

**UNIVERSIDAD DE BARCELONA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA**

**PAPEL DEL OXIDO NÍTRICO DURANTE
LA RECIRCULACIÓN NORMOTÉRMICA
EN EL TRASPLANTE HEPÁTICO
EXPERIMENTAL EN CERDOS CON
DONANTES A CORAZÓN PARADO**

TESIS DOCTORAL DE : PABLO BARROS SCHELOTTO

DIRECTOR: Dr. JUAN CARLOS GARCÍA-VALDECASAS SALGADO

BARCELONA - 2001

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1. 1. Reseña histórica	3
1. 2. Diferentes soluciones ante la falta de donantes ..	6
1. 3. Donantes a corazón parado	10
1. 4. Donantes a corazón parado:técnicas de obtención de órganos.....	16
1. 4. 1. Enfriamiento in situ	16
1. 4. 2. Enfriamiento corporal total	18
1. 5. Lesión por isquemia reperfusión	19
1. 5. 1. Lesiones por isquemia caliente	21
1. 5. 2. Lesión por preservación	23
1. 5. 3. Lesión por reperfusión	24
1. 5. 3. 1. Producción de radicales libres	24
1. 5. 3. 2. Adhesión leucocitaria	27
1. 5. 3. 3. Activación de células de Kupffer	27
1. 5. 3. 4. Producción de FNT y sustancias vasoactivas	28
1. 5. 3. 5. Mecanismos celulares de defensa	29
1. 6. Utilización de la Recirculación Normotérmica durante la obtención de órganos de donantes a corazón parado: Estado actual	31
1. 7. Importancia del óxido nítrico durante la recirculación normotérmica y la obtención de hígados a partir de donantes a corazón parado ..	35
2. HIPÓTESIS	39

3. OBJETIVOS	43
4. MATERIAL Y MÉTODOS	47
4. 1. Trasplante hepático en cerdos	49
4. 2. Diseño del estudio	51
4. 3. Técnica quirúrgica	54
4. 3. 1. Anestesia en el donante	54
4. 3. 2. Procedimiento quirúrgico	55
4. 3. 3. Cirugía de banco	57
4. 3. 4. Procedimiento en el receptor	58
4. 3. 5. Cuidados postoperatorios	59
4. 4. Determinaciones analíticas del estudio	63
4. 4. 1. Toma de muestras	63
4. 4. 2. Determinaciones analíticas	64
4. 4. 2. 1. Alaninoaminotransferasa (ALAT)	64
4. 4. 2. 2. Alfa-glutation-S-Transferasa (GST)	65
4. 4. 2. 3. Acido Hialurónico (AH)	66
4. 4. 2. 4. Determinación de nitritos y nitratos	67
4. 4. 2. 5. Determinación de nucleótidos de adenosina	67
4. 4. 2. 6. Evaluación histológica del hígado	69
4. 5. Evaluación del flujo hepático y calculo del metabolismo hepático del oxigeno durante la recirculación normotérmica	71
4. 5. 1. Flujo hepático durante la recirculación normotérmica ...	71
4. 5. 2. Cálculo del metabolismo hepático de oxigeno	71
4. 6. Análisis estadístico	73

5. RESULTADOS.....	75
5. 1. Supervivencia de los animales al quinto día	77
6. 2. Análisis del flujo sanguíneo hepático durante el período de recirculación normotérmica	80
5. 2. 1. Flujo sanguíneo de arteria hepática	80
5. 2. 2. Flujo sanguíneo de la vena porta	82
5. 2. 3. Flujo hepático total	83
5. 2. 4. Flujo sanguíneo de la bomba de recirculación extracorpórea	85
5. 2. 6. Metabolismo hepático de oxígeno	87
5. 3. Marcadores de lesión hepatocelular	91
5. 3. 1. Alaninoaminotransferasa (ALAT)	91
5. 3. 2. Alfa-glutation-transferasa (GST)	92
5. 3. 3. Marcador de lesión endotelial: determinación de ácido hialurónico	93
5. 3. 4. Determinación de Nitritos y Nitratos	94
5. 3. 5. Carga energética	95
5. 4. Histología al quinto día	97
5. 4. 1. Dilatación sinusoidal	97
5. 4. 2. Infiltración sinusoidal polimorfonuclear	98
5. 4. 3. Infiltración sinusoidal linfocitaria	99
5. 4. 4. Colangitis isquémica	99
5. 4. 5. Desestructuración hepatocitaria	100
5. 4. 6. Necrosis isquémica centrolobulillar	101
5. 4. 7. Area necrótica media	101
6. DISCUSIÓN	105
6. 1. Análisis de la supervivencia	115

6. 2. Evaluación de los flujos sanguíneos	118
6. 3. Evaluación del metabolismo hepático del oxígeno	124
6. 4. Evaluación de los diferentes parámetros bioquímicos	126
6. 5. Determinación de nitritos y nitratos	130
6. 6. Evaluación de la carga energética	132
6. 7. Evaluación de los cambios histológicos	134
6. 8. Importancia de los resultados y aplicabilidad clínica	136
7. CONCLUSIONES	137
8. BIBLIOGRAFÍA	141

1. 1. RESEÑA HISTÓRICA

Durante las últimas décadas la Medicina ha avanzado de manera muy importante, y dentro de ésta, el trasplante de órganos y tejidos fue uno de los campos médicos que presentó mayor desarrollo, alcanzando objetivos antes no pensados.

Durante el siglo XX, se han producido avances importantes que tuvieron gran influencia en la evolución de la historia de los trasplantes. Entre ellos podemos destacar a Alexis Carrel quien desarrolló las suturas vasculares y realizó los primeros trasplantes experimentales en animales con éxito, a principio del siglo pasado, la utilización de bombas de perfusión y circulación extracorpórea, el desarrollo de la inmunología y las drogas antirrechazo.

Sin duda alguna, el descubrimiento de la ciclosporina por J.F. Borel en 1970 a partir del hongo *Trichocladium Inflatum* Gams y su introducción en el mercado a partir de la década del 80 marco un antes y un después en la "era de los trasplantes", ya que a partir de ese momento se comenzaron a obtener resultados clínicos muy satisfactorios, convirtiéndose el trasplante de órganos en una opción terapéutica válida para pacientes que sufren una falla terminal de la función de algún órgano.

En lo referente al trasplante hepático tuvo sus orígenes en el laboratorio de experimentación de los doctores Thomas Starzl y Francis Moore durante el fin del decenio de 1950 y principio de 1960. Fue T. Starzl quien realizó el 1º de marzo de 1963 el primer trasplante hepático humano, pero debido a los malos resultados clínicos obtenidos (supervivencia al año menor al 30 %), esta práctica estuvo considerada durante casi 20 años, como una práctica experimental.

A partir del año 1980, coincidiendo con la introducción de la ciclosporina, los resultados comenzaron a mejorar ostensiblemente, por lo tanto el trasplante hepático se transformó en una alternativa válida para el tratamiento de diferentes enfermedades hepáticas.(1)

El primer trasplante hepático en España fue realizado en el año 1984, en el Hospital de Bellvitge de Barcelona, y desde ese momento hasta finales de 2000 se han llevado a cabo más de 7700 trasplantes hepáticos en todo el país.(2) El número de trasplantes hepáticos realizados en España ha aumentado considerablemente desde principio de 1990 hasta la fecha. Desde 1984 hasta el año 1990, por ejemplo, se han realizado 407 trasplantes de hígado, mientras que durante el año 1990 se realizaron 313 trasplantes hepáticos y a partir de ese momento se presentó un aumento paulatino y sostenido de la actividad trasplantadora llegándose a trasplantar casi 1000 hígados en 1999.

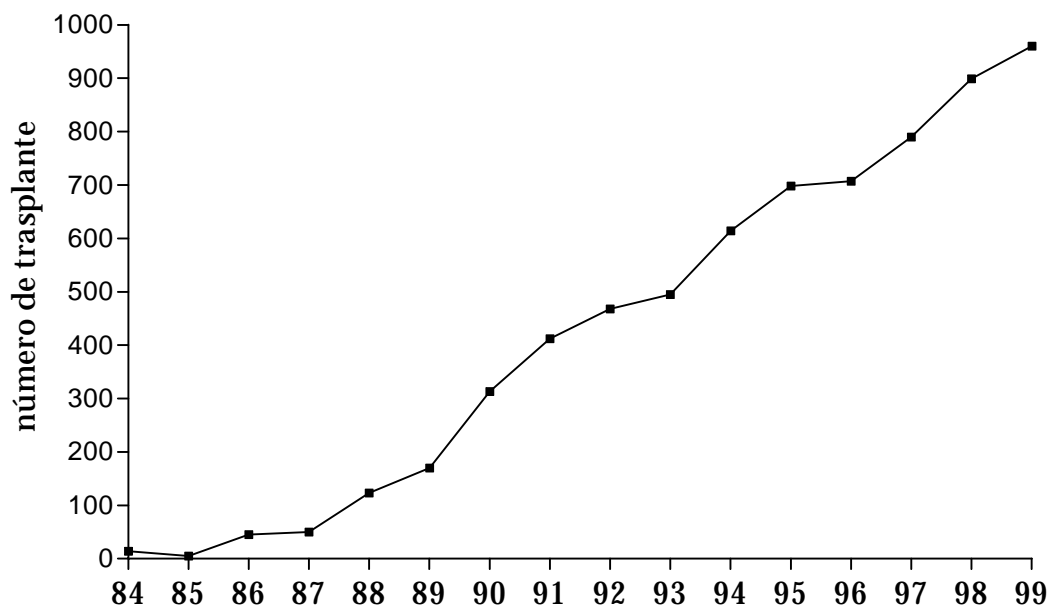


Figura 1: Evolución de los trasplantes hepáticos en España desde 1984 hasta 1999.(3)

Durante los últimos años España ha ocupado un privilegiado lugar dentro del concierto internacional en lo referente a la donación de órganos. En 1989 la tasa de donantes por millón de población (p.m.p.) de España era del 14,3, aumentando en 1995 a 27 donantes p.m.p. y en el año 2000 llegó hasta 33,9 donantes p.m.p.(3)

Junto con el aumento del número de donantes se ha producido un aumento de pacientes que ingresan a las listas de espera, que podemos ver reflejado en el tiempo que están los paciente en ellas, ya que por el año 1991 más del 75 % de los pacientes eran trasplantados antes de los tres meses y en la actualidad solamente el 55 % de los pacientes son trasplantados antes de ese período de tiempo.

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

1. 2. DIFERENTES SOLUCIONES ANTE LA FALTA DE DONANTES

Actualmente España es uno de los países que presenta la mayor tasa de donantes por millón de habitantes a nivel mundial: 33,9 por millón de habitantes (datos del año 2000). Ver tabla 1. Sin embargo, esto no soluciona el problema de la falta de órganos para trasplante, ya que el número de pacientes que ingresan a las listas de espera es mayor que el número de donantes existentes.

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

Tabla 1: Tasas de donantes por millón de población (p.m.p.) de diferentes países.(4)

Es por ello que los diferentes grupos trasplantadores han ido cambiando algunos criterios en la selección de los posibles donantes. Dentro de las modificaciones que se han ido presentando a lo largo de los años, el criterio en relación con la edad de los donantes fue quizás la que mayor importancia ha tenido. En el año 1990 se consideraba como edad límite para ser donante de hígado, los 55 años, mientras que en la actualidad no existe un límite máximo fijado para la edad del donante. Esto lo podemos ver reflejado en el aumento de la edad media de los donantes en España, que en el año 1991 era de 27 años y llegando a los 47 a fines de 2000.(3,5-8)

También son aceptados donantes con patologías crónicas como la hipertensión arterial, diabetes mellitus y más recientemente se han utilizado hígados de donantes con positividad para los anticuerpos contra hepatitis C (HCV +).(7,9) Otros datos que se tenían en cuenta como contraindicaciones y en la actualidad han quedado relegados son la estancia prolongada en unidades de cuidados intensivos prolongadas y la utilización de drogas vasoactivas.(10)

La esteatosis del injerto también ha sido un tema de largas discusiones. Actualmente se sabe que la macroesteatosis es la que se relaciona con mayores posibilidades de presentar una no función primaria (NFP). Es por ello, que algunos grupos de trasplantes aconsejan realizar biopsias por congelación en hígados cuyo aspecto macroscópico es esteatósico o existan antecedentes que indiquen que pueda ser un hígado con un alto porcentaje de esteatosis. Dicho procedimiento es útil para cuantificar el grado de esteatosis presente como así también para poder diferenciar entre la microesteatosis y la macroesteatosis, por ser ésta última un factor de riesgo de NFP.(7,11,12)

- ◆ Aumento en la edad de los donantes
- ◆ Donantes con patologías crónicas
- ◆ Split o bipartición hepática
- ◆ Donantes vivos
- ◆ Donantes a corazón parado

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

En lo referente al trasplante de hígado diferentes técnicas han ido surgiendo para suplir la falta de órganos. Dentro de ellas podemos destacar a la bipartición hepática o split, técnica por la cual de un hígado podemos obtener

dos injertos para ser trasplantados principalmente en la población pediátrica.(13-16)

Otra alternativa, quizás la más novedosa, es la realización de trasplante hepático con donantes vivos. Esto fue posible gracias al avance en cirugía hepática, al desarrollo de las técnicas de bipartición hepática y a un buen conocimiento de la anatomía del hígado por parte de los cirujanos. S. Raia, fue el primer cirujano en describir esta técnica a fines de la década del 80.(17) Esta técnica ha sido por años, la principal alternativa de obtención de órganos en países como Japón, quienes no contaban con legislación sobre el concepto de muerte cerebral. Así comenzaron con esta técnica para la realización de trasplante hepático, principalmente en la población pediátrica, obteniendo el segmento lateral izquierdo del donante (segmentos II y III).

Posteriormente y de la mano de los buenos resultados obtenidos se comenzaron a realizar trasplantes hepáticos con donantes vivos en adultos, realizándose al principio con segmentos laterales izquierdos, en receptores más bien pequeños, y en 1994 Y. Yamaoka reportó el primer caso de trasplante hepático realizado con el lóbulo derecho de un donante vivo.(18) Esta técnica fue muy aceptada por los diferentes grupos trasplantadores, ya que el lóbulo hepático derecho representa aproximadamente el 60 % de la masa hepática, lo que supone un buen tamaño de hígado para poder asegurar la buena función del injerto en un receptor adulto. Actualmente este tipo de trasplantes, ha llegado a representar hasta el 25 % del total de los trasplantes que se realizan en algunos centros.(19) En el año 2000, en el Hospital Clinic i Provincial de Barcelona, se ha llevado a cabo con éxito, el primer trasplante hepático en España, realizado con el lóbulo derecho de un donante vivo adulto.

Los donantes a corazón parado, que fueron la única fuente de órganos al comienzo de los trasplantes en la década del 50 hasta que se aceptó el concepto de muerte encefálica, constituyen otra posible fuente de obtención de

órganos.(20) El principal inconveniente que se presenta con este tipo de donantes es el tiempo de isquemia caliente a la cual están sometidos los órganos y que se ha demostrado que es muy perjudicial para la función de los mismos. Diferentes autores han podido demostrar en transplante renal que la utilización de donantes a corazón parado permite obtener resultados muy similares a los obtenidos con donantes a corazón latiente.(21-25) Sin embargo, la experiencia en transplantes hepáticos con este tipo de donantes continúa siendo escasa.(26-28)

1. 3. DONANTES A CORAZÓN PARADO

Podemos definir como donante a corazón parado aquella persona que presenta una parada cardiorrespiratoria irreversible tras maniobras de reanimación y presenta un período de isquemia caliente dentro del tiempo que se puede considerar óptimo, para poder realizar las maniobras de enfriamiento y preservación de órganos.

Actualmente más del 95 % de los donantes en España son cadavéricos a corazón latiente, mientras que solamente el 2, 5 % de los donantes en 1999 han sido a corazón parado.(3) En diferentes centros de Estados Unidos, casi el 10 % del total de trasplantes hepáticos se han realizado con hígados obtenidos de donantes a corazón parado. En el hospital San Carlos de Madrid, desde 1996, el 50 % de los órganos obtenidos fueron a partir de donantes a corazón parado. (26,28-30)

La obtención de órganos para trasplante a partir de donantes a corazón parado continua siendo en la actualidad un reto importante para la medicina. La situación actual nos permite obtener riñones en buenas condiciones para trasplante y es una situación contemplada de forma habitual en la práctica clínica. Lamentablemente no sucede lo mismo con relación al trasplante hepático. No debemos olvidar la ventaja que presenta en este aspecto el trasplante renal, ya que si un riñón procedente de un donante a corazón parado, es trasplantado y no funciona inmediatamente el paciente tiene la posibilidad de ser sometido a hemodiálisis, mientras que si un hígado trasplantado presenta una mal función primaria, el paciente necesita urgente un retrasplante ya que sino el único desenlace será la muerte del mismo.

Como hemos hecho referencia anteriormente, durante los últimos años, impulsados por la necesidad de aumentar el número de órganos disponibles

para trasplantes, se han vuelto a utilizar órganos obtenidos de donantes a corazón parado. Es por ello, en 1995, en Maastricht se ha llevado a cabo la primer reunión internacional sobre extracción de órganos a corazón parado. En esta reunión se unificaron diferentes criterios y se clasificó a los donantes a corazón parado de la siguiente manera (31):

Categoría I
Paciente que ingresa en parada cardíaca de tiempo indeterminado.
El sujeto sufre una parada cardíaca y se traslada al hospital sin habersele practicado maniobras de reanimación previas. El mayor inconveniente que presentan estos donantes es el desconocimiento exacto del tiempo de la parada cardíaca.

Categoría II
Individuos en parada cardíaca en los cuales las maniobras de reanimación son inefectivas
Son pacientes que estando ingresados en un hospital les sobreviene la parada cardíaca. A diferencia de la anterior categoría de donantes a corazón parado, conocemos todos los datos desde el momento de la parada cardiorrespiratoria. La actuación de los equipos de preservación debe ser rápida para lograr tener tiempos de isquemia caliente cortos.

Categoría III
Pacientes en los cuales se espera la parada cardíaca
En este grupo se incluyen los pacientes a los que se les retira la ventilación mecánica y/o el soporte terapéutico. Por el momento en España no se consideran como posibles donantes de órganos.

Categoría IV
Donante en muerte cerebral que sufre una parada cardíaca antes del procedimiento de extracción.
En este tipo de donantes a corazón parado la situación es más controlada ya que conocemos la historia clínica y podemos prever la parada cardíaca. Es el tipo de donantes a corazón parado más frecuente en nuestro medio.

Tabla 3: Donantes a corazón parado: Clasificación de Maastrich

De la clasificación anterior podemos diferenciar dos grupos de donantes a corazón parado: los no controlados que serían los correspondientes al grupo 1-2 y los controlados representados por el grupo 3 y 4.

Existen diferentes publicaciones donde se presentan experiencias con donantes a corazón parado controlados, donde la supervivencia y las complicaciones postoperatorias son similares a las que presentan los pacientes trasplantados con hígados obtenidos de donantes a corazón latiente. Por otro lado, es de nuestro conocimiento que la incidencia de mal función primaria es mayor en los pacientes trasplantados con hígados obtenidos de donantes a corazón parado no controlados.(32,33) A pesar de ser escasa, existe una pequeña experiencia con la utilización de hígados provenientes de donantes a corazón parado no controlados.(34)

Como hemos hecho referencia anteriormente, uno de los mayores inconvenientes cuando se obtiene un hígado de un donante a corazón parado es la posibilidad que ese injerto desarrolle una mal función primaria que lleve a la pérdida de ese injerto. Diferentes factores se encuentran implicados en su patogenia. Entre ellos tenemos a la isquemia caliente, la isquemia fría y la lesión por isquemia-reperfusión quienes llevan a que exista daño de las células endoteliales, activación de las células de Kupffer, adherencias de leucocitos,

formación de radicales libres, etc. Diferentes estudios experimentales proponen el uso de varios agentes hepatoprotectores para disminuir el daño hepático, tales agentes disminuyen la formación de radicales libres, inhiben la adhesión leucocitaria, etc. (35-37)

Por lo dicho anteriormente queda claro que el principal inconveniente que presentan los donantes a corazón parado es el período de isquemia caliente o sea el tiempo que el paciente está en parada cardíaca al que van a estar sometidos los diferentes órganos.

A pesar de los grandes esfuerzos para identificar cual es el tiempo de parada cardíaca ideal para poder obtener órganos de donantes a corazón parado, no existe en la actualidad una clara definición al respecto. La mayoría de los tiempos publicados son sobre la base de estudios experimentales en ratas y cerdos. Así mismo, se debe diferenciar aquellos trabajos donde se hace referencia a la tolerancia del hígado a la isquemia caliente en relación con cirugía hepática resectiva y aquellos trabajos que se refieren al tiempo de parada cardíaca al cual van a estar sometidos los órganos, en caso de donantes a corazón parado.

Desde hace mucho tiempo la tolerancia del hígado a la isquemia ha sido un tema que ha preocupado a los cirujanos. Diferentes trabajos relacionados con cirugía hepática resectiva, han podido demostrar que el hígado humano, tolera en normotermia, sin mayores problemas tiempos de isquemia caliente de 60 minutos.(38-40)

En relación al tema del tiempo de parada cardíaca y trasplante hepático con donantes a corazón parado, Richter y colaboradores publican que existen evidencias que los hígados pueden tolerar un tiempo de isquemia caliente que llegue a los 30 minutos y que períodos de 60 minutos de parada cardíaca se acompañan de malos resultados, ya que estos tiempos producen una deficiente

perfusión acinar y sinusoidal lo que traerá mayores alteraciones en la función del injerto. Por otro lado, Schön asegura, en un modelo de perfusión normotérmica ex-situ, que tras 75 minutos de parada cardíaca se pueden recuperar hígados para trasplantes.(41,42)

Existen evidencias histológicas que demuestran que a medida que el tiempo de parada cardíaca aumenta por encima de los 20 minutos, la histología de los hígados de cerdos trasplantados con injertos obtenidos de donantes a corazón parado presenta lesiones importantes a nivel de la vía biliar, lo que condiciona la viabilidad de dicho injerto.(43) Por su parte, sin hacer referencia a cambios histológicos y basándose sobre cambios en la carga energética y los valores de ASAT, Takada y colaboradores sugieren que el tiempo de parada cardíaca en cerdos debería ser menor de 60 minutos.(44)

El mismo Takada, en un modelo de trasplante hepático con donante a corazón parado en cerdos, publica que si se realiza el pretratamiento del donante con bloqueantes de las endotelinas y del factor activador de plaquetas se puede obtener una supervivencia del 100 % al séptimo día del trasplante, cuando los hígados son sometidos a 90 minutos de parada cardíaca. Este mismo grupo investigador, presenta resultados similares con el uso de FK 506, un inmunosupresor que ha demostrado tener cierta protección contra la lesión por isquemia-reperfusión.(45,46)

Avalado por su experiencia en trasplante hepático con donante a corazón parado en humanos, Yanaga aconseja que el tiempo de parada cardíaca debe estar entre quince y treinta minutos. Gómez y colaboradores publican en 1997 su experiencia clínica, en donde han sugerido que el tiempo de parada cardíaca compatible con una buena función del injerto debería ser menos de 15 minutos.(34,47) Quizas los resultados mas llamativos son los que publicados por Hong y colaboradores, de la Universidad de Hiroshima, Japón, quienes presentan su experiencia clínica en trasplante hepático con donante a corazón

parado donde comentan que con tiempos de isquemia caliente entre los 32 y 45 minutos, no han tenido ningún caso de no función primaria.(48)

1. 4. DONANTES A CORAZÓN PARADO: TÉCNICAS DE OBTENCIÓN DE ÓRGANOS.

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

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

1. 4. 1. Enfriamiento in situ

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

Se comenzó a realizar por medio de un catéter colocado en la arteria y vena femorales. El catéter arterial se utiliza para la infusión de los líquidos de preservación, mientras que el catéter venoso se utiliza para la salida de sangre. Posteriormente se utilizó el catéter femoral de doble balón diseñado por Garcia-Rinaldi en 1975 y que fuera ampliamente utilizado por los diferentes equipos trasplantadores. Se procede a la disección de la arteria femoral y se introduce el catéter con dos balones que, una vez hinchados, se sitúan por encima y por debajo de las arterias renales. Con este método se enfría selectivamente el área renal.(22,49,50)

La perfusión de los líquidos de preservación ha sido un tema que también se ha estudiado. Se ha comprobado que la perfusión a altas presiones (más de 70 mmHg) consigue un enfriamiento más rápido como así también una disminución en la resistencia intraparenquimatosas hecho que tendría importancia en la futura función del injerto.(49,51-55)

Con el tiempo fueron surgiendo diferentes variaciones en éste tipo de procedimiento, una de ellas fue la utilización de bombas de perfusión para realizar el enfriamiento argumentando que con este procedimiento se logran mejores presiones de perfusión a nivel intraparenquimatoso.

El tiempo entre la parada cardíaca y la extracción pueden ser hasta 2-3 horas cuando se utilizan máquinas de perfusión, mientras que cuando se perfunde con gravedad se recomienda que sea de 1 hora. Otra alternativa utilizada ha sido la administración de fentolamina, previa a la infusión de los líquidos de lavado, para producir una mayor relajación vascular y permitir de esta manera una buena perfusión de los órganos con el líquido de preservación.(56,57)

1. 4. 2. Enfriamiento corporal total

Este método consiste en la realización de todo el cuerpo por medio de una bomba de circulación extracorpórea. Se ha descrito en un principio para la preservación del corazón y pulmón y a partir de ahí, se comenzó a utilizar para el enfriamiento de órganos abdominales (principalmente riñones) en países donde el concepto de muerte cerebral no existía y los donantes a corazón parado eran la única fuente de órganos para trasplantes. El enfriamiento de todo el cuerpo se realiza con Ringer lactato y con la misma sangre del paciente. Esto último permite mantener una buena oxigenación de los órganos mientras se disminuye la temperatura de los mismos. Así mismo, el flujo de la bomba de recirculación que se utiliza es alto, 2000-3000 ml/min., lo que permite que exista una alta perfusión de los órganos evitando así que se produzca vasoconstricción y que aumente el daño isquémico. El tiempo aproximado de enfriamiento con este método es de 20 a 30 minutos. En relación al trasplante hepático, ha sido demostrado que este método es superior a las técnicas de lavado in situ.(58-64)

Diferentes trabajos experimentales han demostrado que la hemoperfusión de riñones previo a la isquemia fría mejora la viabilidad de los órganos a transplantar. Por su parte, Hosino T., presenta en 1994, que la realización de un período de hemoperfusión a 37°C antes del enfriamiento corporal total, es beneficioso en la obtención de hígados de donantes a corazón parado. Por su parte, Tojimbara, en 1995 publica un trabajo experimental de trasplante hepático en ratas con donantes a corazón parado, donde demuestra que realizando el lavado del hígado con solución de Wisconsin a 37 °C, la lesión por

isquemia reperfusión es menor tanto desde el punto de vista bioquímico como histológico.(37,65-68)

La realización de un período de hemoperfusión antes del enfriamiento corporal total ha demostrado ser eficaz en la obtención tanto de riñones como hígados para trasplantes con buenos resultados clínicos.(69) Este procedimiento se ha denominado recirculación normotérmica. Más adelante explicaremos detalladamente como se realiza dicho procedimiento.(30)

1. 5. LESIÓN POR ISQUEMIA REPERFUSIÓN

Durante el proceso de obtención de un órgano a partir de un donante a corazón parado y su posterior implante en el receptor, existen etapas en las que se producen diferentes lesiones en el injerto, derivadas las mismas de la falta de irrigación sanguínea de dicho órgano, del almacenamiento en frío del mismo y de su posterior reoxigenación una vez implantado, por lo tanto estudiaremos separadamente lo que ocurre durante estos tres períodos bien diferenciados (26):

- 1- Isquemia caliente: Es el período de tiempo durante el cual el individuo está en parada cardiorrespiratoria.
- 2- Isquemia fría: Abarca el período desde la entrada de los líquidos de enfriamiento hasta la reperfusión del órgano una vez implantado.
- 3- Reperfusión: Es cuando el injerto es reoxigenado con la sangre del receptor.

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

1. 5. 1. Lesiones por isquemia caliente.

