfusion in the epinephrine-treated septic shock. *Crit Care Med*. 1997; 25: 1649-1654.

-
229. Joly LM, Monchi M, Cariou A, et al. Effects of dobutamine on gastric mucosal perfusion and hepatic metabolism in patients with septic shock. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999; 160: 1983-1986.
230. Van der Woude FJ, Schnuelle P, Yard BA. Preconditioning strategies to limit graft immunogenicity and cold ischemic organ injury. *J Invest Med.* 2004; 52: 323-329.
231. Lochner A, Genade S, Tromp E, et al. Ischemic preconditioning and the beta-adrenergic signal transduction pathway. *Circulation.* 1999; 100: 958-966.
232. Raddatz A, Kubulus D, Winning J, et al. Dobutamine improves liver function after hemorrhagic shock through induction of heme oxygenase-1. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006; 174: 198-207.
233. Banowsky LH, Sullivan M, Moorehouse J. In muortuo renal perfusion for cadaver kidney preservation. *Investigative Urology.* 1971; 9: 199-205.
234. García-Rinaldi R, Lefrak EA, Defore WW, et al. In situ preservation of cadaver kidneys for transplantation: Laboratory observations and clinical application. *Ann Surg.* 1975; 182:576-584.
235. Anaise D, Yland MJ, Waltzer WC, et al. A new perfusion tube for multiple organ procurement. *Transplant Proc.* 1987; 19(1): 4129-4136.
236. Johnson HK, Skelley L, Warner H, et al. Results following use of the García-Lefrak double balloon catheter. *Transplant Proc.* 1984; 16: 122-125.
237. Anaise D, Yland MJ, Waltzer WC, et al. Flush pressure requirements for optimal cadaveric donor kidney preservation. *Transplant Proc.* 1988; 20: 891-894.
238. Maessen JG, Van der Vusse GJ, Vork M, Kootstra G. The beneficial effect of intermediate normothermic perfusion during cold storage of ischemically injured

- kidneys. A study of renal nucleotide homeostasis during hypothermia in the dog. *Transplantation*. 1989; 47: 409-414.
239. Koyama I, Hoshino T, Nagashima N, et al. A new approach to kidney procurement from non-heart-beating donors: core cooling on cardiopulmonary bypass. *Transplant Proc*. 1989; 21:1203-1205.
240. Hoshino T, Koyama I, Nagashima N, et al. Liver transplantation from non-heart beating donors by core cooling technique. *Transplant Proc*. 1989; 21: 1206-1208.
241. Hoshino T, Koyama I, Nagashima N, et al. Transplantation of livers from non-heart beating donors is possible by core cooling technique. *Transplant Proc*. 1989; 21: 3519.
242. Williams GM, Cameron DE, Fraser CD, et al. Cardiopulmonary bypass with profound hypothermia: an optimal preservation method for multi-organ procurement. *Transplant Proc*. 1989; 21: 1199.
243. van der Wijk J, Slooff MJ, Rijkmans BG, Kootstra G. Successful 96- and 144-hour experimental kidney preservation: a combination of standard machine preservation and newly developed normothermic ex vivo perfusion. *Cryobiology*. 1980; 17: 473-477.
244. Balupuri S, Buckley P, Snowden C, et al. The trouble with kidneys derived from the non-heart-beating donor: a single center 10-year experience. *Transplantation*. 2000; 69: 842-846.
245. Wight J, Chilcott J, Holmes M, Brewer N. The clinical and cost-effectiveness of pulsatile machine perfusion versus cold storage. *Health Technol Assess*. 2003; 7: 1-94.
246. Lee CY, Zhang JX, Jones JW, et al. Functional recovery of preserved livers following warm ischemia improvement by machine perfusion preservation. *Transplantation*. 2002; 74: 944-951.

