

María Nieves Sánchez Fuentes

Análisis de la influencia del daño  
hepático de isquemia-reperfusión  
durante la cirugía resectiva  
hepática sobre la viabilidad y  
calidad funcional de los  
hepatocitos aislados del tejido  
resecado

Departamento  
Cirugía, Ginecología y Obstetricia

Director/es  
Serrablo Requejo, Alejandro  
Solanas Villacampa, Estela María

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>





**Universidad**  
Zaragoza

Tesis Doctoral

**ANÁLISIS DE LA INFLUENCIA DEL  
DAÑO HEPÁTICO DE ISQUEMIA-  
REPERFUSIÓN DURANTE LA  
CIRUGÍA RESECTIVA HEPÁTICA  
SOBRE LA VIABILIDAD Y CALIDAD  
FUNCIONAL DE LOS HEPATOCITOS  
AISLADOS DEL TEJIDO RESECADO**

Autor

María Nieves Sánchez Fuentes

Director/es

Serrablo Requejo, Alejandro

Solanas Villacampa, Estela María

**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA**

Cirugía, Ginecología y Obstetricia

2015



**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA**

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA, GINECOLOGÍA Y  
OBSTETRICIA



**TESIS DOCTORAL**

“ANÁLISIS DE LA INFLUENCIA DEL DAÑO HEPÁTICO DE ISQUEMIA-  
REPERFUSIÓN DURANTE LA CIRUGÍA RESECTIVA HEPÁTICA SOBRE  
LA VIABILIDAD Y CALIDAD FUNCIONAL DE LOS HEPATOCITOS  
AISLADOS DEL TEJIDO RESECADO”

**AUTORA**

M<sup>a</sup> Nieves Sánchez Fuentes

**DIRECTORES**

Alejandro Serrablo Requejo

Estela Solanas Villacampa

**Zaragoza, octubre 2015**



El Dr. Alejandro Serrablo Requejo, Profesor Asociado del Departamento de Cirugía de la Facultad de Medicina de Zaragoza y Jefe de Sección de la Unidad de Cirugía Hepatobiliopancreática del Hospital Universitario Miguel Servet de Zaragoza

**CERTIFICA:**

Que el siguiente trabajo, titulado: **“ANÁLISIS DE LA INFLUENCIA DEL DAÑO HEPÁTICO DE ISQUEMIA-REPERFUSIÓN DURANTE LA CIRUGÍA RESECTIVA HEPÁTICA SOBRE LA VIABILIDAD Y CALIDAD FUNCIONAL DE LOS HEPATOCITOS AISLADOS DEL TEJIDO RESECADO”** de D<sup>a</sup> Nieves Sánchez Fuentes, se ha realizado bajo mi dirección en el Departamento de Cirugía de la Facultad de Medicina de la Universidad de Zaragoza, planteando unos objetivos adecuados e innovadores desarrollando una metodología científica correcta y que concluye con resultados de indudable interés.

Por todo ello, considero que se encuentra en condición óptima para su presentación y defensa pública ante un Tribunal para optar al Grado de Doctor, cumpliendo todos los requisitos y criterios de calidad científica.

Y para que así conste y obre a los efectos oportunos firmo la presente en Zaragoza diecisiete de Octubre de dos mil quince

Fdo. Prof. Dr. D. Alejandro Serrablo Requejo

Director de Tesis Doctoral

La Dra. Estela M<sup>a</sup> Solanas Villacampa, Profesora Asociada del Departamento de Anatomía e Histología Humanas de la Facultad de Medicina de Zaragoza e Investigadora del Instituto de Investigación Sanitaria de Aragón (IIS Aragón)

**CERTIFICA:**

Que el siguiente trabajo, titulado: **“ANÁLISIS DE LA INFLUENCIA DEL DAÑO HEPÁTICO DE ISQUEMIA-REPERFUSIÓN DURANTE LA CIRUGÍA RESECTIVA HEPÁTICA SOBRE LA VIABILIDAD Y CALIDAD FUNCIONAL DE LOS HEPATOCITOS AISLADOS DEL TEJIDO RESECADO”** de D<sup>a</sup> Nieves Sánchez Fuentes, se ha realizado bajo mi dirección en el laboratorio de Patología Digestiva del IIS Aragón, planteando unos objetivos adecuados e innovadores desarrollando una metodología científica correcta y que concluye con resultados de indudable interés.

Por todo ello, considero que se encuentra en condición óptima para su presentación y defensa pública ante un Tribunal para optar al Grado de Doctor, cumpliendo todos los requisitos y criterios de calidad científica.

Y para que así conste y obre a los efectos oportunos firmo la presente en Zaragoza diecisiete de Octubre de dos mil quince

Fdo. Prof. Dra. Dña. Estela Solanas Villacampa.

Directora de Tesis Doctoral





A mis padres Francisco y Nieves  
por su ejemplo diario de superación.



# ÍNDICE

<b>ÍNDICE GENERAL</b>	<b>1</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>7</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	<b>9</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>11</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>15</b>
1.1. NEOPLASIAS HEPÁTICAS	17
1.1.1.- Tumores benignos	17
1.1.2.- Tumores malignos	18
1.1.2.1.- Tumores primarios	18
- Hepatocarcinoma	19
- Colangiocarcinoma intrahepático	21
- Otros	22
1.1.2.2.- Metástasis hepáticas	24
-Metástasis de carcinoma colorrectal	24
- Metástasis de carcinoma neuroendocrino	25
- Otras	26
1.2. FISIOPATOLOGÍA HEPÁTICA	27
1.2.1.- Fisiología celular	27
1.2.1.1.- Hepatocito	27
1.2.1.2.- Sinusoides	28
1.2.1.3.- Células de Kupffer	29
1.2.1.4.- Células estrelladas o Células de Ito	29
1.2.1.5.- Matriz extracelular	29
1.2.2.- Hemodinámica	30
1.2.3.- Secreción biliar	31

1.2.4.- Metabolismo	32
1.2.4.1.- Metabolismo de los carbohidratos	33
1.2.4.2.- Metabolismo de las proteínas	33
1.2.4.3.- Metabolismo de los lípidos	34
1.2.4.4.-Metabolismo de los xenobióticos	34
1.2.5.- Hemostasia	35
1.3.- TÉCNICAS DE RESECCIÓN HEPÁTICA	37
1.3.1.- Anatomía quirúrgica hepática. Fundamentos anatómicos de las resecciones anatómicas	37
1.3.1.1.- Descripción de la segmentación hepática	37
1.3.1.2.- Clasificación de Brisbane	41
1.3.2.- Diferentes tipos de resecciones hepáticas	44
1.3.2.1.- Resecciones regladas	44
1.3.2.2.- Resecciones limitadas	45
1.3.3.- Descripción de las técnicas de oclusión y control vascular	46
1.4.- FISIOPATOLOGÍA DE LA LESIÓN HEPÁTICA POR ISQUEMIA REPERFUSIÓN	51
1.4.1.- Fases del daño hepático secundario a isquemia-reperfusión	52
1.4.1.1.- Fase precoz o aguda	52
1.4.1.2.- Fase tardía o subaguda	52
1.4.2.-Factores que participan en el daño hepático secundario a isquemia-reperfusión	53
1.4.2.1.-Lesión hepática inducida por el factor de necrosis tumoral	53
1.4.2.2.-Especies reactivas de oxígeno. El óxido nítrico	54
1.4.2.3.- Cambios en la microcirculación	56
1.4.2.4.-Papel de los linfocitos en el daño hepático por isquemia-reperfusión	56
1.5.- PREACONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO DEL HÍGADO	58
1.5.1.- Etapas de protección del preconditionamiento isquémico	58

1.5.2.- Mecanismos moleculares del preconditionamiento isquémico	59
1.5.3.- Implicaciones clínicas del preconditionamiento isquémico	63
<b>1.6.- DEL HÍGADO AL HEPATOCITO</b>	<b>65</b>
1.6.1.- Aplicaciones del hepatocito	65
1.6.1.1.- Estudio de la hepatogénesis	66
1.6.1.2.- Estudio expresión y regulación de las funciones hepáticas	66
1.6.1.3.- Estudios de la toxicidad y metabolismo de los fármacos	67
1.6.1.4.- Estudios de la producción y secreción de bilis	68
1.6.1.5.- Aplicaciones en virología y parasitología	69
1.6.1.6.- Terapia celular hepática o trasplante de hepatocitos	69
1.6.2.- Aislamiento del hepatocito	71
1.6.2.1.- Fuentes de hepatocitos	73
1.6.2.2.- Factores que influyen en la viabilidad del hepatocito “in vitro”	75
1.6.2.2.1.- Factores dependientes del donante	76
1.6.2.2.2.- Factores dependientes de la intervención y la toma de la muestra	79
1.6.3.- Valoración de la viabilidad y funcionalidad del hepatocito	81
1.6.3.1.- Viabilidad	81
1.6.3.2.- Rendimiento	82
1.6.3.3.- Test de funcionalidad	83
<b>2. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>89</b>
<b>3. HIPÓTESIS</b>	<b>91</b>
<b>4. OBJETIVOS</b>	<b>93</b>
<b>5.- MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>95</b>
5.1.DISEÑO EXPERIMENTAL DEL ESTUDIO	95
5.2.POBLACIÓN A ESTUDIO	96
5.2.1.- Criterios de inclusión	96

5.2.2.- Criterios de exclusión	96
5.2.3.- Tamaño de la muestra	96
5.3.DESARROLLO DEL ESTUDIO	97
5.3.1.- Técnica quirúrgica	97
5.3.2.- Obtención de la muestra	100
5.3.3.- Asilamiento de hepatocitos	100
5.3.4.- Determinación de viabilidad, rendimiento y funcionalidad	102
5.4.- RECOGIDA DE VARIABLES	108
5.5.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO	114
5.6.- CONSIDERACIONES ÉTICAS	115
<b>6.- RESULTADOS</b>	<b>117</b>
6.1.- CARACTERÍSTICAS BASALES DELA POBLACIÓN A ESTUDIO	117
6.1.1.- Datos demográficos	117
6.1.2.- Variables relacionadas con las características clínicas y los antecedentes patológicos del paciente	118
6.1.3.- Variables analíticas	119
6.1.4.- Variables relacionadas con la enfermedad hepática causante de la cirugía	120
6.1.5.- Variables relacionadas con la técnica de clampaje	121
6.1.6.- Variables relacionadas con el aislamiento celular	122
6.2.- ANÁLISIS DE LOS OBJETIVOS ESPECÍFICOS PROPUESTOS	123
6.2.1.- Análisis del efecto del clampaje vascular sobre la viabilidad, el rendimiento celular tras el aislamiento y la funcionalidad de los hepatocitos aislados “in vitro”	123
6.2.2.- Análisis del efecto del tipo de clampaje, continuo o intermitente, sobre la viabilidad y el rendimiento celular tras el aislamiento y la funcionalidad de los hepatocitos aislados “in vitro”	127
6.2.3.- Influencia del tiempo total de clampaje en el donante de la muestra sobre la viabilidad y el rendimiento celular tras	



el aislamiento y la funcionalidad de los hepatocitos “in vitro”	129
6.2.4.- Análisis en los pacientes sometidos a clampaje intermitente, de la influencia del número de clampajes o el tiempo máximo de cada uno de ellos sobre la viabilidad y el rendimiento celular tras el aislamiento y la funcionalidad de los hepatocitos aislados “in vitro”	133
6.2.5.- Análisis del efecto de las variables derivadas del donante así como del procedimiento ( diferentes a isquemia por clampaje) sobre la viabilidad y rendimiento celular tras el aislamiento y capacidad funcional de los hepatocitos aislados	137
6.2.5.1.- Edad	137
6.2.5.2.- Sexo	138
6.2.5.3.- Variables analíticas preoperatorias	139
6.2.5.4.- Etiología oncológica	140
6.2.5.5.- Quimioterapia	142
<b>7.- DISCUSIÓN</b>	<b>147</b>
7.1.- VALIDEZ DEL DISEÑO DEL ESTUDIO	149
7.2.- VALIDEZ DE LOS AISLAMIENTOS REALIZADOS	152
7.2.1.- Viabilidad	153
7.2.2.- Rendimiento	153
7.2.3.- Pruebas funcionales	154
7.3.- FACTORES QUE INFLUYEN EN LA VIABILIDAD, RENDIMIENTO Y FUNCIONALIDAD DEL HEPATOCITO “INVITRO”	157
7.3.1.- Influencia del uso de clampaje en la viabilidad de los hepatocitos aislados, el rendimiento celular del aislamiento la funcionalidad hepática de los hepatocitos aislados y cultivados “in vitro”	157
7.3.2.- Influencia de la técnica de clampaje (continuo-intermitente) en la viabilidad de los hepatocitos aislados, el rendimiento celular del aislamiento y la funcionalidad hepática de los hepatocitos aislados y cultivados “in vitro”	159

7.3.3.- Influencia del tiempo total de clampaje sobre la viabilidad de los hepatocitos aislados, el rendimiento celular del aislamiento y la funcionalidad hepática de los hepatocitos aislados y cultivados “in vitro”	161
7.3.4.- Influencia del número de clampajes o el tiempo máximo de cada uno de ellos sobre la viabilidad de los hepatocitos aislados, el rendimiento celular del aislamiento y la funcionalidad hepática de los hepatocitos aislados y cultivados “in vitro”	163
7.3.5.- Variables asociadas tanto al paciente donante de la muestra como al procedimiento, que influyen en el resultado del aislamiento del hepatocito	165
7.3.5.1.- Edad	165
7.3.5.2.- Sexo	166
7.3.5.3.- Parámetros analíticos	167
7.3.5.4.- Fibrosis hepática	169
7.3.5.4.- Esteatosis hepática	171
7.3.5.6.- Etiología oncológica	172
7.3.5.7.- Tratamiento quimioterápico	173
7.4.- LIMITACIONES DEL ESTUDIO	
7.4.1.- Tamaño muestral	175
7.4.2.- Limitaciones de las pruebas funcionales	175
7.4.3.- Variables sin capacidad de análisis	175
<b>8.- CONCLUSIONES</b>	<b>179</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>181</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>200</b>
ANEXO I. Hoja de información al paciente.	201
ANEXO II. Consentimiento informado.	202

## **ÍNDICE DE FIGURAS.**

<b>Figura 1:</b> Estructura del hepatocito	28
<b>Figura 2:</b> Fibrinogénesis y fibrinólisis	35
<b>Figura 3:</b> Activación de la cascada de coagulación	36
<b>Figura 4:</b> Cisura sagital o mediana	38
<b>Figura 5:</b> Cisura portoumbilical	39
<b>Figura 6:</b> Cisura lateral derecha	40
<b>Figura 7:</b> Segmentación hepática	41
<b>Figura 8:</b> Maniobra de Pringle	47
<b>Figura 9:</b> Fase precoz del daño por isquemia-reperfusión	52
<b>Figura 10:</b> Fase tardía del daño por isquemia-reperfusión	53
<b>Figura 11:</b> Protección bifásica inducida por el preconditionamiento isquémico	59
<b>Figura 12:</b> Vías de señalización por las que el PI confiere protección contra la LIR	61
<b>Figura 13:</b> Maniobra de Pringle	98
<b>Figura 14:</b> Clampaje selectivo de las venas suprahepáticas	99
<b>Figura 15:</b> Resección hepática	99
<b>Figura 16:</b> Cámaras de Neubauer mejoradas	103
<b>Figura 17:</b> Retícula de cámara de Neubauer mejorada	103
<b>Figura 18:</b> Distribución de la población por edades	117
<b>Figura 19:</b> Distribución de antecedentes oncológicos	118
<b>Figura 20:</b> Distribución del número de clampajes	121
<b>Figura 21:</b> Comparación de los niveles medios de viabilidad entre clampaje si y clampaje no	124
<b>Figura 22:</b> Comparación de los niveles medios de rendimiento entre clampaje si y clampaje no	124

<b>Figura 23:</b> Influencia del clampaje en las muestras con viabilidad superior a 65%	126
<b>Figura 24:</b> Influencia del clampaje en las muestras con viabilidad superior a 75%	126
<b>Figura 25:</b> Influencia del tipo de clampaje en los niveles medios de MTT	127
<b>Figura 26:</b> Media del tiempo total en aislamientos con viabilidad superior y no a 65 y 75 %	131
<b>Figura 27:</b> Influencia del tiempo total de clampaje >30 minutos en la viabilidad	132
<b>Figura 28:</b> Distribución del tiempo total de clampaje en la población a estudio	132
<b>Figura 29:</b> Influencia del tiempo total de clampaje >15 minutos en la viabilidad	133
<b>Figura 30:</b> Influencia del tiempo máximo de clampaje en aislamientos con viabilidad superior o no a 65 y 75%	135
<b>Figura 31:</b> Influencia del número total de clampajes en aislamientos con viabilidad superior o no a 65 y 75 %	136
<b>Figura 32:</b> Relación lineal entre GGT y rendimiento celular	139
<b>Figura 33:</b> Influencia de la etiología oncológica en el porcentaje de viabilidad superior o no a 65 y 75%	142
<b>Figura 34:</b> Influencia del tratamiento con quimioterapia en los niveles medios de MTT	143
<b>Figura 35:</b> Influencia del tratamiento con oxaliplatino en los aislamientos con viabilidad superior o no a 65 y 75%	145

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Concentración de electrolitos en la bilis	31
<b>Tabla 2.</b> Valores analíticos estándar en la población	111
<b>Tabla 3.</b> Determinaciones analíticas preoperatorias	119
<b>Tabla 4.</b> Distribución etiológica de las lesiones hepáticas	120
<b>Tabla 5.</b> Resultados medios en viabilidad, rendimiento y funcionalidad hepática.	123
<b>Tabla 6.</b> Influencia del clampaje en la viabilidad, rendimiento y funcionalidad hepática	125
<b>Tabla 7.</b> Influencia del tipo de clampaje en la viabilidad, rendimiento y funcionalidad hepática	128
<b>Tabla 8.</b> Influencia del tiempo total de clampaje en la viabilidad, rendimiento y funcionalidad hepática	129
<b>Tabla 9.</b> Modelo de regresión lineal univariante viabilidad-tiempo total de clampaje	130
<b>Tabla 10.</b> Modelo de regresión lineal univariante viabilidad-número total de clampajes	130
<b>Tabla 11.</b> Relación lineal entre el número de clampajes y las variables a estudio	134
<b>Tabla 12.</b> Relación lineal entre el tiempo máximo de clampaje y las variables a estudio	134
<b>Tabla 13.</b> Influencia de la edad en la viabilidad, el rendimiento celular y la funcionalidad de los hepatocitos “in vitro”	137
<b>Tabla 14.</b> Influencia del sexo en la viabilidad, el rendimiento celular y la funcionalidad de los hepatocitos “in vitro”	138
<b>Tabla 15.</b> Relación lineal entre las determinaciones analíticas preoperatorias y las variables a estudio	140
<b>Tabla 16.</b> Influencia del origen oncológico con la viabilidad, rendimiento y funcionalidad del hepatocito “in vitro”	141

<b>Tabla 17.</b> Influencia del tratamiento quimioterápico en la viabilidad, rendimiento y funcionalidad del hepatocito “in vitro”	143
<b>Tabla 18.</b> Influencia del tratamiento con oxaliplatino en la viabilidad, rendimiento y funcionalidad del hepatocito “in vitro”	144
<b>Tabla 19.</b> Resultados publicados sobre la influencia del clampaje vascular en la viabilidad y rendimiento celular	158

## **ABREVIATURAS**

**Ahr:** Aryl hidrocarbon receptor

**ALT:** Alanina aminotransferasa

**ARN:** Acido ribonucleico

**AST:** Aspartato aminotransferasa

**ATP:** Adenosín trifosfato

**Ca.19.9:** Antígeno carbohidrato 19.9

**CAR:** Receptor constitutivo del androstano

**CEA:** Antígeno carcinoembrionario

**CCR:** Carcinoma colorrectal

**COUP-TFII:** Factor de transcripción COUD2

**CYP:** Citocromo P450 hepático

**DE:** Desviación estándar

**ECOD:** O-deetilación de la 7-etoxicumarina

**EDTA:** Etilendiaminotetraacético

**EE:** Error estándar

**ERO:** Especies reactivas de oxígeno

**ERN:** Especies reactivas de Nitrógeno

**ET:** Endotelina

**FA:** Fosfatasa alcalina

**FXR- $\alpha$ :** Receptor X fernesioide  $\alpha$

**GGT:** Gamma glutamil trasnpeptidasa

**GM-CSF:** Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos

**GOT:** Transaminasa glutamico oxalacético

**GPT:** Transaminasa glutamico pirúvica

**HCC:** Hepatocarcinoma IHPBA: Asociación Internacional Hepatobiliopancreática

**hES:** Células madre embrionarias humanas

**HNF:** Factor nuclear hepático

**HSP:** Proteninas del Shock térmico

**hTERT:** Telomerasa transcriptasa inversa humana

**IC:** Intervalo de confianza

**IL:** Interleuquina  
**INF:** Interferón  
**Ips:** Células madre pluripotentes inducidas  
**I-R:** Isquemia-reperfusión  
**JNK:** Jun N-Terminal Kinasa  
**LIR:** Lesión por isquemia-reperfusión  
**LRH-1:** Liver receptor homolog-1  
**MAPK:** Proteínquinasa de activación nitrogenética  
**MSC:** Células madre mesenquimales  
**NO:** Oxido nítrico  
**NOS:** Nitrógeno sintetasa  
**O:** Oxígeno  
**PBS:** Solución salina amortiguada por fosfatos  
**PC:** Preacondicionamiento  
**PET:** Tomografía por emisión de positrones  
**PI:** Preacondicionamiento isquémico  
**PKC:** Proteínquinasa C  
**PMN:** Polimorfonucleares  
**PXR:** Receptor X de pregnano  
**RFA:** Radiofrecuencia  
**Sind:** Síndrome  
**SREBP-1c:** Proteína de unión al elemento regulador del estero  
**STF:** Suero fetal de ternera  
**SV40 LT:** Simian Vacuolating Virus 40 large T antigen  
**TC:** Tomografía computerizada  
**TCH:** Trasplante celular hepático  
**TNF:** Factor de necrosis tumoral  
**TH:** Trasplante hepático  
**UDPGT:** Uridina-difosfato-glucuronato-transferasa.  
**VHC:** Virus hepatitis C  
**VHB:** Virus hepatitis B  
**VIH:** Virus inmunodeficiencia humana



**WEM:** Medio Williams E

**XDH:** Sistema Xantina-deshidrogenasa

**XO:** Xantina-Oxidasa

**XOD:** Sistema Xantina-oxidasa

# **1. INTRODUCCIÓN**

El hígado siempre constituyó para los cirujanos un órgano de difícil acceso y de soluciones técnico-quirúrgicas muy limitadas. *Longmire* lo denominó “el órgano hostil” por su recibimiento caluroso a las células malignas y de sepsis, su sangrado copioso y por ser el órgano que más se afecta en los traumatismos cerrados. Para equilibrar estos factores negativos, el hígado tiene dos grandes atributos: su capacidad de regeneración tras la pérdida masiva de sustancia y sus múltiples funciones metabólicas.