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

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

En el interior de la célula debido a la disminución en la fosforilación oxidativa, se comienza a consumir el ATP existente, siendo este un mecanismo que utiliza la célula para mantener su homeostasis. El ATP es hidrolizado a ADP y AMP.(70) El AMP posteriormente es catabolizado a hipoxantina, siendo ésta última importante en la lesión por reperfusión. Así mismo se estimula la glucólisis anaerobia formándose ácido láctico, lo que produce la disminución del pH intracelular con la consiguiente acidosis intracelular. La depleción de los depósitos de energía celular lleva a un fracaso en la homeostasis celular que simultáneamente llevará a un trastorno en los gradientes transmembrana. (71)

En el ámbito de la membrana plasmática se produce una alteración de la actividad de la bomba Na-K-ATPasa, que es la encargada de mantener el equilibrio iónico entre la célula y el espacio intersticial, produciéndose una alteración del transporte de sodio, calcio y potasio. Los iones sodio penetran dentro de la célula, arrastrando así un gran volumen de agua y los iones potasio salen de la célula para mantener el equilibrio iónico en el espacio intersticial.

Ello conduce a la aparición de edema celular y a diferentes alteraciones citoplasmáticas (autólisis de lisosomas, dilatación del retículo endoplasmático), que llevarán inevitablemente a la muerte de la célula.

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

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

Tabla 4: Mecanismos patogénicos implicados en la lesión por isquemia.

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

1. 5. 2. Lesión por preservación

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

La razón primaria por la cual, la hipotermia mantiene viable los órganos preservados es por medio de la disminución del metabolismo celular, es decir que disminuye la velocidad a la cual las enzimas intracelulares degradan los componentes necesarios para la viabilidad del órgano. Este proceso es reversible con la reperfusión del órgano. Queda claro que el almacenamiento hipotérmico, no impide la muerte celular, sino que solamente la retrasa. Así la mayoría de los sistemas enzimáticos presentan una disminución de 1,5 a 2 veces su actividad por cada 10 °C que se disminuye la temperatura.(72)

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

Así mismo, el lavado con las soluciones de preservación, tiene la función de lavar el árbol intravascular de células sanguíneas, aglutininas y diferentes factores de la coagulación. La realización de un mal lavado puede llevar a una

disfunción de la microcirculación del órgano que trae aparejado trastornos de la reperfusión y en la función del mismo.

1. 5. 3. Lesión por reperfusión

Cuando se produce la llegada de sangre oxigenada al hígado trasplantado, debido a la reperfusión, comienzan a producirse diferentes tipos de fenómenos, los cuales se caracterizan por dañar al órgano trasplantado. Esto es lo que se conoce con el nombre de lesión por reperfusión. Esta es el resultado de la interacción de sustancias vasoconstrictoras y vasodilatadoras que actúan al nivel de la microcirculación hepática.(73-75)

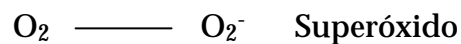
En lo referente a trasplante hepático, diferentes trabajos han demostrado que el principal lugar de impacto de la lesión por isquemia reperfusión es la microcirculación hepática y más específicamente la célula endotelial sinusoidal. (76-78)

Existen diferentes mediadores y acontecimientos los cuales han sido fuertemente implicados dentro de la patogenia de la lesión por reperfusión entre los cuales podemos citar la producción radicales libres de oxígeno y diferentes citoquinas inflamatorias, la adhesión de leucocitos y plaquetas a la pared sinusoidal, la activación de las células de Kupffer, la producción de óxido nítrico, endotelinas y factor de necrosis tumoral-alfa (FNT- α), la activación del complemento. (79) Así mismo, también conocemos que los diferentes tejidos, cuentan con sistemas enzimáticos encargados de proteger contra la lesión producida por la isquemia-reperfusión.(36,80-82)

1. 5. 3. 1. Producción de radicales libres

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

Los RLO son moléculas inestables que tienen uno o varios electrones no apareados en su estructura y han sido implicados en la lesión por isquemia reperfusión.(83,84) Los radicales libres se producen por la reducción del oxígeno molecular, según el número de electrones de oxígeno que se reducen vamos a tener diferentes tipos de radicales libres. Con la reducción de un electrón tendremos superóxido (O_2^-), con la de dos; peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y con la reducción de tres: radical hidroxilo (OH^\cdot).(84,85)



Durante la isquemia, a nivel intracelular se acumula hipoxantina, derivada del metabolismo del ATP, necesario para mantener los niveles energéticos celulares. Paralelamente, ocurre la conversión de xantina deshidrogenasa tipo D, a xantina oxidasa O, por acción de una proteasa dependiente del Ca^{++} . Durante la reperfusión, ésta última enzima es la encargada de transformar la hipoxantina en xantina generándose de esta manera peróxido de hidrógeno, anión hidroxilo y ácido úrico.(36,83,86,87) Ver figura 2.

El mecanismo por el cual los RLO producen daño celular es por su acción al nivel de la membrana plasmática donde producen la peroxidación de los lípidos.(88,89) Este daño, también provoca alteraciones en las organelas

citoplasmáticas, como los lisosomas y las mitocondrias. También los RLO producidos en diferentes células producen señales que determinan el aumento de sustancias proinflamatorias, como por ejemplo aumento de TNF- α , expresión de moléculas de adhesión, formación de factor activador de plaquetas, reclutamiento de leucocitos y producción de diferentes tipos de interleuquinas.(90)

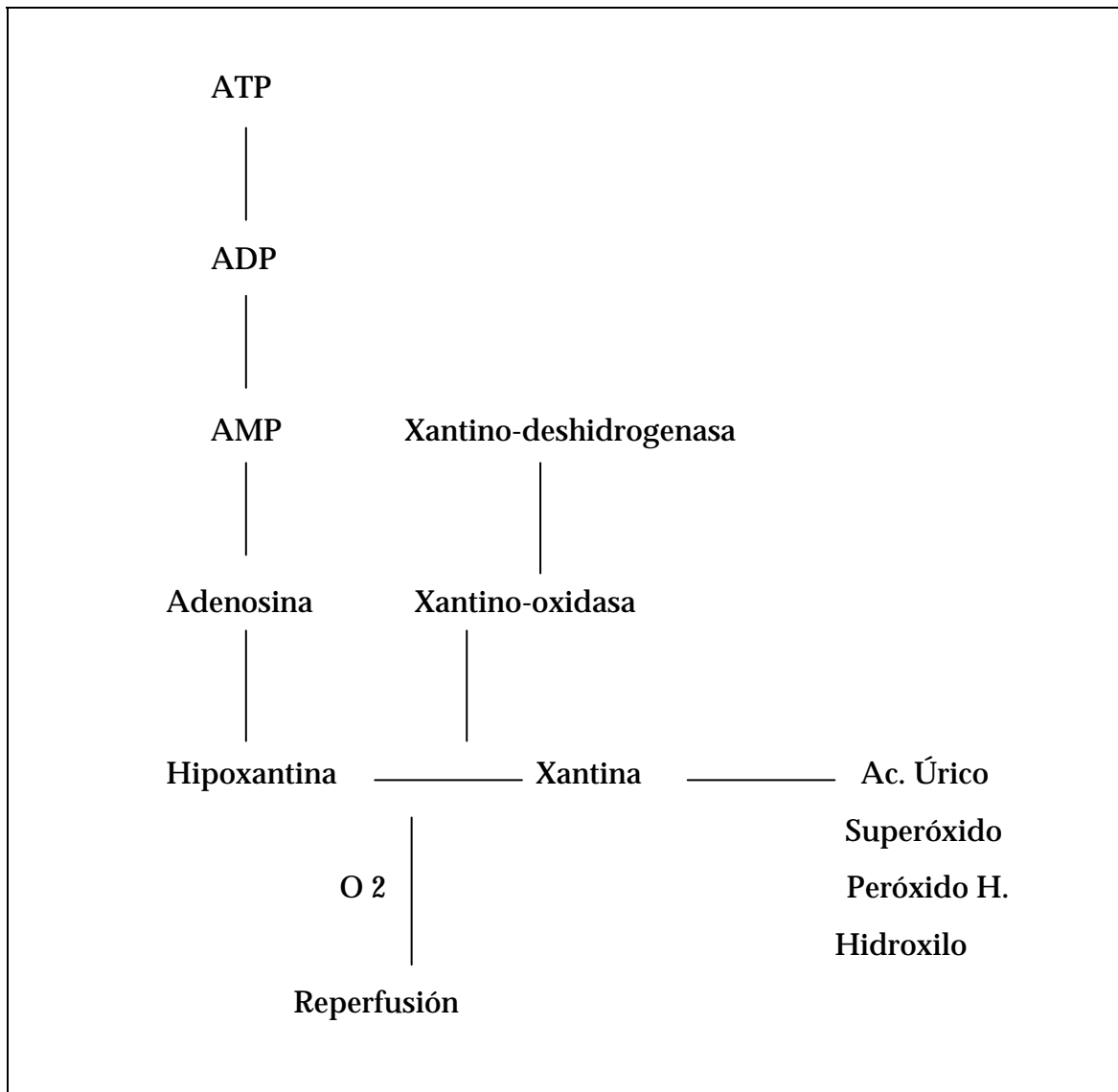


Figura 2: Vía de degradación del ATP y formación de radicales libres a partir de la xantino oxidasa.

1. 5. 3. 2. Adhesión leucocitaria

Tanto en la isquemia como en la reperfusión se puede observar un aumento de la adhesión de los polimorfonucleares a las células endoteliales, lo que puede provocar un aumento de la permeabilidad y aparición de edema celular. Los neutrófilos provocan lesión celular por medio de mediadores citotóxicos como pueden ser los radicales libres y por medio de proteasa tales la catepsina y la elastasa.(91,92)

Uno de los eventos que ocurre inmediatamente tras la reperfusión es el aumento de la expresión de p-selectina por parte de las células endoteliales, que es una de las principales señales que existen para la adhesión de los leucocitos a la pared del sinusoides.(93,94) Así mismo también existe un aumento en la adhesión de las plaquetas en los sinusoides hepáticos, acontecimiento que se acompaña de un aumento de la apoptosis en las células endoteliales, lo que traerá aparejado mayor daño hepático tras la reperfusión.(95,96)

1. 5. 3. 3. Activación de células de Kupffer

Quizás uno de los fenómenos que mayores implicancia tenga en la lesión por reperfusión es la activación de las células de Kupffer. Con la activación de las células de Kupffer se presenta un aumento en la producción de los radicales libres, de diferentes citoquinas y sustancias vasoconstrictoras, de la síntesis de FNT- α , lo que producirá lesión endotelial, mayor adhesión leucocitaria y por último un grado mayor de lesión parenquimatosa.(97,98)

Ha sido demostrado en diferentes trabajos de experimentación que el pretratamiento de los animales donantes con diferentes bloqueantes de la actividad de las células de Kupffer se acompaña de menor daño hepático tras la reperfusión del injerto.(81,99-101)

1. 5. 3. 4. Producción de FNT- α y sustancias vasoactivas

El FNT- α ha sido implicado tanto en la lesión hepática como pulmonar tras el trasplante hepático. Tiene su origen en diferentes células, entre ellas, las células de Kupffer, células intestinales, células del epitelio biliar, y células endoteliales.(102) Esta citoquina propaga la respuesta inflamatoria por el hígado y órganos vecinos por medio de la inducción de moléculas de adhesión I, también provoca la activación de sustancia procoagulantes y depósitos de fibrina, incremento de la IL 1 y del factor activador de plaquetas. Así mismo ha sido demostrado que aumenta la adhesión de leucocitos tanto en el hígado como en el pulmón. (90,98,103-105)

El óxido nítrico (ON) es otra de las sustancias que se encuentran implicadas en la patogenia de la lesión por isquemia-reperfusión. Existen evidencias que demuestran la importancia fundamental del ON en la protección de la microcirculación bajo condiciones patológicas.(74,75,106,107)

Diversos autores, ponen de manifiesto, la posibilidad que el ON tenga también efectos deletéreos sobre el hígado en presencia de radicales libres, como puede ser por ejemplo el superóxido, que al unirse al ON formarían peroxinitrito quien tiene efectos citotóxicos al producir la peroxidación de lípidos.(108-110)

Las endotelinas son sustancias vasoconstrictoras que han sido aisladas del endotelio vascular.(111,112) Paralelamente a todos los cambios señalados,

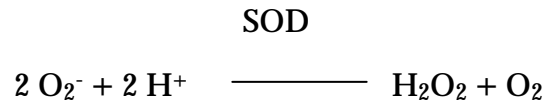
ha sido demostrado que durante reperfusión hay un aumento de la endotelina 1 (ET-1) en el tejido hepático y en plasma.(75,113) A nivel del sinusoides hepático, la ET-1 produce una disminución del calibre de los mismos, disminuyendo el flujo sanguíneo dentro de ellos.(114,115) En diferentes modelos experimentales se ha utilizado antagonistas de los receptores de endotelina tanto en donantes como en los receptores, logrando una disminución de la lesión de las células endoteliales durante la reperfusión. (45,75,116,117)

Durante la isquemia reperfusión se liberan tanto por células de Kupffer, como por células endoteliales y otras células, diferentes tipos de citoquinas. Entre ellas podemos citar a la interleuquina 1 (IL 1), IL 6, IL 8, IL 10 e IL12. Camargo y colaboradores, han demostrado en un modelo experimental en ratas, que minutos después de la reperfusión se produce un aumento de IL 6, que tiene un efecto protector contra la isquemia caliente por medio de sus propiedades antiinflamatorias y también por disminuir la producción de FNT- α .(118) En contraste la IL 1, IL 10, IL 12 aumentan también tras la reperfusión y tendrían efectos perjudiciales, a través de la producción de radicales libres y por incrementar la producción de FNT- α .(98,119) Otras sustancias que también aumenta durante la reperfusión, producto de la lipoperoxidación son el leucotrieno B4, la prostaciclina y las prostagandinas E y F.(120,121)

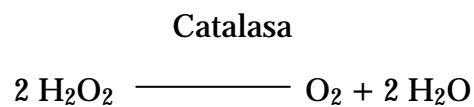
1. 5. 3. 5. Mecanismos celulares de defensa.

Por otro lado, además debemos recordar que los propios tejidos cuentan con diferentes enzimas que intentarán defender la célula de la agresión, entre las que podemos nombrar la superóxido dismutasa, la catalasa y la glutathion reductasa cuya principal función es eliminar los radicales libres formados a partir del oxígeno.(85,122)

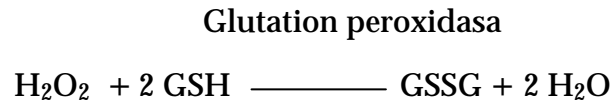
La **superóxido dismutasa (SOD)** cataliza la reacción entre dos radicales superóxido y generando peróxido de hidrógeno y O₂.



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



Por su parte la **glutathion peroxidasa** cataliza la oxidación del glutathion reducido y el peróxido de hidrógeno.



Queda claro que del balance en la producción de todas estas sustancias dependerá el estado final de la microcirculación y principalmente de las células endoteliales del sinusoides hepático que es el principal blanco de toda la agresión.(76),(123)(78,124)

1. 6. UTILIZACIÓN DE LA RECIRCULACIÓN NORMOTÉRMICA EN LA OBTENCIÓN DE ÓRGANOS A PARTIR DE DONANTES A CORAZÓN PARADO: ESTADO ACTUAL.

Durante los últimos años nuestro grupo investigador se ha centrado su actividad en un programa de trasplante hepático experimental en cerdos, con donantes a corazón parado y utilización de by-pass cardiopulmonar con oxigenación tisular a 37 °C. A este procedimiento se lo ha denominado RECIRCULACIÓN NORMOTÉRMICA (RN).

El primer objetivo planteado fue demostrar la utilidad que tiene la realización de RN antes del enfriamiento corporal total y la obtención de los órganos. Se ha podido demostrar que la supervivencia en cerdos trasplantados con hígados obtenidos de donantes a corazón parado y utilización de RN es similar a la obtenida en cerdos trasplantados con hígados obtenidos de donantes a corazón latiente. Por otro lado, si durante la obtención de hígados a partir de donantes a corazón parado no se realiza la RN, la supervivencia al quinto día de los cerdos trasplantados es nula. Ello demuestra que la utilización de circulación extracorpórea a 37° y oxigenación tisular es indispensable para obtener hígados de donantes a corazón parado y a su vez es capaz de revertir la lesión por isquemia que sucede después de la parada cardíaca y que se traduce en lesión hepatocitaria y sinusoidal, evidenciadas indirectamente por la elevación plasmática de las transaminasas, α -GST y el ácido hialurónico y directamente por la lesión histológica.(125) Es sabido que después de un determinado tiempo de parada cardíaca, la carga energética celular comienza a disminuir y esto repercute de manera negativa en la función de los hígados trasplantados. Se ha podido demostrar, que tras la realización de la RN la carga energética de los hígados se recupera a valores observado antes del período de isquemia caliente.(126)

En un intento de determinar cual es el tiempo ideal de parada cardíaca que se relaciona con una buena función postrasplante se ha trabajado, siguiendo la misma línea de investigación, con tiempos de isquemia caliente de 20, 30 y 40 minutos. La supervivencia del injerto a los cinco días se relaciona de forma inversamente proporcional con el tiempo de isquemia caliente, es decir 100, 70 y 50% para tiempos de isquemia caliente de 20, 30 y 40 minutos respectivamente. Esto nos habla de la sensibilidad que tiene el hígado a tiempos prolongados de isquemia caliente.(127,128)

Durante el mismo estudio experimental se ha evaluado el flujo sanguíneo hepático y el cociente de extracción de oxígeno como predictores de la viabilidad del injerto. En este aspecto se ha observado que los flujos sanguíneos elevados de la bomba de circulación extracorpórea, vena porta y arteria hepática se correlacionan positivamente con la supervivencia del injerto, obteniéndose el mayor flujo de bomba en aquellos donantes con menor tiempo de isquemia caliente.(129) También se ha comprobado que aquellos cerdos en donde la extracción hepática de oxígeno en el animal donante durante la recirculación normotérmica es mayor, existe una disminución de la supervivencia al quinto día postrasplante.

Por otro lado la utilización de diferentes sustancias farmacológicas, que se han mostrado capaces en estudios previos de reducir la lesión por isquemia reperusión, durante la RN, ha permitido posteriormente comprobar que el periodo de isquemia caliente puede aumentar hasta los 40 minutos sin perjudicar la supervivencia ni perjudicar la viabilidad del injerto, tanto a corto (preservación de la función hepatocelular) como a largo plazo (conservación de la integridad de la vía biliar especialmente sensible a los periodos de isquemia). Dentro de las sustancias farmacológicas utilizadas por nuestro grupo están la L-Arginina, quien es un precursor de la síntesis del óxido nítrico, la S-adenosyl-metionina (Same), que actúa mediante la elevación de los niveles intracelulares de glutatión y de adenosina y la glicina que tiene un efecto

estabilizante de membrana lo que disminuye la activación de las células de Kupffer y por consiguiente la síntesis de sustancias vasoconstrictoras.(130-135)

Por lo descrito anteriormente, queda claro el beneficio que produce la realización de la recirculación normotérmica previo al enfriamiento corporal total, pero es poco lo conocido acerca de su mecanismo de acción.

Durante los últimos años nuestro grupo ha podido demostrar que la RN consigue aumentar los niveles de adenosina circulantes y ésta sería la responsable del efecto beneficioso de la RN. El hecho del aumento de la adenosina durante la RN y la extracción del hígado, o sea antes de la isquemia-reperfusión se asemeja al mecanismo de protección que confiere en el hígado el preconditionamiento isquémico (PI).

El PI consiste en provocar un breve período de isquemia, seguido de otro de perfusión, en un órgano que posteriormente será sometido a períodos de isquemia y perfusión más prolongados. Con ello se consigue que el órgano o tejido sea más resistente a la lesión por isquemia-reperfusión. Este fenómeno ha sido descrito en primer lugar en el corazón y posteriormente fue aplicado a diferentes órganos entre los que se encuentra el hígado.(136-139)

El mecanismo exacto por el cual actúa el PI hoy día no ha sido aclarado totalmente. Es conocido que la realización del PI provoca un aumento en los niveles circulantes de adenosina y ésta actúa a nivel hepático por medio de la activación de los receptores A_2 . Por otro lado se postula que el efecto beneficioso de la adenosina estaría mediado por el aumento de la producción de óxido nítrico principalmente a partir las células endoteliales.(140,141)

Es por ello que nos hemos planteado la posibilidad de estar frente a fenómenos similares y decidimos evaluar la importancia del aumento de adenosina que se observa durante la RN y determinar por medio de que

mecanismo actúa. A diferencia de los que ocurre en el PI, donde se actúa antes de un período de isquemia, la RN revierte las lesiones que se producen durante la isquemia, es decir que estamos actuando después del período isquémico.

De la evaluación de los resultados de este estudio se puede deducir que la RN actúa por medio de un mecanismo de acondicionamiento en el hígado, por medio de los receptores A_1 y A_2 .

Es fácil de comprender esta acción a nivel de dos receptores distintos. Los receptores A_2 una vez que son estimulados producen como repuesta un aumento de los niveles intracelulares de AMPc, mientras que los receptores A_1 producen el efecto contrario, es decir, una vez que son estimulados disminuyen los niveles de AMPc. Esto lo hemos comprobado por medio del bloqueo selectivo de los receptores A_1 con el uso de 8-Ciclipentil-1,3-dipropilxantina (DCPCPX) durante la RN produce el efecto beneficioso máximo que se puede obtener. Decimos efecto beneficioso máximo por que por un lado estamos aumentando los niveles de adenosina con el empleo de la RN y ésta actuaría a través de los receptores A_2 y por otro lado estamos bloqueando los receptores A_1 que disminuyen los niveles de AMPc.

Estos resultados están avalados por diferentes estudios experimentales, entre los que podemos destacar el trabajo de Minor y colaboradores quienes han demostrado en un modelo de trasplante hepático experimental en ratas, que la estimulación farmacológica de los receptores A_2 mejora la viabilidad de los hígados obtenidos de donantes a corazón parado, disminuyendo la lesión hepatocelular y mejorando la producción de bilis. Este efecto estaría mediado por el aumento del AMPc que provoca una disminución del Ca^{++} intracelular, inhibiendo la formación del complejo Ca^{++} -calmodulina que lleva a la lesión de la membrana celular y lesión mitocondrial.(142)

1. 7. IMPORTANCIA DEL ÓXIDO NÍTRICO DURANTE LA RECIRCULACIÓN NORMOTÉRMICA Y LA OBTENCIÓN DE HÍGADOS DE DONANTES A CORAZÓN PARADO.

Furchgott y colaboradores, a principio de la década del 80, descubrieron una sustancia derivada del endotelio vascular con efecto vasodilatador al que denominaron: factor relajante derivado del endotelio (EDRF), pero fue Palmer, en 1987, quien denominó óxido nítrico (ON) a este vasodilatador tras demostrar en cultivos de células endoteliales que las acciones del EDRF y ON son idénticas.(143)

El ON es uno de las principales sustancias implicadas en la distribución del flujo sanguíneo a nivel de todo el organismo. Es sintetizado a partir de las células endoteliales y es el encargado de mantener un tono vasodilatador basal. Existen diferentes estímulos que hacen que la producción de ON aumente, tales como el ejercicio físico, el estrés de rodamiento (shear stress), la baja presión de oxígeno, entre otros. Existen evidencias que el ON tiene otras funciones vasculares, como por ejemplo: la disminución de la adhesión de neutrófilos y plaquetas a las células endoteliales y la disminución de la permeabilidad capilar.(144)

El ON, es un radical libre, altamente inestable que se forma a partir de la L-arginina por acción de la óxido nítrico sintasa. Para la oxidación de la L-arginina son requeridos como cofactores: NADPH, tetrahidrobioproteína y calmodulina. El óxido nítrico tiene una vida media muy corta, sólo de algunos segundos y es rápidamente convertido en nitrito (NO₂), nitrato (NO₃) y citrulina.(145-147)

Existen dos isoformas de óxido nítrico sintasa: la óxido nítrico sintasa constitutiva (cNOS) y la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS). La cNOS se

encuentra en las células endoteliales y produce poca cantidad de ON. La iNOS se encuentra en las células sinusoidales (células endoteliales y de Kupffer) y en los hepatocitos y es la encargada de sintetizar la mayor cantidad de ON.(107,148-150)

	cNOS	iNOS
Células de origen	Endoteliales Neuronales,	Macrófagos Hepatocitos Kupffer Musculares lisas
Activadores	Trombina ADP Glutamato Presion Shear stress	
Inductores	Ejercicio fisico	Lipopolisacáridos Interleucina 1 Factor de necrosis tumoral α
Cantidad de producción	Pequeñas y en pulsos	Grandes y continuas
Dependencia de calcio	Si	No

Tabla 5: Comparación entre la óxido nítrico sintasa constitutiva (cNOS) y la oxido nítrico sintasa inducible (iNOS).

La acción del ON es ejercida a través de la vía de la guanilato ciclasa, quién aumenta la concentración intracelular de GMPc y este provoca la activación de una proteinquinasa que fosforila las cadenas de miosina provocando la relajación del músculo liso.(148,151)

Es conocido que el óxido nítrico es uno de los principales responsables del estado de la microcirculación a nivel de todo el organismo. Así mismo, durante la isquemia-reperfusión de cualquier órgano hay cambios importantes en la síntesis de dicha sustancia vasodilatadora. Se ha demostrado en diferentes trabajos experimentales que la inhibición en la síntesis del óxido nítrico, se acompaña de una mayor lesión por isquemia reperfundida. Opuestamente, la administración de L-Arginina, un precursor en la síntesis del óxido nítrico confiere protección contra la lesión por isquemia-reperfusión.(106,131,152-157)

Es por ello, que hemos pensado que durante la obtención de órganos de donantes a corazón parado y utilización de recirculación normotérmica, es posible que el óxido nítrico tenga un papel importante en la protección de la microcirculación hepática.

HIPÓTESIS

2. HIPOTESIS

Por un lado sabemos que el aumento de la adenosina es uno de los mecanismos por los cuales actúa la recirculación normotérmica y paralelamente por otro lado, se ha demostrado en diferentes estudios que el beneficio que produce el preconditionamiento isquémico es debido a un aumento en los niveles de adenosina, siendo el último efector en la protección hepática el óxido nítrico.

En estudios anteriores hemos podido demostrar que la recirculación normotérmica actúa mediante un mecanismo de acondicionamiento en el hígado y es por ello que nos hemos preguntado: ¿es también el óxido nítrico el último efector?

Si así fuera, sería el ON mediante su efecto vasodilatador el que favorecería el flujo sanguíneo hepático y la buena perfusión del hígado, factor esencial que sabemos se correlaciona con la viabilidad de órgano en el trasplante hepático.

OBJETIVOS

3.

3. OBJETIVOS

Objetivo general

Demostrar en un modelo de trasplante hepático experimental en el cerdo con donantes a corazón parado, si el efecto beneficioso de la recirculación normotérmica está mediado por una elevación de los niveles de óxido nítrico.

Objetivos concretos

1- Ver si existe diferencia en la sobrevida en los diferentes grupos dependiendo de la inhibición o no de la síntesis del ON.

2- Observar si existe alguna diferencia en la lesión hepatocelular, lesión endotelial, concentración de nitritos y nitratos en sangre y la carga energética entre grupos donde se realice la administración o no de L-NAME.

3- Evaluar los cambios en el flujo hepático y en el metabolismo hepático del oxígeno tras la administración de L-NAME durante la RN.

4- Evaluar los cambios histológicos presentes en el tejido hepático en las muestras obtenidas al quinto día del trasplante en los animales supervivientes.

MATERIAL Y METODOS

4. 1. TRASPLANTE HEPÁTICO EN CERDOS

Desde hace muchos años se ha utilizado al cerdo como animal de experimentación para la realización del trasplante hepático. Este hecho se basa principalmente en una anatomía parecida entre el hígado del cerdo y el hombre, una fisiología semejante además de ser un animal que se puede criar fácilmente en cautiverio, de reproducción numerosa y económicamente accesible. Así mismo en lo referente al trasplante hepático específicamente, la técnica quirúrgica utilizada en el cerdo es similar a la realizada en el humano, además este animal tolera bien determinado tiempo de clampaje portal y se acompaña de un grado de rechazo agudo leve.(158-160)

Por todo ello hemos utilizado pares de cerdos raza Large White, entre 25-30 Kg. de peso. Se utiliza un animal como donante y otro como receptor, siendo el único requisito que sean semejante en peso. Los trasplantes se han realizado sin prestar importancia al sexo del animal.