-
247. Lee CY, Jain S, Duncan HM, et al. Survival transplantation of preserved non-heart-beating donor in rat livers: preservation by hypothermic machine perfusion. *Transplantation*. 2003; 27: 76: 1432-1436.
248. Jain S, Xu H, Duncan H, et al. Ex-vivo study of flow dynamics and endothelial cell structure during extended hypothermic machine perfusion preservation of livers. *Cryobiology*. 2004; 48: 322-332.
249. Schön MR, Hunt CJ, Pegg DE, Wight DG. The possibility of resuscitating livers after warm ischemic injury. *Transplantation*. 1993; 56: 24-31.
250. Schön MR, Kollmar O, Wolf S, et al. Liver transplantation after organ preservation with normothermic extracorporeal perfusion. *Ann Surg* 2001; 233: 114-123.
251. St Peter SD, Imber CJ, López I et al. Extended preservation on non-heart-beating donor livers with normothermic machine perfusion. *Br J Surg*. 2002; 89: 609-619.
252. Reddy SP, Bhattacharjya S, Maniakin N, et al. Preservation of porcine non-heart-beating donor livers by sequential cold storage and warm perfusion. *Transplantation*. 2004; 77: 1328-1332.
253. Reddy S, Greenwood J, Maniakin N, et al. Non-heart-beating donor porcine livers: the adverse effect of cooling. *Liver Transplantation*. 2005; 11: 35-38.
254. Miller BJ, Gibbon JH, Gibbon MH. Recent advances in the development of a mechanical heart and lung apparatus. *Ann Surg*. 1951; 134: 694-708.
255. Belcher PR, Murithi EW, Milne EM, et al. Heparin, platelet aggregation, neutrophils and cardiopulmonary bypass. *Thromb Res*. 2000; 98: 249-256.
256. Brinks HJ, Weerwind PW, Bogdan S et al. Does heparin pre-treatment affect the haemostatic system during and after cardiopulmonary bypass? *Perfusion*. 2001; 16: 3-12.

-
257. van Oeveren W, Kazatchkine MD, Descamps-Latscha B, et al. Deleterious effects of cardiopulmonary bypass. A prospective study of bubble versus membrane oxygenation. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1985; 89:888-899.
258. Lim MW. The history of extracorporeal oxygenators. *Anaesthesia.* 2006; 61: 984-995.
259. Benedetti M, De Caterina R, Bionda A, et al. Blood-artificial surface interactions during cardiopulmonary bypass. A comparative study of four oxygenators. *Int J Artif Organs.* 1990; 13: 488-497.
260. Shin'oka T, Shum-Tim D, Laussen PC, et al. Effects of oncotic pressure and hematocrit on outcome after hypothermic circulatory arrest. *Ann Thorac Surg.* 1998; 65: 155-64.
261. Farstad M, Kvalheim VK, Husby P. Cold-induced fluid extravasation during cardiopulmonary bypass in piglets can be counteracted by use of iso-oncotic prime. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2005; 130: 287-294.
262. Chandler WL. Effects of hemodilution, blood loss, and consumption on hemostatic factor levels during cardiopulmonary bypass. *J Cardiothorac Vasc Anesth.* 2005; 19: 459-467.
263. Karkouti K, Beattie WS, Wijeyesundera DN, et al. Hemodilution during cardiopulmonary bypass is an independent risk factor for acute renal failure in adult cardiac surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2005; 129: 391-400.
264. Habib RH, Zacharias A, Schwann TA, et al. Adverse effects of low hematocrit during cardiopulmonary bypass in the adult: should current practice be changed? *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2003; 125: 1438-1450.

-
265. Karkouti K, Djaiani G, Borger MA, et al. Low hematocrit during cardiopulmonary bypass is associated with increased risk of perioperative stroke in cardiac surgery. *Ann Thorac Surg.* 2005; 80: 1381-1387.
266. González M. Hemodilución, fluidoterapia y conservación de la sangre. En: Asociación española de perfusionistas editores. *Fisiopatología y técnicas de circulación extracorpórea.* Barcelona.2003.
267. Valdes Xenia S. Risk of blood transfusion in cardiac surgery. *Arch Cardiol Mex.* 2006; 76 Suppl 2: S86-S91.
268. Dial S, Delabays E, Albert M, et al. Hemodilution and surgical hemostasis contributes significantly to transfusion requirements in patients undergoing coronary artery bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2005; 130: 654-661.
269. Wan S, LeClerc JL, Vincent JL. Inflammatory response to cardiopulmonary bypass: mechanisms involved and possible therapeutic strategies. *Chest.* 1997; 112: 676-692.
270. Lanzeby WD, Ko W, Zelano JA, et al. Effects of temperature and flow rate on regional blood flow and metabolism during cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg.* 1992; 53: 957-964.
271. Hickey RF, Hoar PF. Whole-body oxygen consumption during low-flow hypothermic cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1983; 86: 903-906.
272. Matsuda H, Sasako Y, Nakamo S, et al. Determination for optimal perfusion flow rate for deep hypothermic cardiopulmonary bypass in the adult based on distributions of blood flow and oxygen consumption. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1992; 103: 541-548.
273. Fox LS, Blackstone EH, Kirklin JW, et al. Relationship of whole body oxygen consumption to perfusion flow rate during hypothermic cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1982; 83: 239-248.

