

18 233

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR.



# **PEROXIDACION LIPÍDICA EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE ISQUEMIA HEPÁTICA CALIENTE**

**TESIS DOCTORAL**

*Memoria que para optar al  
Grado de Doctor presenta:  
D. Rafael Navidad Novalvos*

A handwritten signature in black ink, enclosed within a circular stamp. The signature is stylized and appears to read "Rafael Navidad Novalvos".

*Vº Bº del Director*

A handwritten signature in black ink, appearing to read "José Luis del Castillo-Olivares Ramos".

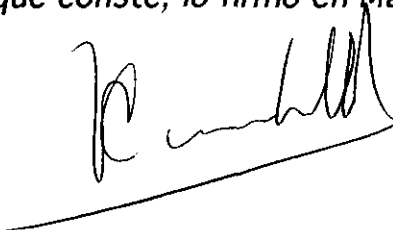
*Fdo. Prof. José Luis del Castillo-Olivares Ramos  
MADRID, 1993.*

*Prof. D. José Luis del Castillo-Olivares Ramos, Catedrático de Cirugía de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid y Jefe del Servicio de Cirugía Experimental de la Clínica Puerta de Hierro.*

**CERTIFICO:**

*D. Rafael Navidad Novalvos, licenciado en Ciencias Biológicas por la Universidad Complutense de Madrid, desde mil novecientos ochenta y siete, ha trabajado, en el Servicio de Cirugía Experimental de la Clínica Puerta de Hierro sobre el tema: "Peroxidación lipídica en un modelo experimental de isquemia hepática caliente" para optar al Grado de Doctor bajo mi dirección y patrocinio.*

*Y para que conste, lo firmo en Madrid.*

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'J. del Castillo-Olivares', written over a horizontal line.

***a mis padres***

## **AGRADECIMIENTOS**

*En primer lugar, deseo darle las gracias al Prof. Castillo-Olivares, Catedrático de Cirugía de la U.A.M., y Jefe de Servicio de Cirugía Experimental por la dirección de este trabajo, y por haberme proporcionado los medios técnicos y humanos suficientes para la realización del mismo.*

*Deseo también expresar mi más sincero agradecimiento al Dr. García Páez al que debo la oportunidad de mi realización como biólogo. Sin su colaboración, continuo estímulo y ejemplo de tenacidad, nunca hubiese sido posible la conclusión de esta Tesis.*

*Al Dr. D. Eduardo Jorge, con el que he compartido trabajo y amistad durante estos años de formación. Gracias por tu tiempo, tus consejos y el apoyo, generosos en todo momento.*

*Al Prof. Vivanco, tutor de esta Tesis, por su cooperación, atención y estímulo.*

*Al Prof. Barja de Quiroga, del Departamento de Fisiología Animal de la Facultad de C.C. Biológicas de la U.C.M., por su inestimable colaboración en el desarrollo metodológico para la valoración de la peroxidación lipídica.*

*Al Dr. Arribas y a la Dra. Iritia del Servicio de Bioquímica del Hospital Príncipe de Asturias de Alcalá de Henares por su colaboración en las determinaciones de parámetros sanguíneos.*

*A la Dra. Martinez, y su equipo técnico, del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Príncipe de Asturias de Alcalá de Henares por su inestimable labor en la realización del estudio anatomopatológico.*

*A los Dres. Díaz Gil y García Cañero, y a sus colaboradores del Servicio de Bioquímica Experimental de la Clínica Puerta de Hierro, primeros en describir el efecto regenerante de la bilialbúmina (LGF "liver growth factor"), por su colaboración, confianza y estímulo.*

*A mi colaboradora y compañera en el laboratorio Dña. Socorro de Andrés, por su infatigable y abnegada ayuda en las labores técnicas.*

*A Dña. Isabel Millán del Departamento de Bioestadística de la Clínica Puerta de Hierro, por su paciencia y colaboración en la valoración estadística de los resultados.*

*A los Dres. López Lozano, Brera Morón, Risco Bóveda, Moreno Cano, y a su técnico de laboratorio Dña. Carolina de la Torre, del laboratorio de Neurobiología de la Clínica Puerta de Hierro y pioneros en el transplante clínico de neuronas, quienes con su buen hacer, su experiencia científica y su amistad, han favorecido decisivamente mi formación científica y personal. A Bego por su hermosa compañía y sincero afecto.*

*A las Dras. Maganto y Sierra, especialistas de reconocido prestigio en el transplante hepatocelular y en terapia génica, por su ánimo en los momentos difíciles, su apoyo continuo en el esclarecimiento de mis múltiples dudas, y por su amistad.*

*A las Dras. Álvarez y Escudero, cirujanas cardiovasculares, con quienes conté en todo momento y de las que aprendí conocimientos de inestimable valor.*

*Al Dr. Ratia, por su inestimable colaboración.*

*Al Dr. Tendillo y sus colaboradores del estabulario de la Clínica Puerta de Hierro, por su continua colaboración y bien hacer.*

*Al Dr. Pérez Mora, cirujano del equipo de transplante hepático, buen conocedor de las técnicas de preservación, y que desde el principio, me inspiró en el tema de la isquemia hepática, ofreciéndome, en todo momento, toda su ayuda y conocimientos.*

*Al Dr. Ramón y Cajal, del Servicio de Anatomía Patológica de la Clínica Puerta de Hierro, por su ayuda en la interpretación de las muestras histológicas.*

*A Dña. Martha Messman, por su colaboración en la traducción de numerosos trabajos y por su amistad.*

*A todo el personal técnico del Servicio de Cirugía Experimental, sin cuya comprensión, profesionalidad y ayuda hubiese sido imposible la realización de este trabajo.*

*AL sr. Fernández Cassau, excelente dibujante y fotógrafo, por su colaboración en el desarrollo de la técnica de fluoresceína-ultravioleta.*

*Quiero darle las gracias a mi querida familia, a Casi y a Miguel Angel, por su paciencia, su crítica, y su apoyo moral, animándome siempre a continuar.*

*A mis amigos, por su interés y estímulo, generosos en todo momento.*

*Quiero recordar muy especialmente en este apartado a mi hermana Rosa, quien con su recuerdo imborrable, me dió y me sigue dando el mejor de los estímulos y el apoyo más hermoso. "In memoriam".*

## ABREVIATURAS.

|                             |                                                        |
|-----------------------------|--------------------------------------------------------|
| $^{\bullet}\text{O}_2$ .    | Radical superóxido.                                    |
| $^{\bullet}\text{OH}$ .     | Radical hidroxilo.                                     |
| ADP.                        | Adenosina-5'-difosfato.                                |
| AMP.                        | Adenosina-5'-monofosfato.                              |
| ATP.                        | Adenosina-5'-trifosfato.                               |
| BHT                         | 2,6-di-terc-butil-p-cresol.                            |
| Cat.                        | Catalasa.                                              |
| CID.                        | Coagulación intravascular diseminada.                  |
| CoQ10.                      | Coenzima Q10.                                          |
| Cr.                         | Creatinina.                                            |
| DTNB                        | 5-5'-ditiobis-2-nitrobenzoico.                         |
| GSH.                        | Glutation reducido.                                    |
| GSSH.                       | Glutation oxidado.                                     |
| $\text{H}_2\text{O}_2$ .    | Peróxido de hidrógeno.                                 |
| HGF.                        | Hepatic growth factor.                                 |
| LGF.                        | Liver growth factor.                                   |
| MDA.                        | Dialdehído malónico.                                   |
| MEOS.                       | Sistema microsómico de oxidación del etanol.           |
| $\text{NAD}^+$ .            | Nicotinamida adenin dinucleótido oxidada.              |
| $\text{NADH}+\text{H}^+$ .  | Nicotinamida adenin dinucleótido reducida.             |
| $\text{NADP}^+$ .           | Nicotinamida adenin dinucleótido fosfato oxidada.      |
| $\text{NADPH}+\text{H}^+$ . | Nicotinamida adenin dinucleótido fosfato reducida.     |
| $\text{RO}^{\bullet}$ .     | Radical alcoxi.                                        |
| $\text{ROO}^{\bullet}$ .    | Radical peroxi-acilo.                                  |
| ROOH.                       | Hidroperóxido.                                         |
| SOD.                        | Superóxido dismutasa.                                  |
| TBA.                        | Método del ácido tiobarbitúrico.                       |
| TBARS.                      | Sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico. |
| TEP.                        | 1,1,4,4-Tetraetoxipropano.                             |
| TNF.                        | Factor de necrosis tumoral.                            |

## INDICE

|                                                                                  | <b><i>pag.</i></b> |
|----------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| <b>1. INTRODUCCION</b>                                                           | <b><u>1</u></b>    |
| 1.1. Síndrome de isquemia-reperfusión: concepto                                  | <u>1</u>           |
| 1.2. Metabolismo energético: ruta <u>aerobia</u>                                 | <u>1</u>           |
| 1.3. Fuentes anaeróbicas de <u>energía</u>                                       | <u>2</u>           |
| 1.4. Alteraciones en la utilización del sustrato durante la <u>hipoxia</u>       | <u>2</u>           |
| 1.5. Mecanismos de daño celular por hipoxia                                      | <u>3</u>           |
| 1.5.1. <i>Acidosis celular</i>                                                   | <u>5</u>           |
| 1.5.2. <i>Pérdida de nucleótidos de adenina</i>                                  | <u>5</u>           |
| 1.5.3. <i>Incremento de la concentración intracelular de calcio</i>              | <u>6</u>           |
| 1.5.4. <i>Degradación de fosfolípidos de membrana</i>                            | <u>6</u>           |
| 1.5.5. <i>Formación de radicales libres de oxígeno</i>                           | <u>7</u>           |
| 1.6. Alteraciones morfológicas producidas por la isquemia reperfusión del hígado | <u>10</u>          |
| 1.6.1. <i>Lesiones en los hepatocitos</i>                                        | <u>10</u>          |
| 1.6.2. <i>Lesiones en el endotelio sinusoide</i>                                 | <u>11</u>          |
| 1.7. Isquemia y función hepática                                                 | <u>11</u>          |
| 1.7.1. <i>Alteraciones de la función hepática</i>                                | <u>11</u>          |
| 1.7.2. <i>Alteraciones vasculares</i>                                            | <u>12</u>          |
| 1.8. Criterios de viabilidad celular                                             | <u>13</u>          |
| 1.9. Significación fisiopatológica de la peroxidación <u>lipídica</u>            | <u>14</u>          |
| 1.10. Determinación de peróxidos lipídicos                                       | <u>15</u>          |
| 1.11. Radicales libres y membranas                                               | <u>17</u>          |
| 1.11.1. <i>Estructura y vulnerabilidad de las membranas</i>                      | <u>17</u>          |
| 1.11.2. <i>Desorganización estructural de las membranas</i>                      | <u>17</u>          |
| 1.11.3. <i>Fases de la peroxidación lipídica</i>                                 | <u>17</u>          |
| 1.12. Radicales libres e inflamación                                             | <u>20</u>          |
| 1.12.1. <i>Agresión al endotelio vascular</i>                                    | <u>22</u>          |
| 1.12.2. <i>Hiperagregabilidad plaquetaria</i>                                    | <u>22</u>          |
| 1.12.3. <i>Aumento de la permeabilidad capilar con edema intersticial</i>        | <u>23</u>          |
| 1.13. Modelo quirúrgico experimental de isquemia-reperfusión en hígado de rata   | <u>23</u>          |
| 1.13.1. <i>Modelos existentes</i>                                                | <u>23</u>          |
| 1.13.2. <i>Características que debe reunir el modelo quirúrgico</i>              | <u>24</u>          |
| 1.14. Intoxicación por etanol en el hígado post-isquémico                        | <u>25</u>          |
| 1.15. Factor de crecimiento de hígado (LGF) e isquemia hepática                  | <u>26</u>          |
| 1.16. Protección farmacológica del hígado isquémico                              | <u>26</u>          |

|                                                                                                                                                  |            |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>2. HIPOTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS</b>                                                                                                       | <b>3 0</b> |
| <b>3. MATERIAL Y METODOS</b>                                                                                                                     | <b>3 2</b> |
| 3.1. Protocolo experimental                                                                                                                      | 3 2        |
| 3.1.1. Elección de un modelo quirúrgico de isquemia-reperfusión en hígado de rata                                                                | 3 2        |
| 3.1.2. Estudio de la relación entre la duración de la isquemia hepática y el daño producido en el órgano reperfundido                            | 3 5        |
| 3.1.3. Valoración de la influencia de la isquemia en una situación de estrés oxidativo hepático inducida por la administración crónica de etanol | 3 7        |
| 3.1.4. Estudio de la influencia de la isquemia en la síntesis del factor de crecimiento de hígado (LGF)                                          | 3 9        |
| 3.1.5. Estudio de la protección farmacológica del hígado isquémico: efecto de la clorpromazina y la pentoxifilina                                | 4 0        |
| 3.1.6. Mantenimiento y cuidado de los animales                                                                                                   | 4 2        |
| 3.2. Descripción de las técnicas de valoración utilizadas                                                                                        | 4 2        |
| 3.2.1. Estudio de la peroxidación lipídica                                                                                                       | 4 2        |
| 3.2.1.1. Determinación del dialdehído malónico (MDA)                                                                                             | 4 2        |
| 3.2.1.2. Método de valoración del glutatión reducido (GSH) en hígado                                                                             | 4 5        |
| 3.2.2. Determinación del factor de crecimiento de hígado                                                                                         | 4 6        |
| 3.2.3. Anatomía patológica                                                                                                                       | 4 7        |
| 3.3. Otras determinaciones                                                                                                                       | 4 9        |
| 3.3.1. Bioquímica sérica                                                                                                                         | 4 9        |
| 3.3.2. Gasometría de sangre arterial                                                                                                             | 4 9        |
| 3.3.3. Determinación de las concentraciones en tejido hepático de Adenosin-5'-trifosfato                                                         | 4 9        |
| 3.3.4. Verificación de la perfusión efectiva del hígado                                                                                          | 5 0        |
| 3.3.5. Valoración del contenido en agua del tejido hepático                                                                                      | 5 1        |
| 3.4. Estudio estadístico                                                                                                                         | 5 1        |

|                                                                                                                                                          |            |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>4. RESULTADOS</b>                                                                                                                                     | <b>53</b>  |
| 4.1. Modelo quirúrgico experimental de isquemia-reperfusión en hígado de rata:<br>comparación de los modelos de isquemia completa y, de isquemia parcial | 53         |
| 4.1.1. <i>Gasometría de sangre arterial</i>                                                                                                              | 53         |
| 4.1.2. <i>Bioquímica sérica</i>                                                                                                                          | 56         |
| 4.1.3. <i>Observaciones macroscópicas</i>                                                                                                                | 57         |
| 4.2. Duración de la isquemia y daño hepático                                                                                                             | 59         |
| 4.2.1. <i>Alteraciones bioquímicas y duración de la isquemia</i>                                                                                         | 59         |
| 4.2.2. <i>Estudio "in vitro" de la sensibilidad del hígado al estrés oxidativo</i>                                                                       | 64         |
| 4.2.3. <i>Verificación de la reperfusión hepática</i>                                                                                                    | 65         |
| 4.3. Efecto de la isquemia hepática en un modelo experimental de estrés oxidativo<br>inducido por la administración crónica de etanol                    | 68         |
| 4.4. Efecto del factor de crecimiento de hígado (LGF) en el estrés oxidativo<br>producido durante la isquemia-reperfusión hepática                       | 70         |
| 4.5. Protección farmacológica del hígado isquémico: efecto de los fármacos<br>pentoxifilina y clorpromazina                                              | 74         |
| 4.5.1. <i>Estudio bioquímico</i>                                                                                                                         | 74         |
| 4.5.2. <i>Estudio anatomopatológico</i>                                                                                                                  | 79         |
| <b>5. DISCUSIÓN</b>                                                                                                                                      | <b>83</b>  |
| 5.1. Modelo quirúrgico experimental de isquemia-reperfusión en hígado de rata:<br>comparación de los modelos de isquemia completa y de isquemia parcial  | 83         |
| 5.2. Duración de la isquemia y daño hepático                                                                                                             | 86         |
| 5.3. Efecto de la isquemia hepática en un modelo experimental de estrés oxidativo<br>inducido por la administración crónica de etanol                    | 93         |
| 5.4. Efecto del factor de crecimiento de hígado (LGF) en el estrés oxidativo<br>producido durante la isquemia-reperfusión hepática                       | 95         |
| 5.5. Protección farmacológica del hígado isquémico: efecto de los fármacos<br>pentoxifilina y clorpromazina                                              | 99         |
| <b>6. CONCLUSIONES</b>                                                                                                                                   | <b>108</b> |
| <b>7. BIBLIOGRAFÍA</b>                                                                                                                                   | <b>109</b> |

## **1.INTRODUCCION**

## **1. INTRODUCCION.**

### **1.1. SINDROME DE ISQUEMIA-REPERFUSION HEPATICA: CONCEPTO.**

La isquemia se define como la situación en la que un órgano o tejido recibe un aporte disminuído de oxígeno (hipoxia), o no lo recibe (anoxia), pudiendo causar según su severidad importantes alteraciones celulares e incluso la muerte de las células afectadas. Cuando el tejido que ha sufrido la hipoxia es reperfundido, el restablecimiento de las concentraciones normales de oxígeno causa una importante situación de estrés oxidativo celular debido a la generación de especies reactivas de oxígeno (radicales libres) que pueden reaccionar con numerosas estructuras celulares alterando su función, en ocasiones de forma irreversible, llegando a causar destrucción celular. Este efecto sucede por las profundas alteraciones producidas durante la isquemia sobre los sistemas reguladores y de defensa frente a los citados radicales libres.

### **1.2. METABOLISMO ENERGETICO: RUTA AEROBIA.**

A concentraciones normales de oxígeno, la síntesis de ATP se produce mayoritariamente por la ruta aerobia. En los capilares periféricos, el oxígeno se disocia de la hemoglobina, y difunde a través de un gradiente de concentraciones hasta la mitocondria, donde la  $pO_2$  es de unos 0,5 torr (0,07 KPa) (Kappas, 1985). La difusión de oxígeno se acompaña por la de substratos metabólicos, como glucosa y ácidos grasos libres. La producción de ATP tiene lugar en la mitocondria, por medio de la oxidación ordenada de los substratos con una disminución progresiva del gradiente eléctrico en una serie de reacciones denominadas de forma genérica como fosforilación oxidativa. El paso final de esta cadena es la transferencia de dos electrones al oxígeno molecular, formándose una molécula de agua.

El ATP producido, abandona entonces la mitocondria por acción de las ATP-adenosina-5'-difosfato-translocasas, difundiéndose a los sitios en donde existen requerimientos energéticos, como las miofibrillas o las bombas iónicas asociadas a membranas, donde los enlaces fosfato de alta energía son hidrolizados por acción de ATPasas. Como resultado de esta hidrólisis se generan grandes cantidades de energía, ADP, AMP, Pi y  $H^+$ , según la reacción:



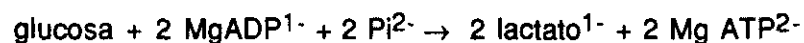
Los productos de esta hidrólisis regresan a la mitocondria donde son reciclados para producir más ATP y  $\text{CO}_2$ .

### 1.3. FUENTES ANAEROBICAS DE ENERGIA.

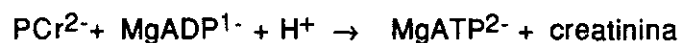
Mediante la limitación en la disponibilidad de oxígeno, la velocidad de producción de ATP por la vía aerobia llega a ser considerablemente menor que la velocidad a la que el ATP es hidrolizado, produciéndose como consecuencia una acumulación intracelular de ADP,  $\text{P}_i$  y  $\text{H}^+$ .

Estos metabolitos se comportan como señales de retroalimentación que promueven la síntesis anaeróbica de ATP, a través de la ruta glicolítica, y las reacciones catalizadas por las enzimas creatinina-quinasa y adenilato-quinasa, según las siguientes reacciones.

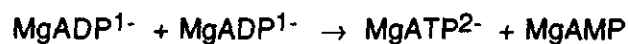
Ruta glicolítica:



Creatinina-quinasa:



Adenilato-quinasa:



### 1.4. ALTERACIONES EN LA UTILIZACION DE SUBSTRATO DURANTE LA HIPOXIA.

Durante las primeras etapas de la hipoxia se produce en la célula el efecto Pasteur, es decir, la utilización de glucosa como sustrato principal en el metabolismo rindiendo lactato (Sevanian et al., 1985).

El consumo neto de glucosa se incrementa en situaciones de hipoxia (Sies et al., 1982), al mismo tiempo que disminuye la oxidación de ácidos grasos de

cadena larga, debido posiblemente, a la disminución del ATP disponible, y al deterioro del transporte mitocondrial de ácidos grasos de cadena larga.

La hipoxia, disminuye también la síntesis proteica impidiendo la elongación de las cadenas polipeptídicas, ocasionando una acumulación intracelular de aminoácidos, a excepción del aspartato y el glutamato que por transaminación con piruvato forman alanina (Smith et al., 1982), y su incremento, parece moderar la formación de lactato producida durante la hipoxia.

### **1.5. MECANISMOS DE DAÑO CELULAR DURANTE LA HIPOXIA.**

La hipoxia tisular se observa frecuentemente en pacientes en estado crítico, y posiblemente es uno de los factores decisivos que predisponen a estos pacientes a desarrollar un cuadro de fallo multiorgánico. En términos celulares, la hipoxia se caracteriza por una disminución de oxígeno celular, y como consecuencia de esto una disminución drástica en la producción de ATP.

La resistencia a la hipoxia varía de acuerdo con el nivel de actividad celular del tejido considerado. Así, el músculo esquelético es capaz de recobrar totalmente su función después de 30 minutos de isquemia total (Recknagel et al., 1966), los hepatocitos aislados no sufren un daño irreversible por hipoxia si esta no supera las 2,5 horas (Di Lucio, 1966). Sin embargo, las células del cerebro quedan permanentemente dañadas tan solo después de 4 ó 6 minutos de hipoxia (Fridovich, 1978).

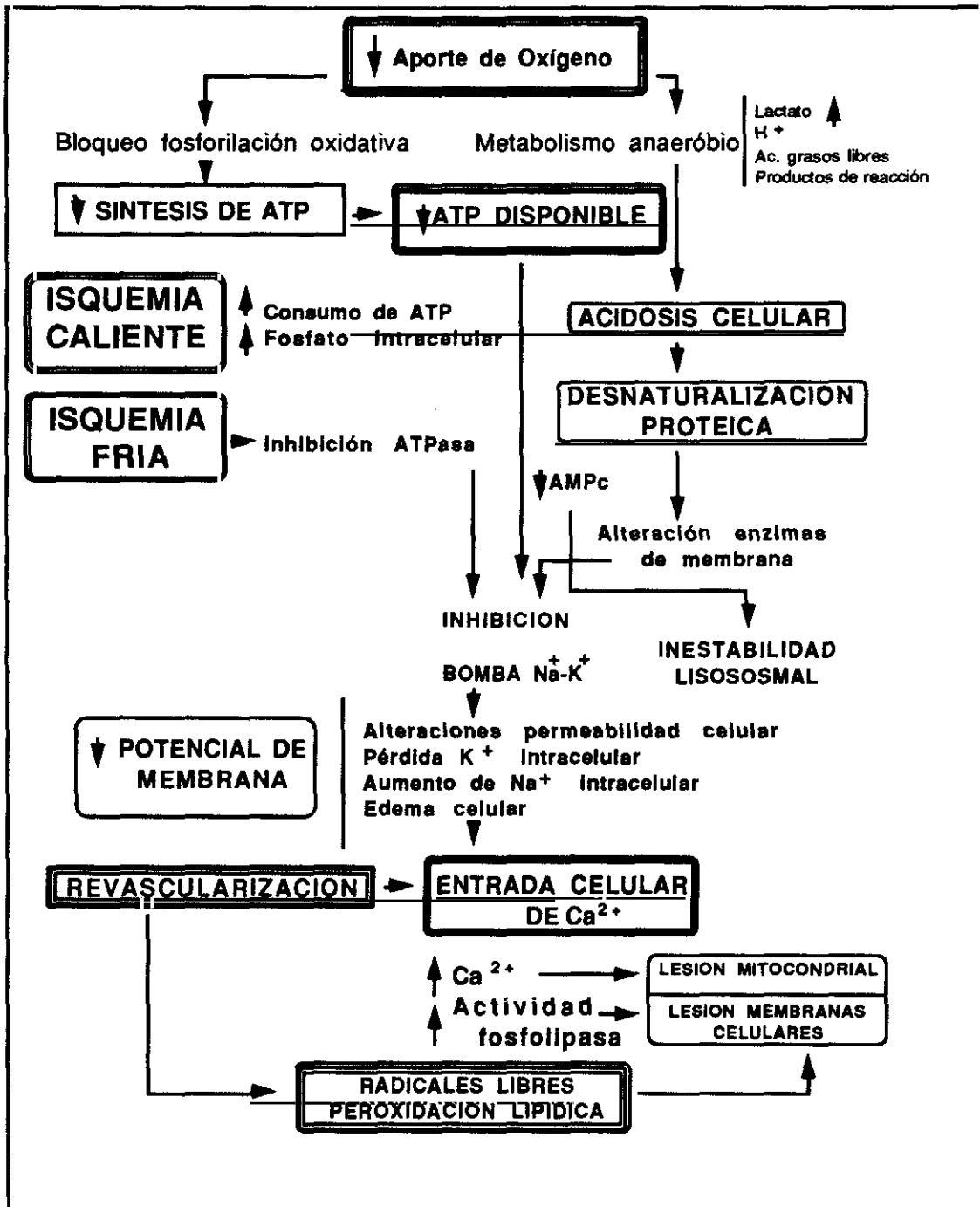
La disfunción celular ocurre cuando las fuentes anaeróbicas de producción de energía no son suficientes para mantener el nivel energético necesario para un correcto funcionamiento de los procesos metabólicos.

El daño celular irreversible ocurre cuando la depleción de energía afecta a las reacciones responsables del mantenimiento de la integridad celular.

Algunos de los mecanismos que intervienen en el desarrollo de daños celulares irreversibles por efecto de la hipoxia son (Fig. 1):

- a) Acidosis celular.
- b) Pérdida celular de nucleótidos de adenina.
- c) Alteración de los fosfolípidos de membrana.

- d) Exceso de concentración productos metabólicos, incluido el calcio.  
e) Formación de radicales libres de oxígeno.



**Fig.1 ACONTECIMIENTOS CELULARES DURANTE LA ISQUEMIA-REPERFUSION.**  
Durante la isquemia (caliente y/o fría) y posteriormente, durante la revascularización, se produce una cadena de alteraciones en las condiciones fisiológicas de la célula, que junto a una acumulación de productos tóxicos, producen el deterioro de estructuras celulares fundamentales, y de su función, pudiendo llegar a inducir incluso la muerte de la célula o células afectadas (Cortesía del Dr.P. Mora).

### **1.5.1. Acidosis celular**

La mayor fuente intracelular de iones hidrógeno durante la hipoxia parece ser la que se produce durante la hidrólisis del ATP. Cuando la función mitocondrial está limitada por un aporte disminuido de oxígeno, la reciclación de protones en la fosforilación oxidativa disminuye, incrementándose la concentración de protones ( $H^+$ ) en el citosol.

La acidosis celular es también una consecuencia de la utilización durante la hipoxia de la ruta glicolítica. Este dato no está claro, ya que no se generan protones durante la glicolisis cuando el pH celular se encuentra dentro del rango fisiológico (Pryor, 1973), sin embargo, cuando el pH es inferior a 6,2 aumenta la desprotonación del  $ADP^{-1}$  originándose un protón por cada molécula de lactato generada (Bruce et al., 1982).

La acidosis, por sí misma, o junto a otros factores, puede deteriorar seriamente la función celular por medio de los siguientes mecanismos:

- a) Pérdida de nucleótidos de adenina por inhibición del transportador  $MgATP^{2-} / Pi^{2-}$  (Naqui et al., 1986).
- b) Inhibición del intercambiador  $Na^+-Ca^{2+}$ , produciéndose un secuestro intracelular de  $Ca^{2+}$  (Nauta et al. 1991).
- c) El incremento de la actividad AMP-desaminasa y la pérdida celular de precursores de nucleótidos de adenina (Castillo-Olivares et al., 1972).
- d) Destrucción del  $NAD^+$  por catálisis ácida (Comporti et al., 1967).
- e) Conversión intracelular de fosfato inorgánico en su forma desprotonada, la cual actúa de forma inhibitoria (Naqui et al., 1986).

### **1.5.2. Pérdida de nucleótidos de adenina.**

La pérdida de nucleótidos de adenina durante la isquemia caliente puede dar lugar a daño celular irreversible (este efecto, se hace notar menos durante la isquemia fría, ya que en éstas condiciones, la actividad metabólica se encuentra deprimida por efecto de la hipotermia). El AMP, puede defosforilarse entonces, y convertirse en adenosina por acción de la 5'-nucleotidasa, abandonando la célula por difusión facilitada a través de la membrana y actuando como un potente vasodilatador en la mayoría de los lechos vasculares (Lai et al., 1977).

### **1.5.3. Incremento en la concentración intracelular de calcio.**

Durante la hipoxia tiene lugar un incremento de la concentración intracelular de calcio, que en condiciones normales es  $10^4$  veces inferior a la extracelular, debido a la inhibición de los transportadores de membrana dependientes de ATP y del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  produciéndose un incremento adicional de la acidosis celular y la activación de las proteasas  $\text{Ca}^{2+}$ -dependientes que pueden inducir la desorganización del sarcolema y el citoesqueleto (Fariss et al., 1985). Además el incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  libre incrementa la actividad de las ATPasas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ , al mismo tiempo que la hipoxia determina una producción mínima de ATP (Chaudry, 1983).

### **1.5.4. Degradación de los fosfolípidos de membrana.**

La pérdida de los fosfolípidos de membrana y el deterioro consecuente de los gradientes iónicos de la misma, son fenómenos relacionados con la irreversibilidad del daño celular debido a la hipoxia (Cardenas et al., 1981).

Existen tres posibles mecanismos de alteración de las propiedades de la membrana durante la hipoxia:

- a) Activación de fosfolipasas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  (Lihlström et al., 1987).
- b) Inhibición de la síntesis de lípidos por un déficit energético (Bruce et al., 1982).
- c) Alteraciones de las propiedades físicas de las membranas celulares y, como consecuencia su rotura (Cardenas et al., 1989).

La degradación de los fosfolípidos asociados a membrana parece estar relacionada con la entrada de calcio a la célula (Pompella et al., 1987; Rodriguez et al., 1991).

El calcio es capaz de activar las fosfolipasas  $\text{A}_2$  y C, capaces de degradar los fosfolípidos de membrana. Sin embargo, este incremento de la actividad de las fosfolipasas y su relación con el proceso de degradación de las membranas durante la hipoxia no está bien establecido, ya que la actividad de la fosfolipasa  $\text{A}_2$  es máxima con niveles normales de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Sharma et al., 1990).

Además, la actividad de la fosfolipasa C no se incrementa durante la hipoxia (Borowitz et al., 1989).

Otro mecanismo responsable del daño de las membranas celulares durante la hipoxia es la inhibición del recambio de fosfolípidos en el proceso de acilación-desacilación. La acilación se produce a expensas de la energía generada durante la hidrólisis del ATP; y en este caso al estar los niveles de ATP muy reducidos durante la hipoxia, la síntesis de fosfolípidos queda drásticamente reducida (Ferrero et al., 1990). Esta relación alterada entre las velocidades de síntesis y degradación de fosfolípidos, deteriora la membrana, produciéndose una acumulación de ácido araquidónico (un precursor de los fosfolípidos de membrana) (Halliwell et al., 1984b).

#### ***1.5.5. Formación de Radicales Libres de Oxígeno.***

En fase de isquemia, y por tanto de aporte de oxígeno insuficiente, el rendimiento de la cadena respiratoria mitocondrial está disminuído. En anaerobiosis, se producen dos moléculas de ATP a partir de una molécula de glucosa, contra las 38 que se producen en aerobiosis (metabolismo hepático). La hipoxia persistente induce un fallo energético de la bomba  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$  de membrana con entrada de sodio y de calcio en la célula, aumento de la presión osmótica y edema intracelular. El calcio intracelular activa la fosfolipasa  $\text{A}_2$  (Borowitz et al., 1989), y produce un aumento de ácidos grasos libres. También induce la conversión de la xantina-deshidrogenasa en xantina-oxidasa (Fig. 2), fuente de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  (Brass et al., 1991). Paralelamente, el metabolismo del ADP en anaerobiosis se desvía hacia la síntesis de AMP, de adenosina y de hipoxantina (Ferrero et al., 1990; Gutiérrez, 1991).

Todas estas perturbaciones celulares son aún reversibles pero, en el momento de la reperusión, las células isquémicas serán sometidas a un estrés oxidativo que acelerará su destrucción (Mc Cord, 1985; Bulkley, 1987).

Durante la reperusión, la producción de radicales libres en la zona isquémica es muy intensa dado que sus sistemas de protección están deprimidos (disminución importante de las tasas de superóxido-dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa durante la isquemia) (Mc Cord, 1983).

La hiperproducción de radicales libres durante la reperusión (Fig. 3) se asegura principalmente a través de cuatro vías (Mc Cord, 1985 ):

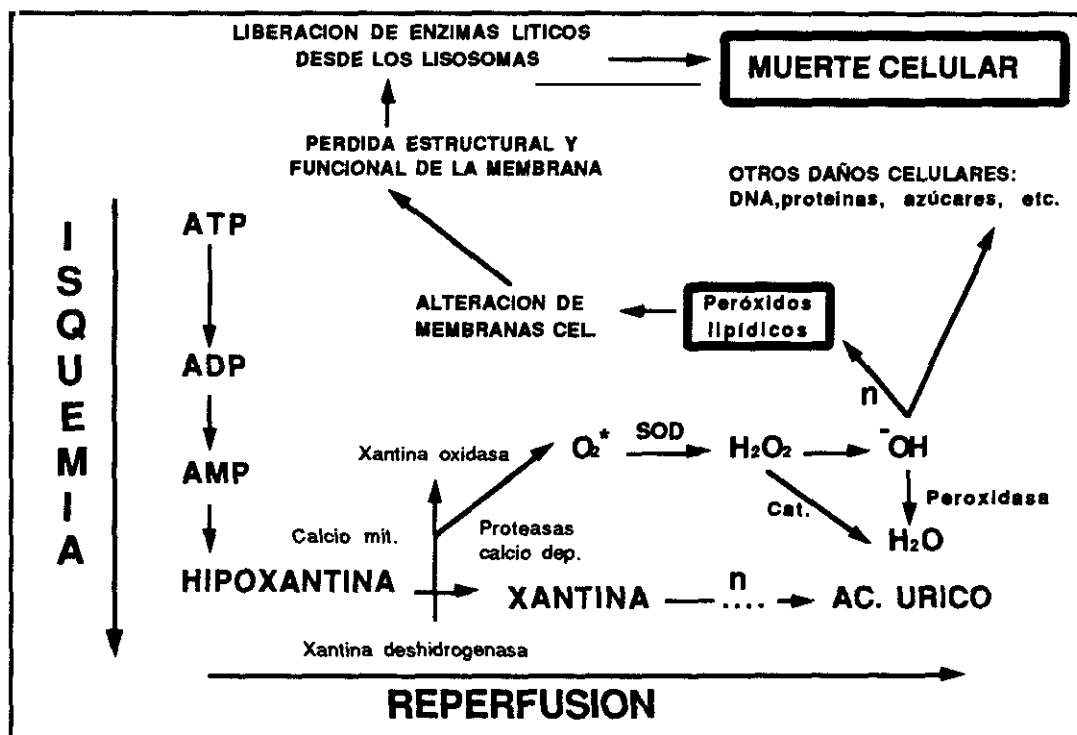
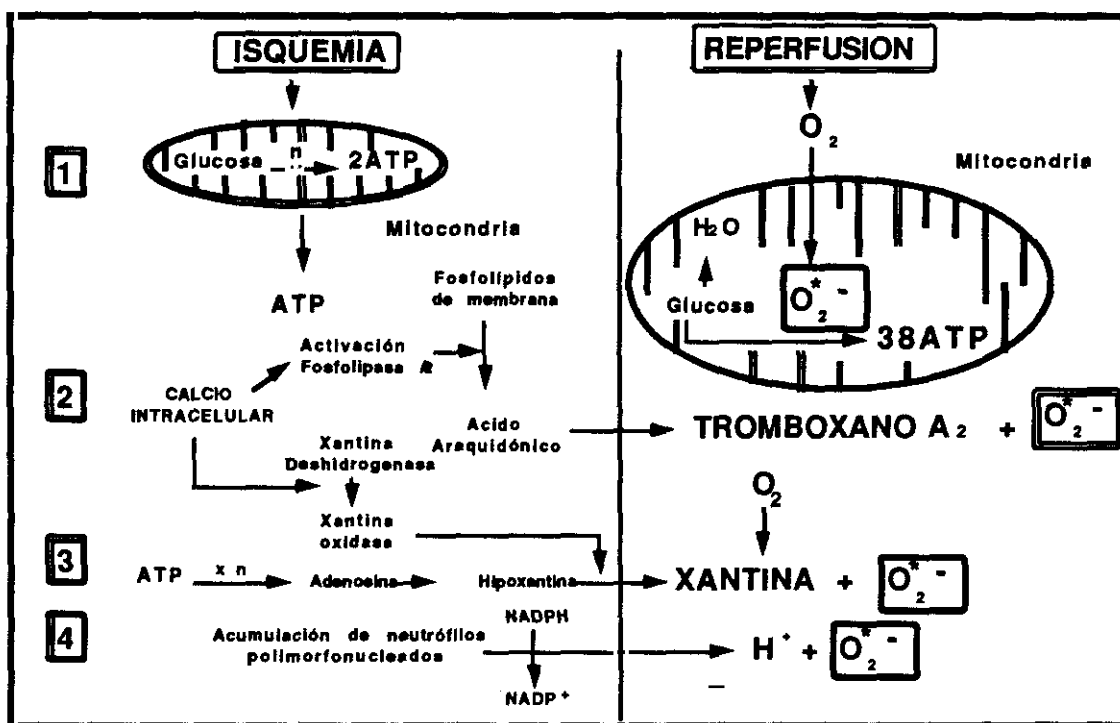


Fig. 2 PRODUCCION DE RADICALES LIBRES DURANTE LA ISQUEMIA-REPERFUSION.

Después de un periodo de isquemia, la revascularización del hígado, induce la formación del anión superóxido a partir del oxígeno, nuevamente incorporado, durante la transformación de hipoxantina en xantina (ruta degradativa del ATP). Este paso supone una de las fuentes más importantes de radicales libres durante la isquemia-reperfusión.

- Durante la respiración mitocondrial, por reducción monovalente del oxígeno nuevamente disponible (Gutiérrez et al., 1991).
- Por activación de los neutrófilos polinucleares acumulados en la zona de isquemia (incremento del consumo de oxígeno y activación de la NADPH-oxidasa de membrana ligada por sí misma a producción y difusión extracelular de radicales libres) (Jaesche et al., 1990; Lemaster y Thurman, 1991; Welbourn et al., 1991).
- Por reacción de los productos del metabolismo en anaerobiosis: hipoxantina y xantina-oxidasa, las cuales, en presencia de oxígeno, forman xantina y anión superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ) (Marubayashi, et al. 1991).
- Por transformación del ácido araquidónico acumulado en la fase isquémica; hay síntesis de endoperóxidos y producción de radicales libres (Southorn et al., 1988).



**Fig. 3 LAS CUATRO VIAS DE PRODUCCION DE RADICALES LIBRES DURANTE LA ISQUEMIA-REPERFUSION.**

La isquemia hepática induce alteraciones moleculares que durante la revascularización, transforman el oxígeno recién incorporado, en anión superóxido, iniciador de las cadenas de reacciones mediadas por radicales libres.

Los radicales libres formados durante la reperfusión ( $O_2^{\cdot-}$  y  $H_2O_2$  transformados en  $OH^{\cdot}$ ) actúan produciendo las siguientes consecuencias (Tribble et al., 1987):

- Reaccionan con los fosfolípidos de las membranas celulares (peroxidación lipídica), con las proteínas y los ácidos nucleicos provocando la desorganización estructural y funcional de las células y su muerte (Reilly, et al. 1991).
- Actúan sobre los ácidos grasos libres acumulados en la fase isquémica y pueden desviar la cascada del ácido araquidónico hacia la vía metabólica vasoconstrictora y proagregante del tromboxano A<sub>2</sub>.
- Igualmente como agentes quimiotácticos para las plaquetas (adhesión y agregación) y los neutrófilos polinucleados, los cuales, activados, se adhieren al endotelio y añaden su propia producción de radicales libres (Welbourn et al., 1991).