La técnica utilizada es el trasplante hepático ortotópico sin preservación de vena cava, como ha descrito, ya hace muchos años, R. Calne.(158) Hemos realizado algunas modificaciones entre la que podemos destacar que no hemos utilizado en los cerdos receptores ningún tipo de by-pass veno-venoso para descongestionar la región esplácnica durante el clampaje portal, hecho que lo basamos en el corto período de dicho clampaje: menos de 20 minutos, circunstancia que es bien tolerada por los cerdos.

Durante los últimos cinco años toda la actividad quirúrgica se ha llevado a cabo en el Estabulario de Cirugía Experimental perteneciente a la Facultad de Medicina de la Universidad de Barcelona.

Durante todo este tiempo el grupo investigador a puesto a punto el modelo de trasplante hepático en cerdo para el cual es necesario el uso de varios aparatos para el control y monitorización desde el punto de vista anestésico, así como propios para poder realizar cualquier intervención quirúrgica. Básicamente, el quirófano cuenta con:

- un aparato de ventilación mecánica (respirador Siemens Serrvo 900[®]).
- un monitor de presiones y electrocardiograma (Hewlett-Packard[®]).
- un analizador de gases (Ciba-Corning[®]).
- una bomba de rodete no pulsátil (Stöckert Shiley[®]) con un intercambiador de temperatura (Marcusor, Sorin[®]), así como un oxigenador pediátrico (William Harvey H-300 Bard[®] pediátrico).
- equipo de medición de flujos sanguíneos (Transonic System[®]).
- un bisturí eléctrico (Magari 1, Cuatro SA[®]).
- sistema de aspiración de campo quirúrgico central.
- un calentador de sueros.

En el estabulario de la Facultad de Medicina existen corralinas individuales, con piso templado y acceso de agua a demanda. Así mismo cuenta con personal especializado que se encarga diariamente de la alimentación y limpieza de los animales.

Todos los animales son suministrados por la misma granja especializada. Cada animal se encuentra, previo a la cirugía en una corralina templada, con acceso a alimentación y líquidos. Todos los animales fueron sometidos a un ayuno de 24 horas antes de la cirugía, solo se les permitió ingesta de agua durante este período.

4. 2. DISEÑO DEL ESTUDIO

Como primer paso en el trasplante hepático en cerdos con donantes a corazón parado se debió determinar un modelo para la realización de parada cardíaca. Entre las diferentes alternativas existentes, la inyección intravenosa de 20-30 mEq de ClK ha demostrado ser segura, efectiva y permite mantener la volemia del cerdo, hecho que en este modelo de donantes a corazón parado con utilización de RN y oxigenación tisular es indispensable mantener.

Para la realización de la RN se utiliza una bomba de recirculación extracorpórea portátil, a la cual se acopla el sistema de reservorio sanguíneo, oxigenador y guías de conexión entre la bomba y el cerdo. Así mismo también cuenta con un intercambiador de temperatura.

Se estudiaron 40 pares de cerdos, a los que se les practicó un trasplante hepático con donante a corazón parado. El animal donante, se sometió a diferentes condiciones, según la siguiente distribución aleatoria randomizada:

Grupo 1: Período de parada cardíaca de 20 minutos seguido de un periodo RN de 30 minutos a 37°C y oxigenación tisular, posteriormente se realizó el enfriamiento corporal total hasta los 15°C y por último la irrigación del hígado con solución de Wisconsin y extracción del órgano.

Grupo 2: Período de parada cardíaca de 20 minutos seguido de un periodo RN de 30 minutos a 37°C y oxigenación bloqueando la acción de la óxido nítrico sintetasas con la adición de L-Omega-Nitro-arginina-metil-ester (L-NAME) a dosis de 10 mg/Kg. por una vía endovenosa. Posteriormente se realizó el enfriamiento corporal total hasta los 15 ° C y por último la irrigación del hígado con solución de Wisconsin y extracción del órgano.

Grupo 3: Se administró Espermina NONOato, un donante exógeno de óxido nítrico, a una dosis de 10 mg/Kg. i.v. 5 minutos antes de los 20 minutos de parada cardiaca. Posteriormente se realizó la irrigación del hígado con solución de Wisconsin y extracción del órgano.

Grupo 4: Infusión endovenosa de adenosina a dosis de 250 µg/Kg/min. conjuntamente con la adición de L-NAME a dosis de 10 mg/Kg i.v. antes de la parada cardiaca. Luego de los 20 minutos de asistolia se procede a la irrigación del hígado con solución de Wisconsin y extracción del órgano.

Una vez extraído el hígado se lo preserva a 4°C por el término de 6 horas hasta el momento de ser implantado en el receptor.

Como se puede ver, en este estudio hemos empleado diferentes sustancias farmacológicas. Entre ellas tenemos, L-Nitro-arginina-metil-ester (L-NAME), espermina NONOato y adenosina. El L-NAME es un inhibidor no selectivo de la oxido nítrico sintasa. En diferentes estudios se ha demostrado que es uno de los inhibidores más potentes de dicha enzima que se conocen. Su utilización en este estudio fue para inhibir la formación del oxido nítrico durante la RN en el grupo 2 y tras la administración de adenosina en el grupo 4. Por otro lado, en estudios anteriores se ha demostrado que la administración exógena de adenosina tiene el mismo efecto protector a nivel parenquimatoso y sinusoidal que la recirculación normotérmica, sobre el hígado obtenido de donantes a corazón parado. Este ha sido el motivo por el cual se ha sustituido la RN por adenosina en el grupo 4. Por último hemos empleado espermina NONOato, que es una fuente exógena de óxido nítrico y fue administrado para ver si sólo por este medio se consigue el aumento del oxido nítrico asemejando la función que tiene la RN (grupo 3).

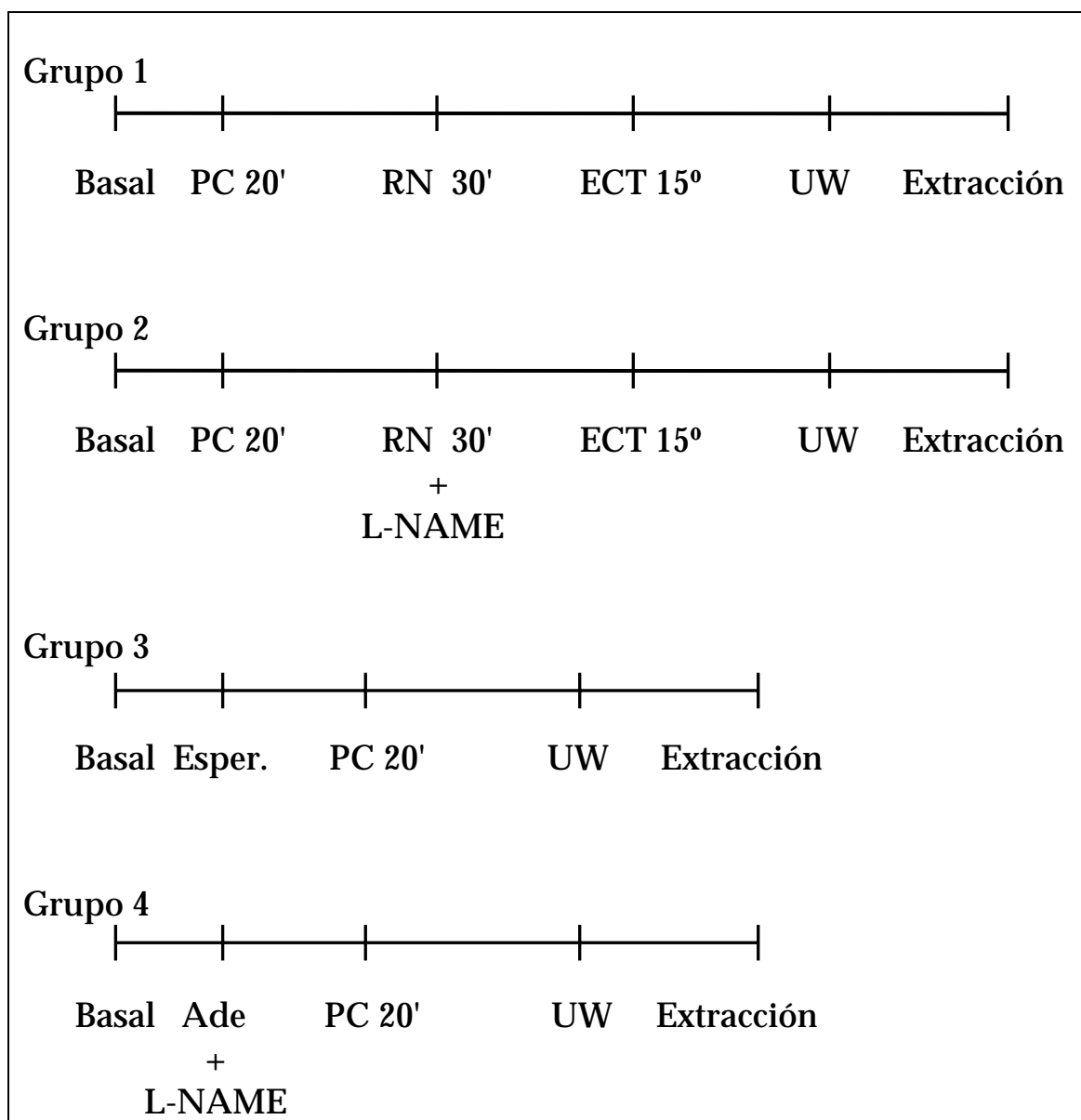


Figura N° 3: Representación esquemática de los diferentes grupos de cerdos. Basal: Fase basal; PC 20': Parada cardíaca de 20 minutos; RN 30': Período de Recirculación Normotérmica (RN) de 30 minutos; ECT 15°: Enfriamiento corporal total hasta los 15°C; UW: Irrigación de solución de la Universidad de Wisconsin; Extracción: Extracción del hígado; RN 30' + L-NAME: Período de RN de 30 minutos administrando en forma continua de L-NAME; Esper.: Administración de espermina NONOato; Ade + L-NAME: Administración simultánea, por diferente vía venosa de Adenosina y L-NAME

4. 3. TÉCNICA QUIRÚRGICA

4. 3. 1. Procedimiento en el donante

Se premedica al cerdo elegido para la cirugía con azoperona (Stresnil®), por vía intramuscular a una dosis de 1 mg/Kg. Una vez logrado el efecto tranquilizador en el animal, el mismo es llevado a la mesa de operaciones donde se coloca en decúbito supino, previo pesaje del mismo.

Posteriormente se introduce en una vena de la oreja ya sea la auricular lateral o medial, un catéter venoso 16 G (Venflon®), para realizar la inducción anestésica con 15 mg/Kg. de pentobarbital sódico (Penthotal®). Luego de la intubación orotraqueal con tubo N° 6,5 la ventilación mecánica es mantenida con un equipo Siemens Servo 900 D®, con un volúmen de 10-15 ml/Kg. de oxígeno al 100 %. Se intenta mantener un nivel sanguíneo de dióxido de carbono de 30-35 mmHg. Durante el acto operatorio la anestesia es mantenida con isoflurano (Forane®) al 0,7-1 %. Para la analgesia intraoperatoria se utiliza fentanilo (Fentanest®) a una dosis de 3 mcg/Kg y para la relajación muscular besilato de atracurio (Tracrium®) a 0,3 mg/Kg. Rutinariamente se realiza monitorización electrocardiográfica.

Previo al comienzo del acto operatorio se realiza el lavado con agua y jabón del cuerpo del animal, desde el cuello hasta las extremidades inferiores. Posteriormente se realiza la antisepsia con iodopovidona (Topionic®) ya que todo el procedimiento se realiza bajo estrictas condiciones de esterilidad.

4. 3. 2. Procedimiento quirúrgico

Por medio de una incisión en la región lateral del cuello derecha se secciona el platisma y se identifica el músculo esternocleidomastoideo. Separando este músculo lateralmente, podemos encontrar el paquete vasculonervioso del cuello, compuesto por la arteria carótida, la vena yugular interna y el neumogástrico. Realizamos la disección de la arteria carótida para la colocación de un catéter 16 G (Arrow®) que es utilizado para la monitorización de la presión arterial y para la obtención de muestras sanguíneas.

Durante este tiempo operatorio se disecciona la vena yugular externa. Esta vena es utilizada posteriormente para la colocación de la cánula de conexión con la bomba de RN. Este último paso solo es realizado cuando en el animal donante utilizamos la bomba de recirculación. (Grupo 1 y 2).

A continuación se realiza la laparotomía xifopubiana y la disección del pedículo hepático para identificación de todos sus elementos (vena porta, arteria hepática y vía biliar) y colocación de los transductores para la medición de los flujos en la arteria hepática y vena porta.

Previo a la provocación de la parada cardíaca se administra, por vía endovenosa, 3 mg/Kg. de heparina sódica. Una vez realizados todos los pasos anteriores, se procede a realizar la parada cardíaca con la inyección intravenosa de 10-15 ml de KCl. Paso seguido, se realiza la disección de la arteria aorta, por encima de la bifurcación de la misma y disección la vena cava inferior por debajo de las venas renales.

En los cerdos pertenecientes a grupos donde se realiza recirculación normotérmica realizamos la canulación de la vena yugular externa, de la vena cava inferior y de la arteria aorta con cánulas (Bard®) número 22 Fr, 28 Fr y 16 Fr respectivamente. En este momento estamos en condiciones de montar la conexión entre el cerdo y la bomba de recirculación. Previamente el circuito de la bomba de recirculación es cebado con 500 cc. de solución de Ringer, 500 cc. de Hemocel® y 250 cc. de manitol al 20%.

Tras los veinte minutos de parada cardíaca se inicia la recirculación normotérmica (circulación extracorpórea con oxigenación tisular a 37°C, que se mantiene por el término de 30 minutos). El flujo de sanguíneo de la bomba de recirculación extracorpórea mantenido durante la RN fue el máximo posible, dependiendo directamente del retorno venoso existente. Durante todo el procedimiento se realiza monitorización de la temperatura hepática por medio de un termómetro, colocado en la superficie hepática y un termómetro esofágico para controlar la temperatura corporal.

Luego de finalizado el tiempo preestablecido de la recirculación normotérmica (30 minutos) se procede al enfriamiento corporal total, que se realiza por medio de un intercambiador de temperatura con la misma bomba de circulación extracorpórea. Con ello se disminuye la temperatura del hígado hasta los 15 °C, momento en el cual se comienza con la perfusión del hígado con solución de la Universidad de Wisconsin (UW) a 4°C a través de la aorta y de la vena porta. Para obtener una irrigación selectiva del hígado realizamos ligaduras de la arteria mesentérica superior y de la aorta supracelíaca.

Simultáneamente a los pasos antes referidos, se realiza la apertura del diafragma para la sección de la vena cava intratorácica, que permite la salida de la solución de perfusión hepática y la colocación en toda la cavidad abdominal de hielo triturado. También se realiza la apertura de la vesícula biliar, aspiración de bilis y lavado de la misma con solución de Ringer.

En los cerdos pertenecientes a grupos donde no se realiza recirculación normotérmica, una vez finalizado el tiempo de isquemia caliente, procedemos a la canulación de la vena porta y de la arteria aorta para irrigar el hígado con la solución de UW. Aproximadamente la cantidad de líquido de preservación irrigado es de 1 litro por arteria aorta y vena porta respectivamente. Una vez finalizada ésta, procedemos a la extracción del órgano.

La técnica de extracción que utilizamos es la siguiente: Primero se secciona la vía biliar principal lo más cerca posible del duodeno, posteriormente se secciona el epiplón menor y el ligamento triangular izquierdo. Acto seguido identificamos la arteria hepática que se sigue hasta llegar al tronco celíaco y la aorta. Posteriormente se secciona esta arteria. Seguimos por la sección de la vena cava inferior a la altura de la glándula suprarrenal derecha, se seccionan las adherencias de esta vena con la pared posterior, se secciona el ligamento posterior del hígado. Finalmente procedemos a la sección del diafragma que se inserta en la vena cava inferior. Una vez extraído el hígado se coloca en una batea con hielo y se procede a realizar la cirugía de banco.

4. 3. 2. Cirugía de banco

Durante este momento se prepara al hígado donante para poder ser implantado sin ninguna dificultad en el receptor. Primero procedemos a la disección de todo el tejido periarteriolar de la arteria hepática desde el tronco celíaco hasta la división de la arteria hepática en derecha e izquierda. Comprobación de la integridad de la arteria con la inyección de solución fisiológica por medio de un catéter venoso de pequeño calibre. Se ligan con Seda 3-0, todas las pequeñas colaterales de dicha arteria.

La vena porta se libera de todo el tejido que interfiera para la realización de una anastomosis segura. Posteriormente se realiza la exéresis de todos los ganglios linfáticos que se encuentran en el hilio hepático. Generalmente, debido a su longitud, esta vena necesita ser seccionada en el momento de la anastomosis en el receptor.

Rutinariamente se realiza el lavado con solución fisiológica de la vía biliar. Posteriormente se procede a realizar la disección de la vena cava inferior donde se realiza la exéresis de la glándula suprarrenal derecha y de todo el tejido sobrante. Para finalizar se prepara la vena cava inferior suprahepática que se libera de todo el diafragma que se adhiere y realizando apertura de todas las venas diafragmáticas.

Una vez realizados todos estos pasos estamos en condiciones de colocar el hígado en una bolsa de preservación de órganos y mantenerlo a una temperatura de 4°C hasta la hora del implante en el receptor.

4. 3. 3. Procedimiento en el receptor

El manejo anestésico es similar al animal donante. Se realizó anestesia general con intubación orotraqueal. Se monitoriza la función cardíaca por medio de electrocardiograma, presión arterial a través de catéter colocado en la arteria carótida y se coloca un catéter venoso en la vena yugular externa que se exterioriza por contraabertura a nivel del cuello y es dejado en dicha posición para la toma de muestras sanguíneas en el postoperatorio.

Una vez realizada la laparotomía en "J", se realiza la hepatectomía estándar sin preservación de la vena cava. No fue utilizado ningún tipo de by pass veno-venoso para el retorno venoso mesentérico, debido a que el tiempo

de clampeo portal fue menos de 20 minutos, tiempo que es bien tolerado por los cerdos.

Previa a la colocación del injerto en el receptor, se realiza el lavado del mismo con 500 cc. de solución de Ringer a temperatura ambiente, a través de la vena porta. El mismo se realiza para barrer la microcirculación hepática de detritus celulares, acumulados durante la isquemia, como así también para eliminar la solución de preservación que puede existir dentro del mismo, que es rica en potasio y puede provocar devastadores efectos en el cerdo si pasa a la circulación del mismo.

Las suturas vasculares del hígado a implantar se realizan en el siguiente orden: vena cava suprahepática, vena porta, vena cava inferior infrahepática y arteria hepática. Una vez realizada la anastomosis portal se procede a la reperusión del injerto. Todas las anastomosis vasculares son realizadas en un plano posterior continuo y otro anterior de la misma manera. La vena cava suprahepática es realizada con Prolene[®] 4-0, la porta con Prolene[®] 5-0 al igual que la vana cava inferior y la arteria hepática es suturada con el mismo tipo de sutura pero 6-0.

Para la reconstrucción de la vía biliar se realiza una colédoco-colédoco anastomosis termino-terminal, con tutorización interna. Por último procedemos al cierre de la vesícula biliar.

Una vez finalizado el procedimiento se cierra la pared abdominal con suturas continua por planos y por último se realiza el cierre de la herida de piel. Posteriormente se retira el catéter colocado en la arteria carótida para control de la presión arterial y se cierra la incisión correspondiente.

4. 3. 4. Cuidados postoperatorios

Todos los animales fueron extubados una vez que pudieron mantener la respiración en forma espontánea, esto sucedió entre los 15 y 25 minutos aproximadamente de finalizar la operación. Una vez extubado, el cerdo es colocado en corralina térmicas donde pasará el postoperatorio, teniendo solamente acceso a la ingesta de agua durante las primeras 24 horas. Luego de este período comenzamos con dieta blanda y posteriormente se instaure dieta normal.

La inmunosupresión se comienza en la inducción anestésica con 250 mg de metilprednisolona y 250 mg. más de la misma droga durante la fase anhepática. En el postoperatorio la inmunosupresión es continuada a partir del segundo día con ciclosporina oral 20 mg/kg. La analgesia postoperatoria se realizará con inyección intramuscular de meperidina, 100 mg. Al segundo día de postoperatorio y al quinto día, se realizará la tomas de muestras sanguíneas para realizar las analíticas correspondientes.

En los animales supervivientes al quinto día, se realizará el sacrificio del mismo con una sobredosis de pentobarbital sódico y cloruro de potasio.

4. 4. DETERMINACIONES ANALÍTICAS DEL ESTUDIO

4. 4. 1. Toma de muestras

Se obtendrán muestras de sangre venosa, arterial y de tejido hepático en las siguientes fases:

- 1) **Basal:** Luego de anestesiado el animal y antes de cualquier manipulación del mismo.
- 2) **Periodo de isquemia caliente:** 20 minutos después de la parada cardiaca, antes de la RN. Traduce la lesión del episodio de parada cardiaca.
- 3) **Fase de RN:** Tras los 30 minutos de RN. Traduce el efecto que ha tenido la recirculación con sangre oxigenada.
- 4) **Isquemia fría:** Inmediatamente antes de la reperfusión vascular portal en el receptor durante la realización del implante. Traduce la lesión tras el periodo total de isquemia.
- 5) **Reperfusión:** Una hora después de la reperfusión del hígado transplantado. Traduce la lesión por isquemia-reperfusión.
- 6) **Quinto día:** Al quinto día del trasplante en el animal superviviente y antes del sacrificio. Traduce el resultado final de todo el proceso de isquemia-reperfusión.

4. 4. 2. Determinaciones analíticas

4. 4. 2. 1. Alaninoamonotransferasa

Uno de los marcadores más característicos de la lesión hepatocelular es el aumento en los niveles séricos de alaninoaminotransferasa (ALAT) ya que esta enzima se encuentra dentro del citoplasma de los hepatocitos y una vez que éstas células se lesionan entra en la circulación.

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

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

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

4. 4. 2. 2. Alfa-glutation-S-Transferasa

La glutation-S-Transferasa (α -GST) es una familia de enzimas que catalizan diferentes reacciones a nivel intracelular. La α -GST es una enzima

citoplasmática que se encuentra en altas concentraciones en el hígado y se ha demostrado que aumenta rápidamente y en grandes concentraciones ante el daño hepático, por lo que es considerado un marcador útil para la detección del daño hepatocelular.(161)

La α -GST es una enzima que se localiza principalmente en hepatocitos centrolobulillares mientras que las transaminasas lo hacen preferentemente en los periportales. Presentan una elevación muy precoz ante la lesión hepatocelular y una vida media en plasma de aproximadamente de 1 hora, por lo que ha sido empleada como marcador de la lesión por isquemia-reperfusión en este modelo trasplante hepático con donante a corazón parado.(162,163)

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

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

En primer término se cargan las muestras en una placa de ELISA que presenta posillos con anti-Ig G ALFA-GST porcina adherida. Se deja incubar por una hora en mezclado uniforme. Posteriormente se añade anticuerpos unidos a biotina (Biotin-Ig G anti- α -GST) y después estreptovirina conjugada con peroxidasa. Realizado este proceso se puede cuantificar la concentración de la GST presente en la muestra por medio de la lectura de adsorbancia a 450 nm.

4. 4. 2. 3. Acido Hialurónico

El ácido hialurónico (AH) es un glucosaminglicano de alto peso molecular que se sintetiza en las células mesenquimatosas de todo el organismo. Normalmente llega hasta el hígado donde es captado predominantemente por las células endoteliales sinusoidales que son las encargadas de la remoción del mayor porcentaje de AH de la circulación general.(164-167) Diferentes estudios han podido demostrar que los niveles en suero reflejan la función de las células endoteliales del sinusoides hepático siempre que no exista otra causa que pueda provocar valores altos, como es posible encontrar en falla hepática aguda, mesoteliomas y cirrosis.(168-170)

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

Para su determinación en suero de sangre arterial, que se realiza por medio de RIA (Radio Inmune Assay), se utiliza un kit comercial (Pharmacia HA Test, Pharmacia & Upjohn Diagnostics AB, Uppsala, Sweden). Todas las muestras se realizan por duplicado. El test se basa en la mezcla de 200 microlitros de proteínas de unión de ácido hialurónico aislada de cartílago bovino (HABP-¹²⁵) con 100 microlitros de muestra del cerdo correspondiente. Luego de un proceso de incubación de 60 minutos a 4-20°C, se debe agregar 100 microlitros de AH-sefaroza y esperar un último período de incubación de 45 minutos a la misma temperatura que el anterior. Luego se agregan 2 ml de solución de decantación y se centrifuga la muestra durante 10 minutos a 1500 rpm. Así se está en condiciones de cuantificar la HABP-¹²⁵ no unida al ácido hialurónico presente en la muestra, por medio de un contador gamma. La radioactividad medida es inversamente proporcional a la cantidad de ácido hialurónico presente en la muestra.

4. 4. 2. 4. Determinación de nitritos y nitratos

Debido a que el óxido nítrico es una gas altamente inestable, reacciona con el oxígeno molecular formando nitrito. Así mismo también reacciona con la oxihemoglobina y el anión superóxido para formar nitrato. Estos dos productos finales son los metabolitos que se pueden medir en sangre y son un fiel marcador de la cantidad de ON que ha estado presente..

Una vez obtenida la muestra de sangre se realizaron los mismo pasos que para las demás determinaciones hasta el momento de la descongelación del suero. Posteriormente, el tratamiento que se realizó a las muestras consistió en una eliminación de todos los elementos contaminantes del suero por medio de una ultrafiltración a 1200 r.p.m. por medio de un filtro especial. (Ultrafree MC microcentrifuge, UFC 3 LGCNB). Para realizar su medición se utiliza un autoanalizador 280 Nitric Oxide Analyzer NOA™ (Sievers Instruments, Millipore Corp., Bedford, MA).

4. 4. 2. 5. Determinación de nucleótidos de adenosina

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

Una vez obtenida la muestra es conservada en forma inmediata en nitrógeno líquido a - 170°C. Para realizar la determinación de nucleótidos se procede de la siguiente manera. A las muestras de tejido hepático se les añade ácido perclórico (1 ml, 0,6 N) en baño de hielo a una temperatura de 4°C, con la finalidad de homogeneizar y separar los compuestos de interés de la matriz protéica. Posteriormente, las biopsias son homogeneizadas en un sistema

Polytron 10 ST 3 veces durante 10 segundos manteniendo el medio a 4°C. Tras centrifugación a 15000 rpm durante 5 minutos manteniendo la temperatura, el sobrenadante obtenido (0,5 ml) es neutralizado con carbonato potásico al 9% hasta obtener un pH 7 (0,3 ml). Se debe dejar reposando 15 minutos y luego se realiza una segunda centrifugación en frío para separar el precipitado del perclorato potásico formado. El extracto neutralizado obtenido fue diluido a la mitad con tampón de dihidrogenofosfato de amonio 0,10 M (fase móvil), e inyectado para su análisis en el sistema cromatográfico.

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

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

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

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

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

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

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

4. 4. 2. 6. Evaluación histológica del hígado

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

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

Posteriormente los bloques parafinados serán cortados con un micrótopo de rotación de Reichert-Jung 2035 a de 3 micras de espesor. Como último paso se realiza la desparafinación de la muestra y posterior tinción con Hematoxilina y Eosina.

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

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

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

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

4. 5. EVALUACIÓN DEL FLUJO HEPÁTICO Y CÁLCULO DEL METABOLISMO HEPÁTICO DEL OXIGENO DURANTE LA RECIRCULACIÓN NORMOTÉRMICA.

4. 5. 1. Flujo hepático durante la recirculación normotérmica.

Antes y durante el período de recirculación normotérmica se realiza en forma continua la medición del flujo sanguíneo en la arteria hepática y la vena porta. La medición se realiza con transductores específicos que son conectados a un aparato medidor de flujos Transonic (Transonic Systems Inc, Ht 207, Ithaca, NY, USA). También es valorado el flujo sanguíneo de la bomba de recirculación extracorpórea y calculado el flujo hepático total (flujo de arteria hepática + flujo de la vena porta). Todas estas mediciones son corregidas por la superficie corporal, dato que se obtiene a partir del peso y de la talla del cerdo.

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

4. 5. 2. Cálculo del metabolismo hepático de oxígeno

Durante los 5, 15 y 30 minutos de la recirculación normotérmica se realizan extracciones sanguíneas de la vena porta, vena suprahepática y arteria carótida para realizar diferentes pruebas gasométricas y poder calcular el metabolismo hepático del oxígeno.