No sería hasta comienzos del siglo XX cuando se produjeron algunos avances pequeños, pero significativos, en la cirugía hepática. Se aplicaron y describieron las técnicas para suturar los grandes vasos hepáticos y se comenzó a utilizar el cauterio para los vasos pequeños<sup>1</sup>. Probablemente el avance principal llegó de la mano de J. Hogarth Pringle, quien en 1908 describió la compresión digital de los vasos hiliares para controlar las hemorragias hepáticas de las heridas traumáticas<sup>2</sup>.

La era moderna de la cirugía hepática comenzó con las mejoras en el conocimiento de la anatomía. La descripción de la segmentación hepática hizo posible el inicio de resecciones cada vez más regladas, hasta llegar a la práctica de un gran número de hepatectomías para la solución de problemas cada vez más complejos.

A pesar de estas mejoras, la cirugía hepática se vio gravada con una enorme morbimortalidad quirúrgica entre las décadas de 1950 a 1980, con tasas de mortalidad operatoria que excedían el 20%, casi siempre por una hemorragia masiva<sup>3</sup>.

En la actualidad, el delineamiento del plano de transección por medio de la ecografía intraoperatoria, el control del flujo sanguíneo que entra y sale del hígado a través de los métodos reglados de clampaje y el desarrollo de instrumentos específicos para fracturar el parénquima hepático con la mínima agresión, así como la aportación de lo aprendido con el desarrollo de los trasplantes hepáticos de donantes vivos, hacen de la cirugía hepática una técnica segura con unas tasas de mortalidad inferiores al 5%<sup>4,5</sup>.

Desde la descripción del clampaje vascular hepático por Pringle<sup>2</sup>, son múltiples las técnicas realizadas con el fin de minimizar las pérdidas sanguíneas durante la resección hepática. Así se ha descrito desde la exclusión vascular total, en la que se realiza un clampaje tanto del pedículo hepático como de la vena cava inferior, permitiendo un muy buen control del sangrado, pero un elevado riesgo de daño por isquemia-reperfusión y un trastorno

hemodinámico considerable, hasta técnicas de clampaje selectivo por abordaje hiliar o suprahiliar, que limitan la isquemia al segmento que se va a resear, pero que proporciona un peor control del sangrado y precisan de una disección exhaustiva<sup>6</sup>.

La exclusión vascular total con preservación del flujo de la vena cava inferior es la técnica empleada por nuestro equipo, considerándola una técnica segura, bien tolerada y fácilmente reproducible.

Los métodos de clampaje son muy útiles en la cirugía hepática, pero es importante conocer los efectos secundarios que ello conlleva y realizar una práctica reglada teniendo en cuenta los tiempos límites que debemos respetar según la técnica elegida.

Es difícil determinar si el daño hepático presentado por un paciente tras una resección, es secundario al daño por isquemia-reperfusión, ya que existen múltiples factores como la pérdida hemática, el tamaño del segmento resecado o la existencia de patología hepática subyacente, que van a contribuir a una posible insuficiencia hepática postoperatoria.

El aislamiento de hepatocitos de muestras hepáticas resecadas y su modelo de cultivo “in vitro” representa un sistema muy útil en la investigación tanto de las funciones hepáticas básicas como de sus distintas áreas de aplicación, por lo que lo consideramos un modelo ideal para analizar el daño por isquemia-reperfusión de los pacientes sometidos a resección hepática evitando otros factores como el sangrado o el tipo de resección. Por todo ello, proponemos nuestro trabajo con el fin de realizar un análisis de la tolerancia al tiempo de clampaje en aquellos pacientes sometidos a cirugía hepática, determinando sobre el tejido sano resecado de dichos pacientes la viabilidad y el rendimiento celular del aislamiento y la funcionalidad “in vitro” de los hepatocitos aislados.

## 1.1.- NEOPLASIAS HEPÁTICAS

### 1.1.1.- Tumores benignos

Los tumores hepáticos benignos son lesiones relativamente frecuentes que se encuentran en cerca del 10% de la población y suelen ser asintomáticas<sup>7</sup>. La mayoría se descubren accidentalmente en pacientes sin historia previa de enfermedad hepática, debido al amplio uso de los estudios radiológicos y durante la realización de laparotomías por otras causas<sup>7,8</sup>. La mayoría no precisa tratamiento y es importante obtener un diagnóstico preciso y descartar la malignidad<sup>7,9</sup>.

- ***El hemangioma*** es el tumor benigno más frecuente. Generalmente asintomático salvo cuando presenta un tamaño mayor de 4 centímetros donde pueden aparecer síntomas compresivos. Se complica muy raramente por lo que en la mayoría de los pacientes se optará por la observación y el seguimiento. La resección estará indicada cuando exista crecimiento rápido, un tamaño superior de 10 cm, duda diagnóstica, sintomatología o presente un síndrome asociado de trombocitopenia y coagulopatía de consumo conocido como síndrome de Kasabach-Merritt<sup>10</sup>
- ***La hiperplasia nodular focal*** es el segundo tumor benigno más frecuente en el hígado, suele afectar a mujeres jóvenes. La masa se caracteriza por una cicatriz central con tabiques radiales, aunque en un 15 % no puede demostrarse esta morfología. Suele ser asintomática. La rotura, el sangrado y el infarto son extraordinariamente raros y jamás se ha descrito una degeneración maligna. Por ello la resección quirúrgica sólo estará indicada cuando existan dudas diagnósticas<sup>7,10</sup>.

- **El adenoma hepático** es una proliferación benigna, bastante rara, de los hepatocitos en el contexto de un hígado normal. Se da principalmente en mujeres, asociado a la toma de anticonceptivos, y rara vez en varones, vinculado a la ingesta de anabolizantes esteroideos<sup>6,11</sup>. Suele ser único aunque pueden ser múltiples, la presencia de 10 o más adenomas se denomina adenomatosis hepática. La mayoría son sintomáticos, siendo el dolor epigástrico el síntoma más frecuente. Presentan un alto riesgo de rotura y hemorragia intratumoral (del 30 al 50%)<sup>7,10</sup>. Existen numerosos informes sobre la transformación del adenoma hepático en carcinoma hepatocelular, pero se ignora el riesgo verdadero de malignización<sup>12</sup>. El riesgo de malignización y el alto índice de complicaciones en estos pacientes obligan a la resección como tratamiento de elección.

### **1.1.2.- Tumores malignos**

En el hígado, la mayoría de los tumores son secundarios, es decir, metástasis de tumores originados en otras zonas del organismo con una relación tumores primarios- secundarios de 1:20

La mayoría de pacientes con tumores hepáticos malignos presentan lesiones avanzadas, o situadas sobre hígados cirróticos, lo que empobrece el pronóstico. Los avances técnicos de la cirugía hepática, el desarrollo del trasplante hepático y una selección cuidadosa de los pacientes; han permitido estandarizar las indicaciones de estos enfermos para ofrecerles procedimientos con intención curativa.

#### **1.1.2.1.- Tumores primarios**

En el concepto de tumor maligno primitivo hepático se incluyen aquellas lesiones cancerosas originadas a partir de alguna de las estirpes celulares que forman parte de los tejidos hepáticos. Con gran diferencia, el más frecuente es el hepatocarcinoma, siendo el colangiocarcinoma el segundo tumor en frecuencia.

- **Hepatocarcinoma:**

El hepatocarcinoma (HCC) es un tumor maligno hepático causante de la muerte anual de más de 700000 personas en el mundo<sup>13</sup>. Es la sexta neoplasia más frecuente y ocupa el cuarto lugar entre las causas de mortalidad relacionadas con el cáncer<sup>14</sup>.

El desarrollo del HCC está vinculado a la existencia de cirrosis hepática de cualquier etiología. Sin embargo, también puede ocurrir en pacientes no cirróticos con hígado normal. Los factores de riesgo más conocidos son: La infección crónica por virus hepatitis B (VHB) y C (VHC), las toxinas ambientales como la aflatoxina y el agua contaminada, el enolismo<sup>15</sup>, la cirrosis biliar de otro origen como hemocromatosis o cirrosis biliar primaria, la esteatohepatitis no alcohólica y la diabetes mellitus<sup>16</sup>.

Habitualmente el HCC no presenta síntomas, y cuando lo hace, éstos son indistinguibles de los que aparecen en un paciente cirrótico. Por ello se ha dado gran importancia a los programas de Screening en pacientes con cirrosis o infección crónica por VHC o VHB. Esto permite un diagnóstico precoz del HCC mejorando el pronóstico del paciente. En la mayoría de los pacientes las pruebas de imagen como la ecografía, la tomografía o la resonancia acompañadas de una elevación de marcadores biológicos como la alfa-feto proteína son suficiente para llegar al diagnóstico, reservando la biopsia percutánea para los casos en los que existe duda<sup>17</sup>.

Las opciones terapéuticas van a estar determinadas no solo por el estadio tumoral, sino también por la situación de la función hepática del enfermo, ya que recordamos que estos tumores suelen asentarse sobre hígados cirróticos.

La extirpación completa del hepatocarcinoma, ya sea mediante hepatectomía parcial o hepatectomía total con trasplante, es la única modalidad con capacidad curativa. Sin embargo, en general se considera que sólo el 10-20% de los pacientes sufren una enfermedad resecable<sup>10, 18</sup>.

La resección parcial estará indicada en pacientes con un excelente grado de reserva funcional (Child A), sin hipertensión portal, con niveles normales de bilirrubina, con tumores únicos, sin evidencia de metástasis ni signos de invasión vascular. En estos casos ofrece una supervivencia del 50% a los 5 años. La resección debe ser limitada, que cumpla los criterios de radicalidad oncológica, pero que preserve el máximo de parénquima funcionante. El principal inconveniente de este tratamiento es la alta probabilidad de recidiva que asciende al 70% a los cinco años<sup>19,20</sup>.

El trasplante hepático es la segunda opción terapéutica curativa para el HCC, presenta la ventaja de que no sólo elimina el tumor, sino también cura la cirrosis subyacente, con su potencial oncogénico. Estaría indicado en pacientes no candidatos a resección por la existencia de una cirrosis hepática avanzada y que cumplan los criterios de Mazzaferro: tumor único  $\leq 5$  cm o tres tumores, ninguno mayor de 3 cm; sin invasión vascular, y sin metástasis ganglionares ni a distancia<sup>21</sup>. Las limitaciones del trasplante son la necesidad de inmunosupresión crónica y la falta de donantes de órganos.

En los pacientes en los que no está indicada la cirugía existen terapias alternativas:

La radiofrecuencia (RFA) consiste en la aplicación de corriente eléctrica alterna a través de una aguja insertada en el tumor por vía percutánea, o durante el mismo acto quirúrgico. Está indicado en tumores menores de 3-4cm, en pacientes con Child A-B, y en recidivas tras resección o trasplante.

La alcoholización es una necrosis del tumor inducida por la inyección intratumoral de alcohol, la ventaja de este tratamiento es el bajo coste, pero la radiofrecuencia ha demostrado mayor efectividad con menor número de sesiones.

La quimioembolización arterial se basa en la obliteración de la arteria que irriga el tumor mediante gelatina o partículas metálicas, asociada a la inyección de drogas citotóxicas mezcladas con lipiodol, que se van liberando



progresivamente. Permite reducir el tamaño del tumor y retrasar la evolución del mismo. Está indicado en: HCC de gran tamaño no candidatos a cirugía; como tratamiento puente en pacientes a la espera de un trasplante hepático (TH); para reducir la estadificación del HCC y cumplir los criterios de TH; y previamente a la resección o la RFA, para aumentar la supervivencia<sup>19</sup>.

Los quimioterápicos sistémicos no han logrado una paliación efectiva. Tan solo el sorafenib, un fármaco aparecido en el año 2007 ha demostrado buenos resultados<sup>19</sup>.

- **Colangiocarcinoma:**

El colangiocarcinoma es un tumor raro que se origina en el epitelio de los canalículos biliares intrahepáticos. Constituye el 5-10% de todas las neoplasias hepáticas. Suele afectar a pacientes con edad superior a los 60 años y los factores de riesgo más comunes son la colangitis esclerosante primaria, la enfermedad quística del colédoco y la colangitis piógena recidivante. Está considerado de alto grado de malignidad, ya que en algunos casos es multifocal (5%), y tiene gran capacidad para provocar afectación linfática<sup>22</sup>.

Los síntomas habituales son síndrome constitucional y dolor en hipocondrio derecho, acompañado de ictericia en el 25% de los pacientes.

A diferencia del hepatocarcinoma no se asocia a elevación de alfa-fetoproteína, sin embargo aparecen elevados otros marcadores como el Ca19.9, que puede ser útil para el seguimiento postoperatorio. Las pruebas de imagen como la colangiorresonancia y la tomografía nos serán útiles tanto para el diagnóstico como para planificar la estrategia terapéutica<sup>10, 22</sup>.

La resección completa constituye el tratamiento de elección, en estos pacientes la localización del tumor va a obligar a resecciones amplias en muchas ocasiones. Presenta una supervivencia no mayor del 25% a los 5 años tras una

resección completa. El principal problema es el alto índice de recidivas, para el cual no existen tratamientos efectivos.

Se han ensayado tratamientos con quimioterapia y radioterapia, pero sus efectos beneficiosos todavía están por dilucidar<sup>23</sup>.

- **Otros:**

El *hepatoblastoma* es el tumor hepático primario más frecuente en la infancia, casi todos los casos suceden antes de los tres años. Es un tumor que procede de los hepatocitos fetales embrionarios y suele contener elementos mesenquimatosos. Suele presentarse como una masa asintomática y es característica la aparición de pubertad precoz como dato paraneoplásico. Los valores de alfa-fetoproteína se elevan en el 85-90%. La mayoría de estudios respaldan la quimioterapia seguida de la resección como tratamiento de elección, logrando con ello una supervivencia que asciende al 70-100% a los cinco años<sup>24</sup>.

El *angiosarcoma hepático* es un tumor poco frecuente (0,1-2% de tumores hepáticos), si bien es el más frecuente de los tumores mesenquimales malignos hepáticos. La mayoría son idiopáticos aunque existen casos secundarios a la exposición de determinados productos como el Thorotrast®<sup>25</sup>. El diagnóstico suele ser tardío debido a la inespecificidad de la sintomatología y hasta el 50% presentan metástasis a distancia en este momento. La resección completa es el mejor tratamiento. Es una lesión con muy mal pronóstico, presenta una supervivencia media tras cirugía de 12-36 meses e inferior a seis meses sin tratamiento<sup>26</sup>. Se han descrito otros sarcomas, entre ellos el leiomiomasarcoma, el histiocitoma fibroso maligno, el sarcoma embrionario y el tumor rabdoide hepático primario, pero son muy poco frecuentes.

El *cistoadenocarcinoma* es un tumor quístico poco frecuente que puede desarrollarse sobre un cistadenoma previamente existente. Con frecuencia no es posible realizar un diagnóstico diferencial entre ellos. El tratamiento consiste en la resección completa<sup>27</sup>.

El *hemangioendotelioma epitelioide* es un tumor poco frecuente, derivado del endotelio vascular, que suele presentarse como una tumoración multinodular que afecta difusamente a todo el hígado. Es más frecuente en mujeres y se ha relacionado con la toma de anticonceptivos y esteroides. No responde a la radio-quimioterapia en la mayoría de los casos. El tratamiento de elección es la resección, siendo preciso en muchos casos la realización de trasplante por su naturaleza multifocal. Casi todos fallecen por insuficiencia hepática, pero se han descrito series tratadas con trasplante con una supervivencia a los cinco años próximas al 83%<sup>10</sup>.

El *linfoma no hodgkiniano* puede afectar primariamente al hígado. Debe ser tratado como linfoma de cualquier otra localización<sup>28</sup>. También se han descrito tumores neuroendocrinos hepáticos primarios y tumores carcinoides, aunque es muy difícil diferenciarlos de una lesión metastásica.

### 1.1.2.2.- Metástasis hepáticas

Los tumores malignos más comunes del hígado son las metástasis. Quizás el origen más relevante para el cirujano es el colorrectal, debido tanto a su elevada frecuencia como a los buenos resultados en supervivencia tras la resección, sin embargo, un gran número de tumores producen metástasis hepáticas: tumores del sistema gastrointestinal superior (estómago, páncreas, vía biliar), sistema genitourinario (Ca.renal o de próstata), sistema endocrino, mama, melanoma (cutáneo y ocular), tejidos blandos (sarcoma retroperitoneal), o sistema ginecológico (ovario, endometrio, cuello uterino).

Esta elevada frecuencia de metástasis en el parénquima hepático se debe a varios factores: la buena irrigación sanguínea del hígado por vía sistémica y portal; las fenestraciones del sistema sinusoidal hepático que facilitan la diseminación de las células tumorales del sistema hepático; factores humorales que facilitan el crecimiento celular y celulares que favorecen la diseminación metastásica y la proximidad del parénquima hepático con otros órganos que facilitan tu afectación por contigüidad<sup>29</sup>.

En cuanto a la clínica la mayoría se mantiene asintomáticos, pudiendo presentar dolor abdominal, ictericia o prurito. En ocasiones la clínica va a depender del origen del tumor de las propias metástasis, así puede aparecer diarreas o sudoración en tumores carcinoides o clínica secundaria a la producción de diferentes hormonas en los tumores neuroendocrinos.

El diagnóstico de estas lesiones se realiza a través de pruebas de imagen siendo la ecografía y la tomografía computerizada las que se realizan de primera línea, reservando la resonancia magnética y el PET-TC para lesiones dudosas.

***Metástasis hepáticas de Carcinoma colorrectal:*** Aproximadamente un tercio de los pacientes con carcinoma colorrectal (CCR) presentaran metástasis hepáticas, en el 15-20 % se diagnosticaran sincrónicamente con el tumor primario<sup>29</sup>. Estos pacientes se clasifican en un estadio IV por presentar metástasis hepáticas, pero será la presencia de enfermedad extrahepática, los

márgenes de resección positivo, las metástasis ganglionares del carcinoma primario, un corto intervalo libre de enfermedad, tumor mayor de 5 cm, más de una metástasis y niveles de CEA > 200 ng/ ml, los factores que influyen en el verdadero pronóstico<sup>30</sup>.

La cirugía combinada con un correcto tratamiento quimioterápico es el tratamiento de elección en estos pacientes tras múltiples series que demuestran que la resección de las lesiones metastásicas mejora la supervivencia, llegando a ser curativa en algunos casos<sup>31</sup>. Se consideran lesiones resecables todas aquellas en las que se pueda llevar a cabo una escisión completa preservando al menos dos segmentos adyacentes con adecuada vascularización de entrada y salida, y siempre que quede un remanente hepático adecuado<sup>32</sup>. El hecho de que la cirugía haya mejorado la supervivencia en estos pacientes sumado a la capacidad regenerativa del hígado ha originado el empleo de otras técnicas que permitan aumentar las indicaciones como son la radiofrecuencia, la embolización portal y la hepatectomía en dos tiempos<sup>30,33</sup>.

Es importante un seguimiento estrecho de estos pacientes dado el alto riesgo de recidiva que puede ascender al 60%<sup>34</sup>.