Los radicales libres producidos en la isquemia tisular contribuyen enormemente al agravamiento de ésta (Halliwell, 1988), ya sea ejerciendo sus efectos perjudiciales directamente (oxidación de los lípidos, proteínas y ácidos nucleicos celulares) (Parks et al., 1983b), induciendo un colapso del sistema microcirculatorio por acción sobre el endotelio vascular, las plaquetas y los neutrófilos (disminución de las tasas de prostaciclina, aumento de las tasas de tromboxano A<sub>2</sub>, factor quimiotáctico para las plaquetas y los neutrófilos) (Slater, 1984a. Lemaster y Thurman, 1991). Se ha demostrado que estas reacciones de los radicales libres son responsables del fenómeno de "no reperfusión" (Mora et al., 1987) que se observa durante las reimplantaciones quirúrgicas: las arterias suturadas son permeables pero, secundariamente a la perfusión del injerto, hay un colapso de la microcirculación nutritiva y, finalmente, necrosis del implante (Thurman et al., 1988. Gao, 1991).

#### **1.6. ALTERACIONES MORFOLOGICAS PRODUCIDAS DURANTE LA ISQUEMIA-REPERFUSION DEL HIGADO.**

La descripción más exhaustiva de las lesiones estructurales que se producen en el hígado por efecto de la isquemia (tanto fría como caliente) ha sido llevada a cabo por Myagkaya et al. en 1987.

El estudio incide en la aparición progresiva de lesiones según aumenta el tiempo de isquemia (Navidad Novalvos et al., 1992a). Estas lesiones se manifiestan con más rapidez e intensidad en el endotelio sinusoidal que en los hepatocitos (Subirats Bayego, 1982).

Los hallazgos morfológicos se pueden resumir en los siguientes:

##### **1.6.1. Lesiones en los hepatocitos.**

- a) Edema progresivo de las diversas estructuras celulares: retículo endoplásmico, mitocondrias, etc (Chevrel et al., 1979).
- b) Desaparición progresiva de crestas mitocondriales. Aparición de condensaciones mitocondriales (Mitnacht et al., 1981; Myagkaya et al., 1985).
- c) Vacuolización celular: A expensas fundamentalmente del retículo endoplásmico.
- d) Alteraciones de la estructura nuclear principalmente de la cromatina y de la membrana.

- e) Ruptura lisosomal con vertido de enzimas proteolíticos (Wattiaux, 1980).

#### **1.6.2. Lesiones del endotelio sinusoidal.**

- a) Engrosamiento del espacio de Disse (Ciardi et al., 1991).
- b) Pérdida de la integridad del borde sinusoidal (Myagkaya et al., 1984).
- c) Aparición de material necrótico en la luz sinusoidal (Carey et al., 1991).

Estas lesiones tienen una distribución zonal incidiendo fundamentalmente en la zona central del lobulillo hepático (Lemaster et al., 1985; Marotto et al., 1988).

Los hallazgos morfológicos observados tras la revascularización del hígado tienen especial interés ya que ponen de manifiesto el estado final del órgano (Menon et al., 1986; Rodriguez et al., 1991).

Estos hallazgos pueden resumirse en los siguientes:

- a) Pérdida de la estructura del lobulillo hepático.
- b) Incidencia variable de necrosis hepatocitaria, preferentemente centrolobulillar.
- c) Hemorragia parenquimatosa focal o diseminada -según la intensidad del daño- con extravasación de hematíes.
- d) Adhesión de polimorfonucleares neutrófilos al endotelio que pueden dar lugar al fenómeno de no perfusión (Lemaster y Thurman, 1991).

### **1.7. ISQUEMIA Y FUNCION HEPATICA.**

La isquemia va a producir sobre el hígado una serie compleja de efectos perjudiciales que van a afectar a la función y estructura del parénquima hepático, y a su entramado vascular.

#### **1.7.1. Alteraciones de la función hepática.**

Las alteraciones causadas por la isquemia en la función hepatocelular podemos deducirlas fácilmente de los efectos bioquímicos y celulares (descritos anteriormente).

Las funciones metabólicas y de mantenimiento estructural pueden quedar comprometidas o incluso anuladas de manera irreversible si la isquemia se mantiene durante un tiempo prolongado (Navidad Novalvos et al., 1992a), dando lugar a un cuadro clínico característico de insuficiencia hepática aguda. Este cuadro se caracteriza fundamentalmente por los siguientes fenómenos:

- a) Ausencia de síntesis hepática de factores de coagulación (Belcher, 1961; Dymock, 1975).
- b) Disminución de otros procesos de síntesis, en especial de la síntesis de proteínas (Jones et al., 1987; Nordström et al., 1990).
- c) Elevación de los niveles plasmáticos de ácidos láctico y pirúvico (Harris et al., 1982).
- d) Hiperammonemia como consecuencia de la interrupción del ciclo de la urea.
- e) Alteraciones del metabolismo y aclaramiento de aminoácidos (Wustrou et al., 1981).
- f) Aumento de enzimas hepáticas en plasma (citoplásmicas (Frederiks, 1983), mitocondriales (Frederiks, 1984) y lisosomales (Fredmud, 1974; Gove, 1981)) debido a necrosis tisular y/o a profundas alteraciones de la permeabilidad de la membrana.
- g) Hiperbilirrubinemia por alteración en el proceso de síntesis y excreción biliar (Mora et al., 1987).
- h) Otros: Elevación de cuerpos cetónicos y ácidos grasos libres. Disminución del aclaramiento de la bromosulfaleína y del verde de indocianina. Alteraciones en la captación y excreción de radiofármacos.

Como consecuencia de estas alteraciones y otras, desconocidas en la actualidad, puede llegar a desarrollarse un cuadro clínico de encefalopatía y coma hepático.

### **1.7.2. Alteraciones vasculares.**

El sinusoides y el lecho vascular hepático son las estructuras, que de manera más precoz, resultan lesionadas por efecto de la isquemia.

Sus manifestaciones tienen lugar una vez que el órgano es reperfundido y producen los siguientes efectos:

- a) Vasoconstricción arterio-arteriolar refractaria, que puede llegar a ser irreversible y que clínicamente se conoce como "fenómeno de no

reperfusión" -, el cual se agrava considerablemente por una acumulación masiva de polimorfonucleares neutrófilos sobre el endotelio vascular tras la reperfusión del órgano. El vasoespasmo persistente después de revascularizar un órgano es conocido desde hace tiempo (Sagone, 1983), atribuyéndose actualmente a alteraciones en la síntesis de prostaglandinas vasoactivas (Santiago Delpin et al., 1975).

- b) Alteraciones de la permeabilidad vascular por pérdida de integridad del endotelio-sinusoide. Este fenómeno produce congestión hepática, que clínicamente se denomina como "bloqueo del flujo de salida". La acumulación de radicales libres podría constituir la base bioquímica de éste fenómeno.
- c) Activación de la fibrinólisis y coagulación intravascular diseminada (C.I.D.) (Dymock et al., 1975). Las lesiones endoteliales y vasculares desencadenan alteraciones en la coagulación observadas tras la revascularización del hígado sometido a un periodo de isquemia (Chiu et al., 1987).

### **1.8. CRITERIOS DE VIABILIDAD CELULAR.**

No existe un criterio universal para definir el concepto de viabilidad de un órgano. Etimológicamente se define como la capacidad de vivir, o de permitir el mantenimiento de la vida. Por lo tanto, en lo referente a la isquemia-reperfusión hepática, entenderemos por viable, aquel órgano que tras sufrir una situación de hipoxia es capaz de recuperar y mantener sus funciones una vez reperfundido.

La falta de universalidad de este concepto se debe fundamentalmente a que no se ha establecido, de una manera concluyente, el momento en el que las lesiones celulares y moleculares llegan a ser irreversibles provocando la muerte celular.

La mayoría de los estudios experimentales se centran en las alteraciones observadas en la función mitocondrial: niveles totales de nucleótidos de adenina (Hayashi et al., 1986), carga energética total, cociente ADP: O (Chaudry, 1983), o concentraciones de AMP.

Algunos estudios coinciden en que la depleción de nucleótidos de adenina que se produce durante la isquemia condiciona la viabilidad celular, considerándose un criterio fundamental de viabilidad la capacidad de la célula de restaurar los niveles de ATP una vez reestablecido el flujo sanguíneo, lo que indica la reanudación del proceso de fosforilación oxidativa ( Naqui et al., 1986; Castillo-Olivares et al., 1972).

Otros parámetros propuestos como criterio de viabilidad son:

- a) La recuperación del potencial de membrana ( Mitnacht et al., 1981).
- b) La relación  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  intracelular (Ohkohchi et al., 1991).
- c) El contenido total de agua intracelular (Nordström et al., 1985).
- d) La síntesis de péptidos y proteínas intrínsecas de membrana (Ferrero et al., 1980).

El estudio de estos y otros criterios de viabilidad celular (después de la isquemia) constituyen un campo de estudio fundamental para la valoración de los métodos de preservación.

Sin embargo, la mayoría de las técnicas expuestas tienen el inconveniente de ser invasivas, requiriendo en la mayoría de los casos la revascularización del hígado a fin de obtener un criterio de viabilidad preciso. Por ello, el desarrollo de técnicas no invasivas que permitan obtener un criterio precoz de viabilidad debe constituir un objetivo prioritario de estudio.

#### **1.9. SIGNIFICACION FISIOPATOLOGICA DE LA PEROXIDACION LIPIDICA DURANTE EL DAÑO CELULAR OXIDATIVO.**

El estrés oxidativo se acompaña de complejos procesos celulares, los cuales, tienen como resultado el daño, con frecuencia irreversible, de numerosas estructuras y funciones de la célula. El proceso de descomposición peroxidativa de los lípidos de membrana y su asociación a cambios en sus propiedades se considera el mecanismo básico de daño celular, suponiendo el puente de unión entre la iniciación de la cadena de reacciones mediadas por radicales libres y la aparición de disfunción celular evidente. Además, mientras que la química de la peroxidación lipídica en relación a los mecanismos potenciales de formación de radicales libres es bien conocida (Di Lucio, 1966; Fridovich, 1978), la secuencia de reacciones implicadas en la producción de los productos finales, y los mecanismos celulares de defensa implicados en cada caso (Kappas, 1985; Sevanian et al., 1985), no se conocen lo suficiente en lo que respecta, al menos, a la significación de la peroxidación lipídica en los procesos de deterioro y muerte celular como consecuencia del estrés oxidativo (Belcher, 1961; Baraona et al., 1980; Sies et al., 1982; Blackwell et al., 1983).

El origen de este desconocimiento puede atribuirse a las dificultades metodológicas para definir los procesos críticos que limitan la irreversibilidad

del daño oxidativo, así como, las reacciones implicadas que tienen lugar en el tejido intacto. Existen evidencias suficientes que demuestran que la peroxidación lipídica incrementa el estrés oxidativo de la célula (Smith et al., 1982), sin embargo se desconoce qué cambios son necesarios en las propiedades celulares y sus magnitudes, para producir el daño celular. Además, la peroxidación lipídica producida como consecuencia de la muerte celular no se distingue fácilmente de la que podría ser la causa del daño celular. Por otro lado, la cadena de reacciones que inician el proceso de peroxidación lipídica puede ser por sí misma responsable del deterioro de numerosas estructuras celulares, como ácidos nucleicos, proteínas, etc. (Sies, 1985), causando de esta manera, un grave deterioro de la célula sin que necesariamente intervengan fenómenos de peroxidación lipídica, lo que parece indicar, que la peroxidación lipídica podría tener mayor importancia como modulador de la extensión del daño celular inducido por los radicales libres, que como causa directa del daño celular.

#### **1.10. DETERMINACION DE PEROXIDOS LIPIDICOS.**

El establecimiento de los procesos oxidativos celulares implicados en los fenómenos de peroxidación lipídica, y daño celular, suponen actualmente un problema de difícil solución debido principalmente a los siguientes factores (Halliwell et al., 1987; Gutteridge et al., 1990):

- a) El elevado número de especies reactivas, algunas de las cuales no intervienen como agentes citotóxicos.
- b) La reducida vida media de algunas de estas especies (i.e. el radical hidroxilo  $10^{-9}$  seg), que por su elevada reactividad, reducen la posibilidad de detección de las mismas (Pryor, 1973; Fridovich, 1978).
- c) La presencia de potentes sistemas celulares de detoxificación dificultan el establecimiento de la secuencia de causalidad entre el proceso inducido por radicales libres , la peroxidación lipídica y el daño celular (Barja de Quiroga et al., 1990; Bisby, 1990).
- d) Los ensayos de estudio desarrollados hasta este momento obtienen determinaciones indirectas y poco específicas (Smith et al., 1982). En ocasiones, la presencia de sistemas detoxificadores hacen indetectables estas especies, las cuales, serían detectables cuando los sistemas de detoxificación están deprimidos o abolidos por alguna causa, lo que haría pensar que la

citotoxicidad estaría más en función de un sistema de eliminación ineficaz, que de la reactividad y especificidad de las especies tóxicas. Este efecto puede minimizarse en ocasiones muy concretas usando sistemas químicos puros, sistemas *in vitro* con enzimas purificadas y sistemas con orgánulos aislados (mitocondria, membranas, etc.) (Kupcsulik et al., 1979; Cardenas et al., 1981).

Como puede deducirse de los factores anteriormente expuestos, el papel que desempeña la peroxidación lipídica en el daño celular oxidativo depende del futuro diseño, aplicación y correcta interpretación de nuevas metodologías más adecuadas.

Existen varias opciones para determinar la extensión de la peroxidación lipídica, tales como, los ensayos en sistemas donde el potencial oxidativo es activado (Esterbauer, et al. 1982; Barja de Quiroga et al., 1990), los estudios de las especies reactivas del oxígeno (Lai et al., 1977; Starke et al., 1985), de los radicales libres orgánicos (Mc Cay et al., 1984), los sistemas de detoxificación (Schelley et al., 1983; Sharma et al., 1990) los productos metabólicos y de degradación (Pompella et al., 1987), así como, el estudio de las consecuencias patológicas del daño celular.

Ya que las especies reactivas tienen una vida media muy corta y están presentes en muy bajas concentraciones (Pryor, 1973), la mayoría de los ensayos en preparaciones biológicas implican la determinación de los productos de peroxidación lipídica, más estables y menos reactivos que las especies que los generan. Estos métodos incluyen la medida de las siguientes especies (Smith et al., 1982; Kappas, 1985; Sevanian et al., 1985): a) dienos conjugados, b) hidroperóxidos lipídicos y c) hidroxilípidos. Otros productos utilizados en los ensayos de valoración derivan de procesos más complejos e incluyen sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Uchiyama et al., 1978), formación de pigmentos fluorescentes (Jones et al., 1987), etano y pentano (Slater, 1984b), hidroxialquenos (Halliwell et al., 1988) y estudios de quimiluminiscencia (Roldan et al., 1989).

Es importante destacar, que la sensibilidad del método utilizado depende del tiempo al que realizamos la medida, ya que el metabolismo de estas sustancias no se realiza de manera simultánea, por lo que se aconseja el uso comparativo de al menos dos métodos (Smith et al., 1982). Esta dependencia del tiempo nos hace considerar si el daño celular irreversible se produce al poco tiempo de aparecer

la peroxidación lipídica, después de mucho tiempo, o de manera continua. Esta pregunta permanece actualmente sin respuesta.

### **1.11. RADICALES LIBRES Y MEMBRANAS.**

#### **1.11.1. Estructura y vulnerabilidad de las membranas celulares.**

Las membranas celulares se hallan formadas por una doble capa de fosfolípidos, moléculas compuestas por una cabeza hidrófila y una cola hidrófoba, constituida por cadenas de ácidos grasos insaturados. En esta bicapa lipídica se encuentran las proteínas responsables de las funciones de intercambio y transmisión de información que desempeña la membrana, pudiendo ser proteínas integrales o periféricas. Las cadenas de ácidos grasos insaturados de la bicapa, en sus dobles enlaces, son extremadamente sensibles a la agresión por los radicales de oxígeno (Lihlström et al., 1987).

#### **1.11.2. La desorganización estructural de las membranas.**

El ataque de los radicales ( $\text{OH}^*$ ) a los fosfolípidos de las membranas celulares induce una reacción en cadena (Fig. 4) mantenida por la existencia de dobles enlaces carbono-carbono en los ácidos grasos insaturados que facilitan la deslocalización del electrón libre, convirtiendo los ácidos grasos en productos hidrosolubles que pierden su estructura funcional en las membranas (Blackwell et al., 1961). Por otra parte, la reacción en cadena se ve favorecida también por la presencia de oxígeno molecular que apareará fácilmente uno de sus electrones con el electrón libre deslocalizado, lo que potenciará los daños iniciales (Fehér et al., 1987).

#### **1.11.3. Fases de la peroxidación lipídica.**

##### **Inicio.**

El radical hidroxilo  $\text{OH}^*$  "agresor" capta un átomo de hidrógeno de un doble enlace de un ácido graso insaturado, para transformarse en agua, iniciándose de esta forma la reacción en cadena (Arthur et al., 1985;1988).

El ácido graso insaturado, transformado en radical libre, sufre una oxidación de sus dobles enlaces y, en presencia de oxígeno, forma un radical peroxi-acilo ( $\text{ROO}^*$ ).

### **Propagación.**

El radical  $\text{ROO}^*$  capta, de una cadena insaturada vecina intacta, un átomo de hidrógeno y se transforma en un hidroperóxido ( $\text{ROOH}$ ) inestable mientras que el radical lipídico ( $\text{ROO}^*$ ) que se ha formado puede reiniciar un nuevo ciclo.

Esta reacción en cadena, resultado del ataque a los lípidos de la membrana, constituye la peroxidación lipídica (Comporti, 1985. Gutteridge et al., 1990).

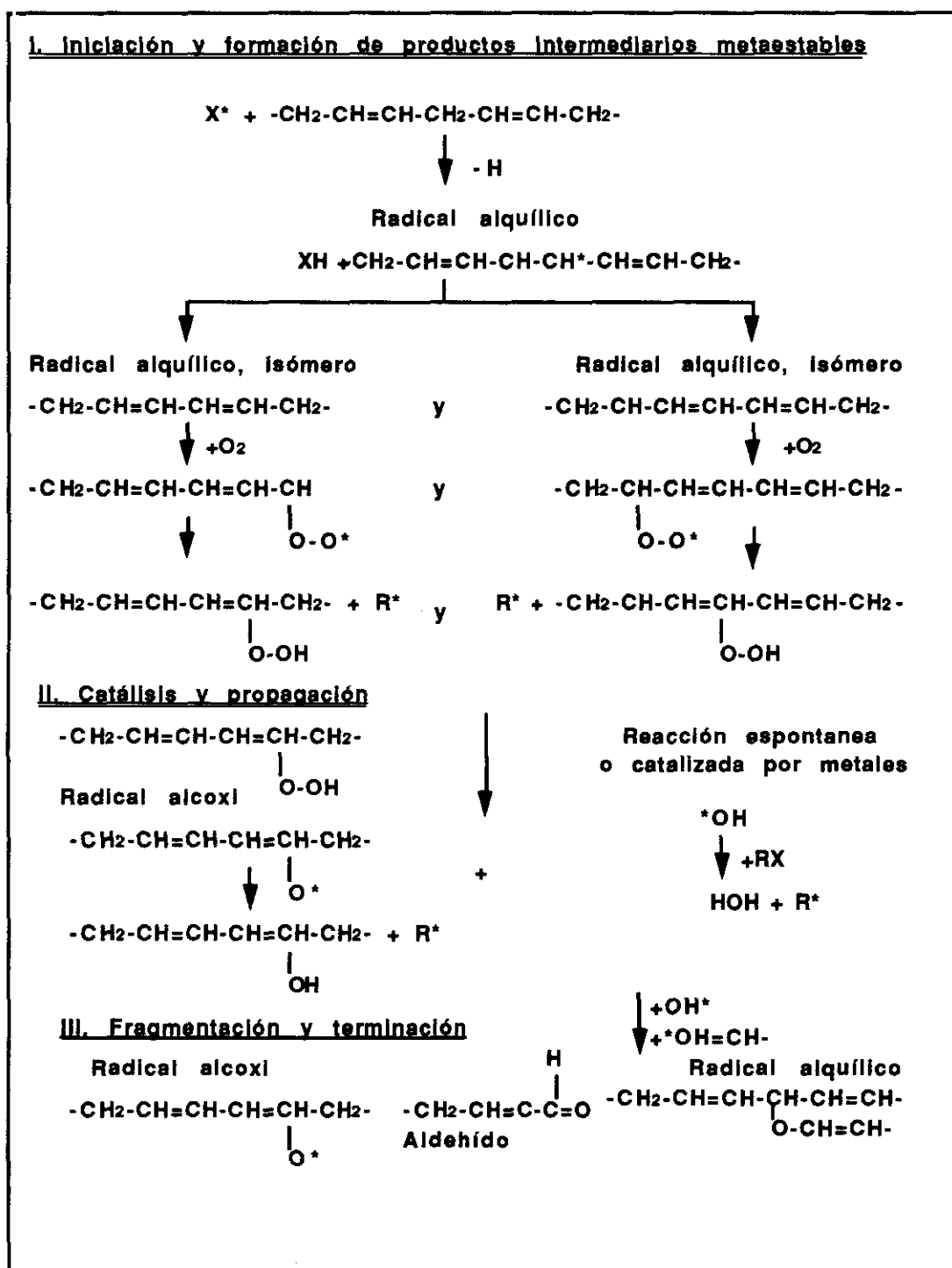
Los hidroperóxidos ( $\text{ROOH}$ ) son poco reactivos pero son convertidos, en presencia de hierro ( $\text{Fe}^{2+}$ ) (Esterbauer et al., 1982), en radicales alcoxi ( $\text{RO}^*$ ), radicales susceptibles como el  $\text{OH}^*$  de iniciar una nueva cadena.

Los hidroperóxidos son igualmente degradados, formando alcanos y aldehídos. Uno de los productos de degradación, el dialdehído malónico, puede reaccionar con los grupos tiol ( $-\text{SH}$ ) o amina ( $-\text{NH}_2$ ) de las proteínas, originando compuestos fluorescentes (Jones et al., 1987) cuya acumulación (lipofucsina) puede caracterizar a las células sede de peroxidaciones lipídicas intensas y repetidas.

### **Final.**

La reacción en cadena se detiene cuando dos radicales, pertenecientes o no a la misma molécula, interaccionan, creando enlaces moleculares entre ellos (Halliwell et al., 1984b; Cotgrave et al., 1988).

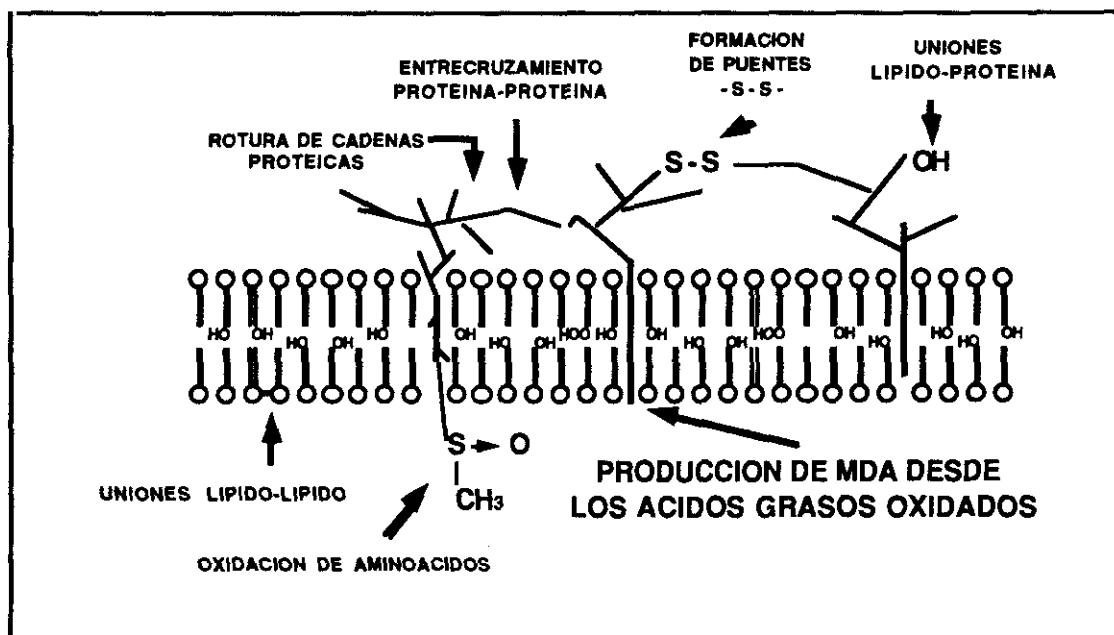
Esta cadena de reacciones mediadas por radicales libres puede ser igualmente detenida por reacción con moléculas "captadoras" tales como el  $\alpha$ -tocoferol de las membranas, el glutatión y el dialdehído malónico, igualmente, por la intervención de sistemas enzimáticos de "protección" como superóxido dismutas, catalasa u otras peroxidasas.



**Fig. 4 FASES DE LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA.**

Los radicales libres reaccionan, además de con otras estructuras celulares (ADN, proteínas, etc.) con los ácidos grasos libres de las membranas celulares en un proceso denominado peroxidación lipídica, y que implica la desestructuración química de la membrana y consecuentemente, el deterioro, en ocasiones irreversible de su función.

El ataque de los radicales a los ácidos grasos insaturados y la peroxidación lipídica en cadena resultante producen una desorganización profunda de la arquitectura de las membranas (Fig. 5): destrucción de dobles enlaces carbono-carbono, entrecruzamientos intra e inter-moleculares (Kupcsulik et al., 1979; Gerson, 1985; Freeman et al., 1986).



**Fig. 5 ALTERACIONES EN LAS MEMBRANAS CELULARES INDUCIDAS POR RADICALES LIBRES.**

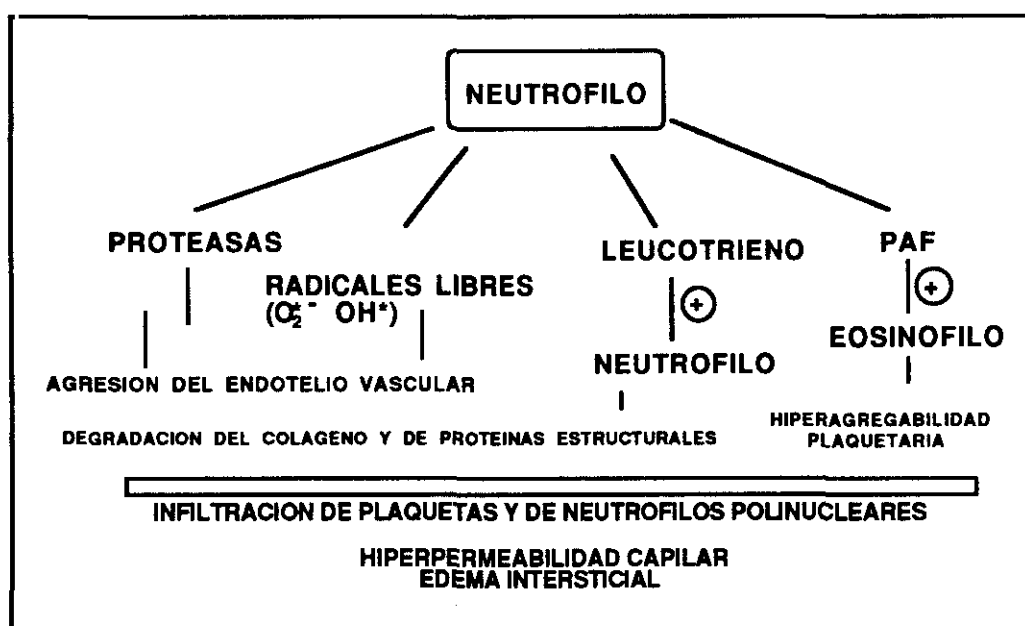
Los radicales libres interaccionan con los componentes de las membranas celulares alterando su estructura molecular, formando enlaces inter e intracatenarios entre sus componentes y/o produciendo elementos citotóxicos interviniendo en reacciones de degradación.

### 1.12. RADICALES LIBRES E INFLAMACION

La activación de polimorfonucleares neutrófilos se acompaña de una producción de radicales libres (Mc Cord et al., 1982). Su difusión en el entorno extracelular de los leucocitos activados desempeña un papel importante en el proceso inflamatorio.

Los mediadores de la inflamación (complejos inmunes, fracción C5a del complemento, leucotrienos B4, ..... ) desencadenan una migración y activación de los polinucleares neutrófilos (Lucchesy, 1986; Ortiz-Lacorzana et al., 1992) comparable a la observada, bajo inducción de productos bacterianos, en la fagocitosis .

Los polinucleares estimulados se adhieren al endotelio vascular. Estos pueden migrar a través de los tejidos (Fig. 6). Aumentando su consumo de oxígeno, activan la NADPH-oxidasa de membrana con producción de radicales libres (Welbourn et al., 1991).



**Fig. 6 REACCION INFLAMATORIA: CONSECUENCIAS DE LA LIBERACION DE RADICALES LIBRES.**

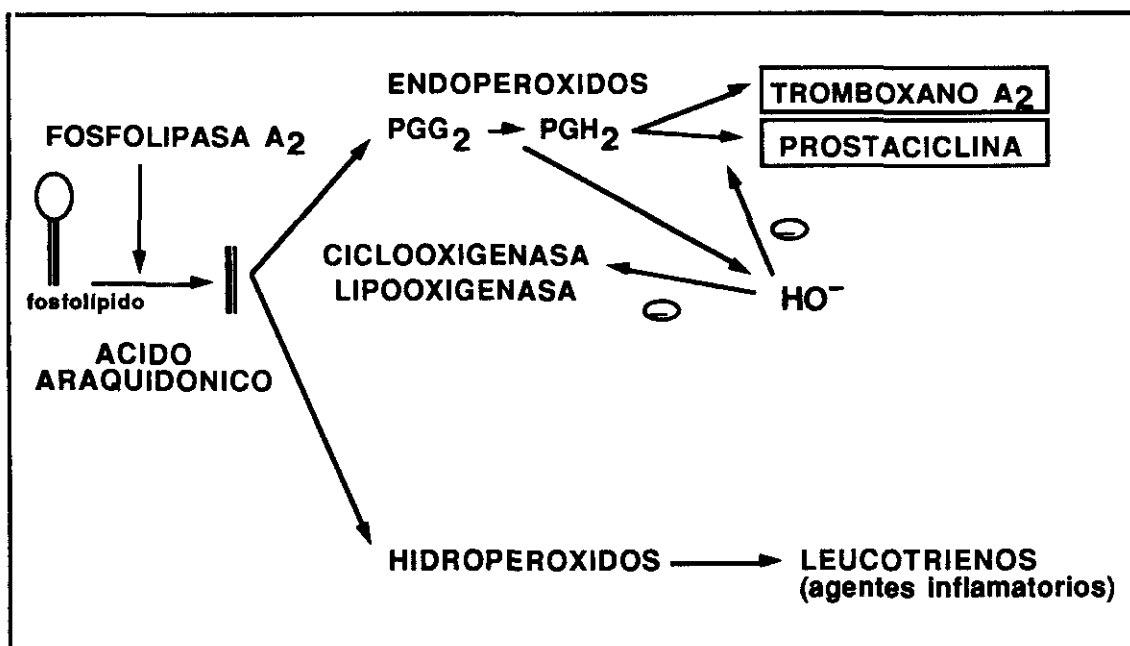
Durante la isquemia-reperfusión se producen señales citoquímicas que inducen la agregación y adhesibilidad de neutrófilos mononucleares sobre el endotelio vascular del órgano afectado. Estos neutrófilos aportan su propia fuente de radicales libres en una cadena de sucesos muy similar a la que se produce en la reacción inflamatoria.

Implicados en el proceso de fagocitosis, estos radicales libres son utilizados como agentes antibacterianos (Gabig et al., 1981) .

En el medio extracelular, inician, mantienen y amplifican la reacción inflamatoria (Weisigen, 1986; Jaesche et al., 1990. Lemaster y Thurman, 1991).

Además de la activación de la NADPH-oxidasa de membrana, la respuesta del polinuclear activado comporta una producción de Factor Activante Plaquetario (PAF), leucotrienos, y metabolitos del ácido araquidónico por la vía enzimática de la lipooxigenasa (Fig. 7) (Tribble et al., 1987; Ueda et al., 1987) .

La liberación de radicales libres oxigenados, de proteasas, de leucotrienos y de PAF desencadena un conjunto complejo de acontecimientos interactivos que constituyen la reacción inflamatoria (Mc Cord et al., 1982).



**Fig. 7 RADICALES LIBRES E HIPERAGREGABILIDAD PLAQUETARIA.**

La activación de fosfolipasas durante la isquemia-reperfusión, y una síntesis disminuida de fosfolípidos induce una acumulación del precursor, ácido áraquidónico y la formación de endoperoxidos, fundamentalmente leucotrienos, que favorecen la inducción de reacciones inflamatorias y la agregación plaquetaria al inhibirse la ruta de formación de prostaglandinas por acción del radical hidroxilo ( $\text{HO}^\bullet$ ).

#### **1.12.1. Agresión del endotelio vascular.**

Las células endoteliales, en contacto directo con los polinucleares activados que se adhieren a sus membranas, son las más sensibles a la acción citotóxica de los radicales libres. Hay una peroxidación lipídica de las membranas celulares, y a nivel intracelular oxidación de las proteínas y de los ácidos nucleicos (Lucchesy et al., 1986. Matsumoto y Nakamura, 1991).

#### **1.12.2. Hiperagregabilidad plaquetaria.**

De entre los trastornos metabólicos inducidos, las repercusiones del ataque de los radicales libres sobre la cascada del ácido araquidónico consisten en un aumento de tromboxano A<sub>2</sub>, responsable de la hiperagregación plaquetaria (Anderson et al., 1991). Este efecto parece estar relacionado con la acción moduladora ejercida por el óxido de nitrógeno sobre el endotelio vascular (Kanner et al, 1992)

### **1.12.3. Aumento de la permeabilidad capilar con edema intersticial.**

Las células intersticiales lesionadas, incluso lisadas, presentan fugas líquidas más o menos ricas en elementos. Es la hiperpermeabilidad capilar con edema intersticial constantemente asociada a las reacciones inflamatorias (Halliwell et al., 1988. ).

### **1.13. MODELO QUIRURGICO EXPERIMENTAL DE ISQUEMIA-REPERFUSION EN EL HIGADO DE RATA.**

#### **1.13.1. Modelos existentes.**

Los modelos empleados actualmente para el estudio experimental del síndrome de isquemia-reperfusión hepático pueden clasificarse en tres tipos:

- a) Modelos *in vivo*.
- b) Modelos *ex vivo*.
- c) Modelos *in vitro*.

Los modelos *in vivo* suelen implicar la intervención quirúrgica del animal de experimentación y consisten en interrumpir, de manera total (Mc Cord, 1983; Marubayashi et al., 1986) o parcial (Hayashi et al., 1986; Reilly et al., 1991), la entrada de sangre en el hígado, y por tanto, de oxígeno y nutrientes. Esto se consigue en la práctica mediante el pinzamiento oclusivo de todas o algunas de las ramas vasculares del sistema portal, o bien por derivación portosistémica del flujo sanguíneo (Nordström et al., 1985) por medio de la anastomosis porto-cava, o estableciendo una derivación portosistémica externa (p.e. porto-femoral, porto-yugular...). Estos modelos son los más utilizados por ser los que mejor simulan la situación que se presenta en la clínica; sin embargo, requieren práctica quirúrgica y, además, algunos de estos modelos producen efectos no deseados, debidos a la interrupción del flujo portal (Reilly et al., 1991), que entorpecen en gran medida el estudio de la isquemia hepática como suceso individual (Nauta et al., 1990; 1991).

Los modelos *ex vivo* consisten en la extracción quirúrgica del hígado y su perfusión con soluciones fisiológicas, variando el contenido en oxígeno de las

mismas a fin de simular el fenómeno isquémico y de reperfusión (Lemaster et al., 1985; Marotto et al., 1988). En este caso se estudia el líquido que efluye del hígado y el tejido, a fin de conocer la respuesta del órgano aislado frente a distintos grados de anoxia. Este método es relativamente sencillo y reproducible en la práctica. Su desventaja fundamental reside en su alejamiento de la realidad, ya que el hígado es un órgano interactivo cuya alteración no puede separarse de los efectos causados por la misma sobre el resto del organismo, el cual respondera en mayor o menor grado a la alteración hepática (Fredericks, 1983).

En los modelos *in vitro* se utilizan suspensiones de hepatocitos aislados en un medio de cultivo (Kupcsulik et al., 1879) oxigenado en concentraciones variables, y se estudia la respuesta de los hepatocitos, a los distintos grados de hipoxia (Cardenas et al., 1981; Gerson et al., 1985; von Ruecker et al., 1989). Es un modelo sencillo y reproducible, sin embargo, de la misma manera que los modelos *ex vivo*, se aleja de la situación clínica, ya que ignora la interrelación existente entre el hígado y el resto de órganos.

#### **1.13.1. Características que debe reunir el modelo quirúrgico experimental.**

Debido a la multiplicidad de factores implicados en el síndrome de isquemia-reperfusión, la mayoría de ellos desconocidos y de estudio muy reciente, no existe un criterio común entre los distintos grupos de trabajo sobre qué modelo debe utilizarse como referencia en el estudio del síndrome de isquemia-reperfusión del hígado, empleando cada grupo aquel que más se adapta a los objetivos de su estudio. Sin embargo, las condiciones que debe reunir el modelo están cada vez más delimitadas ( Hayashi et al., 1986) y podemos resumirlas en las siguientes:

- a) El modelo debe reproducir con fidelidad la mayoría de los fenómenos que tienen lugar en la presentación clínica del síndrome de isquemia-reperfusión hepático y, las distintas manifestaciones del mismo en el resto de órganos y sus interrelaciones.
- b) El modelo ha de ser sencillo, reproducible y económico.
- c) La manipulación del hígado ha de ser mínima a fin de reducir en lo posible las interferencias y alteraciones introducidas por dicha manipulación a lo largo del estudio experimental.

Para el desarrollo de nuestro trabajo hemos utilizado un modelo de isquemia parcial en hígado de rata (Fredericks, 1983; Hayashi et al., 1986), que imita mejor que otros modelos el fenómeno clínico manteniendo la interdependencia entre el hígado y otros órganos implicados. La razón de elegir un modelo de isquemia parcial, y no global, se fundamenta principalmente en que la rata no sobrevive a tiempos prolongados de isquemia global, ya que la hipertensión portal en este animal produce una hipotensión severa que le causa la muerte (Jaesche et al., 1990). Además la interrupción total del flujo portal interrumpe también el drenaje mesentérico y esplénico, provocando la isquemia de estos órganos, fenómenos que se sumarían al de la isquemia hepática y alterarían los resultados analíticos obtenidos en los ensayos (Hasselgren, 1987). Como consecuencia de la isquemia global, se produce en la reperusión una acidosis metabólica considerablemente elevada y suficiente para causar la muerte del animal para tiempos superiores a sesenta minutos. Estos fenómenos indeseables no ocurren en el modelo de isquemia parcial, ya que el flujo portal se deriva por los lóbulos derechos lo que nos permite ampliar los tiempos y la supervivencia del animal de manera considerable (Hayashi et al., 1986; Navidad Novalvos et al., 1992a).

#### **1.14. INTOXICACION POR ETANOL EN EL HIGADO POST-ISQUEMICO.**

Está establecido que la ingesta de alcohol en grandes cantidades, o de forma crónica, produce alteraciones en el hígado que pueden llegar a ser irreversibles y causar la muerte (Lieber, 1980; 1991b). Sin embargo, aunque se conoce el metabolismo del alcohol (Lieber, 1991a), no están del todo establecidos los mecanismos causantes de los efectos perjudiciales sobre el organismo, atribuyéndose estos efectos a alteraciones en la dieta (Chow, 1987. Bonjour, 1979. Lieber, 1991c), generación excesiva de NADH en hígado (Egea Arquillué et al., 1988), alteraciones en el metabolismo intermediario de lípidos (Lieber et al. 1965), carbohidratos y de la síntesis proteica (Baraona et al., 1977, 1980).