-
274. Schumacker PT, Samsel RW. Oxygen delivery and uptake by peripheral tissues: physiology and pathophysiology. *Crit Care Clin.* 1989; 5: 255-269.
275. Alston RP, Singh M, McLaren AD. Systemic oxygen uptake during cardiopulmonary bypass. Effects of flow rate, flow character and arterial pH. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1989; 98: 757-768.
276. Baraka A. The effect of perfusion flow on oxidative metabolism during cardiopulmonary bypass. *Anaesth Analg.* 1993; 76: 1191-1194.
277. Pastuszko P, Liu H, Mendoza-Paredes A, et al. Brain oxygen and metabolism is dependent on the rate of low flow cardiopulmonary bypass following circulatory arrest in newborn piglets. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2007; 31: 899-905.
278. Schultz JM, Karamlou T, Swanson J, et al. Hypothermic low-flow cardiopulmonary bypass impairs pulmonary and right ventricular function more than circulatory arrest. *Ann Thorac Surg.* 2006; 81: 474-480.
279. Alston RP, Murray L, McLaren AD. Changes in hemodynamic variables during hypothermic cardiopulmonary bypass. Effects of flow rate, flow character and arterial pH. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1990; 100: 134-144.
280. Üндar A. The ABC of research on pulsatile versus nonpulsatile perfusion during cardiopulmonary bypass. *Med Sci Monit.* 2002; 8: ED21-24.
281. Favre L, Vallotton MB, Muller AF: Relationship between plasma concentrations of angiotensin I, angiotensin II and plasma renin activity during cardio-pulmonary bypass in man. *Eur J Clin Invest.* 1976; 4: 135-140.
282. Taylor KM, Morton IJ, Brown JJ, et al. Hypertension and the renin-angiotensin system following open-heart surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1977; 74: 840-845.

-
283. Levine FH, Philbin DM, Kono K, et al. Plasma vasopressin levels and urinary sodium excretion during cardiopulmonary bypass with and without pulsatile flow. *Ann Thorac Surg.* 1981; 32: 63-67.
284. Zamparelli R, De Paulis S, Martinelli L, et al. Pulsatile normothermic cardiopulmonary bypass and plasma catecholamine levels. *Perfusion.* 2000; 15: 217-223.
285. Orime Y, Shiono M, Hata H, et al. Cytokine and endothelial damage in pulsatile and nonpulsatile cardiopulmonary bypass. *Artif Organs.* 1999; 23: 508-512.
286. Hamulu A, Atay Y, Yagdi T et al. Effects of low types in cardiopulmonary bypass on gastric intramucosal pH. *Perfusion.* 1998; 13: 129-135.
287. Ündar A, Masai T, Yang SQ et al. Effects of perfusion mode on regional and global organ blood flow in a neonatal piglet model. *Ann Thorac Surg.* 1999; 68: 1336-1342.
288. Laursen H, Bodker A, Andersen K, et al. Brain oedema and blood-brain barrier permeability in pulsatile and nonpulsatile cardiopulmonary bypass. *Scand J Thorac Cardiovasc Surg.* 1986; 20: 161-166.
289. Dunn J, Kirsh MM, Harness J, et al. Hemodynamic, metabolic and hematologic effects of pulsatile cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1974; 68: 138-147.
290. Taylor K, Bain WH, Maxted KJ, et al. Comparative studies of pulsatile and nonpulsatile flow during cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1978; 75: 569-573.
291. Taylor KM, Jones JV, Walker MS, et al. The cortisol response during heart-lung bypass. *Circulation.* 1976; 54: 20-25.