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

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

También se han calculado los siguientes parámetros:

Llegada de oxígeno al hígado (HDO_2): ($CaO_2 \times \text{flujo arterial}$) + ($CpO_2 \times \text{flujo portal}$)

Extracción hepática de oxígeno (HVO_2): $HDO_2 - (CshO_2 \times \text{flujo suprahepático})$

Flujo suprahepático: flujo arterial + flujo portal

Índice de extracción hepática de oxígeno: $(HVO \times 100) / HDO$

4. 6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

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

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

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

RESULTADOS

5. 1. SUPERVIVENCIA DE LOS ANIMALES AL QUINTO DÍA

La supervivencia a los cinco días obtenida en los diferentes grupos ha sido la siguiente:

Grupo 1: 20 minutos de parada cardíaca y recirculación normotérmica durante 30 minutos previo al enfriamiento corporal total: 100 % (10/10).

Grupo 2: 20 minutos de parada cardíaca y recirculación normotérmica durante 30 minutos más L-NAME durante la RN: 50 % (5/10).

Grupo 3: Administración de espermina NONOato previo a los 20 minutos de parada cardíaca sin recirculación normotérmica: 90 % (9/10).

Grupo 4: Administración de adenosina y L-NAME previo a los 20 minutos de parada cardíaca sin recirculación normotérmica: 30 % (3/10).

Estos datos se pueden ver en la tabla N° 6 y en la figura N°

Grupo	Vivos	Muertos	Supervivencia (%)
20 + RN	10	-	100
20 + RN + L-NAME	5	5	50
Espermina NONOato	9	1	90
ADENOSINA + L-NAME	3	7	30

Tabla 6: Animales vivos y muertos al quinto día del trasplante

A todos los animales muertos antes del quinto día se les ha realizado la autopsia correspondiente, descartándose para el estudio aquellos animales donde existieran evidencias de alguna complicación quirúrgica.

Analizando la supervivencia podemos ver que existe una diferencia significativa cuando comparamos entre sí, los grupos 1 y 2; $p < 0,03$ y los grupos 1 y 4; $p < 0,01$. No existieron diferencias significativas cuando se compararon los restantes grupos entre sí.

¡Error! Marcador no definido.

Figura N °1: Supervivencia de los diferentes grupos al quinto día. Referencia a: $p < 0,03$. Referencia b: $p < 0,01$; ambos con relación al grupo 20 + RN.

Si analizamos los datos obtenidos en la supervivencia reagrupando los grupos en aquellos en los que hemos bloqueado la formación del óxido nítrico (grupos 2 y 4) y en aquellos que no lo hemos hecho (grupo 1 y 3), podemos ver que la supervivencia en el grupo donde se ha administrado L-NAME para

interferir con la formación del NO es del 40 % (8/20) mientras que en el otro grupo es del 95 % (19/20), p 0,0001. Figura N° 2 y Tabla N° 1

¡Error! Marcador no definido.

Figura N° 2: Supervivencia al quinto día agrupando los cerdos según se realizó bloqueo o no del óxido nítrico. Referencia a: p 0,0001.

5. 2. ANÁLISIS DEL FLUJO SANGUÍNEO HEPÁTICO DURANTE EL PERÍODO DE RECIRCULACIÓN NORMOTÉRMICA.

Se ha empleado la recirculación normotérmica solamente en dos grupos 1 (20 minutos de parada cardíaca + RN) y en el grupo 2 (20 minutos de parada cardíaca + RN + L-NAME) . En ellos hemos evaluado el flujo en arteria hepática y vena porta, el flujo hepático total y el flujo sanguíneo de la bomba de recirculación extracorpórea.

5. 2. 1. Flujo sanguíneo de arteria hepática

El grupo 1 (20 minutos de parada cardíaca + RN) tenía un flujo arterial basal de 205 ± 28 ml/min/m², mientras que el grupo 2 (20 minutos de parada cardíaca + RN + L-NAME) tenía un flujo de 146 ± 17 ml/min/m². Del análisis de los flujos basales podemos decir que ambos grupos eran comparables, ya que no existe diferencia significativa: F 2,6; p 0,1.

Durante los 30 minutos de RN se han medido los flujos en la arteria hepática a los 5, 15 y 30 minutos obteniéndose los siguientes resultados: En el grupo 1 a los 5 minutos el flujo medio de la arteria hepática era de 185 ± 25 ml/min/m², a los 15 minutos de 147 ± 16 ml/min/m² y a los 30 minutos de 167 ± 23 ml/min/m². En el grupo 2, donde hemos interferido la formación del óxido nítrico durante la recirculación normotérmica con L-NAME, los flujos en la misma arteria eran de 126 ± 11 ml/min/m², 122 ± 30 ml/min/m², 97 ± 14 ml/min/m² a los 5, 15 y 30 minutos respectivamente. Si bien es posible observar que los flujos arteriales son mayores en el grupo 1 durante la RN, solo existieron diferencias significativas en la lectura realizada a los 30 minutos de la RN: F 5,3; p 0,03. Tabla y Figura .

	Grupo 1	Grupo 2	F	p
Valor basal	205 ± 28	146 ± 17	2,6	ns
Valor 5 minutos	185 ± 25	126 ± 11	3,4	ns
Valor 15 minutos	147 ± 16	122 ± 30	0,6	ns
Valor 30 minutos	167 ± 23	97 ± 14	5,3	0,03

Tabla N° 2: Flujos en arteria hepática durante la recirculación normotérmica. Los valores son expresados como media ± ES, en ml/min/m².

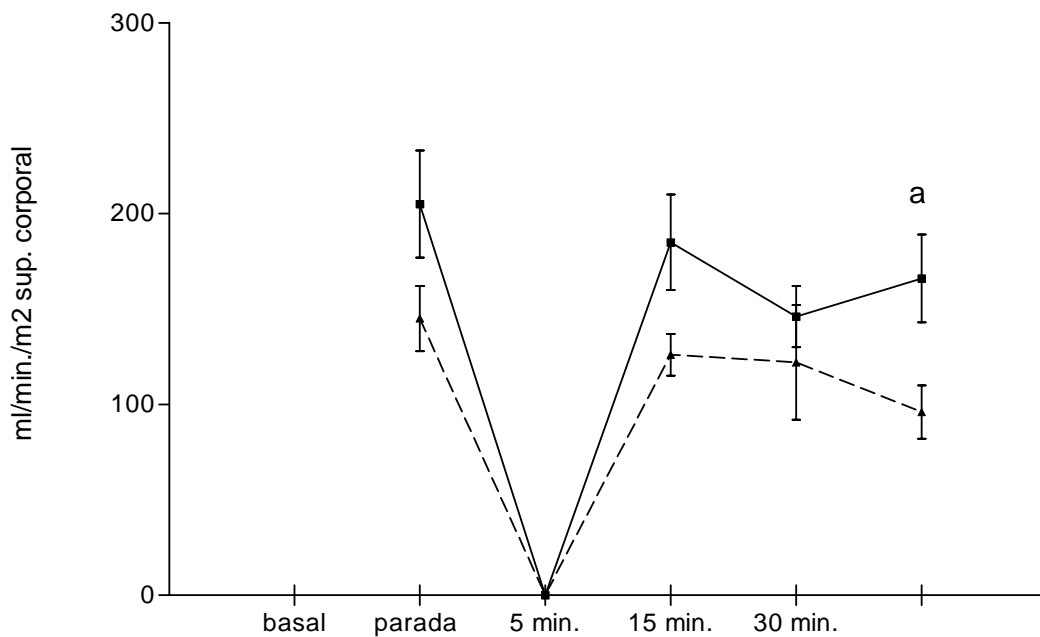


Figura N° 3: Flujos de arteria hepática durante la recirculación normotérmica. Media ± ES. Los valores son expresados en ml/min/m² de superficie corporal.
 — 20 + RN; - - - 20 + RN + L-NAME

5. 2. 2. Flujo sanguíneo de la vena porta

Los flujos portales basales obtenidos en el grupo 1 eran de 509 ± 32 ml/min/m², mientras que el grupo 2 fueron de 492 ± 46 ml/min/m². Del análisis de estos flujos basales podemos decir que no existieron diferencias significativas entre ambos por lo que estos grupos son comparables: F 0,9; p 0,8.

En el grupo 1(20 minutos de parada cardíaca + RN), a los 5 minutos el flujo de la vena porta era de 466 ± 58 ml/min/m², a los 15 minutos de 452 ± 57 ml/min/m² y a los 30 minutos de 336 ± 21 ml/min/m². En el grupo 2 (20 minutos de parada cardíaca + RN + L-NAME), los flujos eran de 255 ± 36 ml/min/m², 208 ± 38 ml/min/m² y 121 ± 15 ml/min/m² a los 5, 15 y 30 minutos respectivamente. En la tabla y figura se puede ver que existieron diferencias significativas en las tres determinaciones analizadas.

	RN	RN + L-NAME	F	p
Valor basal	509 ± 32	492 ± 46	0,9	ns
Valor 5 minutos	466 ± 58	255 ± 36	7,5	0,01
Valor 15 minutos	452 ± 57	208 ± 38	10,3	0,004
Valor 30 minutos	336 ± 21	121 ± 15	55,6	0,0001

Tabla N° 3: Flujos en la vena porta durante la recirculación normotérmica. Los valores son expresados como media \pm ES, en ml/min/m² de superficie corporal.

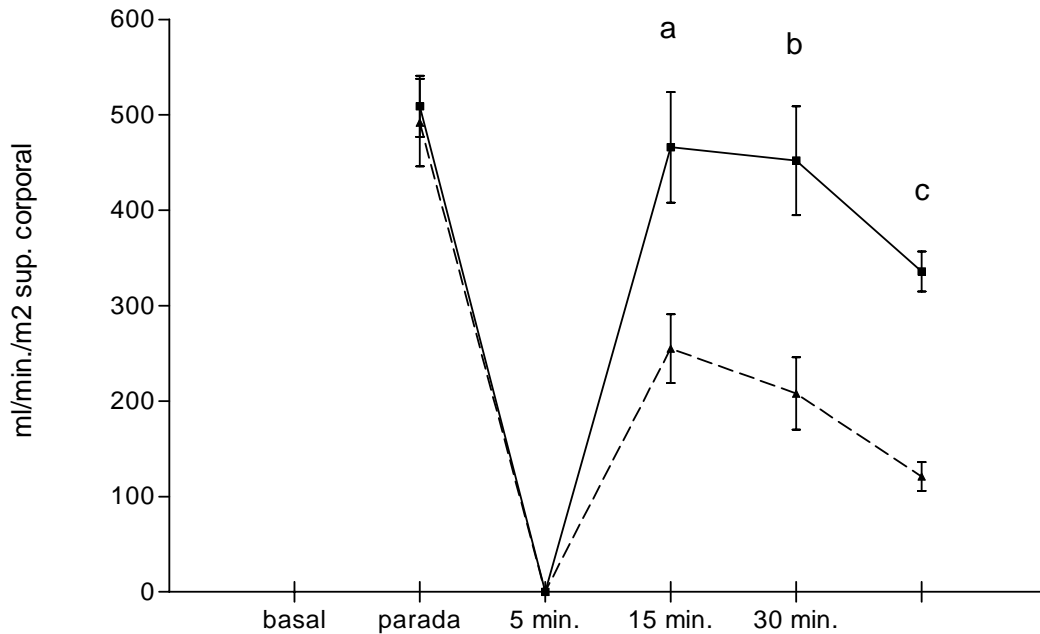


Figura N° 4: Flujos en la vena porta durante la recirculación normotérmica. Media \pm ES. Los valores son expresados en ml/min/m² de superficie corporal. Referencia a: p 0,01; b: p 0,004; c: p 0,0001. —20 + RN, - - - 20 + RN + L-NAME

5. 3. Flujo hepático total

Como es de nuestro conocimiento, el hígado recibe doble aporte sanguíneo, es decir que recibe sangre de la vena porta de y de arteria hepática, es por ello que también hemos calculado el flujo sanguíneo hepático total durante los 30 minutos de la recirculación normotérmica.

Podemos observar que los flujos en el grupo de 20 minutos de parada cardíaca + 30 minutos de RN (Grupo 1) tenía un flujo basal hepático total medio de 714 ± 49 ml/min/m², mientras que el grupo de 20 minutos de parada cardíaca + RN + L-NAME (Grupo 2), tenía en el mismo momento un flujo hepático total medio de 638 ± 51 ml/min/m². Analizando estas dos mediciones no existe diferencia significativa entre ambos grupos: F 1,1; p ns.

El flujo hepático total medio a los 5,15 y 30 minutos han sido los siguientes: En el grupo 1 a los 5 minutos el flujo hepático total medio era de 651 ± 77 ml/min/m², a los 15 minutos de 599 ± 54 ml/min/m² y a los 30 minutos de 503 ± 30 ml/min/m², mientras que en el grupo 2 el flujo hepático total a los 5 minutos eran de 381 ± 33 ml/min/m², a los 15 minutos de 330 ± 59 ml/min/m² y a los 30 minutos de 218 ± 23 ml/min/m². Realizamos un análisis estadístico para evaluar las diferencias entre ambos grupos y podemos ver que tanto a los 5,15 y 30 minutos existen diferencias significativas en el flujo hepático total.

Tabla N° 4 y Figura N° 5

	RN	RN + L-NAME	F	p
Valor basal	714 ± 49	638 ± 33	1,1	ns
Valor 5 minutos	651 ± 77	381 ± 33	7,8	0,01
Valor 15 minutos	599 ± 54	330 ± 59	10,9	0,003
Valor 30 minutos	503 ± 30	218 ± 23	48,4	0,0001

Tabla N° : Valores de flujo hepático total. Los valores son expresados como media \pm ES, en ml/min/m² de superficie corporal.

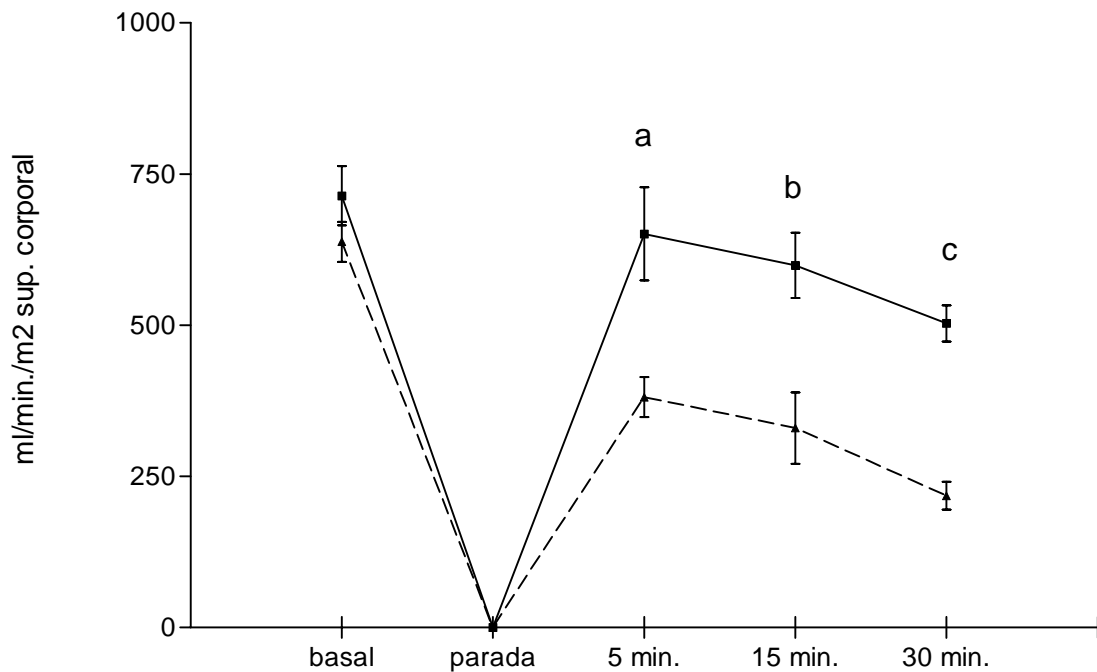


Figura N° : Flujo hepático total durante la recirculación normotérmica. Media \pm ES. Los valores son expresados en ml/min/m² de superficie corporal. Referencia a: p 0,01; b: 0,003; c: 0,0001. — 20 + RN, - - - 20 + RN + L-NAME

Flujo sanguíneo de la bomba de recirculación extracorpórea

Durante la RN hemos analizado el flujo sanguíneo mantenido por la bomba de recirculación extracorpórea. Los flujos de bomba en el grupo 1 eran de $2,82 \pm 0,29$ l/min/m² a los 5 minutos, de $2,80 \pm 0,28$ l/min/m² a los 15 minutos y de $2,20 \pm 0,22$ l/min/m² a los 30 minutos. En el grupo 2 los flujos de la bomba de recirculación eran de $2,84 \pm 0,26$ l/min/m² a los 5 minutos, de $2,06 \pm 0,19$ l/min/m² a los 15 minutos y a los 30 minutos era de $1,31 \pm 0,17$ l/min/m². Existieron diferencias significativas a los 30 minutos de la RN; F 8,4; p 0,009. Se pueden ver los resultados anteriores en la tabla y figura

	RN	RN + L-NAME	F	p
Valor 5 minutos	2,82 ± 0,29	2,84 ± 0,26	0,002	ns
Valor 15 minutos	2,80 ± 0,28	2,06 ± 0,19	3,9	ns
Valor 30 minutos	2,20 ± 0,22	1,31 ± 0,17	8,4	0,009

Tabla N° : Valores del flujo sanguíneo de la bomba de recirculación extracorpórea. Los valores son expresados como media ± ES, en l/min/m²

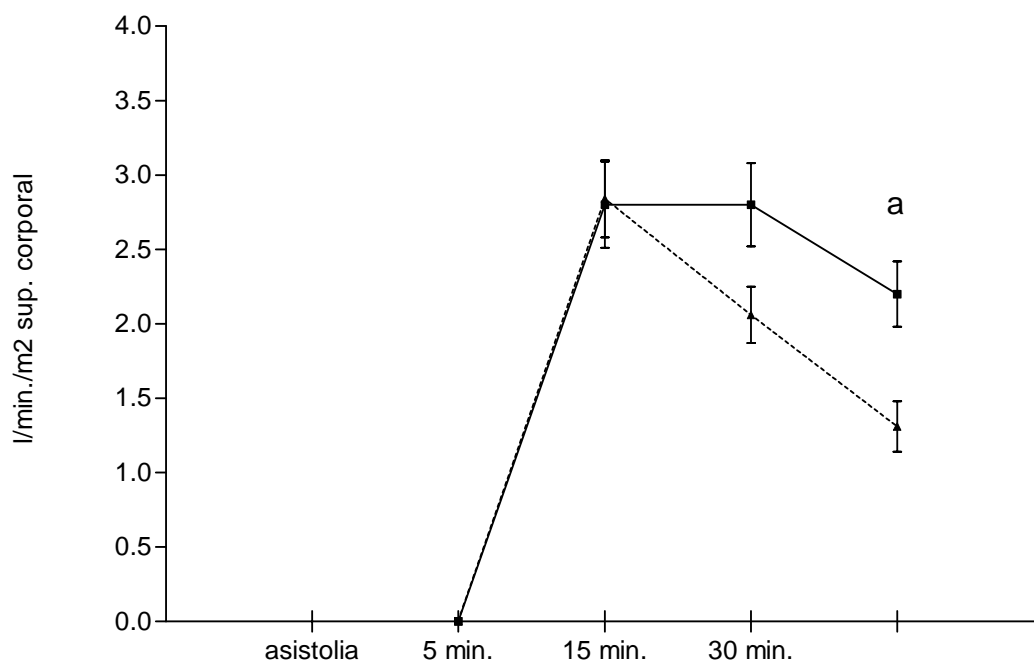


Figura N° : Flujos de la bomba de recirculación extracorpórea. Los valores son expresados en media ± ES, en l/min/m². Referencia a: p 0,009. — 20 + RN, - - 20 + RN + L-NAME

Metabolismo hepático de oxígeno

Durante la RN se ha realizado el cálculo del metabolismo hepático del oxígeno. Por lo que hemos determinado el contenido de oxígeno en arteria, vena porta y vena suprahepática. Los datos son mostrados en la tabla N° .

	20 + RN	20 + RN + L-NAME
Contenido arterial de oxígeno.		
basal (ml/min)	13,54 ± 1,50	13,78 ± 0,35
5 minutos	7,60 ± 0,26	9,68 ± 1,01
15 minutos	8,43 ± 0,40	8,95 ± 0,11
30 minutos	8,96 ± 0,21	9,01 ± 0,19
Contenido portal de oxígeno		
basal (ml/min)	9,78 ± 1,12	11,59 ± 0,57
5 minutos	5,50 ± 0,37	5,89 ± 0,66
15 minutos	5,71 ± 0,50	5,41 ± 0,59
30 minutos	5,63 ± 0,61	3,76 ± 0,46
Contenido vena hepática de oxígeno		
basal (ml/min)	9,37 ± 1,1	10,87 ± 1,00
5 minutos	4,77 ± 0,73	4,12 ± 0,63
15 minutos	5,02 ± 0,81	2,96 ± 0,52
30 minutos	4,17 ± 0,84	3,01 ± 0,32

Tabla N° : Contenido arterial, portal y de vena suprahepática. Los valores son expresados como media ± ES.

A partir del cálculo del contenido de oxígeno se calculó la llegada al hígado de oxígeno, la extracción hepática como así también el porcentaje de extracción hepática de oxígeno. Pudimos ver que el grupo 1 presenta una llegada de oxígeno basal de $76,97 \pm 6,25$ ml/min. , mientras que durante la RN fue de $36,25 \pm 6,53$ ml/min. a los 5 minutos, $37,09 \pm 3,58$ ml/min. a los 15 minutos y de $34,72 \pm 3,88$ ml/min. a los 30 minutos. En el grupo 2 los datos obtenidos fueron los siguientes: $79,08 \pm 6,54$ ml/min. en la muestra basal, $24,41 \pm 2,43$ ml/min. a los 5 minutos de la RN, $19,35 \pm 2,82$ ml/min. a los 15 minutos y de $12,59 \pm 1,96$ ml/min. a los 30 minutos. Cuando comparamos los resultados obtenidos entre los dos grupos podemos ver que existen diferencias significativas en la llegada de oxígeno al hígado a los 15 y 30 minutos de la RN (F 15,09, p 0,002; F 90,15, p 0,0001 para los 15 y 30 minutos respectivamente). Estos datos se muestran en la tabla N°.

En el grupo 1 la extracción hepática de oxígeno ha sido de $8,79 \pm 6,64$ en la determinación basal, $3,14 \pm 0,87$ ml/min. a los 5 minutos de la RN, $7,41 \pm 4,93$ ml/min. a los 15 minutos y de $12,08 \pm 3,30$ ml/min. a los 30 minutos. Los resultados en el grupo 2 fueron: $9,19 \pm 6,73$ en el basal, $5,47 \pm 2,25$ ml/min. a los 5 minutos de la RN, $11,19 \pm 1,92$ ml/min. a los 15 minutos y de $6,55 \pm 1,47$ ml/min. a los 30 minutos. Tabla N°

Si calculamos el índice de extracción hepática de oxígeno podemos ver que en el grupo 1 la misma es del 14 ± 9 % en la muestra basal, 11 ± 3 % a los 5 minutos de la RN, 20 ± 14 % a los 15 minutos de la RN y de 38 ± 10 % a los 30 minutos de la RN. En el grupo tratado con L-NAME vemos que los valores han sido: 10 ± 8 % en el basal, 20 ± 7 % a los 5 minutos de la RN, 59 ± 7 % a los 15 minutos y 50 ± 5 % a los 30 minutos. Se puede observar que en el grupo donde se inhibió la formación del ON, el índice de extracción hepática de oxígeno ha sido mayor durante la RN, siendo estadísticamente significativo a los 15 minutos (F 4,75; p 0,04). Tabla N°

	20 + RN	20 + RN + L-NAME	F	p
DHO 2				
basal	76,97 ± 6,25	79,08 ± 6,54	0,05	ns
5 min. (ml/min)	36,25 ± 6,53	24,41 ± 2,43	1,99	ns
15 min. (ml/min)	37,09 ± 3,58	19,35 ± 2,82	15,09	0,002
30 min. (ml/min)	34,72 ± 3,88	12,59 ± 1,36	90,15	0,0001
HVO 2				
basal (ml/min)	8,79 ± 6,64	9,19 ± 6,73	0,002	ns
5 mi. (ml/min)	3,14 ± 0,87	5,47 ± 2,25	0,92	ns
15 mi. (ml/min)	7,41 ± 4,93	11,19 ± 1,92	0,51	ns
30 min. (ml/min)	12,08 ± 3,30	6,55 ± 1,47	2,33	ns

Tabla N°: Llegada de oxígeno al hígado (DHO2), extracción hepática de oxígeno (VHO2) durante la RN. Los valores son expresados como media ± ES.

	20 + RN	20 + RN + L-NAME	F	p
I-HVO 2 (%)				
basal	14 ± 9	10 ± 8	0,10	ns
5 minutos	11 ± 3	20 ± 7	1,78	ns
15 minutos	20 ± 14	59 ± 7	4,75	0,04
30 minutos	38 ± 10	50 ± 5	0,86	ns

Tabla N° : Índice de extracción hepática de oxígeno (I-HVO₂). Los valores son expresados como media \pm ES.

5. 3. MARCADORES DE LESIÓN HEPATOCELULAR.

5. 3. 1. Alaninoaminotransferasa (ALAT)

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

En el grupo 1 (20 minutos de parada cardíaca + RN) el porcentaje medio en relación con el basal a la hora de la reperfusión ha sido del 99 ± 12 , en el grupo 2 (20 minutos de parada cardíaca + RN + L-NAME) 83 ± 15 , en el grupo 3 (espermina NONOato + 20 minutos de parada cardíaca, sin RN) 206 ± 56 y en el grupo 4 (adenosina + L-NAME) 109 ± 23 . En todos los casos tras realizar el análisis de la varianza las diferencias existentes entre ambos grupos no eran significativas.

Durante el 2do día de postoperatorio los valores enzimáticos eran los siguientes: en el grupo 1 el incremento en el porcentaje medio en relación con el basal fue 212 ± 25 , en el grupo 2 de 706 ± 338 , en el grupo 3, 441 ± 119 y en el grupo 4, 165 ± 23 . Realizando el análisis estadístico correspondiente podemos ver que no existen diferencias significativas entre los diferentes grupos.

Analizando la misma enzima al quinto día podemos ver que los resultados han sido los siguientes: grupo 1: 124 ± 20 , grupo 2: 132 ± 11 ; grupo 3: 229 ± 52 y grupo 4: 101 ± 10 . No existe diferencia significativa entre los grupos. Figura N° 7.

¡Error! Marcador no definido.

Figura N° 7: Valores de ASAT a la hora de la reperusión, al segundo día y al quinto día. Los valores son expresados en media \pm ES del porcentaje de incremento sobre el valor basal.

5. 3. 2. Alfa-glutation-transferasa (GST)

La GST es una enzima que ha sido demostrado por diferentes autores, que es más precoz su aparición. Se valora el valor basal y a la hora de la reperusión. Los valores a la hora de la reperusión están expresados como porcentaje con relación al valor basal, debido a la variabilidad de los resultados entre los diferentes grupos.

El grupo 1 presenta un aumento de 3150 ± 1006 %, el grupo 2, 2626 ± 672 %, el grupo 3, 13325 ± 4372 % y el grupo 4: 574 ± 54 %. En todos los casos este aumento es significativo en relación al valor basal, p 0,001, 0,001, 0,0001 y 0,0001 para los grupos 1, 2, 3 y 4 respectivamente. Realizando un análisis entre los

diferentes grupo a la hora de la reperfusión, resultan significativas las diferencias existentes entre el grupo 3 y los grupos restantes: 1, 2 y 4. (p 0,03; p 0,02, p 0,01, respectivamente). Figura N° 8.

¡Error! Marcador no definido.

Figura N° 8: Valores de GST con relación al valor basal. Referencias: a p 0,001; b: p 0,001; c: p 0,0001 y d: 0,001 con relación al valor basal del mismo grupo; e: p 0,03; 0,02 y 0,01 con relación a los grupos 1, 2 y 4, en la misma fase.

5. 3. 3. Marcador de lesión endotelial: determinación de ácido hialurónico.