El acetaldehído, un producto del metabolismo del etanol, puede unirse a la cisteína (Nordström et al., 1990. Lieber, 1992a) y/o al glutatión favoreciendo la peroxidación al disminuir las defensas celulares contra los radicales libres (Schuckit, 1979). Teóricamente, el incremento de actividad de la NADPH microsomal del hígado después del consumo de etanol, incrementa la producción de  $H_2O_2$  (Pompella et al., 1987), induciendo así peroxidación lipídica. Esta

inducción de la peroxidación lipídica durante el consumo crónico de etanol parece ser dependiente de la dosis, no observándose incremento de la peroxidación lipídica en ratas para concentraciones de etanol inferiores a 3-6 g/kg/día (Lieber, 1980; 1991b).

Se ha estudiado este aspecto estableciendo relaciones entre la situación de estrés oxidativo producido tras la reperusión del hígado isquémico, y la producida por el consumo crónico de etanol (Navidad Novalvos et al., 1992c); a fin de establecer, una relación entre ambas situaciones, y su posible sinergismo (Kawase et al., 1989).

#### **1.15. FACTOR DE CRECIMIENTO DE HIGADO E ISQUEMIA HEPATICA.**

El factor de crecimiento de hígado (LGF) purificado tanto de plasma de ratas parcialmente hepatectomizadas como de plasma de enfermos con trastornos hepatobiliares (Diaz Gil et al., 1986a,b) es un mitógeno específico para hepatocitos. Se ha propuesto que el LGF juega un papel fisiológico en la regeneración hepática (Diaz Gil et al., 1987a). El LGF ha sido caracterizado químicamente como un complejo albumina-bilirrubina (Diaz Gil et al., 1987b).

Por otro lado, se ha demostrado, que a diferencia de otros posibles factores de regeneración hepática, como el HGF (Nakamura et al., 1986. Gohda et al., 1988. Matsumoto y Nakamura, 1992) o la Hepatopoyetina A (Michalopoulos et al., 1985), el LGF, es eficaz como secuestrador de radicales libres tanto en hepatocitos aislados, como en miocitos de ventrículo humano (Wu T.-W et al., 1991b) demostrando un poder como antioxidante superior incluso al del  $\alpha$ -tocoferol (Wu T.-W et al., 1991a).

Varios estudios han pretendido analizar las posibles variaciones del LGF en suero de rata en relación al proceso de isquemia reperusión, considerando tanto su papel como secuestrador de radicales libres (Stocker et al., 1987a,b) como el de promotor de la regeneración hepática (Diaz Gil et al., 1986a,b; Slater et al., 1990).

#### **1.16. PROTECCION FARMACOLOGICA EN LA ISQUEMIA HEPATICA.**

Los modelos experimentales de shock y de isquemia hepática (Parks et al., 1983a; Anderson et al., 1991) han tenido una importancia decisiva en el desarrollo de estrategias farmacológicas encaminadas a la protección y

preservación del órgano isquémico. Estos modelos han suministrado datos *fundamentales sobre los acontecimientos celulares y moleculares que tienen lugar al reducir o suprimir el aporte de oxígeno a un órgano determinado* (Chaudry, 1983).

La posibilidad de modificar o corregir estos efectos deletéreos por medio de agentes farmacológicos es una deducción lógica e inmediata (Toledo-Pereyra et al., 1975; Ontel et al., 1989).

El estudio de la protección y preservación del órgano isquémico constituye actualmente la línea de experimentación más prolífica (Gao et al., 1991. Takei et al., 1991).

Los principales fármacos utilizados en modelos de isquemia y/o preservación se resumen a continuación agrupados según el mecanismo de acción propuesto:

#### **NUCLEOTIDOS DE ADENINA:**

##### **\* MgCl<sub>2</sub>ATP**

Utilizado hace tiempo en algunos trabajos experimentales como reserva energética (Flye, 1987), en la actualidad se ha demostrado su ineficacia, y su capacidad para inducir citotoxicidad (Zoetewij, 1993).

##### **\* Inosina**

Administrada antes de la isquemia aumenta la reserva de nucleótidos (Grudman, 1982).

##### **\* ADP**

Junto a otros nucleótidos aumenta la función renal post-isquémica (Siegel, 1980).

##### **\* 2-Deoxicoformacina**

Inhibe la desaminación de la adenosina, conservando mejor sus niveles celulares (D'Alessandro et al., 1986).

### **ESTABILIZADORES LISOSOMALES. INHIBIDORES ENZIMATICOS:**

#### **\* Glucocorticoides**

Su eficacia es controvertida, demostrando efectos beneficiosos en algunos casos (Miller et al., 1973) e ineficaces o incluso perjudiciales en otros (Dvorak et al., 1976).

#### **\* Leupeptina y pepsatina**

Inhibidores de proteasas lisosomales eficaces en la isquemia hepática (Schneider et al., 1983).

### **REDUCTORES E INHIBIDORES DE LOS RADICALES LIBRES:**

#### **\* CoQ10**

Su mecanismo de acción parece residir en la inhibición de la peroxidación lipídica de los ácidos grasos poliinsaturados de membrana (Cotgrave et al., 1988), manteniendo la homeostasis del calcio y la restauración de la función mitocondrial (Sumimoto et al., 1990).

#### **\* Catalasa y Superóxido dismutasa**

*Captadores específicos de radicales libres que han demostrado su eficacia en la isquemia cuando son suministrados conjuntamente* (Hasselgren, 1987; Chiu et al., 1987). El óxido de nitrógeno parece ejercer, sobre el endotelio vascular, una acción similar a la ejercida por la superóxido dismutasa dentro de la célula (Kanner et al., 1992. Samuni et al. 1991).

#### **\* $\alpha$ -tocoferol y glutathione**

Disminuye considerablemente la peroxidación lipídica de las membranas celulares (Bisby, 1990; Marubayashi et al., 1986). Ejerce un importante papel en la regulación del metabolismo del glutathione (Santiago Delpin et al., 1975). Como el  $\alpha$ -tocoferol, el glutathione, es un antioxidante con capacidad para captar radicales libres (Marubayashi et al., 1987), ejerciendo un importante papel en las reacciones de peroxidación de lípidos (Casini et al., 1985; Lenz et al., 1989).

### **BLOQUEANTES DEL CALCIO:**

#### **\* Verapamilo.**

Este es el más utilizado, ejerce su acción bloqueando la activación de proteasas calcio-dependientes (Nauta et al., 1991). En lo que se refiere a la generación de radicales libres del oxígeno, inhibiría a la xantina-oxidasa impidiendo la generación del radical superóxido y sus productos de reacción (Ontel et al., 1989).

### **AGENTES VASODILATADORES:**

#### **\* Dopamina**

En dosis inferiores a 10 mg/Kg/min ejerce efectos beneficiosos sobre el flujo sanguíneo. Se han descrito efectos sobre la recuperación de la síntesis proteica (Hasselgren et al., 1983).

#### **\* Prostaglandinas**

La PGE1 parece ejercer efectos beneficiosos sobre el endotelio vascular (Ueda et al., 1987) y la hiperagregabilidad plaquetaria que en ocasiones se produce tras la reperfusión.

### **OTROS FARMACOS:**

\* Clorpromacina. Mejora significativamente la función mitocondrial post-isquémica. Aunque sus efectos beneficiosos se han atribuido al bloqueo de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  y a una cierta estabilización lisosomal (Chien et al., 1977). Su principal mecanismo protector parece residir en una acción de mantenimiento de la integridad de membranas celulares por inhibición de fosfolipasas (Blackwell et al., 1983; Borowitz, 1989).

\* Pentoxifilina. No se ha ensayado su acción en la isquemia hepática hasta ahora, aunque si en situaciones de shock hemorrágico (Wasman et al., 1991). La Pentoxifilina reduce la viscosidad de la sangre, posiblemente, incrementando la deformabilidad de los eritrocitos y disminuyendo la agregación plaquetaria. También mejora la oxigenación de los tejidos isquémicos, por lo que se usa terapéuticamente en los trastornos de la circulación periférica e incluso en casos de claudicación intermitente. También se ha demostrado su capacidad para inhibir la transcripción del gen de Factor de Necrosis Tumoral(TNF) implicado entre otros en la isquemia tisular.

## **2.HIPOTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS**

## **2. HIPOTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS:**

### **HIPOTESIS DE TRABAJO**

Los complejos procesos que acompañan al estrés oxidativo que se produce como consecuencia de la reperfusión de un órgano isquémico producen la alteración de numerosas estructuras celulares y su función. La descomposición peroxidativa de los lípidos de las membranas celulares, y los cambios asociados a sus propiedades, se consideran con frecuencia como la base del daño celular.

Es necesario por tanto, profundizar en el estudio de la isquemia hepática caliente y los fenómenos asociados que tienen lugar durante la revascularización del órgano.

Por lo tanto, en la presente tesis nos hemos propuesto los siguientes objetivos:

## **OBJETIVOS**

- 1.- Estudio de la influencia de la duración de la isquemia en la funcionalidad del hígado una vez reperfundido: Definición del "punto de no retorno".
- 2.- Estudio del efecto de la isquemia hepática sobre el estrés oxidativo producido por el consumo crónico de etanol.
- 3.- Valoración de la influencia de la peroxidación lipídica en la regeneración post-isquémica del hígado, mediada por el factor de crecimiento de hígado (LGF).
- 4.- Análisis del efecto de la pentoxifilina y la clorpromazina en la regulación farmacológica del daño producido durante la isquemia-reperfusión del hígado.

### **3. MATERIAL Y METODOS**

### 3. MATERIAL Y METODOS

#### 3.1. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

##### 3.1.1. ELECCION DE UN MODELO QUIRURGICO DE ISQUEMIA-REPERFUSION HEPATICA EN HIGADO DE RATA.

Con el propósito de estudiar el fenómeno de isquemia-reperfusión hepática "in vivo", y como consecuencia de las consideraciones sobre los distintos modelos empleados con tal fin, y comentados en la introducción, hemos creído conveniente comenzar el presente trabajo comparando los modelos quirúrgicos experimentales de *isquemia hepática completa* (**Modelo I**) y de *isquemia hepática parcial* (**Modelo II**).

##### DESCRIPCION DE LOS MODELO QUIRURGICOS EXPERIMENTALES DE ISQUEMIA HEPATICA COMPLETA (Modelo I) Y PARCIAL (Modelo II).

Para el desarrollo del modelo quirúrgico experimental se utilizaron 42 ratas macho tipo Wistar de pesos comprendidos entre 200 y 250 g, alimentadas "ad libitum".

Las ratas fueron anestesiadas por inyección (i.p.) de una mezcla de clorhidrato de ketamina (Ketolar. Parke-Davis) , diacepan (Valium. Roche) y sulfato de atropina (Atropina. Palex S.A.) en una proporción de volúmenes de 1/0,8/0,2 empleando dosis de 0,25 ml / 100 g.

Se realizó una laparotomía accediendo por la línea media desde el xifoides hasta la zona media del abdomen. El hígado se liberó del diafragma cortando el ligamento falciforme, y los lóbulos medio e izquierdo se extrajeron volteándolos sobre el tórax para exponer el hilio hepático y sus ramas vasculares. Se aislaron entonces las ramas arterio-venosas de los lóbulos hepáticas disecándolas y pasando a su alrededor un lazo doble de sutura de seda de 3-0. Antes de interrumpir el flujo sanguíneo se anticoaguló al animal por inyección endovenosa de heparina (Heparina 1%. Laboratorios Leo S.A.) , en dosis de 40 ui / 100 g en la vena dorsal del pene . Se realizaron dos modelos de inducción de isquemia experimental en el hígado: uno de isquemia completa por oclusión de la totalidad de las ramas vasculares del hilio hepático (**Modelo I**) y otro de isquemia parcial

por oclusión de las ramas vasculares de los lóbulos izquierdo y medio (**Modelo II**), en este modelo de isquemia parcial, el flujo sanguíneo a través de la porta y la arteria hepática no queda totalmente interrumpido, sino que se deriva a través de los lóbulos derechos, evitando de esta manera, los efectos negativos del éstasis sanguíneo del sistema portal. La isquemia conseguida mediante esta técnica de isquemia parcial afecta al 75-80 % de la masa hepática total.

La reperfusión del órgano se efectuó retirando el lazo de sutura y reponiendo los líquidos perdidos mediante inyección intraperitoneal de 3 ml. de suero salino fisiológico.

En ambos modelos el tiempo de isquemia fue de 30 minutos, reperfundiéndose después los lóbulos isquémicos durante 15 minutos.

Al término de cada una de las experiencias los animales fueron sacrificados por medio de una inyección de tiopental sódico i.p. en sobredosis.

### **Valoraciones**

Se hizo en cada caso un estudio completo de la bioquímica sérica y de los valores de gasometría arterial.

### **GRUPOS DE TRABAJO**

#### **GRUPO CONTROL.**

En este grupo se realizó una operación ficticia en la que los animales eran anestesiados, practicándoseles una laparatomía, pero sin proceder a la inducción de isquemia. El número de animales empleados fue de 10.

#### **GRUPO I. ENSAYO DE ISQUEMIA COMPLETA.**

##### **Subgrupo de Isquemia IA.**

En este subgrupo los animales fueron sometidos a una isquemia completa de 30 minutos, al término de la cual eran exanguinados por inyección de la aorta

abdominal para la obtención de muestras séricas. El número total de animales empleados fue de 8.

#### **Subgrupo de Isquemia-Reperfusión IB.**

En este subgrupo 8 animales fueron sometidos a una isquemia completa de 30 minutos y una posterior perfusión del órgano de 15 minutos, momento en que los animales fueron exanguinados por la aorta abdominal para la obtención de muestras séricas.

### **GRUPO II. ENSAYO DE ISQUEMIA PARCIAL.**

#### **Subgrupo de Isquemia IIA.**

En esta ocasión a 8 animales se les indujo la isquemia de los lóbulos hepáticos medio e izquierdo durante 30 minutos, al término de los cuales, los 8 animales fueron exanguinados por la aorta abdominal.

#### **Subgrupo de Isquemia-Reperfusión IIB.**

Se indujo una isquemia parcial de 30 minutos, tras los cuales, se restableció el flujo sanguíneo de los lóbulos sometidos a isquemia, exanguinando a los 8 animales tras 15 minutos de perfusión para la obtención de muestras séricas.

| GRUPOS  | ISQUEMIA | REPERFUSION | n  |
|---------|----------|-------------|----|
| CONTROL | 0 MIN.   | 0 MIN.      | 10 |
| IA      | 30 MIN.  | 30 MIN.     | 8  |
| IIA     | 30 MIN.  | 15 MIN.     | 8  |
| IB      | 30 MIN.  | 0 MIN.      | 8  |
| IIB     | 30 MIN.  | 15 MIN.     | 8  |

A = MODELO DE ISQUEMIA COMPLETA

B = MODELO DE ISQUEMIA PARCIAL

### **3.1.2. ESTUDIO DE LA RELACION ENTRE LA DURACION DE LA ISQUEMIA HEPATICA Y EL DAÑO PRODUCIDO EN EL ORGANO REPERFUNDIDO.**

En este ensayo se pretendió estudiar en qué forma la duración de la isquemia afectaba a la función hepatocelular después de la reperfusión del hígado. Se estudió en los parametros valorados al término de cada uno de los periodos de isquemia una relación matemática que nos sirva de valor predecitivo del futuro estado del hígado después de su reperfusión, sobre todo en las primeras etapas de la misma. Por otro lado, la calidad de la reperfusión, se objetivó por inyección i.v. de fluoresceína sódica, antes de la revascularización, y posterior exposición de los lóbulos, una vez revascularizados, a una fuente de luz ultravioleta, con el fin de excluir de los diferentes ensayos, aquellos hígados, que por una u otra razón, no se habían reperfundido, tras la retirada del lazo de sutura, inductor de la isquemia.

Se utilizaron 50 ratas Wistar, macho, de pesos comprendidos entre 200 y 250 g y alimentadas "ad libitum". A todas ellas se les indujo una isquemia parcial del hígado, según el modelo quirúrgico experimental descrito en el apartado 3.1., estableciéndose los siguientes grupos de trabajo:

#### **CONTROLES**

**Subgrupo I a.-** Grupo de animales sometidos a una operación ficticia de 15 seg. de isquemia, al término de la cual se obtenían muestras sanguíneas para análisis séricos.

**Subgrupo I b.-** Grupo de animales sometidos a una operación ficticia de 15 seg. de isquemia y 15 min. de reperfusión, al término de la cual se obtenían muestras séricas.

#### **GRUPOS DE ISQUEMIA PARCIAL (a) Y DE ISQUEMIA-REPERFUSION (b)**

**Subgrupo II a.-** Grupo de animales sometidos a una isquemia parcial de 15 min. de duración, al término de la cual se obtenían muestras séricas.

**Subgrupo II b.-** Grupo de animales sometidos a una isquemia parcial de 15 min. de duración seguida de 15 min. de reperfusión, al término de la cual se obtenían muestras séricas.

**Subgrupo III a.-** Grupo de animales sometidos a una isquemia parcial de 30 min. de duración, al término de la cual se obtenían muestras séricas.

**Subgrupo III b.-** Grupo de animales sometidos a una isquemia parcial de 30 min. de duración seguida de 15 min. de reperfusión, al término de la cual se obtenían muestras séricas.

**Subgrupo IV a.-** Grupo de animales sometidos a una isquemia parcial de 60 min. de duración, al término de la cual se obtenían muestras séricas.

**Subgrupo IV b.-** Grupo de animales sometidos a una isquemia parcial de 60 min. de duración seguida de 15 min. de reperfusión, al término de la cual se obtenían muestras séricas.

**Subgrupo V a.-** Grupo de animales sometidos a una isquemia parcial de 120 min. de duración, al término de la cual se obtenían muestras séricas.

**Subgrupo V b.-** Grupo de animales sometidos a una isquemia parcial de 120 min. de duración seguida de 15 min. de reperfusión, al término de la cual se obtenían muestras séricas.

En todos los grupos las muestras se obtuvieron por exanguinación a través de la vena yugular, en los tiempos de isquemia, y de isquemia-reperfusión indicados en cada caso.

| GRUPOS | ISQUEMIA | REPERFUSION | n |
|--------|----------|-------------|---|
| Ia     | 15 seg.  | 0 min.      | 5 |
| Ib     | 15 seg.  | 15 min.     | 5 |
| IIa    | 15 min.  | 0 min.      | 5 |
| Ib     | 15 min.  | 15 min.     | 5 |
| IIIa   | 30 min.  | 0 min.      | 5 |
| IIIb   | 30 min.  | 15 min.     | 5 |
| IVa    | 60 min.  | 0 min.      | 5 |
| IVb    | 60 min.  | 15 min.     | 5 |
| Va     | 120 min. | 0 min.      | 5 |
| Vb     | 120 min. | 15 min.     | 5 |

a = muestra de sangre obtenida al término de la isquemia

b = muestra de sangre obtenida al término de la reperfusión

## **Valoraciones.**

Los parámetros séricos estudiados fueron las enzimas hepáticas GOT, GPT, LDH y fosfatasa alcalina. Se determinaron también las concentraciones séricas de ácido úrico y de dialdehído malónico (MDA). También se determinaron concentraciones de ATP en tejido hepático. En todos los ensayos, se verificó que los lóbulos sometidos a isquemia, eran realmente reperfundidos mediante la inyección de fluoresceína sódica i.v. momentos antes de la revascularización de los lóbulos isquémicos.

### **3.1.3. VALORACION DE LA INFLUENCIA DE LA ISQUEMIA EN UNA SITUACION DE ESTRES OXIDATIVO HEPATICO INDUCIDA POR LA ADMINISTRACION CRONICA DE ETANOL.**

El consumo crónico de etanol , a determinadas dosis, y dependiendo del tiempo de exposición al tóxico, crea en el hígado una situación de estrés oxidativo, detectable por un incremento de la peroxidación lipídica, que podemos valorar, tanto en el tejido hepático, como en suero de la sangre de las ratas intoxicadas.

Otra situación, inductora de estrés oxidativo hepático, es la creada durante la isquemia y posterior reperfusión del hígado, conocido por "daño por reperfusión" debido a la generación de especies reactivas de oxígeno (radicales libres).

El propósito de éste ensayo fue valorar la situación de estrés oxidativo inducida por ambas situaciones, y su posible sinérgismo o dependencia.

El motivo de administrar el etanol por vía oral, en dosis fijas, y no añadido a una dieta líquida, fue controlar la dosis diaria de etanol ingerida al día a fin de establecer relaciones temporales con las alteraciones inducidas por la isquemia-reperfusión.

También se estudió la posible modulación farmacológica de éste fenómeno valorando el efecto de la administración de un antioxidante fisiológico, el  $\alpha$ -tocoferol.

Se utilizaron 90 ratas Wistar, de pesos comprendidos entre 200 y 250 g al comienzo del experimento. Durante la duración del estudio los animales se alimentaron "ad libitum".

## **GRUPOS DE TRABAJO**

Se compararon dos situaciones de estrés oxidativo hepático: el consumo crónico de etanol y la reperfusión del hígado después de un tiempo de isquemia. Para ello, se realizaron los siguientes grupos de trabajo.

### **GRUPO A: CONTROL**

Se administraron dosis diarias de 1 ml de agua por vía oral por medio de una cánula bajo anestesia ligera con éter. El número de animales utilizados fue de 18. Este grupo se utilizó como control.

### **GRUPO B: TRATAMIENTO CON ETANOL**

De la misma forma que en grupo control, el etanol se administró por vía oral con una cánula, bajo anestésia ligera con éter, y en dosis diarias de 2,4 g de etanol / Kg. El número de animales utilizados fue de 18.

### **GRUPO C: ISQUEMIA-REPERFUSION MAS TRATAMIENTO CON ETANOL**

Se indujo una isquemia hepática completa de diez minutos y posterior reperfusión del órgano, según el protocolo descrito en el apartado 3.1., administrandose dosis diarias de 2,4 g de etanol / Kg por via oral , desde los 30 min. de reperfundido el órgano. El tratamiento con etanol se mantuvo durante 14 semanas. El número de animales utilizados fue de 18.

### **GRUPO C: TRATAMIENTO CON ETANOL Y $\alpha$ -TOCOFEROL**

Se administraron dosis diarias de 2,4 g de etanol / Kg por via oral. Además, se administraron dosis diarias de 100 mg de  $\alpha$ -tocoferol (Ephynal. Roche S.A.) por vía intraperitoneal, desde los cinco días anteriores a la administración de etanol y durante el resto del experimento. El número de animales utilizados fue de 18.

### **GRUPO E: ISQUEMIA-REPERFUSION, TRATADO CON ETANOL Y $\alpha$ -TOCOFEROL**

Se indujo una isquemia hepática completa de diez minutos y posterior reperfusión del órgano, administrándose entonces, dosis diarias de 2,4 g de etanol / Kg por vía oral, desde los 30 min. de reperfundido el órgano hasta el final del estudio. Además, se administraron dosis diarias de 100 mg de  $\alpha$ -tocoferol, por vía intraperitoneal, desde los cinco días anteriores a la administración de etanol y durante el resto del experimento. El número de animales utilizados fue de 18.

| GRUPOS  | ISQUEMIA | ETANOL | $\alpha$ -TOCOFEROL | n  |
|---------|----------|--------|---------------------|----|
| GRUPO A | NO       | NO     | NO                  | 18 |
| GRUPO B | NO       | SI     | NO                  | 18 |
| GRUPO C | SI       | SI     | NO                  | 18 |
| GRUPO D | NO       | SI     | SI                  | 18 |
| GRUPO E | SI       | SI     | SI                  | 18 |

### **Valoraciones**

El estrés oxidativo producido en cada una de las situaciones se valoró mediante la cuantificación semanal de las concentraciones séricas de MDA, desde la cuarta semana de comenzada la administración de etanol, hasta seis semanas después de suspendido el tratamiento (semana décimo cuarta). También se consideró la mortalidad en cada grupo a las cuatro semanas de comenzado el tratamiento con el fin de que la posterior toma de muestras sanguíneas no influyese en su valoración.

#### **3.1.4. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA ISQUEMIA EN LA SINTESIS DEL FACTOR DE CRECIMIENTO DE HIGADO (LGF).**

La  $\delta$ -bilirrubina, aislada de suero de ratas hepatectomizadas, es un aducto formado por la unión de bilirrubina y albúmina, capaz de estimular la mitosis de hepatocitos, tanto in vivo, como in vitro, por lo que se la ha llegado a denominar Factor de Crecimiento Hepático (LGF). Recientemente se ha demostrado, en cultivos de hepatocitos y de miocitos de ventrículo humano, que ésta bilialbúmina es capaz de ejercer un importante función como antioxidante en situaciones de estrés oxidativo, incluso superior a la ejercida por el  $\alpha$ -tocoferol, no habiéndose demostrado esta capacidad en otros factores de crecimiento hepático, tales como, el HGF o la Hepatoyetina A.

El objetivo del presente trabajo fue valorar *in vivo* la capacidad antioxidante de la  $\delta$ -bilirrubina en una situación de estrés oxidativo, como es, la isquemia-reperfusión hepática.

Se utilizaron 35 ratas Wistar hembras de 80 a 100 g de peso alimentadas "ad libitum".

### **Procedimiento**

A cada una de las ratas se les indujo quirúrgicamente una isquemia de los lóbulos hepáticos izquierdo y medio (70 % de la masa hepática aprox.) durante 70 minutos, momento en el cuál el hígado fue reperfundido.

Se tomaron muestras hepáticas del hígado isquémico y de los lóbulos derechos (sanos), así como muestras sanguíneas, a tiempo 0, y a los 5, 60 y 70 minutos de isquemia, y a los 5, 15 y 60 minutos de perfusión, utilizando para cada uno de los tiempos grupos de cinco animales.

### **Valoraciones**

Se valoraron las concentraciones de  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\delta$ -bilirrubina en suero. También se valoraron las concentraciones de MDA en los lóbulos hepáticos sometidos a isquemia-reperfusión, comparándola con la observada en los lóbulos derechos, que no sufrieron isquemia.

#### **3.1.5. ESTUDIO DE LA PROTECCION FARMACOLOGICA DEL HIGADO ISQUEMICO: EFECTO DE LA CLORPROMAZINA Y DE LA PENTOXIFILINA.**

El proceso de isquemia, y posterior perfusión, crea en el hígado toda una serie de efectos deletéreos que pueden limitar, e incluso anular, las posibilidades de viabilidad del hígado afectado. Por lo tanto, la posibilidad de paliar estos efectos no deseables mediante una modulación farmacológica de los mismos, parece una deducción inmediata.

El propósito del presente ensayo fue comparar la posible acción terapéutica de dos fármacos; un bloqueante de calcio, como la clorpromazina, que también actúa como estabilizante lisosomal e inhibidor de las fosfolipasas, siendo un

fármaco ya ensayado en múltiples trabajos como protector hepático durante la isquemia .

Con éste fármaco, comparamos la acción de una metilxantina, denominada pentoxifilina, utilizada en clínica para la terapia de trastornos en la circulación periférica y en casos de claudicación intermitente. Las propiedades de la pentoxifilina se atribuyen, principalmente, a una disminución en la viscosidad de la sangre, y a un incremento en el transporte de oxígeno hacia los tejidos. Este fármaco no había sido ensayado hasta la fecha en casos de isquemia-reperfusión hepática.

Se utilizaron 90 ratas Wistar macho, de pesos comprendidos entre 200 y 250 g y alimentadas "ad libitum".

### **Procedimiento**

A todos los animales se les indujo quirúrgicamente una isquemia de los lóbulos izquierdo y medio de 70 minutos de duración, reperfundiendo después el hígado isquémico por periodos de 2, 6 y 24 horas, momento en el cual se extrajeron muestras de tejido hepático y sangre para su estudio. Con el fin de no interferir en los resultados se utilizaron diez animales para cada uno de los tiempos de perfusión.

### **GRUPOS DE TRABAJO**

#### **GRUPO CONTROL**

Sin tratamiento farmacológico. El número de animales utilizados fue de 30. Este grupo se tomo como control.

#### **GRUPO TRATADO CON PENTOXIFILINA**

Se administró a cada animal, por inyección intraperitoneal, una dosis única de pentoxifilina (Hemovás. Roberts s.a.) (40 mg / Kg) 15 minutos después de la perfusión del hígado isquémico. El número de animales utilizados fue de 30.

## **GRUPO TRATADO CON CLORPROMAZINA**

Se administró a cada animal, por inyección intraperitoneal, una dosis única de clorpromazina (Largactil. Rhone-Poulenc Farma s.a.e.) (250 mg / Kg) 30 minutos antes de producir la isquemia hepática. El número de animales utilizados fue de 30.

### **Valoraciones**

En cada uno de los casos se determinaron, en un autoanalizador, concentraciones en suero de GOT, GPT y LDH, concentración en tejido de MDA y de glutatión reducido. Se determinó el contenido tisular de agua en diversas fases de la isquemia reperusión con el fin de objetivar la existencia de edema hepático, y se realizaron biopsias hepáticas para su estudio anatomopatológico.

### **3.1.6. MANTENIMIENTO Y CUIDADO DE LOS ANIMALES**

Los animales utilizados para el desarrollo de este trabajo se mantuvieron en jaulas a temperatura constante de 18 a 20°C, con un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, y fueron alimentados "ad libitum" con una dieta de pienso en gránulos y agua. La manipulación de los animales se realizó de acuerdo a la normativa dictada en el Real Decreto 223/1988 de 14 de Marzo sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos (BOE nº 67 de Marzo de 1988 p.p. 8509-8512).

### **3.2. DESCRIPCION DE LAS TECNICAS DE VALORACION UTILIZADAS**

#### **3.2.1. ESTUDIO DE LA PEROXIDACION LIPIDICA.**

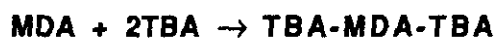
##### **3.2.1.1. DETERMINACION DEL DIALDEHIDO MALONICO**

En los grupos de animales establecidos para tal fin, se determinaron las cantidades presentes en plasma y tejido hepático de dialdehído malónico, uno de los productos metaestables de la rotura peroxidativa de los ácidos grasos polienólicos, parámetro indicativo de la extensión del daño hepatocelular inducido por los

radicales libres producidos durante la reperusión del órgano isquémico. Para ello se utilizó el método descrito por Mitsuru Uchiyama y Midori Mihara (1978), modificado por Jan Pikul et al. (1983), quien recomienda añadir a la mezcla de reacción 2,6-Di-terc-butil-p-cresol (Hidroxitolueno butilado. BHT. Sigma) en disolución alcohólica, a fin de evitar las oxidaciones de los ácidos grasos debidas a que la reacción se produce a 100°C en presencia de oxígeno.

#### **FUNDAMENTO DEL METODO DE DETERMINACION DEL DIALDEHIDO MALONICO (MDA) EN HOMOGENIZADO DE HIGADO.**

Se utilizó el método del Acido tiobarbitúrico (TBA-test). Este método se fundamenta en la reacción producida en medio ácido entre una molécula de MDA y dos de TBA. Esta reacción estequiométrica se produce después de someter la mezcla a una temperatura de 100°C, y pH < 3, durante un tiempo no inferior a 45 minutos, produciéndose un cromóforo (TBA-MDA-TBA), de color rosa, que absorbe a longitudes de onda de aproximadamente 534 nm, según la siguiente reacción:



Las muestras de los hígados obtenidas, tanto de los hígados isquémicos como de los reperfundidos, se homogeneizaron inmediatamente después de su extracción con un aparato Polytron en KCl al 1,15% a 4 °C y en una proporción del 0.5% (p/v), centrifugándolas (Beckman mod. TJ-6 con rotor TH-4) a 3500 rpm durante 20 minutos a 5 °C para obtener el sobrenadante. A 0,14 ml. del sobrenadante se le añade 1 ml. de ácido fosfórico al 1% a fin de acidificar la muestra y poder obtener la reacción de color. Se añaden entonces 0,033 ml de BHT 0,01% para evitar oxidación añadida de la muestra durante su calentamiento posterior y 0,3 ml. de TBA 0,67% para producir la reacción de color. Se prepara un blanco con 0,14 ml de KCl 1,15% y TBA 0,67% ( Acido 2-Tiobarbitúrico. Fluka Chemie). La mezcla se calienta al "baño maría" durante 45 minutos a 100 °C. Se enfrían los tubos hasta alcanzar la temperatura ambiente y se añade a cada uno de ellos 1,4 ml. de Butanol . La mezcla se agita vigorosamente con un "vortex", separando después la fase orgánica de la acuosa por centrifugación a 4000 rpm durante 15 minutos.

Se recoge la fase superior orgánica y se mide la absorbancia a 534 nm. (Espectrofotómetro PU 8630. Philips).

Para transformar los valores de absorbancia en valores de concentración se realizó una curva patrón utilizando como standar un análogo del dialdehído malónico, el 1,1,4,4-Tetraetoxipropano (Malondialdehído-tetraetil-acetal. Fluka Chemie).

### **VALORACION "IN VITRO" DE LA SENSIBILIDAD DEL HIGADO A LA PEROXIDACION**

Con el fin de valorar la sensibilidad del tejido hepático a la peroxidación producida debida al estrés oxidativo, se sometió el homogenizado a una situación de elevado estrés oxidativo incubándolo en una mezcla oxidante, siguiendo el método descrito por Barja de Quiroga et al. (1990).

#### **Medio de incubación**

- Sistema oxidante:

\*  $\text{FeSO}_4$  0,2 mM en KCl 1,15%

\* Ácido ascórbico 1,6 mM en KCl 1,15%

#### **Método**

Se incuban en baño metabólico a 37°C, con agitación, alícuotas de 0,34 ml. del homogeneizado de hígado con 0,17 ml. de Sulfato férrico y 0,17 ml. de Ascorbato durante 0, 30 y 60 minutos, procediendo para la determinación del dialdehído malónico según el protocolo descrito anteriormente.

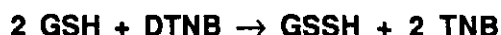
## DETERMINACION EN SUERO DE LAS CONCENTRACIONES DE MDA

Para las determinaciones en sangre se recogen por centrifugación 0,14 ml. de suero, procediéndose de forma similar a la descrita anteriormente, en el método para la valoración de las concentraciones de MDA en tejido.

### 3.2.1.2. METODO DE VALORACION DEL GLUTATION REDUCIDO EN HIGADO

La determinación de las concentraciones de glutathion reducido (GSH) en tejido hepático, debido a la función de éste reductor captador de radicales libres es, otra manera de valorar la formación de peróxidos lipídicos.

El método utilizado en nuestro trabajo para la determinación, se fundamenta en el descrito por Owens (1965). La determinación de GSH se realiza colorimétricamente utilizando el reactivo de Ellman (5-5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico) [DTNB]) un cromóforo que cambia de color al pasar de su estado oxidado, a su estado reducido, según la siguiente reacción:



El cromóforo resultante absorbe longitudes de onda de 412 nm

1. Disolución compuesta por:

- Acido metafosfórico 1,67 %
- EDTA 0,20 %
- NaCl 25,00 %

esta disolución se filtra para su almacenamiento.

2. Disolución de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,3 M

3. Citrato sódico 1%

4. 5-5'-Ditiobis-(2-nitrobenzoico)(DTNB. Sigma) 0,04% en citrato sódico 1%.

5. Glutation 0,5%

Se realizó una curva patrón utilizando como standar glutathion reducido (Sigma).

## **Método**

El hígado se homogeiniza al 0.5% en Glucosa (35%) en Polytron.

A 0,25 ml de homogenizado de hígado se añaden 0,45 ml de solución precipitante dejando la mezcla reposar durante 30 minutos.

Se añaden 0,6 ml de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y 0,2 ml de DTNB y se determina la absorbancia a 412 nm.

La reacción para la curva de calibración se realiza con 0,1 ml de solución de GSH con 0,60 ml de la solución precipitante continuando el procedimiento según el método.

Las absorbancias de las muestras se interpolan en la curva de calibración refiriendo el resultado a mmol de GSH /g de tejido.

### **3.2.2. DETERMINACION DEL FACTOR DE CRECIMIENTO DE HIGADO (LGF).**

El Factor de Crecimiento de Hígado (LGF) se cuantificó por Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC) utilizando el método descrito por Singh y Bowers (1986) con el que podemos separar y cuantificar las cuatro especies de bilirrubina presentes en suero: Bilirrubina no conjugada (fracción- $\alpha$ ), monoglucurónido de bilirrubina (fracción- $\beta$ ), diglucurónido de bilirrubina (fracción- $\gamma$ ) y biliproteína (fracción- $\delta$ ).

El LGF, objeto de nuestro estudio, se demostró que era idéntico a la bilirrubina- $\delta$  (Díaz Gil, 1986a).

### **PREPARACION DE LAS MUESTRAS PARA CROMATOGRAFIA**

El suero (25  $\mu\text{l}$ ) se diluye hasta un volumen final de 500  $\mu\text{l}$  en una solución que contiene ácido ascórbico 0.6% y dimetil sulfóxido 1% (DMSO); pH: 7. Para muestras de suero con baja concentración en bilirrubina (menos de 100 mg/l), se toman 100  $\mu\text{l}$  de suero y se diluyen de la manera descrita. Para muestras de suero con una concentración de bilirrubina mayor que 250 mg/l, el suero se

diluye en una proporción de volúmenes de 1:2 con albumina sérica antes de tomar la alícuota de 25 µl para diluirlo según se ha descrito. El suero diluido se filtra a través de un filtro de celulosa-acetato de 0,45 µm de tamaño de poro usando tubos con microfiltro para centrifuga. El filtro se lava dos veces haciendo pasar a través de él dos alíquotas (0,25 ml) de una solución que contiene DMSO (1%) y ácido ascórbico (0,6%). El filtrado con un volumen final de 1 ml, se guarda para cromatografía. La dilución final del suero problema es de 1/40 o 1/100 (v:v) dependiendo de que tomemos 25 ó 100 µl como muestra inicial de suero.

## **SEPARACION**

La separación de la bilirrubina sérica se consigue inyectando 100 µl del suero diluido en una columna de HPLC de fase reversa (Hypersil WP-300 Butyl C-4 de 15 cm x 4,6 mm). La separación se lleva a cabo por un gradiente de elución usando como fase móvil inicial ácido trifluoracético (ATFA) al 0,5% (pH 2), con incremento lineal de isopropanol hasta llegar a una fase móvil final de ATFA/ isopropanol con proporción de 60/40 (v/v) a los 18,5 min. La velocidad de flujo se mantiene en 1ml/min. La separación se lleva a cabo a una temperatura de  $45 \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

Las especies de bilirrubina separadas se detectan midiendo la absorbancia a 436 nm. Las áreas de los picos se cuantificaron mediante un programa de ordenador. La curva que se obtiene en cada análisis se determina programando el integrador frente a un patrón estandar antes de cromatografiar las muestras de suero.

### **3.2.3. ANATOMIA PATOLOGICA.**

Para el estudio anatomopatológico se sometió a los animales de los tres grupos (sin tratamiento, con pentoxifilina y con clorpromazina) a un periodo de isquemia parcial caliente de 70 minutos, y se obtuvieron muestras de los tres grupos a las 2, 6 y 24 horas de reperfusión.

Las biopsias en cuña del parénquima hepático de los 3 grupos estudiados fueron fijadas en formol al 10%. Se tomaron 3 muestras al azar que se incluyeron en parafina, fueron cortadas a 5 µm de espesor y teñidas con hematoxilina-eosina.

Los parámetros morfológicos estudiados fueron:

1. Congestión vascular y/o hemorragia.
2. Necrosis hepatocelular. Se hizo una valoración semicuantitativa que se ha expresado en porcentaje de área de necrosis por área total del corte histológico.
3. Reacción inflamatoria de polimorfonucleares neutrófilos, valorada como: 0=ausente; 1=ligera; 2=moderada; 3=intensa.
4. Número de mitosis por 10 campos de gran aumento, tomados al azar.

Las muestras de tejido hepático se obtuvieron después de sacrificar a los animales con una sobredosis de tiopental sódico (i.p.) por abordaje quirúrgico.

### **ESTUDIO MORFOMETRICO**

El estudio morfométrico se realizó mediante un proceso digital de análisis de imagen con un sistema MICROM IP (MIP).

Se cuantificó el área de tejido hepático necrosado en porcentaje respecto al área total de cada corte, eligiendo un estudio a bajo aumento (x 125) debido a que la distribución de la necrosis es zonal y no aleatoria, desaconsejándose por tanto, el muestreo de campos a gran aumento.

Se realizaron en cada caso fotomicrografías de las muestras estudiadas, y que correspondían a animales control y animales a los que se sometió a una isquemia hepática de los lóbulos izquierdo y medio (70% de la masa hepática total) durante 70 minutos con posterior perfusión de los lóbulos isquémicos, tomando muestras hepáticas para su valoración anatomopatológica a las dos, seis y veinticuatro horas de perfusión.

Estos animales estaban divididos en tres grupos: a) animales no tratados (ST); b) animales tratados con pentoxifilina (PT) y c) animales tratados con clorpromazina (CP), según el protocolo correspondiente.