-
292. Taylor KM, Bain WH, Jones JV, Walker MS. The effect of hemodilution on plasma levels of cortisol and free cortisol. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1976; 72: 57-61.
293. Kono K, Philbin DM, Coggins CH, et al. Adrenocortical hormone levels during cardiopulmonary bypass with and without pulsatile flow. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1983; 85: 129-133.
294. Ohata T, Sawa Y, Kadoba K, et al. Role of nitric oxide in a temperature dependent regulation of systemic vascular resistance in cardiopulmonary bypass. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2000; 18: 342-347.
295. Tönz M, Mihaljevic T, von Segesser LK, et al. Postoperative hemodynamics depend on cardiopulmonary temperature: the potential role of endothelin-1. *Eur J Cardiothorac Surg.* 1997; 11: 157-161.
296. Stibbe J, Kluft C, Brommer EJP, et al. Enhanced fibrinolytic activity during cardiopulmonary bypass in open-heart surgery in man is caused by extrinsic (tissue type) plasminogen activator. *Eur J Clin Invest.* 1984; 14: 375-382.
297. Kongsgaard UE, Smith-Erichsen N, Geiran O, Bjornskau L. Changes in the coagulation and fibrinolytic systems during and after cardiopulmonary bypass. *Thorac Cardiovasc Surg.* 1989; 37: 158-162.
298. Paparella D, Galeone A, Venneri MT, et al. Blood damage related to cardiopulmonary bypass: in vivo and in vitro comparison of two different centrifugal pumps. *ASAIO J.* 2004; 50: 473-478.
299. Hansbro SD, Sharpe DA, Catchpole R, et al. Haemolysis during cardiopulmonary bypass: an in vivo comparison of standard roller pumps, nonocclusive roller pumps and centrifugal pumps. *Perfusion.* 1999; 14: 3-10.

-
300. Finlayson DC, Zaidan, Hunter RL, et al. Serum protein changes during cardiopulmonary bypass: implications for host defense. *Perfusion*. 1990; 5: 101-108.
301. Kaul TK, Bhatnagar NK, Mercer JL. Plasma albumin and calcium levels following cardiopulmonary bypass. *Int J Artif Organs*. 1989; 12: 461-465.
302. Asberg AE, Videm V. Neutrophil dysfunction after biomaterial contact in an in vitro model of cardiopulmonary bypass. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2006; 30: 744-748.
303. Chenoweth DE, Cooper SW, Hugli TE, et al. Complement activation during cardiopulmonary bypass: evidence for generation of C3a and C5a anaphylatoxins. *N Engl J Med*. 1981; 304: 497-503.
304. Ilton MK, Langton PE, Taylor ML, et al. Differential expression of neutrophil adhesion molecules during coronary artery surgery with cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1999; 118: 930-937.
305. Wan S, LeClerc JL, Vincent JL. Cytokine responses to cardiopulmonary bypass: lessons learned from cardiac transplantation. *Ann Thorac Surg*. 1997, 63: 269-276.
306. Sezai A, Shiono M, Nakata K, et al. Effects of pulsatile CPB on interleukin-8 and endothelin-1 levels. *Artif Organs*. 2005; 29: 708-713.
307. Finkel MS. Source of inflammatory mediators in cardiopulmonary bypass. *Crit Care Med*. 2002; 30: 249-251.
308. Ruvolo G, Speziale G, Greco E et al. Nitric oxide release during hypothermic versus normothermic cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg*. 1995; 9: 651-654.
309. Lindholm L, Bengtsson A, Hansdottir V, et al. Regional oxygenation and systemic inflammatory response during cardiopulmonary bypass: influence of temperature and blood flow variations. *J Cardiothorac Vasc Anesth*. 2003; 17: 182-187.

-
310. Kamler M, Goedeke J, Pizanis N, et al. In vivo effects of hypothermia on the microcirculation during extracorporeal circulation. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2005; 28: 259-265.
311. Pannen BHJ. Hepatic blood flow during anaesthesia and surgery .4RC1. http://euroanesthesia.org/education/rc_vienna/04rc1.HTM
312. Richter S, Vollmar B, Mücke I, et al. Hepatic arteriolo-portal venular shunting guarantees maintenance of nutritional microvascular supply in hepatic arterial buffer response of rat livers. *J Physiol.* 2001; 531: 193-201.
313. Reynaert H, Thompson MG, Thomas T, Geerts A. Hepatic stellate cells: role in microcirculation and pathophysiology of portal hypertension. *Gut.* 2002; 50: 571-581.
314. McCuskey RS. Morphological mechanisms for regulating blood flow through hepatic sinusoids. *Liver.* 2000; 20: 3-7.
315. Oda M, Han JY, Yokomori H. Local regulators of hepatic sinusoidal microcirculation: recent advances. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2000; 23: 85-94.
316. Braet F, Wisse E. Structural and functional aspects of liver sinusoidal endothelial cell fenestrae: a review. *Comparative Hepatology.* 2002 Aug 23; 1:1.
317. Lautt WW, Legare DJ. Passive autoregulation of portal venous pressure: distensible hepatic resistance. *Am J Physiol.* 1992; 263: G702-G708.
318. Lautt WW, Brown LC, Durham JS. Active and passive control of hepatic blood volume responses to hemorrhage at normal and raised hepatic venous pressure in cats. *Can J Physiol Pharmacol.* 1980; 58: 1049-1057.
319. Lautt WW. Mechanism and role of intrinsic regulation of hepatic arterial blood flow: hepatic arterial buffer response. *Am J Physiol.* 1985; 249: G549-G555.