Analizando la determinación de ácido hialurónico a la hora de la reperfusión vemos que los valores son los siguientes: Grupo 1: 1608 ± 286 ; grupo 2: 2890 ± 953 ; grupo 3: 408 ± 53 y grupo 4: 1402 ± 135 . Existieron diferencias significativas respecto al valor basal en los grupos 1, 2 y 4, (p 0,008; 0,001 y 0,003). Así mismo, las diferencias existentes entre el grupo 3 con el grupo 1, 2, y 4 son significativas (p 0,02, p 0,0001 y 0,05 respectivamente). Figura N° 9.

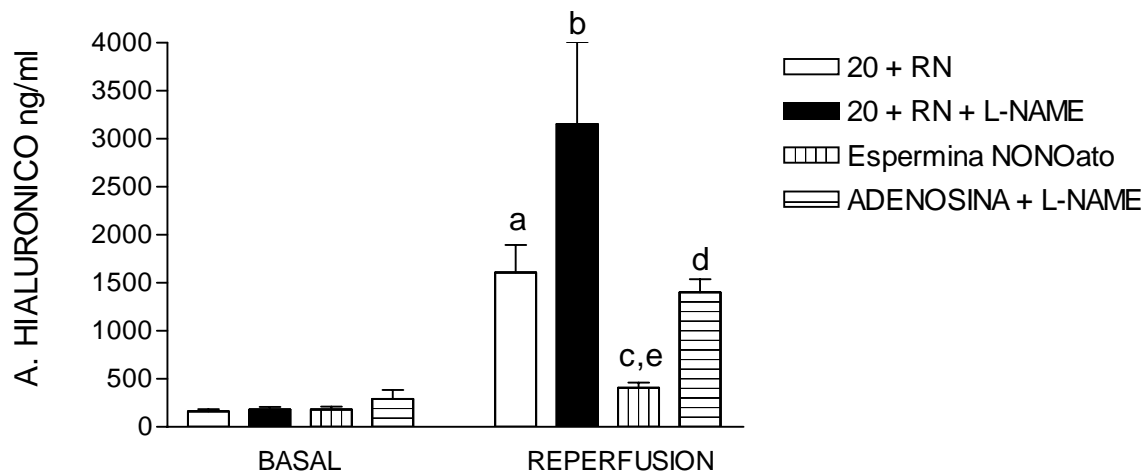


Figura N° 9: Valores de ácido hialurónico a la hora de reperusión. Referencia a: p 0,008; b: p 0,001; c: p 0,1 y d: 0,003, con relación al valor basal. Referencia e: p 0,02, p 0,0001 y 0,05 en relación con el grupo 1, 2 y 4.

5. 3. 3. 4. Determinación de Nitritos y Nitratos

Podemos observar que tras los 20 minutos de parada cardíaca los valores de nitritos y nitratos fueron $102 \pm 6 \%$, $113 \pm 3 \%$, $198 \pm 53 \%$ y $92 \pm 5 \%$ en relación al valor basal para el grupos de RN, RN más L-NAME, espermina NONOato y adenosina + L-NAME respectivamente. El aumento presente en el grupo de espermina NONOato es significativo respecto a su valor basal y al resto de los grupos en el mismo momento. Estos datos los podemos ver reflejados en la Tabla y en la figura....

En el grupo de RN tras la realización de la misma podemos ver que el valor era de $88 \pm 5 \%$ en relación con el basal mientras que en el grupo donde se

realizó RN pero se inhibió la síntesis del óxido nítrico la concentración de nitritos y nitratos fue del $80 \pm 3 \%$.

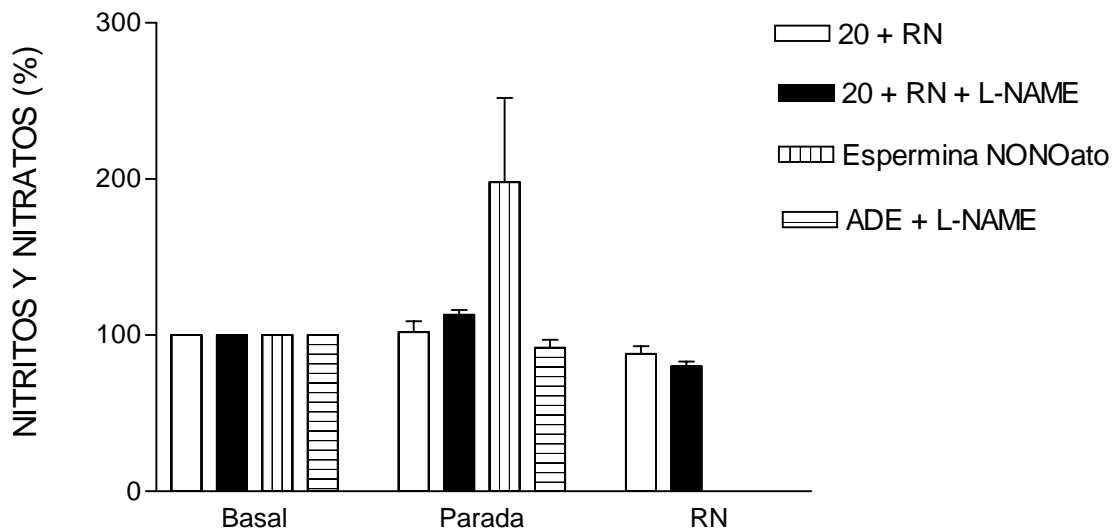


Figura : Determinación de nitritos y nitratos durante el procedimiento. Los valores son presentados como media + ES del porcentaje de variación con relación al valor basal.

Carga energética

Se ha calculado la carga energética que presentaron los diferentes grupos a lo largo del procedimiento de procuración del hígado. Es decir, que hemos calculado la variación que a sufrido la carga energética desde el momento basal, hasta la finalización del período de recirculación normotérmica. En los grupos de cerdos, donde no se efectuó recirculación normotérmica, hemos tomado como valor en dicho tiempo el que presentaron al final de la parada cardíaca. No han existido diferencias significativas en los diferentes grupos en los

distintos momentos del proceso, ni entre los grupos en un mismo momento determinado. Figura N° 10.

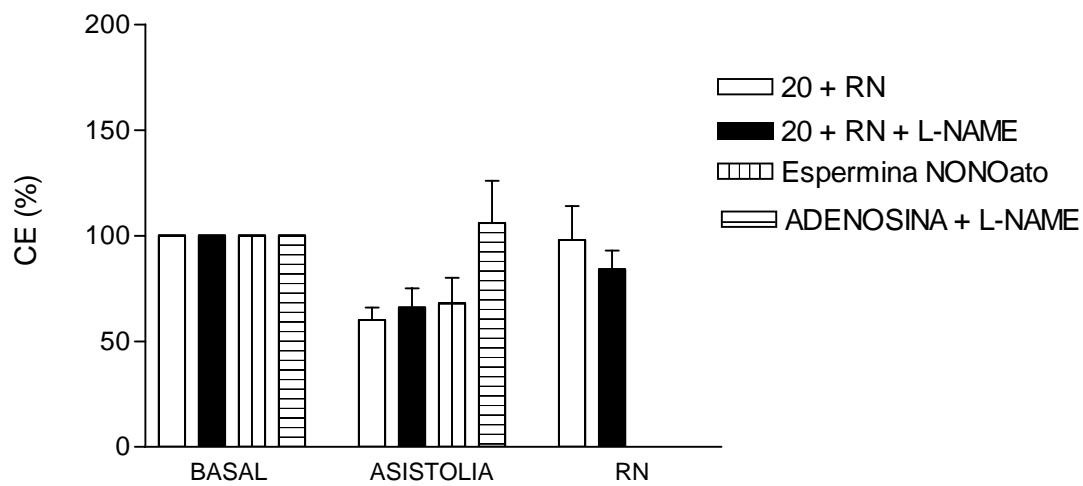


Figura N° 10: Carga energética durante el proceso de obtención del hígado. Los valores son presentados como media + ES del porcentaje de variación con relación al valor basal.

5. 4. HISTOLOGÍA AL QUINTO DÍA

En todos los animales que han sido sacrificados al quinto día, se ha obtenido una biopsia de tejido hepático a la cual se ha sometido a análisis anatomopatológico por medio de microscopía óptica. Los resultados de los diferentes grupos son los siguientes:

5.4.1. Dilatación sinusoidal

Comparando los diferentes grupos entre ellos, apreciamos que no existen diferencias significativas en la presencia de dilatación sinusoidal en la biopsia tomada el día del sacrificio del animal. A continuación se puede observar el grado de lesión en los diferente grupos en la tabla N° 11.

	Grado de dilatación sinusoidal			
	0	1	2	3
Grupo 1 (20 + RN)	3	4	3	-
Grupo 2 (20 + RN + L-NAME)	3	2	-	-
Grupo 3 (Espermina NONOato)	1	1	6	1
Grupo 4 (Ade + L-NAME)	-	1	1	1

Tabla N° 11: Grado de dilatación sinusoidal en los diferentes grupos, representado por número de casos presente en cada grado de lesión.

5.4.2. Infiltración sinusoidal polimorfonuclear

En la siguiente figura están representados los diferentes grados de infiltración polimorfonuclear de los sinusoides hepáticos. Existe una diferencia significativa cuando se comparó el grupo 1 (20 minutos de parada cardíaca + RN) con el grupo 2 (20 minutos de parada cardíaca + RN + L-NAME) y este último con el grupo 3 (Espermina NONOato + 20 minutos de parada cardíaca), p 0,001 y 0,006 respectivamente. Entre el resto de grupos no hubo diferencias significativas. Tabla N° .

	Grado de lesión			
	0	1	2	3
Grupo 1 (20 + RN)	1	5	4	-
Grupo 2 (20 + RN + L-NAME)	5	-	-	-
Grupo 3 (Espermina NONOato)	1	5	3	-
Grupo 4 (Ade + L-NAME)	1	-	1	1

Tabla N° : Grado de infiltración sinusoidal por polimorfonucleares en los diferentes grupos, representado por número de casos presentes en cada grado de lesión.

5.4.3. Infiltración sinusoidal linfocitaria

Comparando los diferentes grupos entre sí, no hemos observado diferencias significativas entre ellos en la presencia de infiltración linfocitaria en los sinusoides hepáticos. Estas diferencias las podemos apreciar en la tabla N° .

	Grado de infiltración linfocitaria			
	0	1	2	3
Grupo 1 (20 + RN)	-	4	4	2
Grupo 2 (20 + RN + L-NAME)	-	2	2	1
Grupo 3 (Espermina NONOato)	-	2	2	5
Grupo 4 (Ade + L-NAME)	-	-	1	2

Tabla N° 13: Grado de infiltración sinusoidal linfocitaria en los diferentes grupos, representado por número de casos presentes en cada grado de lesión.

5.4.4. Colangitis isquémica

Cuando analizamos la presencia o ausencia de colangitis isquémica en los diferentes grupos y los comparamos entre sí, podemos ver que existen diferencias significativas entre el grupo adenosina + L-NAME y el grupo 20+ RN, p 0,04 y entre el grupo adenosina + L-NAME y el grupo espermina NONOato, p 0,005. tabla N°

	Colangitis isquémica	
	Ausente	Presente
Grupo 1 (20 + RN)	8	2
Grupo 2 (20 + RN + L-NAME)	4	1
Grupo 3 (Espermina NONOato)	9	-
Grupo 4 (Ade + L-NAME)	-	3

Tabla N° : Presencia o no de colangitis isquémica en los diferentes grupos, representado por número de casos presentes en cada grado de lesión.

5.4.5. Desestructuración hepatocitaria

Cuando analizamos la desestructuración hepatocitaria como marcador de daño por la isquemia reperusión no hemos encontrado diferencias significativas entre los diferentes grupos tratados. En la siguiente tabla N° , veremos representadas las diferentes frecuencias, según los grupos.

	Grado de desestructuración hepatocitaria			
	0	1	2	3
Grupo 1 (20 + RN)	5	3	1	-
Grupo 2 (20 + RN + L-NAME)	1	3	-	1

Grupo 3 (Espermina NONOato)	1	3	1	4
Grupo 4 (Ade + L-NAME)	1	-	2	-

Tabla N° : Desestructuración hepatocitaria en los diferentes grupos, representado por número de casos presentes en cada grado de lesión.

5.4.6. Necrosis isquémica centrolobulillar

También hemos realizado el análisis comparativo entre los diferentes grupos del grado de necrosis isquémica centrolobulillar que se ha presentado al quinto día, en los animales supervivientes. No han existido diferencias significativas entre los diferentes grupos. Podemos ver las frecuencias en la tabla N° .

5.4.7. Area necrótica media.

El grupo de 20 minutos + RN presentó $6,3 \pm 4,1$ % de área necrótica media (ANM), el grupo 20 minutos de parada cardíaca + RN + L-NAME presentó un $6,4 \pm 5,9$ %, el grupo de espermina NONOato un $19 \pm 5,5$ % y por último el grupo de adenosina + L-NAME presentó el $7,3 \pm 6,3$ %. En todos los casos, no han existido diferencias significativas entre los grupos. Figura N° 17.

	Grado de necrosis isquémica centrolobulillar			
	0	1	2	3
Grupo 1 (20 + RN)	3	6	-	1

Grupo 2 (20 + RN + L-NAME)	2	2	-	1
Grupo 3 (Espermina NONOato)	3	1	2	2
Grupo 4 (Ade + L-NAME)	1	2	-	-

Tabla N° : Necrosis centrolobulillar en los diferentes grupos, representado por número de casos presentes en cada grado de lesión.

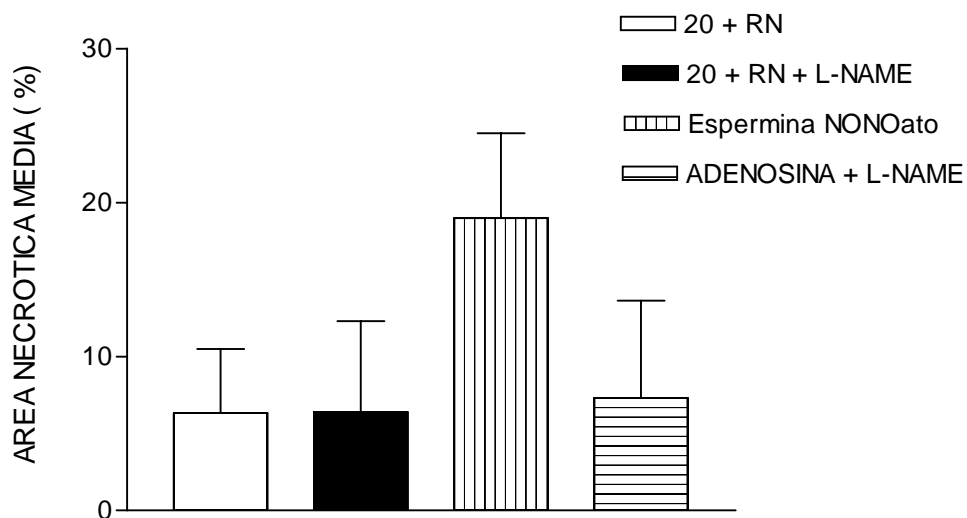


Figura N° 17: Area necrótica media de los diferentes grupos. Los valores son expresados como media \pm ES.

DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

Hoy en día, el trasplante hepático es el único tratamiento definitivo para un grupo importante de hepatopatías. En la actualidad existe una disparidad entre los pacientes que requieren un trasplante de hígado y los órganos que se llegan a generar para ser implantados. Es por ello, que se ha tenido que buscar diferentes alternativas para suplir dicha escasez. No sólo se ampliaron criterios de aceptación de donantes, sino que se desarrollaron diferentes técnicas (donantes vivos, partición hepática) para aumentar el número de injertos para implantar. Así mismo, los donantes a corazón parado comenzaron a ser reconsiderados como una posible alternativa. Este tipo de donantes de órganos ha sido utilizado durante mucho tiempo como única fuente de obtención de órganos en países como Japón, donde el concepto de muerte encefálica no era aceptado.

Es sabido que una vez detectado un posible donante a corazón parado, ya sea fuera o dentro de un hospital, es necesario actuar con la mayor rapidez posible para disminuir al máximo posible el tiempo de isquemia caliente. Uno de los procedimientos que se utilizan en la actualidad para evitar las lesiones que se producen durante la isquemia caliente es la recirculación normotérmica. La RN consiste en realizar un período de recirculación y oxigenación tisular a 37°C, mediante una bomba de recirculación extracorpórea, antes de proceder a realizar el enfriamiento corporal total. Dicho procedimiento ha sido utilizado en la práctica clínica por diferentes grupos en la obtención tanto de riñones como de hígados para el trasplante principalmente en donantes a corazón parado tipo I y II de la clasificación de Maastrich. (30,34,69,125,171)

La mayor experiencia con donantes a corazón parado se tiene en trasplante renal. Hoy día gracias a la utilización de la RN, la incidencia de “no función primaria” ha disminuido hasta valores aceptables y la sobrevida de los

injertos es comparable con la de los donantes en muerte cerebral. Se calcula que el uso de donantes a corazón parado podría incrementar hasta un 20 % el número total de órganos obtenidos.(172,173) Así mismo, cuando se compara la RN con otros métodos de perfusión durante la obtención de riñones en donantes a corazón parado, se puede ver que los riñones así obtenidos y trasplantados presentan una menor incidencia de no función primaria y mejor función inmediata postrasplante.(25,69)

Nuestro grupo investigador, a lo largo de estos últimos años ha centrado su actividad en un programa de trasplante hepático experimental en cerdo con donante a corazón parado y utilización de recirculación normotérmica durante 30 minutos.

En primer lugar hemos podido demostrar la utilidad de dicho procedimiento y el efecto beneficioso que tiene sobre la lesión isquémica que se produce tras la parada cardíaca. Se ha podido observar que el daño que se produce en el hígado está en relación con el tiempo de isquemia caliente y como es lógico, a menor tiempo de parada cardíaca, menor importancia, tendrán las lesiones que presente ese injerto.(126) **El beneficio obtenido por la utilización de recirculación extracorpórea a 37° y oxigenación tisular durante 30 minutos, se traduce en una mejor supervivencia de los animales trasplantados, una menor lesión hepatocitaria y sinusoidal, evidenciada tanto a nivel bioquímico como histológico.**

En segundo lugar se ha intentado dilucidar cual es el mecanismo de acción de la RN y que sustancias se encuentran implicadas. En este aspecto, se ha demostrado que la RN actúa por medio de un mecanismo de preconditionamiento en el hígado. **Durante la RN hemos podido demostrar que existe un aumento en los niveles de adenosina y ésta actúa a nivel hepático por medio de los receptores A1 y A2.** Sin embargo, los receptores que

están implicados en mayor medida son los A₂, que son los que predominan en el hígado ya que se encuentran el músculo liso vascular.

La RN actúa por un mecanismo de preconditionamiento ya que los resultados son semejantes a los que han obtenido diferentes autores con modelos de preconditionamiento isquémico e isquemia hepática parcial o trasplantes hepático.(141,142,174,175)

Como respuesta a la estimulación de los receptores A₂ en las células del músculo liso vascular, se produce la activación de la vía proteinkinasa-AMPC. Algunos autores han demostrado que la proteinkinasa que se encuentra implicada en el aumento del AMPC intracelular es la A, mientras existen evidencias que también pudiera serlo la proteinkinasa C. La unión de la adenosina a los receptores A₂ causa la activación de una proteína G que produce la estimulación de la guanilciclase y la adenilatociclase. Esto produce que se acumulen tanto GMPc y AMPC dentro de la célula. Así mismo hay otros mecanismos que se encuentran implicados en la vasodilatación producida por la adenosina, como son la inhibición de la entrada de calcio a la célula, apertura de canales de K con hiperpolarización de la membrana celular y generación de óxido nítrico.

Por otro lado cuando la adenosina entra en contacto con los receptores A₂ presentes en las células endoteliales se produce un aumento de la entrada de Ca⁺ a la célula, que junto a la calmodulina y otros sustratos producen la síntesis de ON por medio de la óxido nítrico sintasa. Este ON tiene la propiedad de difundir a través de las membranas celulares y llega así hasta la célula del músculo liso vascular donde estimula la guanilciclase para que ésta aumente el AMPC y se produzca así la vasodilatación.

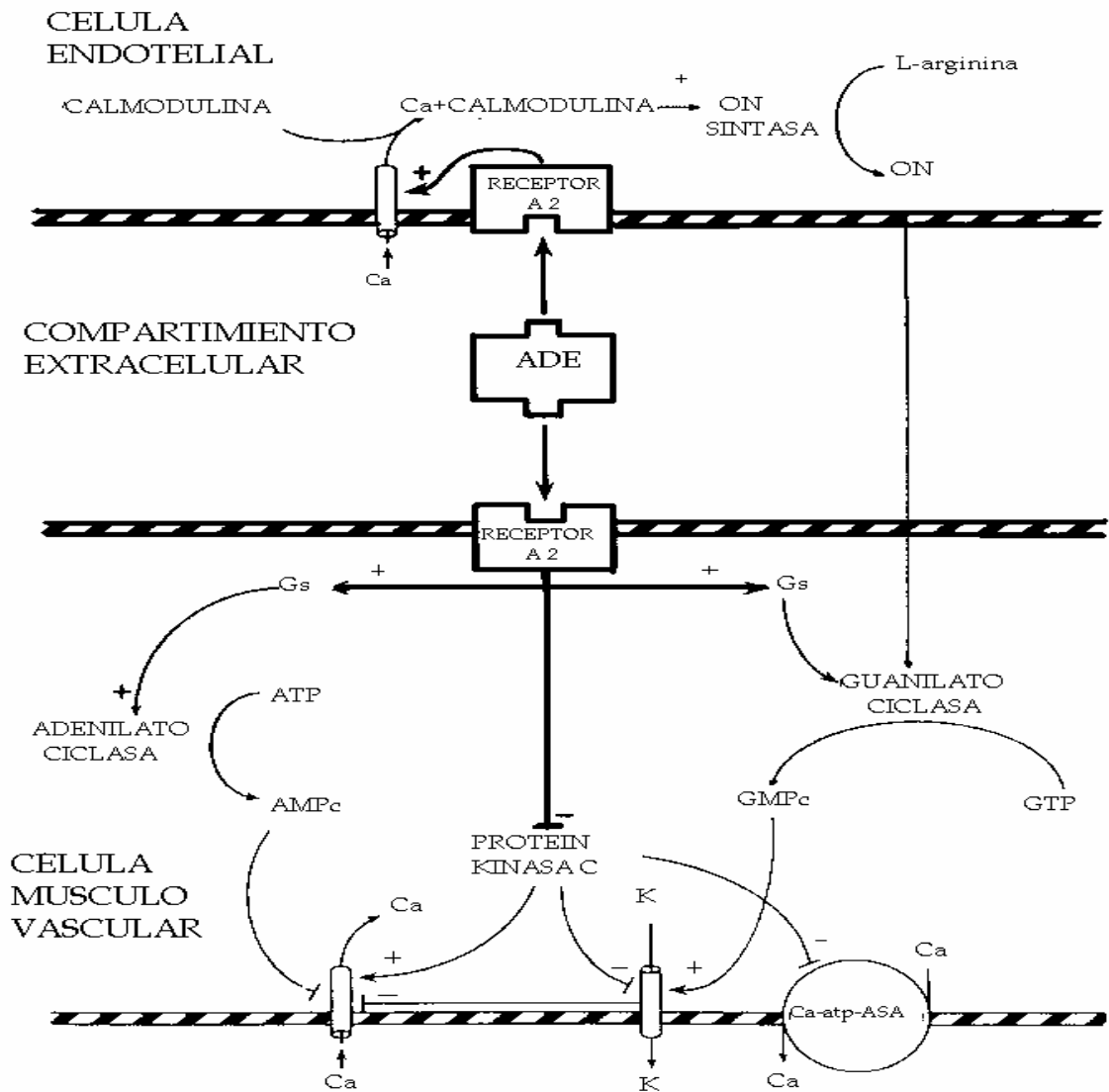


Figura 22 : Representación esquemática de la activación de los receptores A₂ en diferentes tipos de células. A nivel de la célula endotelial produce la síntesis de ON, mientras que en la célula del músculo liso vascular produce la relajación del mismo.

En relación al mecanismo de acción de la RN, nuestros resultados están de acuerdo con los trabajos de C. Peralta y colaboradores quienes trabajan en un modelo de isquemia-reperfusión hepática parcial. Como tiempos de preconditionamiento utilizan 10 minutos de isquemia y otros 10 de perfusión. Estos autores han demostrado que el efecto protector a nivel hepático del

precondicionamiento isquémico también está mediado por la activación de los receptores A2 de la adenosina y ésta última sería la encargada de producir la síntesis de ON a partir de las células endoteliales. Por su parte, Arai y colaboradores han estudiado el efecto que tiene el preconditionamiento sobre el daño en la célula endotelial. Para ello utilizan un modelo de preconditionamiento isquémico (5 minutos de isquemia y 5 de reperfusión) e isquemia fría (30 horas). De esta manera han visto que el preconditionamiento isquémico confiere un mecanismo protector por medio de los receptores A2, que se encuentran en las células endoteliales y se encargan de aumentar los niveles de AMPc.(141,174). Confirmando los resultados anteriores y trabajando con hígados preservados durante 24 horas, pero que habían sido dañados previamente por una hora de parada cardíaca, Minor y colaboradores han podido demostrar que la estimulación de los receptores A 2 de la adenosina, mantiene la viabilidad de los injertos hepáticos.(142)

Debido a que existen evidencias que sugieren que el estado de la microcirculación hepática sería la responsable del mal funcionamiento de los hígados obtenidos de donantes a corazón parado, hemos planteado la posibilidad de evaluar el papel que tiene, en este modelo de donantes a corazón parado y utilización de recirculación normotérmica, la acción del óxido nítrico.(176)

Las alteraciones producidas en la microcirculación, debido a disfunción de las células endoteliales es una de las mayores causas de lesión hepática asociada con la isquemia y subsecuente reperfusión. Es conocida la importancia que tiene **el óxido nítrico** en la regulación del estado de la microcirculación a nivel de todo el organismo. A nivel del sinusoides hepático, se ha demostrado que el ON disminuye su resistencia por lo tanto aumentará el flujo sanguíneo dentro de los mismos. Además de este efecto vasodilatador, el ON produce inhibición de la adhesión plaquetaria al endotelio vascular, disminución de la adhesión de leucocitos a la pared del sinusoides hepático, logrando así una

mayor fluidez de sangre a nivel de la microcirculación. También disminuye la expresión de moléculas de adhesión intracelulares tipo 1 y podría actuar como “scavenger” del superóxido. Estos hallazgos sugieren que el ON dentro del hígado tiene una importancia fundamental en la protección de la microcirculación bajo condiciones patológicas.(74,75,106,107,146)

Otro dato a considerar es la relación existente entre el óxido nítrico y la síntesis de FNT- α y otras citoquinas. Se ha demostrado que la producción endógena de óxido nítrico por diferentes estados patológicos se acompaña de una disminución en la síntesis de FNT- α y esta disminución se acompaña de menor daño hepático.(177) Paralelamente Zhung y colaboradores han sugerido que la inhibición de la síntesis de ON se acompaña de un aumento en la producción de FNT- α sugiriendo que puede existir un mecanismo de feedback entre estas dos sustancias cuyos efectos a nivel de la circulación hepática son opuestos.(178). Yin ha medido la concentración de FNT- α tras el trasplante hepático en ratas donde realizó tratamientos con L-arginina y L-NAME para aumentar y disminuir respectivamente la síntesis de óxido nítrico. En este trabajo se demuestra que cuando existe niveles disminuidos de óxido nítrico los niveles sanguíneos de FNT- α son mayores y viceversa.(138) Este hecho parece indicar la existencia de un mecanismo de autorregulación en la síntesis de estas dos sustancias. Otras sustancias vasoconstrictoras que ha sido demostrado tener relación con la isquemia reperusión ha sido las endotelinas. Aparentemente, existiría un balance entre los niveles de endotelinas circulantes y el ON. Ha sido demostrado en un modelo de isquemia caliente prolongada, donde se ha trabajado con antagonistas de los receptores de endotelinas y L-arginina, que las diferencias entre las concentraciones de ON y endotelinas podría ser el responsable de los disturbios microcirculatorios que surgen tras la reperusión.(179)

En contraposición a todos los efectos beneficiosos que tiene, diversos autores, ponen de manifiesto, la posibilidad que el ON tenga también efectos

nocivos sobre el hígado en presencia de radicales libres. Diferentes situaciones patológicas o estados inflamatorios pueden producir un aumento en los niveles de superóxido, que al unirse al ON formarían peroxinitrito. Éste es un potente oxidante que tiene la propiedad de reaccionar a nivel celular con los ácidos grasos iniciando la lipoperoxidación.(108-110,151,180,181)

Modelo experimental utilizado

Durante la obtención de órganos de donantes a corazón parado y utilización de RN hemos empleado diferentes sustancias farmacológicas para evaluar el papel del ON.