### **3.3. OTRAS DETERMINACIONES**

#### **3.3.1. BIOQUIMICA SERICA.**

Las determinaciones séricas de transaminasas (GPT y GOT), LDH, Fosfatasa alcalina, Acido úrico, etc. se realizaron con un aparato autoanalizador ( Blood autoanalyzer 737. Hitachi).

#### **3.3.2. GASOMETRIA DE SANGRE ARTERIAL.**

Se consideraron los siguientes parámetros: pH, pCO<sub>2</sub>, Bicarbonato y Defecto de bases. Las determinaciones se realizaron con un aparato autoanalizador (IL 1306 / Blood gas analyzer. ALLIED Instrumentation laboratory).

#### **3.3.3. DETERMINACION DE LAS CONCENTRACIONES HEPATICAS DE ADENOSINA-5'-TRIFOSFATO.**

La determinación de las concentraciones en tejido hepático se realizaron utilizando un kit diagnóstico para la determinación espectrofotométrica de concentraciones de ATP.

#### **Obtención de las muestras**

Se obtubieron biopsias hepáticas por abordaje quirúrgico. Estas biópsias eran inmediatamente conservadas en nitrógeno líquido hasta su procesamiento.

#### **Método**

Las biópsias hepáticas eran homogeneizadas en una proporción del 0.5% (p/v) en ácido tricloroacético al 20% (p/v) frío. El homogenizado obtenido era centrifugado a 3500 r.p.m. a 4°C, separando el sobrenadante para su procesamiento.

El procesamiento de las muestras se llevaba a cabo según el protocolo indicado en el kit diagnóstico según el siguiente fundamento del método descrito por Adams en 1963.

## **Fundamento**

Las concentraciones de ATP se determinan usando las enzimas fosfoglicerato quinasa (PGK), y gliceraldehído fosfato deshidrogenasa (GAPD), como catalizadores de las siguientes reacciones:



Se determina la disminución de absorbancia a 340 nm que se produce como resultado de la oxidación del NADH a NAD<sup>+</sup>, como medida del ATP presente en la muestra.

### **3.3.4. VERIFICACION DE LA REPERFUSION EFECTIVA DEL HIGADO ISQUEMICO.**

Para verificar que el hígado era realmente revascularizado después del periodo de isquemia se utilizó la técnica de Silverman D.G. (1981) modificada. Se inyectó a los animales fluoresceína sódica (Fluoresceína oculos 20%. Frumtost zyma S.A.) , a través de la vena yugular, diez minutos antes de la reperusión. La dosis de fluoresceína inyectada fue de 400 mg / kg.

Una vez revascularizados los lóbulos isquémicos, la efectividad de la reperusión, se verificó, por exposición directa de los lóbulos hepáticos a una fuente de luz ultravioleta, en lugar de utilizar el fluorómetro de perfusión descrito en el método de Silverman (1981).

También se realizaron cortes de los lóbulos hepáticos, de aproximadamente 3 mm de espesor. que se sumergieron en una caja de "Petri" con glicerol, exponiéndolos después a luz ultravioleta con el fin de observar la distribución de la fluoresceína y constatar de esta manera las zonas reperfundidas.

### **3.3.5. VALORACION DEL CONTENIDO DE AGUA EN TEJIDO HEPATICO.**

Para la valoración del contenido de agua en el tejido hepático se extrajeron los lóbulos hepáticos por abordaje quirúrgico y se pesó una muestra de 5 g de tejido húmedo.

Para determinar el contenido en agua, se procedió a eliminar el agua del tejido hepático por homogenización en ácido perclórico al 10% (p/v). Este homogenizado se centrifugó para eliminar el sobrenadante. El precipitado obtenido, se deshidrató en estufa a 80°C durante 24 horas.

El contenido en agua se estimó por la diferencia en peso entre el tejido húmedo y el tejido seco, y se expresó en l. de H<sub>2</sub>O/kg de tejido seco.

### **3.4. ESTUDIO ESTADISTICO**

En la comparación de variables discretas, hemos empleado el test Chi-cuadrado con la corrección de Yates (Siegel S. .1978).

Previamente a la comparación de medias, en las variables cuantitativas se comprobó la hipótesis de homogeneidad de varianzas mediante el test de Barlett, y de normalidad de las distribuciones mediante el test de Kolmogorov.

Dependiendo del resultado anterior, las distintas variables se compararon mediante el test de la "t" de Student (paramétrico) o mediante el test U de Mann-Whitney (no paramétrico).

Se realizó también un estudio de regresión lineal y correlación, con el fin de observar la relación entre parámetros que cambian a lo largo del tiempo, y en distintas situaciones.

Por último se realiza un ANOVA para datos emparejados, para valorar los cambios observados en los distintos parámetros. A continuación utilizamos un test de comparaciones múltiples que valora la significación de las medias dentro de cada grupo.

Como grado de significación estadística hemos considerado un error  $\alpha < 0.05$  (D.E. Matthews and V.T. Farewell. 1988).

Los datos fueron procesados mediante un soporte "software" de diseño propio en un ordenador MICROVAX-II (Digital).

#### **4. RESULTADOS**

## 4. RESULTADOS

### 4.1. MODELO QUIRURGICO EXPERIMENTAL DE ISQUEMIA REPERFUSION EN HIGADO DE RATA: COMPARACION DE LOS MODELOS DE ISQUEMIA COMPLETA, Y DE ISQUEMIA PARCIAL.

Se compararon los modelos de isquemia completa (Modelo I) por pinzamiento oclusivo de todas las ramas vasculares del hilio hepático, y de isquemia parcial (Modelo II), por medio del pinzamiento oclusivo de las ramas vasculares de los lóbulos izquierdo y medio del hilio hepático, conservando el flujo sanguíneo a través de los lóbulos derechos, como derivación interna, y siguiendo el protocolo experimental correspondiente (Figs. 8 A y B). La finalidad del trabajo fue determinar, entre los dos modelos ensayados, cuál se adaptaba mejor a nuestros objetivos, valorando una serie de requisitos mínimos que deben cumplirse para el estudio de la isquemia-reperfusión hepática, como especificidad de órgano, inducción mínima de otros factores de riesgo (i.e. alteraciones hemodinámicas), reproductibilidad, etc.

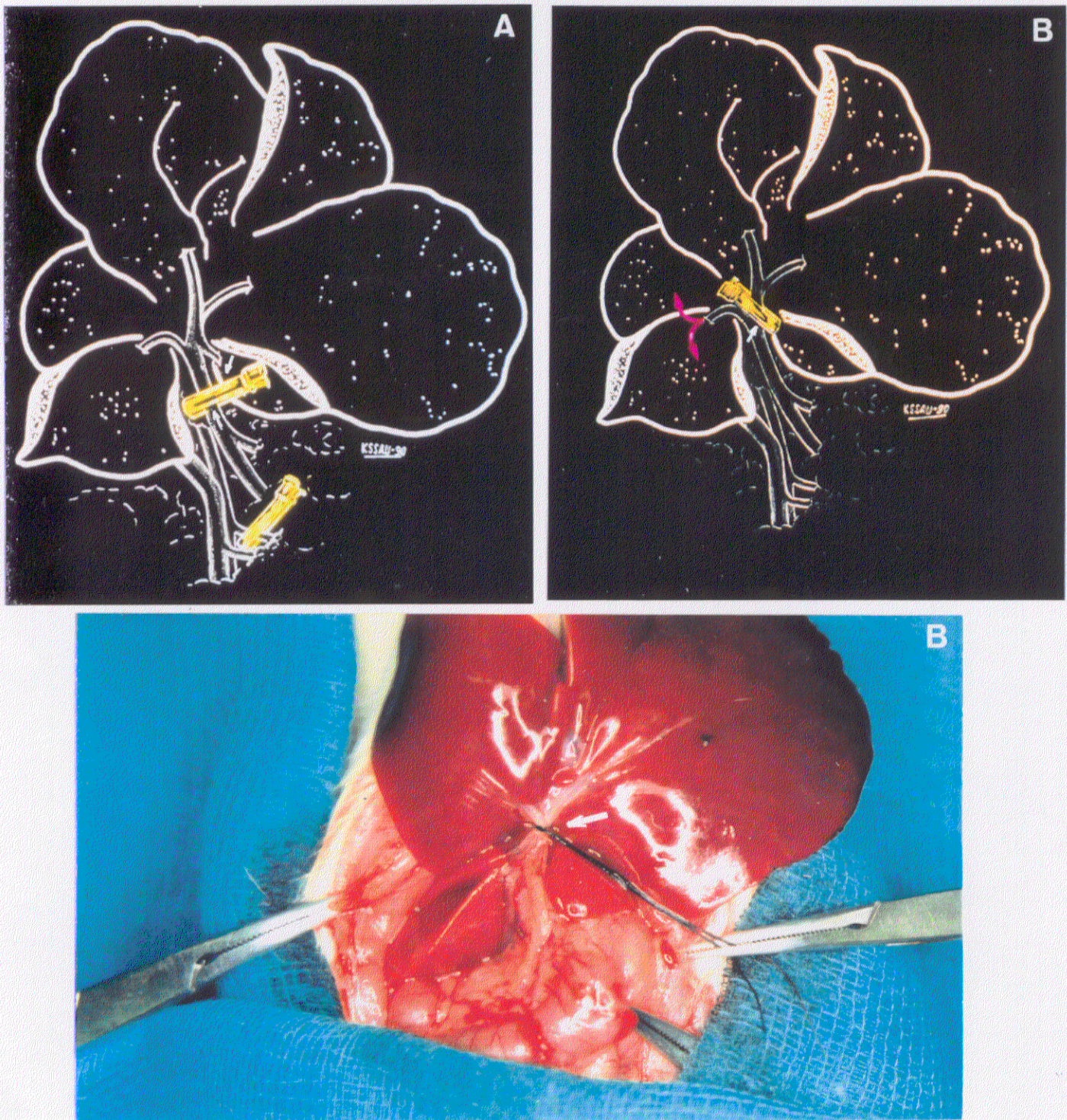
Para ello, se tomaron muestras de sangre de todos los animales, a través de la aorta abdominal, tanto al final del período de isquemia (30 min.), como al final del período de revascularización (30 min. de isquemia +15 min. de perfusión).

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

#### 4.1.1. Resultados de la gasometría de sangre arterial.

##### MODELO I. ISQUEMIA COMPLETA.

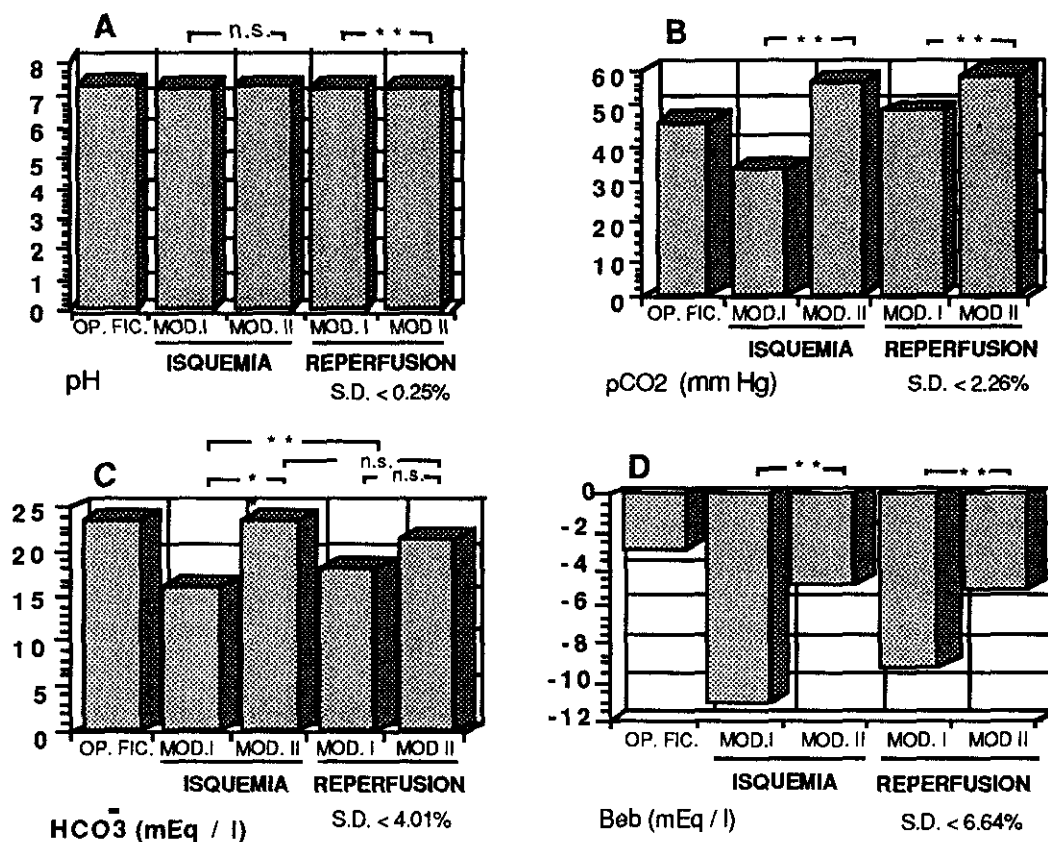
Los valores de pH sanguíneo (Fig. 9A), disminuyeron en relación a los valores fisiológicos (7.35-7.45) , observándose también una acusada disminución en la  $p\text{CO}_2$  (Fig. 9B) respecto a los límites normales (35-45 mEq/l), hallazgos indicativos de una *acidosis metabólica* en los animales con isquemia completa, que se mantiene durante la perfusión, según los valores observados en las determinaciones de  $\text{HCO}_3^-$  (Fig. 9C) y Bases estandar (Beb) que indicaron una deficiencia de bicarbonato y bases (Fig. 9D).



**Fig. 8 Modelos experimentales de inducción de la isquemia hepática.** Isquemia caliente completa (A) mediante torniquete con lazo de seda del tronco portal, que interrumpe el flujo de sangre a través del hígado (→). Isquemia caliente parcial (B) de los lóbulos medio e izquierdo por torniquete selectivo de sus ramas vasculares (→); el flujo sanguíneo se deriva por los lóbulos derechos para evitar el éstasis de la sangre y la hipertensión portal.

## MODELO II. ISQUEMIA PARCIAL.

En este modelo, se observó también, una disminución de los valores de pH (Fig. 9A) durante la isquemia parcial. Sin embargo, la elevación, por encima de los valores normales, de la  $p\text{CO}_2$  (Fig. 9B) durante la reperfusión de los lóbulos isquémicos, y los valores de  $\text{HCO}_3^-$  (Fig. 9C) y  $\text{Beb}$  (Fig. 9D), similares a los observados en los controles, indican un predominio de *acidosis respiratoria aguda*.



**Fig. 9 Modelo quirúrgico experimental. Resultados de la gasometría de sangre arterial: Diferencias en los valores de pH (A),  $p\text{CO}_2$  (B),  $\text{HCO}_3^-$  (C) y defecto de bases  $\text{Beb}$  (D).**

En ambos modelos el tiempo de isquemia fue de 30 min., y el de reperfusión, de 15 min. después de cada uno de los tiempos de isquemia referidos.

Todos los grupos mostraron diferencias significativas frente al grupo con operación ficticia (OP. FIC.). En el margen derecho inferior de cada tabla se expresa el porcentaje máximo de desviación estandar (S.D.) respecto de la media.

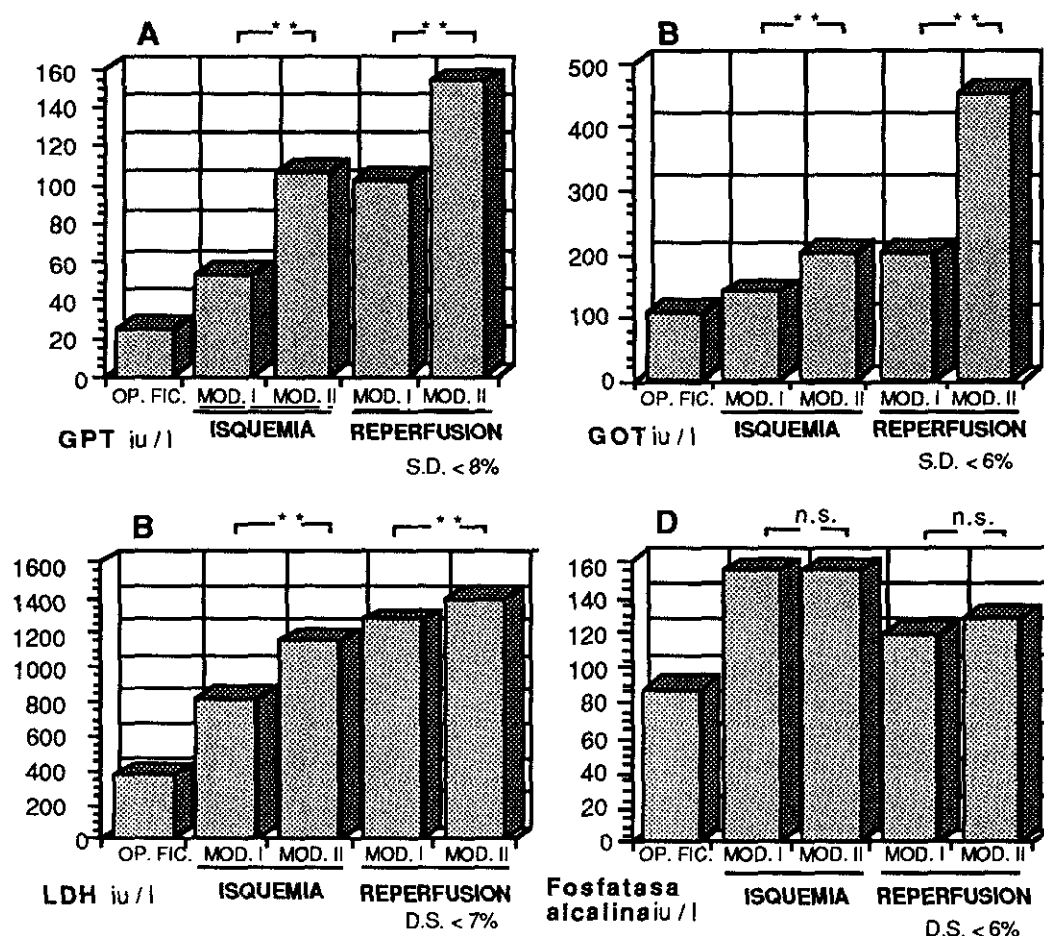
\*\*  $p < 0.01$

n.s. no significativo

#### 4.1.2. Bioquímica sérica.

En ambos modelos de isquemia, completa y parcial, se contrastó el desarrollo de necrosis hepática, observada histológicamente, y por el el incremento en las concentraciones séricas de GPT y GOT (Fig.10A y 10B) .

Los valores de Fosfatasa alcalina (Fig. 10C), indicaron en ambos modelos colestasis durante el periodo de isquemia, con tendencia a regresar a los valores normales durante la revascularización. En este caso las diferencias entre ambos modelos no fueron significativas.



**Fig. 10 Modelo quirúrgico experimental. Valoración de enzimas séricas: GPT (A), GOT (B), LDH (C) y Fosfatasa alcalina (D).**

En ambos modelos el tiempo de isquemia fue de 30 min., y el de reperusión, de 15 min. después de cada uno de los tiempos de isquemia referidos.

Todos los grupos mostraron diferencias significativas frente al grupo con operación ficticia (OP. FIC.). En el margen derecho inferior de cada tabla se expresa el porcentaje máximo de desviación estandar (S.D.) respecto de la media.

\*\*  $p < 0.01$

n.s. no significativo

También se observó una importante disminución en la función hepática, relacionada con un incremento del metabolismo anaerobio, durante la isquemia, valorable por el incremento en las concentraciones séricas de LDH (Fig. 10D).

Estos incrementos, en los valores de enzimas hepáticas, fueron superiores en los animales con isquemia parcial (Modelo II) respecto a los obtenidos en el modelo de isquemia hepática completa (Modelo I), excepto en el caso, ya mencionado, de los valores de fosfatasa alcalina.

#### **4.1.3. Observaciones macroscópicas.**

Se realizó una valoración macroscópica de los animales sometidos a sendos modelos de isquemia, completa y parcial, observándose los siguientes hallazgos:

##### **MODELO I. ISQUEMIA COMPLETA (Fig. 11A).**

Se observó una intensa cianosis de los lóbulos hepáticos isquémicos, debida a la interrupción del flujo sanguíneo.

La oclusión completa de la vena porta, junto con la libre circulación del flujo de las ramas mesentérica, hepática y esplénica, de la aorta abdominal, originaron congestión intensa de los lechos vasculares mesentérico, esplénico e intestinal, por interrupción del flujo venoso portal de drenaje, produciendo hipertensión portal.

Durante la revascularización del hígado isquémico, se observó abundante pérdida líquida por transudado en hígado, intestino y mesentéreo, y desarrollo de coagulación intravascular diseminada (C.I.D.), que se manifestó mediante la formación de petequias, en mesentéreo e intestino.

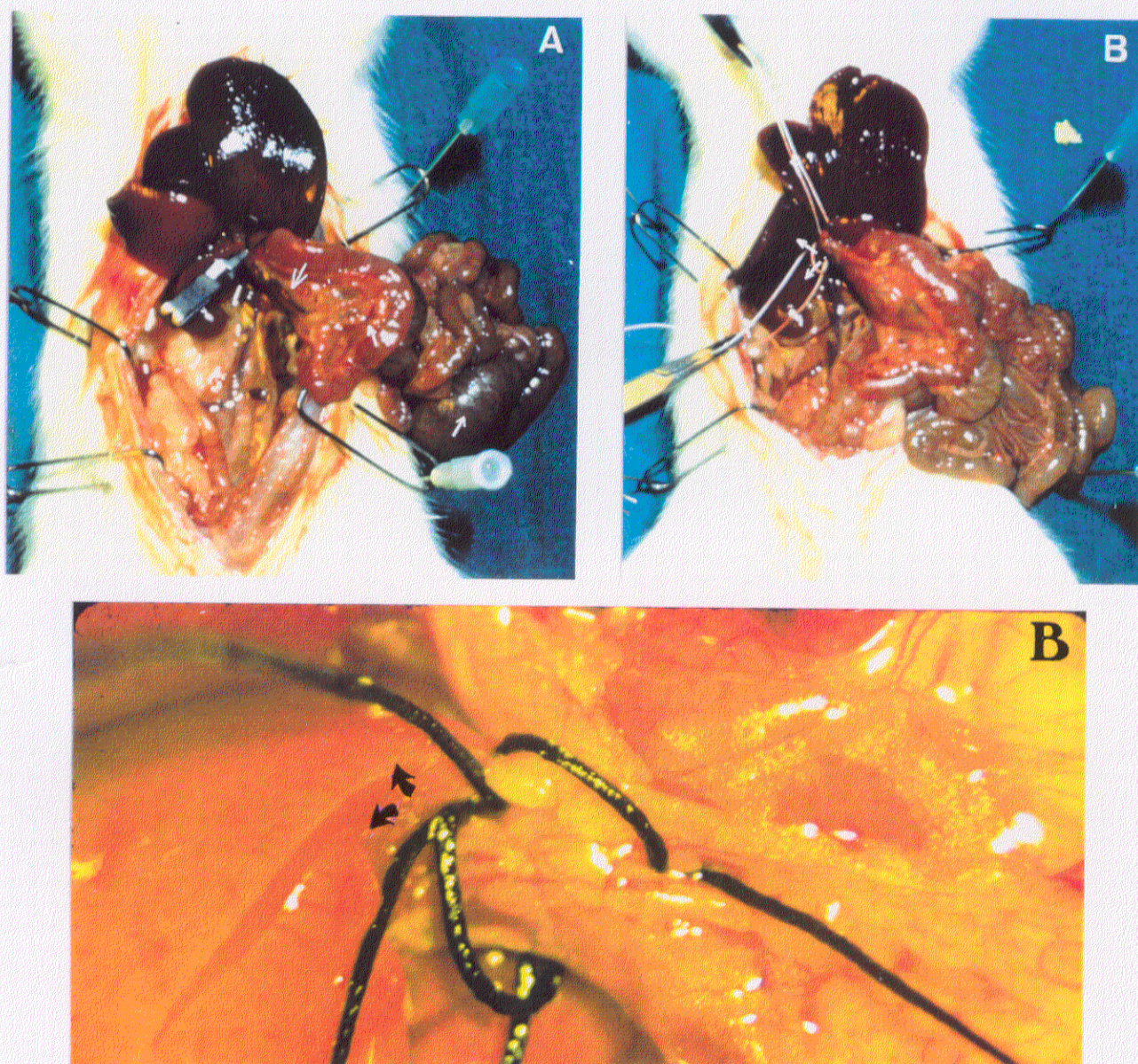
También se observaron durante las primeras fases de la revascularización alteraciones del ritmo respiratorio, posiblemente, por efecto de la anestesia.

##### **MODELO II. ISQUEMIA PARCIAL (Fig. 11B).**

En el modelo de isquemia parcial, al igual que en el anterior, se observó intensa cianosis en los lóbulos izquierdo y medio, pero, no se observaron signos de congestión vascular, ni de hipertensión portal, durante la isquemia parcial, ya

que el flujo sanguíneo, se derivaba a través de los lóbulos derechos, que utilizamos como puente de derivación interna, ni evidencias de coagulación intravascular diseminada.

Las alteraciones en el ritmo respiratorio después de la revascularización de los lóbulos isquémicos fueron menores a las que observamos en la isquemia hepática completa.



**Fig. 11 Observaciones macroscópicas.**

En el modelo de isquemia completa (A) observamos hipertensión portal (→) y congestión intestinal (→). Estos fenómenos limitan la supervivencia para tiempos de isquemia superiores a 60 min.. Con el modelo de isquemia parcial (B), utilizando las ramas de los lóbulos derechos como puente interno (→), eliminamos estos efectos negativos y conseguimos una isquemia hepática más selectiva.

## 4.2. DURACION DE LA ISQUEMIA Y DAÑO HEPATICO.

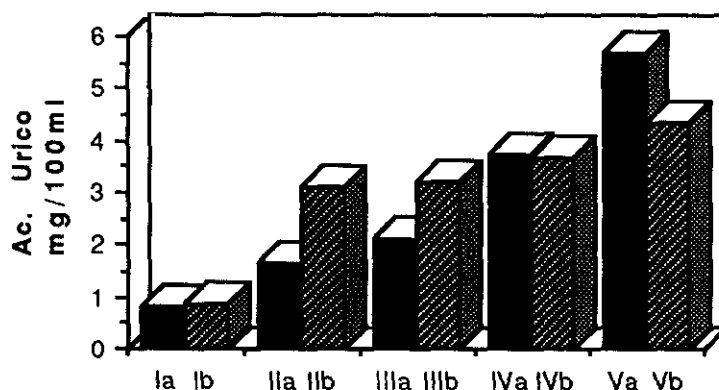
### 4.2.1. Alteraciones bioquímicas y duración de la isquemia.

Con el fin de valorar el daño hepático producido por isquemia caliente parcial, en relación a su duración, sometimos a los animales a períodos crecientes de isquemia: 15, 30, 60 y 120 minutos, manteniendo fijo el tiempo de revascularización, después de cada periodo de isquemia, en 15 minutos.

Se tomaron muestras de sangre al término del período de isquemia, y después del periodo de perfusión, valorándose los siguientes parámetros séricos:

- Séricas: Acido úrico; GPT y GOT; Fosfatasa alcalina; LDH; MDA.
- Concentración de ATP en tejido hepático a fin de valorar la pérdida de carga energética.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:



**Fig. 12 Efecto de la duración de la isquemia. Concentraciones séricas de ácido úrico.**

I = Control. Operación ficticia (15 seg. de isquemia)

II = 15 min. de isquemia

III = 30 min. de isquemia

IV = 60 min. de isquemia

V = 120 min. de isquemia

a = muestra obtenida al término de cada periodo de isquemia

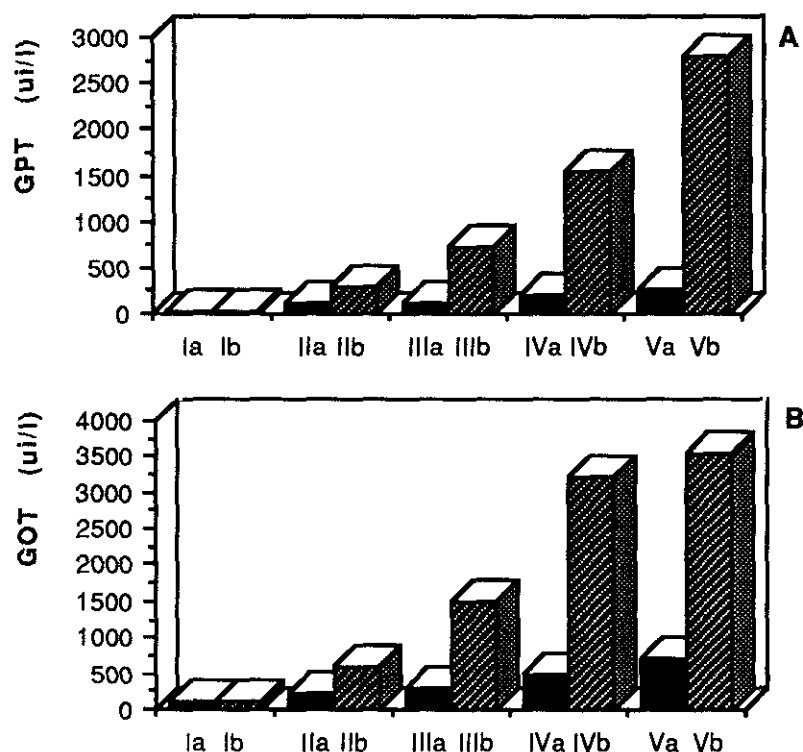
b = muestra obtenida después de 15 min. de perfusión para cada tiempo de isquemia

La correlación entre los niveles de enzima observados al término de cada uno de los tiempos de isquemia y al término de la perfusión fue muy significativa ( $p < 0.001$ ) con un coeficiente de regresión lineal  $R = 0.825$

El porcentaje máximo de desviación estándar fue menor del 5% respecto de la media

El ácido úrico, producto final del catabolismo de bases púricas, (Fig. 12) aumentó su concentración en sangre, con el tiempo de isquemia. Sin embargo, después de 15 minutos de perfusión para cada tiempo de isquemia (15, 30, 60 y 120 min) las diferencias no fueron tan acusadas.

Los valores de GPT y de GOT (Fig. 13) determinados tras la perfusión guardaron una correlación lineal con los obtenidos al término de los distintos periodos de isquemia caliente, y a mayor duración de la isquemia, obteníamos incrementos mayores en las concentraciones de GOT y GPT.



**Fig. 13 Efecto de la duración de la isquemia. Concentraciones séricas de GPT y GOT.**

I = Control. Operación ficticia: 15 seg. de isquemia.

II = 15 min. de isquemia.

III = 30 min. de isquemia.

IV = 60 min. de isquemia.

V = 120 min. de isquemia.

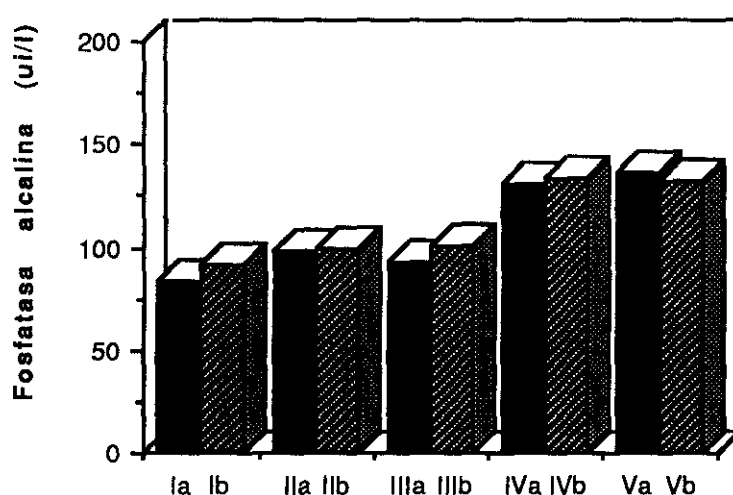
a = muestra obtenida al final de cada periodo de isquemia.

b = muestra obtenida después de 15 min. de perfusión para cada uno de los tiempos de isquemia correspondiente.

La correlación entre los niveles de enzima observados al término de cada uno de los tiempos de isquemia y al término de la perfusión fue significativa ( $p < 0.001$ )

El coeficiente de regresión lineal (R) entre los valores de concentración observados al término de la isquemia, y de la perfusión fueron:  $R = 0.929$  (A) y  $R = 0.960$  (B). Los porcentajes máximos de desviación estándar fueron: 9% (A) y 6% (B). respectivamente.

Las determinaciones de fosfatasa alcalina (Fig. 14) para tiempos crecientes de isquemia y las realizadas después de 15 minutos de reperfusión, mostraron también una correlación lineal significativa, indicando colestasis creciente en relación a la duración de la isquemia, probablemente atribuible, a la obliteración del conducto biliar durante la maniobra quirúrgica inductora de la isquemia. Este aumento de la colestasis fue más patente cuando la duración de la isquemia era de 60 y 120 minutos, respecto a tiempos de isquemia más cortos.



**Fig. 14 Efecto de la duración de la isquemia. Concentraciones séricas de Fosfatasa alcalina.**

I = Control. Operación ficticia: 15 seg. de isquemia.

II = 15 min. de isquemia

III = 30 min. de isquemia

IV = 60 min. de isquemia

V = 120 min. de isquemia

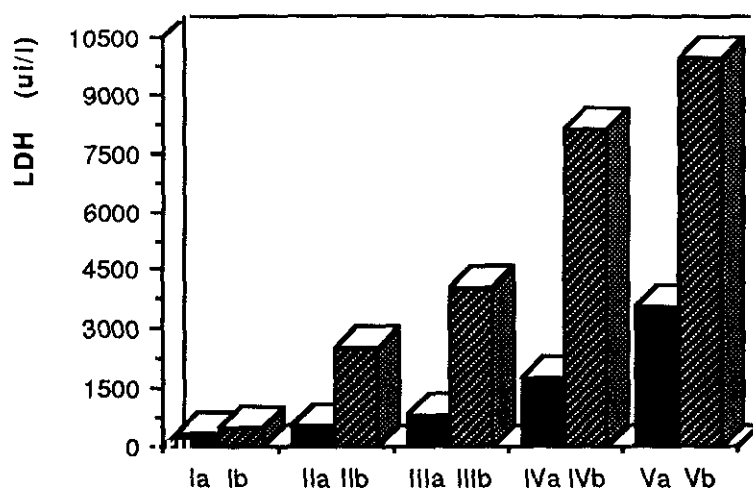
a = muestra obtenida al término de cada periodo de isquemia

b = muestra obtenida después de 15 min. de reperfusión para cada tiempo de isquemia

La correlación entre los niveles de enzima observados al término de cada uno de los tiempos de isquemia y al término de la reperfusión fue muy significativa ( $p < 0.001$ ) con un coeficiente de regresión lineal  $R = 0.924$

El porcentaje máximo de desviación estandar fue menor del 7% respecto de la media

El incremento en las concentraciones de LDH (Fig. 15) fue directamente proporcional al término de la reperfusión, con respecto a la duración de la isquemia, indicando una disminución progresiva de la función hepática con la duración de la isquemia, al mismo tiempo que, un aumento en el metabolismo anaerobio.



**Fig. 15 Efecto de la duración de la isquemia. Concentraciones séricas de LDH.**

I = Control. Operación ficticia (15 seg. de isquemia)

II = 15 min. de isquemia

III = 30 min. de isquemia

IV = 60 min. de isquemia

V = 120 min. de isquemia

a = muestra obtenida al término de cada periodo de isquemia

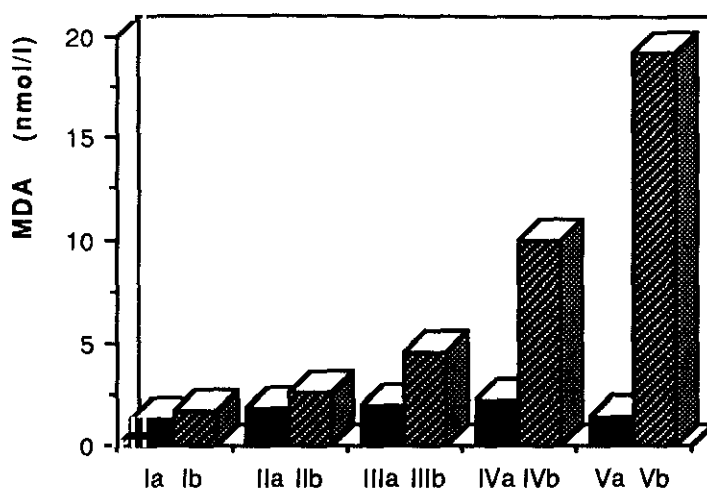
b = muestra obtenida después de 15 min. de reperusión para cada tiempo de isquemia

La correlación entre los niveles de enzima observados al término de cada uno de los tiempos de isquemia y al término de la reperusión fue muy significativa ( $p < 0.001$ ) con un coeficiente de regresión lineal  $R = 0.923$

El porcentaje máximo de desviación estandar fue menor del 3% respecto de la media

Los valores de MDA (Fig. 16) no aumentaron al incrementar el tiempo de isquemia, indicando que en condiciones de anoxia de los lóbulos hepáticos, no se producen posiblemente fenómenos de peroxidación lipídica, o no se expresan en sangre. Sin embargo, se observó que después de la resperusión, las concentraciones séricas de MDA, se ingrementaban con el tiempo de isquemia, indicando que cuanto más prolongada era la isquemia, mayor era la peroxidación lipídica producida en la reperusión ( $R = 0.993$ ).

Las concentraciones de ATP en tejido hepático (Fig. 17) mostraron una drástica disminución al término de la isquemia, sin que se observen diferencias significativas al aumentar la duración de la misma, para tiempos de isquemia caliente iguales, o superiores, a 30 minutos. Por otro lado, pudo comprobarse que para un periodo de isquemia de 120 minutos, la recuperación de los niveles de ATP al término de la reperusión, era practicamente nula, comparada con tiempos de isquemia más reducidos (30 y 60 minutos).



**Fig. 16 Efecto de la duración de la isquemia. Concentraciones séricas de MDA.**

I = Control. Operación ficticia (15 seg. de isquemia)

II = 15 min. de isquemia

III = 30 min. de isquemia

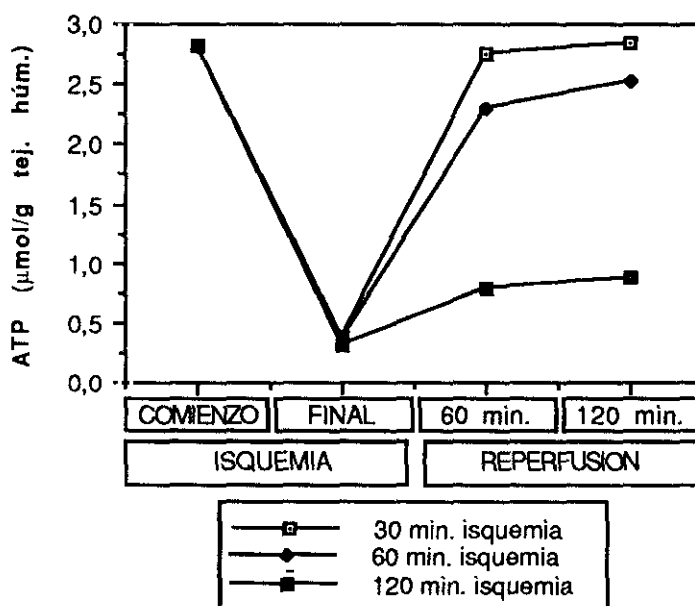
IV = 60 min. de isquemia

V = 120 min. de isquemia

a = muestra obtenida al término de cada periodo de isquemia

b = muestra obtenida después de 15 min. de reperusión para cada tiempo de isquemia

Las concentraciones de MDA no aumentaron con el tiempo de isquemia, al término de cada periodo. Sin embargo las concentraciones obtenidas al término de la reperusión aumentaban con el tiempo de isquemia ( $p < 0.01$ ). Coeficiente de regresión lineal  $R = 0.995$ . El porcentaje máximo de desviación estándar fue menor del 7% respecto de la media.