-
320. Lauth WW, Legare DJ, d'Almeida MS. Adenosine as putative regulator of hepatic arterial flow (the buffer response). *Am J Physiol.* 1985; 248: H331-H338.
321. Li X, Benjamin IS, Naftalin R, Alexander B. Location and function of intrahepatic shunts in anaesthetised rats. *Gut.* 2003; 52: 1339-1346.
322. Li X, Benjamín IS, Alexander B. Hepato-cardiovascular response and its regulation. *World J Gastroenterol.* 2005; 11: 676-680.
323. Oda M, Yokomori H, Han JY. Regulatory mechanisms of hepatic microcirculation. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2003; 29: 167-182.
324. Jiao LR, Inglott FS, Mathie RT, Habib NA. The effect of augmenting portal venous inflow on intrahepatic pressure and resistance in the isolated perfused porcine liver. *Hepatogastroenterology.* 2001; 48: 1011-1014.
325. Browse DJ, Mathie R, Benjamin IS, Alexander B. The role of ATP and adenosine in the control of hepatic blood flow in the rabbit liver in vivo. *Comparative Hepatology.* 2003; 2: 9.
326. Mathie RT, Ralevic V, Alexander B, Burnstock G. Nitric oxide is the mediator of ATP-induced dilatation of the rabbit hepatic arterial vascular bed. *Br J Pharmacol.* 1991; 103: 1602-1606.
327. Mathie RT, Blumgart LH. Effect of denervation on the hepatic haemodynamic response to hypercapnia and hypoxia in the dog. *Pflugers Arch.* 1983; 397: 152-157.
328. Jakob SM, Tenhunen JJ, Laitinen S, et al. Effects of systemic arterial hypoperfusion on splanchnic hemodynamics and hepatic arterial buffer response in pigs. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2001; 280: G819-G827.

-
329. Bracht H, Takala J, Tenhunen JJ, et al. Hepatosplanchnic blood flow control and oxygen extraction are modified by the underlying mechanism of impaired perfusion. *Crit Care Med.* 2005; 33: 645-653.
330. Kinoshita G, Washizu M, Motoyoshi S, Breznock EM. Effects of hypovolemic shock and reperfusion on liver blood flow in the dog. *J Vet Med Sci.* 1995; 57: 703-708.
331. Hughes RL, Mathie RT, Campbell D, Fitch W. Effect of hypercarbia on hepatic blood flow and oxygen consumption in the greyhound. *Br J Anaesth.* 1979; 51: 289-296.
332. Hughes RL, Mathie RT, Fitch W, Campbell D. Liver blood flow and oxygen consumption during metabolic acidosis and alkalosis in the greyhound. *Clin Sci.* 1981; 60: 355-361.
333. Hughes RL, Mathie RT, Fitch W, Campbell D. Liver blood flow and oxygen consumption during hypocapnia and IPPV in the greyhound. *J Appl Physiol.* 1979; 47: 290-295.
334. Nagano K, Gelman S, Parks D, Bradley El Jr. Hepatic circulation and oxygen supply-uptake relationships after hepatic ischemic insult during anesthesia with volatile anesthetics and fentanyl in miniature pigs. *Anesth Analg.* 1990; 70: 53-62.
335. Nagano K, Gelman S, Bradley EL Jr, Parks D. Hypothermia, hepatic oxygen supply-demand, and ischemia-reperfusion injury in pigs. *Am J Physiol.* 1990; 258: G910-G918.
336. Hampton WW, Townsend MC, Schirmer WJ, et al. Effective hepatic blood flow during cardiopulmonary bypass. *Arch Surg.* 1989; 124: 458-459.
337. Yamada T, Nomoto S, Aota M, et al. Hepatic circulation during nonpulsatile cardiopulmonary bypass. *ASAIO J.* 1995; 41: M294-M297.