1- **El L- ω -Nitro-arginina-metil-ester (L-NAME)**, un análogo de la arginina, es uno de los inhibidores no selectivos de la oxido nítrico sintasa más potente que se conoce. Ha sido utilizado en diferentes estudios experimentales donde se demostró que su uso está relacionado con una disminución importante en la síntesis de oxido nítrico y mayor grado de lesión por isquemia reperfusión.(182-185)

2- **La adenosina** también ha sido ampliamente utilizada en la evaluación de la lesión por isquemia-reperfusión.(186) Con anterioridad ha este trabajo, nuestro grupo investigador, pudo demostrar que su administración previa a la parada cardíaca tiene un efecto similar al que produce la RN. El aumento en los niveles de adenosina se correlaciona con una mejor supervivencia, una menor lesión endotelial y parenquimatosa como así también una mejor histología al quinto día postrasplante. Esto sugiere la reversibilidad de la lesión por isquemia-reperfusión. CITA DEL CONGRESO Resultados comparables han obtenido diferentes grupos con el uso de este fármaco y la realización de preconditionamiento isquémico. Peralta y colaboradores en el mismo modelo descrito anteriormente, han demostrado que el preconditionamiento isquémico

provoca un aumento de los niveles de la adenosina y ésta produce un aumento en la síntesis del óxido nítrico que sería el efector de los cambios sucedidos tras el preconditionamiento.(141)

3- Por último hemos utilizado **espermina NONOato** como fuente exógena de óxido nítrico. Este fármaco una vez que entra en la circulación se convierte espontáneamente en óxido nítrico. También se ha demostrado que su administración disminuye el grado de lesión por isquemia reperusión. Similares efectos son conseguidos por sustancias similares como por ejemplo con el FK 409.(140,187-189)

6. 1. Análisis de la supervivencia

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

Cuando analizamos la supervivencia de los diferentes grupos hemos observado que los grupos **donde se interfiere por medio de L-NAME, con la producción del óxido nítrico hay una clara diferencia con aquellos donde no se ha utilizado dicha sustancia**. El grupo de cerdos a los cuales se les ha realizado 20 minutos de parada cardíaca más 30 minutos de RN previo al enfriamiento corporal total tiene una supervivencia del 100 % al quinto día, mientras que en el grupo **donde se administró L-NAME durante la RN la sobrevida llega tan solo al 50 % y en el grupo de adenosina más L-NAME solamente al 30 %**. Estas diferencias son estadísticamente significativas y ponen en evidencia la importancia que tiene en la sobrevida de los animales trasplantados al 5to día, la inhibición del óxido nítrico en el donante.

Paralelamente hemos realizado un grupo de cerdos a los cuales no se le ha realizado ni recirculación normotérmica ni hemos administrado adenosina (cuyo efecto es similar en la protección contra la lesión por isquemia-reperfusión que la realización de RN), pero hemos administrado **espermina NONOato (donante de óxido nítrico) y la sobrevida al quinto día ha sido del 90 %**. Este hecho es muy importante, ya que en estudios anteriores se había demostrado que el trasplante hepático con injertos obtenidos de donantes a corazón parado donde no se realiza recirculación normotérmica ni otro método para evitar o revertir la lesiones propias de la isquemia caliente, es incompatible con la sobrevida del animal trasplantado.

Esto último parece ser una clara demostración de la importancia que tiene el ON en la función inicial del injerto y en la supervivencia de los animales trasplantados con donantes a corazón parado.

Nuestro grupo investigador ha trabajado desde 1995 en un modelo de donante a corazón parado con la idea de prolongar el tiempo de isquemia caliente. Hemos observado que cuando se trabaja con tiempos de parada cardíaca de 40 minutos, se obtiene una supervivencia del 50 % al quinto día del trasplante. Se ha visto que la administración de L-arginina, durante la realización de la RN mejora ostensiblemente la supervivencia al quinto día, llegando hasta el 80 %. Con este hecho se puede relacionar al ON, ya que la L-arginina es un sustrato que es utilizado por la óxido nítrico sintasa para la formación del óxido nítrico, por lo que podemos suponer que su administración durante la RN, elevaría aun más los niveles circulantes de ON y ser este el que en definitiva produzca el beneficio.(131) Calabrese y colaboradores también ha observado que tras períodos prolongados de isquemia caliente (120 minutos), la administración de L-arginina aumenta la supervivencia en animales sometidos a períodos de isquemia-reperfusión hepática.(132)

Existen evidencias que relacionan al óxido nítrico y el preconditionamiento isquémico con la supervivencia de animales trasplantados de hígado. Yin y colaboradores han realizado trasplante hepático en ratas donde realizaron en los animales donantes un período de preconditionamiento isquémico o tratamientos farmacológicos con diferentes sustancias. Entre ellas han utilizado L-NAME, para inhibir la síntesis de ON y L-arginina o adenosina, como precursores o inductores de la síntesis del ON. En sus resultados se puede ver que el preconditionamiento isquémico confiere protección hepática logrando aumentar la supervivencia en ratas trasplantadas tras períodos prolongados de isquemia fría. Similares resultados fueron obtenidos en las ratas que recibieron hígados tratados con L-arginina o adenosina, mientras que la administración de L-NAME repercutió en forma negativa sobre la supervivencia

de los animales. Estos resultados sugieren el óxido nítrico sería una de las sustancias responsables del efecto protector del preconditionamiento isquémico y representan otra evidencia de la importancia del ON en la lesión por isquemia reperusión y como cambios en su síntesis puede influir en la supervivencia de los animales.(138)

En resumen: En base a los resultados obtenidos podemos afirmar que el óxido nítrico presente durante la obtención del órgano en donantes a corazón parado, se encuentra relacionado con la supervivencia de los animales trasplantados

6. 2. Evaluación de los flujos sanguíneos

Desde el punto de vista fisiológico, la microcirculación hepática es diferente a la del resto del organismo. A diferencia de los que ocurre en otros órganos donde la regulación del flujo sanguíneo es a nivel del esfínter precapilar en el hígado el sitio de regulación de más del 90 % del flujo sanguíneo ocurre en la unión de la vénula portal con la arteriola terminal, o sea a nivel del sinusoides hepático. El mantenimiento fisiológico del flujo total del hígado es realizado primariamente por una regulación recíproca entre el flujo arterial y el flujo de la vena porta. La arteria hepática es la que juega un papel pasivo, aumentando o disminuyendo su flujo con relación a cambios en el flujo portal. **Este fenómeno fisiológico se ha denominado “REPUESTA BUFFER “.** (190-193)

Durante la obtención del hígado, en dos grupos de cerdos en los animales donantes se ha realizado el período de recirculación normotérmica tras los 20 minutos de parada cardíaca. Para bloquear la síntesis del ON en uno de ellos hemos utilizado L-NAME. En ambos grupos hemos evaluado durante los 30 minutos de la RN, los flujos sanguíneos de la vena porta, la arteria hepática, el flujo sanguíneo hepático total y como así también el flujo sanguíneo mantenido por la bomba de recirculación extracorpórea.

Se pudo observar que después de los 20 minutos de parada cardíaca se recuperan los flujos tanto en la arteria hepática como en la vena porta, casi hasta los valores basales. Así mismo, hemos observado que cuando es inhibida la acción de la óxido nítrico sintasa por medio de L- NAME hay una **disminución estadísticamente significativa tanto en el flujo hepático total como en el flujo portal y en el flujo sanguíneo de la bomba de recirculación** extracorpórea. Sólo existieron diferencias significativas en cuanto al flujo de la arteria hepática a los 30 minutos de la RN, pero debemos hacer referencia que los flujos en dicha

arteria han sido menores cuando hemos empleado L-NAME. Con anterioridad a la realización de esta tesis, Valero y colaboradores han evaluado los flujos hepáticos durante la obtención de hígados en donantes a corazón parado. Se ha demostrado que los animales trasplantados con hígados obtenidos de donantes a corazón parado y vivos al quinto día postrasplante presentaron durante la RN valores de flujo portal significativamente superiores a los de los animales trasplantados con hígados obtenidos de manera similar y que mueren antes del quinto día. De la misma manera, vieron que los flujos en la arteria hepática, si bien son mayores no alcanzaban diferencias significativas.(129) Por otra parte, el mismo autor, ha demostrado, nuevamente en un modelo de donante a corazón parado, que la administración de L-arginina durante la obtención de hígados en donantes a corazón parado y RN, aumenta el flujo hepático, pero solo es significativo el aumento que se produce en el flujo portal, mientras que el flujo arterial, si bien es mayor al que se presenta sin la administración de L-arginina, no alcanza diferencias significativas. Podemos ver que nuestros resultados obtenidos en la medición de los flujos hepáticos durante la recirculación normotérmica e inhibición de la síntesis del ON, están de acuerdo con los publicados previamente por Valero y colaboradores.

Similares resultados han obtenido diferentes investigadores inhibiendo la producción de óxido nítrico y evaluando el flujo hepático. Así lo ha demostrado Saetre y colaboradores quienes observan que tras la administración de L-NAME y lipopolisacáridos (LPS) el flujo hepático disminuye más del 50 %, con una disminución significativa del flujo de la vena porta, mientras que el flujo de la arteria hepática disminuye levemente. En el mismo estudio dicen que en ausencia de LPS y con solo la presencia de L-NAME, el flujo hepático presenta el mismo patrón de cambio.(194) Idénticos resultados fueron los obtenidos por Zhang y colaboradores en relación a los cambios observados en el flujo hepático tras la administración de L-NAME.(178) También Macedo y colaboradores han bloqueado la síntesis del ON por medio de L-NAME y evaluaron el flujo hepático y de la arteria mesentérica superior (AMS),

observando que no existen cambios en la arteria hepática tras la administración de dicho inhibidor, pero el flujo en la AMS disminuye como así también lo hace el flujo de la vena porta.(193)

Es conocido que el flujo hepático durante la RN para la obtención de hígados de donantes a corazón parado se relaciona de forma directa con el flujo sanguíneo mantenido por la bomba de recirculación extracorpórea. De igual manera, el flujo de ésta última depende directamente del retorno venoso, por lo que una disminución de la llegada de sangre a la bomba de recirculación se acompañará de menor flujo de bomba y por lo tanto de un menor flujo hepático. La administración de L-NAME durante la RN, en un donante a corazón parado, exagera aún más la vasoconstricción producida por la propia isquemia lo que producirá un menor retorno venoso y menor flujo de bomba. Mulder y colaboradores han demostrado que la administración de L-NAME se acompaña de un aumento de la resistencia del lecho vascular esplácnico con la consecuente disminución en el flujo portal.(195) Como posible explicación al comportamiento del flujo arterial se puede decir que la arteria hepática podría tener una menor concentración de guanilciclase en las células musculares lisas y ser esta la causa de una menor repuesta ante sustancias vasoactivas.(193)

En la evaluación del flujo hepático y el preconditionamiento isquémico existen resultados contradictorios. Por un lado, C. Peralta y colaboradores han realizado la medición del flujo hepático por medio de Doppler laser y no han encontrado diferencias significativas en el flujo hepático entre un grupo de ratas a las cuales se las sometió a un período de 90 minutos de isquemia seguidos por 90 minutos de reperfusión y otro grupo de similares características a las cuales se les realizó un período de preconditionamiento isquémico consistente en 10 minutos de isquemia y 10 minutos de reperfusión antes de la isquemia-reperfusión. Por otro lado, Zapletal y colaboradores trabajando que un modelo de isquemia-reperfusión parcial con preconditionamiento isquémico de 5 minutos de isquemia y 10 de reperfusión observan por medio de microscopía

intravital, que tras el preconditionamiento mejoran tanto la perfusión acinar como la perfusión sinusoidal, lo que indicaría que el preconditionamiento hepático mejoraría el flujo hepático, posiblemente debido al aumento del óxido nítrico.(139,140)

En diferentes modelos experimentales se ha demostrado que la administración de L-NAME disminuye profundamente el flujo sanguíneo del hígado llevando a que se produzcan profundas alteraciones en la perfusión del órgano, caracterizadas por áreas de baja perfusión e inclusive algunas sin perfusión. Como responsable de estos cambios podemos nombrar al propio vasoespasmo producido por el L-NAME, el edema de células endoteliales, la contracción de los sinusoides hepáticos y la trombosis de los mismos producidos por la isquemia. A su vez, en estas zonas de bajo flujo se produce grandes cantidades de hidrógenos que lleva a empeorar la acidosis existente empeorando la situación general.(194) Este dato, si bien no ha sido cuantificado en este estudio lo hemos podido observar. Después de la reperfusión del injerto en el receptor, pudimos observar en los trasplantes realizados con hígados obtenidos de donantes donde se había utilizado L-NAME, que existieron varias zonas que presentaban una alteración importante en la reperfusión, cosa que no ha ocurrido en los grupos donde no se utilizó L-NAME, donde se produce una reperfusión homogénea del injerto.

Podemos afirmar, en base a nuestros resultados, la importancia que tiene durante la realización de la recirculación normotérmica el óxido nítrico en la mantención del flujo sanguíneo hepático.

Otra circunstancia que hemos observado durante el presente estudio, es la **persistencia de la repuesta “buffer” en los hígados donde no se interfiere con la formación del NO con L-NAME.** Este fenómeno ha sido estudiado en hígados trasplantados y se ha podido observar que dicha repuesta es mantenida.(196) En nuestro modelo experimental podemos ver que la repuesta

buffer también se mantiene solo en los cerdos donde no se ha interferido con la formación del NO. Podemos observar dicha repuesta a los 30 minutos de la RN cuando el flujo portal comienza a disminuir y en ese momento se produce el aumento en el flujo arterial. Cuando hemos utilizado L-NAME durante la RN se observa que a partir de los 15 minutos comienza a disminuir el flujo sanguíneo portal sin que se produzca la repuesta compensatoria correspondiente en el flujo arterial.

Este fenómeno ha sido ampliamente estudiado por Lauth y colaboradores. Según sus trabajos, aparentemente los cambios producidos en el flujo de la arteria hepática estarían relacionados con un mecanismo adenosina-dependiente. El control del flujo arterial estaría dado por la concentración de adenosina presente en el flujo portal. Al existir un mayor flujo en la vena porta existiría un menor contacto de la adenosina con los receptores y no se produciría la vasodilatación, mientras que cuando existe una disminución en el flujo portal se acumula adenosina y así se produce la dilatación arterial.(192)

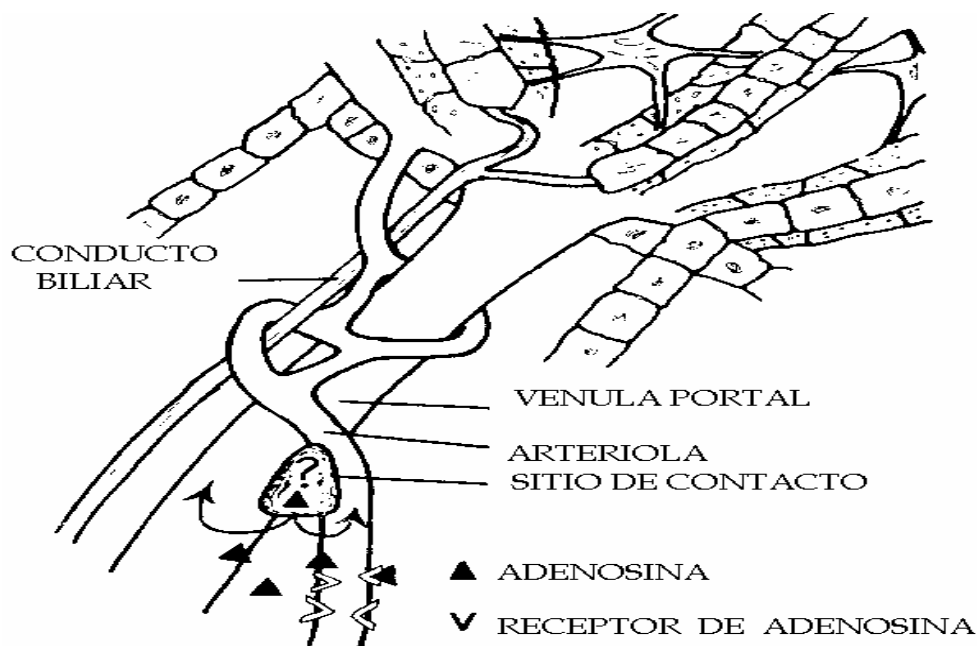


Figura 23: Representación esquemática del sitio de regulación del flujo arterial.

En resumen: Considerando los datos obtenidos de la medición de los flujos hepáticos durante la recirculación normotérmica, se puede sugerir que la inhibición de la síntesis de óxido nítrico en el animal donante condiciona de manera importante el estado de la microcirculación de ese injerto, posiblemente a nivel del sinusoides hepático y este hecho, según nuestros resultados tendría influencia sobre la viabilidad del injerto.

6. 3. Evaluación del metabolismo hepático del oxígeno

Una de las mayores incógnitas que se plantea antes de comenzar con la RN, es que sucederá en hígado cuando se restablezca el aporte de oxígeno, cuanto oxígeno le llegará al hígado y si las células hepáticas serán capaces de extraer el oxígeno presente en la sangre.

Hemos observado que en los cerdos donde se ha utilizado L-NAME para interferir con la formación del ON existe una marcada disminución de la llegada de oxígeno al hígado durante la RN, como así también observamos que el índice de extracción hepática de oxígeno es significativamente mayor. Esto se puede explicar de la siguiente manera: Al disminuir la síntesis del ON, predomina el efecto de diferentes sustancias que producen vasoconstricción. Esto conlleva que haya una menor irrigación de los tejidos, menor aporte de oxígeno y una mayor lesión de los mismos. Este hecho nos habla de por sí de la importancia que tiene el óxido nítrico durante la RN en el mantenimiento de la microcirculación en todo el organismo y como la disminución de la síntesis de ON se acompaña de cambios relevantes en la oxigenación de los diferentes órganos y tejidos.

Pero, ¿ es realmente útil el uso de los parámetros antes descritos en la evaluación de hígados obtenidos de donantes a corazón parado? Valero y colaboradores han demostrado que durante la RN dependiendo del tiempo de parada cardíaca, se produce una disminución en la llegada de oxígeno al hígado y un aumento en el índice de extracción hepática de oxígeno. A su vez estos datos son mayores a medida que el tiempo de isquemia caliente supera los 30 minutos. En el mismo trabajo puede demostrar que estas diferencias se hacen más evidentes si se compara los animales vivos y con los muertos al quinto día del trasplante. Además, este trabajo concluye que se puede llegar a utilizar dichos parámetros (llegada de oxígeno al hígado, índice de extracción hepática

de oxígeno) como marcadores de viabilidad del injerto en donantes a corazón parado.(129)

Resultados similares podemos ver en diferentes trabajos como por ejemplo los de Saetre y Ba, quienes trabajan con modelos experimentales de endotoxemia y shock hemorrágico y ven que durante estos procesos existe una clara disminución en la entrega del oxígeno al hígado, manteniéndose estable la extracción hepática de oxígeno pero con un aumento en el índice de extracción hepática de oxígeno cuando se bloque la síntesis del NO con inhibidores de la oxido nítrico sintasa.(194,197)

En resumen: La modificación en la síntesis de ON se acompaña de una alteración importante en la oxigenación de los órganos y esto repercute de forma negativa en la función de los mismo.

6. 4. Evaluación de los diferentes parámetros bioquímicos.

Basados en la experiencia obtenida durante estos años en la evaluación de la lesión por isquemia reperfusión en trasplante hepático con donante a corazón parado, hemos evaluado como marcadores de lesión hepatocelular los valores de alaninoaminotransferasa (ALAT) y Alfa-glutation-transferasa (α -GST), mientras que para la evaluación de la lesión sinusoidal hemos empleado los valores de ácido hialurónico (AH).(125,126)

No hemos observado ninguna diferencia en relación a la concentración de la ALAT a la hora de la reperfusión entre los diferentes grupos, posiblemente debido a que el pico máximo de esta enzima se presenta tras varias horas de producida la reperfusión por lo que el valor de esta enzima a la hora de la reperfusión es limitado. **Durante el segundo día del trasplante** hemos podido observar que a pesar de no existir un aumento significativo de en los valores de ALAT entre los diferentes grupos, **el grupo de RN + L-NAME es el grupo que presenta un mayor daño hepático.** Este hecho ha sido observado por diferentes autores, y relaciona a la inhibición de la oxido nítrico sintasa con mayor daño hepatocelular.(198) Así mismo, es posible observar que al quinto día, los valores de ALAT disminuyen aproximadamente hasta los valores basales, indicando este hecho de la posible recuperación del hígado del daño sufrido.

La α -GST, a demostrado, según diferentes autores, ser un marcador más precoz de la lesión por isquemia-reperfusión.(161-163,199) A la hora de la reperfusión hemos visto que en todos los grupos se produce un significativo aumento en relación al valor basal. **En el grupo 3, donde se administró espermina NONOato antes de la parada cardíaca y no se realizó recirculación normotérmica la lesión hepatocelular a sido mayor en comparación con los otros tres grupos.** Este hecho nos podría indicar que a pesar de modificar

notablemente la sobrevida de los cerdos, sometidos a trasplante con órganos obtenidos de donantes a corazón parado, la administración exógena de ON no parece tener un efecto protector a nivel de la lesión hepatocitaria en forma inmediata y posiblemente su efecto beneficioso esté en relación a la protección que brinda a nivel del endotelio vascular.

Por otro lado, posiblemente la administración exógena de ON no tenga los mismo efectos protectores a nivel hepatocitario que el óxido nítrico que se genera a partir de la RN. Recientemente, se ha demostrado en un modelo de isquemia reperfusión en ratas, que los mecanismos de protectores de estos dos tipos diferentes de ON no son los mismos.(187)

Analizando los valores de ALAT, Peralta y colaboradores han observado en un modelo de isquemia reperfusión que el preconditionamiento isquémico disminuye los valores de ALAT a valores similares a los que presentan grupos controles. Durante este estudio han observado que la administración de L-NAME suprime el beneficio del preconditionamiento isquémico, pero cuando se compara los valores de ALAT obtenidos en ese grupo con un grupo de isquemia reperfusión no existen diferencias significativas. Si extrapolamos estos resultados a los nuestros podemos ver que tras la isquemia reperfusión (en nuestro modelo sería tras la RN), el daño hepático presente, evaluado por medio de los valores séricos de ALAT es similar al que se presenta tras la realización de preconditionamiento y administración de L-NAME (en nuestro caso RN +L-NAME).(140)

Quizás el dato de mayor relevancia que hemos obtenido con el presente trabajo, está en relación a la protección que confiere el óxido nítrico a nivel del endotelio sinusoidal hepático. Diferentes trabajos experimentales y clínicos han podido demostrar que el marcador más fiable de lesión de la célula endotelial a nivel del sinusoides hepático es la determinación del ácido hialurónico presente en sangre. Este normalmente es captado por las células endoteliales hepáticas y

eliminado de la circulación. Su aumento en sangre se correlaciona con lesión de las células endoteliales.(164,165,167-170)

El grupo donde se ha inhibido la formación de óxido nítrico con L-NAME, durante la recirculación normotérmica es el grupo que presenta el mayor daño endotelial, reflejado por el aumento de ácido hialurónico, mientras que el grupo en el cual no hemos realizado recirculación normotérmica pero administramos un donante del óxido nítrico (espermina NONOato) es el que presenta una menor lesión del endotelio sinusoidal. Esto pone en evidencia que el óxido nítrico está en íntima relación con la protección del endotelio sinusoidal y que no se correlaciona o lo hace en menor medida, con el daño hepatocitario producido durante la isquemia-reperfusión.

Recientemente, C. Peralta ha publicado un trabajo experimental en ratas en un modelo de isquemia-reperfusión, donde demuestra que la interferencia en la producción del óxido nítrico se acompaña de una mayor lesión por isquemia reperfusion y mayor lesión endotelial, reflejada ésta por el aumento del ácido hialurónico en la circulación, mientras que la administración exógena de óxido nítrico o la administración de L-arginina se acompaña de una menor lesión endotelial.(187)

Datos similares a los nuestros ha encontrado Shimamura T. y colaboradores en un modelo de isquemia reperfusion hepático en perros. Trabajando con un período de isquemia caliente prolongado (60 minutos) ha podido demostrar que el tratamiento previo y posterior a la isquemia con L-arginina (precursor en la síntesis del ON) y con FK409 (donante de ON) mejora notablemente la supervivencia de los animales como así también lo hacen los test de funcionamiento hepático. Hasta la fecha es el único trabajo encontrado donde se relaciona directamente a la lesión de las células endoteliales con la síntesis del óxido nítrico.(188)

En nuestro modelo, ha sido de vital importancia la determinación de ácido hialurónico como marcador de lesión endotelial. Actualmente, no se dispone en la literatura consultada de datos en relación al preconditionamiento isquémico y la protección de la célula endotelial, ya que nos llama la atención el hecho que los trabajos publicados no utilizan la determinación del ácido hialurónico como marcador de lesión hepático.

En resumen: El óxido nítrico se encuentra relacionado en mayor medida con la protección de la célula endotelial y en menor manera protege a los hepatocitos de lesión por isquemia reperusión.

6. 5. Determinación de nitritos y nitratos.

El óxido nítrico permanece menos de un segundo en la sangre y algunos segundos en los tejidos ya que al unirse al oxígeno molecular se transforma en nitrito. A su vez éste último es convertido en nitrato y es eliminado posteriormente por la orina. Con la intención de observar si existe una variación en los niveles de ON en sangre, hemos realizado en diferentes etapas del procedimiento, la cuantificación de nitritos y nitratos que son una manera útil de medir indirectamente la cantidad de ON que ha existido. La medición se ha realizado en suero de sangre periférica.

En nuestro análisis no hemos sido capaces de encontrar diferencias significativas entre los diferentes grupos. **Lo que si podemos decir es que cuando se administra espermina NONOato antes de la parada cardíaca, los niveles alcanzados tras los 20 minutos de la isquemia caliente son superiores de los que presentaron el resto de los grupos**, este hecho puede ser uno de los responsables de supervivencia que presentan los cerdos de espermina NONOato a los cuales no se les ha realizado RN.

La demostración de un aumento en los niveles de nitritos y nitratos es relativa, ya que el método empleado en esta tesis, para la determinación de nitritos y nitratos cuantifica la totalidad de dichos elementos en la sangre, por lo tanto, no diferencia entre el óxido nítrico enzimático del no enzimático, es decir el que se forma a partir de la óxido nítrico sintasa y el que se forma a partir de nitritos o ácido ascórbico por ejemplo. Otra posible causa de no haber hallado grandes diferencias en la concentración de nitritos y nitratos es el momento de la RN en el que hemos realizado las mediciones. Quizás, el hecho de medir solo a los 30 minutos de la RN los niveles de nitritos y nitratos, no esté reflejando verdaderamente la concentración de éstos durante todo el tiempo de la RN.(200)

Sin embargo existen diferentes trabajos en la literatura consultada que han encontrado diferencias significativas en la concentración de nitritos y nitratos tras diferentes periodos de isquemia reperusión en ratas. Por ejemplo, Shiraishi, observa que tras la administración intraportal de L-arginina existe un aumento de nitritos y nitratos entre los 5 y 15 minutos de la reperusión, mientras que estas diferencias desaparecen a partir de los 20 minutos de la reperusión. En este trabajo no se hace referencia que sucede tras la administración sistémica de la L-arginina, situación que sería semejante a la realización de la RN, ya que en nuestro modelo estamos realizando la recirculación de todo el organismo.(155) Tanaka y colaboradores, en un modelo de isquemia reperusión pancreática en ratas, ha podido demostrar diferencias significativas en los niveles de nitritos y nitratos tanto en sangre portal como a nivel sistémico tras la utilización de L-NAME.(201). Sin embargo Ohmori y colaboradores en un modelo de isquemia-reperusión en ratas han observado que tras la administración de FK 409 (donante de ON) existe un aumento en sangre de nitritos y nitratos, pero cuando administran L-arginina no hay un aumento significativo de estos metabolitos en sangre. Estos resultados se asemejan un poco a los nuestros, donde administrando un donante de ON, ya sea FK 409 (Tanaka) o esperminana NONOato (esta tesis), existe un aumento de nitritos y nitratos en sangre.(202)En contraposición a nuestros resultados, Kokem y colaboradores, en un modelo de isquemia reperusión total, en ratas ha observado que tras la administración de L-NAME existe una disminución en los niveles de nitratos en suero y esta disminución de correlaciona con mayor daño hepático reflejado por los valores de AST y LDH.(185) En nuestro trabajo, si bien no alcanzaron significancia estadística, los valores de nitritos y nitratos han sido menores cuando hemos empleado L-NAME durante la RN.