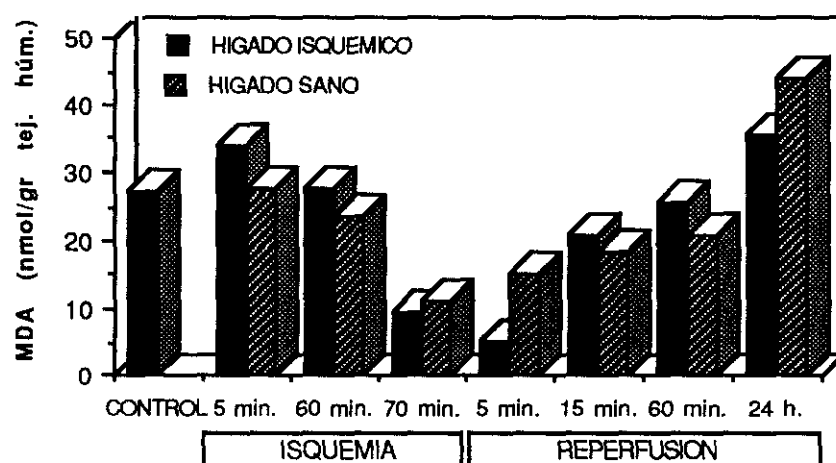
**Fig. 17 Efecto de la duración de la isquemia. Concentraciones de ATP en tejido hepático homogenizado.**

Las diferencias observadas entre los tres grupos, durante la reperusión, fueron muy significativas ( $p < 0.01$ ). El porcentaje máximo de desviación estándar respecto de la media no fue superior al 14% respecto de la media.

#### 4.2.2. Estudio "in vitro" de la sensibilidad del hígado al estrés oxidativo producido por isquemia-reperfusión: hígado isquémico Vs hígado sano.

Homogenizados de biopsias hepáticas obtenidas en distintos tiempos de isquemia-reperfusión de los lóbulos izquierdo y medio, y de los no afectados por la isquemia (lóbulos derechos), fueron incubadas a 37°C en una disolución oxidante de sulfato férrico/ácido ascórbico durante 0, 30 y 60 minutos, valorando después la concentración tisular de MDA, como indicador de peroxidación lipídica y extensión de la necrosis hepática, mediante la prueba del TBA; así como la susceptibilidad de los distintos homogenizados al estrés oxidativo. A mayor susceptibilidad al estrés oxidativo, mayores concentraciones de MDA se observarán durante la incubación.

Se observaron diferencias significativas en las concentraciones de MDA entre los hígados isquémicos y sanos, para todos los tiempo de isquemia, y de perfusión estudiados (Fig. 18).

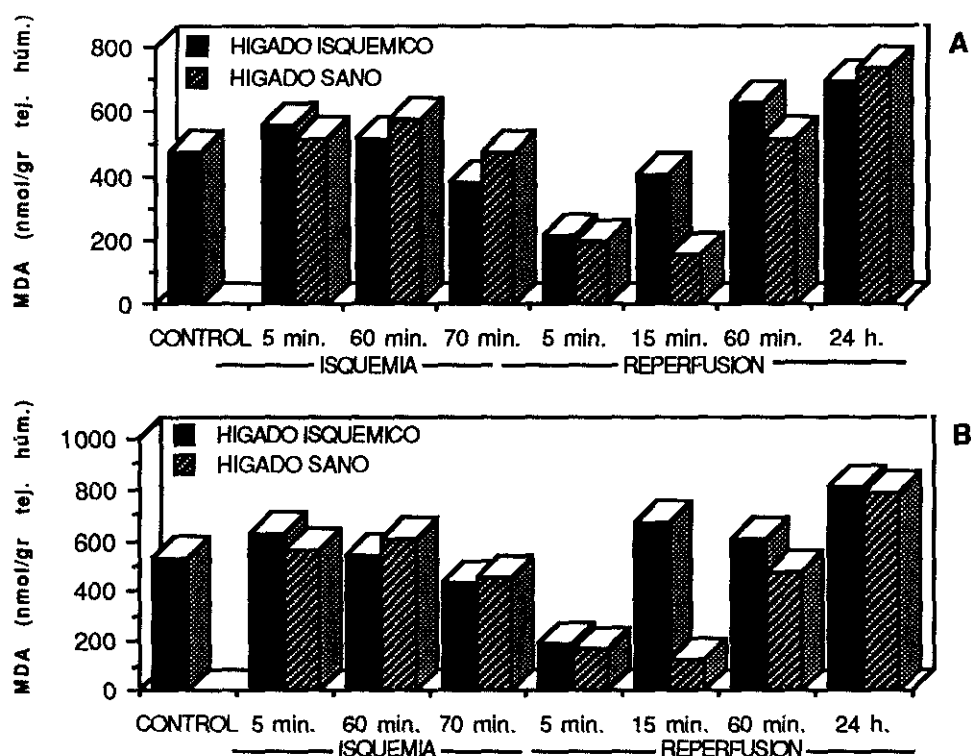


**Fig. 18 Concentraciones de MDA en homogeneizado de tejido hepático durante la isquemia-reperfusión.**

Las muestras se obtuvieron a los 0, 5, 60 y 70 min. de isquemia, y a los 5, 15 y 60 min., y a las 24 h. después de la perfusión. Los valores de MDA se determinaron mediante el método del TBA. Las diferencias observadas entre las concentraciones de MDA de los lóbulos sometidos a isquemia-reperfusión y los lóbulos no afectados fue significativa en todos los puntos ( $p < 0.01$ ). El porcentaje máximo de desviación estandar respecto de la media no superó el 19%.

Estas diferencias se hicieron más notables durante el período de perfusión, siendo mayores las concentraciones de los lóbulos post-isquémicos, y de forma

directamente proporcional al tiempo de incubación de los homogenizados en el medio oxidante (Fig. 19A). Los lóbulos isquémicos demostraron mayor sensibilidad al estrés oxidativo que los lóbulos sanos durante los quince primeros minutos de reperfusión (Fig. 19B).



**Fig. 19 Concentraciones en homogenizado de tejido hepático durante la isquemia reperfusión. Valoración de la sensibilidad del hígado con isquemia-reperfusión al estrés oxidativo frente al hígado sin afectar.**

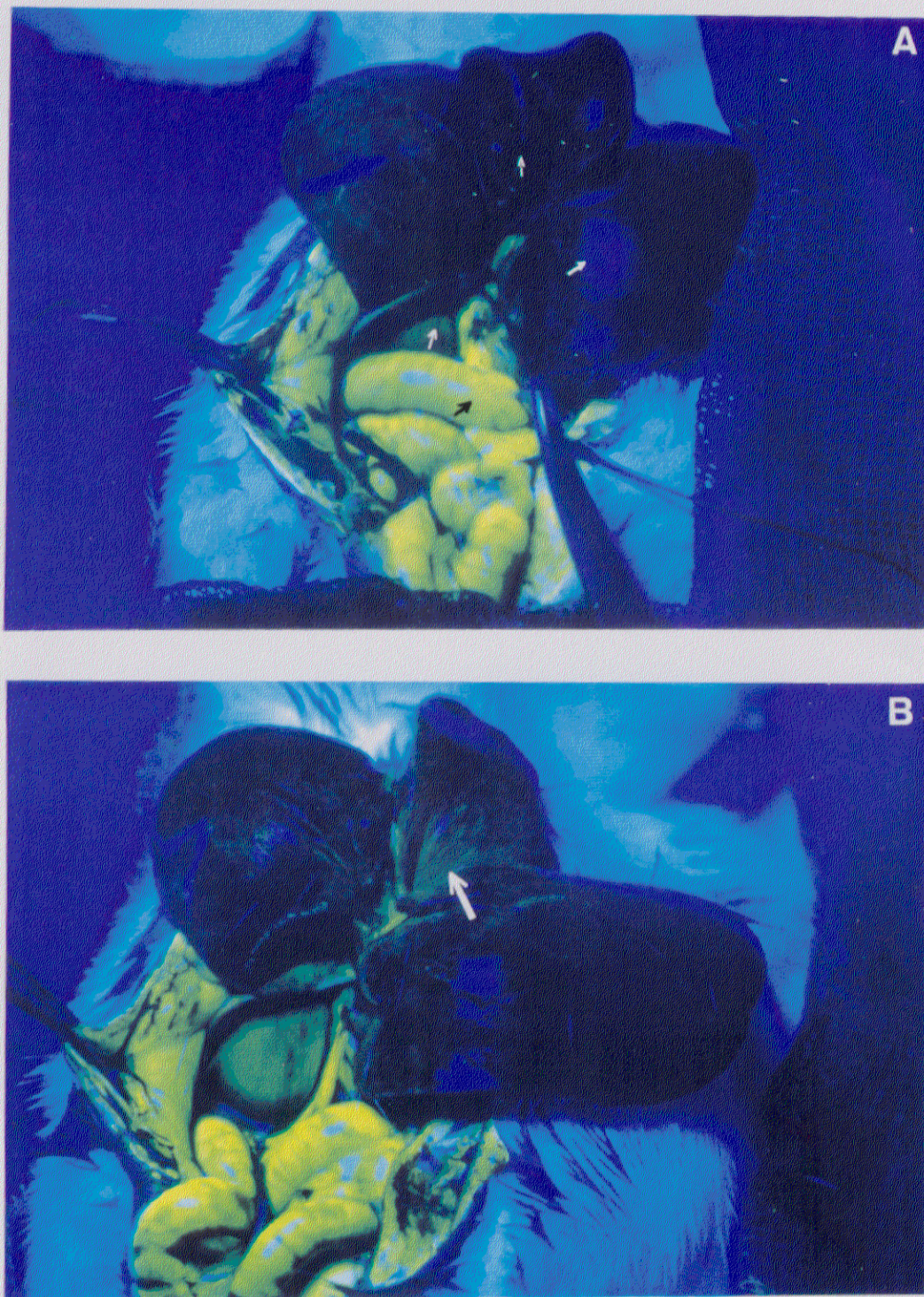
Las muestras se obtuvieron a los 0, 5, 60 y 70 min. de isquemia, y a los 5, 15 y 60 min., y a las 24 h. después de la reperfusión. Los valores de MDA se determinaron usando el método del TBA, incubando las muestras homogeneizadas durante 30 min. (A) y 60 min. (B) en euna disolución oxidante de sulfato férrico/ácido ascórbico.

Las diferencias entre las concentraciones de MDA entre los lóbulos con isquemia-reperfusión, y los no afectados fue significativa en todos los puntos ( $p < 0.01$ ). El porcentaje máximo de desviación estandar no superó el 13% (A) y el 8% (B) respecto de la media.

#### 4.2.3. Verificación de la reperfusión hepática.

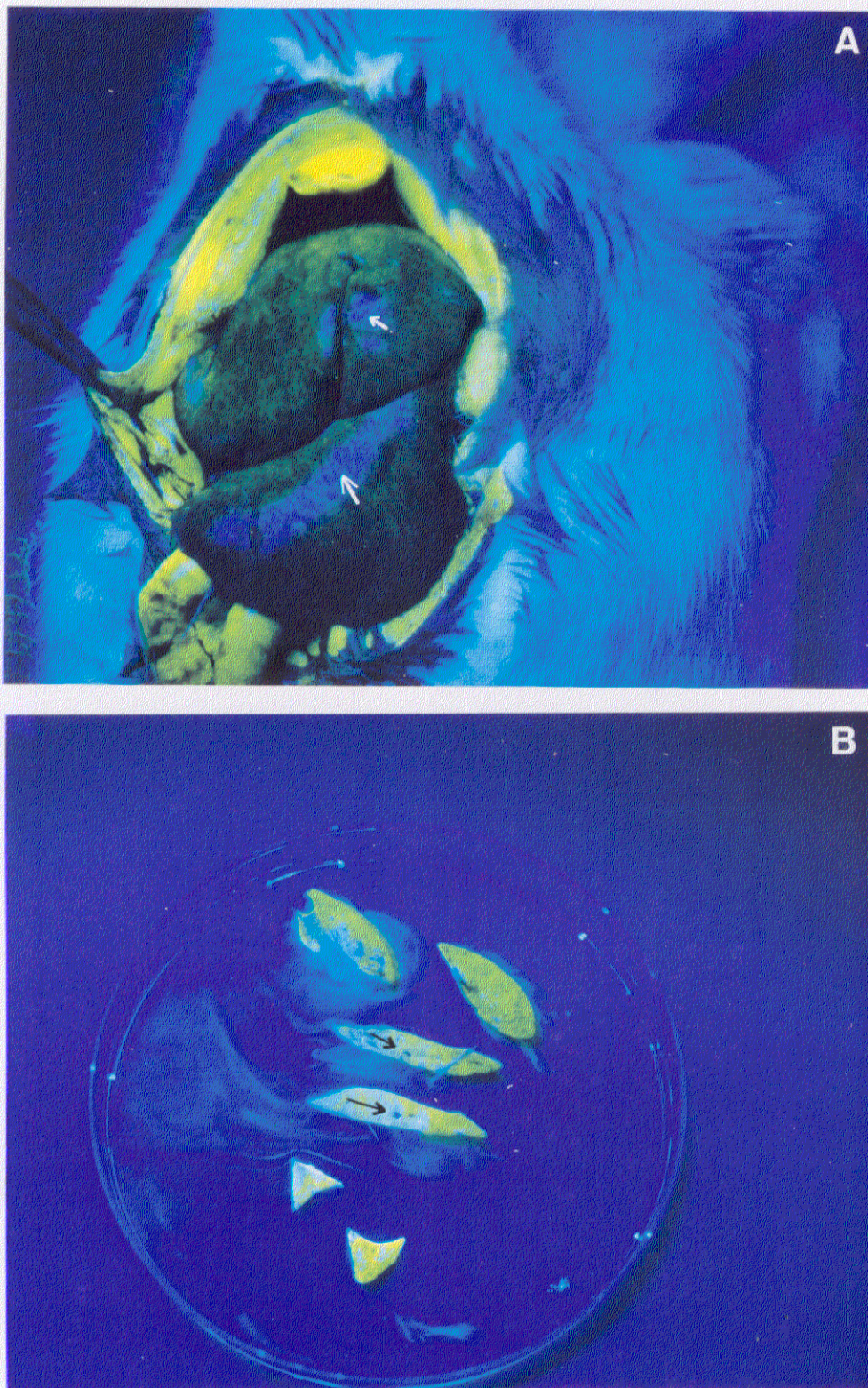
Injectando fluoresceína después de la instauración de la isquemia parcial, se comprobó, que después de la reperfusión de los lóbulos isquémicos pueden observarse zonas en el parénquima con una reperfusión deficiente, o incluso, zonas no reperfundidas, fenómeno que era contrastable tanto "in vivo", como "in vitro" (Figs. 20 y 21). Estas zonas no reperfundidas, eran más intensas cuanto

mayor era la duración de la isquemia, siendo su localización, preferentemente perivenular.



**Fig. 20 Comprobación de la reperusión hepática.**

Mediante la inyección de fluoresceína (i.v.) después de la inducción de la isquemia caliente (A) podemos visualizar, bajo luz ultravioleta, las zonas con flujo sanguíneo (→) y las zonas donde el flujo ha sido interrumpido (→). Una vez que el flujo es reestablecido en los lóbulos isquémicos (B) podremos valorar su reperusión observando la distribución del colorante en la superficie del tejido hepático (→).



**Fig. 21 Comprobación de la reperusión del hígado post-isquémico.**  
(A) La fluoresceína presenta una distribución uniforme en la superficie del hígado a los 20 min. de revascularización (la duración de la isquemia caliente fue de 70 min.). Las zonas no reperfundidas son aisladas ( $\rightarrow$ ). (B) En cortes del mismo hígado observamos zonas no reperfundidas ( $\rightarrow$ ), preferentemente, alrededor de las venas centrales.

#### **4.3. EFECTO DE LA ISQUEMIA HEPATICA EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE ESTRÉS OXIDATIVO INDUCIDO POR LA ADMINISTRACION CRONICA DE ETANOL.**

El objeto de este estudio fue valorar la peroxidación lipídica inducida por dos situaciones diferentes de estrés oxidativo hepático: la producida por la ingestión crónica de etanol (un proceso dependiente de la dosis y el tiempo de tratamiento), y la producida durante la isquemia y posterior revascularización del hígado (un proceso de dependencia multifactorial poco conocida).

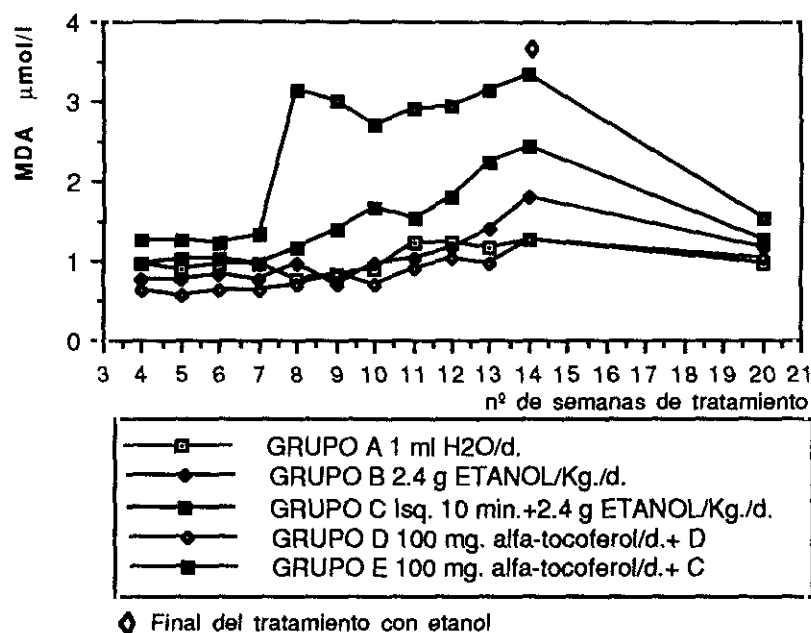
Se estudió también el efecto terapéutico del  $\alpha$ -tocoferol, potente antioxidante fisiológico, que intervendría como protector frente la peroxidación lipídica de los ácidos grasos polienólicos de las membranas celulares.

También se valoró la mortalidad de los animales sometidos a las distintas situaciones de estrés oxidativo. Esta valoración se realizó durante los primeros treinta días de tratamiento con etanol, a fin de que las frecuentes extracciones de sangre no interfiriesen en éste parámetro.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

En los animales control (Grupo A), tratados con agua, no se observaron variaciones en las concentraciones séricas de MDA durante el experimento.

La administración crónica de etanol (grupo B) no dió lugar a un incremento de las concentraciones en suero de MDA en la dosis utilizada (2.4 g / Kg. / día.) respecto a las observadas en los controles (Grupo A). Sin embargo, cuando la administración de etanol iba precedida de un proceso de isquemia-reperfusión hepática (grupo C), las concentraciones séricas de MDA se elevaban. Este incremento en la concentración de MDA, era muy significativo a partir de la séptima semana de comenzado el tratamiento con etanol, manteniéndose después en niveles tres veces superiores a los basales a partir de la octava semana, y volviendo a las concentraciones iniciales, una vez interrumpida la administración de etanol (Fig. 22).



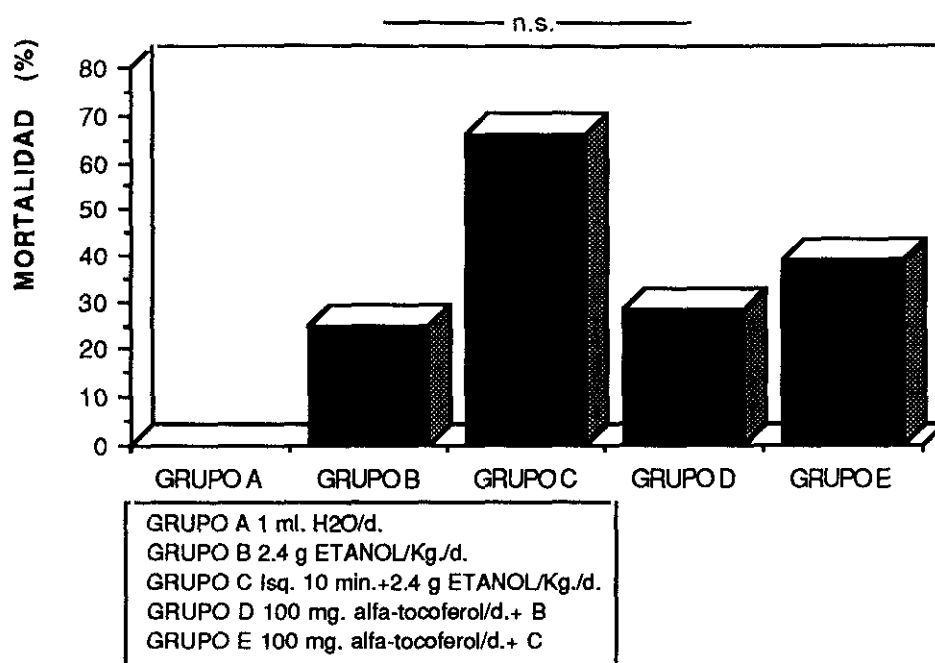
**Fig. 22 Concentraciones séricas de MDA, frente al tiempo en semanas de tratamiento, en un modelo de intoxicación crónica por Etanol. Influencia de la isquemia-reperfusión del hígado.**

En los grupos C y D el  $\alpha$ -tocoferol se suministró diariamente (i.p.) a las dosis indicadas desde los cinco días anteriores a la administración de Etanol y hasta que concluyó el experimento. El Etanol, y el agua, se suministraron mediante una cánula (v.o.).

Durante las siete primeras semanas de tratamiento con Etanol (v.o.) las diferencias entre el grupo E y el grupo control A no fueron significativas. En el resto de casos las diferencias tuvieron siempre significación estadística ( $p < 0.001$ ). Nótese que la administración de  $\alpha$ -tocoferol a los animales sometidos a isquemia y administración de etanol (grupo E) produce una significativa disminución del MDA sérico y un considerable retardo temporal en la elevación de dichas concentraciones, respecto a los no tratados con  $\alpha$ -tocoferol.

El porcentaje máximo de desviación estandar no superó el 13% respecto de la media.

La administración de  $\alpha$ -tocoferol a los animales con isquemia-reperfusión hepática y posterior administración diaria de etanol (Grupo E) resultó en una disminución significativa de los valores séricos de concentración de MDA, respecto al grupo C, no tratado (Fig. 22). El tratamiento con  $\alpha$ -tocoferol también supuso un retardo temporal de 21 días en la aparición del incremento de las concentraciones de MDA. La mortalidad también disminuyó significativamente en el grupo E, tratado con  $\alpha$ -tocoferol, respecto al grupo C, no tratado (39% Vs 66%) (Fig. 23).



**Fig. 23 Mortalidad después de 30 días de tratamiento con Etanol en los grupos sometidos a diversas condiciones de estrés oxidativo.**

En los grupos C y D el  $\alpha$ -tocoferol se suministró diariamente (i.p.) a las dosis indicadas desde los cinco días anteriores a la administración de Etanol y hasta que concluyó el experimento.

Excepto en el caso señalado en la figura las diferencias entre grupos fueron significativas ( $p < 0.01$ ).

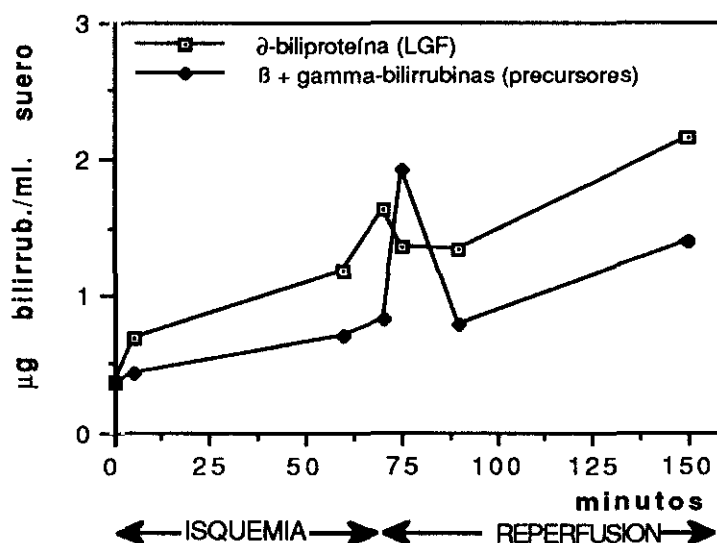
El porcentaje máximo de desviación estándar frente a la media fue del 12%.

#### 4.4. EFECTO DE LA ISQUEMIA-REPERFUSION HEPATICA EN LA SINTESIS DEL FACTOR DE CRECIMIENTO DE HIGADO (LGF)

Desde los momentos inmediatamente posteriores a la instauración de la isquemia hepática, se observó un incremento progresivo de las concentraciones de la biliproteína LGF y de sus precursores (Fig. 24) que coincidió con una disminución, durante el mismo período, de la concentración de MDA en el tejido hepático (Fig. 25), respecto a las concentraciones observadas en los animales considerados como control.

Inmediatamente antes de la revascularización de los lóbulos isquémicos, las concentraciones de LGF descendían, a pesar de que sus precursores, aumentaban en más de dos veces su concentración (Fig. 24), para descender después de 5 minutos de reperfusión. Justo en este momento, se producía una disminución de la concentración del MDA hepático alcanzándose concentraciones muy inferiores a las observadas en los controles (Fig. 25). Este fenómeno pudo observarse desde los diez minutos anteriores a la revascularización, y hasta los quince minutos

posteriores a la revascularización de los lóbulos isquémicos. A la hora de la reperfusión, pudo comprobarse que tanto las concentraciones de LGF, como de MDA se habían incrementado considerablemente respecto a los controles.



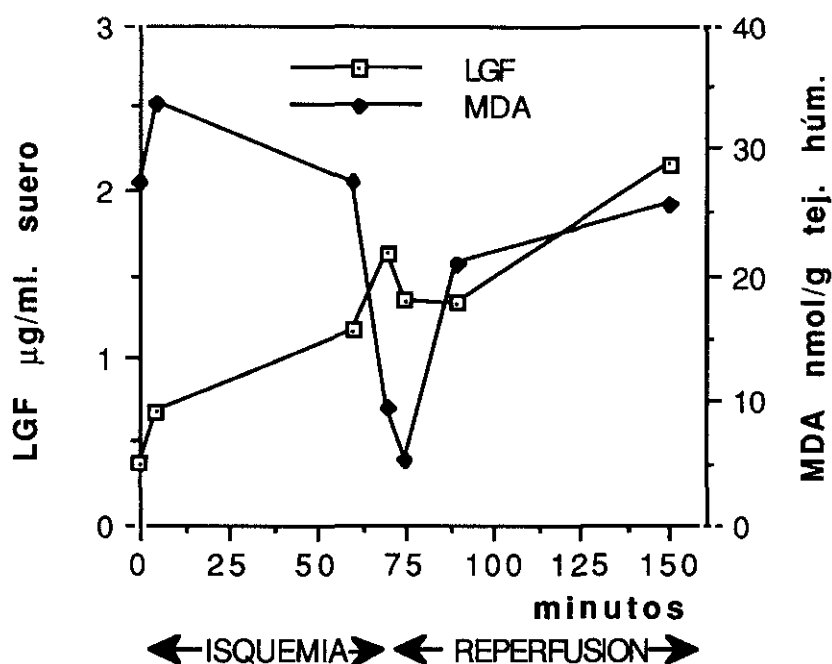
**Fig. 24 Efecto de la isquemia-reprfusión en las concentraciones séricas de factor de regeneración hepática (LGF) y de sus precursores.**

Las diferencias observadas entre las concentraciones de LGF y sus precursores hepáticos respecto al tiempo de isquemia reperfusión fueron siempre significativas respecto a sus controles ( $p < 0.01$ ).

El porcentaje máximo de desviación estandar no superó el 12% respecto de la media.

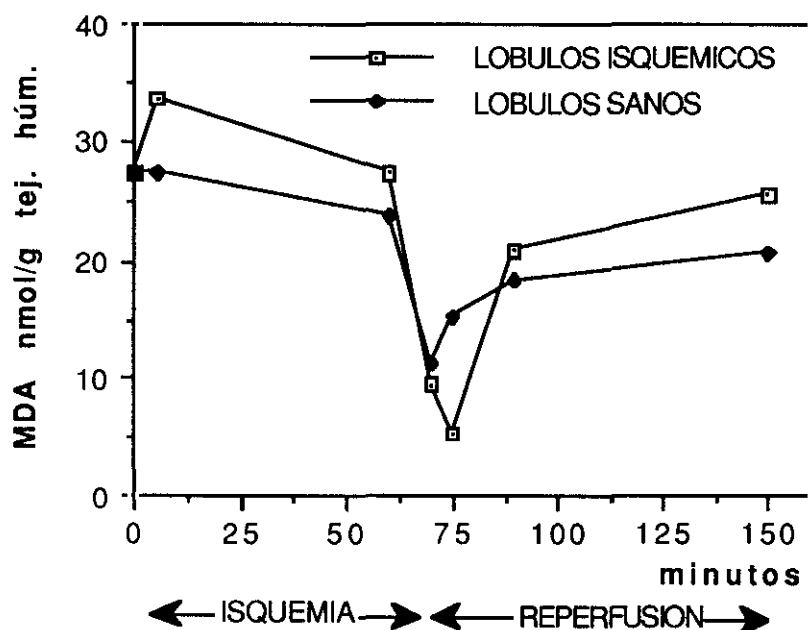
Después de transcurridos los primeros quince minutos de revascularización, las concentraciones de LGF y sus precursores aumentaban progresivamente, fenómeno que se constató hasta las 24 horas después de la reperfusión, mientras que los valores de MDA recuperaban su concentración basal alcanzando concentraciones incluso superiores a las 24 horas de revascularización, según puede observarse en el perfil de concentraciones de MDA de los lóbulos isquémicos y no-isquémicos a lo largo de la isquemia-reperfusión (Fig. 26).

Con el fin de estudiar cuál era el efecto de la isquemia sobre la recuperación de la masa hepática, después de la resección quirúrgica de parte de los lóbulos hepáticos, se realizaron hepatectomías parciales del 70%, disecando los lóbulos izquierdo y medio, y conservando, los derechos y el lóbulo caudado. A la mitad de las ratas operadas se les sometió a una isquemia de 70 minutos de los lóbulos derechos antes de practicarles la hepatectomía. Los animales se sacrificaron a los 8 días de la operación, y sus hígados pesados (Fig. 27).



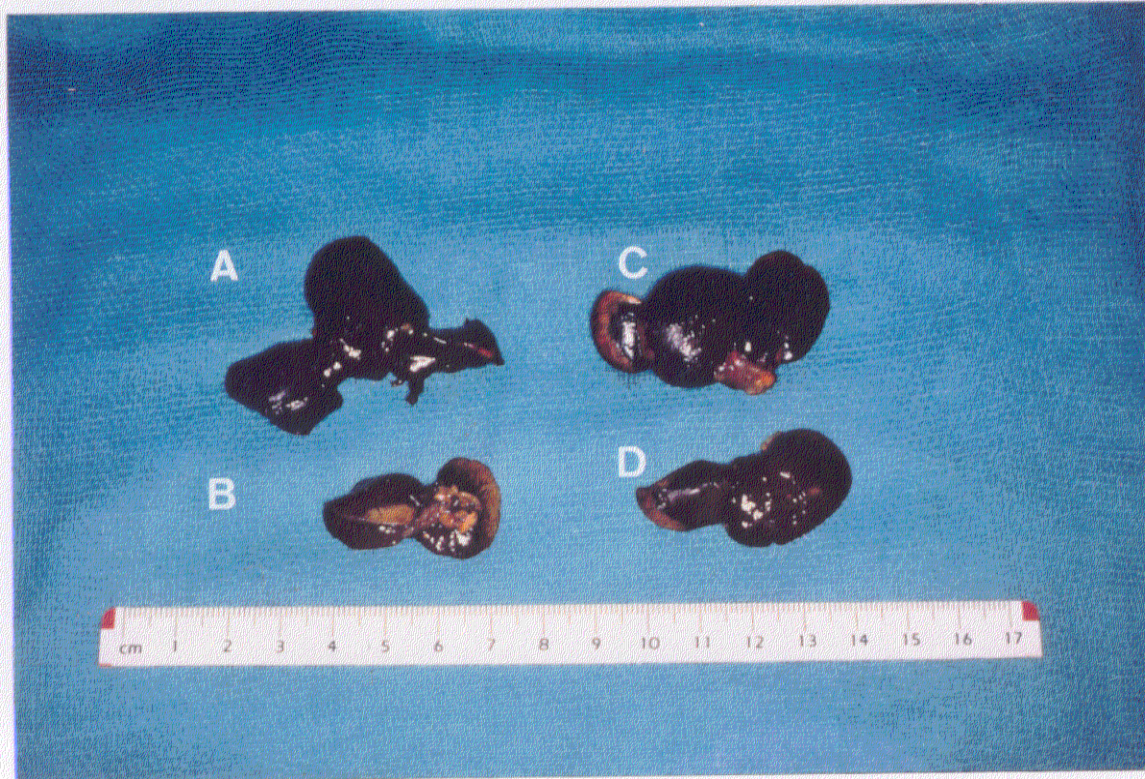
**Fig. 25 Variación durante la isquemia-reperfusión de las concentraciones séricas de LGF y de MDA en homogenizado de tejido hepático.**

Las diferencias entre las concentraciones de LGF y de MDA fueron significativas en todos los puntos ( $p < 0.01$ ). Nótese la relación inversa entre las concentraciones de LGF y MDA durante la isquemia, y en las primeras etapas de la reperfusión. El porcentaje máximo de desviación estandar nunca superó el 19% respecto de la media.



**Fig. 26 Variación de las concentraciones de MDA en homogeneizados de lóbulos sometidos a isquemia-reperfusión, y lóbulos sin afectar.**

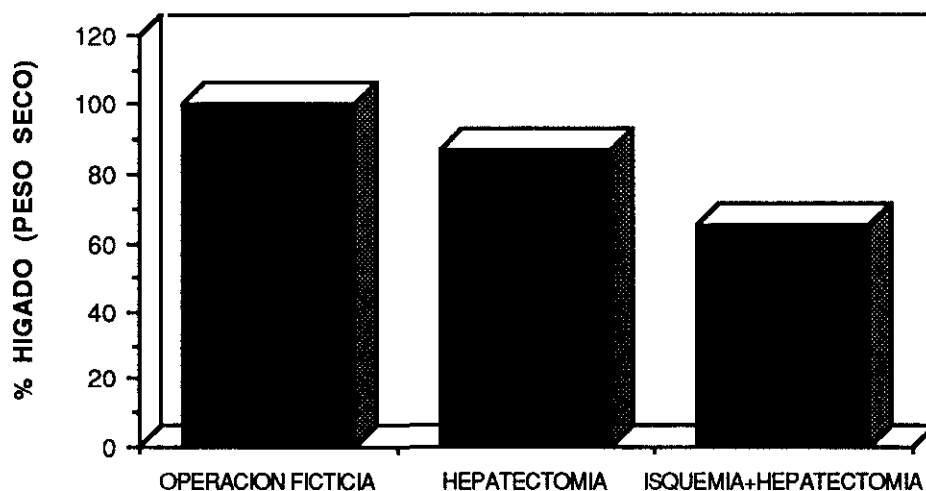
La determinación de MDA en tejido hepático, se realizaron en homogeneizados de hígado, aplicando el método del TBA. Las diferencias fueron significativas en todos los puntos ( $p < 0.01$ ). El porcentaje máximo de desviación estandar no superó el 19% respecto de la media.



**Fig. 27 Efecto de la isquemia en la regeneración hepática después de hepatectomía.**

Cuando al hígado normal (A) se le practica una hepatectomía quirúrgica de su lóbulos izquierdo y medio (B) (70% del hígado), los lóbulos derechos, después de 8 días desde la intervención, han regenerado la práctica totalidad de la masa pérdida, con un peso muy similar (87% Vs control), al que presentaba el hígado antes de la intervención (C). Sin embargo, cuando los lóbulos regenerantes (derechos) han sufrido una isquemia caliente (70 min.) previa a la hepatectomía, presentan un peso muy inferior (65% Vs control) al esperado a los 8 días de la intervención (D).

Los hígados de las ratas que sólo habían sufrido hepatectomía habían recuperado prácticamente la totalidad de su masa hepática inicial, mientras que los que habían sufrido una isquemia previa de los lóbulos regenerantes lo habían hecho en un porcentaje significativamente menor (87% Vs 65%) (Fig. 28).



**Fig. 28** Porcentaje de regeneración de la masa hepática en animales sometidos a una operación ficticia (laparotomía), ratas con hepatectomía parcial (70%) y ratas sometidas a una isquemia caliente (70 min.) previamente a la hepatectomía. Las diferencias entre grupos fueron significativas ( $p < 0.05$ ). El porcentaje máximo de desviación estándar no superó el 14% respecto a la media.

#### 4.5. PROTECCION FARMACOLOGICA DEL HIGADO ISQUEMICO: EFECTO DE LOS FARMACOS CLORPROMAZINA Y PENTOXIFILINA

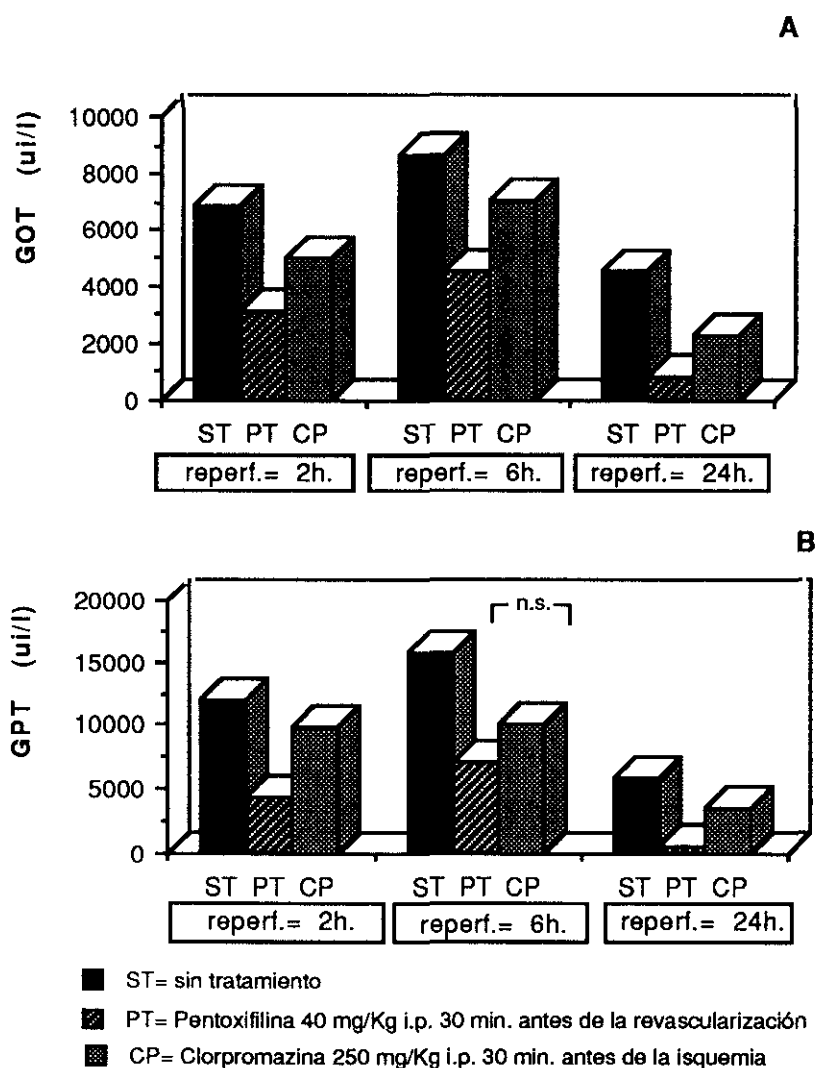
Los resultados observados en los tres grupos de experimentación, sin tratamiento farmacológico, tratados con pentoxifilina, y tratados con clorpromazina, fueron los siguientes:

##### 4.5.1. Estudio Bioquímico.

Los valores de las transaminasas GPT y GOT (Fig. 29) disminuyeron significativamente en los grupos tratados con pentoxifilina o clorpromazina respecto a los valores observados en los animales sin tratamiento farmacológico.

A las 6 horas de reperusión, las concentraciones de GPT observadas en los animales tratados con clorpromazina y los tratados con pentoxifilina, no mostraron diferencias estadísticas, sugiriendo un efecto similar después de transcurrido éste tiempo de reperusión, sobre los niveles en sangre de ésta enzima.

El incremento en las concentraciones de LDH (Fig. 30) fué también considerablemente menor en los grupos de animales tratados farmacológicamente. A las 6 horas de reperusión no se observaron diferencias significativas entre los animales tratados con pentoxifilina y los tratados con clorpromazina .