-
338. Mathie RT, Desai JB, Taylor KM. The effect of normothermic cardiopulmonary bypass on hepatic blood flow in the dog. *Perfusion*. 1986; 1: 245-253.
339. Desai JB, Mathie RT, Taylor KM. Hepatic blood flow during cardiopulmonary bypass in the dog: the effect of temperature, flow rate and pulsatility. *Perfusion*. 1993; 8: 149-158.
340. Mathie RT. Hepatic blood flow during cardiopulmonary bypass. *Crit Care Med*. 1993; 21 (2S): 72-76.
341. Koizumi M, Nobuyuki M, Ueda K. Influence of cardiopulmonary bypass and fentanyl anesthesia on hepatic circulation and oxygen metabolism in beagles. *Anesth Analg*. 1998; 86: 1177-1186.
342. Mathie RT, Ohri SK, Batten JJ, et al. Hepatic blood flow during cardiopulmonary bypass operations: the effect of temperature and pulsatility. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1997; 114: 292-293.
343. Hashimoto K, Sasaki T, Hachiya T, et al. Superior hepatic mitochondrial oxidation-reduction state in normothermic cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2001; 121: 1179-1186.
344. Okano N, Miyoshi S, Owada R, et al. Impairment of hepatosplanchnic oxygenation and increase of serum hyaluronate during normothermic and mild hypothermic cardiopulmonary bypass. *Anesth Analg*. 2002; 95: 278-286.
345. Mastoraki A, Karatzis E, Sotiria M, et al. Postoperative jaundice after cardiac surgery. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2007; 6: 383-387.
346. Tojimbara T, García R, Burns W et al. The use of non-heart beating cadaver donors in experimental liver transplantation. *Transplantation*. 1995; 60: 1179-1186.

-
347. Hoshino T, Maley WR, Stump KC, et al. Evaluation of core cooling technique for liver and kidney. *Transplant Proc.* 1987; 19: 4123-4128.
348. Mayfield KB, Ametani M, Southard JH, Belzer FO. Mechanism of action ex vivo blood rescue in six day preserved kidneys. *Transplant Proc.* 1987; 19: 1367-1368.
349. González FX, García-Valdecasas JC, López-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.
350. García-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.
351. Valero R, García-Valdecasas JC, Tabet J. Blood flow and oxygen extraction during normothermic recirculation and total body cooling predict viability of liver from non-heart-beating pig donors. *Transplant Proc.* 1997; 29: 3469-3470.
352. Valero R, García-Valdecasas JC, Tabet J. Hepatic blood flow and oxygen extraction ratio during normothermic recirculation and total body cooling as viability predictors in non-heart-beating donor pigs. *Transplantation.* 1998; 66: 170-176.
353. Valero R, Manyalich C, Cabrer L, et al. Organ procurement from non-heart-beating donors by total body cooling. *Transplant Proc.* 1993; 25: 3091-3092.
354. Valero R, Cabrer C, Oppenheimer F, et al. Normothermic recirculation reduces primary graft dysfunction of kidneys obtained from non-heart-beating donors. *Transpl Int.* 2000; 13: 303-310.
355. Valero R, Sánchez J, Cabrer C, et al. Organ procurement from non-heart-beating donors through in situ perfusion or total body cooling. *Transplant Proc.* 1995; 27: 2899-2900.

-
356. Otero A, Gómez-Gutierrez M, Suarez F, et al. Liver transplantation from Maastricht category 2 non-heart-beating donors: a source to increase the donor pool? *Transplant Proc.* 2004; 36(3): 747-750.
357. Calne R. Technique in the pig. En: Calne RY, editors. *Liver transplantation*. London. Grune and Stratton. 1987; 9.
358. Naoshi Kamada. Historical background to experimental liver transplantation. En: *Experimental liver transplantation*. CRC Press Inc. 1988. p. 1- 3
359. Hickman PE, Potter JM, Pesce AJ. Clinical chemistry and post-liver-transplant monitoring. *Clin Chem.* 1997; 43: 1546-1554.
360. Shaked A, Nunes FA, Olthoff KM, Lucey MR. Assessment of liver function: pre-and-peritransplant evaluation. *Clin Chem.* 1997; 43: 1539-1545.
361. Smedsrod B, Pertoft H, Eriksson S, et al. Studies in vitro on the uptake and degradation of sodium hyaluronate in rat liver endothelial cells. *Biochem J.* 1984 ;223 : 617- 626.
362. Nishizaki T, Okano S, Uchiyama H, et al. Intra-operative hyaluronic acid clearance predicts postoperative graft function in living related liver transplantation. *International Surgery.* 1999; 84: 262-265.
363. Deaciuc I, Bagby G, Lang C, et al. Hyaluronic acid uptake by the isolated, perfused rat liver: an index of hepatic sinusoidal endothelial cell function. *Hepatology.* 1993; 17: 266-272.
364. Soejima Y, Yanaga K, Wakiyama S. Serum hyaluronic acid as a reliable parameter of allograft viability in porcine liver transplantation. *Hepatogastroenterology.* 1996; 43: 590-595.