6. 6. Evaluación de la carga energética

Desde hace mucho tiempo existen claras evidencia que el estado energético del órgano a trasplantar es muy importante. Varios estudios han demostrado la correlación que existe entre la viabilidad del injerto y la carga energética o la concentración de nucleótidos de adenina presentes en el tejido hepático. (203,204) En este aspecto existen diferentes trabajos experimentales donde trabajando con diferentes sustancias farmacológicas se pueden llegar a producir mejorías en la carga energéticas de hígados obtenidos de donantes a corazón parado.(205,206)

Basado en estos conceptos, Gonzalez y colaboradores han evaluado en biopsias hepáticas obtenidas de donantes a corazón parado, si existe correlación entre los niveles de los nucleótidos de adenina y la viabilidad del injerto. En ese estudio, se pudo demostrar que a medida que aumenta el tiempo de isquemia caliente disminuye de manera significativa la concentración de ATP, ADP y AMP en las biopsias de tejido hepático. Así mismo también se puede ver que la RN restaura los valores de carga energética a partir del aumento de los niveles de ADP. Por su parte J. Arias-Diaz ha evaluado la carga energética en donantes a corazón parado y sugiere que tras determinado tiempo de recirculación normotérmica se puede mejorar la carga energética tanto en hígados como en riñones.(207,208)

M. Net ha demostrado en un modelo de donantes a corazón parado con isquemia caliente de 40 minutos, que el tratamiento farmacológico con S-Adenosil-Metionina (SAME) puede aumentar la carga energética de los hígados tras la realización de la recirculación normotérmica. En este trabajo, también ha evaluado durante la RN el efecto de la L-arginina, un precursor de la síntesis del óxido nítrico, y se ha visto que la carga energética de esos hígados no aumenta significativamente.(209)

En este trabajo no hemos observado ninguna diferencia significativa en el cambio del estado energético cuando se ha bloqueado la síntesis del óxido nítrico y cuando no se lo ha hecho. Como era lógico de esperar, el grupo donde se administró adenosina previa a la parada cardíaca no ha presentado una disminución en la carga energética tras los 20 minutos de parada cardíaca. Por otro lado, no hemos encontrado en la literatura ningún trabajo que haya podido modificar la carga energética de hígados por medio de cambios en la síntesis del óxido nítrico.

Una de las explicaciones ante este hecho podría ser que el tiempo de isquemia no ha sido suficientemente prolongado como para poder llegar a notar diferencias significativas entre los grupos. Es sabido que a medida que aumenta el tiempo de parada cardíaca se comienzan a degradar el ATP intracelular, como mecanismo compensatorio para mantener la homeostasis celular. Dependiendo del tiempo de duración de la isquemia caliente se comienza a acumular hipoxantina y xantina que están relacionadas con la pérdida de viabilidad del injerto. La xantina produce sus efectos deletéreos durante la reperfusión por medio de la generación de radicales libres de oxígeno a través de la activación de la enzima xantina oxidasa.(70,210) Por otro lado y lo más importante de todo, creemos que el óxido nítrico no está relacionado con la producción de cambios a nivel energético ya que su acción es principalmente la mantención del buen estado de la microcirculación.

6. 7. Evaluación histológica

En el presente estudio hemos realizado la valoración histológica del hígado trasplantado solamente en los animales que sobrevivieron al quinto día ya que nuestro objetivo fue observar que manera los cambios en la concentración del ON en el donante de órganos pueden condicionar la viabilidad del injerto. Los parámetros analizados han demostrado en otros trabajos experimentales ser buenos indicadores del proceso de lesión por isquemia reperfusión.

El grado de infiltración sinusoidal por polimorfonucleares fue mayor en los grupos de estudio donde no se realizó la inhibición del ON. Así mismo debemos saber que los animales que son considerados para este análisis en el grupo de L-NAME son solamente los que han sobrevivido y que lógicamente deberían presentar un injerto con buenas características.

En cambio el grupo que ha presentado **mayor presencia de colangitis isquémica ha sido el que recibió adenosina + L-NAME donde el 100 %** de los animales supervivientes al quinto día del trasplante presentaron colangitis isquémica. Este parámetro analizado es de suma importancia, ya que la lesión que se produce en la vía biliar puede llegar a comprometer la viabilidad del injerto. En los restantes grupos no existieron diferencias, haciendo mención que en el grupo tratado con espermina NONOato ningún cerdo de los 9 supervivientes han presentado colangitis isquémica, mientras que en el grupo de RN y el de RN y L-NAME un 20 % de los cerdos supervivientes presentaron dicho parámetro.

Así mismo otros marcadores característicos de lesión hepática por isquemia reperfusión lo son el grado de desestructuración hepatocitaria y la necrosis centrolobulillar que también fueron analizados. No se encontraron

diferencias significativas entre los diferentes grupos, excepto que ambos parámetros estuvieron presentes en mayor proporción en los hígados de receptores de injertos donde se administro espermina NONOato en el donante. Posiblemente este hecho esté en relación con la falta de realización de RN.

El área media de necrosis fue del 6 % aproximadamente en los grupos donde se realizó RN y el los animales donde se administró adenosina. El grupo de esperminanonato ha presentado un porcentaje de área media de necrosis superior al 15%. Esto quizás demuestra que si bien el ON mejora notablemente la supervivencia de los animales trasplantados con donantes a corazón parado en los cuales no se ha realizado RN, desde el punto de vista histológico el hígado presenta lesiones que pueden llegar a comprometer la viabilidad del injerto a largo plazo.

Con anterioridad a este trabajo se pudo demostrar que los parámetros evaluados anteriormente presentan cambios importantes cuando el tiempo de parada cardíaca se extiende mas allá de los 30 minutos y el uso de L-arginina, como precursor de la síntesis del oxido nítrico puede mejorar la viabilidad de los órganos.(131) Diferentes autores también han demostrado que la administración de L-arginina tras períodos prolongados de isquemia caliente (mas de 60 minutos), produce un beneficio en los hígados que se puede evaluar por medio de la mejoría histológica en las biopsias realizadas.(132,198)

Resumen: Analizando en conjunto todos los datos obtenidos por la microscopía óptica es muy difícil llegar a una conclusión en relación a la importancia del ON durante la obtención de hígados de donantes a corazón parado y utilización de recirculación normotérmica. Posiblemente el corto tiempo de isquemia caliente sea el responsable que los cambios no sean tan evidentes y que el número de animales supervivientes en algunos grupos no permita valorar fehacientemente las diferencias existente entre ellos.

6. 8. Importancia de los resultados y aplicabilidad clínica

Realizando un análisis global de todos los resultados obtenidos podemos decir que durante la realización de la RN, el óxido nítrico cumple un papel importante en la manutención del estado de la microcirculación hepática y que la interferencia en su producción lleva a que exista una disminución en el aporte de oxígeno al hígado, hecho que inevitablemente llevará a daño tisular. Este hecho lo hemos visto claramente en los cambios que se producen en el flujo hepático y el cambio que produce en el metabolismo hepático del oxígeno. En relación con el daño que existe a nivel de la microcirculación hepática, desde el punto de vista bioquímico se ha podido ver que las células que mayor daño han presentado son las células endoteliales. Por otro lado a pesar que los hepatocitos sufren de igual manera durante todo este proceso, cuando se utiliza L-NAME el daño hepatocelular producido es importante y la recuperación al quinto día no es total.

Conociendo la importancia del ON durante la obtención de hígados de donantes a corazón parado, se podría plantear la posibilidad del uso clínico durante la recirculación normotérmica de diferentes sustancias capaces de aumentar la síntesis de ON y poder así mejorar la viabilidad de los órganos.

CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

Durante la obtención del injerto de donantes a corazón parado, la recirculación normotérmica actúa de forma beneficiosa:

- 1- A través de la activación de la adenosina que determina un aumento de ON.**
- 2- Este aumento del ON, produce un efecto protector del lecho microvascular.**
- 3- Que se traduce en una menor lesión tanto a nivel endotelial y como hepatocelular.**

El mecanismo de acción, es más complejo de lo que conocemos, puesto que la aportación exógena de óxido nítrico no se traduce en el efecto protector de la RN.

BIBLIOGRAFÍA

8. BIBLIOGRAGFÍA

1. Kuss R., Bourget P. El hígado, el páncreas y el intestino. En Una historia ilustrada del trasplante de órganos. La gran aventura del siglo. Laboratoires Sandoz, Rueil-Malmaison 2000;76-103.
2. Gómez R., Moreno E. Breve recuerdo histórico del desarrollo del trasplante de órganos. En presente y futuro del trasplante de órganos abdominales. Moreno-Gonzalez E., Gómez-Sanz R. Jarpio Editores. Madrid 1997;1-4.
3. <http://www.msc.es/ont/esp/home.htm> 2000;
4. <http://www.tpm.org/Registry/RTPM.htm> 2001;
5. Grande L, Matus D, Rimola A, Manyalic M, Cabrer C, Garcia-Valdecasas JC, Visa J. Expanded liver donor age over 60 years for hepatic transplantation. Clin Transpl 1998;297-301.
6. Grande L, Matus D, Manyalic M, Cabrer C, Rodriguez-Montalvo C, Rimola A, Navasa M, Garcia-Valdecasas JC, Visa J. Effect of donor age on graft outcome after liver transplantation. Transplant Proc 1999;31(6):2482-3.
7. Thomas M. Fisbein and Charles M. Miller. Expanding the pool of donor livers. Current Opinion in Organ Transplantation 1996;1:76-81.
8. Alexander JW, Zola JC. Expanding the donor pool: use of marginal donors for solid organ transplantation. Clin Transplant 1996;10(1 Pt 1):1-19.

9. Jacobbi LM, McBride VA, Etheredge EE, McDonald JC, Cooper ES, Frey D, Boudreaux JP, Gonzalez F, Van Meter C, McMillan R. The risks, benefits, and costs of expanding donor criteria. A collaborative prospective three-year study. *Transplantation* 1995;60(12):1491-6.
10. Melendez HV, Heaton ND. Understanding "marginal" liver grafts. *Transplantation* 1999;68(4):469-71.
11. Selzner M, Clavien PA. Fatty liver in liver transplantation and surgery. *Semin Liver Dis* 2001;21(1):105-13.
12. D'alessandro AM, Kalayoglu M, Sollinger HW, Hoffmann RM, Reed A, Knechtle SJ, Pirsch JD, Hafez GR, Lorentzen D, Belzer FO. The predictive value of donor liver biopsies for the development of primary nonfunction after orthotopic liver transplantation. *Transplantation* 1991;51(1):157-63.
13. Azoulay D, Astarcioglu I, Bismuth H, Castaing D, Majno P, Adam R, Johann M. Split-liver transplantation. The Paul Brousse policy. *Ann Surg* 1996;224(6):737-46.
14. Busuttil RW, Goss JA. Split liver transplantation. *Ann Surg* 1999;229(3):313-21.
15. Sauer IM, Pascher A, Steinmuller T, Settmacher U, Muller AR, Bechstein WO, Neuhaus P. Split liver and living donation liver transplantation: the Berlin experience. *Transplant Proc* 2001;33(1-2):1459-2.
16. Bismuth H HD. Reduced-sized orthotopic liver graft in hepatic transplantation in children. *Surgery* 1984;95((3)):367-70.

17. Raia S, Nery JR, Mies S. Liver transplantation from live donors. *Lancet* 1989;2(8661):497
18. Yamaoka Y, Washida M, Honda K, Tanaka K, Mori K, Shimahara Y, Okamoto S, Ueda M, Hayashi M, Tanaka A. Liver transplantation using a right lobe graft from a living related donor. *Transplantation* 1994;57(7):1127-30.
19. Marcos A, Fisher RA, Ham JM, Shiffman ML, Sanyal AJ, Luketic VA, Sterling RK, Posner MP. Right lobe living donor liver transplantation. *Transplantation* 1999;68(6):798-803.
20. Beecher H, Raymond D, Clifford Barger A, William J. Curran. Definition of irreversible coma: report of the Ad Hoc Committee of the Harvard Medical School to Examine the definitions of Brain Death. *JAMA* 1968;205:337-8.
21. Light JA, Barhyte DY, Gage FA, Sasaki TM, Aquino AO. Long-term graft survival after transplantation with kidneys from uncontrolled nonheartbeating donors. *Transplantation* 1999;68(12):1910-1.
22. Shiroki R, Hoshinaga K, Horiba M, Izumitani M, Tsukiashi Y, Yanaoka M, Naide Y, Kanno T. Favorable prognosis of kidney allografts from unconditioned cadaveric donors whose procurement was initiated after cardiac arrest. *Transplant Proc* 1997;29(1-2):1388-2.
23. Cho YW, Terasaki PI, Cecka JM. High kidney graft survival rates using non-heart-beating trauma donors. *Transplant Proc* 1995;30(7):3795-6.
24. Orloff MS, Reed AI, Erturk E, Kruk RA, Paprocki SA, Cimbalo SC, Cerilli GJ. Nonheartbeating cadaveric organ donation. *Ann Surg* 1994;220(4):578-83.

25. Hattori R, Ohshima S, Ono Y, Fujita T, Kinukawa T, Matsuura O. Long-term outcome of kidney transplants from non-heart-beating donors: multivariate analysis of factors affecting graft survival. *Transplant Proc* 1999;31(7):2847-50.
26. D'alessandro AM, Hoffmann RM, Knechtle SJ, Odorico JS, Becker YT, Musat A, Pirsch JD, Sollinger HW, Kalayoglu M. Liver transplantation from controlled non-heart-beating donors. *Surgery* 2000;128(4):579-88.
27. Casavilla A, Ramirez C, Shapiro R, Nghiem D, Miracle K, Bronsther O, Randhawa P, Broznick B, Fung JJ, Starzl T. Experience with liver and kidney allografts from non-heart-beating donors. *Transplantation* 1995;59(2):197-203.
28. D'alessandro AM, Hoffmann RM, Knechtle SJ, Eckhoff DE, Love RB, Kalayoglu M, Sollinger HW, Belzer FO. Successful extrarenal transplantation from non-heart-beating donors. *Transplantation* 1995;59(7):977-82.
29. Reich DJ, Munoz SJ, Rothstein KD, Nathan HM, Edwards JM, Hasz RD, Manzarbeitia CY. Controlled non-heart-beating donor liver transplantation: a successful single center experience, with topic update. *Transplantation* 2000;70(8):1159-66.
30. Alvarez J, del Barrio R, Arias J, Ruiz F, Iglesias J, de Elias R, Yebenes C, Matesanz J, Caniego C, Elvira J. Non-heart-beating donors from the streets: an increasing donor pool source. *Transplantation* 2000;70(2):314-7.
31. Kootstra G, Daemen JH, Oomen AP. Categories of non-heart-beating donors. *Transplant Proc* 1995;27(5):2893-4.

32. Totsuka E, Fung JJ, Hakamada K, Narumi S, Sasaki M. Experience of orthotopic liver transplantation from non-heart-beating donors at the University of Pittsburgh Medical Center. (Abstract). *Nippon.Geka.Gakkai.Zasshi*. 1999;100(12):818-21.
33. Fung JJ. Use of non-heart-beating donors. *Transplant Proc* 2000;32(7):1510-1.
34. Gomez M, Garcia-Buitron JM, Fernandez-Garcia A, Vilela D, Fernandez-Selles C, Corbal R, Fraguera J, Suarez F, Otero A, Alvarez J, et al. Liver transplantation with organs from non-heart-beating donors. *Transplant Proc* 1997;29(8):3478-9.
35. Memon MA, Solomon H. Non-heart-beating liver donors: towards increasing the liver supply [editorial]. *Liver* 2000;20(1):1-2.
36. Clavien PA, Harvey PR, Strasberg SM. Preservation and reperfusion injuries in liver allografts. An overview and synthesis of current studies. *Transplantation* 1992;53(5):957-78.
37. Tojimbara T, Kennedy RG, Burns W, Hayashi M, Krams S, Martinez O, So S, Esquivel CO. The use of non-heart-beating cadaver donors in experimental liver transplantation. *Transplantation* 1995;60(10):1179-80.
38. Quan D, Wall WJ. The safety of continuous hepatic inflow occlusion during major liver resection. *Liver Transpl Surg* 1996;2(2):99-104.
39. Huguet C, Gavelli A, Chieco PA, Bona S, Harb J, Joseph JM, Jobard J, Gramaglia M, Lasserre M. Liver ischemia for hepatic resection: where is the limit? *Surgery* 1992;111(3):251-9.

40. Huguet C, Gavelli A, Bona S. Hepatic resection with ischemia of the liver exceeding one hour. *J Am Coll Surg* 1994;178(5):454-8.
41. Schon MR, Hunt CJ, Pegg DE, Wight DG. The possibility of resuscitating livers after warm ischemic injury. *Transplantation* 1993;56(1):24-31.
42. Richter S, Yamauchi J, Minor T, Vollmar B, Menger MD. Effect of warm ischemia time and organ perfusion technique on liver microvascular preservation in a non-heart-beating rat model. *Transplantation* 2000;Jan.15. 69(1):20-4.
43. Lopez-Boado MA, Garcia-Valdecasas JC, Ordi J, Tabet J, Net M, Cifuentes A, Rull R, Gonzalez FX, Valero R, Deulofeu R, et al. Histological changes during and after liver transplantation from non-heart-beating donor pig. *Transplant Proc* 1997;29(8):3471
44. Takada Y, Taniguchi H, Fukunaga K, Yuzawa K, Otsuka M, Todoroki T, Iijima T, Fukao K. Hepatic allograft procurement from non-heart-beating donors: limits of warm ischemia in porcine liver transplantation. *Transplantation* 1997;63(3):369-73.
45. Takada Y, Fukunaga K, Gu M, Ishiguro S, Taniguchi H, Seino K, Yuzawa K, Otsuka M, Fukao K. Improvement of allograft viability with organs procured from non-heart-beating donors in porcine liver transplantation. *Transplant Proc* 2000;32(2):277-8.
46. Takada Y, Taniguchi H, Fukunaga K, Yuzawa K, Otsuka M, Todoroki T, Iijima T, Fukao K. Prolonged hepatic warm ischemia in non-heart-beating donors: protective effects of FK506 and a platelet activating factor antagonist in porcine liver transplantation. *Surgery* 1998;123(6):692-8.

47. Yanaga K, KSITPLDASTE. Procurement of liver allografts from non-heart beating donors. *Transplant Proc* 2000;22(1):275-8.
48. Hong HQ, Yin HR, Zhu SL, Lin YT. The results of transplant livers from selected non-heart-beating cadaver donors. (Abstrac). *Hiroshima J Med Sci* 1991;40(3):87-91.
49. Rapaport FT, Anaise D. Technical aspects of organ procurement from the non-heart-beating cadaver donor for clinical transplantation. *Transplant Proc* 1993;25(1 Pt 2):1507-8.
50. Garcia-Rinaldi R, Lefrak EA, Defore WW, Feldman L, Noon GP, Jachimczyk JA, DeBakey ME. In situ preservation of cadaver kidneys for transplantation: laboratory observations and clinical application. *Ann Surg* 1975;182(5):576-84.
51. Anaise D, Yland MJ, Waltzer WC, Frischer Z, Rapaport FT. A new perfusion tube for multiple organ procurement. *Transplant Proc* 1987 Oct;19(5):4129-36 1987;19(5):4129-36.
52. Booster MH, Wijnen RM, Vroemen JP, van Hooff JP, Kootstra G. In situ preservation of kidneys from non-heart-beating donors--a proposal for a standardized protocol. *Transplantation* 1993;56(3):613-7.
53. Anaise D, Yland MJ, Waltzer WC, Frischer Z, Hurley S, Eychmuller S, Rapaport FT. Flush pressure requirements for optimal cadaveric donor kidney preservation. *Transplant Proc* 1988;20(5):891-4.
54. Paprocki S, Kruk R, Erturk E, Cerilli J. A technique for successful transplantation of organs from non-heartbeating cadaver donors. *Transplantation* 1992;54(2):381-3.

55. Fujita T, Matsui M, Yanaoka M, Shinoda M, Naide Y. Clinical application of in situ renal cooling: experience with 61 cardiac-arrest donors. *Transplant Proc* 1989;21(1 Pt 2):1215-7.
56. Booster MH, Wijnen RM, Yin M, Tiebosch AT, Heineman E, Maessen JG, Buurman WA, Kurvers HA, Stubenitsky BM, Bonke H. Enhanced resistance to the effects of normothermic ischemia in kidneys using pulsatile machine perfusion. *Transplant Proc* 1993;25(6):3006-11.
57. Booster MH, Wijnen RM, Ming Y, Vroemen JP, Kootstra G. In situ perfusion of kidneys from non-heart-beating donors: the Maastricht protocol. *Transplant Proc* 1993;25(1 Pt 2):1503-4.
58. Valero R, Manyalich M, Cabrer C, Salvador L, Garcia-Fages LC. Organ procurement from non-heart-beating donors by total body cooling. *Transplant Proc* 1993;25(6):3091-2.
59. Hoshino T, Maley WR, Labs JD, Clemens MG, Burdick JF, Williams GM. Core cooling technique is superior to flush techniques for liver procurement. *Transplant Proc* 1989;21(3):3517-8.
60. Watanabe T, Koyama I, Taguchi Y, Ogawa N, Omoto R. Salvage of warm ischemic pancreas from non-heart-beating donors by a core-cooling method with cardiopulmonary bypass. *Transplant Proc* 1992;24(4):1331-2.
61. Koyama I, Taguchi Y, Watanabe T, Nagashima N, Otsuka K, Omoto R. Development of a reliable method for procurement of warm ischemic kidneys from non-heart-beating donors. *Transplant Proc* 1992;24(4):1327-8.
62. González-Segura C. López-Navidad A, Kulieusky J, Caballero F, editors. *El donante de órganos y tejidos. Evaluación y manejo*. Barcelona:

Springer; 1994; 38, Donantes de órganos a corazón parado. p. 497-507.

63. Hoshino T, Koyama I, Nagashima N, Kadokura M, Kazui M, Omoto R. Liver transplantation from non-heart-beating donors by core cooling technique. *Transplant Proc* 1989;21(1 Pt 2):1206-8.
64. Adachi H, Ueda K, Koyama I, Hoshino T, Omoto R, Fraser CD, Kontos GJ, Baumgartner WA, Reitz BA. Donor core cooling for multiple organ retrieval: new application of portable cardiopulmonary bypass for transplantation. *Transplant Proc* 1989;21(1 Pt 2):1200-2.
65. 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 Mar;47(3):409-14 1989;47(3):409-14.
66. Gaber AO, Yang HC, Haag BW, Buckingham FC, Lloyd DM, Thistlethwaite JR, Jr., Stuart FP. Intermediate normothermic hemoperfusion doubles safe cold preservation of rat kidneys. *Transplant Proc* 1987;19(1 Pt 2):1369-71.
67. Hoshino T., Koyama I, Taguchi Y, Kazui M, Neya K, Omoto R. A new method for safe liver transplantation from non heart beating donors. In: In situ liver oxigenation by cardiopulmonar by pass procceding of World Congress of Transplantation Society.Kyoto.Japan. 1994;280
68. Tojimbara T, Wicomb WN, Garcia-Kennedy R, Burns W, Hayashi M, Collins G, Esquivel CO. Liver transplantation from non-heart beating donors in rats: influence of viscosity and temperature of

initial flushing solutions on graft function. *Liver Transpl Surg* 1997;3(1):39-45.

69. Valero R, Cabrer C, Oppenheimer F, Trias E, Sanchez-Ibanez J, De Cabo FM, Navarro A, Paredes D, Alcaraz A, Gutierrez R, et al. Normothermic recirculation reduces primary graft dysfunction of kidneys obtained from non-heart-beating donors. *Transpl Int* 2000;13(4):303-10.
70. Harvey PR, Iu S, McKeown CM, Petrunka CN, Ilson RG, Strasberg SM. Adenine nucleotide tissue concentrations and liver allograft viability after cold preservation and warm ischemia. *Transplantation* 1988;45(6):1016-20.
71. Kim SK, Belzer FO, Southard JH. Loss of mitochondrial respiratory function and its suppression during cold ischemic preservation of rat livers with University of Wisconsin solution. *Hepatology* 1992 1992;16(3):742-8.
72. Belzer FO, Southard JH. Principles of solid-organ preservation by cold storage. *Transplantation* 1988;45(4):673-6.
73. Kurokawa T, Nonami T, Harada A, Nakao A, Takagi H. Mechanism and prevention of ischemia-reperfusion injury of the liver. *Semin Surg Oncol.* 1996;12(3):179-82.
74. Dhar DK, Yamanoi A, Ohmori H, Nakashima Y, Yamamoto A, Osama NE, Kubota H, Kohno H, Nagasue N. Modulation of endothelin and nitric oxide: a rational approach to improve canine hepatic microcirculation. *Hepatology* 1998;28(3):782-8.

75. Pannen BH, Al-Adili F, Bauer M, Clemens MG, Geiger KK. Role of endothelins and nitric oxide in hepatic reperfusion injury in the rat. *Hepatology* 1998;27(3):755-64.
76. Vollmar B, Glasz J, Leiderer R, Post S, Menger MD. Hepatic microcirculatory perfusion failure is a determinant of liver dysfunction in warm ischemia-reperfusion. *Am J Pathol.* 1994;145(6):1421-31.
77. Arii S, Imamura M. Liver transplantation and hepatic sinusoidal cells. *J Gastroenterol Hepatol* 1995;10 Suppl 1:S92-S96
78. Clavien PA. Sinusoidal endothelial cell injury during hepatic preservation and reperfusion. *Hepatology* 1998;28(2):281-5.
79. Lichtman SN, Lemasters JJ. Role of cytokines and cytokine-producing cells in reperfusion injury to the liver. *Semin Liver Dis* 1999;19(2):171-87.
80. Menger MD, Richter S, Yamauchi J, Vollmar B. Role of microcirculation in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Hepatogastroenterology* 1999;46 Suppl 2:1452-7.
81. Lemasters JJ, Thurman RG. Reperfusion injury after liver preservation for transplantation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1997;37:327-38.
82. Lemasters JJ, Bunzendahl H, Thurman RG. Reperfusion injury to donor livers stored for transplantation. *Liver Transpl Surg* 1995;1(2):124-38.
83. McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *New England Journal of Medicine* 1985;312(3):159-63.

84. Halliwell B, Gutteridge JM. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* 1984;219(1):1-14.
85. Arthur MJ, Bentley IS, Tanner AR, Saunders PK, Millward-Sadler GH, Wright R. Oxygen-derived free radicals promote hepatic injury in the rat. *Gastroenterology* 1985;89(5):1114-22.
86. Parks DA, Granger DN. Ischemia-induced vascular changes: role of xanthine oxidase and hydroxyl radicals. *Am J Physiol* 1983;245(2):G285-9.
87. Engerson TD, McKelvey TG, Rhyne DB, Boggio EB, Snyder SJ, Jones HP. Conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemic rat tissues. *J Clin Invest* 1987;79(6):1564-70.
88. Risby TH, Maley W, Scott RP, Bulkley GB, Kazui M, Sehnert SS, Schwarz KB, Potter J, Mezey E, Klein AS. Evidence for free radical-mediated lipid peroxidation at reperfusion of human orthotopic liver transplants. *Surgery* 1994;115(1):94-101.
89. Richard VJ, Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Oxygen-derived free radicals and postischemic myocardial reperfusion: therapeutic implications. *Fundam Clin Pharmacol* 1990;4(1):85-103.
90. Scales WE, Campbell DAI, Green ME, Remick DG. Hepatic ischemia/reperfusion injury: importance of oxidant/tumor necrosis factor interactions. *Am J Physiol* 1994;267(6 Pt 1):G1122-7.
91. Ramirez P, Marín J.M. PARC-CyPP. Investigación experimental aplicada a la clínica: isquemia-reperfusión hepática. *Cir Esp* 2000;67(3):281-91.