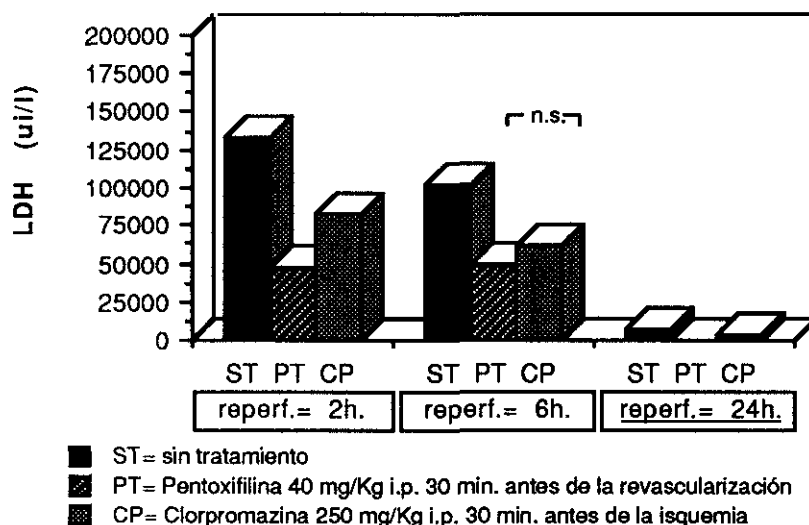


**Fig. 29 Protección farmacológica del hígado con isquemia-reperusión. Concentraciones séricas de GOT (A) y GPT (B).**

Las muestras de sangre se obtuvieron por exanguinación a través de la cava inferior a las 2, 6 y 24 horas de reperusión hepática después de un periodo de isquemia caliente de 70 min.

Menos en el caso indicado las diferencias fueron siempre significativas ( $p < 0.05$ ).

El porcentaje máximo de desviación estandar no superó el 9% (A), y el 6% (B), respectivamente, respecto de la media.



**Fig. 30 Protección farmacológica del hígado con isquemia-reperfusión. Concentraciones séricas de LDH.**

Las muestras de sangre se obtuvieron por exanguinación a través de la cava inferior a las 2, 6 y 24 horas de reperfusion hepática después de un periodo de isquemia caliente de 70 min.

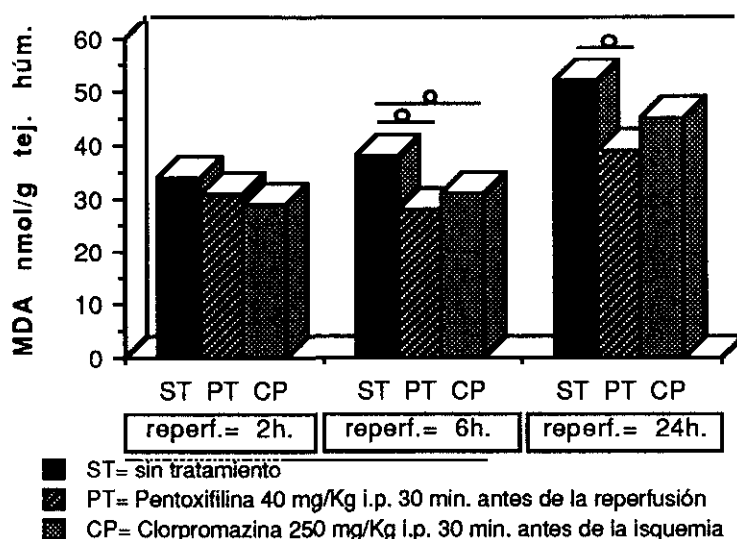
Menos en el caso indicado las diferencias fueron siempre significativas ( $p < 0.05$ ).

El porcentaje máximo de desviación estandar no superó el 14% respecto de la media.

La peroxidación lipídica, valorada por las concentraciones hepáticas de MDA (Fig. 31), a los 15 minutos de revascularizados los lóbulos isquémicos, no mostró diferencias significativas entre los animales tratados y no tratados.

Sin embargo, cuando homogenizados de los lóbulos isquémicos eran incubados (Fig. 31), durante 30 minutos, en una mezcla oxidante (sulfato férrico/ácido ascórbico), con el fin de estudiar la sensibilidad del tejido al estrés oxidativo producido por la reperfusion de los lóbulos isquémicos, se observó, que los animales con tratamiento farmacológico, tenían concentraciones en tejido hepático de MDA significativamente inferiores, a las de los animales sin tratar.

Después de 60 minutos de incubación, éstas concentraciones se incrementaron en los tres grupos (Fig. 31), siendo significativamente inferiores en los animales tratados con pentoxifilina, que las observadas en los animales tratados con clorpromazina, y en aquellos sin tratamiento, que no mostraron diferencias entre ellos.

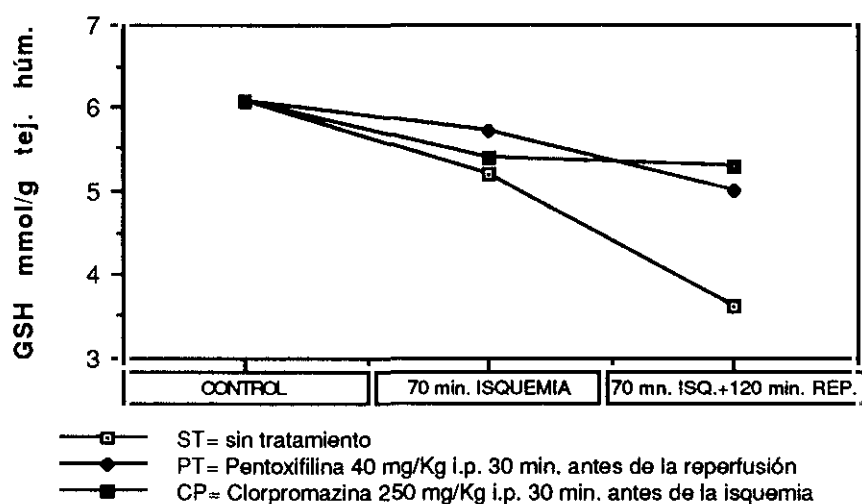


**Fig. 31 Protección farmacológica del hígado con isquemia-reperusión. Concentraciones de MDA en homogeneizados de hígado.**

La peroxidación lipídica se valoró por la concentración de MDA presente en homogeneizados de los lóbulos hepáticos, mediante el método del TBA.

Las muestras de tejido se obtuvieron a los 15 min. de revascularizar los lóbulos isquémicos, después de 70 min. de isquemia hepática caliente. Sólomente en los casos indicados (○) las diferencias fueron significativas ( $p < 0.01$ ).

El porcentaje máximo de desviación estandar no superó el 19% respecto de la media.



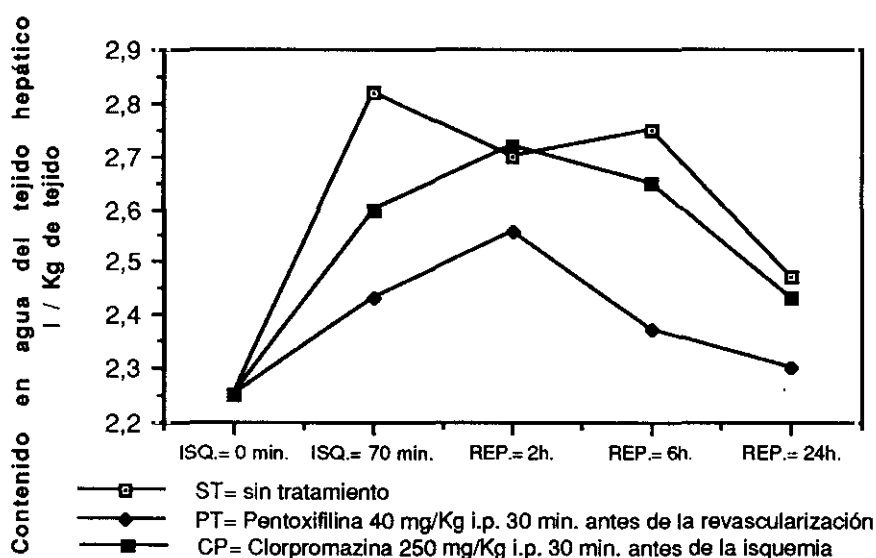
**Fig. 32 Protección farmacológica del hígado con isquemia-reperusión. Concentraciones de GSH en los homogeneizados del hígado.**

La recuperación de las concentraciones basales de GSH hepático, después de la reperusión, fue muy significativa en los animales tratados respecto a los animales no tratados farmacológicamente ( $p < 0.05$ ).

El porcentaje máximo de desviación estandar no superó el 11% respecto de la media.

El descenso de las concentraciones en tejido hepático de GSH (Fig. 32), fue muy acusado durante la isquemia-reperfusión en los animales que no habían sido tratados farmacológicamente, observándose diferencias significativas entre estos y los animales que fueron tratados con pentoxifilina o clorpromazina. Los animales tratados con pentoxifilina no mostraron tendencia a restituir los niveles de GSH, a las 2 horas de perfusión.

El contenido de agua (formación de edema intersticial) en el tejido hepático, de los tres grupos, al término de cada periodo de isquemia, respecto de los valores basales (Fig. 33), disminuyendo después durante la perfusión. Esta disminución fue significativa en los animales tratados con pentoxifilina respecto a los tratados con clorpromazina y los no tratados, que no mostraron diferencias entre ellos.



**Fig. 33 Protección farmacológica del hígado con isquemia-reperfusión. Contenido en agua del tejido hepático.**

El grupo tratado con Pentoxifilina mostró una menor tendencia a desarrollar edema intersticial durante la isquemia que los animales sin tratar, y que aquellos que fueron tratados con Clorpromazina ( $p < 0.01$ ).

El porcentaje máximo de desviación estandar no superó el 12% respecto de la media.

#### **4.5.2. Estudio anatomopatológico.**

##### **Grupo control. Sin tratamiento.**

A las 2 horas de reperfusión: El parénquima hepático mostraba congestión sinusoidal en la zona centro y mediolobulillar con pequeñas áreas de hemorragia en algunos casos (Fig. 34). No se observó necrosis y la reacción inflamatoria era ausente o ligera. No se identificaron figuras de mitosis.

A las 6 horas de reperfusión: Histológicamente se observó congestión y hemorragia difusa. El porcentaje de necrosis hepatocelular oscilaba entre un 20-40%, preferentemente centrolobulillar. La infiltración leucocitaria fue ligera y no había mitosis.

A las 24 horas de reperfusión: Extensa necrosis del parénquima hepático que alcanzaba el 80% del área total (Fig. 34 y 36). La reacción inflamatoria fue de moderada a intensa. No se observaron mitosis (Fig. 34 y 37).

##### **Grupo tratado con pentoxifilina.**

A las 2 horas de reperfusión: El parénquima hepático presentaba ligera congestión sinusoidal, centrolobulillar, sin hemorragia. No se identificó necrosis ni reacción inflamatoria.

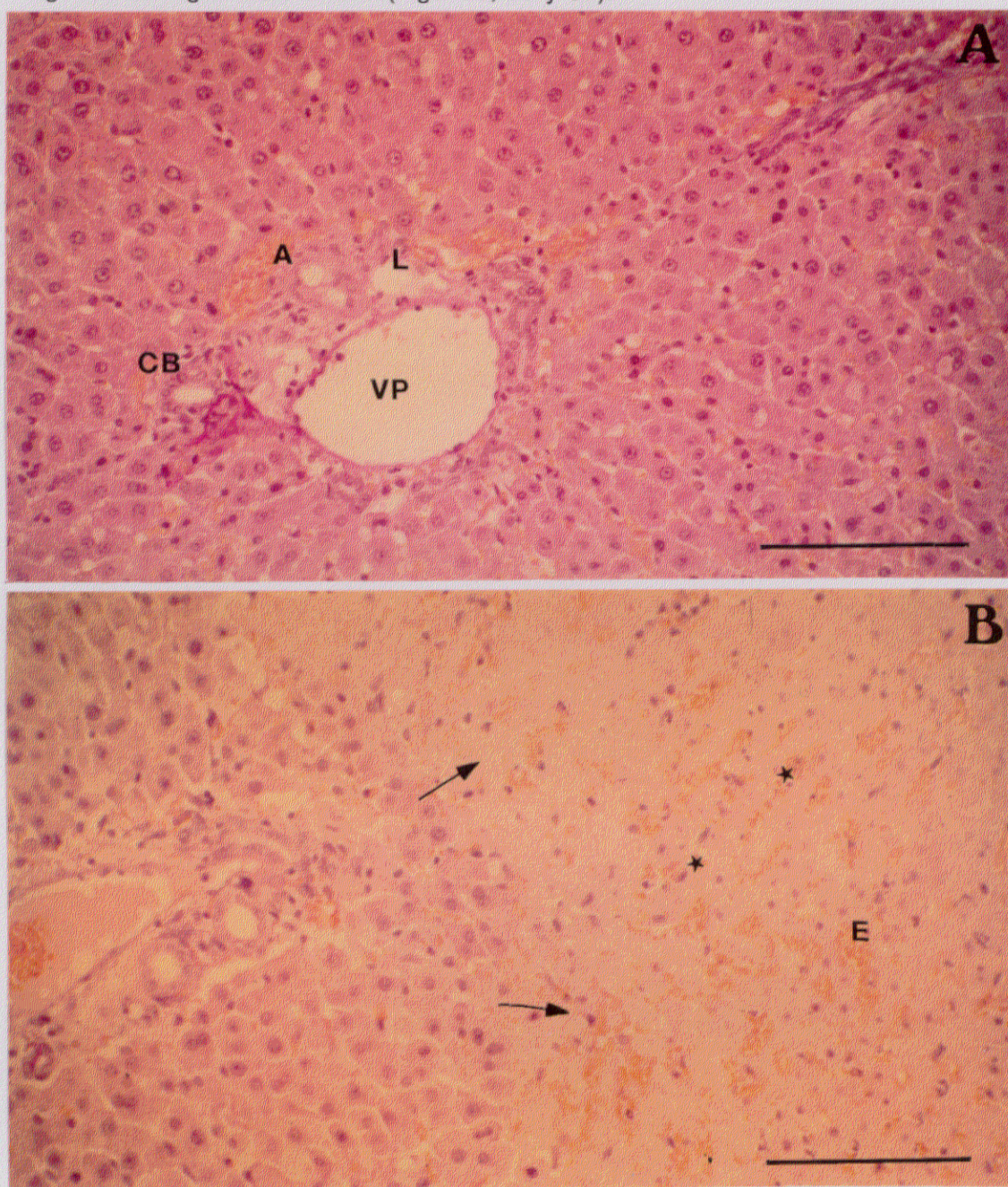
A las 6 horas de reperfusión: Marcada congestión sinusoidal centro y mediolobulillar con un 20% de necrosis parenquimatosa. Ligera infiltración de polimorfonucleares neutrófilos. No se vieron figuras de mitosis.

A las 24 horas de reperfusión: Los cortes histológicos mostraron un porcentaje de necrosis hepatocitaria inferior al 35% (Figs. 35 y 36). Moderada a intensa respuesta inflamatoria (Figs. 35 y 37).

##### **Grupo tratado con clorpromazina.**

Las características de este grupo fueron muy similares a las observadas en los animales tratados con pentoxifilina. Sin embargo después de 24 horas de

reperfusión la necrosis valorada en este grupo presentó un mayor porcentaje, llegando en algún caso al 63%(Figs. 35, 36 y 37).

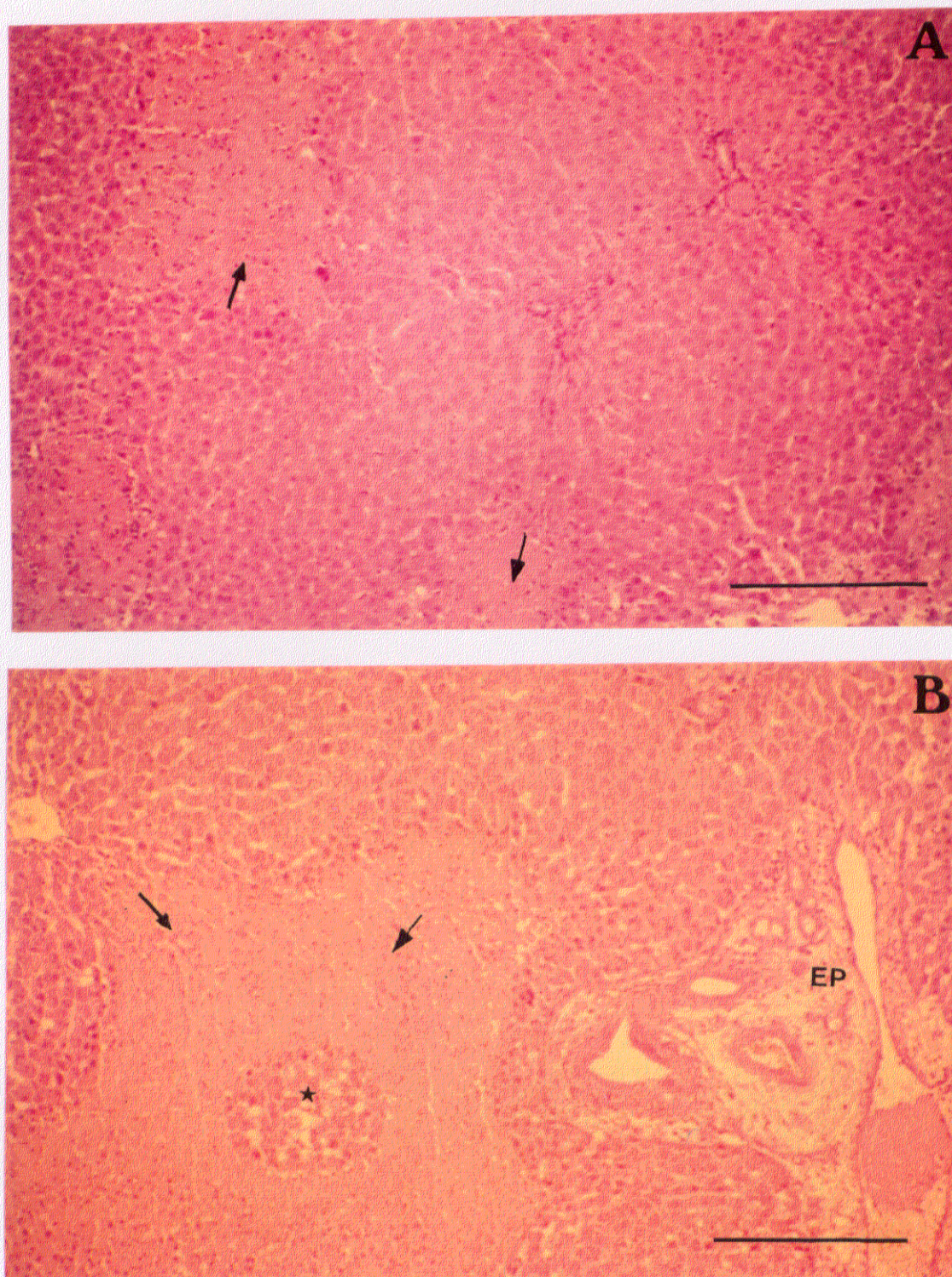


**Fig. 34 Alteraciones morfológicas en el hígado por efecto de la isquemia-reperfusión**

Fotomicrografía de un corte de hígado normal (A) y de otro con isquemia parcial caliente de 70 min. y reperfusión de 24 horas, sin tratamiento farmacológico (B). Tinción hematoxilina-eosina (Barra = 120  $\mu$ m).

(A)-*hígado normal*-. Visión general de un corte de hígado normal en el que se aprecia un espacio portal con todos sus componentes: (VP) vena porta, (CB) conducto biliar, (A) arteria y (L) un linfático.

(B)-*isquemia hepática*-. Se observa a la derecha de la imagen intensa necrosis hepatocitaria ( $\rightarrow$ ) y congestión sinusoidal (\*) con abundantes eritrocitos (E) en los espacios de Disse.

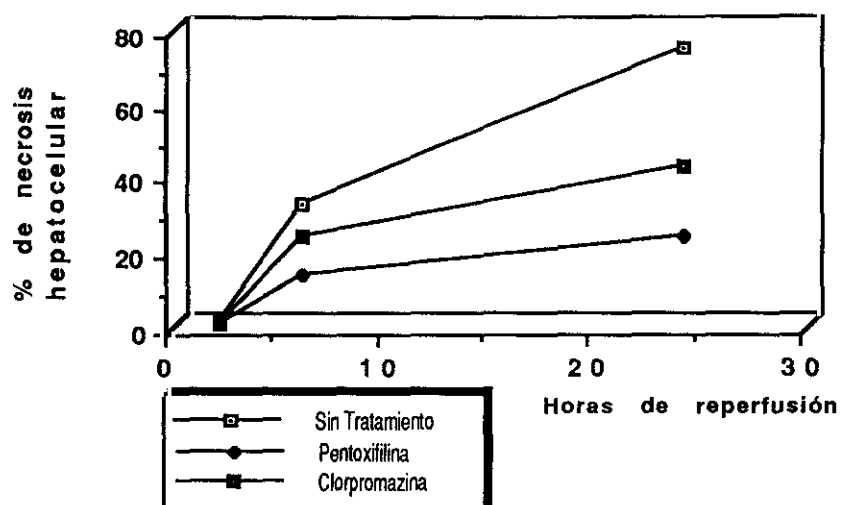


**Fig. 35 Efecto en el hígado post-isquémico de la administración de pentoxifilina (A) y clorpromazina (B) .**

Fotomicrografía de secciones de hígado con isquemia parcial caliente de 70 min. y reperusión de 24 horas. (A) Tratamiento con pentoxifilina, 40 mg/Kg i.p. 30 min. antes de la reperusión. (B) Tratamiento con clorpromazina, 250 mg/Kg i.p. 30 min. antes de la inducción de isquemia. Tinción hematoxilina-eosina (Barra = 240  $\mu$ m).

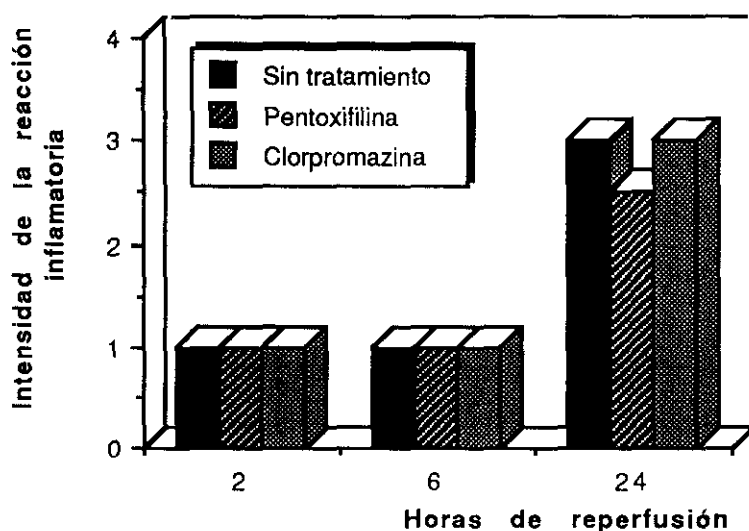
(A)-*pentoxifilina*-. Se observan áreas focales de necrosis con una distribución preferentemente centrolobulillar ( $\rightarrow$ ).

(B)-*clorpromazina*-. Extraña placa de necrosis hepatocitaria ( $\rightarrow$ ) con un nódulo central de hepatocitos conservados (\*). Intenso edema portal (EP).



**Fig. 36** Incremento en el porcentaje de área hepática necrosada después de la reperfusion de los lóbulos sometidos a isquemia caliente. La duración de la isquemia fue de 70 minutos.

Las diferencias fueron significativas ( $p < 0.01$ ) a partir de las 6 horas de reperfusion, tanto entre los animales tratados y sin tratar, como entre los animales tratados con Pentoxifilina, con los que fueron tratados con Clorpromazina. El porcentaje máximo de desviación estandar no superó el 15%.



**Fig. 37** Intensidad de la reacción inflamatoria valorada cualitativamente por la mayor o menor abundancia de neutrófilos polinucleados: 0 = infiltrado ausente; 1 = ligero; 2 = moderado; 3 = intenso. La isquemia duró 70 minutos.

No se encontraron diferencias significativas entre grupos.

La Desviación standard D.S. no superó en ningún caso el 16% respecto a la media.

## **5. DISCUSSION**

## 5. DISCUSION.

El estudio del periodo de hipoxia, o isquemia, que sufre un órgano, tejido o célula por efecto de, un choque hemorrágico, una intervención quirúrgica o por infarto vascular, ha despertado en los últimos años un interés creciente debido al aumento de los trasplantes de órganos como alternativa terapéutica. Sin embargo, nos encontramos en la actualidad lejos de conocer la totalidad de mecanismos y efectos celulares que se inducen en el órgano como causa de la isquemia (caliente o fría), por las distintas manipulaciones y disoluciones empleadas en su preservación y, por la reperfusión de sangre y oxígeno en el órgano isquémico cuando éste es revascularizado. Estas cuestiones necesitan de un profundo estudio multidisciplinar, con el fin de dar soluciones a la hora de conseguir una mejor selección del binomio donante-receptor, una superior calidad del órgano transplantado, y sobre todo, una mayor tolerancia a la isquemia por parte del órgano, con la finalidad, de dar el tiempo suficiente a la hora de tomar decisiones coherentes que aseguren un mayor porcentaje de éxito en los trasplantes, y disminuyan al mismo tiempo, el elevado coste social que implica la prontitud con la que un órgano ha de ser obtenido, preservado para su transporte, y finalmente reimplantado en el receptor adecuado.

Nuestra intención con la realización del presente trabajo, y basándonos en consideraciones descritas con anterioridad por la experiencia clínica y la investigación de base, ha sido dar constancia de una serie de aspectos, en su mayoría poco estudiados, relacionados con lo que hoy se denomina "síndrome de isquemia-reperfusión". En nuestro trabajo hemos utilizado un modelo experimental de isquemia hepática caliente y sobre él hemos estudiado, aspectos como, la importancia de la duración de la isquemia en la viabilidad del hígado, la respuesta del hígado postisquémico al estrés oxidativo, las alteraciones en su capacidad de regeneración, o la importancia de la protección farmacológica del hígado isquémico.

### 5.1. Modelo quirúrgico experimental de isquemia-reperfusión en hígado de rata.

Ratas Wistar macho, de pesos comprendidos entre 200 y 300 g fueron sometidas a dos modelos diferentes de isquemia-reperfusión hepática caliente. En el primer modelo se indujo una isquemia completa por ligadura oclusiva de las ramas vasculares que afieren a la totalidad de los lóbulos hepáticos (Modelo I) (Mc Cord, 1983; Marubayashi et al., 1986). A otro grupo de animales, se les indujo, una isquemia parcial, que afecta al 75% de la masa hepática, mediante la ligadura oclusiva de las ramas vasculares de los lóbulos izquierdo y medios, derivando la

circulación sistémica a través del lóbulo caudado y los lóbulos derechos (Modelo II) (Hayashi et al., 1986; Reilly et al., 1991).

Los resultados que observamos en las gasometrías de sangre arterial, indicaron una acidosis metabólica en el modelo I, sometido a isquemia completa y posterior reperfusión del hígado. Este hallazgo, coincide con la opinión de otros autores, que valorando el aclaramiento en sangre de lactato, otro indicador de la acidosis metabólica, obtienen resultados comparables (Pryor, 1973; Fredmud, 1974; Bruce et al., 1982; Nauta et al., 1991). Sin embargo, en el modelo de isquemia parcial, se observa un predominio de acidosis respiratoria durante la isquemia-reperfusión, que posiblemente, puede atribuirse a estrés y a la anestesia. No se presentan signos de acidosis metabólica (Hayashi et al., 1986), o en algunos animales, en un grado leve durante la reperfusión. Este efecto se encuentra generalmente asociado a fenómenos de -no reperfusión- (Menon et al., 1986; Rodriguez et al., 1991), y por lo tanto de necrosis hepática.

Con respecto a los valores de enzimas hepáticas determinadas en suero, al final del periodo de isquemia, que fue de 30 minutos, y al final de la reperfusión (30 minutos de isquemia + 15 minutos de reperfusión) pudo observarse un incremento, respecto a los controles, de las enzimas GOT y GPT, indicadoras de necrosis hepáticas. Este incremento era más acusado durante la reperfusión (Arthur et al., 1985, 1988; Atalla et al., 1985; Jaesche et al., 1991), aunque algunos autores señalan que esta elevación en las concentraciones de GOT y GPT se produce en etapas más tardías de la reperfusión (Nauta et al., 1991). Hemos observado, que las concentraciones séricas de las transaminasas GOT y GPT en el modelo de isquemia completa (modelo I) alcanzan valores sensiblemente inferiores, y de forma más acusada, al término de la reperfusión, respecto a los valores determinados en los animales sometidos a isquemia parcial (modelo II). Resultados similares aportan otros autores utilizando modelos de isquemia completa (Weisigen, 1986; Marubayashi et al., 1988, 1991; Welbourn et al., 1991), y de isquemia parcial (Mc Cord, 1985; Marotto et al., 1987; Jaesche et al., 1990).

De cualquier forma, en ambos modelos de isquemia caliente (completa y parcial), se induce la aparición de necrosis hepática, valorable por un incremento de las concentraciones séricas de GOT y GPT, y por estudio anatomopatológico, para el tiempo de isquemia empleado en este caso (Gove, 1981; Chaudry, 1983; Frederiks, 1983; Bulkley, 1987; Carey et al., 1991). Este incremento, tiene mayor valor diagnóstico después de reperfundir los lóbulos isquémicos, ya que

durante la isquemia, la interrupción temporal del flujo sanguíneo, dificulta la detección en sangre de los cambios de concentración de enzimas hepáticas (Sagone, 1983; Chiu y Toledo-Pereira, 1987).

Los valores séricos de concentración de la enzima fosfatasa alcalina indican en ambos modelos un incremento de la colestasis durante la isquemia (Stocker et al., 1987), duplicando su concentración respecto a los controles. Esto posiblemente se debe a que en la maniobra quirúrgica de inducción de la isquemia se liga todo el hilio hepático, incluido el conducto biliar, ya que durante la reperfusión se observa una tendencia a disminuir las concentraciones de fosfatasa alcalina en sangre (Thurman, 1988; Slater et al., 1990). En este caso no se presentaron diferencias entre ambos modelos, ni al término de la isquemia, ni después de la reperfusión.

Las determinaciones en suero de LDH, indicaron una disminución de la función hepática, tanto al término de la isquemia, como después del periodo de reperfusión (Chaudry, 1983; Bulkley, 1987; Coletti, 1990). Este incremento era considerablemente superior en el modelo de isquemia parcial. Este dato, es también indicativo de un incremento del metabolismo anaerobio durante la isquemia-reperfusión hepática en ambos modelos (Sevanian y Hochstein, 1985). El incremento de LDH después del reestablecimiento del flujo sanguíneo en los lóbulos postisquémicos, pudiera deberse a un deterioro de la función hepática (Comporti et al., 1967; Smith et al., 1982; Brass, 1991), o a que ciertas zonas del hígado no se han reperfundido correctamente por lo que continúan en condiciones de hipoxia, y por tanto, utilizando rutas anaeróbicas para su mantenimiento metabólico (Lai y Piette, 1977; Fredericks et al., 1982; Bulkley, 1987).

Por otro lado se pudo constatar, mediante la observación macroscópica de los animales operados, que cuando se producía una isquemia hepática completa, se producía en el animal hipertensión portal, lo que induce un cuadro de hipotensión severa, y posteriormente, fallo multiorgánico y muerte del animal (Dymock, 1975; Anderson et al., 1991), de forma similar a lo que ocurre en situaciones de choque (Parks et al., 1983a; Freeman y Crapo, 1986; Waxman et al., 1991). La rata, a diferencia de otros animales de experimentación, como el conejo, no soporta episodios prolongados de hipertensión portal, lo que disminuye sensiblemente su supervivencia durante periodos prolongados de isquemia caliente, y por lo tanto, la posibilidad de su estudio (Chien, 1977; Chaudry, 1983; Hayashi et al., 1986). Con la isquemia parcial, en la que el flujo sanguíneo se deriva a través de los lóbulos derechos, se elimina este fenómeno limitante, y sus consecuencias; tales como, el

éstasis sanguíneo que se produce en el árbol vascular mesentérico, en el intestino y en el bazo. El éstasis de este importante volumen de sangre durante la isquemia parece ser el responsable de la acidosis metabólica observada en la reperfusión de los lóbulos isquémicos ( Pryor, 1973; Fredmud, 1974; Bruce et al., 1982; Reilly, 1991).

## **5.2. Duración de la isquemia y daño hepático.**

La duración de la isquemia es un determinante más en el daño que el hígado sufre después de su reperfusión, siendo el principal factor que va a condicionar la viabilidad del órgano una vez reestablecido su circulación sanguínea normal, y por lo tanto, un aporte adecuado de oxígeno y nutrientes (Harris et al., 1982; Myagkaya, 1985; Navidad Novalvos et al., 1992a). Es necesario, por tanto, conocer, en qué momento, en una situación de isquemia hepática caliente, el hígado se daña irreversiblemente, siendo incapaz de reestablecer y mantener su integridad estructural y funcional (Wattiaux, 1980; Rodriguez et al., 1991).

Durante los últimos años, esta pregunta ha constituido un objeto preferente de estudio, entroncado, con los múltiples criterios existentes de viabilidad celular, y que pretenden establecer, lo que hoy en día se conoce, como "punto de no retorno" (Mora et al., 1987; Carey et al., 1991), a partir del cual, el hígado se considera no viable, o incapaz de recuperar su viabilidad (D'Alessandro et al., 1986; Rodriguez et al., 1991). Este hecho alcanza su máxima relevancia en el transplante de órganos donde la duración de la isquemia caliente, y fría, del órgano donante es decisiva para el éxito de la intervención (Grudman, 1982; Menon et al., 1986; Ciardi et al., 1991).

Está descrito en la literatura, que a diferencia de lo que ocurre durante la isquemia fría, en la que la actividad metabólica se encuentra deprimida (Parks et al., 1983a; Thurman et al., 1988), durante la isquemia caliente el consumo de ATP se produce a la misma velocidad que en condiciones normales, mientras que su producción se ve drásticamente disminuída, debido al metabolismo anaeróbico inducido por la isquemia (Santiago Delpin et al., 1975; Subirats Bayego, 1982; Rodriguez, 1991). Esto conduce a una importante disminución de la energía necesaria para el mantenimiento estructural y funcional de la célula isquémica (Scheider et al., 1986; Bisby, 1990; Carey et al., 1991).

En nuestro trabajo, determinamos las concentraciones séricas de ácido úrico como un medio de valoración indirecta del catabolismo de bases púricas y , por tanto, de ATP; ya que el ácido úrico, es el producto final del catabolismo de este tipo de bases (Atalla et al., 1985; Gutierrez, 1991). Otros autores determinan con el mismo fin las concentraciones de otros metabolitos intermedios, como la xantina, y su predecesora en esta ruta catabólica, la hipoxantina (Fridovich, 1978; Arthur, 1988; Marubayashi et al., 1991). También se determinan las concentraciones de las enzimas implicadas en este paso de reacción; la xantina deshidrogenasa durante el metabolismo aeróbico y la xantina oxidasa durante el anaeróbico o, la relación entre ambas (Brass et al. 1982; Gutierrez, 1991). Durante la isquemia la xantina deshidrogenasa, se transforma en xantina oxidasa por acción de una proteasa dependiente de calcio (Lambotte, 1977; Freeman y Crapo, 1986). Este proceso se favorece por el incremento de la concentración intracelular de calcio que tiene lugar durante la isquemia (Ishigami et al., 1984; Fariss, 1985; Nauta, 1991).

En nuestro estudio de las concentraciones séricas de ácido úrico en relación a la duración de la isquemia, encontramos que, a mayor tiempo de isquemia caliente, detectamos concentraciones en sangre de ácido úrico progresivamente mayores. Esto supone un catabolismo acelerado del ATP durante la isquemia, confirmando lo descrito por otros autores, que determinan metabolitos intermedios de ésta ruta degradativa, como los anteriormente citados, para tiempos de isquemia caliente similares (Lambotte, 1977; Flye y Yu, 1987; Brass et al., 1991; Marubayashi et al., 1991). Lo que permite pensar que el ácido úrico es un buen indicador del catabolismo de bases púricas, siendo además muy sencilla su determinación, a diferencia de la Xantina y la Hipoxantina, cuya determinación necesita de técnicas que generalmente no están estandarizadas en la clínica.

Después de la reperusión de los lóbulos isquémicos, la concentración de ácido úrico continúa elevándose para tiempos de isquemia caliente de 15 y 30 minutos respectivamente. Cuando la isquemia es de 60 minutos se mantiene en los mismos valores que al término de la isquemia, y cuando es de 120 minutos las concentraciones de ácido úrico disminuyen después de la reperusión (Hayashi et al., 1986; Ohkohchi et al., 1991).

Con el fin de contrastar estos resultados, realizamos también determinaciones en tejido hepático de concentraciones de ATP, tanto al final de cada uno de los periodos de isquemia (30, 60 y 120 min.) como al término de la reperusión (15 min.). No se hicieron determinaciones en tiempos de isquemia inferiores por

existir documentación bibliográfica suficiente en la que se demuestra que, tiempos de isquemia hepática caliente inferiores a 30 minutos son totalmente reversibles, y por lo tanto, de poco interés desde el punto de vista patológico.

Comprobamos, que para los tiempos de isquemia estudiados, se produce una drástica caída en los niveles tisulares de ATP debido a que en situaciones de anaeróbiosis se produce dos moléculas de ATP por molécula de Glucosa consumida, frente a las 38 que se producen durante el metabolismo aeróbico. No se observaron diferencias al término de la isquemia para los tiempos indicados, lo que hace pensar, coincidiendo con la opinión de otros autores (Mittnacht y Farber, 1981; Gutierrez, 1991), que el ATP se consume durante las primeras etapas de la isquemia caliente, ya que a temperatura fisiológica, la actividad metabólica no se encuentra deprimida. Durante la reperfusión se produce una progresiva recuperación de las concentraciones basales de ATP debido a un incremento de la síntesis al reestablecerse las condiciones aeróbicas. Esta recuperación fue más rápida cuanto menor era el tiempo de la isquemia. Cuando la isquemia fue de 120 minutos, no había recuperación de las concentraciones de ATP, lo que nos hace pensar que cuando la duración de la isquemia caliente es de 120 minutos, o más, se producen profundas alteraciones en la fosforilación oxidativa (Castillo-Olivares et al., 1972), daños irreversibles en las ATP-adenosina-5'-difosfato-translocasas (Comporti et al., 1967) o falta de los sustratos metabólicos necesarios para la síntesis de novo de ATP (Castillo-Olivares et al., 1972; Naqui y Chance, 1986).

En cuanto a la necrosis hepatocelular producida como consecuencia de la isquemia-reperfusión, y valorada, mediante el análisis de las concentraciones séricas de GPT y GOT, pudimos observar un incremento significativo, y directamente proporcional, de los valores de estas transaminasas en relación al tiempo de duración de la isquemia. Otros autores han observado incrementos parecidos para tiempos de isquemia similares a los estudiados en nuestro trabajo (Gove, 1981; Fredericks, 1983; Schneider y Gorschboth, 1983).

Se ha observado también que estos incrementos en los títulos séricos de estas transaminasas están íntimamente relacionados con la masa y el volumen del hígado. De manera que cuanto más grande es el hígado, como en el cerdo o el perro (Ueda et al., 1987; Nauta et al., 1991), más se suaviza el incremento en las concentraciones séricas de GOT y GPT respecto a lo observado en animales de menor tamaño, como la rata, en la que los incrementos son más acusados, debido a su

metabolismo, más acelerado (Baraona et al., 1977; Arthur et al., 1985; Brass et al., 1991).

Estas elevaciones en las concentraciones séricas de GPT y GOT, como expresión del daño hepático, se hace mucho más patente después de la reperfusión del hígado (Wattiaux, 1980; Bulkley, 1987; Nauta, 1991), guardando una clara relación lineal, con los valores observados al término de cada uno de los periodos de isquemia. Esta correlación entre los valores obtenidos durante un periodo determinado de isquemia y los valorados después de la reperfusión, nos permite predecir, de forma bastante aproximada, cómo será el estado del hígado después de sufrir un periodo de isquemia caliente.