-
365. Schumacker PT, Samsel RW. Oxygen transport and uptake in health and disease. En: Gutierrez G, Vincent JL. Update in intensive care and emergency medicine. Vol 12: Tissue Oxygen utilization. Springer Verlag. Berlin. 1991. p. 132-142.
366. Reinders ME, van Wagenveld BA, van Gulik TM, et al. Hyaluronic acid uptake in the assessment of sinusoidal endothelial cell damage after cold storage and normothermic reperfusion of rat livers. *Transpl Int*. 1996; 9: 446-453.
367. Wang L, Zhao D, Suehiro T, et al. Assessment of damage and recovery of sinusoidal endothelial cell function by in vivo hyaluronic acid uptake in cold-preserved and transplanted rat livers. *Transplantation*. 1996; 62: 1217-1221.
368. Hickman R, Rose-Innes C, Tyler M, et al. Energy charge as an indication of liver viability. A comparison of changes in livers that remained intact with those subjected to autografting. *Transplantation*. 1992; 53: 540-545.
369. González FX, Rimola A, Grande L, et al. Predictive factors of early postoperative graft function in human liver transplantation. *Hepatology*. 1994; 20: 565-573.
370. Net M, Valero R, Almenara R, et al. Hepatic xanthine levels as viability predictor of livers procured from non-heart-beating donor pigs. *Transplantation*. 2001; 71: 1232-1237.
371. Shirakura R, Matsuda H, Nakata S, et al. A new method to harvest multiple organs from non-heart beating donors by use of a percutaneous cardiopulmonary suport machine. *Transplant Proc*. 1992; 24: 1329-1330.
372. Ma Y, Wang GD, Wu LW, Hu RD. Dynamical changing patterns of histological structure and ultrastructure of liver graft undergoing warm ischemia injury from non-heart-beating donors in rats. *World J Gastroenterol*. 2006; 12: 4902-4905.

373. Ma Y, Wu L-W, Wu J-L, et al. Energy metabolism and survival of livers grafts from non-heart-beating donors rats with warm ischemia injury. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2006; 5: 521-525.

* * * * *

8. ANEXOS

8.1. Glosario de Abreviaturas

α -GST: alfa Glutation-S-Transferasa.

2D: Segundo día postrasplante.

5D: Quinto día postrasplante.

ADP: Adenosín difosfato.

AH: Ácido Hialurónico.

AHp: Arteria hepática.

ALAT: Alanina aminotransferasa.

AMP: Adenosín monofosfato.

AMPc: AMP cíclico.

ASAT: Aspartato aminotransferasa.

ATP: Adenosín trifosfato.

Ca²⁺: Ión calcio.

CAM: Concentración alveolar mínima.

CaO₂: Contenido arterial de oxígeno.

CEC: Circulación extracorpórea.

ClK: Cloruro potásico.

CO: Monóxido de carbono.

CO₂: Dióxido de carbono.

CpO₂: Contenido portal de oxígeno.

CsA: Ciclosporina A.

CvshO₂: Contenido de vena suprahepática de oxígeno

DBT: Dobutamina.

DCL: Donantes a corazón latiente.

DCP: Donante a corazón parado.

DCPC: Donante a corazón parado controlado.

DCPNC: Donante a corazón parado no controlado.

DE: Desviación estándar

EHAH: Extracción hepática de ácido hialurónico.

EtCO₂: presión parcial de CO₂ determinada al final de la espiración

EV: Administración endovenosa.

FAH: Flujo arterial hepático.

FB: Flujo de bomba.

FHT: Flujo hepático total.

FIC: Final de la isquemia caliente.

FiO₂: Fracción inspiratoria de oxígeno.

FK 506: Tacrolimus.

FPH: Flujo portal hepático.

FRH: Final recirculación hipotérmica.

FRN: Final recirculación normotérmica.