***Metástasis hepáticas de Carcinoma Neuroendocrino:*** Estos tumores se clasifican en carcinoides o no carcinoides y en funcionales o no según la producción de hormonas que presenten. Independientemente de su origen son tumores histológicamente similares, que presentan tinción para cromogranina A de forma específica. Estas características histológicas son compartidas por los tumores benignos y malignos siendo precisa la confirmación de una metástasis para asegurar la naturaleza maligna del mismo<sup>35,36</sup>.

El hígado es la localización más frecuente de esas metástasis. Su presencia ensombrece el buen pronóstico de estos tumores disminuyendo la supervivencia de un 90-100% a un 30-40 % a los 5 años. Hasta un 60-70 % de los pacientes presentan afectación difusa por ambos lóbulos hepáticos, lo que

hace que las técnicas de embolización portal, cirugía en dos tiempos o la radiofrecuencia tenga un papel importante con el fin de hacer una resección completa de las mismas. En estos pacientes la resección de las metástasis tiene dos fines, por una parte hacer una resección completa del tejido tumoral en un tumor con crecimiento lento por lo que provoca un importante aumento de supervivencia y por otra la importancia de la citorreducción para disminuir la clínica en un tumor funcionante. Así se indica cirugía siempre que estemos ante un tumor bien diferenciado, sin insuficiencia cardíaca derecha (Sind. Carcinoide), en ausencia de enfermedad extraabdominal o de carcinomatosis peritoneal y asegurándonos una citorreducción del 90% del volumen tumoral<sup>35,37</sup>.

**Otros:** La experiencia de los equipos quirúrgicos en resecciones hepáticas que ha originado una disminución en la morbimortalidad, sumado al desarrollo de tratamientos adyuvantes que mejoran el control de la enfermedad metastásica en diferentes tipos de tumores, ha causado un aumento en la indicación de resección hepática en estos pacientes.

A pesar de que no existen evidencias claras sobre la conducta que debemos tener ante estos pacientes, y que todos ellos precisarán de una valoración individual. En general lo más aceptado es proponer cirugía hepática a aquellos que presenten metástasis resecable, después de un intervalo libre de enfermedad superior a doce meses, con el tumor primario controlado y en los que se haya demostrado un esquema quimioterápico para ser utilizado de forma neoadyuvante, adyuvante o ambos<sup>38</sup>.

## 1.2 FISIOPATOLOGÍA HEPÁTICA

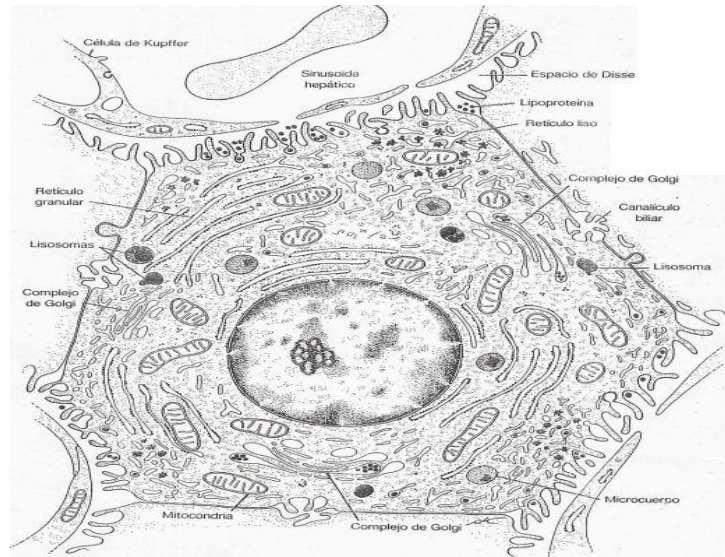
### 1.2.1 Fisiología celular

#### 1.2.1.1.- El hepatocito:

Los hepatocitos son células poliédricas de 20 nm de longitud por 30 nm de anchura, con núcleo central, redondeado u ovalado, pudiendo en el 25% de los casos ser binucleado (Fig.1).

El hepatocito representa el 80% de la población celular hepática en el hombre. Es una célula poliédrica, compleja y multifuncional.

Está formada por un citoesqueleto que tiene un papel funcional en la dinámica de los canalículos biliares y en el transporte de sustancias; por mitocondrias que participan en la oxidación de ácidos grasos y generan energía a través de la fosforilación oxidativa; lisosomas que son vesículas intracelulares que almacenan y descomponen las sustancias exógenas y endógenas, y por un amplio sistema de complejos membranosos interconectados conocido como fracción microsómica de los hepatocitos (Retículo endoplasmático rugoso, liso y complejo de Golgi) que cumple multitud de funciones como la síntesis de proteínas secretoras y estructurales, el metabolismo de los lípidos y la glucosa, la producción y metabolismo del colesterol, la glucosilación de las proteínas secretoras, la formación y secreción de bilis y el metabolismo farmacológico<sup>10, 39</sup>.



**Figura 1. Estructura del hepatocito**

#### **1.2.1.2.- Sinusoides hepáticos:**

Son capilares sanguíneos sinusoidales, cuyas paredes formadas por las células endoteliales están separadas de los hepatocitos por el espacio de Disse, compartimento extravascular hacia donde los hepatocitos proyectan sus microvellosidades. Tienen un diámetro de 105 a 110 nm y ocupan del 6 al 10% de la superficie endotelial.

Las células endoteliales de la pared de los sinusoides son células sin uniones intercelulares, sin membrana basal y con fenestraciones múltiples y amplias. Esta disposición permite un movimiento bidireccional libre de solutos hacia y desde los hepatocitos con una gran capacidad de filtración. Además estas realizan endocitosis; intervienen en la síntesis de la matriz celular, con producción de colágeno IV, fibronectina, colágeno III; producen mediadores de las reacciones inflamatorias tales como interleucinas 1 y 6, prostaciclina y prostaglandinas E2 y vasorreguladores como el monóxido de nitrógeno, que representa un papel fundamental en el desarrollo de la fibrosis y la hipertensión portal<sup>10</sup>.



**1.2.1.3.- Células de kupffer:**

Son un tipo de macrófagos móviles, ligados a las células endoteliales de los sinusoides. Pueden representar del 80 al 90% de la población de macrófagos fija del organismo. Tiene la capacidad de emigrar de los sinusoides hacia las zonas de lesión y así contribuyen en el atrapamiento de las sustancias extrañas y el comienzo de la respuesta inflamatoria<sup>39</sup>. Sintetizan citoquinas, eicosanoides y derivados reactivos del oxígeno.

**1.2.1.4.- Células estrelladas o células de ITO:**

Son células perisinusoidales, que se encuentran en el espacio de Disse. Tienen un papel importante en el depósito de grasa y fundamentalmente de la vitamina A, siendo el principal almacenador de esta vitamina. Sintetizan y modulan la degradación de la matriz extracelular, produciendo colágeno, glicoproteínas y proetoglicanos. Estas células desempeñan una misión cardinal en la progresión de la fibrosis hepática<sup>40</sup>. Regulan el flujo sanguíneo sinusoidal por su capacidad contráctil en respuesta a diversos agentes como tromboxano A2, prostaglandinas F2, sustancia P y endotelinas.

**1.2.1.5.- Matriz extracelular:**

Está situada en los espacios porta, en continuidad con el tejido conjuntivo de la cápsula de Glisson, en el espacio de Disse perisinusoidal y en torno a las venas centrolobulillares. Está compuesto por colágeno, proteoglicanos y glicoproteínas. La interacción entre las células y la matriz es esencial para el mantenimiento de la homeostasia. Esta interacción es extremadamente compleja y frágil y representa un papel fundamental en la fibrosis y la oncogénesis hepática<sup>40</sup>.

### 1.2.2.- Hemodinámica:

El hígado del adulto está perfundido por 120 ml de sangre por minuto para cada 100 g de tejido hepático, lo que equivale al 25% del gasto cardiaco. La vena porta proporciona el 75% del flujo con una sangre pobre en oxígeno pero con abundantes nutrientes, mientras que el 25% es un flujo rico en oxígeno dependiente de la arteria hepática. A pesar de ello el flujo portal aporta entre el 50-70% de la oxigenación hepática por su elevado caudal.

El flujo sanguíneo hepático está regulado por una serie de factores. El tono del esfínter muscular localizado en la entrada y salida de los sinusoides está regulado por el sistema nervioso vegetativo, las hormonas circulantes, las sales biliares y los metabolitos. Entre los factores endógenos que regulan el flujo se encuentran el glucagón, la histamina, la bradicinina, las prostaglandinas, el óxido nítrico y algunas hormonas intestinales. Los propios sinusoides con la contracción y expansión de sus células endoteliales, las células de Kupffer y las células estrelladas también gobiernan de forma primaria este flujo<sup>41</sup>.

La vena porta normalmente es responsable de un flujo de 90 ml por minuto por 100 g de hígado perfundido. La presión portal varía de 5 a 8 mmHg, con velocidad de flujo portal de  $38,3 \pm 14,6$  cm/seg. Las venas hepáticas drenan la totalidad del flujo hepático, manteniendo un flujo de 1.2 a 1.8 litros por minuto, y su presión libre es de 1 a 2 mmHg.

Existe una relación unilateral recíproca entre el flujo por la arteria hepática y la vena porta, de forma que el descenso del flujo portal se acompaña de un aumento en el flujo arterial hepático, pero la situación contraria no se da.

En el hombre, el clampaje del pedículo hepático aferente aumenta constantemente la presión arterial, tanto sistólica como diastólica, a pesar de ocasionar una bajada moderada del débito cardíaco. La resistencia vascular periférica aumenta cerca del 50%. Estas modificaciones pueden permanecer estables hasta 90 minutos y vuelven a

la normalidad en algunos minutos tras el desclampaje, tras un breve período de aumento del retorno venoso, de la presión arterial y del índice cardíaco.

El flujo hepático declina con el envejecimiento en cerca de 0,5 a 1,5% por año, pudiendo llegar a una reducción de 40% a partir de los 65 años, con la consecuente disminución de la tolerancia a la isquemia, de la función hepática y de la capacidad regenerativa a partir de esta edad<sup>42</sup>.

### 1.2.3.- Secreción biliar:

La secreción y producción de bilis representa una de las funciones principales del hígado. La misión fisiológica de la bilis es doble: desechar algunas sustancias y proporcionar sales biliares al intestino para facilitar la digestión.

La bilis es una solución isotónica formada por ácidos, sales y pigmentos biliares, así como colesterol, fosfolípidos, electrolitos inorgánicos, mucina, múltiples metabolitos y agua. En la tabla 1 mostramos la concentración de electrolitos en la bilis humana.

**Tabla 1.- Concentración de electrolitos en la bilis.**

Concentración de Electrolitos en la Bilis Humana	
	mEq/L
Na <sup>+</sup>	132 a 165
K <sup>+</sup>	4,2 a 5,6
Ca <sup>++</sup>	0,6 a 2,4
Mg <sup>++</sup>	0,7 a 1,5
Cl <sup>-</sup>	96 a 126
HCO <sup>3-</sup>	17 a 55
Ac. Biliares	3 a 45

Cada día se secretan aproximadamente 1500 ml de bilis; el 80% es secretado desde los hepatocitos a los canalículos biliares. Se efectúa a través del transporte activo de ácidos biliares desde la sangre hacia los canalículos biliares, por una secreción canalicular ácido-biliar independiente y por la reabsorción y secreción de fluidos de electrolitos inorgánicos por los canalículos y ductos biliares<sup>42</sup>. La variación en la producción diaria de bilis es dependiente de la producción de ácidos biliares por los hepatocitos, siendo influenciado por la ingesta alimentaria, por la motilidad intestinal y por el funcionamiento de la vesícula biliar<sup>43</sup>.

Las bilirrubinas proceden del catabolismo de la hemoglobina en el sistema retículo endotelial de varias localizaciones en el organismo como el bazo y la médula ósea. El hierro y la globina se separan formando la biliverdina que, tras la reducción, da origen a bilirrubina no conjugada o indirecta, insoluble en agua, pero que es llevada al hígado por la albúmina, donde en el interior del hepatocito se liga al glutatión-S-transferasa y a la proteína Z, siendo entonces conjugada a ácido glucurónico, formando monoglucuronidos de bilirrubina, proceso catalizado por la uridina-difosfato-glucuronato-glucuronil-transferasa (UDPGT), pasando a bilirrubina conjugada o bilirrubina directa, que es hidrosoluble y es excretada hacia los conductos biliares y de ahí hacia el intestino.

Los ácidos biliares provienen esencialmente del catabolismo del colesterol y son sintetizados exclusivamente por el hígado, formando derivados glucocólicos y taurocólicos, presentes en la bilis como sales de sodio y de potasio<sup>42</sup>.

#### **1.2.4.- Metabolismo:**

La integridad morfológica y funcional del hígado es vital para la salud del organismo humano. Este depende fundamentalmente del mantenimiento constante de las numerosas funciones bioquímicas y de la diversidad de procesos metabólicos que ocurren en él.

**1.2.4.1.- Metabolismo de los carbohidratos:** El hígado es el principal responsable de la homeostasia de los carbohidratos, consumiendo, almacenando y produciendo glucosa. Tanto él como los músculos almacenan la glucosa en forma de glucógeno, pero sólo el hígado descompone glucógeno para entregar glucosa a la circulación sistémica, mientras que el glucógeno descompuesto por el músculo sólo puede ser utilizado en el mismo músculo<sup>44</sup>.

El glucógeno hepático desaparece tras 48 horas de ayuno y el hígado cambia la descomposición de glucógeno por la glucogénesis. Sus sustratos principales son los aminoácidos derivados de la descomposición muscular y el glicerol de la adiposa. Libera cuerpos cetónicos que pasan a ser el principal sustrato energético del encéfalo.

La regulación de este metabolismo va a depender de la concentración de glucosa en sangre sinusoidal y de las hormonas (insulina, catecolaminas y glucagón).

**1.2.4.2.- Metabolismo de las proteínas:** El hígado también ocupa un lugar central en el metabolismo de las proteínas. Las proteínas ingeridas se descomponen a aminoácidos y circulan por el organismo. El exceso de aminoácidos lo afronta el hígado, aquí se oxidan para dar energía o se convierten en glucosa, cuerpos cetónicos o grasa. Los aminoácidos de cadena ramificada son los únicos que no pueden ser catabolizados por el hígado, son transformados mayoritariamente en el músculo<sup>44</sup>.

El hígado es también el lugar donde se sintetizan muchas proteínas que participan en una amplia gama de funciones críticas, como la coagulación, el transporte, la unión al hierro y la inhibición de las proteasas. Y es el responsable de la llamada respuesta de la fase aguda, es decir una respuesta de síntesis en la que el hígado fabrica proteínas frente a un traumatismo o una infección.

**1.2.4.3.- Metabolismo de los lípidos:** como comentamos con anterioridad los ácidos grasos se sintetizan en el hígado durante los estados de exceso de glucosa. En la lipólisis los ácidos grasos pueden esterificarse con el glicerol para formar triglicéridos que se almacenan o transportan, o bien oxidarse, produciendo energía en forma de ATP y cuerpos cetónicos. Este proceso está regulado por el estado nutricional; el ayuno favorece la oxidación y el estado postprandial la esterificación<sup>45</sup>.

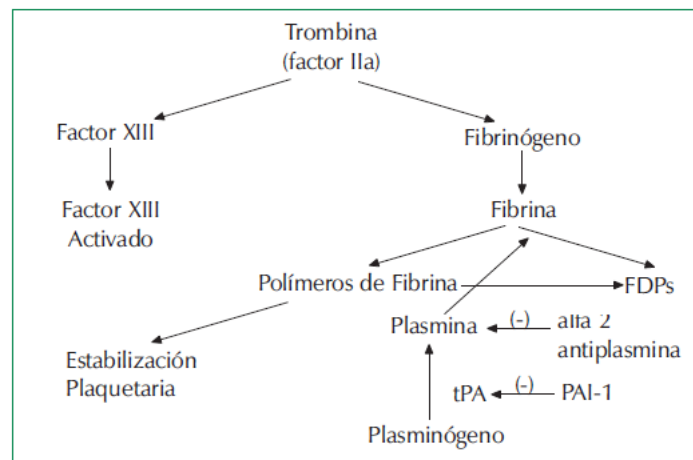
**1.2.4.4.- Metabolismo de los xenobióticos:** Los xenobióticos son compuestos químicos que no forman parte de la composición habitual del cuerpo humano, pero que son capaces de acceder a su interior. Muchos de ellos son de naturaleza lipofílica y el organismo cuenta con una serie de enzimas capaces de convertirlos en sustancias más hidrosolubles y más fáciles de excretar<sup>46</sup>. Las reacciones de biotransformación de los xenobióticos son de dos tipos:

Reacciones de fase 1: Son reacciones de oxidación, reducción e hidrólisis, donde el Citocromo P450 (enzimas con actividad monooxigenasa) es el principal responsable. Las enzimas P450 se encuentran en todo el organismo, pero fundamentalmente en el hígado, siendo éste el principal órgano de metabolización de los xenobióticos<sup>47</sup>.

Reacciones de fase 2: Son reacciones de conjugación, tras las cuales se facilita la unión de los xenobióticos o de los metabolitos generados en las reacciones de fase 1 con moléculas endógenas, tales como el ácido glucurónico, glutatión, sulfato o aminoácidos. Tras éstas, se producen sustancias más fácilmente excretables<sup>46</sup>.

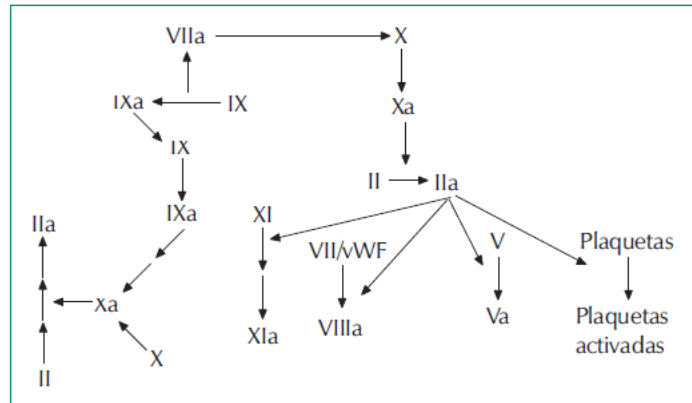
### 1.2.5.- Hemostasia:

El hígado es el responsable de la síntesis, activación y aclaramiento de los diversos factores de coagulación, de sus inhibidores y de la fibrinólisis (Fig.2). La hemostasia primaria depende del número y de la función plaquetaria, en cuanto que la coagulación (Fig.3) depende de la activación de factores y de la presencia de plaquetas activadas.



**Figura 2. Fibrinólisis y fibrinogénesis**

La fibrinólisis se inicia por el hígado con la producción y liberación por las células endoteliales del activador tisular de plasminógeno, que convierte el plasminógeno en plasmina activada, causando la degradación de la fibrina. El plasminógeno y los factores antifibrinolíticos también son sintetizados por el hígado.



**Figura 3. Activación de la cascada de coagulación**

El hígado sintetiza la mayoría de los factores de coagulación, con producción exclusiva del fibrinógeno (factor I), protombina (factor II) y los factores V, VII, IX y X. En la insuficiencia hepática la disminución de estos factores acarrea coagulopatía. El hígado también sintetiza una pequeña fracción de factor VIII. Los factores II, VII, IX y X son glicoproteínas cuya síntesis es dependiente de la asociación de vitamina K, encontrándose disminuídos en presencia de colestasis<sup>10</sup>.



### 1.3.- TÉCNICAS DE RESECCIÓN HEPÁTICA

#### 1.3.1.- Anatomía quirúrgica hepática. Fundamentos anatómicos de las resecciones anatómicas.

El hígado es el mayor órgano del cuerpo humano con un peso en el adulto de hasta 2500 g. Es un órgano intratorácico, situado detrás de las costillas y cartílagos costales, separado de la cavidad pleural y de los pulmones por el diafragma. Localizado en el cuadrante superior de la cavidad abdominal se proyecta a través de la línea media hacia el cuadrante superior izquierdo. Posee un parénquima blando, flexible y con cierta dificultad para ser suturado. Envuelto por una fina capa fibrosa denominada cápsula de Glisson.

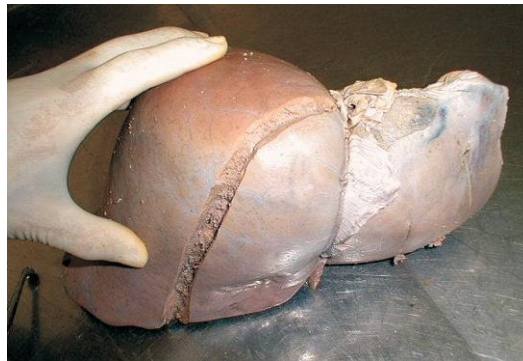
Una resección hepática segura y sin complicaciones exige un conocimiento a fondo de la anatomía hepática tanto morfológica, como funcional.

##### 1.3.1.1.- Descripción de la segmentación hepática:

La cirugía hepática moderna se fundamenta en la anatomía funcional hepática sistematizada por Couinaud en 1957, basada en la distribución en el interior del hígado de los pedículos portales y las venas suprahepáticas. La proyección vertical de las venas suprahepáticas divide al hígado en cuatro secciones: posterior derecha, anterior derecha, medial izquierda y lateral izquierda. La división de estas secciones en un plano horizontal conforma los segmentos hepáticos<sup>48, 49</sup>.