92. Vollmar B, Richter S, Menger MD. Liver ischemia/reperfusion induces an increase of microvascular leukocyte flux, but not heterogeneity of leukocyte trafficking. *Liver* 1997 Apr;17(2):93-8 1997;17(2):93-8.
93. Sawaya DEJ, Zibari GB, Minardi A, Bilton B, Burney D, Granger DN, McDonald JC, Brown M. P-selectin contributes to the initial recruitment of rolling and adherent leukocytes in hepatic venules after ischemia/reperfusion. *Shock* 1999;12(3):227-32.
94. Yadav SS, Howell DN, Steeber DA, Harland RC, Tedder TF, Clavien PA. P-Selectin mediates reperfusion injury through neutrophil and platelet sequestration in the warm ischemic mouse liver. *Hepatology* 1999;29(5):1494-502.
95. Sindram D, Kohli V, Madden JF, Clavien PA. Calpain inhibition prevents sinusoidal endothelial cell apoptosis in the cold ischemic rat liver. *Transplantation* 1999;68(1):136-40.
96. Sindram D, Porte RJ, Hoffman MR, Bentley RC, Clavien PA. Platelets induce sinusoidal endothelial cell apoptosis upon reperfusion of the cold ischemic rat liver. *Gastroenterology* 2000;118(1):183-91.
97. Imamura H, Sutto F, Brault A, Huet PM. Role of Kupffer cells in cold ischemia/reperfusion injury of rat liver [see comments]. *Gastroenterology* 1995;109(1):189-97.
98. Wanner GA, Ertel W, Muller P, Hofer Y, Leiderer R, Menger MD, Messmer K. Liver ischemia and reperfusion induces a systemic inflammatory response through Kupffer cell activation. *Shock* 1996;5(1):34-40.
99. Ohdan H, Fukuda Y, Asahara T, Miyata Y, Urushihara T, Sumimoto R, Marubayashi S, Dohi K. Modulation of Kupffer cells affects the

metabolism of protease inhibitor administered in cold-preserved liver transplantation. *Transplant Proc* 1997;29(8):3358-9.

100. Akamatsu Y, Ohkohchi N, Doi H, Satomi S. Does elimination of Kupffer cells prolong survival time in liver transplantation? *Transplant Proc* 1999;31(1-2):545-2.
101. von Frankenberg M, Golling M, Mehrabi A, Nentwich H, Thies J, Schaeffer F, Jahnke C, Bud O, Gebhard MM, Otto G, et al. Destruction of Kupffer's cells increases total liver blood flow and decreases ischemia reperfusion injury in pigs. *Transplant Proc* 1999;31(8):3253-4.
102. Colletti LM, Remick DG, Burtch GD, Kunkel SL, Strieter RM, Campbell DAJ. Role of tumor necrosis factor-alpha in the pathophysiologic alterations after hepatic ischemia/reperfusion injury in the rat. *J Clin Invest* 1990;85(6):1936-43.
103. Lentsch AB, Kato A, Yoshidome H, McMasters KM, Edwards MJ. Inflammatory mechanisms and therapeutic strategies for warm hepatic ischemia/reperfusion injury. *Hepatology* 2000;32(2):169-73.
104. Colletti LM, Cortis A, Lukacs N, Kunkel SL, Green M, Strieter RM. 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(3):182-91.
105. Oudar O, Moreau A, Feldmann G, Scoazec JY. Expression and regulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in organotypic cultures of rat liver tissue. *J Hepatol* 1998;29(6):901-9.

106. Koepfel TA, Thies JC, Schemmer P, Trauner M, Gebhard MM, Otto G, Post S. Inhibition of nitric oxide synthesis in ischemia/reperfusion of the rat liver is followed by impairment of hepatic microvascular blood flow. *J Hepatol* 1997;27(1):163-9.
107. Cottart CH, Do L, Blanc MC, Vaubourdolle M, Descamps G, Durand D, Galen FX, Clot JP. Hepatoprotective effect of endogenous nitric oxide during ischemia-reperfusion in the rat. *Hepatology* 1999;29(3):809-13.
108. Isobe M, Katsuramaki T, Hirata K, Kimura H, Nagayama M, Matsuno T. Beneficial effects of inducible nitric oxide synthase inhibitor on reperfusion injury in the pig liver. *Transplantation* 1999;68(6):803-13.
109. Oishi A, Inagaki M, Tanaka N. Correlation between nitric oxide production and preservation injury of sinusoidal endothelial cells during cold ischemia. *Transplant Proc* 1997;29(1-2):1338-9.
110. Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch Biochem Biophys* 1991;288(2):481-7.
111. Masaki T. Possible role of endothelin in endothelial regulation of vascular tone. *Annu.Rev Pharmacol.Toxicol.* 1995;35:235-55.
112. Miyauchi T, Tomobe Y, Shiba R, Ishikawa T, Yanagisawa M, Kimura S, Sugishita Y, Ito I, Goto K, Masaki T. Involvement of endothelin in the regulation of human vascular tonus. Potent vasoconstrictor effect and existence in endothelial cells. *Circulation* 1990;81(6):1874-80.

113. Kawamura E, Yamanaka N, Okamoto E, Tomoda F, Furukawa K. Response of plasma and tissue endothelin-1 to liver ischemia and its implication in ischemia-reperfusion injury. *Hepatology* 1995;21(4):1138-43.
114. Zhang JX, Pegoli WJ, Clemens MG. Endothelin-1 induces direct constriction of hepatic sinusoids. *Am J Physiol* 1994;266(4 Pt 1):G624-G632
115. Bauer M, Zhang JX, Bauer I, Clemens MG. ET-1 induced alterations of hepatic microcirculation: sinusoidal and extrasinusoidal sites of action. *Am J Physiol* 1994;267(1 Pt 1):G143-G149
116. Fukunaga K, Takada Y, Mei G, Taniguchi H, Seino K, Yuzawa K, Otsuka M, Todoroki T, Goto K, Fukao K. An endothelin receptor antagonist ameliorates injuries of sinusoid lining cells in porcine liver transplantation. *Am J Surg* 1999;178(1):64-8.
117. Jin MB, Zhu Y, Zhang S, Ishizaki N, Tanaka H, Subbotin VM, Lee RG, Starzl TE, Todo S. Attenuation of ischemic liver injury by a non-selective endothelin receptor antagonist. *Transplant Proc* 1997;29(1-2):1335
118. Camargo CAJ, Madden JF, Gao W, Selvan RS, Clavien PA. Interleukin-6 protects liver against warm ischemia/reperfusion injury and promotes hepatocyte proliferation in the rodent. *Hepatology* 1997;26(6):1513-20.
119. Suzuki S, Toledo-Pereyra LH. Interleukin 1 and tumor necrosis factor production as the initial stimulants of liver ischemia and reperfusion injury. *J Surg Res* 1994;57(2):253-8.

120. Lentsch AB, Yoshidome H, Kato A, Warner RL, Cheadle WG, Ward PA, Edwards MJ. Requirement for interleukin-12 in the pathogenesis of warm hepatic ischemia/reperfusion injury in mice. *Hepatology* 1999;30(6):1448-53.
121. Shito M, Wakabayashi G, Ueda M, Shimazu M, Shirasugi N, Endo M, Mukai M, Kitajima M. Interleukin 1 receptor blockade reduces tumor necrosis factor production, tissue injury, and mortality after hepatic ischemia-reperfusion in the rat. *Transplantation* 1997;63(1):143-8.
122. Editorial. Metal chelation therapy, oxygen radicals, and human disease. *Lancet* 1985 Jan 19;1(8421):143-5 1985;1(8421):143-5.
123. Thurman RG BHLJJ. Role of sinusoidal lining cells in hepatic reperfusion injury following cold storage and transplantation. *Semin Liver Dis* 1993;13((1)):93-100.
124. Tsutsumi R, Azuma T, Miyamoto S, Hou Z, Ohkubo H, Yuzawa H, Kamohara Y, Okudaira S, Mizoe A, Fujioka H, et al. Main injury site of liver grafts from non-heart-beating donors in pigs. *Transplant Proc* 2000;32(7):2348
125. Garcia-Valdecasas JC, Tabet J, Valero R, Taura P, Rull R, Garcia F, Montserrat E, Gonzalez FX, Ordi J, Beltran J, et al. Liver conditioning after cardiac arrest: the use of normothermic recirculation in an experimental animal model. *Transpl Int* 1998;11(6):424-32.
126. Tabet J, Garcia-Valdecasas JC, Rull R, Valero R, Angas J, Gonzalez FX, Cifuentes A, Garcia F, Beltran J, Ordi J, et al. Non-heart-beating

donor pigs: the feasibility of liver donation. *Transplant Proc* 1997;29(1-2):1374-5.

127. Garcia-Valdecasas JC, Tabet J, Valero R, Deulofeu R, Taura P, Rull R, Capdevila L, Cifuentes A, Gonzalez FX, Net M, et al. Evaluation of ischemic injury during liver procurement from non-heart-beating donors. *Eur Surg Res* 1999;31(6):447-56.
128. Tabet J, Garcia-Valdecasas JC, Net M, Cifuentes A, Gonzalez FX, Valero R, Deulofeu R, Rimola A, Garcia F, Visa J. Evaluation of ischemic liver injury during graft procurement from non-heart-beating donor pigs. *Transplant Proc* 1997;29(8):3482-3.
129. Valero R, Garcia-Valdecasas JC, Tabet J, Taura P, Rull R, Beltran J, Garcia F, Gonzalez FX, Lopez-Boado MA, Cabrer C, et al. Hepatic blood flow and oxygen extraction ratio during normothermic recirculation and total body cooling as viability predictors in non-heart-beating donor pigs. *Transplantation* 1998;66(2):170-6.
130. Lopez-Boado MA, Ordi J, Garcia-Valdecasas JC, Cifuentes A, Gonzalez FX, Net M, Valero R, Beltran J, Palacin J, Grande L et al. L-arginine during liver procurement from non-heart-beating donor pigs: histological evaluation. *Feb-Mar 1999, 31(1-2) p1069 2000;*
131. Valero R, Garcia-Valdecasas JC, Net M, Beltran J, Ordi J, Gonzalez FX, Lopez-Boado MA, Almenara R, Taura P, Elena M, et al. L-arginine reduces liver and biliary tract damage after liver transplantation from non-heart-beating donor pigs. *Transplantation* 2000;70(5):730-7.
132. Calabrese F, Valente M, Pettenazzo E, Ferraresso M, Burra P, Cadrobbi R, Cardin R, Bacelle L, Parnigotto A, Rigotti P. The protective effects of

L-arginine after liver ischaemia/reperfusion injury in a pig model. *J Pathol.* 1997;183(4):477-85.

133. Schemmer P, Bradford BU, Rose ML, Bunzendahl H, Raleigh JA, Lemasters JJ, Thurman RG. Intravenous glycine improves survival in rat liver transplantation. *Am J Physiol* 1999;276(4 Pt 1):G924-G932

134. Barros-Schelotto, P., Net, M., Valero, R., Ruiz, A., Almenara, R., Capdevila, L., Sugrañes, G., Suarez-Crivaró, F., Lopez-Boado MA, Pellegrino, A., Delofeu, R., Miquel, R., Taura, P., Manyalic, M., and Garcia-Valdecasas, J. C. Reduced reperfusion injury by glycine in a porcine liver transplantation model with non-heart-beating-donors. En prensa. (GENERIC)

Ref Type: Generic

135. Net M, Garcia-Valdecasas JC, Deulofeu R, Gonzalez X, Palacin J, Almenara R, Valero R, Lopez-Boado M, Angas J, Elena M et al. S-adenosyl L-methionine effect on hepatic allografts procured from non-heart-beating donor pigs. *Transplant Proc (United States)*, Feb-Mar 1999, 31(1-2) p1063-4 2000;

136. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986 Nov;74(5):1124-36 1986;74(5):1124-36.

137. Lloris-Carsi JM, Cejalvo D, Toledo-Pereyra LH, Calvo MA, Suzuki S. Preconditioning: effect upon lesion modulation in warm liver ischemia. *Transplant Proc* 1993;25(6):3303-4.

138. Yin DP, Sankary HN, Chong AS, Ma LL, Shen J, Foster P, Williams JW. Protective effect of ischemic preconditioning on liver preservation-reperfusion injury in rats. *Transplantation* 1998;66(2):152-7.
139. Zapletal C, Maksan SM, Lehmann T, Guenther L, Fallsehr C, Mehrabi A, Weiss G, Golling M, Gebhard MM, Herfarth C, et al. Ischemic preconditioning improves liver microcirculation after ischemia/reperfusion. *Transplant Proc* 1999;31(8):3260-2.
140. Peralta C, Hotter G, Closa D, Gelpi E, Bulbena O, Rosello-Catafau J. Protective effect of preconditioning on the injury associated to hepatic ischemia-reperfusion in the rat: role of nitric oxide and adenosine. *Hepatology* 1997;25(4):934-7.
141. Peralta C, Hotter G, Closa D, Prats N, Xaus C, Gelpi E, Rosello-Catafau J. The protective role of adenosine in inducing nitric oxide synthesis in rat liver ischemia preconditioning is mediated by activation of adenosine A2 receptors. *Hepatology* 1999;29(1):126-32.
142. Minor T, Akbar S, Yamamoto Y. Adenosine A2 receptor stimulation protects the predamaged liver from cold preservation through activation of cyclic adenosine monophosphate-protein kinase A pathway. *Liver Transpl* 2000;6(2):196-200.
143. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987;327(6122):524-6.
144. Gundersen Y, Saetre T, Scholz T, Hovig T, Lilleaasen P, Aasen AO. Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase maintains haemodynamic stability without untoward consequences for hepatic function or morphology. *Eur J Surg* 1999;165(12):1167-74.

145. Maher JJ FSL. Parenchymal and nonparenchymal cell interactions in the liver. *Semin Liver Dis.*1993 Feb 2000;12(1):13-20.
146. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993;329(27):2002-12.
147. Nathan C, Xie QW. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell* 1994;78(6):915-8.
148. Vane JR, Anggard EE, Botting RM. Regulatory functions of the vascular endothelium. *New England Journal of Medicine* 1990;323(1):27-36.
149. Joly GA, Ayres M, Chelly F, Kilbourn RG. Effects of NG-methyl-L-arginine, NG-nitro-L-arginine, and aminoguanidine on constitutive and inducible nitric oxide synthase in rat aorta. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;199(1):147-54.
150. Anggard E. Nitric oxide: mediator, murderer, and medicine. *Lancet* 1994;343(8907):1199-206.
151. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 1996 Nov;271(5 Pt 1):C1424-37 1996;271(5 Pt 1):C1424-37.
152. Horie Y, Wolf R, Granger DN. Role of nitric oxide in gut ischemia-reperfusion-induced hepatic microvascular dysfunction. *Am J Physiol* 1997;273(5 Pt 1):G1007-G1013
153. Koken T, Inal M. The effect of nitric oxide on ischemia-reperfusion injury in rat liver. *Clin Chim.Acta* 1999;288(1-2):55-62.

154. Uhlmann D, Scommotau S, Witzigmann H, Spiegel HU. Exogenous L-arginine protects liver microcirculation from ischemia reperfusion injury. *Eur Surg Res* 1998;30(3):175-84.
155. Shiraishi M, Hiroyasu S, Nagahama M, Miyaguni T, Higa T, Tomori H, Okuhama Y, Kusano T, Muto Y. Role of exogenous L-arginine in hepatic ischemia-reperfusion injury. *J Surg Res* 1997;69(2):429-34.
156. Roth E. The impact of L-arginine-nitric oxide metabolism on ischemia/reperfusion injury. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 1998;1(1):97-9.
157. Nilsson B, Yoshida T, Delbro D, Andius S, Friman S. Pretreatment with L-arginine reduces ischemia/reperfusion injury of the liver. *Transplant Proc* 1997;29(7):3111-2.
158. Calne RY, Yoffa DE, White HJ, Maginn RR. A technique of orthotopic liver transplantation in the pig. *Br J Surg* 1968;55(3):203-6.
159. Balén E.M., Sáez MJ, Cienfuegos JA, Zazpe CM, Ferrer JV, Herrera J, Lera JM. Anatomía del cerdo aplicada a la experimentación en cirugía general. *Cir Esp* 2000;67(586):593
160. Camprodon R, Solsona J, Guerrero JA, Mendoza CG, Segura J, Fabregat JM. Intrahepatic vascular division in the pig: basis for partial hepatectomies. *Arch Surg* 1977;112(1k0):38-40.
161. Mulder TP, Court DA, Peters WH. Variability of glutathione S-transferase alpha in human liver and plasma. *Clin Chem* 1999;45(3):355-9.
162. Tiainen P, Hockerstedt K, Rosenberg PH. Hepatocellular integrity in liver donors and recipients indicated by glutathione transferase alpha. *Transplantation* 1996;61(6):904-8.

163. Hayes PC, May L, Hayes JD, Harrison DJ. Glutathione S-transferases in human liver cancer. *Gut* 1991 Dec;32(12):1546-9 1991;32(12):1546-9.
164. Engstrom-Laurent A, Loof L, Nyberg A, Schroder T. Increased serum levels of hyaluronate in liver disease. *Hepatology* 1985 Jul-Aug;5(4):638-42 1985;5(4):638-42.
165. Lendoire JC, Duek F, Bianco G, Aziz H, Saul J, Blanco S, Romero MC, Trigo P, Braslavsky G, Inventarza O. Correlation between effluent hyaluronic acid levels and early graft function in orthotopic liver transplantation. *Transplant Proc* 1998;30(6):2889-90.
166. Frebourg T, Delpech B, Bercoff E, Senant J, Bertrand P, Deugnier Y, Bourreille J. Serum hyaluronate in liver diseases: study by enzymoimmunological assay. *Hepatology* 1986 May-Jun;6(3):392-5 1986;6(3):392-5.
167. Fraser JR, Alcorn D, Laurent TC, Robinson AD, Ryan GB. Uptake of circulating hyaluronic acid by the rat liver. Cellular localization in situ. *Cell Tissue Res* 1985;242(3):505-10.
168. Bramley PN, Rathbone BJ, Forbes MA, Cooper EH, Losowsky MS. Serum hyaluronate as a marker of hepatic derangement in acute liver damage. *J Hepatol* 1991;13(1):8-13.
169. Adams DH, Wang L, Neuberger JM. Serum hyaluronic acid following liver transplantation: evidence of hepatic endothelial damage. *Transplant Proc* 1989 Feb;21(1 Pt 2):2274 1989;21(1 Pt 2):2274
170. Cooper EH, Rathbone BJ. Clinical significance of the immunometric measurements of hyaluronic acid. *Ann Clin Biochem* 1990 Sep;27 (Pt 5):444-51 1990;27(Pt 5):444-51.

171. Gomez M, Alvarez J, Arias J, Barrio R, Muguerza J, Balibrea JL, Martin F. Cardiopulmonary bypass and profound hypothermia as a means for obtaining kidney grafts from irreversible cardiac arrest donors: cooling technique. *Transplant Proc* 1993;25(1 Pt 2):1501-2.
172. Kootstra G, Wijnen R, van Hooff JP, van der Linden CJ. Twenty percent more kidneys through a non-heart beating program. *Transplant Proc* 1991;23(1 Pt 2):910-1.
173. Booster MH, Wijnen RM, Vroemen JP, van Hooff JP, Kootstra G. In situ preservation of kidneys from non-heart-beating donors--a proposal for a standardized protocol. *Transplantation* 1993 Sep;56(3):613-7 1993;56(3):613-7.
174. Arai M, Thurman RG, Lemasters JJ. Contribution of adenosine A₂ receptors and cyclic adenosine monophosphate to protective ischemic preconditioning of sinusoidal endothelial cells against Storage/Reperfusion injury in rat livers. *Hepatology* 2000;32(2):297-302.
175. Nakayama H, Yamamoto Y, Kume M, Yamagami K, Yamamoto H, Kimoto S, Ishikawa Y, Ozaki N, Shimahara Y, Yamaoka Y. Pharmacologic stimulation of adenosine A₂ receptor supplants ischemic preconditioning in providing ischemic tolerance in rat livers. *Surgery* 1999;126(5):945-54.
176. Tsukamoto S, Ohkohchi N, Fukumori T, Satomi S. Microcirculatory disturbance is an obstacle to liver transplantation from agonal NHBD. *Transplant Proc* 1999;31(1-2):1091-3.
177. Florquin S, Amraoui Z, Dubois C, Decuyper J, Goldman M. The protective role of endogenously synthesized nitric oxide in staphylococcal

enterotoxin B-induced shock in mice. *J Exp Med* 1994
1994;180(3):1153-8.

178. Zhang H, Rogiers P, Smail N, Cabral A, Preiser JC, Peny MO, Vincent JL. Effects of nitric oxide on blood flow distribution and O₂ extraction capabilities during endotoxic shock. *J Appl Physiol* 1997;83(4):1164-73.
179. Scommotau S, Uhlmann D, Loffler BM, Breu V, Spiegel HU. Involvement of endothelin/nitric oxide balance in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Langenbecks Arch Surg* 1999;384(1):65-70.
180. Hogg N, Kalyanaraman B. Nitric oxide and lipid peroxidation. *Biochim Biophys Acta* 1999;1411(2-3):378-3.
181. Rubbo H, Radi R, Trujillo M, Telleri R, Kalyanaraman B, Barnes S, Kirk M, Freeman BA. Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *J Biol Chem* 1994
1994;269(42):26066-75.
182. Kobayashi H, Nonami T, Kurokawa T, Takeuchi Y, Harada A, Nakao A, Takagi H. Role of endogenous nitric oxide in ischemia-reperfusion injury in rat liver. *J Surg Res* 1995;59(6):772-9.
183. Rhoden EL, Pereira-Lima L, Rhoden CR, Lucas ML, Teloken C, Bello-Klein A. Role of the L-arginine/nitric oxide pathway in renal ischaemia-reperfusion in rats. *Eur J Surg* 2001;167(3):224-8.
184. Meldrum DG, Stephenson LL, Zamboni WA. Effects of L-NAME and L-arginine on ischemia-reperfusion injury in rat skeletal muscle. *Plast Reconstr Surg* 1999;103(3):935-40.

185. Koken T, Inal M. The effect of nitric oxide on ischemia-reperfusion injury in rat liver. *Clin Chim Acta* 1999;288(1-2):55-2.
186. Sakata C, Tanaka H, Takemura S, Hirohashi K, Minamiyama Y, Nakamura A, Inoue M, Kinoshita H. Post-ischemic intraportal adenosine administration protects against reperfusion injury of canine liver. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2000;7(1):78-85.
187. Peralta C, Rull R, Rimola A, Deulofeu R, Rosello-Catafau J, Gelpi E, Rodes J. Endogenous nitric oxide and exogenous nitric oxide supplementation in hepatic ischemia-reperfusion injury in the rat. *Transplantation* 2001;71(4):529-36.
188. Shimamura T, Zhu Y, Zhang S, Jin MB, Ishizaki N, Urakami A, Totsuka E, Kishida A, Lee R, Subbotin V, et al. Protective role of nitric oxide in ischemia and reperfusion injury of the liver. *J Am Coll Surg* 1999;188(1):43-52.
189. Fukuyama S, Kita Y, Hirasawa Y, Azuma T, Sato A, Morokoshi N, Koda S, Yasuda T, Oka S, Sakurai H. A new nitric oxide (NO) releaser: spontaneous NO release from FK409. *Free Radic Res* 1995;23(5):443-52.
190. Shah V, Haddad FG, Garcia-Cardena G, Frangos JA, Mennone A, Groszmann RJ, Sessa WC. Liver sinusoidal endothelial cells are responsible for nitric oxide modulation of resistance in the hepatic sinusoids. *J Clin Invest* 1997;100(11):2923-30.
191. McCuskey RS, Reilly FD. Hepatic microvasculature: dynamic structure and its regulation. *Semin Liver Dis* 1993;13(1):1-12.

192. Lautt WW, Legare DJ, d'Almeida MS. Adenosine as putative regulator of hepatic arterial flow (the buffer response). *Am J Physiol* 1985;248(3 Pt 2):H331-8.
193. Macedo MP, Lautt WW. Potentiation to vasodilators by nitric oxide synthase blockade in superior mesenteric but not hepatic artery. *Am J Physiol* 1997;272(3 Pt 1):G507-14.
194. Saetre T, Gundersen Y, Smiseth OA, Scholz T, Carlsen H, Nordsletten L, Lilleaasen P, Sautner T, Fugger R, Aasen AO. Hepatic oxygen metabolism in porcine endotoxemia: the effect of nitric oxide synthase inhibition. *Am J Physiol* 1998;275(6 Pt 1):G1377-85.
195. Mulder MF, van Lambalgen AA, Huisman E, Visser JJ, van den Bos GC, Thijs LG. Protective role of NO in the regional hemodynamic changes during acute endotoxemia in rats. *Am J Physiol* 1994;266(4 Pt 2):H1558-64.
196. Henderson JM, Gilmore GT, Mackay GJ, Galloway JR, Dodson TF, Kutner MH. Hemodynamics during liver transplantation: the interactions between cardiac output and portal venous and hepatic arterial flows. *Hepatology* 1992;16(3):715-8.
197. Ba ZF, Wang P, Koo DJ, Cioffi WG, Bland KI, Chaudry IH. Alterations in tissue oxygen consumption and extraction after trauma and hemorrhagic shock. *Crit Care Med* 2000;28(8):2837-42.
198. Burra P, Chirizzi L, Cadrobbi R, Calabrese F, Cardin R, Baldan N, Masiero M, Rigotti P. Evaluation of liver function and morphology following ischemia-reperfusion injury in pigs. *Transplant Proc* 1997;29(8):3515-7.

199. Schon MR, Akkoc N, Schrem H, Keech G, Krautlein K, Lemmens HP, Wolf S, Tominaga M, Kollmar O, Neuhaus P. alpha-Glutathione-S-transferase is a sensitive marker of hepatocellular damage due to warm or cold ischemia in pig liver transplantation. *Transplant Proc* 1997;29(7):3036-8.
200. Weitzberg E, Lundberg JO. Nonenzymatic nitric oxide production in humans. *Nitric Oxide* 1998;2(1):1-7.
201. Tanaka S, Kamiike W, Kosaka H, Ito T, Kumura E, Shiga T, Matsuda H. Detection of nitric oxide production and its role in pancreatic ischemia-reperfusion in rats. *Am J Physiol* 1996 Sep;271(3 Pt 1):G405-9 1996;271(3 Pt 1):G405-9.
202. Ohmori H, Dhar DK, Nakashima Y, Hashimoto M, Masumura S, Nagasue N. Beneficial effects of FK409, a novel nitric oxide donor, on reperfusion injury of rat liver. *Transplantation* 1998;66(5):579-85.
203. Hamamoto I, Takaya S, Todo S, Bronsther O, Fujita S, Van Gulik TM, Nakamura K, Irish W, Starzl TE. Can adenine nucleotides predict primary nonfunction of the human liver homograft? *Transpl Int* 1994;7(2):89-95 1994;7(2):89-95.
204. Hickman R, Rose-Innes C, Tyler M, Bracher M, Lotz Z, Fourie J. 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(3):540-5.
205. Takada Y, Fukunaga K, Taniguchi H, Yuzawa K, Otsuka M, Fukao K. Energy metabolism of hepatic allografts subjected to prolonged warm ischemia and pharmacologic modulation with FK506 and

platelet activating factor antagonist. *Transplant Proc* 1998;30(7):3694-5.

206. Palombo JD, Pomposelli JJ, Fechner KD, Blackburn GL, Bistran BR. Enhanced restoration of adenine nucleotides in rat liver following extended preservation in UW solution by provision of adenosine during reperfusion. *Transplantation* 1991;51(4):867-73.
207. Gonzalez FX, Garcia-Valdecasas JC, Lopez-Boado MA, Tabet J, Net M, Grande L, Cifuentes A, Rull R, Valero R, Beltran J, et al. Adenine nucleotide liver tissue concentrations from non-heart-beating donor pigs and organ viability after liver transplantation. *Transplant Proc* 1997;29(8):3480-1.
208. Arias-Diaz J, Alvarez J, Gomez M, del Barrio R, Garcia-Carreras C, Gonzalez P, Balibrea JL. Changes in adenine nucleotides and lipid hydroperoxides during normothermic cardiopulmonary bypass in a porcine model of type II non-heart-beating donor. *Transplant Proc* 1997;29(8):3486-7.
209. Net M, Garcia-Valdecasas JC, Almenara R et al. Precondicionamiento de hígados obtenidos de donantes a corazón parado mediante administración de S-Adenosil-L-Metionina (SAME). En 6 Congreso Societat Catalana de Trasplantament. Barcelñona 21-24 de enero. 2001 2001;
210. Peralta C, Closa D, Xaus C, Gelpi E, Rosello-Catafau J, Hotter G. Hepatic preconditioning in rats is defined by a balance of adenosine and xanthine. *Hepatology* 1998;28(3):768-73.