Está descrito en la literatura, que cuanto más prolongada es la isquemia sufrida por el hígado, más frecuentes son después de la revascularización los fenómenos de -no reperfusión- (Santiago Delpin et al., 1972; Mora et al., 1986) posiblemente, debido a alteraciones en la permeabilidad vascular (Nordtröm, 1985; Bisby, 1990; Jaesche et al., 1990) por una vasoconstricción inducida por agentes vasoactivos (Lai y Piette, 1977; Ueda et al., 1987; Anderson et al., 1991) y, sobre todo, por la acumulación sobre el endotelio vascular de numerosos neutrófilos polimorfonucleados que, obliterando ramas capilares impedirían el paso de la circulación sanguínea, induciendo necrosis en la masa hepática circundante (Starke y Farber, 1985; Carey et al., 1991). Estas alteraciones generadoras de necrosis hepática, serían la causa principal, del progresivo aumento de la necrosis hepatocelular expresada como concentraciones de GPT y GOT en relación a la duración de la isquemia (Gove, 1981; Navidad Novalvos et al., 1992a).

Otro tanto podemos decir de las concentraciones de LDH y fosfatasa alcalina, también relacionadas linealmente con la duración de la isquemia. La LDH, como indicador de disfunción hepática, y de actividad metabólica en condiciones de anaerobiosis, se incrementa durante el periodo de isquemia, de manera que cuanto más prolongada es la isquemia, mayores son las concentraciones séricas de LDH (Mitnacht y Farber, 1981; Parks et al., 1983a; Gutierrez, 1991). Este fenómeno, como en el caso anterior, es mucho más patente después de la reperfusión de los lóbulos isquémicos, y se correlaciona con los valores obtenidos al término de cada uno de los periodos de isquemia, lo que nuevamente, nos permite utilizarlo como un valor predictivo de la integridad de la funcionalidad hepática.

Los valores de fosfatasa alcalina, también se incrementan con la duración de la isquemia caliente, si bien, éste aumento es más patente para tiempos de isquemia superiores a 30 minutos respecto a los obtenidos en los animales control (Mora et al., 1987; Navidad Novalvos et al., 1992a). Los valores obtenidos después de la reperusión, son nuevamente, reflejo de lo que ocurre al prolongar el tiempo de isquemia, guardando también en este caso, una relación lineal entre ambos valores. Este perfil de concentraciones sugiere, que es a partir de tiempos superiores a los 30 minutos de isquemia caliente cuando es valorable la colestasis hepática producida por la obliteración del conducto biliar durante la inducción de la isquemia (Frederiks, 1983; Marubayashi et al., 1987). Nuevamente, podremos predecir al término de la isquemia hepática el índice de colestasis que sufrirá el hígado después de la reperusión de los lóbulos isquémicos.

Es necesario aclarar que esta correlación matemática, de posible valor predictivo, entre los valores de enzimas hepáticas valorados al término de la isquemia, y después de la reperusión se han realizado, en el presente trabajo, para tiempos variables de isquemia caliente, y para un tiempo fijo (15 minutos) de reperusión para cada periodo de isquemia. Por lo tanto, no podemos asegurar que ésta relación matemática se mantenga para tiempos de reperusión distintos al estudiado, por lo que limitaremos su posible valor predictivo a las primeras etapas de la reperusión; etapas que se consideran decisivas en cuanto a la futura viabilidad del hígado sometido a isquemia-reperusión (Bulkley, 1987; Ferrero et al., 1980,1990). Un claro exponente de este concepto son las intervenciones de transplante hepático ( Belcher, 1961; Castillo-Olivares et al., 1972; Mora et al., 1986; Cardenas et al., 1989; Ciardi et al., 1991).

El hígado, durante la isquemia-reperusión de la totalidad, o de parte de sus lóbulos, sufre numerosas alteraciones, estructurales y funcionales, que en último término, resultan en la irreversibilidad del proceso de deterioro celular, y en muerte de las células afectadas (Bruce et al., 1982; Buechter, 1988, Bisby, 1990; Carey, 1991). Una de los principales cambios inducidos por anoxia, es la alteración del sistema de reducción-oxidación de la célula, por causa del estrés oxidativo que, en menor o mayor grado, sufren las células hepáticas durante la isquemia-reperusión (Mittnacht y Farber, 1981; Rosen et al., 1982; Naqui y Chance, 1986).

De la capacidad de respuesta al estrés oxidativo, va a depender, en buena parte, la futura viabilidad del hígado reperfundido tras la isquemia (Kappas, 1985; Sies,

1985; Halliwell, 1988). Está demostrado, que la continua depleción, durante la isquemia-reperfusión, de antioxidantes celulares, como el  $\alpha$ -tocoferol o el glutathion (Sumimoto et al., 1987; Lenz et al., 1989; Sharma et al., 1990; Slater et al., 1990; Wu T.-W. et al., 1991a), y de sistemas enzimáticos como la SOD y la Catalasa (Fridowich, 1978; Atalla et al., 1985; Cardenas, 1989; Brass et al., 1991), así como, una síntesis de los mismos, drásticamente disminuída por la hipoxia (Nordström et al., 1985; Marubayashi et al., 1986; Sumimoto et al., 1987), son los principales responsables de un progresivo aumento de la susceptibilidad del hígado a la isquemia, directamente relacionado con la duración de la misma (Casini et al., 1985; Cotgrave et al., 1988; Barja de Quiroga et al., 1990).

En nuestro estudio, realizamos un perfil de las concentraciones de MDA en tejido hepático, tanto de los lóbulos sometidos a isquemia-reperfusión, como de aquellos no afectados, y que fueron utilizados como puente para el mantenimiento del flujo sanguíneo (Hayashi et al., 1986; Reilly et al., 1991). La susceptibilidad al estrés oxidativo se valoró mediante la incubación de sus homogeneizados a 37°C en una mezcla oxidante (Esterbauer et al., 1982; Flye y Yu, 1987; Barja de Quiroga et al., 1990). Pudo comprobarse, que durante los primeros 60 minutos de isquemia no hay una alteración apreciable en las concentraciones de MDA respecto a los valores observados antes de la inducción de la isquemia, si bien, los lóbulos isquémicos tenían valores ligeramente superiores, que aquellos considerados "sanos", o control. Esta observación, coincide con lo observado en otra experiencia, en la que se valoraron dienos conjugados, como indicador de peroxidación lipídica (Wu T.-W. et al., 1991a). Sin embargo, tanto estos datos, como los nuestros son difíciles de contrastar bibliográficamente, debido a que generalmente, suelen tomarse determinaciones puntuales y no, perfiles de concentración en el tiempo (Halliwell y Gutteridge, 1984b; Borowitz y Montgomery, 1989; Gutteridge y Halliwell, 1990).

Curiosamente, al término de los 70 minutos de isquemia caliente, y hasta los 15 minutos de perfusión, las concentraciones de MDA, sufrían un considerable descenso, alcanzando valores, incluso inferiores a los considerados basales. Este fenómeno no había sido descrito anteriormente.

Cuando los homogeneizados hepáticos, eran incubados durante 30 y 60 minutos en la mezcla oxidante, los valores obtenidos respecto a los homogeneizados sin incubar se multiplicaban sensiblemente, indicando un aumento progresivo de la peroxidación lipídica respecto al tiempo de incubación (Barja de Quiroga et al.,

1990). Sin embargo, el perfil obtenido no variaba, salvo, en las determinaciones realizadas a los 15 minutos de reperfusión, observándose un drástico incremento en las concentraciones de MDA en los lóbulos sometidos a isquemia-reperfusión respecto a los valorados en los hígados "sanos", lo que indica una mayor sensibilidad al estrés oxidativo de los lóbulos postisquémicos en éste momento de la reperfusión. Este dato, coincide con las observaciones descritas en numerosos trabajos, en los que se cita, que la máxima inducción de peroxidación lipídica, tiene lugar entre los 10 y 20 minutos después de restituir el flujo sanguíneo en los lóbulos isquémicos (Slater, 1984b; Mc Cord, 1985; Wu T.-W. et al., 1991a). Esta diferencia entre los valores de MDA observados en los lóbulos postisquémicos, respecto a los "sanos" desaparece posteriormente, como causa posiblemente, de la síntesis "de novo", tanto de antioxidantes celulares, como de captadores de radicales libres (Halliwell y Gutteridge, 1984b; Casini et al., 1985; Kappas, 1985; Hasselgren, 1987; Cotgrave et al., 1988).

Por otro lado, los valores de MDA obtenidos a las 24 horas de la reperfusión, sensiblemente elevados, frente a los valores basales, podrían indicar un aporte exógeno de radicales libres por parte de neutrófilos adheridos al endotelio sinusoide, que inducirían fenómenos de peroxidación lipídica valorables en las determinaciones realizadas (Jaesche et al., 1990; Welbourn et al., 1991).

Por lo tanto, parece ser que la isquemia induce , durante las primeras etapas de la reperfusión, un incremento significativo de susceptibilidad al estrés oxidativo por parte del tejido hepático (Sies, 1985; Slater, 1990).

También pudo comprobarse, mediante la inyección intravenosa de fluoresceína sódica, y la posterior exposición de los lóbulos a luz ultravioleta (prueba "in vivo"), o de secciones de los mismos (prueba "in vitro") que, después de 30 minutos de isquemia, en algunas ocasiones, se observaban zonas no reperfundidas, o con una reperfusión deficiente, después del restablecimiento del flujo sanguíneo. Estas observaciones han sido publicadas anteriormente por otros autores utilizando técnicas similares a ésta, como la valoración de la reperfusión con fluorímetro de flujos (Silverman et al., 1981), u otras técnicas, generalmente de microscopía (Chevrel y Gatt, 1979; Marotto et al., 1988; Carey et al., 1991). Este fenómeno de -no reperfusión- parece ser consecuencia de la generación de radicales libres durante los primeros minutos de la revascularización de los lóbulos isquémicos (Stocker et al., 1987; Rodriguez, 1991), y a fenómenos de vasoconstricción, posteriores a la revascularización, posiblemente inducidos por la liberación de

sustancias vasoactivas durante éste periodo (Bulkley, 1897; Ueda et al., 1987). Estos radicales libres, actuarían en el endotelio vascular como señales quimiotácticas que atraerían sobre la superficie del endotelio a neutrófilos polimorfonucleados (Gabig y Babior, 1981; Jaesche et al., 1990), los cuales a su vez, generarían más radicales libres, de manera similar a como actúan durante la fagocitosis en los procesos inflamatorios, dañando la estructura y función del endotelio y generando edema intersticial al alterarse la permeabilidad de la membrana endotelial. Esta acumulación de neutrófilos sobre el endotelio puede llegar a interrumpir la circulación sanguínea, produciendo necrosis, por falta de aporte adecuado de oxígeno y nutrientes a las células afectadas (Mc Cord y Roy, 1982; Lucchesy, 1986).

### **5.3. Efecto de la isquemia hepática en un modelo experimental de estrés oxidativo inducido por la administración crónica de etanol.**

El consumo crónico de etanol produce en el hígado numerosas alteraciones, tales como, acidosis celular, cetosis, acumulación de triglicéridos y ácidos grasos, hipoglucemia, etc. (Lieber et al., 1965; Kappas, 1985). Estas alteraciones, deterioran tanto la estructura, como la función de la célula hepática (Ejea Arguillué et al., 1988), siendo muy similares, a las que se procucen por efecto de la isquemia-reperfusión del hígado (Park et al., 1983b; Sevanian y Hochstein, 1985).

En nuestro trabajo hemos comparado estas dos circunstancias, inductoras de estrés oxidativo celular, valorando, concentraciones séricas de MDA, como indicador de peroxidación lipídica. Se estudiaron tanto, el efecto de cada situación por separado, como lo que ocurre cuando ambas circunstancias tienen lugar a un mismo tiempo. De ésta forma valoramos su posible efecto aditivo, o su sinergismo. Se ensayó también, en cada una de las situaciones, la acción del antioxidante fisiológico  $\alpha$ -tocoferol determinando, de ésta manera, su acción terapéutica como captador de radicales libres en éstas situaciones de elevado estrés oxidativo.

Tanto el consumo crónico de etanol, como la revascularización del hígado sometido a isquemia, inducen en el hígado, una situación de estrés oxidativo, que se caracteriza en último término por, la destrucción peroxidativa, de los lípidos que forman parte de las membranas celulares (von Ruecker et al., 1989, Bisby, 1990).

La oxidación del etanol, produce acetaldehído (Schuckit, 1979; Sies, 1985). El acetaldehído, induce una depresión de la fosforilación oxidativa mitocondrial, que se traduce, en una menor producción de ATP, y acumulación de equivalentes reducidos que inducen acidosis metabólica (Sies et al., 1982; Reilly, 1991).

Durante la isquemia hepática caliente, la producción de ATP en condiciones de anoxia, es 18 veces menor, que la que tiene lugar durante el metabolismo aeróbico, mientras que el consumo celular de ATP no se modifica; produciéndose también acidosis metabólica, de forma similar, a lo que ocurre durante el consumo crónico de etanol (Fehér et al., 1987; Gutierrez, 1991).

Por otro lado, el acetaldehído producido durante la oxidación del etanol, puede unirse a la cisteína, uno de los aminoácidos que forman parte del glutathione, disminuyendo de ésta manera su disponibilidad para la síntesis de este importante antioxidante; lo que favorece la formación de radicales libres y de peróxidos lipídicos (Lieber, 1980, 1981; Halliwell, 1988). El acetaldehído incrementa también la actividad de la NADPH-oxidasa, induciendo la formación de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), y por lo tanto, una producción añadida de peróxidos lipídicos (Gove, 1981; Comporti, 1985).

Durante la isquemia, las condiciones de anoxia, o de hipoxia, y un incremento de calcio intracelular, inducen la transformación proteolítica de la xantina deshidrogenasa en xantina oxidasa, enzimas que catalizan la conversión de hipoxantina en xantina durante el catabolismo del ATP. La xantina oxidasa, durante la reperfusión transforma el oxígeno molecular en anión superóxido ( $O_2^-$ ) que inicia numerosas reacciones mediadas por radicales libres, que en último término producirán entre otros efectos perjudiciales, la peroxidación de los lípidos de membrana (Fariss, 1985; von Ruecker et al., 1989).

Como podemos ver, tanto el consumo crónico de etanol, como la isquemia caliente, inducen en el hígado una situación de estrés oxidativo, de consecuencias celulares, cualitativamente similares (Bulkley, 1987; Arthur, 1988).

Durante el tratamiento crónico de etanol, con dosis diarias de 2.4 g de etanol/kg, no se produjo incremento en las concentraciones séricas de MDA. Igualmente, no está descrito, que se induzca un incremento de MDA en suero cuando la duración de la isquemia hepática caliente es inferior a 30 minutos (Hayashi, 1986; Halliwell, 1988; Gutierrez, 1991). El tiempo de isquemia utilizado en

nuestro ensayo fue de 10 minutos. Sin embargo, hemos observado, que cuando concurren ambas circunstancias (isquemia seguida de consumo crónico de etanol), los niveles en sangre de MDA se incrementan, llegando a alcanzar a las 9 semanas de comenzado el ensayo concentraciones, 3 veces superiores a las determinadas antes de comenzar la administración de etanol. Las posibles explicaciones que podrían darse sobre este hecho serían, que ambos procesos inductores de estrés oxidativo tubiesen efecto aditivo, de amplificación cuando tienen lugar a la vez (Kappas, 1985; Bulkley, 1987); o que la isquemia previa a la administración de etanol, aunque de poca duración, sea suficiente para alterar el metabolismo oxidativo del etanol (MEOS) (Fariss, 1985; Brunt, 1988; Buechter, 1988), induciendo la producción de radicales libres y peróxidos lipídicos. Es necesario tener en cuenta, que aunque dosis diarias de etanol inferiores a 3-6 g/Kg no incrementan por si misma los niveles séricos de MDA (Lieber, 1980; Fehér et al., 1987), después de una exposición prolongada al etanol, son suficientes dosis muchos menores, para incrementar la presencia en sangre de sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (Kawase et al., 1989). Esto puede deberse a trastornos nutricionales asociadas al alcoholismo (Lieber et al., 1965; Bonjour, 1979; Chow, 1987), entre otros, alteraciones en las concentraciones celulares de sistemas de defensa como el ácido ascórbico, glutatión, selenio y vitamina E; todos ellos íntimamente relacionados. Estas alteraciones en los sistemas de defensa son muy similares a las que tienen lugar por depleción durante la isquemia caliente, en la que se produce un gasto aumentado por la generación de radicales libres y una síntesis, drásticamente disminuída, por efecto de la hipoxia/anoxia (Santiago Delpin et al., 1975; Baraona et al., 1980; Nordström et al., 1990). Por lo que, en cierto modo, la isquemia previa a la intoxicación con etanol amplificaría la producción de radicales libres y, por lo tanto, sus consecuencias. De hecho, cuando en nuestro trabajo tratábamos a las ratas que habían sufrido una isquemia previa, a la administración de etanol, con  $\alpha$ -tocoferol, las concentraciones elevadas de MDA en suero se reducían a menos de la mitad. Además, la elevación en los niveles de MDA debida al efecto sinérgico de la isquemia y el etanol, se producía más tarde en los animales tratados con  $\alpha$ -tocoferol que, en los animales no tratados, concretamente, tres semanas más tarde. Este efecto positivo de la complementación exógena de  $\alpha$ -tocoferol parece evidenciar la producción de peróxidos lipídicos durante el estrés oxidativo generado por efecto de la isquemia y el tratamiento crónico con etanol (Kawase et al., 1989; Bisby, 1990). Cuando se trataba con  $\alpha$ -tocoferol a animales a los que se les administraba etanol, pero que no habían sufrido una isquemia previa, no se observaba ningún efecto sobre las concentraciones séricas de MDA. Según ésto, podemos pensar que la isquemia-reperfusión hepática limita de alguna forma la capacidad del hígado para

metabolizar etanol, posiblemente por alteraciones en los sistemas responsables de la detoxificación celular (Sies et al., 1982; Sevanian y Hochstein, 1985).

#### **25.4. Efecto del factor de crecimiento de hígado (LGF) en el estrés oxidativo producido durante la isquemia-reperfusión hepática.**

El factor de crecimiento de hígado (LGF), fue caracterizado en plasma, a partir de sangre de ratas parcialmente hepatectomizadas (70%)(Díaz-Gil et al., 1986a; Slater et al., 1990). En un principio fue denominado Promotor Hepático (HP) y corresponde a un aducto de albúmina-bilirrubina, conocido como  $\delta$ -bilirrubina, o bilialbúmina, con un peso molecular de 65 kilodaltons aproximadamente (Díaz-Gil et al., 1987b; Stocker et al., 1987a). La bilirrubina, por acción de la UDP-glucuronil-transferasa se transforma en monoglucurónido de bilirrubina ( $\beta$ -bilirrubina) y en diglucurónido de bilirrubina ( $\gamma$ -bilirrubina). Teóricamente, cualquiera de estas dos especies, puede unirse a la albúmina para formar la bilialbúmina, denominada  $\delta$ -bilirrubina. Sin embargo el mecanismo de formación, y el lugar en el que se produce la unión, son hasta ahora desconocidos. Junto a éste, se han descrito hasta la actualidad otros posibles factores de crecimiento hepático como, la hepatopoyetina A (Michalopoulos y Thaler, 1985), o el HGF (Nakamura et al., 1986). A las 24 horas de realizada la hepatectomía parcial, el LGF presenta un pico de concentración (Díaz-Gil et al., 1987a). Dicho pico, coincide con un máximo de captación de  $^3\text{H}$ -timidina en hígado (máximo de síntesis de DNA) (Díaz-Gil et al., 1987b; Slater et al., 1990). Estudios recientes, realizados en nuestro laboratorio, señalan, que el LGF es detectable en plasma a los pocos minutos de sufrir el hígado una agresión isquémica (Navidad Novalvos et al., 1993. En prensa).

Por otro lado, varios autores atribuyen al LGF capacidad como antioxidante, incluso superior a la del  $\alpha$ -tocoferol (Stocker et al., 1987a; Wu T.-W. et al., 1991a,b), o su análogo hidrosoluble de origen sintético (Trolox-C) (Wu T.-W. et al., 1991a). Esta acción como antioxidante, ha sido atribuida en trabajos anteriores a la bilirrubina en experimentos realizados "in vitro", sobre cultivos de hepatocitos y liposomas (Stocker et al., 1987b). También se ha descrito a la bilirrubina como un potencial captador de radicales peroxilo (Marubayashi et al., 1987). En otros trabajos más recientes, se ha demostrado que el LGF actúa como un potente captador de radicales libres en cultivos de miocitos de ventrículo cardíaco humano (W T.-W. et al., 1991b). Estas capacidades fisiológicas como antioxidante y captador de radicales libres, no han sido descritas en el HGF, ni en la hepatopoyetina A.

En nuestro trabajo realizamos los primeros estudios sobre la implicación del LGF en la generación de peróxidos lipídicos inducida por isquemia-reperfusión hepática en condiciones de normotermia. Se realizaron para ello isquemias parciales (70%) en hígado de rata, con una duración de 70 minutos, a las que posteriormente reperfundíamos. Tomábamos muestras de sangre y de tejido hepático a varios tiempos de isquemia y de perfusión, según el protocolo descrito en el apartado correspondiente de material y métodos.

Los resultados obtenidos nos indicaron un progresivo incremento de las concentraciones séricas de LGF y de sus precursores ( $\beta$  y  $\gamma$ -bilirrubinas) desde los primeros momentos de instaurada la isquemia hepática caliente, incrementándose su concentración hasta cuatro veces, respecto a la concentración basal, al término de los 70 minutos de isquemia. Respecto a este estudio comparativo no existen antecedentes bibliográficos.

Las concentraciones de MDA, como indicador de peroxidación lipídica (Uchiyama y Mihara, 1978; Smith et al., 1982; Sevanian y Hochstein, 1985; Comporti, 1985) aumentaron durante los primeros minutos de la isquemia, disminuyendo después progresivamente, y de forma drástica, a los 60 minutos desde que se interrumpió el flujo sanguíneo, alcanzando incluso valores menores que los basales a los quince minutos de la perfusión de los lóbulos isquémicos. Este mínimo en las concentraciones en tejido de MDA coincidía en el tiempo con el pico en las concentraciones de LGF anteriormente citado (Slater et al., 1990). Al producirse este descenso en las concentraciones de MDA durante los momentos inmediatamente anteriores a la perfusión, no podemos atribuir el fenómeno al reestablecimiento del flujo sanguíneo normal.

Está recientemente descrito en la bibliografía, que después de una hepatectomía parcial en la rata, se producen incrementos periódicos de MDA en el tejido hepático. Estos incrementos coinciden con una disminución en los niveles de  $\alpha$ -tocoferol, y con una reducción en la incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina en DNA de hígado. Cuando vuelven a normalizarse las concentraciones de  $\alpha$ -tocoferol, la incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina se incrementa y las concentraciones de MDA disminuyen. Cuando aumenta la proliferación celular (24, 48 y 72 horas), disminuye la peroxidación lipídica. De hecho, los hígados regenerantes, tienen menores concentraciones de MDA que los hígados de ratas sometidas a una operación ficticia. Sin embargo, este fenómeno periódico no se observa en ratas intoxicadas

con CCl<sub>4</sub> (Recknagel y Goshal, 1966; Mc Cay et al., 1984; Fehér et al., 1987). Este trabajo constituye el único antecedente que existe al respecto en la literatura.

Debido al papel antioxidante del LGF, cabe pensar, aunque de momento sólo constituya una hipótesis, que de forma similar a lo que ocurre con el  $\alpha$ -tocoferol, después de la reperusión de los lóbulos isquémicos, momento en el cual, el estrés oxidativo es máximo (Mc Cord, 1988, WU T.-W. et al., 1991a), y debido a que los mecanismos celulares captadores de radicales libres, como el  $\alpha$ -tocoferol o el glutatión, se hallan disminuídos por la depleción que de ellos sufre el hepatocito durante la isquemia caliente (Casini et al., 1985; Halliwell, 1988; Slater et al., 1990), el LGF actuase durante los primeros momentos de la reperusión como antioxidante celular captando radicales libres, más que como regenerador hepático.

Esto podría justificar que el aumento de LGF observado, coincidiese con una drástica disminución de MDA. En este sentido, hay que recordar, que durante la isquemia caliente, se produce una importante colestasis, que en principio, favorecería la formación de LGF y de sus precursores. También se ha observado que en embriones de ratas, el máximo desarrollo del hígado, coincide con un periodo de colestasis (Wolf-Peters, 1971).

A los 60 minutos de reperusión, las concentraciones de MDA eran similares a las observadas antes de la inducción de la isquemia (animales control). Sin embargo, las concentraciones de LGF presentaban valores cuatro veces superiores a los observados en los controles. Curiosamente, observamos que los lóbulos derechos, no sometidos a isquemia, sufrían un brusco incremento, similar a la observada en los lóbulos postisquémicos, de la concentración hepática de MDA a las 24 horas de la reperusión. Es posible que este incremento sea debido a la presencia de neutrófilos polimorfonucleados sobre el endotelio vascular hepático (Lucchesy, 1986; Jaesche et al., 1990).

Por otro lado, en la experiencia piloto donde se contrastó el efecto de la isquemia, inducida sobre los lóbulos regenerantes, de ratas parcialmente hepatectomizadas, se constató una menor recuperación en el tiempo, de la masa hepática de ratas que habían sufrido una isquemia-reperusión previa a la hepatectomía (aproximadamente un 20 % menos), respecto aquellas que solamente se les practicó una hepatectomía parcial, sin isquemia. Sin embargo, existen otros factores, conocidos y desconocidos, que también pueden influir en la recuperación de la masa hepática.

Estas dos circunstancias, parecen indicar, que es posible que el LGF, consumido como antioxidante durante la isquemia-reperfusión, y no como mitógeno, induciría un retraso en la regeneración de la masa hepática.

Después de la revascularización de los lóbulos isquémicos (regenerantes), la síntesis de novo, tanto de antioxidantes, como de sistemas enzimáticos captadores de radicales libres, que se habían consumido durante la isquemia, permitirían que el LGF ejerciese su principal función fisiológica, la regeneración hepática. En este sentido, es importante hacer notar, que la unión de la albúmina con la bilirrubina para formar LGF es posiblemente extrahepática, por lo que su síntesis, no debe impedirse, en principio, por la isquemia hepática parcial; incluso, podría ser favorecida debido a la colestasis que se induce durante la isquemia (Wolf-Peters, 1971; Diaz-Gil et al., 1986b).

#### **5.5. Protección farmacológica del hígado isquémico: efecto de los fármacos Pentoxifilina y Clorpromazina.**

La modulación farmacológica del daño isquémico es una práctica clínica habitual (Chaudry, 1983; Hayashi et al., 1986; Chiu y Toledo-Pereira, 1987; Flye y Yu, 1987; Ferrero et al., 1990; Anderson et al., 1991). Como ejemplos significativos de ésta realidad, podemos citar entre otros, la utilización de soluciones hiperosmolares en circunstancias de hemorragia masiva (Reilly et al., 1991; Waxman et al., 1991); y las disoluciones empleadas en la preservación de órganos destinados a transplante (Grudman, 1982; Menon et al., 1986; Welbourn et al., 1991). Junto a éstas manipulaciones terapéuticas, existen aquellas, dirigidas a evitar las alteraciones inducidas por la reperfusión del órgano isquémico (Bulkley, 1987; Hasselgren, 1987), tales como, la utilización de bloqueantes de calcio (Chien et al., 1977; Ishigami et al., 1984; Nauta et al., 1991), con el fin de reducir la acumulación intracelular de calcio durante la isquemia y la activación de proteasas calcio-dependientes (Fredericks, 1983; Fariss, 1985; Brass et al., 1991); el uso de corticosteroides y antioxidantes, como estabilizadores de membrana; vasodilatadores, que reducen el vasoespasmo producido por la reperfusión; e inhibidores de proteasas, principalmente.

Se hace por tanto evidente, que el estudio de nuevas estrategias, encaminadas al mantenimiento estructural y funcional de la célula isquémica, debe constituir, un objetivo prioritario de estudio.

En nuestro trabajo, hemos contrastado el efecto de los fármacos clorpromazina y pentoxifilina, sobre un modelo experimental de isquemia parcial en hígado de rata, comparando su efecto, con un grupo de animales, sometidos al mismo modelo de isquemia pero, sin protección farmacológica.

La clorpromazina, es una fenotiacina, utilizada clínicamente como depresor del sistema nervioso central y como antitusígeno (Wattiaux, 1980). Sin embargo, , debido a sus características farmacológicas, ha sido ensayada con éxito, en modelos experimentales de isquemia-reperfusión hepática; principalmente, como bloqueante de canales de calcio, potencial inhibidor de algunas fosfolipasas, vasodilatador y estabilizante de membranas celulares. Sucesos, todos ellos implicados con fenómenos dañinos inducidos por la isquemia-reperfusión hepática (Harris et al., 1982; Ontell et al., 1989; Colletti et al., 1990).

Por lo tanto, creímos conveniente utilizar clorpromazina, como patrón de referencia, para evaluar, el posible potencial terapéutico de la pentoxifilina, una metilxantina, no ensayada en modelos de isquemia hepática.

La pentoxifilina, posee ciertas indicaciones farmacológicas, que justifican el interés de su estudio experimental en modelos de isquemia-reperfusión hepática. Las indicaciones terapéuticas de este fármaco, se refieren principalmente, a trastornos de la circulación periférica, cerebrovasculares, y compromisos vasculares que cursan con cuadros de claudicación intermitente. Sus propiedades farmacológicas, se atribuyen a su capacidad de disminuir la viscosidad de la sangre posiblemente, incrementando la deformabilidad de los eritrocitos y, disminuyendo la adhesibilidad y agregabilidad plaquetaria. Además de éstas, posee otras características íntimamente ligadas a los fenómenos deletéreos inducidos por la isquemia-reperfusión hepática, tales como, su capacidad para aumentar el transporte de oxígeno; disminuir la adhesibilidad de neutrófilos sobre el endotelio vascular, posiblemente por inhibición de la fosfolipasa-A<sub>2</sub>; o su potencial para inhibir el factor de necrosis tumoral (TNF), presente en casos de isquemia (Myagkaya et al., 1984; Lucchesy, 1986; Jaesche et al., 1990; Welbourn et al., 1991).

Una ventaja notable de la pentoxifilina es, que presenta efectos vasculares positivos, tanto en procesos agudos como crónicos (Wattiaux, 1980; Welbourn et al., 1990); mientras que la clorpromazina debe ser administrada antes de la

instauración de la isquemia para hacer notar sus efectos terapéuticos sobre esta patología (Blackwell y Flower, 1983; Ishigami et al., 1984; Reilly et al., 1991), por lo que su aplicación clínica, suele restringirse a sus propiedades como depresor del sistema nervioso central, y como antitúsígeno. Sin embargo, la pentoxifilina tiene en su contra, que sus posibles efectos terapéuticos sobre los daños por isquemia, dependen de la dosis, ya que se han observado efectos contrarios a los deseados cuando la dosis se sobrepasa; generalmente hemorragias, posiblemente debidas a alteraciones en la síntesis hepática de factores de coagulación durante la isquemia.

Las determinaciones séricas de GPT y GOT indicaron un aumento de la necrosis hepatocelular después de la revascularización de los lóbulos isquémicos en los animales que no fueron tratados farmacológicamente, valores que alcanzaron un máximo después de 6 horas de reperfusión para disminuir después, progresivamente, aunque estos valores seguían siendo elevados a las 24 horas después de la reperfusión. Estos valores eran significativamente menores en los animales tratados farmacológicamente, sobre todo, los tratados con pentoxifilina, con valores aproximadamente 30 veces inferiores a los observados en los animales sin tratar. Otros autores, han obtenido valores similares a los obtenidos en los animales sin tratar, para tiempos de isquemia caliente comprendidos entre 60 y 80 minutos utilizando, el mismo modelo experimental. Para tiempos, más cortos de isquemia caliente (30 min.), el retorno a las concentraciones fisiológicas de GOT y GPT puede observarse a las 24 horas de reperfusión, no evidenciándose después de transcurrido éste tiempo, signos séricos o histológicos de necrosis hepática. El mejor resultado, observado en los animales tratados con pentoxifilina puede deberse, al menos en parte, a sus efectos hemodinámicos. La disminución de la viscosidad sanguínea y la inhibición de la adhesibilidad sobre el endotelio vascular de neutrófilos y plaquetas (Gabig y Babior, 1981; Jaesche et al., 1990; Anderson et al., 1991), contribuyen a facilitar una buena revascularización hepática, evitando los frecuentes fenómenos de -no reperfusión- inductores de necrosis y muerte celular (Fredericks et al., 1982; Diaz-Gil et al., 1987a; Carey et al., 1991). Por otro lado, los valores de LDH observados a lo largo de la reperfusión, indican también, mejores resultados en los animales tratados con pentoxifilina, con una mejor función hepática de estos animales y menor metabolismo anaerobio, valorable por menores concentraciones de LDH respecto a los otros grupos.

Respecto al efecto de la clorpromazina y la pentoxifilina en la peroxidación lipídica, valorada por las concentraciones de MDA en homogeneizados de hígado a las

2, 6 y 24 horas de reperusión, se pudo observar, que a las 2 horas de reperusión no existían diferencias estadísticas entre los grupos tratados y no tratados. Sin embargo, a las 6 horas los grupos tratados farmacológicamente mostraban concentraciones de MDA significativamente menores que el grupo que no habían recibido tratamiento farmacológico. Tanto la clorpromazina, como la pentoxifilina, tuvieron un efecto positivo sobre la disminución de la peroxidación lipídica inducida por la revascularización de los lóbulos isquémicos. A las 24 horas de la revascularización, solamente la pentoxifilina mantenía un efecto estadísticamente positivo respecto a los animales sin tratar.

A la vista de los resultados obtenidos podemos pensar, que las concentraciones de MDA, menores en los grupos tratados respecto al grupo sin tratamiento farmacológico, sobre todo, después de seis horas de reperusión, podría explicarse como una mejor recuperación de las funciones de síntesis de los sistemas celulares de protección frente a radicales libres (enzimáticos y de carácter antioxidante) (Atalla et al., 1985; Cotgrave et al., 1988; Barja de Quiroga et al., 1990). Este efecto, se debe posiblemente, a una protección de las estructuras celulares implicadas en dicha síntesis, y por tanto, de su función (Borowitz y Montgomery, 1980; Bisby, 1990). Esta protección es evidente para el caso de la pentoxifilina, incluso después de 24 horas de reperusión, momento en el cual, la generación de radicales libre es principalmente exógena por la acumulación de neutrófilos sobre el endotelio vascular hepático (Lucchesy, 1986; Gutteridge y Halliwell, 1990). Uno de los efectos hemodinámicos de la pentoxifilina, utilizados terapéuticamente en clínica, es disminuir, además de la viscosidad de la sangre, la adherencia de dichos neutrófilos sobre el endotelio (Lemaster y Thurman, 1985; Ortiz-Lacorzana et al., 1990), evitando de ésta manera sus efectos degenerativos sobre el mismo, proporcionando una mejor reperusión de los lóbulos sometidos a isquemia, y disminuyendo, de ésta manera, la necrosis hepática. Respecto a éste punto, hay que tener en cuenta, que las concentraciones en hígado de MDA, como indicador de peroxidación lipídica, se toman frecuentemente como indicador de extensión de necrosis en el tejido afectado (Bulkley, 1983; Comporti, 1985; Wu T.-W. et al., 1991a).

Ha sido más estudiado, que en el caso de la pentoxifilina, el efecto de la clorpromazina en la disminución de la peroxidación lipídica después de la reperusión hepática. Este efecto, parece deberse, entre otras causas, a su capacidad como bloqueante de canales de calcio, impidiendo la activación de proteasas dependientes de éste catión (Fariss, 1985; Brass et al., 1991), como por ejemplo,

la implicada en la conversión de xantina-deshidrogenasa en xantina-oxidasa durante la reperfusión (Chien et al., 1977; Marubayashi et al., 1991). Esta es una de las reacciones más directamente implicadas en la generación del radical superóxido, iniciador de múltiples reacciones mediadas por radicales libres durante la revascularización hepática (Atalla et al., 1985; Gutteridge y Halliwell, 1990). Por otro lado, su capacidad para reducir la activación de las fosfolipasas durante la isquemia (Blackwell y Flower 1983; Borowitz y Montgomery, 1989), también contribuiría a disminuir la peroxidación de los lípidos de membranas celulares, y por tanto, a una mejor conservación de su integridad física y funcional.

Durante la isquemia-reperfusión hepática se produce una considerable depleción de antioxidantes celulares, que se consumen en proteger a la célula de la generación de radicales libres y sus efectos degenerativos (Santiago-Delpin et al., 1975; Slater et al., 1990). Uno de los antioxidantes celulares de mayor implicación en los mecanismos hepáticos de defensa en situaciones de estrés oxidativo es el glutatión (Kupcsulik y Kokas, 1979; Lenz et al., 1989). Este compuesto, cuya síntesis depende, en gran parte, del contenido celular de otro antioxidante, el  $\alpha$ -tocoferol (Casini et al., 1985), interviene como secuestrador de radicales libres, captando el electrón desapareado de éstos oxidando sus grupos sulfhidrilo (-SH). La síntesis enzimática disminuida durante la anoxia impide que el glutatión vuelva a reducirse por acción de la glutatión reductasa (Kappas, 1985; Fehér et al., 1987), lo que induce una acumulación progresiva de especies reactivas y de sus productos tóxicos derivados, fundamentalmente, peróxidos y aldehídos (Esterbauer et al., 1982; Cotgrave et al., 1988; Borowitz y Montgomery, 1989). Esto produce una desestructuración de las membranas celulares, que junto con alteraciones en las cadenas de ADN y proteínas, y el vertido de enzimas hidrolíticas por rotura lisosomal, determinan la muerte de la célula afectada. En nuestro trabajo, hemos podido comprobar, la disminución producida en el contenido hepático de GSH durante la isquemia caliente (Atalla et al., 1985; Barja de Quiroga et al., 1990), al término del periodo de isquemia, que en nuestro caso fue de 70 minutos, y cómo, ésta disminución no se afectaba, al menos de forma valorable, por la utilización de clorpromazina o pentoxifilina; por lo que puede suponerse, que la utilización de estos fármacos no reduce la depleción de GSH producida durante la isquemia. Después de la reperfusión de los lóbulos isquémicos, momento de mayor estrés oxidativo (Chien et al., 1977; Bulkley, 1987) por la reentrada de oxígeno al tejido hepático, el GSH continúa consumiéndose como captador de los radicales libres producidos durante la revascularización hepática, mientras que, por otro lado, la reactivación metabólica que supone la entrada de nutrientes y oxígeno al tejido por

la restitución del flujo sanguíneo hepático, permitirá la síntesis de novo de glutathione y su reducción enzimática, reestableciéndose después de un tiempo, sus concentraciones fisiológicas, siempre y cuando, los mecanismos celulares implicados en éste proceso de resíntesis no hallan sido irreversiblemente alterados por la isquemia (Chow, 1987; Arthur, 1988; Bisby, 1990). En nuestro ensayo, pudimos comprobar, que después de 2 horas de restaurado el flujo sanguíneo a través de los lóbulos isquémicos, los animales que no habían sido tratados farmacológicamente, no sólo no recuperaban las concentraciones fisiológicas de GSH, sino que reducían aún más el contenido celular de este antioxidante fisiológico, alcanzando después de éste periodo de reperfusión, concentraciones 3 veces inferiores a las observadas en los controles. Los animales tratados con clorpromazina tampoco mostraron una tendencia a recuperar las concentraciones fisiológicas de GSH después de la reperfusión, sin embargo, su concentración después de 2 horas de reperfusión no disminuyó respecto a la observada al término de la isquemia. En el caso de los animales tratados con pentoxifilina, no se observó, que las concentraciones de GSH después de las 2 horas de reperfusión, tendiesen a recuperar sus niveles fisiológicos.

El uso de estos fármacos, contribuye por tanto positivamente, a una más rápida recuperación de las concentraciones fisiológicas de GSH, aunque no impide su depleción durante la isquemia. Sin embargo, es posible, que la recuperación de éstas concentraciones se produzca igualmente en los animales no tratados, pero más lentamente (Nauta et al., 1990; Nordström et al., 1990).

Durante la isquemia hepática, las membranas celulares alteran su estructura, y por tanto, sus características físicas y funcionales (Bisby, 1990; Carey et al., 1991). Una de las consecuencias de la isquemia sobre las membranas, es el incremento de la permeabilidad de las mismas. Como consecuencia del aumento en la permeabilidad, que afecta en primer lugar a las células del endotelio vascular, para alterar más tarde las membranas de los hepatocitos, se incrementa el contenido en agua de las células isquémicas, dando lugar al desarrollo de edema intersticial (Nordström et al., 1985). En nuestro ensayo, valoramos el contenido en agua del tejido hepático en animales sometidos a 70 minutos de isquemia parcial caliente, y posterior reperfusión, tomando muestras de tejido, al término de la isquemia y, a las 2, 6 y 24 horas de reperfusión. El contenido en agua se determinó por diferencia entre el peso de tejido húmedo y, el peso de tejido seco. Al término de la isquemia, tanto los animales sin tratamiento, como aquéllos que fueron tratados farmacológicamente incrementaron el contenido de agua en los lóbulos isquémicos.