Las fronteras anatómicas que van a dividir los diferentes segmentos se denominan cisuras, son líneas fundamentales para la penetración en el interior del parénquima durante la resección reglada.

Cisura sagital o mediana se extiende desde el lecho vesicular hasta el borde izquierdo de la vena cava y divide al hígado en dos hemihígados: derecho e izquierdo (Fig.4). En su interior se encuentra en un plano superior el trayecto de la vena suprahepática media y en un plano más inferior la división del pedículo glissoniano principal en derecho e izquierdo. Esta cisura forma con la cara inferior del hígado un ángulo de unos 65 grados y corta al hilio a nivel de la bifurcación portal. Es la que se debe abordar para realizar las hemihepatectomías izquierda y derecha<sup>50</sup>.

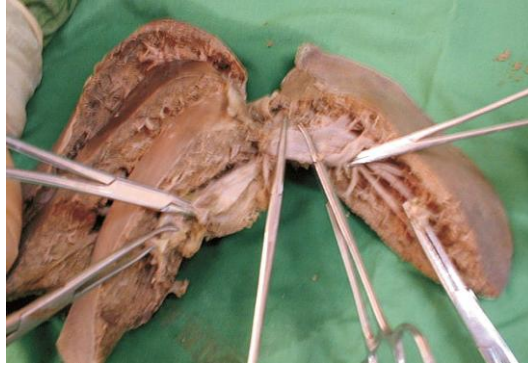


**Figura 4. Cisura sagital o mediana**

Cisura portoumbilical: Es la única visible y bien conocida por los antiguos anatomistas. Su cara interna está delimitada por el canal de Arantius y el receso de Rex o seno portoumbilical y la superior por el ligamento falciforme (Fig. 5).

Corresponde clásicamente a la división hepática en dos lóbulos: a la izquierda el lóbulo izquierdo clásico y a la derecha, entre ella y la cisura

mediana el segmento medial o subsegmento IV de Couinaud. En ocasiones está atravesada por una vena suprahepática intermedia, de menor calibre que la media y no presente en todos los casos.



**Figura 5. Cisura portoumbilical**

Cisura lateral derecha: Corresponde con el trayecto de la vena suprahepática derecha. Está limitada en su plano posterior por la hoja superior del ligamento coronario derecho hasta seguir al origen del ligamento triangular derecho. A este nivel desciende hacia delante, paralelamente al borde inferior y derecho del hígado; en la cara inferior del hígado sigue paralela al borde vesicular para terminar en la extremidad derecha del sillón hiliar transversal (Fig. 6). Nos permite el abordaje en las segmentectomías anterior y posterior.

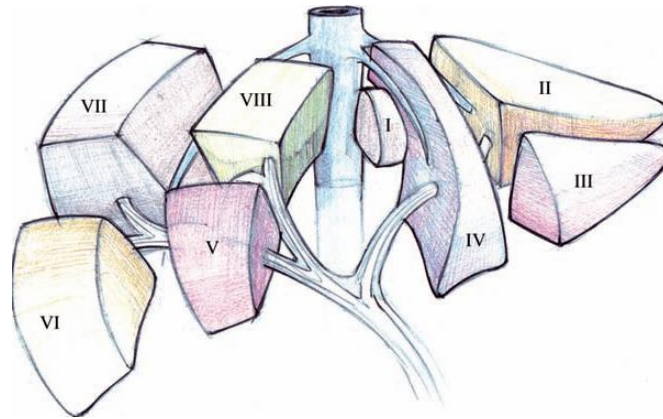


**Figura 6. Cisura lateral derecha**

Cisura lateral izquierda: Sigue el trayecto de la vena suprahepática izquierda. Desde su origen describe un trayecto arciforme, oblicuo a la izquierda y hacia delante para terminar en la mitad del borde anterior del lóbulo izquierdo. Es el límite de división entre los segmentos II y III del lóbulo hepático izquierdo.

Cada segmento se caracteriza porque recibe una rama de la tríada portal independiente formada por arteria, porta y conducto biliar rodeada de una vaina de tejido conectivo, prolongación de la cápsula de Glisson que rodea al hígado, de ahí la denominación de pedículo glissoniano.

La triada portal derecha se bifurca en una rama anterior y otra posterior (sectores anterior y posterior derechos), cada una de las cuales se bifurcan en una rama superior y otra inferior (segmentos 8, 5, 7 y 6). El pedículo izquierdo se divide en tres ramas (una posterior y dos anteriores) (segmentos 2, 3 y 4) (Fig. 7).



**Figura 7. Segmentación hepática**

El segmento 1 se halla por detrás del hilio hepático, entre las venas porta y cava inferior y recibe vascularización tanto del hígado derecho como del izquierdo. Desde el punto de vista anatómico se han descrito tres porciones: lóbulo caudado (lóbulo de Spiegel) a la izquierda de la vena porta; proceso caudado que es la porción entre la vena cava y la vena porta, y porción paracaval localizada en su porción más craneal cerca de las venas suprahepáticas, también denominada segmento 9 o segmento de Mazzio. Es el puente que enlaza el resto del S1 con el lóbulo derecho<sup>48-50</sup>.

**1.3.1.2.- Clasificación de Brisbane:** Los preceptos de Couinaud fueron ampliamente utilizados durante al menos medio siglo y su clasificación referencia de la mayor parte de tratados. Sin embargo durante ese tiempo surgieron inconvenientes que llevaron a muchos expertos a proponer nuevas clasificaciones. Es por ello que en el año 2000, el Comité Científico de la Asociación Hepato-Bilio-Pancreática (IHPBA), aprobó unánimemente una nueva terminología, elaborada por un grupo de expertos mundiales. Esta clasificación se conoce como clasificación de Brisbane y se basa en tres órdenes siguiendo la ramificación portal<sup>51</sup>.

1) Primer orden: la primera etapa es la división en dos mitades, cuya irrigación aferente y drenaje biliar proviene de las ramas de primer orden, derechas e izquierdas. El plano de primer orden es la cisura portal media establecida por el recorrido de la vena suprahepática media. Se divide así en dos hemihígados: derecho e izquierdo.

Hígado derecho: 5-6-7-8

Hígado izquierdo: 2-3-4

2) Segundo orden. Sección: La disposición alternada “venas hepáticas-pedículos hepáticos” permite establecer planos que son irrigados por ramas de 2º orden, dando lugar a la siguiente etapa de sistematización hepática. Esta división corresponde a los planos interseccionales; en el hemihígado derecho, al plano coronal (cisura portal derecha) donde discurre la vena suprahepática derecha, dividiéndolo en dos secciones, anterior y posterior. El hemihígado izquierdo también queda dividido en dos secciones, medial y lateral por el plano interseccional que corresponde a los ligamentos redondo y falciforme (fisura umbilical anatómica).

Sección anterior derecha: 5-8

Sección posterior derecha: 6-7

Sección medial izquierda: 4

Sección lateral izquierda: 2-3

3) Tercer orden. Segmentos: Las divisiones de tercer orden corresponden a los planos intersegmentarios, no tienen un límite preciso, y dependen de los pedículos hepáticos que llevan irrigación y presentan drenaje biliar de forma independiente a cada uno de los segmentos que describiera Couinaud. En esta nueva terminología, estos segmentos se denominan con números arábigos (no ya romanos como propuso Couinaud) del 1 al 8, comenzando por el lóbulo caudado y siguiendo el sentido de las agujas del reloj.

**Segmento 1, 9:** correspondiente al lóbulo caudado.

**Segmento 2:** lateral izquierdo posterior.

**Segmento 3:** lateral izquierdo anterior.

**Segmento 4:** medial izquierdo.

**Segmento 5:** anterior inferior derecho.

**Segmento 6:** posterior inferior derecho.

**Segmento 7:** posterior superior derecho.

**Segmento 8:** anterior superior derecho.

Debido a que el lóbulo caudado puede recibir irrigación aferente de cualquiera de los pedículos hepáticos de primer orden, se lo suele subdividir en dos mitades homólogas que se numeran como “1” a la mitad izquierda y “9” a la mitad derecha. Aunque el número total de segmentos hepáticos es de ocho.

### 1.3.2.- Diferentes tipos de resecciones hepáticas:

**1.3.2.1.- Resecciones regladas:** Se definen como la resección de una parte del parénquima que sigue una o más cisuras anatómicas. De este modo, se evita dejar tejido desvitalizado que pueda ser origen de complicaciones postoperatorias.

- Hepatectomía o hemihepatectomía: El plano de disección empleado es la vena suprahepática media (cisura sagital). En la hepatectomía derecha se extirpan los segmentos 5, 6, 7 y 8; mientras que en la izquierda se resecan los segmentos 2, 3 y 4. El segmento 1 puede ser resecado con una u otra.
- Hepatectomía ampliada (triseccionectomía): Incluye los segmentos extirpados de una hemihepatectomía ampliándose a segmentos contralaterales, por lo que la vena suprahepática media debe ser ligada. En la hepatectomía derecha ampliada se resecan los segmentos 5, 6, 7 y 8 añadiendo el segmento 4 (el plano de disección es la vena suprahepática izquierda). En la hepatectomía izquierda ampliada se extirpan los segmentos 2, 3 y 4, añadiendo los segmentos 5 y 8 (el plano de sección es la vena suprahepática derecha).
- Seccionectomía anterior derecha: incluye los segmentos 5 y 8.
- Seccionectomía posterior derecha: incluye los segmentos 6 y 7.
- Seccionectomía medial izquierda: incluye el segmento 4.
- Seccionectomía lateral izquierda: incluye el segmento 2 y 3.
- Sectorectomía medial izquierda: incluye los segmentos 3 y 4.



- Sectorectomía lateral izquierda: incluye el segmento 2.
- Bisegmentectomías. Incluye dos segmentos contiguos. Existen bisegmentectomías con características propias:

Bisegmentectomía 2-3 (Seccionectomía lateral izquierda). Se extirpan los segmentos 2 y 3 del lóbulo hepático izquierdo. El plano de resección se inicia a nivel del ligamento redondo y sigue el plano de la vena suprahepática izquierda.

Bisegmentectomía 6-7 (sectorectomía posterior derecha). Se reseca el sector posterior derecho de Couinaud, para lo que se debe ligar la rama posterior de la vena porta derecha y seguir el plano de la vena suprahepática derecha.

Bisegmentectomía 5-8. Es la resección del sector anterior derecho; para ello debe ligarse la rama anterior de la vena porta derecha y seguir los planos de la vena suprahepáticas derecha y media.

- Segmentectomías: la denominación incluye el segmento resecado.

**1.3.2.2.- Resecciones limitadas:** Consiste en la resección de una parte del parénquima hepático que no corresponde a una porción anatómica del hígado y en consecuencia, el plano de sección no pasa por una cisura anatómica. Determinadas situaciones aconsejan esta técnica: pacientes con hepatopatía crónica o necesidad de preservar el máximo de parénquima. En absoluto son resecciones incompletas o incorrectas, y por ello debe evitarse términos como “no regladas” o “atípicas”.

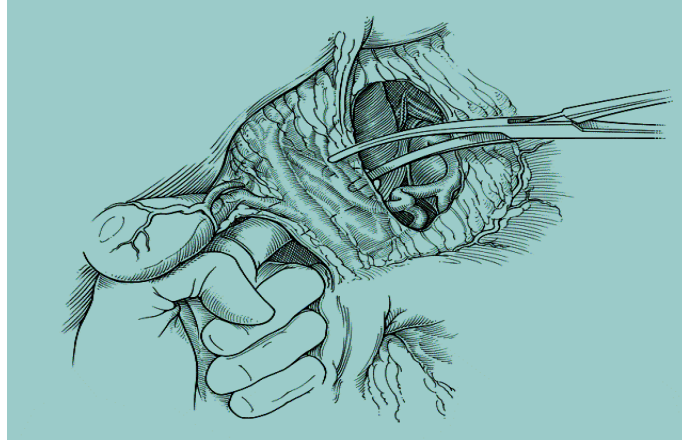
### 1.3.3.- Descripción de las técnicas de oclusión y control vascular.

La pérdida de sangre durante la resección hepática es uno de los factores importantes que afectan a los resultados perioperatorios de los pacientes<sup>52</sup>. Se han utilizado diversos métodos para reducir la pérdida de sangre durante la resección hepática. Esto incluye bajar la presión venosa central, la hipoventilación y la oclusión del flujo de sangre al hígado mediante diferentes técnicas de clampaje:

#### **Clampaje total del pedículo hepático (Maniobra de Pringle):**

En 1908 J. Hogarth Pringle describe esta técnica para el tratamiento de las hemorragias arterio-portales en el trauma hepáticos. Se realiza tomando en bloque la totalidad de la triada del pedículo hepático mediante un clampaje vascular o un torniquete ajustable. Para su correcta realización se debe acceder a la cara posterior del hilio, a través del hiato de Winslow, realizando la apertura del epiplón menor. No precisa de una disección excesiva del tejido celuloadiposo, ya que este protege las estructuras del trauma con la pinza. Permite un control eficaz del flujo aferente del hígado (Fig. 8)<sup>2</sup>.

Esta oclusión puede ser aplicada de forma continua o intermitente, con periodos de isquemia de 15 minutos y descansos de 5 minutos, con el objetivo de evitar el efecto perjudicial de una isquemia prolongada. Sobre hígado sano si se aplica de forma continua la duración máxima aconsejable es de una hora y de dos horas si se aplica de forma intermitente.



**Figura 8. Maniobra de Pringle**

Es una técnica fácil de reproducir. Actualmente es la técnica más utilizada debido a que la mayoría de hepatectomías son por metástasis hepáticas de carcinoma colorrectal, donde el riesgo de recidiva es alto y con ello el riesgo de rehepatectomía. La disección pedicular debe ser mínima en estos pacientes evitando así dificultades en sucesivas intervenciones.

#### **Clampaje selectivo por abordaje hiliar o suprahiliar:**

Mediante esta técnica se interrumpe el flujo aferente de un hemihígado, o bien de uno de los sectores del hígado derecho. De esta forma se limita la vascularización destinada al parénquima que va a ser resecado y preserva al parénquima restante del efecto de toda isquemia.

En el abordaje hiliar se disecan las ramas porta y arteriales a nivel del hilio, en el interior de la vaina peritoneal del pedículo hepático. Se debe liberar todo el tronco portal y arterial, sin necesidad de abrir la placa hiliar ni de controlar la vía biliar.

El abordaje suprahiliar se trata de un control en bloque de los elementos glissonianos pasando alrededor de la vaina glissoniana, dentro del trayecto

intraparenquimatoso suprahiliar. Fue descrito por Launois<sup>53</sup>. Para su realización debemos penetrar en el parénquima hepático por encima y por debajo del pedículo glissoniano derecho, permaneciendo siempre en contacto con él.

Este tipo de clampajes es utilizado cuando las lesiones son unilaterales, sobre todo si hay una indicación de hepatectomía derecha o izquierda. Los abordajes suprahiliares son más recomendados para las lesiones derechas en donde se realiza una bisegmentectomía 5-8. Presentan el inconveniente de una disección exhaustiva a nivel del pedículo hepático lo que hace la intervención más difícil.

#### **Clampaje intrahepático o con balón intraportal:**

La rama portal correspondiente al segmento a resear se puede ocluir con un catéter balón que se introduce por punción con ayuda de la ecografía peroperatoria. Es una técnica que requiere amplios conocimientos de la ecografía peroperatoria y una gran pericia para puncionar la rama portal, colocando la guía y después el catéter balón, por lo que no está muy difundida. En ocasiones se combina con la introducción de azul de metileno inyectado el cual nos va a indicar los límites de resección.

#### **Exclusión vascular total:**

Fue descrita inicialmente por Heaney en 1966 y popularizada por los trabajos de Huguet en la década de los setenta. Provoca una exclusión vascular completa del hígado, tanto aferente como eferente. Debe realizarse una disección y liberación total del hígado y posteriormente un clampaje del pedículo hepático, de la vena cava inferior infrahepática por encima de las venas renales y de la vena cava inferior suprahepática, en este orden. En cuanto al desclampaje deberá hacerse en sentido inverso.

Produce un trastorno hemodinámico considerable, que no será tolerado en todos los pacientes, requiriendo en ocasiones un sistema de by-pass venovenoso. Es una técnica poco empleada por su mala tolerancia, se reserva para tumores centrales de gran tamaño que están adyacentes a vena cava o suprahepáticas<sup>54</sup>.

La duración de la exclusión vascular no debería sobrepasar los 45 minutos en hígado sano y los 30 en hígado cirrótico.

Fortner describió la exclusión vascular total con refrigeración con el fin de favorecer la tolerancia del hígado a la isquemia producida, mediante la perfusión de líquido a 4°C a través del sistema venoso-portal. Resultó ser una técnica muy compleja.

#### **Exclusión vascular total con preservación del flujo de la cava:**

En esta técnica el pedículo hepático y las venas suprahepáticas son clampadas sin interrumpir la circulación en la vena cava. Puede realizarse de forma total (ocluyendo la triada portal y todas las venas suprahepáticas) o parcial (cuando se ocluyen únicamente vasos en algunos de los lóbulos)<sup>55</sup>. Para su aplicación se deben disecar las venas suprahepáticas, derecha por un lado y habitualmente el tronco común de la media y la izquierda por otro. Esta técnica disminuye los trastornos hemodinámicos que aparecen en la exclusión vascular total. Es efectiva y segura en tumores grandes y/o centrales sin invasión de la vena cava.

Esta es la técnica empleada de forma habitual en nuestro servicio.

**Control vascular aferente-eferente:**

El fundamento de esta técnica, descrita por Lotart-Jacob para la hepatectomía derecha, consiste en el control y ligadura de los elementos vasculares de la porción hepática a extirpar antes de iniciar la transección del parénquima. Su principal ventaja es la reducción de la hemorragia intraoperatoria y que durante la sección hepática es evidente en la superficie hepática el límite de resección. Su principal inconveniente es la dificultad en el control de las venas suprahepáticas y los riesgos derivados de su lesión.

**Control vascular sin interferencia aferente-ni eferente:**

Esta técnica fue descrita por Ton That Tung y Nguyen Duong Quang. Se realiza la transección del parénquima hepático sin seccionar los elementos vasculares previamente. Inicialmente se realizaba sin ninguna maniobra de oclusión, con lo que era necesaria una extremada rapidez; actualmente se utiliza maniobra de Pringle. Los pedículos portales y suprahepáticos se controlan intrahepáticamente. Presenta la ventaja de no estar influenciada por posibles variaciones anatómicas; sin embargo la hemorragia suele ser mayor.

**Control vascular aferente-no eferente:**

Descrita inicialmente por Bismuth, intenta combinar las dos anteriores. Inicialmente se realiza una disección de los elementos portales que son pinzados y no ligados y posteriormente se realiza la transección del parénquima con la ligadura intrahepática de los elementos portales y suprahepáticos.

#### **1.4.- FISIOPATOLOGÍA DE LA LESIÓN HEPÁTICA POR ISQUEMIA REPERFUSIÓN**

La lesión por isquemia-reperfusión (IR) se define como el fenómeno durante el cual el daño celular en un órgano, causada por la hipoxia, se exagera paradójicamente después de la restauración del aporte de oxígeno<sup>56</sup>.

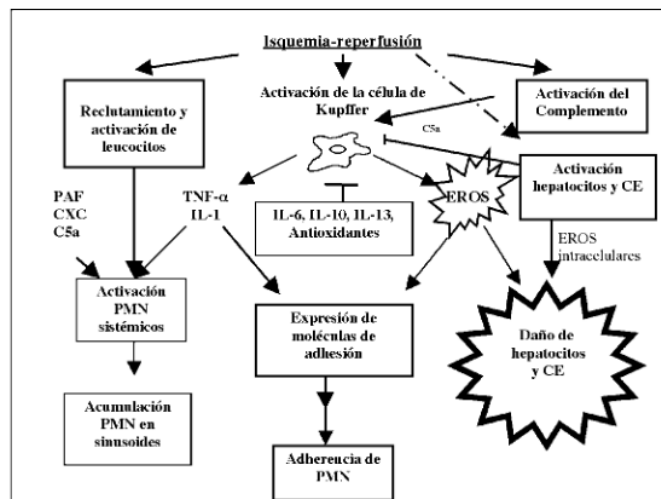
El daño hepático por isquemia-reperfusión es una complicación frecuente e importante tras las resecciones mayores en las que se produce una reducción completa del flujo sanguíneo mediante maniobras de clampaje, en el trasplante hepático o cuando se producen situaciones que originan hipoxia sistémica o que implican un bajo flujo sanguíneo que dan como resultado una insuficiente perfusión hepática. Esta compromete la función hepática y aumenta la morbilidad postoperatoria, la mortalidad, el tiempo de recuperación y los resultados globales de la cirugía<sup>57</sup>.