H⁺ : Hidrogeniones.	NO : Óxido nítrico.
H₂O : Molécula de agua.	O₂ : Oxígeno molecular.
H₂O₂ : Peróxido de hidrógeno.	OH⁻ : Radical hidroxilo.
HDO₂ : Aporte de oxígeno hepático.	PAF : Factor de activación plaquetario.
HO : Heme-oxigenasa.	PG : Prostaglandinas.
HO₂ER : Cociente de extracción hepático de oxígeno.	PI : Precondicionamiento isquémico.
hsp32 : Proteína de shock térmico.	PKA : Proteínkinasa A.
HTK : Histidina-triptófano-cetoglutarato.	PKC : Proteínkinasa C.
HVO₂ : Consumo de oxígeno hepático.	PMN : Polimorfonucleares neutrófilos.
IC : Isquemia caliente.	PMP : por millón de población.
ICAM : Moléculas de adhesión intracelular.	PRP : Post-reperfusión.
IF : Isquemia fría.	PVC : Presión venosa central.
IL : Interleuquinas.	RH : Recirculación hipotérmica.
IM : Administración intramuscular.	RLO : Radicales libres de oxígeno.
IR : Isquemia-Reperfusión.	RN : Recirculación normotérmica.
K⁺ : Ión potasio.	SAMe : S-Adenosil-L-Metionina.
LDH : Lactato deshidrogenasa.	TAK-044 : Antagonista no selectivo de los receptores A y B de la endotelina.
mEq : Miliequivalentes.	TNFα : Factor de necrosis tumoral alfa.
N₂ : Molécula de Nitrógeno.	TxA₂ : Tromboxano A ₂ .
Na⁺ : Ión sodio.	UCI : Unidad de cuidados intensivos.
NELP : <i>Normothermic extracorporeal liver perfusion</i> .	UW : Solución de la Universidad de Wisconsin®.
NF-κB : Factor de transcripción nuclear.	VB : vía biliar.

VCAM: Moléculas de adhesión vascular.

VHB: Virus de la hepatitis B.

VHC: Virus de la hepatitis C.

VP: Vena porta.

VO: Administración vía oral.

VSH: vena suprahepática.

X: Media aritmética.

χ^2 : Prueba estadística de Ji cuadrado.

8.2. Comunicaciones a Congresos

1. Efecto de la recirculación normotérmica tras 60 minutos de isquemia caliente en un modelo de trasplante hepático experimental a partir de donante a corazón parado. **XIII Reunión Nacional de Cirugía. Zaragoza, 7-9 Noviembre, 2001. Poster.**
2. The role of 60 minutes of warm ischemia and normothermic recirculation on graft viability after experimental pig liver transplantation from non-heart-beating donors. **10th Congress of the European Society for Organ Transplantation. 2001. Poster.**
3. Non heart beating donors porcine livers: effect of three different pump flow rate during cardiopulmonary bypass. **Annual Meeting of the European Society of Anaesthesiology. Euroanaesthesia 2007. Munich, Germany. June 9-12, 2007. Poster.**
4. Dobutamine addition during cardiopulmonary bypass decreases hepatocellular and endothelial damage in porcine liver grafts from non heart beating donors. **Annual Meeting of the European Society of Anaesthesiology. Euroanaesthesia 2007. Munich Munich, Germany. June 9-12, 2007. Poster.**
5. Improving porcine livers viability from non-heart-beating donors by extended normothermic recirculation to sixty minutes. **13th Congress of the European Society for Organ Transplantation. Prague, Czech Republic. October, 2007. Poster.**
6. Total body cooling after normothermic recirculation in livers from non-heart beating donors impairs hepatic injury. **13th Congress of the European Society for Organ Transplantation. Prague, Czech Republic. October, 2007. Poster.**
7. Hepatoprotective effect of dobutamine addition during cardiopulmonary bypass in porcine liver grafts from non-heart beating donors after sixty minutes of warm

ischemia. **13th Congress of the European Society for Organ Transplantation. Prague, Czech Republic. October, 2007. Poster.**

8. Hemodynamic patterns in porcine livers from non-heart beating donors under three different pump flow rates during cardiopulmonary bypass. **13th Congress of the European Society for Organ Transplantation. Prague, Czech Republic. October, 2007. Poster.**

8.3. Becas

Este trabajo de investigación se ha realizado bajo el soporte económico de:

5. Beca concedida por la **Fundació “La Marató de TV3”**. Beca nº 3710, de tres años de duración (2001-2003) para el proyecto titulado: **“Trasplante hepático experimental en el cerdo. Efecto de las modificaciones de las características de la recirculación normotérmica sobre la viabilidad del injerto hepático”**.
6. Beca concedida por el Fondo de Investigación Sanitaria de la Seguridad Social (FISss). Beca 01/1498, de tres años de duración (2001-2003) para el proyecto titulado: **“Trasplante hepático experimental en el cerdo. Efecto de las modificaciones de las características de la recirculación normotérmica sobre la viabilidad del injerto hepático”**.