Sin embargo, los animales tratados farmacológicamente mostraron una menor edematización que los animales no tratados, aproximadamente un 45% menos en el caso de la clorpromazina, y un 77% menos cuando eran tratadas con pentoxifilina. Después de la reperfusión se observó, una tendencia, en todos los grupos, al reestablecimiento del contenido en agua previo a la instauración de la isquemia; pero, sólo los animales tratados con pentoxifilina habían eliminado el edema hepático después de 24 horas de la revascularización. La prevención del edema ejercida por ambos fármacos se fundamenta en mecanismos diferentes para cada uno de ellos. En el caso de la clorpromacina, su capacidad de inhibir la activación de las fosfolipasas le confiere un importante papel como protector de las membranas celulares, disminuyendo los múltiples efectos degenerativos inducidos sobre éstas por efecto de la isquemia-reperfusión (Blackwell y Flower, 1983; Atalla et al., 1985). Por su lado, la pentoxifilina, disminuyendo la adhesibilidad de los neutrófilos sobre el endotelio vascular, impediría la alteración de la permeabilidad de dicho endotelio, causada principalmente, por el ataque de los radicales libres liberados (Kupsulik y Kokas, 1979; Hasselgren, 1987), de manera similar a lo que ocurre durante la inflamación (Gabig y Babior, 1981; Ortiz-Lacorzana et al., 1990), evitando de ésta manera el edema tisular.

Junto a las alteraciones bioquímicas inducidas por la isquemia-reperfusión del hígado, y como consecuencia de éstas, se producen toda una serie de cambios morfológicos en las estructuras celulares, los cuales, en buena medida, van a determinar la futura funcionalidad de las células afectadas (Ohkohchi et al., 1991). Las lesiones, producidas por efecto de la isquemia, afectan en primer lugar al endotelio sinusoide, observándose en primer lugar, engrosamiento de los espacios de Disse, y más tarde, una pérdida progresiva del borde sinusoidal y la aparición de material necrótico en la luz del sinusoide (Ciardi et al., 1991). La aparición cronológica de estas lesiones depende fundamentalmente de la severidad y duración del daño isquémico (Myagkaya et al., 1984; Carey et al., 1991; Navidad Novalvos et al., 1992b). Las lesiones observadas en los hepatocitos durante la isquemia, afectan preferentemente a la membrana citoplásmica y de los orgánulos celulares, observándose en primer término un edema progresivo de las diversas estructuras celulares, principalmente el retículo endoplásmico y las mitocondrias, que progresa posteriormente con desaparición de las crestas mitocondriales y vacuolización celular a expensas fundamentalmente del retículo; más tarde aparecen alteraciones de la membrana nuclear y de la cromatina, y finalmente, ruptura lisosomal con vertido de enzimas proteolíticas (Frederiks, 1983; Myagkaya et al., 1984; Carey et al., 1991). Después de la revascularización del órgano, observamos

toda una serie de hallazgos morfológicos, que una vez estudiados, nos darán una idea del estado final del hígado afectado por la isquemia, pudiendo determinar el grado de irreversibilidad del daño producido (Chevrel y Gatt, 1979; Bulkley, 1987; Ciardi et al., 1991). Las principales alteraciones morfológicas valorables después de la revascularización son fundamentalmente, la desestructuración del lobulillo hepático y la necrosis hepatocitaria, principalmente rodeando a las venas centrales (Subirats Bayego, 1982; Lemaster y Thurman, 1985; Thurman et al., 1988); la hemorragia parenquimatosa central o diseminada, con mayor o menor extravasación de hematíes (Dymock, 1975; Chiu y Toledo-Pereira, 1987), y más adelante en el tiempo, la presencia de neutrófilos polimórfonucleares adheridos al endotelio vascular (Marotto et al., 1988; Carey et al., 1991) que, llegan en ocasiones, a obliterar el vaso afectado (fenómenos de no reperfusión) (Santiago-Delpin et al., 1975; Sagone, 1983).

En esta parte de nuestro trabajo, realizamos un estudio anatomopatológico comparativo con microscopía óptica y tinción de hematoxilina-eosina. Determinamos morfológicamente, el efecto sobre la estructura celular de los fármacos clorpromazina y pentoxifilina, respecto a los animales que no recibieron tratamiento. La duración de la isquemia parcial fue de 70 minutos para todos ellos y, las valoraciones morfológicas se realizaron a las 2, 6 y 24 horas de reperfusión, con el fin de estudiar su evolución en el tiempo.

En los animales no tratados, se observó congestión sinusoidal (Chevrel y Gatt, 1979; Ciardi et al., 1991), que se hacía más intensa con el tiempo de reperfusión, implicando a las 24 horas, la práctica totalidad del parénquima hepático (Jaesche et al., 1990). Sin embargo, en los animales tratados con clorpromazina y pentoxifilina, la congestión, que presentaba una distribución similar, alcanzaba un máximo a las 6 horas de reperfusión para desaparecer, casi en su totalidad a las 24 horas, observándose en algunos casos, la presencia de hepatocitos hinchados en zonas muy aisladas. Los animales tratados farmacológicamente no presentaron en ningún caso hemorragia parenquimatosa, observación que fue muy frecuente, aunque de intensidad variable, en los animales sin tratamiento (Nordström et al., 1985). La reacción inflamatoria, fue ligera o ausente (Ferrero et al., 1982; Mc Cord y Roy, 1982; D'Alessandro et al., 1986). Sólo los animales tratados con pentoxifilina presentaron una menor presencia de neutrófilos, aunque las diferencias respecto a los otros grupos, no fueron estadísticamente significativas. Sin embargo, cuando se valoró la extensión de necrosis, si se encontraron diferencias significativas entre grupos. En todos los casos, la necrosis aumentaba con el tiempo de reperfusión

(Parks et al., 1983a; Atalla et al., 1985; Navidad Novalvos et al., 1992b). En los animales no tratados, llegaba a ocupar hasta el 80% del volumen hepático, siendo su distribución centrolobulillar en un principio, y extendiéndose, más tarde, hacia zonas perilobulillares (Fredericks et al., 1982; Ciardi et al., 1991). Los animales tratados con clorpromazina presentaron un 65% de necrosis a las 24 horas de reperfusión, mientras que los tratados con pentoxifilina no superaron el 35% de necrosis. El efecto, notablemente positivo de la pentoxifilina lo atribuimos a su capacidad para mejorar el reestablecimiento hemodinámico en la microcirculación de las zonas isquémicas (Chaudry, 1983; Waxman et al., 1991) facilitando, una mejor reperfusión del tejido, puesto que, los fenómenos de -no reperfusión-, debidos principalmente a la acumulación de neutrófilos sobre el endotelio, y a vasoespasmo, son los principales responsables de la necrosis producida después de la revascularización hepática (Ueda et al., 1987; Thurman et al., 1988; Welbourn et al., 1991). Estos efectos hemodinámicos se deben a una disminución en la viscosidad de la sangre, un aumento de la elasticidad de las membranas de los eritrocitos, y una disminución de la adhesibilidad de los neutrófilos al endotelio vascular (Ortiz-Lacorzana et al., 1990; Reilly et al., 1991; Rodriguez et al., 1991). En éste sentido, la clorpromazina, como bloqueante de canales de calcio, ejercería un efecto inhibitor del vasoespasmo durante la reperfusión (Blackwell y Flower, 1983; Bulkley, 1983; Colletti et al., 1990), facilitando la continuidad del flujo sanguíneo. En cualquier caso, parece que una reperfusión adecuada del hígado isquémico, es fundamental para el mantenimiento de la integridad estructural del tejido hepático.

## **6. CONCLUSIONES**

## 6. CONCLUSIONES.

1. Hemos observado que para el estudio del síndrome de isquemia-reperfusión en el hígado de rata resulta más adecuado utilizar un modelo experimental de isquemia parcial caliente, que el modelo de isquemia completa, por selectividad de órgano, reproductibilidad y supervivencia.
2. La duración de la isquemia hepática caliente es un factor decisivo en la recuperación funcional del hígado reperfundido, existiendo, una correlación lineal entre la duración de la isquemia y los valores séricos de enzimas marcadoras de daño hepático, obtenidos después de un tiempo de reperfusión fijo (15 minutos). En el caso de la rata, el punto de "no retorno" se alcanza después de tiempos de isquemia caliente superiores al intervalo de 80-120 minutos.
3. La isquemia-reperfusión del hígado, previa a la ingestión crónica de etanol, tiene como resultado un efecto sumatorio y sinérgico de ambas situaciones de estrés oxidativo hepático, determinado por un incremento en suero de las concentraciones de dialdehído malónico. El  $\alpha$ -tocoferol reduce la peroxidación lipídica inducida por estas situaciones.
4. El factor de crecimiento hepático (LGF) parece desempeñar una función fisiológica como captador de radicales libres en la isquemia-reperfusión hepática. La isquemia-reperfusión hepática podría limitar la capacidad de autorregeneración del hígado.
5. La pentoxifilina ejerce un efecto hepatoprotector en la isquemia-reperfusión hepática, incluso superior al descrito en el caso de la clorpromazina, por lo que debe considerarse su ensayo experimental en esta situación.
6. La determinación de la peroxidación lipídica, en términos de concentración de dialdehído malónico es un buen índice de la extensión del daño hepático y de la sensibilidad del tejido afectado al estrés oxidativo.

## **7. BIBLIOGRAFIA**

## **7. BIBLIOGRAFIA.**

Adams H.. Adenosine-5'-Triphosphate determination with Phosphoglycerate kinase. E *Methods of enzymatic Analysis*. Ed. por H.U. Bergmeyer. Academic Press. Nueva York. 1963. pp 539-543

Anderson B.D., Bensard D.D., Harken A.H.. The role of Platelet Activating Factor and its antagonist in shock, sepsis and multiple organ failure. *Surg. Gynecol. & Obstetr.*. 1991; 172:415-424

Arthur M.J.P., Benley I.S., Tanner A.R. et al.. Oxygen-derived free radicals promote hepatic injury in the rat. *Gastroenterology*. 1985; 89: 1114-1122

Arthur M.J.P.. Reactive oxygen intermediates and liver injury. *J. of Hepathology*. 1988; 6: 125-131

Atalla S.L., Toledo-Pereira L.H., Mackenzie G.H., Cederna J.P.. Influence of oxygen-derived free radical scavengers on ischemic livers. *Transplantation*. 1985; 40 (6): 584-590

Baraona E., Leo M.A., Borowsky A., et al.. Pathogenesis of alcohol-induced accumulation of protein in the liver. *J. Clin. Invest.*. 1977; 60: 546-554

Baraona E., Pikkarainen P., Salaspuro M., Finkelman F., Lieber C.S.. Acute effects of Ethanol on hepatic protein synthesis and secretion in the rat. *Gastroenterology*. 1980; 79: 104-111

Barja de Quiroga G., Pérez Campo R., López Torre M.. Anti-oxidant defences and peroxidation in liver and brain of aged rats. *Biochem. J.*. 1990; 272: 247-250

Belcher T.E.. Orthotopic liver transplantation. Coagulation and hematologic changes in pig. *Arch. Surg.*. 1961; 96: 331-339

Bisby R.H.. Interactions of vitamine E with free radicals and membranes. *Free Rad. Res. Commun.*. 1990; 8 (4-6): 299-306

Blackwell G.J., Flower R.J.. Inhibition of phospholipase. *Brit. Med. Bull.* 1983; 39: 260-261

Bonjour J.P.. Vitamins and alcoholism. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 1979; 49: 434-441

Borowitz S.M., Montgomery C.. The role of phospholipase A<sub>2</sub> in microsomal lipid peroxidation induced with t-Butyl Hydroperoxide. *Biochim. and Biophys. Res. Com.* 1989; 158 (3): 1021-1028

Brass C.A., Narciso J., Gollan J.L.. Enhanced activity of the free radical producing enzyme Xanthine oxidase in hypoxic rat liver. *J. Clin. Invest.* 1991; 87: 424-431

Bruce A., James D., Crapo J.D.. Biology of disease. Free radicals and tissue injury. *Lab. Invest.* 1982; 47 (5): 412-426

Brunt P.. The liver and alcohol. *J. of Hepatology*. 1988; 7: 377-383

Buechter D.D.. Free radicals and oxygen toxicity. *Pharm. Res.* 1988; 5 (5): 253-260

Bulkley G.B.. The role of oxygen free radicals in human disease processes. *Surgery*. 1983; 94 (3): 407-411

Bulkley G.B.. Free radical-mediated reperfusion injury: a selective review. *Br. J. Cancer Suppl.* 1987; 8: 66-73

Cardenas E., Wefers H., Sies H.. Low level chemiluminescence of isolated hepatocytes. *Eur. J. Biochem.* 1981; 119: 531-536

Cardenas E.. Biochemistry of oxygen toxicity. *Ann. Rev. Biochem.* 1989; 58: 79-110

Carey D., Wu J., Sohiyama H., Wu T.-W.. Validation of the morphologic end point necrosis in rat hepatocytes subjected to oxyradical damage. *Biochem. Cell. Biol.* 1991; 69: 689-694

Casini A.F., Pompella A., Comporti M.. Liver glutathione depletion induced by bromobenzene, iodobenzene and diethylmaleate poisoning and its relation to lipid peroxidation and necrosis. *Am. J. Pathol.* 1985; 118: 225-237

Castillo-Olivares J.L., Gosálvez M., Azpeitia D. et al.. Mitochondrial respiration and oxidative phosphorylation during hepatic preservation. *J. Sur. Res.* 1972; 2: 85-91

Ciardi A., Pecorella I., Rossi M.. Cytological analysis of preservation injury in liver transplantation. *Transp. Proc.* 1991; 23 (5): 2424-2425

Colletti L.M., Remic D.G., Burch G.D. et al.. Role of Tumor Necrosis Factor in the pathophysiologic alterations after hepatic ischemia-reperfusion injury in the rat. *J. Clin. Invest.* 1990; 85: 1936-1943

Comporti M., Hartman A., DiLuzio N.R.. Effect of *in vivo* and *in vitro* Ethanol administration on liver lipid peroxidation. *Lab. Invest.* 1967; 16 (4): 616-624

Comporti M.. Lipid peroxidation and cellular damage in toxic liver injury. *Lab. Invest.* 1985; 53 (6): 599-623

Cotgrave I.A., Moldeus P., Orrenius S.. Host Biochemical defense mechanism against prooxidant. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1988; 28: 189-212

Chaudry I.H.. Cellular mechanism in shock and ischemia and their correction. *Am. J. Physiol.* 1983: 117-134

Chevrel J.P., Gatt M.T.. Histological study of the liver conserved for long periods. *J. Chir.* 1979; 116: 595-600

Chien K.R., Abrams J., Pfan R.G., Farber J.L.. Prevention by Chlorpromazine of ischemic liver cell death. *Am. J. Pathol.* 1977; 88: 539-558

Chiu C., Toledo-Pereira L.H.. Effect of catalase and/or allopurinol, or N-t-Butyl-a-Phenil nitron on hepatic ischemia. *Transplantation Proc.* 1987; 19 (1): 1077-

Chow C.K.. Nutritional influence on cellular antioxidant defence system. *Am. J. Clin. Nutr.* 1987; 32: 1066-1081

de Wolf-Peeters C., de Vos R., Desenet V.. Histochemical evidence of a cholestatic perios in neonatal rats. *Pediat. Res.* 1971; 5: 704-709

Diaz Gil J.J., Escartin P., García Cañero R. et al.. Purification of a liver DNA-synthesis promoter from plasma of partially hepatectomized rats. *Biochem J.* 1986a; 235: 49-55

Diaz-Gil J.J., Sanchez G., García-Cañero R. et al.. Characterization of a liver mitogenic factor from human plasma of subjects with hepatitis B. *Hepatology.* 1986b; 6: 769 (2)

Diaz-Gil J.J., García-Cañero R., Sanchez G. et al.. Acute hepatic failure and hepatic regeneration. Possible implications of a Liver Growth Factor. *J. of Hepatology.* 1987a; 5: S120 (228)

Diaz-Gil J.J., Gavilanes J.G., Sanchez G. et al.. Identification of a Liver Growth Factor as an albumin-bilirubin complex. *Biochem. J.* 1987b; 243: 443-448

DiLucio N.R.. A mechanism of acute ethanol-induced fatty liver and the modification of liver injury by antioxidants. *Lab. Invest.* 1966; 15: 50-61

Dvorak K.J., Brawn W.F.. Effect of high doses of methylprednisolone on the isolated perfused canine kidney. *Transplantation.* 1976; 21: 149-162

Dymock I.W.. Coagulation studies as a prognostic index in acute liver failure. *Br. J. Hematol.* 1975; 29: 385-387

D'Alessandro A.M., Southard J.H., Kalayoglu L., et al.. The viability of preserved livers as judged by a tissue slice technique. *Transpl. Proc.* 1986; XVIII (3): 588-596

Ejea Arquillué M.V., García Julián G., Abascal Agorreta M., Bartolomé Rodríguez M. . Alteraciones morfológicas y bioquímicas hepáticas provocadas

por intoxicación alcohólica aguda experimental. Arch. Fac. Med. Zaragoza. 1988; 28 (3): 148-152

Esterbauer H., Cheeseman K.H., Dianzani M.U., Poli G., Slater T.F.. Separation and characterization of the aldehydic products of lipid peroxidation stimulated by ADP-Fe<sup>2+</sup> in rat liver microsomes. Biochem. J. 1982; 208 (1): 129-140

Fariss M.W. . Vitamine E reversal of the effect of extracellular calcium on chemically induced toxicity in hepatocytes. Science. 1985; 227: 751-754

Fehér J., Csomós G., Vereckei A.. Lipid peroxidation. In: Springer-Verlag ed.. Free radical reactions in medicine. Berlín Heidelberg. Germany, 1987. pp 3-6

Ferrero M.E., Orsi R., Bernelli-Zazzera A.. Cell repair after liver injury. Exp. Mol. Pathol.. 1980; 32: 32-36

Ferrero M.E., Marni A., Gaja G.. Prevention of impaired liver metabolism due to ischemia in rats. Efficacy of defibrotide administration. J. of Hepatology. 1990; 10: 223-227

Flye M.W., Yu S.. The synergistic effect of superoxide dismutase and adenosine triphosphate-MgCl<sub>2</sub> on acute hepatic ischemia. Transplantation Proc.. 1987; 19 (1): 1324-1326

Fredericks W.M., James J., Bosch D.S. et al.. A model for provoking ischemic necrosis in rat liver parenchima and its quantitative analysis. Exp. Pathol. 1982; 22: 215-232

Frederiks W.M. The value of enzyme leakage for the prediction of necrosis in liver ischemia: Histochemistry. 1983; 78: 459-466

Fredericks W.M.. Plasma Ornithine carbamyl transferase level as an indicator of ischemic injury of rat liver. Cell. Biochem. Func.. 1984; 2: 217-220

Fredmud S.. Acidosis and increased plasma levels of  $\beta$ -d-Glucosidase and  $\beta$ -d-Galactosidase after hepatic inflow occlusion in the pig. *Acta Chir. Scand.* 1974; 140: 234-239

Freeman B.A., Crapo J.D.. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab. Invest.* 1986; 47: 412-426

Fridovich I.. The biology of oxygen radicals. The superoxide radical is an agent of oxygen toxicity; Superoxide dismutases provide an important defense. *Science*. 1978; 201: 875-880

Gabig T.G., Babior B.M.. The killing of pathogenes by phagocytes. *Annu. Rev. Med.* 1981; 32: 313-326

Gao W., Takei Y., Marzi I., et al.. Carolina rinse solution-A new strategy to increase survival time after orthotopic liver transplantation in the rat. *Transplantation*. 1991; 52 (3): 417-424

Gerson R.J., Casini A., Gilford D., Serroni A., Farber J.L.. Oxygen-mediated cell injury in the killing of cultured hepatocytes by Acetaminophen. *Biochem. and Biophys. Res. Com.* 1985; 126 (3): 1129-1137

Gohda E., Tsubouchi H., Nakayama H., et al.. Purification and partial characterization of hepatocyte growth factor from plasma of a patient with fulminant hepatic failure. *J. Clin. Invest.* 1988; 81: 414-419

Gove C.D.. Circulating lysosomes enzymes and acute hepatic necrosis. *J. Clin. Pathol.* 1981; 34: 13-19

Grudman R.. Fundamentals of preservation methods. In: Basis concepts of organ procurement, perfusion and preservation. Toledo-Pereyra L.M. ed.. Acad. Press. Inc.. New York. 1982. pp 93-120

Gutierrez G.. Cellular energy metabolism during Hypoxia. *Critical Care Medicine*. 1991; 19 (5):619-626

Gutteridge J.M.C., Halliwell B.. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *TIBS*; 1990; 15: 129-135

Halliwell B., Gutteridge M.C.. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. Review article. *Biochem J.* 1984a; 219: 1-14

Halliwell B., Gutteridge J.M.C.. Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage and antioxidant therapy. *The Lancet*. 1984b; 1: 1396-1397

Halliwell B., Grootveld M.. The measurement of free radical reactions in humans. *Febs Letters*. 1987; 231: 9-14

Halliwell B.. Free radicals and antioxidant protection mechanisms and significance in toxicology and disease. *Human Toxicol.* 1988; 7: 7-13

Harris K.A., Wallace A.C., Wall W.L.. Tolerance of the liver to ischemia in the pig. *J. Surg. Res.* 1982; 33: 524-528

Hasselgren P., Biber B., Formander J.. Improved blood flow and protein synthesis in the postischemic liver following infusion of dopamine. *J. Surg. Res.* 1983; 34: 44-50

Hasselgren P.O.. Prevention and treatment of ischemia of the liver. *Surg. Gynecol. & Obstetr.* 1987; 164: 188-196

Hayashi H., Chaudry I.H., Clemens M.G., Balie A.E.. Hepatic ischemia models for determining the effects of ATP-MgCl<sub>2</sub> treatment. *J. of Surg. Res.* 1986; 40: 167-175

Ishigami M., Magnusson M.O., Stowe N.T., et al.. The salutary effect of Verapamil and d-Propanolol in ischemically damaged Kidneys. *Transpl. Proc.* 1984; XVI(1): 40-43

Jaesche H., Farhood A., Smith C.W.. Neutrophils contribute to ischemia reperfusion injury in rat liver in vivo. *The FASEB J.* 1990; 4: 335-3359

Jones A.F., Lunec J.. Protein fluorescence and its relationship to free radical activity. Br. J. Cancer Suppl.. 1987; 8: 60-65

Kanner J., Harel S., Granit R.. Nitric oxide, an inhibitor of oxidation by lipoxygenase, ciloxygenase and hemoglobin. Lipids. 1992; 27 (1): 46-49

Kappas H.. Lipid peroxidation: mechanism, analysis, enzymology and biological relevance. En: Sies H. ed. Oxidative stress. Londres. Inglaterra. Academic Press, 1985. pp 273-310

Kawase T., Kato S., Lieber C.. Lipid peroxidation and antioxidant defense systems in rat liver after chronic Ethanol feeding. Hepatology. 1989; 10 (5): 815-821

Kupcsulik P., Kokas P.. Ischemic damage of the liver. Part I: In vitro investigation of the prevention of the ischemic lesion of the liver. Acta Hepato-Gastroenterol.. 1979; 26: 279-294

Lai C.S., Piette L.H.. Hydroxyl radical production involved in lipid peroxidation of rat liver microsomes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1977; 78: 51-59

Lambotte L.. Effect of anoxia and ATP depletion on the membrane potential and permeability of dog liver. J. Physiol.. 1977; 269: 53-59

Lemaster J.J., Thurman R.G.. Centrilobular injury following hypoxia in isolated perfused rat liver. Science . 1985; 213: 661-662

Lemaster J.J., Thurman R.G.. Reperfusion injury: a role for neutrophils. Hepatology. 1991; 14 (5): 954-955

Lenz M.L., Lloyd L., Chartes M.. Glutathion disulfide formation and lipid peroxidation during cardiac ischemia and reflow in the dog *in vivo*. Biochim. and Biophys. Res. Com.. 1989; 164(2): 722-727

Lewis J.H., Bontempo F.A., Kang Y.G.. Intraoperative coagulation changes in liver transplantation: Anaesthetic and perioperative management. Winter P.M., Kangs Y.G. praeger Publishers. New York, 1986. pp 142-150

Lieber C.S., Jones D.P., De Carli L.M.. Effects of prolonged ethanol intake: production of fatty liver despite adequate diets. *J. Clin. Invest.* 1965; 44: 1009-1021

Lieber C.S.. Alcohol, protein metabolism and liver injury. *Gastroenterology*. 1980; 79: 373-390

Lieber C.S.. Liver injury and regeneration. *The Liver-Annual 1. Escerpta Medica*. Arias. Frenkel. Wilson. 1981: 58-81

Lieber C.S.. Hepatic, metabolic and toxic effects of ethanol: 1991 update. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 1991a; 15 (4): 573-592

Lieber C.S., De Carli L.M.. Hepatotoxicity of ethanol. *J. Hepatol.* 1991b; 12 (3): 394-401

Lieber C.S.. Prespectives: do alcohol calories count? *Am. J. Clin. Nutr.* 1991c; 54 (6): 976-982

Lihlström M., Marjomäki V., Salminen A.. Effect of free fatty acids, lysophosphatides and phospholipase treatment on lipid peroxidation of myocardial homogenates and membrane fractions. *Basic Res. Cardiol.* 1987; 82: 261-269

Lucchesy B.R. Leucocytes and ischemia-induced myocardial injury. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1986; 26: 201-224

Marotto M. E., Thurman R.G., Lemasters J.J.. Early midzonal cell death during low-flow hypoxia in the isolated perfused rat liver: Protection by allopurinol. *Hepatology*. 1988; 8 (3): 558-590

Marubayashi S., Dohi K., Ochi K. et al.. Role of free radicals in ischemic rat liver cell injury. Prevention of damage by  $\alpha$ -tocopherol administration. *Surgery*. 1986; 99 (2): 184-192

Marubayashi S., Dohi K., Ochi K., Kawasaki T.. Protective effects of free radical scavengers and antioxidant administration on ischemic liver cell injury. *Transp. Proc.* 1987; 19 (1): 1327-1328

Marubayashi S., Dohi K., Yamada K.. Role of conversion of Xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemic rat liver cell injury. *Surgery*. 1991; 110: 537-543

Matsumoto K., Nakamura T.. The beneficial effect of prostaglandin I<sub>2</sub> analog on ischemic rat liver. *Transplantation*. 1991; 52 (6): 979-983

Matsumoto K., Nakamura T.. Hepatocyte growth factor: molecular structure, roles in liver regeneration, and other biological functions. *Crit. Rev. Oncol.* 1992; 3 (1-2): 27-54

McCay P.B., Lai E.K., Poyer J.L., et al.. Oxygen and carbon-centered free radical formation during carbon tetrachloride metabolism. *J. Biol. Chem.* 1984; 259: 2135-2143

McCord J.M., Roy R.S.. The pathophysiology of superoxide: roles in inflammation and ischemia. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 1982; 60: 1346-1352

McCord J.M.. The superoxide free radical: its biochemistry and pathophysiology. *Surgery*. 1983. 94 (3): 412-414

McCord J.M.. Oxygen derived free radicals in post ischemic tissue injury. *N. Eng. J. Med.* 1985 ; 312 (3):159-163

Menon R.M., Campbell D.A. Jr., Averill D.R. Jr.. Improved liver preservation with Euro-Collins and allopurinol. *Transpl. Proc.* 1986; XVIII (3): 582-587

Michalopoulos G.K., Thaler F.J.. Hepatopoietin A: partial characterization and trypsin activation of a hepatocyte growth factor. *Cancer Res.* 1985; 45: 2545-2549

Miller M.C., Alexander J.W.. Protective effect of methylprednisolone against ischemic injury to the kidney. *Transplantation*. 1973; 16: 57-71

Mitnacht S., Farber J.L.. Reversal of ischemic mitochondrial dysfunction. *J. Biol. Chem.* 1981; 256: 3199-3206

Mora N., Cienfuegos J.A., Castillo-Olivares J.L., Figuera Aymerich D..Preservación hepática: Situación actual y prespectivas. 1986; *Revista española de enfermedades del aparato digestivo*. 1986; 69 (2): 177-184

Mora N., Cienfuegos J.A., Codoceo R., Jara P., Tendillo F.J., Menchaca C., Berisa F., Navidad R., Castillo-olivares J.L.. Monitoring of serum total bile acids as an early indicator of graft function in clinical and experimental liver transplantation. *Transplantation Proc.* 1987; 19 (5): 3840-3841

Myagkaya G.L., Van Veen H., James J.. Ultrastructural changes in rat liver liver sinusoids during prolonged normothermic and hypothermic ischemia in vitro. *Virchow Arch. (Cell. Pathol.)*. 1984; 47: 361-369

Myagkaya G.L., Van Veen H., James J.. Quantitative analysis of mitochondrial flocculent densities in rat hepatocytes during normothermic and hypothermic ischemia in vitro. *Virchow Arch. (Cell. Pathol.)*. 1985; 49: 61-73

Nakamura T., Teramoto H., Ichiara A.. Purification and characterization of a growth factor from rats platelets for mature parenchymal hepatocytes in primary cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1986; 83: 6489-6493

Naqui A., Chance B.. Reactive oxygen intermediates in biochemistry. *Ann. Rev. Biochem.* 1986; 55: 137-166

Nauta R.J., Tsimoyiannis E., Uribe M.. Oxygen-derived free radicals in hepatic ischemia and reperfusion injury in the rat. *Surg. Gynecol. Obstetr.* 1990; 171: 120-125

Nauta R.J., Tsimoyiannis E., Uribe M.. The role of calcium ions and calcium chanel entry blockers in experimental ischemia-reperfusion-induced liver injury. *Ann. Surg.* 1991; 213 (2): 137-142

Navidad Novalvos R., Ratia T., Martínez P. et al.. Ischemia and reperfusion liver injury: Influence of duration of ischemia on viability. *Br. J. Surg.* 1992a; 79: S840

Navidad Novalvos R., Ratia T., Martínez P., Iritia M., Arribas L., de Andrés S., Castillo-Olivares J.L.. Pentoxifylline improves lipid peroxidation in hepatic ischemia-reperfusion injury in the rat. *Free Radical Res. Com.* 1992b; : S9.19

Navidad Novalvos R.; Jorge Herrero E., Castillo-Olivares J.L.. "Chronic ethanol administration in healthy rats and rats with hepatic ischemia: effect of alpha-tocopherol on the lipid peroxides levels". *Research in Surgery*. 1992c; 4 (2): 134-137

Navidad Novalvos R.; Ratia T.; Díaz-Gil J.J.; Castillo-Olivares J.L.. Warm ischemia-reperfusion of the liver: Possible antioxidant activity of  $\delta$ -bilirubin. *Br. J. Surg.* 1993 "en prensa".

Nordström G., Seeman T., Hasselgren P.O.. Beneficial effect of allopurinol in liver ischemia. *Surgery*. 1985; 97 (6): 679-684

Nordström G., Säljö A., Li S.. Effects of ischemia and reperfusion on protein synthesis in livers with different Glutathione levels. *Ann. Surg.* 1990; 211 (1): 97-102

Ohkohchi N., Sakurada M., Endoh. et al.. Role of free radicals and energy synthesis on primary graft nonfunction in liver transplantation. *Transp. Proc.* 1991; 23 (5): 2416-2419

Ontell S.J., Makowka L., Trager J. et al. Pharmacologic modulation of experimental postischemic hepatic function. *Ann. Surg.* 1989; 209 (2): 200-210

Ortiz-Lacorzana J., García-Alonso I., Apecechea A. et al.. The immune system and oxygen-derived free radicals in small bowel reperfusion injury in the rat. *Res. of Surg.* 1990; 2 (3): 106-111

Owens C.W.I., Bridges R.J., Meister A.. A colorimetric micro-method for the determination of Glutathione. *Biochem. J.* 1965; 94: 705-711

Parks D.A., Bulkley G.B., Granger D.N.. Role of oxygen free radicals in shock, ischemia, and organ preservation. 1983a; 94 (3): 428-432

Parks D.A., Bulkley G.B., Granger D.N.. Role of oxygen-derived free radicals in digestive tract disease. *Surgery*. 1983b; 94 (3): 415-422

Pikul J., Lesczynski D.E., Kummerow F.A.. Elimination of sample autoxidation by Butylated Hydroxitoluene additions before Thiobarbituric acid assay for Malondialdehyde in fat from chicken meat. *J. Agric. Food. Chem.* 1983; 31 (6): 1338-1342

Pompella A., Maellaro E., Casini A.F., Comporti M.. Histochemical detection of lipid peroxidation in the liver of Bromobenzene-poisoned mice, *Am. J. of Pathol.* 1987; 129: 295-301

Pryor W.A.. Free radicals reactions and their importance in biochemical systems. *Fed. Proc.* 1973; 32: 1862-1869

Recknagel R.O., Goshal A.K.. Lipoperoxidation as a vector in Carbon Tetrachloride hepatotoxicity. *Lab. Invest.* 1966; 15 (1): 132-148

Reilly P.M., Schiller H.J., Bulkley G.B.. Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. *Am. J. Surg.* 1991; 161: 489-503

Rodriguez A.A., Lattore W.W., Haurahan L.M. et al.. Liver viability after ischemia reperfusion. *Arch. Surg.* 1991; 126: 767-772

Roldan. E., Pinus C.R., Turrens J.F., Boveris A.. Chemiluminiscence of ischemic and reperfused intestine in vivo. *Gut*. 1989; 30: 184-187

Rosen G.M., Flunkelstein E., Ranckman E.J.. A method for detection of superoxide in biological system. *Arch. Biochem. Biophys.* 1982. 215: 367-378

Sagone A.L.. Glucose: a role as a free radical scavenger in biological systems. *J. Lab. Clin. Med.*. 1983; 101: 97-104

Samuni A., Mitchell J.B., De Graff W., et al.. Nitroxide SOD-mimics: modes of action. *Free Radic. Res. Commun.*. 1991; 12-13 Pt IP: 187-194

Santiago Delpin E.A., Figueroa M.I., López R., Vázquez J.. Protective effects of steroids on liver ischemia. *Am. Surg.* 1975; 41: 683-695

Schneider P.D., Gorschboth C.M.. Limiting ischemic liver injury by interferin with lysosomal autophagy. *J. Surg. Res.*. 1983; 34: 550-563

Schuckit M.A.. Ethanol ingestion: Differences in blood Acetaldehyde concentration in relatives of alcoholics and controls. *Science*. 1979; 203: 54-55

Sevanian A., Hochstein P.. Mechanism and consequences of lipid peroxidation in biological systems. *Ann. Rev. Nutr.*. 1985; 5: 365-390

Sharma B.K., Bacon B.R., Britton R.S. et al.. Prevention of hepatocyte injury and lipid peroxidation by iron chelators and  $\alpha$ -tocopherol in isolated iron-loaded rat hepatocytes. *Hepatology*. 1990; 12 (1): 31-39

Siegel N.J.. Enhanced recovery from acute renal failure by the post-ischemic infusion of adenine nucleotides and magnesium chloride. *Kidney Int.*. 1980; 17: 338-345

Sies H., Wendel A., Bors W.. Metabolism of organic hydroperoxides. En: Jakoby W.B., Bend J.R. and Caldwell eds.. *Metabolic basis of detoxification*. Academic Press. Nueva York, 1982. pp 307-321

Sies H., Wendel A., Bors W.. Metabolism of organic hydroperoxides. En: Jakoby W.B., Bend J.R. and Caldwell eds.. *Metabolic basis of detoxification*. Academic Press. Nueva York, 1982. pp 307-321

Sies H. ed.. *Oxidative stress* en Academic Press. Londres. Inglaterra. 1985. pp 507

Silverman D.G., Cedron F.A., Hundford W.E., Bering T.G., La Rossa D.D.. Monitoring tissue elimination of fluorescein with the perfusion fluorometer: A new method to asses capillary blood flow. *Surgery*.1981; 90: 409-417

Sing J., Bowers L.D.. Quantitative fractionation of serum bilirubin species by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromat.* 1986; 380: 321-330

Slater F.. Free radical machanisms in tissue injury. *Biochem J.* 1984a; 222: 1 - 5

Slater T.F.. Overview of methods used for detecting lipid peroxidation. *Methods in enzimology.* 1984b; 105 : 283-293

Slater T.F., Cheesman K.H., Benedetto C., Collins M. et al.. Studies on the Hyperplasia ("regeneration") of the rat liver following partial hepatectomy. *Biochem J.* 1990; 265; 51-59

Smith M.T., Thor H., Hatzzell P., et al.. The measurement of lipid peroxidation in isolated hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.* 1982; 31: 19-26

Southorn P.A., Powis G.. Free radicals in medicine I. Chemical nature and biological reactions. *Mayo Clin. Proc.* 1988; 63: 381-389

Starke P.E., Farber J.L.. Ferric iron and superoxide ions are required for the killing of cultured hepatocytes by hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.* 1985; 260: 10099-10104

Stocker R., Grazel A.N., Amnes B.N.. Antioxidant activity of Albumin-bound Bilirubin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1987a; 84: 5918-5922

Stocker R., Yamamoto Y., MacDonagh A.F.. Bilirubin an antioxidant of possible Physiological importance. *Science.* 1987b; 235: 1043-1046

Subirats Bayego E.. Cambios histológicos en el hígado hipóxico. Estudio experimental. *Rev. Clin. Esp.* 1982; 166: 145-151

Sumimoto k., Inagaki K., Ito H. et al.. Ischemic damage prevention by coenzyme Q10 treatment of the donor before orthotopic liver transplantation. *Surgery*. 1987; 102 (5): 821-827

Takei Y., Guo W.J., Hijoak T., et al.. Increase in survival of liver grafts after rinsing with warm Rnger's solution do to improvement of hepatic microcirculation. *Transplantation*. 1991; 52 (2): 225-230

Thruman R.G., Marzi I., Seitz G. et al.. Hepatic reperfusion injury following orthotopic liver transplantation in the rat. *Transplantation*. 1988; 46: 502-506

Toledo-Pereira L., Simmons R.L., Najarian J.S.. Protection of the ischemic liver by donor pretreatment before transplantation. *Am. J. Surg.* 1975; 129: 513-517

Tribble D.L., Yee Aw T., Jones D.P.. The pathophysiological significance of lipid peroxidation in oxidative cell injury. *Hepatology*. 1987; 7 (2): 377-387

Uchiyama M., Mihara M.. Determination of Malondialdehyde precursor in tissues by Thiobarbituric acid test. *Analytical Biochemistry*. 1978; 86: 271-278

Ueda Y., Matsuo K., Kamei T. et al.. Prostaglandin E<sub>1</sub> but not E<sub>2</sub> is cytoprotective of energy metabolism and reticuloendothelial in the ischemic canine liver. *Transplantation Proc.* 1987; 19 (1): 1329-1330

von Ruecker A.A., Ham-Jeon B.-G., Wild M., Bidlingmaier F.. Protein kinase c involvement in lipid peroxidation and cell membrane damage induced by oxygen based radicals in hepatocytes. *Biochim. and Biophys. Res. Com.* 1989; 163 (2): 836-842

Wattiaux R.. Reversible and irreversible alterations of lysosomes in ischemic rat liver. *Biochem. Pharmacol.* 1980; 28: 2579-2583

Waxman K., Clark I., Soliman M.H., et al.. Pentoxifilline in resuscitation of experimental hemorrhagic shock. *Critical Care Medicine*. 1991; 19 (5): 728-731

Weisigen R.A.. Oxygen radicals and ischemic tissue injury. *Gastroenterology*. 1986; 90 (2): 494-496

Welbourn C.R.B., Goldman G., Paterson I.S.. Pathophysiology of ischemia reperfusion injury: Central role of the neutrophil. *B. J. Surg.* 1991; 78: 651-655

Wu T.-W., Hashimoto N., Au J.-X. et al. Trolox protects rat hepatocytes against oxyradical damage and the ischemic rat liver from reperfusion injury. *Hepatology*. 1991a; 13 (3): 575-580

Wu T.-W., Wu J., Li R.-K., Mickle D., Carey D.. Albumin-bound bilirubins protect human ventricular myocytes against oxyradical damage. *Biochem. Cell. Biol.* 1991b; 69: 683-688

Zoetewij J.P., van de Water B., de Bont J.G.M., et al.. Calcium-induced cytotoxicity in hepatocytes after exposure to extracellular ATP is dependent on inorganic phosphate. *J. Biol. Chem.* 1993; 5: 3384-3388