Como consecuencia de la hipoxia, se altera la función de la cadena respiratoria mitocondrial y se reducen las enzimas mitocondriales, por lo que se produce la inhibición del proceso de fosforilación oxidativa con la subsiguiente reducción de la síntesis de ATP. Esta reducción del ATP celular ocasiona alteraciones en el transporte de iones a través de la membrana. La inhibición del ATP-asa  $\text{Na}^+\text{K}^+$  provoca la entrada de sodio intracelular y se acumula en la célula, con el correspondiente edema celular y muerte. Además se produce un aumento en el calcio citosólico, lo que provoca la activación de las fosfolipasas de la membrana celular y se produce la degradación de los fosfolípidos. El calcio intracelular está estrechamente implicado en el desarrollo de la lesión isquémica y se considera de crucial importancia en la evolución del daño irreversible. Este aumento de calcio desempeña un importante papel en la producción de radicales libres y oxígeno consecutivos a la reperfusión, mediante la activación de la xantina oxidoreductasa.

En la fisiopatología de la lesión por IR está implicada una compleja red de mecanismos intrahepáticos y extrahepáticos.

### 1.4.1.- Fases del daño hepático secundario a isquemia-reperusión.

**1.4.1.1.- Fase precoz o aguda:** Comprende en el tiempo las primeras tres a seis horas después de la reperusión. Está asociada a la activación de las células de Kupffer con producción de especies reactivas de oxígeno (ERO). Esta activación se lleva a cabo por la acción previa de componentes activados del sistema del complemento, el reclutamiento y la activación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> (Fig.9)<sup>58, 59</sup>.

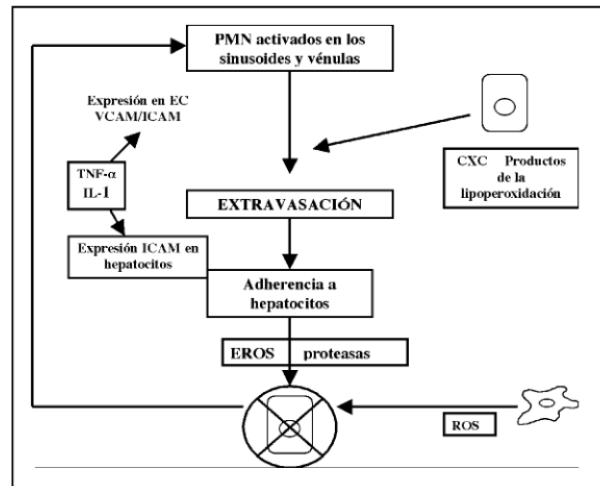


**Figura 9. Fase precoz del daño por isquemia-reperusión**

**1.4.1.2.- Fase tardía o subaguda:** Se caracteriza por infiltración masiva de neutrófilos, alcanza su máximo a las 18-24 horas de la reperusión. En esta fase, las citoquinas proinflamatorias, principalmente el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), las interleuquinas (IL-6 e IL-1), quimioquinas y factores del complemento liberados durante la reperusión precoz son los responsables del reclutamiento de Polimorfonucleares (PMN). Estos neutrófilos activados liberan ERO y proteasas, causantes ambos del estrés oxidativo y de la lesión hepatocelular que se produce en esta fase de la lesión por reperusión, que



supera en gravedad a la fase precoz<sup>59,60</sup>. El secuestro de polimorfonucleares (PMN) es tan acusado que la reducción aguda de su recuento periférico se ha propuesto como marcador intraoperatorio precoz de la lesión por reperfusión del injerto hepático (Fig. 10)<sup>61</sup>.



**Figura 10. Fase tardía del daño por isquemia-reperfusión**

#### 1.4.2.-Factores que participan en el daño hepático secundario a isquemia-reperfusión

##### 1.4.2.1.-Lesión hepática inducida por el factor de necrosis tumoral:

En el hígado el TNF- $\alpha$  desempeña un papel dual, ya que no sólo actúa como un mediador de muerte celular, sino que también induce proliferación hepatocitaria y regeneración hepática<sup>62</sup>. Después de la I-R hepática, las células de Kupffer ganarían ERO, las que a su vez activarían la Jun N- Terminal Kinase (JNK) y aumentaría la secreción de varias quimioquinas y citoquinas incluyendo el TNF- $\alpha$ .

Este a su vez activa los receptores de TNF de los hepatocitos para inducir a la JNK y a las cinasas de I k B y la producción de más ERO. Mientras que las ERO y la JNK producen la muerte celular de los hepatocitos, la activación de las cinasas de I k B favorecen la infiltración leucocitaria del hígado<sup>63</sup>.

Recientes estudios orientan a que la hiperproducción hepática de TNF está asociada al cambio en el flujo sanguíneo a través del lecho vascular, más que a la isquemia o a la reperfusión en sí mismas. Además, este incremento en el TNF- $\alpha$  se ha visto asociado a una mejora transitoria en la función hepática e indicaría que la disfunción hepática secundaria a la reperfusión se debería a mecanismos moleculares alternativos, probablemente la generación de ERO<sup>64</sup>. Por tanto, a pesar de la abundancia de resultados experimentales al respecto, el verdadero papel del TNF- $\alpha$  en la lesión hepática por I-R permanece aún por definirse.

#### **1.4.2.2.-Especies reactivas de oxígeno. El óxido nítrico:**

Aunque el O<sub>2</sub> es la molécula más importante para el mantenimiento de la vida, es también la fuente principal para la formación de radicales libres debido a su alta disponibilidad. Los radicales biológicamente relevantes son el anión superóxido, el radical hidróxilo y el óxido nítrico (NO). En condiciones normales alrededor del 1-3% del O<sub>2</sub> que se metaboliza en la mitocondria se convierte en anión superóxido.

Otras especies son intermedias en el metabolismo de O<sub>2</sub> y del NO pero no son radicales, ya que no contienen electrones desapareados. Estas especies intermedias junto con los radicales libres se denominan, respectivamente, ERO y especies reactivas de nitrógeno (ERN).

Los ejemplos más representativos de ERO no radicales son el peróxido de hidrógeno y el ácido hipocloroso. En el caso de ERN, el no radical más representativo es el peroxinitrito. Las ERO y las ERN son la causa de la lesión hepática inducida por I-R, al menos en parte, con concomitante consumo de antioxidantes endógenos<sup>65</sup>.

Bajo condiciones de estrés oxidativo, la mitocondria es el principal lugar de producción de grandes cantidades de superóxido. Este estrés puede conducir, en su fase final, a la formación de poros de permeabilidad transitoria mitocondrial y provocar la rotura de la membrana mitocondrial y la muerte celular<sup>66</sup>.

El sistema Xantina-oxidasa (XO) se considera una de las mayores fuentes de generación de ERO tras lesión por I-R y es muy abundante tanto en el hígado como en el intestino. Durante la fase hipóxica de la I-R se acumula hipoxantina debido a la depleción del ATP, ya que disminuye el nivel total de energía. En un proceso paralelo, la hipoxia activa las enzimas proteolíticas que convierten a la xantinadeshidrogenasa en XO. Los crecientes niveles de XO oxidan la hipoxantina a urato una vez que se recupera el flujo sanguíneo en la fase de reperfusión. En esta reacción molecular, el O<sub>2</sub> se transforma en radicales superóxidos<sup>67</sup>.

En la lesión hepática por I-R las ERO han demostrado ser una de las principales causantes a través de las siguientes acciones: El aumento de la expresión de genes proinflamatorios (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-8 o moléculas de adhesión celular); la inducción de los factores de transcripción (factor nuclear Kappa-B y activador de la proteína -1); la lesión celular directa mediante oxidación y degradación proteica; la inducción directa y regulación de la muerte celular, tanto apoptótica como necrótica; la inactivación de antiproteasas; la inducción de genes protectores del estrés en los hepatocitos; y la formación de mediadores implicados en la regulación del flujo sanguíneo sinusoidal y de la regeneración hepática<sup>59</sup>.

El NO se forma a partir de L-arginina por la acción de la nitrógeno sintetasa (NOS). Incluye una forma inducible que se expresa principalmente bajo condiciones patológicas (iNOS) y dos constitutivas, la eNOS y la nNOS que se expresan en el endotelio y en el sistema nervioso respectivamente. El NO cumple múltiples funciones fisiológicas y patológicas como mediador intra e intercelular en procesos de inmunomodulación, neurotransmisión y regulación del tono vascular<sup>68</sup>. La inducción de iNOS puede tener tanto efectos tóxicos como protectores. Los efectos dependen del tipo de agresión, el nivel y la duración de la expresión de iNOS y la producción simultánea de anión superóxido<sup>69</sup>. En la I-R hepática la producción de iNOS comienza una hora después de la reperfusión

aumentando su actividad hasta cinco horas después. Estudios en ratas han demostrado que la inhibición de iNOS podría prevenir la lesión hepática por I-R lo que demuestra su implicación en este daño hepático, pero por otra parte hay estudios que contradicen esta afirmación considerándolo un factor beneficioso o sin efecto alguno<sup>70,71</sup>.

#### **1.4.2.3.- Cambios en la microcirculación:**

Habitualmente el flujo vascular a un órgano isquémico no se restablece completamente después de liberar una oclusión vascular. Los cambios que ocurren en la microcirculación durante la isquemia y posterior reperusión inicial del tejido provoca áreas que no se perfunden, aun después del restablecimiento del flujo al órgano, conocido como fenómeno no-reflow. Estos cambios incluyen aumento del volumen celular con protrusión al lumen de los vasos, adherencia de los leucocitos al endotelio, agregación plaquetaria, acumulación del fluido intracelular y vasoconstricción<sup>72</sup>.

El defecto en la microcirculación es el fenómeno inicial que llevará al no-reflow, con la liberación de citoquinas proinflamatorias, formación de tapones sinusoidales con neutrófilos y otras células, e inducción de un estado de estrés oxidativo. Este fenómeno parece estar mediado por la lesión del endotelio sinusoidal y desbalance entre las moléculas vasodilatadoras y vasoconstrictoras, como endotelina (ET) y NO que se producen en el proceso de I-R<sup>73</sup>.

#### **1.4.2.4.-Papel de los linfocitos en el daño hepático por isquemia-reperusión:**

Se calcula que el hígado humano contiene alrededor de  $10^{10}$  linfocitos, que se encuentran tanto dispersos entre los hepatocitos como en los tractos portales. Existe evidencia de un papel patogénico de estos linfocitos pasajeros en la lesión por reperusión tras la isquemia fría. Sin embargo, no está claro el papel de los linfocitos residentes frente a los linfocitos periféricos ni la interrelación entre estos.

En el año 1997, Zwacka describe que la fase aguda se inicia con la activación previa de los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, y que este hecho es el que pone en marcha toda la sucesión de acontecimientos que se producen en esta primera etapa lesional y que a su vez desencadena la subsiguiente fase subaguda. Describen como el estímulo de la lesión por I-R produciría la activación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> residentes en el hígado. Estos segregarían una serie de citocinas, tales como interferon gamma (INF- $\gamma$ ), factor de necrosis tumoral beta (TNF- $\beta$ ) y factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) que tanto directa como indirectamente activarían los neutrófilos para infiltrar el hígado<sup>74</sup>. El estímulo de la I-R podría activar directamente las células de Kupffer dentro del hígado, que a su vez activarían a las células T CD4<sup>+</sup> a través de las citocinas secretadas y, por tanto, existiría una activación recíproca entre las células de Kupffer y los linfocitos T CD4<sup>+</sup> durante la I-R hepática<sup>75</sup>.

Clásicamente los linfocitos T CD4<sup>+</sup> se han diferenciado funcionalmente en células Th1 (que produce INF- $\gamma$ , linfoxina y TNF- $\alpha$ ) y Th2 ( que produce IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13). Posteriormente se ha añadido a estas subpoblaciones una nueva denominada Th17, con efectos sobre la infiltración de PMN<sup>76</sup>. Esta subpoblación se ha implicado sobre todo en la defensa de superficies epiteliales frente a patógenos y desempeña presumiblemente un papel secundario en la lesión hepática por reperfusión. Existen datos que indican que un patrón inflamatorio de predominio Th1 incrementa la lesión por reperfusión, mientras que el patrón Th2 muestra un efecto protector frente a ésta; es pues el equilibrio Th1/Th2 el que determina en gran medida las consecuencias de la I-R<sup>77</sup>.

## 1.5.- PREACONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO DEL HÍGADO

El preacondicionamiento isquémico (PI) es una estrategia quirúrgica que protege a los tejidos frente a la lesión de I-R. Consiste en la aplicación de breves periodos de isquemia-reperusión antes de que el órgano sea sometido a una I-R más prolongada.

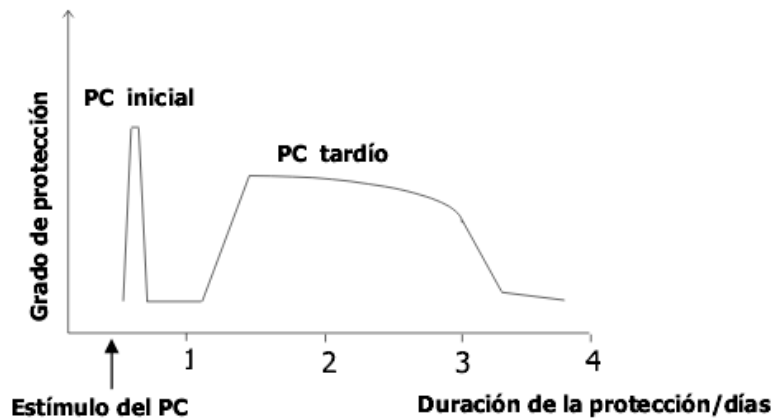
Este fenómeno fue descrito por primera vez en el corazón en 1986 por Murry<sup>78</sup>, sin embargo no fue hasta 2000 que Clavien publicó el primer estudio no aleatorizado que demostraba su efecto protector en el hígado humano<sup>79</sup>. La aplicación del PI difiere entre los distintos órganos, de modo que el efecto protector se consigue tras la aplicación de diferentes ciclos de I-R. De este modo, mientras que en el corazón se aplican varios ciclos de I-R, el efecto protector del PI en el hígado se consigue mediante la aplicación de un único ciclo de 10 minutos de isquemia seguido de 10 minutos de reperusión, sin que la adición de nuevos periodos proporcione más protección<sup>80</sup>.

### 1.5.1.- Etapas de protección del preacondicionamiento isquémico:

El PI ofrece dos tipos de protección, que difieren en el tiempo al que tienen lugar y en los mecanismos responsables de la protección. Por esta razón, distinguimos entre fase inicial y tardía (Fig. 11).

**Fase inicial:** Tiene lugar minutos después de la reperusión y se prolonga 2-3 horas. Los efectos beneficiosos de esta fase del PI son independientes de la síntesis de nuevas proteínas y son mucho más potentes que los de la fase tardía.

**Fase tardía:** Comienza tras 12-24 horas del inicio de la reperfusión, se prolonga 2-3 días y sus efectos beneficiosos son dependientes de la modulación de la expresión de genes y la síntesis de nuevas proteínas. Pese a que en el hígado el comportamiento es similar, la ventana de protección tardía no está completamente definida<sup>81</sup>.



**Figura 11. Protección bifásica inducida por el PI.**

### 1.5.2.- Mecanismos moleculares del precondicionamiento isquémico.

Se postula que se trataría de una secuencia de acontecimientos en la que una señal desencadenaría un mensaje intracelular y la posterior amplificación de los mecanismos encaminados a la protección. En el eje de esta secuencia aparecería el NO y la adenosina como moléculas fundamentales para luego promover la activación de múltiples señales celulares.

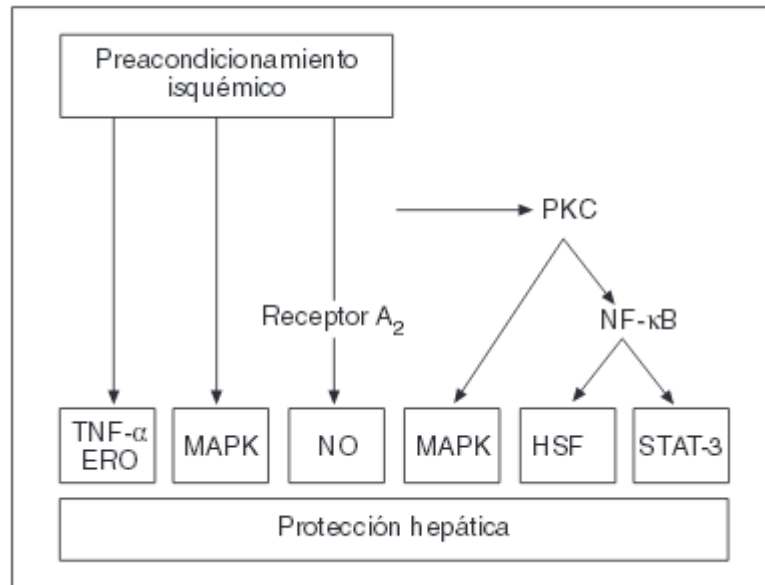
***Papel del óxido nítrico:*** Los trastornos de la microcirculación y la ausencia de perfusión sinusoidal son dos hechos bien documentados que contribuyen a la lesión por IR, el factor determinante de esto es la liberación de potentes sustancias vasoconstrictoras, entre las que destacan las endotelinas<sup>82</sup>. A los pocos minutos de realizar el PI en el hígado, se libera adenosina al espacio extracelular. La adenosina activa la forma constitutiva endotelial de la enzima (eNOS) y aparece el NO, tanto en situaciones de isquemia normotérmica como de hipotermia relacionada con el trasplante hepático. En esta situación se ha comprobado una mejoría en la oxigenación tisular y en la microcirculación del hígado. Por otra parte, el PI también se ha mostrado eficaz para inhibir la producción de las endotelinas, hecho que también ayuda a la mejoría de la microcirculación<sup>83, 84</sup>.

***Papel de la adenosina:*** La generación de NO en el PI se produce por la liberación de adenosina. Se sabe que esta adenosina activa sólo los receptores de adenosina A<sub>2</sub>. Este hecho se puso de manifiesto cuando se demostró que los efectos protectores del PI desaparecían al administrar antagonistas selectivos de los receptores de adenosina A<sub>2</sub> mientras se mantenían cuando se administraban antagonistas de los receptores de adenosina A<sub>1</sub><sup>83</sup>. La ventana de efectividad del PI está determinada por dos factores: una concentración de adenosina lo suficientemente grande para inducir la generación de NO mediante la activación de los receptores de adenosina A<sub>2</sub>, junto con una baja concentración de xantina para evitar sus efectos perjudiciales<sup>85</sup>.

***Vías de señalización molecular:*** La activación de los receptores de adenosina A<sub>2</sub> estimula la actividad de varias cinasas intracelulares, tales como la proteinquinasa C (PKC), la proteincinasa de activación mitogénica (MAPK) y su variante MAPK p38. Este hecho se ha demostrado en modelos de PI hepático y se ha podido establecer que de su activación depende la fosforilación de moléculas efectoras como la tirosincinasa y las MAPK



(Fig.12). Todo ello conlleva un aumento de la tolerancia de los hepatocitos y las células endoteliales a la lesión isquémica<sup>86</sup>.



**Figura 12. Vías de señalización por las que el PI confiere protección contra la lesión por I-R hepática.**

Tras la activación de la PKC, se puede inducir otros factores de transcripción, como el factor de necrosis kappa beta, que serían la causa principal de los efectos protectores de la fase tardía del PI. Estos factores de transcripción modulan la expresión de determinados genes y dan lugar a la síntesis de proteínas como las proteínas de shock térmico (HSP) que se han propuesto como causa del efecto protector del PI<sup>87</sup>. En el hígado, el PI se asocia a la síntesis de varias formas inducibles de HSP, esta inducción reduce la unión nuclear de factores de transcripción proinflamatorios e incrementa la capacidad antioxidante de las células. De este modo se contribuye a la disminución de la formación de FNT-α y la atenuación de la respuesta inflamatoria en los hígados precondicionados. También se ha propuesto que el PI podría

disminuir la transcripción de genes, como los c-fos y c-jun, implicados en el desarrollo de la lesión por isquemia-reperfusión (LIR) hepática. Además de todas estas vías de señalización celular, algunos trabajos indican que el PI puede inducir la liberación de una pequeña cantidad de ERO y de TNF- $\alpha$  que también podrían contribuir a su efecto protector<sup>81, 87</sup>.

***Influencia del estrés oxidativo:*** El PI es una estrategia muy efectiva para prevenir el estrés oxidativo que la LIR conlleva. Su acción incide en el sistema xantina-oxidasa (XOD)/xantina-deshidrogenasa (XDH), que es, sin duda, la fuente principal de ERO que se generan en el proceso de isquemia-reperfusión hepática. Así pues, por una parte limita la acumulación de xantina y, por otra, reduce la conversión de la XDH a XOD durante la isquemia<sup>88</sup>. También se ha propuesto que el PI ejerce una acción protectora adicional preservando el estado redox mitocondrial<sup>89</sup>.

***Preservación del metabolismo energético:*** El PI preserva el metabolismo energético durante la isquemia reduciendo el consumo de ATP y la acumulación de lactato. Este efecto está mediado por un aumento de la actividad de la MAPK que ocurre durante el PI y es independiente del NO<sup>90</sup>.

***Protección tardía en órganos extrahepáticos:*** Los beneficios del PI no se limitan sólo al hígado, ya que se ha demostrado que también reduce la lesión por IR en órganos extrahepáticos como el pulmón. Esta protección se debe a que el NO producido durante el periodo del PI inhibe la producción, a partir de las células de Kuffer, del TNF $\alpha$ . Ello conlleva una disminución de la concentración de esta citocina proinflamatoria en el torrente sanguíneo y una menor inflamación pulmonar, que conlleva una reducción de la expresión de P-selectina y de la adhesión e infiltración de neutrófilos<sup>83, 91</sup>. En el efecto

protector de PI en los pulmones también se debe tener en cuenta la modulación que se ejerce en el sistema xantina/ SOD al prevenir la generación de ERO.

***Implicación en la regeneración hepática:*** El PI también presenta un efecto promotor de la regeneración hepática tras la resección o el trasplante a través de la regulación al alza de citocinas tales como TNF $\alpha$  e IL 6, varias proteínas de choque térmico y la regulación a la baja de TGF- $\beta$ <sup>92</sup>.

### **1.5.3.- Implicaciones clínicas del preconditionamiento isquémico.**

Los traumatismos, el trasplante y la resección hepática pueden dar lugar a una privación prolongada de oxígeno al tejido con la conversión del metabolismo celular a vías anaeróbicas. La reperfusión y en consecuencia la restauración de entrega de oxígeno conduce a la lesión hepática. El primer intento clínico para minimizar la lesión isquémica durante la resección hepática se llevó a cabo mediante la interrupción de largos intervalos de isquemia con periodos cortos de reperfusión descrita por Makuuchi en 1987<sup>92</sup>. A Clavien y col. les cabe el honor de ser los primeros autores que demostraron la utilidad del PI en una serie de 24 pacientes sometidos a hepatectomía<sup>79</sup>. En los pacientes a los que se les aplicó el PI (10 minutos de isquemia, seguidos de 10 minutos de reperfusión) antes de la oclusión hepática, se observó una disminución significativa de la concentración plasmática de ALT en comparación con el grupo de pacientes no preconditionados. También se observó una marcada reducción de la muerte celular por apoptosis de las células endoteliales hepáticas. Tres años más tarde, en 2003, ese mismo grupo de investigación realizó un estudio más extenso que confirmó que la protección inducida por el PI fue mayor en pacientes con edad menor de 60 años y en hígados que presentaban una esteatosis superior al 25%. Otros trabajos posteriores han confirmado la utilidad del PI en las resecciones hepáticas<sup>93</sup>. Chouker y col. han puesto de manifiesto que, en las condiciones empleadas con Clavien y col, el PI mejora además la estabilidad hemodinámica tras la

reperfusión. Esos mismos autores, en otro estudio, han demostrado que el PI reduce la activación de neutrófilos asociada a la maniobra de Pringle. Los beneficios del PI también se conservan cuando son precisos tiempos de isquemia prolongados (superiores a 30 minutos) o cuando se aplica en hígados cirróticos.

En el ámbito del trasplante los trabajos también apuntan en un sentido positivo. Azoulay y col. en un estudio con algunas limitaciones, concluye que el PI aumenta la tolerancia del injerto a la isquemia, aunque tiene efectos adversos en la recuperación de la función hepática (fallo primario del injerto)<sup>94</sup>. El estudio de Jassem y col. y posteriormente de Franchello y col. concluyen que en el trasplante el PI es una técnica eficaz en la reducción del daño hepatocelular<sup>95</sup>.

El hígado es el único órgano capaz de regenerarse y conseguir una función hepática similar a la inicial después de una resección, que en la mayoría de las ocasiones se realiza en condiciones de isquemia-reperfusión. Esta regeneración hepática está controlada por una compleja interrelación del metabolismo celular, las citocinas y los factores de crecimiento, elementos todos ellos modulados por el PI. Así existen trabajos como el de Gómez y col en 2007 que demuestran este beneficio del PI para la regeneración hepática<sup>92</sup>.

Los datos experimentales y la experiencia clínica inicial hacen suponer que el PI es una estrategia útil para mejorar la tolerancia del hígado a la LIR. Sin embargo las revisiones sistemáticas publicadas hasta la fecha concluyen que en la actualidad no existen suficientes pruebas para sugerir un efecto protector del PI, y no observan diferencias al compararlo con un clampaje intermitente, recomendando este segundo en pacientes mayores de 65 años<sup>92,96</sup>.

## **1.6.- DEL HÍGADO AL HEPATOCITO.**

El hígado además de ser un órgano con una capacidad de regeneración altísima, participa en una amplia gama de funciones tales como la detoxificación de fármacos, el metabolismo de lípidos y carbohidratos, la síntesis proteica o la homeostasis. Por ello el modelo “in vitro” de cultivo de hepatocitos representa un sistema muy útil en la investigación tanto de las funciones hepáticas básicas como de sus distintas áreas de aplicación. Aunque el cultivo “in vitro” de hepatocitos es el modelo más cercano al hígado “in vivo”, presenta ciertos inconvenientes: los hepatocitos son fenotípicamente inestables; tienen una vida limitada; existe una gran variabilidad interdonador cuando el origen es humano; etc. A pesar de ello su desarrollo ha tenido una contribución sustancial a la comprensión de la biología, bioquímica y fisiología del hígado normal y enfermo, así como en diversas aplicaciones tales como el metabolismo de los xenobióticos, la toxicología, la virología, la parasitología y la terapia celular.

En estos últimos 40 años se han realizado múltiples ensayos con hepatocitos aislados de hígados humanos y de diferentes especies animales que tratan de aclarar las funciones del hepatocito y sus aplicaciones en diversos campos. Los artículos y libros publicados hasta la fecha ya han cubierto muchos de estos temas, sin embargo se siguen realizando estudios para el progreso y la mejora del aislamiento, cultivo, caracterización, criopreservación y aplicación de esta célula.

### **1.6.1.- Aplicaciones del cultivo de hepatocitos**

Los hepatocitos en un medio de cultivo, con unas condiciones químicas definidas, expresan la mayoría de las funciones bioquímicas típicas hepáticas. Estas características han permitido el uso de estas células en múltiples aplicaciones, entre las que se encuentran:

**1.6.1.1.- Estudio de la hepatogénesis:**

Durante los últimos 15 años los hepatocitos aislados han sido ampliamente utilizados para el estudio de la regulación de los genes específicos del hígado. Los cultivos primarios han sido muy útiles para la comprensión de la función específica de estos genes, así como del papel que los factores ambientales tienen en su regulación. Así, se han identificado varias familias de factores de transcripción que regulan la expresión de estos genes, entre ellas destacan: aquellas que contienen homeodominio como el Factor nuclear hepático (HNF)1 $\alpha$  y el HNF1 $\beta$ , implicados en la síntesis y almacenamiento de carbohidratos y lípidos, en la desintoxicación y en la síntesis de proteínas del suero entre otras<sup>97</sup>; familia de proteínas de hélice-bucle-hélice entre las que se encuentran HNF 3  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\Omega$  también llamados FOX A 1,2y3; miembros de la familia de receptores nucleares (HNF4, COUP-TFII, LRH1, FXR $\alpha$  y PXR) implicados por ejemplo en la diferenciación funcional de los hepatocitos, la formación del epitelio polarizado hepático y en los contactos célula-célula<sup>98</sup>; la familia de factores C/EBP, que contiene el dominio de cremallera de leucina; y la proteína de homeodominio HNF6<sup>98, 100</sup>.

**1.6.1.2.- Estudio de la expresión y regulación de las funciones hepáticas:**

Los modelos “in vitro” con células hepáticas han proporcionado condiciones experimentales óptimas para el estudio de las funciones hepáticas. La mayoría de ellos obtienen su beneficio a partir del desarrollo de nuevas tecnologías tales como el silenciamiento del ARN o el diseño de modelos “in vitro” de patologías hepáticas.

El análisis del comportamiento del hepatocito en cultivo, ha permitido encontrar una fuerte correlación entre los niveles altos de expresión de proteínas muy específicas como la enzima aldolasa B en la vía de la glicólisis, la transferrina en la actividad de la síntesis de proteínas y la CYP3A4 en la

función de desintoxicación, definiendo así una firma genómica característica en el proceso de diferenciación hepática<sup>101</sup>.

A partir de los modelos “in vitro” se ha demostrado la regulación del metabolismo hepático por la insulina a través del mediador SREBP1c<sup>102</sup>. También han sido utilizados en la comprensión del papel de los principales receptores nucleares sobre la regulación de diversas funciones fisiológicas. Funciones que se pueden alterar en gran medida después de la activación de estos receptores por diversos xenobióticos y moléculas endógenas<sup>103</sup>. Estos receptores, particularmente Ahr, PXR y CAR, son ahora reconocidos como el control de vías que regulan el metabolismo lipídico, la inflamación, y la homeostasis de la glucosa, los ácidos biliares, las hormonas y las vitaminas.

Otra aplicación principal de las células hepáticas son los modelos in vitro de sepsis creados para el tratamiento con citoquinas proinflamatorias. Así, se han utilizado para demostrar los efectos directos de citoquinas en el metabolismo del glucógeno y evaluar los efectos de varias catecolaminas que se utilizan para tratar a los pacientes de sepsis<sup>104, 105</sup>. Los avances más recientes se basan principalmente en la identificación de mecanismos de regulación de las vías metabólicas por hormonas, medicamentos o por otros productos químicos endógenos.

#### **1.6.1.3.- Estudios de la toxicidad y metabolismo de los fármacos:**

Los hepatocitos “in vitro” son el modelo que mejor refleja el metabolismo de los fármacos si lo comparamos con el hígado “in vivo”. No existen diferencias en cuanto al metabolismo de determinados fármacos al comparar los hepatocitos “in vitro” y la función hepática “in vivo” del mismo paciente.

Al igual que sucede en el hígado “in vivo”, existe gran variedad interindividual en las actividades del citocromo P450 hepático (CYP) de los hepatocitos aislados. A pesar de ello, se ha constatado que los hepatocitos humanos reproducen los procesos llevados a cabo por las isoenzimas CYP hepáticos y

además expresan enzimas de conjugación (fase 2) similares al hígado humano<sup>106</sup>.

Una de las formas más habituales para evaluar el grado de conservación de la capacidad biotransformadora de xenobióticos de los hepatocitos es determinar su capacidad oxidativa, mediante la medición de la actividad de 7-etoxicumarina o-deetilasa (ECOD), que es una isoenzima representativa de la actividad de varias isoenzimas del P450, y la testosterona-6- $\beta$  hidroxilasa, que representa la actividad del isoenzima CYP3A4 (la enzima CYP más abundante en el hígado humano). Por todo ello se considera que los hepatocitos humanos aislados pueden ser una buena herramienta para predecir el perfil metabólico de un fármaco en el hombre<sup>106, 107</sup>.

#### **1.6.1.4.- Estudios de la producción y secreción de bilis**

La formación de bilis desempeña un papel central en la digestión y la eliminación de numerosos compuestos endógenos y exógenos.

El cultivo primario de hepatocitos adultos retiene expresión tanto de los transportadores sinusoidales como canaliculares. Sin embargo, en ocasiones tiene una menor expresión de los mismos.

Hoy en día, los hepatocitos cultivados con la configuración de sándwich de colágeno se aceptan como la herramienta “in vitro” más potente para determinar el nivel de transporte de drogas en los hepatocitos y de la secreción de estas en la bilis<sup>108, 109</sup>.

Este modelo se ha utilizado recientemente para el análisis de las características de transporte hepatobiliar de nucleósidos, analizando las proteínas transmembrana que facilitan el transporte hidrófobo de los mismos a través de las membranas celulares. También se ha empleado en el estudio del efecto de los xenobióticos en el transporte de bilis, así se ha demostrado, entre otras cosas, que fármacos antirretrovirales como el ritonavir o saquinavir inhiben el transporte de taurocolato<sup>110, 111</sup>.



#### **1.6.1.5.- Aplicaciones en virología y parasitología.**

En los últimos 40 años se ha avanzado considerablemente en la comprensión de la biología del hepatocito y el hígado en enfermedades causadas por agentes biológicos (virus y parásitos), así como en el desarrollo de terapias frente a estas enfermedades gracias al uso intensivo de modelos de cultivo de hepatocitos humanos.

El hígado es susceptible de varios virus, esencialmente del virus de hepatitis B y C (VHB, VHC). Los cultivos de hepatocitos se han empleado ampliamente para la investigación del proceso de infección y replicación viral <sup>112</sup>.

La etapa hepática del ciclo de la vida del *Plasmodium falciparum* es un paso obligado en la infección natural de la malaria. Los esporozoitos forman una forma exo-eritrocítica que aumenta de tamaño y finalmente libera 20000-30000 merozoitos a la sangre. El aislamiento y cultivo de hepatocitos humanos se considera un valioso modelo para la investigación del desarrollo de la forma exo-eritrocítica, así como para evaluar fármacos que puedan interferir con estos procesos <sup>113, 114</sup>.

#### **1.6.1.6.- Terapia celular hepática o trasplante de hepatocitos:**

Actualmente existe un gran número de afectaciones hepáticas para las cuales el único tratamiento efectivo existente es el trasplante de órgano ortotópico. La terapia celular se considera actualmente una estrategia terapéutica de vanguardia complementaria al trasplante hepático de órgano sólido. Las ventajas objetivas que presenta el trasplante celular hepático (TCH) frente al trasplante de órgano lo convierten en una alternativa muy atractiva: La terapia celular hepática podría ir encaminada a mantener las funciones hepáticas durante el periodo puente hasta la obtención de un órgano adecuado; conseguiría la regeneración hepática en el caso de fallo hepático fulminante con la consiguiente recuperación de la función del órgano; se trata de un método poco invasivo que puede efectuarse de manera semiprogramada,

gracias al mantenimiento de las células criopreservadas; permite tratar a varios receptores a partir de un único donante; y la manipulación génica *ex vivo* seguido del trasplante autólogo haría innecesaria la terapia inmunosupresora.

Pese a que en el momento actual el THC no constituye una opción terapéutica definitiva, es aplicable a pacientes con insuficiencia hepática aguda, con intención de sustituir o servir de puente al THO y a pacientes pediátricos con errores congénitos del metabolismo en los que el enzima deficitario se expresa en el hepatocito<sup>115</sup>.

El TCH se trata de utilizar las células adultas totalmente diferenciadas (los hepatocitos) sobre la base de la capacidad del hepatocito trasplantado para desarrollar todas las funciones del hígado sano y la gran capacidad de regeneración que posee el hígado. Los hepatocitos trasplantados, tras adherirse y atravesar el endotelio del sinusoides, se disponen y proliferan a su alrededor. La integración completa en el hígado con conexiones al árbol biliar se consigue en 3-7 días, y a partir de este momento, estos hepatocitos son capaces de proliferar.

Básicamente la realización del TCH consta de tres fases: el aislamiento de los hepatocitos de los hígados rechazados para trasplante de órgano sólido, la preparación de las suspensiones celulares y el implante del mismo en el receptor, que se efectúa habitualmente mediante infusión en la vena porta o la arteria esplénica.

Se considera que una masa celular que representa el 5-10% de masa hepática total es capaz de restaurar la función metabólica del hígado. A pesar de que no exista un consenso formal, la mayoría de los autores sugieren que la masa de células para corregir un defecto enzimático único, es probablemente menor que la que se necesita para el tratamiento de la enfermedad crónica o la insuficiencia hepática aguda<sup>116</sup>. La cantidad de células que pueden ser trasplantadas en el hígado se ve limitada por el efecto de la hipertensión portal, sin embargo, la realización de infusiones celulares repetidas permite aumentar el número total de hepatocitos trasplantados.

En 1976 se llevo a cabo el primer TCH en animales con una metabolopatía, considerando que trasportar células capaces de aportar el enzima deficitario puede ser una forma eficaz de tratamiento<sup>117</sup>. Posteriormente, Sutherland y col. llevaron a cabo TCH en un modelo de ratas con fallo hepático agudo, demostrando que la infusión de los hepatocitos podía proporcionar un soporte metabólico que permitía la recuperación de la necrosis hepática inducida<sup>118</sup>.

Hasta 1992 y 1998 no se publicaron los primeros TCH en adultos con cirrosis hepática y en una niña de 10 años con una enfermedad de Crigler-Najjar tipo I respectivamente<sup>119, 120</sup>. Desde entonces muchas han sido las investigaciones realizadas en este campo. Las observaciones clínicas han demostrado la seguridad del procedimiento y de los pacientes sometidos a TCH, sin embargo, la mayoría de las publicaciones hacen referencia a casos clínicos sin unanimidad de criterios respecto a las indicaciones, metodología, criopreservación celular o valoración de la respuesta, por lo que los resultados no pueden considerarse concluyentes.

### **1.6.2.- Aislamiento del hepatocito**

Los intentos iniciales para aislar células parenquimatosas mediante métodos mecánicos ó utilizando agentes quelantes como el citrato o el EDTA para retirar los iones de Ca<sup>2+</sup> y K<sup>+</sup>, que consolidan las uniones intercelulares, y diferentes enzimas como tripsina, lisozima y pepsina, resultaron poco acertados al obtener muy bajos niveles de rendimiento, viabilidad y funcionalidad celular.

La introducción de las enzimas colagenasa e hialuronidasa consiguió un gran avance en la preparación de hepatocitos intactos de rata adulta. En 1969, Berry y Friend<sup>121</sup> establecieron una técnica de perfusión de hígado de rata “in situ” con una disolución de colagenasa que permitía obtener un alto rendimiento de hepatocitos viables. Posteriormente Seglen en 1972<sup>122</sup> modificó la técnica al desarrollar un proceso en dos etapas: La primera definida como pre-perfusión, utilizaba una disolución tampón sin

Ca<sup>2+</sup> que facilitaba la ruptura de los complejos de unión intercelulares. La segunda etapa de perfusión con una disolución de colagenasa en un tampón suplementado con Ca<sup>2+</sup>, necesario para activar a la enzima que digiere la matriz de colágeno del tejido hepático, facilitaba la separación de los hepatocitos. Esta técnica de perfusión adaptada al tejido hepático humano ha permitido el desarrollo de sistemas de cultivo de hepatocito que ofrecen modelos “in vitro” muy útiles para diferentes investigaciones. Así, tan sólo un año después Bissell y col. describieron el cultivo de hepatocitos en ratas<sup>123</sup>, y serían Gugen-Guillouzo y col. en 1982 los primeros en llevar a cabo el cultivo de hepatocitos empleando hígado de humano adulto<sup>124</sup>.

Actualmente la perfusión enzimática con colagenasa sigue siendo el método elegido en el aislamiento de hepatocito, permitiendo obtener hepatocitos adultos viables funcionalmente activos.

Tras el aislamiento, los hepatocitos se cultivan en condiciones químicamente definidas. El hepatocito diferenciado no prolifera “in vitro”, por tanto, los cultivos celulares han de ser preparados cada vez a partir de tejido hepático. Tras el aislamiento se obtienen gran cantidad de células viables y no todas ellas van a ser utilizadas en ese momento, por ello, el mejor método para mantener y almacenar por un largo período de tiempo dichas células es la criopreservación<sup>125, 126</sup>.

Los hepatocitos pueden ser criopreservados y posteriormente cultivados, manteniendo características ultraestructurales y funcionales muy similares a las de las células recién aisladas<sup>127</sup>. Mantenidos a -4° conservan su viabilidad durante 24 horas, y congelados a -20°C, -80°C ó -196°C mantienen su viabilidad durante períodos prolongados de tiempo. Durante la primera semana, la viabilidad de los hepatocitos es independiente de la temperatura de congelación. Un mes después sólo son viables las células congeladas a -196°C<sup>128</sup>.

La criopreservación permite tener un banco de células, y proporciona flexibilidad a la hora del momento de la realización del TCH, además de ofrecer otras ventajas como son la posibilidad de poder realizar tests microbiológicos exhaustivos y controles de calidad del hepatocito. Frente a esto, el hepatocito aislado fresco presenta generalmente una mayor viabilidad y se injerta mejor que el criopreservado<sup>129</sup>.

El éxito, tanto de la terapia celular como de los estudios de metabolismo y toxicidad de fármacos, está condicionado por la disponibilidad de células hepáticas viables y funcionales en número y calidad funcional suficiente.

**1.6.2.1.- Fuentes de hepatocitos:** Lo ideal sería disponer de hepatocitos capaces de proliferar en cultivo, pero que conservasen al mismo tiempo la expresión de funciones diferenciadas del hepatocito de forma estable y prolongada. Solamente así podría constituir una fuente inagotable de células. Sin embargo, hoy por hoy, todavía no se ha conseguido inducir la proliferación de los hepatocitos humanos adultos en cultivo.

Actualmente los hepatocitos que vamos a emplear tanto para el trasplante como para el resto de aplicaciones, se obtienen a partir de órganos descartados para trasplante (por arteriosclerosis, esteatosis, trauma hepático, fibrosis hepática o isquemia prolongada), del tejido hepático resultante de los procedimientos de reducción hepática o biparticiones para trasplante infantil, de resecciones hepáticas por diversas patologías, de biopsias tomadas durante intervenciones quirúrgicas o de donantes en asistolia con menos de 40 minutos de isquemia caliente<sup>115,129</sup>.

El aumento de demanda de hepatocitos ha motivado el desarrollo de nuevos modelos que puedan constituir una alternativa a los hepatocitos humanos, mediante diferentes aproximaciones experimentales. Se ha contemplado el uso de **líneas celulares derivadas de los hepatoblastomas naturales**, como las células HepG2. Sin embargo, aunque su disponibilidad es ilimitada, su aplicación en la clínica es muy escasa, no sólo por su condición tumoral, sino por el hecho de la alteración de su fenotipo con la pérdida de funciones hepáticas clave, lo que las incapacita para devolver al hígado su funcionalidad hepática normal<sup>130, 131</sup>. La **inmortalización de los hepatocitos** humanos es otra opción que se ha abordado utilizando distintas estrategias. Los procedimientos usados con mayor frecuencia son la transfección de los hepatocitos con vectores de expresión que contienen el antígeno SV40 LT y el hTERT<sup>132, 133</sup>

(subunidad activa de las telomerasas humanas). Sin embargo, a pesar de los avances las células no manifiestan todos los rasgos fenotípicos deseables y presentan el riesgo de generar tumores, por lo que no constituyen una alternativa real a los hepatocitos maduros. Otra posibilidad, no exenta de dificultades, es la utilización de **hepatocitos de otras especies** para xenotrasplante celular, lo que obviaría el obstáculo de la falta de hepatocitos humanos. A pesar de las limitaciones que presenta por el riesgo de transmisión de zoonosis y la inmunogenicidad, existen estudios en modelos animales que han demostrado que el xenotrasplante de hepatocitos puede corregir el fallo hepático y prolongar la supervivencia con una inmunosupresión adecuada<sup>134, 135</sup>.

Se han utilizado también **hepatocitos fetales** y células troncales fetales en modelos animales con insuficiencia hepática o enfermedades metabólicas, pero no se ha demostrado todavía si estas células son capaces de restaurar la función hepática normal<sup>136</sup>. Otra estrategia empleada consiste en la utilización de las **llamadas células ovas del hígado y de las células hepáticas troncales**, que parecen tener la capacidad de proliferar y diferenciarse en hepatocitos maduros. No obstante, por el momento no existe una forma eficiente para purificarlas y conseguir un número suficiente de ellas, para que puedan sustituir a los hepatocitos maduros<sup>137</sup>.

Finalmente, despierta gran interés las investigaciones realizadas en los últimos años sobre la obtención de **hepatocitos derivados de progenitoras pluripotentes**, procedentes de células madre embrionarias humanas (hES), células madre pluripotentes inducidas (IPS) y células madre de origen mesenquimal (MSC)<sup>138-140</sup>.

Las hES son células que derivan del embrión en el estadio de blastocisto. Son capaces de crecer indefinidamente “in vitro” y mantener su pluripotencialidad, pudiéndose diferenciar a todos los tipos celulares. Sin embargo, las hES plantean problemas éticos y legales que imposibilitan su uso actual. Por su parte las IPS son células somáticas reprogramadas a células pluripotenciales, que pueden ser diferenciadas como las hES hacia hepatocitos. Constituyen una

opción terapéutica muy prometedora y en combinación con la terapia génica podrían ser de gran utilidad. Sin embargo, los problemas de seguridad cuestionan su uso, planteando críticas en especial por el riesgo de neoplasia e inmunogenicidad. Por último la obtención de las MSC procedentes de tejido adiposo o médula ósea, es sencilla y no presenta problemas de tipo ético o inmunorreactivo, ya que se trata de tejido autógeno. El tejido adiposo es rico en este tipo de células y su obtención es más fácil que desde la médula ósea, sin embargo, la necesidad de manipulación para obtenerlas las convierte en la categoría de medicamento, siendo complejo su empleo. Hasta hoy en ninguna de ellas se ha conseguido alcanzar el fenotipo completo de la célula hepática por lo que no es posible su uso en la práctica clínica<sup>138-140</sup>.

Ante la escasez de órganos y de células para el trasplante o los estudios “in vitro”, se necesita que las células obtenidas sean viables y posean un mejor rendimiento y calidad funcional. Por ello es importante tanto la realización metódica del proceso de aislamiento como un buen conocimiento de los factores tanto externos como del propio órgano que pueden contribuir a la calidad del aislamiento.

**1.6.2.2.- Factores que influyen en la viabilidad del hepatocito “in vitro”:** El aumento de la demanda de hepatocitos aislados para sus diferentes aplicaciones, sumado a las limitadas fuentes existentes para su utilización, hacen que sea imprescindible un buen conocimiento de los factores dependientes, tanto del donante como del proceso de aislamiento que influyen en el número y funcionalidad de las células aisladas, con el fin de maximizar la disponibilidad de los hepatocitos.

Hasta la fecha disponemos de un escaso número de publicaciones. Además son trabajos heterogéneos y con un número limitado de aislamientos, lo que nos aporta unos indicios sobre las características ideales sin poder extraer conclusiones definitivas.

### 1.6.2.2.1.- Factores dependientes del donante:

- **Donante cadáver:** Existen pocos trabajos que comparen la viabilidad del aislamiento entre hígados tomados de paciente vivo y donante cadáver. En el trabajo de Lloyd y col.<sup>141</sup> muestran mejores resultados en donantes vivos, sin resultados significativos, siendo la tesis publicada en Valencia por la Dra. Martínez la única que muestra resultados significativos en este punto, mostrando un descenso de la viabilidad y el rendimiento celular al emplear donante cadáver<sup>142</sup>.
- **Edad del donante:** Aunque parece que puede existir una influencia negativa de la edad en la calidad del aislamiento, no existen datos concluyentes. Mientras algunos autores muestran en sus resultados que los donantes mayores de 60 años presentan menos viabilidad<sup>143</sup>, otros tienen que ascender esta edad hasta los 80 para obtener un descenso significativo en el rendimiento y la viabilidad celular<sup>144</sup>. Además existen estudios como el de Richert y col. que no consideran la edad del donante un factor significativo en la calidad del cultivo celular<sup>145</sup>.
- **Esteatosis hepática:** La mayoría de autores concluyen sus estudios considerando a la esteatosis hepática un factor negativo en el éxito del aislamiento de hepatocitos. En cuanto al grado de esteatosis, el equipo de Bhogal y col<sup>143</sup> refiere que los pacientes con un nivel de esteatosis leve tienen una mayor tasa de éxito de aislamiento, que aquellos con un nivel de esteatosis moderada-severa (70% vs 20%).



Los hepatocitos esteatósicos tienen mayores niveles de EROS intracelulares y son por tanto potencialmente más susceptibles a los daños. El trabajo de Sagias y col.<sup>146</sup> sugiere que la adición de N-acetilcisteína durante la perfusión de las soluciones de digestión, puede mejorar el rendimiento celular en el aislamiento de hepatocitos de hígados esteatósicos.

- **Fibrosis hepática:** La fibrosis se desarrolla en respuesta a muchos tipos de enfermedades hepáticas crónicas. Está estrechamente vinculada con la inflamación y la muerte celular, por lo que no es de extrañar que los hepatocitos aislados de hígados fibróticos tengan una viabilidad significativamente menor. Entre otros, el estudio de Serene et al. encontró una disminución significativa del rendimiento y viabilidad del aislamiento en aquellos hígados que presentaban fibrosis septal<sup>147</sup>.
- **Patología de base:** El origen de malignidad o benignidad de la patología que obliga a realizar la resección hepática, es otro de los factores que puede influir en la calidad del aislamiento y cultivo de los hepatocitos. Así grupos como el de Vondran y col. afirman que los hepatocitos aislados de donantes intervenidos por patología benigna, presentan mayor viabilidad y rendimiento que aquellos donantes que son intervenidos por una patología de origen oncológico<sup>142-151</sup>.

Todo esto tiene una explicación lógica. En hígados con patología benigna, el parénquima hepático circundante no afectado conserva su función normal y por ello será de alto valor para el aislamiento de hepatocitos. Sin embargo, en los tumores malignos primarios como el hepatocarcinoma o el

colangiocarcinoma, la inflamación crónica, la cirrosis y un complejo patrón de estímulos como el producido por citoquinas o factores de crecimiento producen una alteración en todo el parénquima hepático, disminuyendo la calidad del tejido para el cultivo celular. El tejido hepático circundante a tumores secundarios a menudo no presenta cambios, lo que resulta en un aumento del rendimiento celular en comparación con los tumores primarios<sup>151-152</sup>.

- **Parámetros analíticos:** Entre las múltiples variables analíticas estudiadas por los diferentes grupos de trabajo, quizás los más analizados y los que en más ocasiones han mostrado una influencia en la calidad del aislamiento son los niveles de bilirrubina y la actividad de las enzimas GOT y GGT en el suero.

Los niveles elevados de bilirrubina y GGT son indicadores conocidos de la lesión de hepatocitos. Los estudios “in vitro” han demostrado que niveles altos en el donante de ambos compuestos disminuyen la viabilidad de los hepatocitos aislados<sup>147, 148</sup>.

El aumento de la actividad de GOT provoca una disminución significativa del rendimiento celular. Esto podría ser debido a que los niveles altos de GOT se consideran un marcador de diagnóstico para una serie de enfermedades, que pueden afectar a la microcirculación o al aumento de los depósitos de colágeno, tales como la enfermedad alcohólica avanzada u otras enfermedades hepáticas crónicas con fibrosis significativa<sup>147-149</sup>.

La creatinina, la urea, la glucemia, el nivel de hemoglobina, la actividad de protombina o el índice de Quick son otras de las variables analíticas que han mostrado influencia en la viabilidad

y el rendimiento del cultivo de hepatocitos. Sin embargo, los datos publicados sobre ellas son escasos y heterogéneos por lo que no podemos extraer conclusiones significativas<sup>142</sup>.

**Tratamiento quimioterápico:** En este punto existen resultados contradictorios entre los diferentes estudios. Así, en el trabajo de Hewes y col.<sup>150</sup> no encontraron que la quimioterapia anterior afectase en el rendimiento medio del aislamiento de los hepatocitos humanos. Por el contrario, el estudio de Lee y col. entre otros, muestra un incremento significativo en el rendimiento celular en los que no fueron tratados previamente con quimioterapia<sup>147</sup>. Las diferencias pueden ser debidas a la generalización de las terapias quimioterápicas, sin tener en cuenta el tipo específico de tratamiento que ha llevado cada paciente.

#### **1.6.2.2.2.- Factores dependientes de la intervención y la toma de la muestra.**

- **Tiempos de isquemia:** El tejido hepático puede ser sometido a dos tipos de procesos de isquemia: Isquemia caliente que se considera aquella que se produce durante la intervención quirúrgica, al realizar el clampaje del pedículo portal, evitando así una excesiva pérdida sanguínea, e Isquemia fría que es la que se produce desde el momento de extracción de la pieza hasta el inicio del cultivo.

**Isquemia caliente:** la influencia de ésta en la viabilidad y el rendimiento del aislamiento ha mostrado resultados heterogéneos en los diferentes trabajos. En 2002 Alexandre y

col.<sup>153</sup> demostraron un menor rendimiento del aislamiento en tejido hepático de donantes sometidos a clampaje, independientemente de si éste había sido continuo o intermitente. Además detectaron un descenso en el rendimiento cuando el tiempo de isquemia era superior a 30 minutos. En 2004, Richert y col.<sup>145</sup> sólo encontraron un descenso en el rendimiento cuando se realizaba un clampaje intermitente de acuerdo a la técnica francesa (7-40 minutos *on*, 5-15 minutos *off*), sin encontrar ese descenso cuando se empleaba clampaje continuo o intermitente de acuerdo a la técnica del Reino Unido (10 minutos *on*, 5 minutos *off*). En el 2010 Kawahara y col.<sup>154</sup> demostraron mediante análisis multivariante la influencia negativa de la isquemia caliente en la viabilidad celular tras el aislamiento. Por contra, trabajos como el de Lloyd y col.<sup>141</sup> no demuestran dicha influencia.

**Isquemia fría:** Parece lógico que el tiempo de isquemia fría sea un factor que produzca una disminución significativa tanto en la viabilidad como en el rendimiento celular del aislamiento. Pero en este punto quizás es más importante determinar cuál es el tiempo máximo en que puede ser sometida la pieza a isquemia fría, sin que esto suponga un empeoramiento de la calidad del cultivo.

Alexandrova y col.<sup>155</sup> en 2005 comprobaron que los donantes con tiempo de isquemia fría inferiores a 10 horas presentaban mayor viabilidad en el aislamiento, por contra el descenso en la viabilidad celular tras el aislamiento era evidente en aquellos con tiempo de isquemia fría superiores a 20 horas.

El trabajo de Richert y col.<sup>145</sup> en 2004 muestra que un tiempo de isquemia fría inferior a 5 horas no influye en el rendimiento de células viables. Así, recomiendan que el tiempo transcurrido

desde la extracción de la muestra hasta la realización del aislamiento, no debe superar esas 5 horas.

- **Tamaño de la muestra:** Alexandre y col.<sup>153</sup> mostraron que el porcentaje de tejido no digerido tras el proceso de aislamiento aumentaba significativamente cuando el tamaño de la muestra hepática estaba por encima de 101 g. Posteriormente otros estudios como el de Richert y col. han comprobado un descenso en el rendimiento en aquellas piezas mayores de 150 g, recomendando el uso de biopsias con un tamaño comprendido entre 50 y 100 g<sup>145</sup>. Seguir estas recomendaciones no siempre es posible ya que las muestras recogidas de las resecciones hepáticas debe cumplir unas normas éticas para no alterar un correcto estudio anatomopatológico de la pieza, obteniendo así en muchas ocasiones muestras con tamaño inferior a 50 g.

### **1.6.3.-Valoración de la viabilidad y funcionalidad del hepatocito.**

Tras la realización del aislamiento y el cultivo de los hepatocitos, se precisan controles de calidad con el fin de obtener células en número y con funcionalidad suficiente para ser empleados en las diferentes aplicaciones. Entre estos test, quizás la determinación de la viabilidad y el recuento celular son los más empleados, aunque los test funcionales nos permiten comprobar también la calidad funcional de los mismos.

**1.6.3.1.- Viabilidad:** Su resultado se refiere al porcentaje de células vivas con respecto al número total de células aisladas.

La mayoría de los autores determinan la viabilidad mediante el test de exclusión del azul tripán<sup>147-154</sup>, que mide la integridad de la membrana celular. Las células vivas no captan el azul tripán, mientras que las células muertas son permeables al colorante y se tiñen de azul.

Se calcula el porcentaje de viabilidad mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ viabilidad celular} = \frac{\text{media n}^\circ \text{ de células vivas} \times 100}{\text{media n}^\circ \text{ total de células (vivas + muertas)}}$$

A nivel práctico, se considera que un aislamiento de hepatocitos humanos es aceptable cuando la viabilidad celular tras el aislamiento es superior al 60%. Cifras de viabilidad inferiores indican aislamientos deficientes y mala calidad de las células para ser usadas posteriormente o criopreservadas, para su uso tanto experimental como clínico. Aislamientos con viabilidades por encima del 75% se consideran de calidad.

**1.6.3.2.- Rendimiento celular:** Para valorar el rendimiento celular del aislamiento suele emplearse el mismo método que en la valoración de la viabilidad, pero en este caso no determinamos el porcentaje de células vivas, sino el número total de células vivas obtenidas por gramo de tejido.

El rendimiento se determina como:

$$\text{Número de células vivas obtenidas/ gr de tejido} \times 10^6.$$

### 1.6.3.3.- Tests de funcionalidad:

Los hepatocitos aislados conservan sus características ultraestructurales y su capacidad metabólica. Si bien la obtención de una viabilidad celular mayor del 60% se considera suficiente para considerar un aislamiento de calidad, existen criterios adicionales que nos permiten determinar las capacidades metabólicas y de adhesión del mismo. Estos nos ayudan a conseguir una estimación más real de la calidad de los hepatocitos.

Se utilizan numerosos métodos que permiten determinar la calidad en la que se encuentra el hepatocito, relacionadas con sus características específicas funcionales como es la producción de proteínas específicas de hígado, como la albúmina, la síntesis de urea, la inducción/inhibición del citocromo P-450, la síntesis de glucógeno, la síntesis de lipoproteína o la secreción de bilis. Para realizar una primera aproximación es suficiente con determinar uno o dos parámetros, dependiendo además, la elección del parámetro a estudio de los objetivos de la investigación, por ejemplo, para comprobar si se ha producido daño en la membrana celular se mide la liberación de la enzima lactato deshidrogenasa, o para valorar el daño mitocondrial se determina la producción de ATP, etc. Sin embargo, para estudios previos puede resultar suficiente analizar la producción del producto final de una ruta metabólica como puede ser la producción de urea a partir de amonio para estimar el efecto que causa un compuesto sobre los hepatocitos<sup>156</sup> o estudiar la producción de albúmina ya que éste es un producto específico del hepatocito fácil de analizar.

**Test de Adhesión:** La adhesión de los hepatocitos al sustrato de cultivo es un proceso activo que requiere la preservación de receptores de membrana y componentes de la matriz extracelular. No todos los hepatocitos aislados son capaces de unirse a la superficie de cultivo. La eficiencia de fijación se puede utilizar como un indicador de la calidad celular. Siendo este dato particularmente relevante en el trasplante de

hepatocitos, donde las células tienen que adherirse al sinusoides hepático como parte del proceso de injertación<sup>157</sup>.

Ésta se puede determinar mediante conteo directo del número total de células adheridas a placa, o bien mediante técnicas indirectas como la determinación de la proteína adherida con respecto a la proteína total sembrada<sup>125</sup>, o la determinación del porcentaje de DNA de las células adheridas con respecto al DNA de las células totales sembradas<sup>157</sup>.

***Determinación de urea:*** La urea se forma dentro del ciclo de la urea y representa el principal producto final de la desintoxicación de amoníaco del hígado. Esta función hepática es esencial para la eliminación del amoníaco generado a partir del catabolismo proteico y también para la utilización de la mayoría de los aminoácidos para la glucogénesis. Suele expresarse como nanomoles de urea por minuto y por millón de células viables<sup>157</sup>.

Su síntesis es producida exclusivamente por el hígado e involucra reacciones citosólicas y mitocondriales por lo que es un buen indicador del rendimiento hepático y del grado de preservación mitocondrial. La producción de urea por los hepatocitos en cultivo se usa en muchos estudios como marcador de funcionalidad ya que es una prueba sencilla que permite estimar el estado del hepatocito.

***Determinación de albúmina:*** La albúmina representa la proteína cuantitativamente más importante en suero y es sintetizada exclusivamente por el hígado. La producción de albúmina *in vitro* por los hepatocitos es comparable a la que se produce por el hígado humano por lo que constituye un marcador de función hepática importante. Su presencia refleja la capacidad que tiene el hígado para sintetizar proteínas, y su tasa de síntesis se ve alterada en procesos fisiológicos



como la regeneración hepática o la inflamación o por la acción de algunos fármacos<sup>162</sup>.

Los niveles de albúmina pueden indicar si los hepatocitos han sufrido algún tipo de daño durante el proceso de optimización del cultivo por lo que su cuantificación se emplea como marcador del daño celular.

Su determinación suele realizarse mediante test de ELISA con anticuerpos específicos anti-albúmina humana.

**Determinación de glucosa:** El uso de compuestos sobre el cultivo de hepatocitos también puede afectar al metabolismo de los carbohidratos por lo que la determinación de glucosa también puede servir para establecer si la capacidad funcional del hepatocito está afectada. Los hepatocitos tienen la habilidad de producir glucosa a partir de lactato, aminoácido, glicerol y otros azúcares. Este proceso requiere ATP, cuando hay xenobióticos tóxicos en el medio puede resultar dañado. En ausencia de glucógeno, la glucosa producida por las células es liberada al medio y sirve como indicador de la capacidad gluconeogénica de las células<sup>157</sup>.

**Actividad MTT:** Esta técnica fue desarrollada por Mosmann en 1983<sup>158</sup> y modificada por Francois Denizot y Rita Lang en 1986<sup>159</sup>. Se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color azul (formazan), permitiendo determinar la funcionalidad mitocondrial de las células.

Este método ha sido muy utilizado para medir supervivencia y proliferación celular. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido.

***Función del citocromo P450:*** El citocromo P 450 es el principal responsable de la biotransformación de los xenobióticos metabolizados en el hígado siendo un elemento clave en el metabolismo de fármacos por lo que el conocimiento de las enzimas responsables en el metabolismo de fármacos resulta clave para entender las variaciones existentes entre humanos<sup>160</sup>. La evaluación de la función de metabolización de fármacos, mediada por enzimas del citocromo P450 parece ser de especial interés de cara al uso clínico de los hepatocitos para trasplante, en el que los beneficiarios van a recibir gran cantidad de fármacos. El aumento del uso del cultivo de hepatocitos con este fin y la aparición de métodos de análisis menos complicados ha aumentado el empleo de este tipo de test para valorar la calidad funcional del hepatocito<sup>161</sup>.

Los hepatocitos humanos en cultivo muestran los niveles de P450 involucrados en el metabolismo de fármacos y reflejan si los hepatocitos reproducen un comportamiento normal. Su determinación resulta especialmente útil en estudios de metabolismo de fármacos sin embargo, no se suele utilizar en pruebas de screening por su mayor complejidad analítica.



## **2. JUSTIFICACIÓN**

La realización de clampajes vasculares durante la cirugía hepática es un recurso muy importante y habitual, ya que evita el sangrado masivo durante las resecciones mayores, permitiendo así realizar intervenciones con mayor seguridad.

Si bien el sangrado durante la cirugía hepática es un factor que conlleva importantes consecuencias en la morbi-mortalidad postoperatoria, la isquemia provocada por el clampaje no está exenta de complicaciones.

Las consecuencias del daño por isquemia-reperfusión, así como el tiempo y el tipo de clampaje han sido analizadas en estudios anteriores, pero en la mayoría de ellos, el daño hepático se ha evaluado únicamente mediante la determinación analítica de la funcionalidad hepática postoperatoria en los pacientes sometidos a cirugía hepática. Estos pacientes poseen múltiples factores, independientes de la isquemia, que van a afectar también la funcionalidad hepática, entre ellas el sangrado, el número de segmentos hepáticos resecados, la patología hepática previa, el tratamiento neoadyuvante con fármacos quimioterápicos o complicaciones postoperatorias como la anemia o la sepsis. Consideramos que todos estos factores han podido influir en la interpretación de los resultados obtenidos en estos estudios previos.

Por ello, en el presente trabajo se propone abordar la evaluación del daño por isquemia-reperfusión tras clampaje a través de la determinación de la viabilidad y funcionalidad de los hepatocitos aislados de la muestra hepática y cultivados “in vitro”, evitando así la influencia sobre los resultados de variables como las complicaciones postoperatorias, la anemia o el remanente hepático tras la cirugía; considerándolo un método más exacto para la valorar el efecto del clampaje en el hepatocito y, por ende, en la funcionalidad hepática.

### **3. HIPÓTESIS**

Las hipótesis para la realización del presente trabajo fueron las siguientes:

3.1.- El daño hepático por isquemia-reperfusión provoca un descenso en la viabilidad de los hepatocitos aislados de muestras de tejido hepático sometido a clampaje, así como en el rendimiento celular de dicho aislamiento (número de hepatocitos viables aislados por gramo de tejido) y en la funcionalidad hepática de los hepatocitos aislados y cultivados “in vitro”.

3.2.- El tiempo total de clampaje influye en el descenso de la viabilidad y funcionalidad de los hepatocitos aislados, así como en el rendimiento del aislamiento. A mayor tiempo de clampaje el daño sobre los hepatocitos será mayor.

3.3.- El número de clampajes influye en el descenso de la viabilidad y funcionalidad de los hepatocitos aislados, así como en el rendimiento del aislamiento. A mayor número de clampaje el daño sobre los hepatocitos será mayor.

3.4.- Las muestras de tejido sometidas a clampaje intermitente rendirán mayor número de hepatocitos y con mayor viabilidad y funcionalidad que las muestras sometidas a clampaje continuo.

3.4.- Existen otros factores dependientes de las características del donante de la muestra hepática o del procedimiento quirúrgico practicado que influyen en la viabilidad y funcionalidad de los hepatocitos aislados de dicha muestra, así como en el rendimiento celular del aislamiento e independientes de la isquemia hepática.

## **4. OBJETIVOS**



**4.1.- Objetivo Principal:**

DETERMINAR LA INLUENCIA DE LA ISQUEMIA CALIENTE PRODUCIDA EN EL HÍGADO DURANTE LAS MANIOBRAS DE CLAMPAJE VASCULAR EN LA RESECCIÓN HEPÁTICA, SOBRE LA VIABILIDAD Y FUNCIONALIDAD “IN VITRO” DE LOS HEPATOCITOS AISLADOS DEL TEJIDO RESECADO, ASÍ COMO SOBRE EL RENDIMIENTO CELULAR DE DICHO AISLAMIENTO.

**4.2.- Para alcanzar el objetivo principal, el estudio contempla la consecución de los siguientes objetivos secundarios:**

- Determinar la existencia de diferencias en la viabilidad de los hepatocitos aislados, el rendimiento celular del aislamiento y la funcionalidad hepática de los hepatocitos aislados y cultivados “in vitro” entre pacientes sometidos y no sometidos a clampaje vascular.

- Evaluar la existencia de diferencias en la viabilidad de los hepatocitos aislados, el rendimiento celular del aislamiento y la funcionalidad hepática de los hepatocitos aislados y cultivados “in vitro” entre pacientes sometidos a clampaje continuo y pacientes sometidos a clampaje intermitente.

- Determinar la influencia del tiempo total de clampaje sobre la viabilidad de los hepatocitos aislados, el rendimiento celular del aislamiento y la funcionalidad hepática de los hepatocitos aislados y cultivados “in vitro”.

- Analizar en los pacientes sometidos a clampaje, si el número de clampajes o el tiempo máximo de cada uno de ellos tiene influencia sobre la viabilidad de los hepatocitos aislados, el rendimiento celular del aislamiento y la funcionalidad hepática de los hepatocitos aislados y cultivados “in vitro”.

- Identificar otras variables asociadas tanto al paciente donante de la muestra como al procedimiento, que influyen en el resultado del aislamiento del hepatocito.

# **5. MATERIAL Y MÉTODOS**

### 5.1.- Diseño experimental del estudio.

Se realizó un estudio transversal, observacional y prospectivo, en el que se analizó el rendimiento celular del aislamiento, así como la viabilidad y funcionalidad de los hepatocitos aislados a partir de muestras de tejido hepático obtenidas de pacientes sometidos a resección hepática por diversas indicaciones, teniendo en cuenta en cada caso los tiempos de isquemia por clampaje y el número de clampajes a los que habían sido sometidos durante el procedimiento quirúrgico.

Todos los pacientes fueron intervenidos por el equipo de Cirugía hepatobiliopancreática del H.U. Miguel Servet de Zaragoza, dirigido por el Dr. Serrablo en un periodo comprendido entre Noviembre de 2008 y julio de 2013, ampliándose el periodo de recogida de datos hasta febrero de 2015. En todos ellos se realizó la misma técnica de clampaje, determinando en el protocolo quirúrgico los tiempos de isquemia en minutos.

De cada paciente se obtuvo una muestra del tejido resecado sobre la que se aislaron los hepatocitos por el método en dos pasos de digestión por colagenasa<sup>163</sup> y se determinó en los mismos la viabilidad, el rendimiento celular del aislamiento y tras su cultivo “in vitro” su funcionalidad.

Todas las muestras fueron aisladas y analizadas por el equipo de la Dra. Estela Solanas, dirigido por la Dra. Trinidad Serrano, dentro del grupo de Patología Digestiva del IIS Aragón, coordinado por el Dr. Ángel Lanás, aportando así una homogeneidad en la técnica del proceso tanto quirúrgico como de aislamiento.

Posteriormente se realizó una revisión de la historia clínica de los pacientes, completando los datos referentes a los antecedentes del donante de cada muestra.

**5.2.- Población a estudio:**

Todas las muestras estudiadas se obtuvieron de pacientes pertenecientes al Sistema Público de Sanidad, Salud de Aragón, seleccionados de forma aleatoria desde la lista de espera de la Unidad de Cirugía Hepatobiliopancreática del Hospital Universitario Miguel Servet de Zaragoza.

**5.2.1.- Criterios de inclusión:**

- Pacientes sometidos a cirugía de resección hepática
- Edad mayor o igual a 18 años
- Segmento hepático resecado de suficiente tamaño para realizar la toma de una muestra de tejido sano y libre de tumor, respetando un margen de seguridad que evitase alterar el estudio anatomopatológico de la pieza.

**5.2.2.- Criterios de exclusión:**

- Edad < 18 años
- Proceso infeccioso agudo en actividad
- Serología positiva para VHB, VHC, VIH. (El fin de excluir pacientes con VIH+ es mantener la seguridad del equipo durante el procesamiento de la muestra)
- Enfermedad hepática avanzada (Cirrosis con Child B-C).
- Negación del paciente.

**5.2.3.- Tamaño muestral:**

Se decidió incorporar al estudio todos los pacientes que cumplieran los criterios de selección durante el periodo de tiempo comprendido entre noviembre de 2008 y julio de 2013.

### 5.3.- Desarrollo del estudio:

#### 5.3.1.- Técnica quirúrgica.

El paciente se colocó en posición de decúbito supino, preparando un campo operatorio desde mamilas a pubis. En general se realizó una laparotomía subcostal derecha ampliada, su prolongación medial permite un mejor acceso a los segmentos superiores hepáticos. En algunas ocasiones se empleó la incisión en J propuesta por Makuuchi<sup>20</sup>.

Se comenzó la cirugía con una liberación hepática, realizando la sección del ligamento redondo y del ligamento suspensorio hasta la cara anterior de la vena cava inferior, abriendo el espacio celular limitado por la separación de las dos hojas del ligamento. Así queda liberado el lóbulo hepático izquierdo, se continuó con la sección de los ligamentos triangulares que permiten completar la liberación hepática.

La ecografía intraoperatoria fue el siguiente paso en la intervención, con el fin de localizar la situación exacta de las lesiones a tratar y determinar su relación con los ejes vasculares.

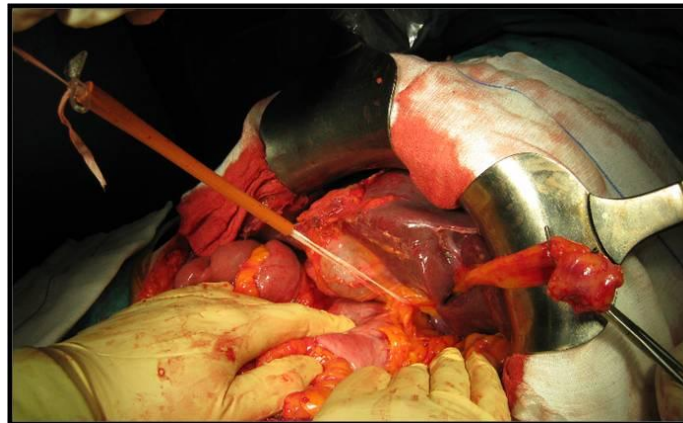
Una vez determinada la localización de las lesiones y decidido el tipo de resección que se iba a realizar se procedió a preparar los clampajes vasculares.

En todos nuestros pacientes se realizó una exclusión vascular total con preservación del flujo de la vena cava inferior por considerarla una técnica segura, bien tolerada y fácilmente reproducible.

Para ello se realizó un doble clampaje tanto del pedículo hepático con sus ramas arteriales y portales como de las venas suprahepáticas.

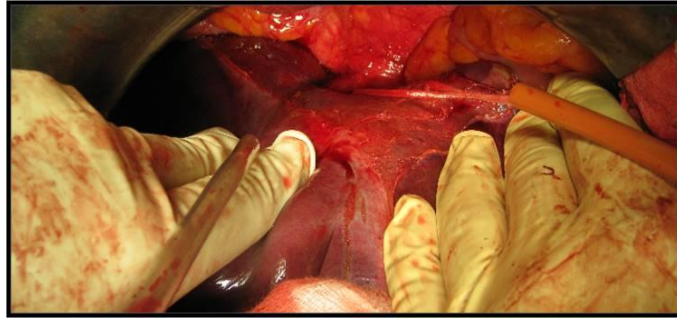
Se practicó una maniobra de Pringle tomando en bloque la totalidad de la triada del pedículo hepático. Para su correcta realización se accedió a la cara posterior del hilio, a través del hiato de Winslow, realizando la apertura del epiplón menor. Esta maniobra no precisa de una disección excesiva del tejido celuloadiposo, ya que la preservación

de éste protege las estructuras del trauma (Fig.13). Con esta técnica se consigue un control eficaz del flujo aferente hepático.



**Figura 13: Maniobra de Pringle**

El flujo eferente del hígado se controló con el clampaje de las venas suprahepáticas, sin interrumpir la circulación en la vena cava. Puede realizarse de forma total (ocluyendo la triada portal y todas las venas suprahepáticas) o como en nuestro caso, de forma parcial, ocluyendo únicamente vasos en algunos de los lóbulos. Para su aplicación se deben disecar las venas suprahepáticas, derecha por un lado y habitualmente el tronco común de la media y la izquierda por otro (Fig. 14). Esta técnica disminuye los trastornos hemodinámicos que aparecen en la exclusión vascular total.



**Figura 14: Clampaje selectivo de las venas suprahepáticas**

Ambos clampajes se realizaron utilizando un torniquete de Rummel al considerarlo más cómodo y menos traumático que una pinza de clampaje.

Se continuó la cirugía realizando la resección del segmento hepático indicado en cada paciente, empleando para ello disector monopolar Tissuelink y disector ultrasónico Cavitron para la transección del parénquima y el sellado de los pequeños vasos (Fig. 15).



**Figura 15: Resección hepática**

En el protocolo quirúrgico quedó anotado la realización o no de tiempos de isquemia, y en caso de realizarse se especificaron también los tiempos que se realizaron contabilizados en minutos.

### **5.3.2.- Obtención de la muestra.**

Tras haberse completado la resección del segmento hepático indicado en cada caso, y estando ya este aislado del resto de parénquima, se realizaba por parte del cirujano una sección de una muestra de tejido hepático macroscópicamente sano en la zona más alejada a la lesión motivo de la intervención, con el fin de evitar tanto las interferencias en el estudio anatomopatológico de la pieza quirúrgica como la existencia de tejido maligno en la muestra a aislar.

Siempre que fue posible la muestra hepática se correspondió a una cuña de tejido rodeada de cápsula de Glisson en todas sus caras excepto en la de la superficie de corte. Intentando obtener la muestra de tejido de mayor tamaño posible sin que ello altere el estudio clínico correcto de la lesión reseçada.

Las muestras hepáticas se conservaron en solución de Wisconsin fría a 4°C (ViaSpan, BristolMyer Squibb Pharma Ltd; Madrid; España) desde su resección en quirófano hasta su aislamiento. Siendo siempre este lapso de tiempo inferior a 30 minutos.

### **5.3.3.- Aislamiento de hepatocitos.**

Se siguió el método de aislamiento de hepatocitos por digestión en dos pasos con colagenasa de muestras de tejido obtenido de resecciones hepáticas descrito por Strom y col.<sup>164</sup>, en 1982, con las modificaciones descritas por Solanas y col.<sup>163</sup> en 2015.

Una vez en el laboratorio si la muestra presentaba vascularización visible se dejaba tal cual, pero cuando no la presentaba se cortaba sobre la superficie de corte hasta conseguir dejar visibles vasos suficientes para la perfusión. Posteriormente la muestra era pesada y los vasos visibles de mayor calibre (de 2 a 4) eran canulados con



Abocaths de 20G, asegurando que la irrigación a través de las cánulas llegaba a la mayor parte del volumen del tejido (más de 2/3).

Para fijar las cánulas y evitar que las soluciones se extravasaran y facilitar la perfusión de las mismas por todo el tejido hepático, las superficies de la muestra no cubiertas por Cápsula de Glisson se cubrieron con pegamento (SuperGlue 3®, Loctite) (Vons et al. 1990; LeCluyse, pers comm). Cada muestra se perfundió con 2 soluciones buffer mantenidas en baño a temperatura constante de 37°C: la primera de ellas (solución de lavado) 300 ml de solución Krebs-Ringer sin calcio (Sigma-Aldrich, St Louis, MO), conteniendo EGTA 0,5mM y Nitro-L-Arginina-metil éster 1nM y la segunda de ellas (solución de digestión) 100 ml de solución Krebs-Ringer con CaCl<sub>2</sub> a una concentración 5mM y 0,05 % de colagenasa (0,25 Unidades de Digestión de Colágeno/litro; C-5138, Sigma-Aldrich, St Louis, MO). Ambas soluciones se perfundían a una velocidad de 40 ml/min/cánula. La primera de ellas (solución de lavado) sin recirculación (hasta que se agotaba el volumen) y la segunda (solución de digestión) se mantenía con un sistema de recirculación constante durante 60 minutos a 37°C, hasta que se objetivaba que el tejido se encontraba digerido por completo.

Todos los pasos se realizaron bajo condiciones estériles y a una temperatura constante de 37°C.

El tejido hepático resultante ya digerido con la colagenasa se separó del tejido conectivo restante no digerido mediante inmersión y separación mecánica en una solución de Krebs-Ringer mantenida en hielo y posterior filtrado de la solución a través de cuatro capas de gasa estéril. La solución filtrada conteniendo los hepatocitos aislados se centrifugaba a baja velocidad (50 x g; 4°C), el pellet resultante se suspendió en medio Williams E (WEM) frío (Lonza, Verviers, Bélgica). El proceso de centrifugado y lavado se repitió tres veces más. El pellet final resultante se suspendió en un volumen conocido fijo de medio de cultivo celular compuesto por Ham's F-12/WEM (1:1, v/v) suplementado con un 2% de suero fetal de ternera (SFT), un 0,1% de fracción V de albúmina de suero bovino, insulina 10nM, 25 µg/ml de transferrina, bicarbonato sódico 26 mM, etanolamina 66.8 µM, ácido linoléico 7.2 µM, glucosa 7 mM, ácido ascórbico 0.62 mM, L-glutamina 2 mM, N-Nitro-L-Arginina metil éster 0.64 mM, penicilina 100 U7ml, anfotericina B 100 µg/ml (todo adquirido en Sigma-

Aldrich, excepto el SFT y la solución antibiótico/antimicótico que fue adquirido en Lonza).

Sobre la solución celular resultante se determinó la viabilidad celular, se contó el número de hepatocitos obtenidos y en 33 de los aislamientos los hepatocitos fueron cultivados en el medio anteriormente mencionado sobre placas de cultivo celular de 96 pocillos colagenizadas 16 horas tras las cuales, se determinó la adhesión celular en 25 muestras, la actividad MTT en 33, la secreción de urea en 19 y la producción de albúmina en 19.

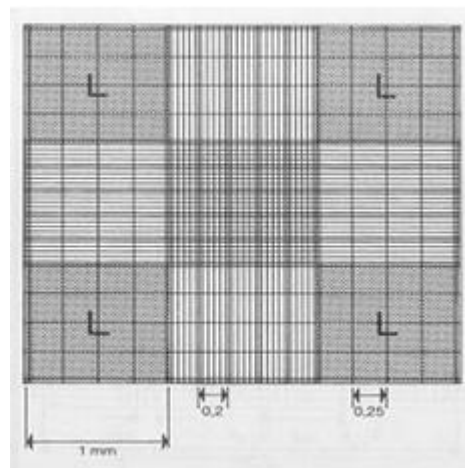
#### **5.3.4.- Determinación de viabilidad, rendimiento celular y pruebas de funcionalidad de los hepatocitos.**

##### Viabilidad celular:

Sobre una alícuota (50µl) de la suspensión final de los hepatocitos aislados de cada muestra se determinó la viabilidad y se realizó el contaje celular mediante el test de exclusión del azul de tripán en cámara de Neubauer mejorada (Fig. 16). Este colorante es excluido por las células viables, que mantienen su membrana íntegra y tiñe de azul los núcleos de las células con membrana dañada. Para ello a la alícuota de 50 µl se le añadían 50 µl de solución de Trypan Blue (Sigma-Aldrich, St Louis, MO), se homogenizaba la mezcla resultante y después se depositaban 10µl de la misma en cada una de las dos retículas de la cámara de Neubauer del hemocitómetro (Fig. 17).



**Fig. 16. Cámaras de Neubauer mejoradas**, en la inferior se puede apreciar la suspensión celular con Trypan Blue en sedas reticuladas



**Fig. 17. Retícula de cámara de Neubauer mejorada.** Las células a contar en cada una de las dos retículas corresponden a 4 cuadrados identificados con la letra “L”, correspondientes con las cuatro esquinas de la retícula.

El conteo se realizó bajo microscopio invertido de contraste de fases con objetivo 20 X. Se cuentan como células viables aquellas células redondeadas y brillantes mientras que se contabilizan como muertas las teñidas de azul. Se hace la media de células vivas y muertas de los 8 cuadrados y se multiplica por el factor de dilución ( $\times 10000$ ) correspondiente a la inversa del volumen de cada cuadrado de la retícula ( $1 \times 10^{-4}$  ml), por el factor de dilución de la suspensión en el Trypan Blue ( $\times 2$ ) y por aquella dilución necesaria para poder tener la suspensión celular dentro de los límites de conteo de la cámara ( $>25$  y  $<100$  células por cuadrícula).

El número de células vivas por ml de suspensión celular se calculó según la siguiente fórmula:

Nº de células vivas /ml de suspensión celular = media de células vivas de las 8 cuadrículas x 2 (factor de dilución del Trypan Blue) x 10000 (inversa del volumen de la cuadrícula) x la dilución de la suspensión celular

El número de células muertas se calculó de la misma manera pero teniendo en cuenta la media de células muertas.

El porcentaje de viabilidad celular se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ viabilidad celular} = \frac{\text{media nº de células vivas} \times 100}{\text{media nº total de células (vivas + muertas)}}$$

#### Rendimiento celular del aislamiento:

Para valorar el rendimiento celular de cada aislamiento (número de hepatocitos viables/ g de tejido hepático aislado) se empleó el mismo método que en la valoración de la viabilidad, pero en este caso no determinamos el porcentaje de células vivas, sino el número total de células vivas (número de células vivas/ml de suspensión celular x ml de suspensión celular obtenida en el aislamiento) obtenidas por gramo de tejido.

El rendimiento se determinó siguiendo la siguiente fórmula:

$$\text{Rendimiento celular} = ((\text{células vivas/ml de suspensión}) \times (\text{ml de suspensión celular final})) / \text{gr de tejido aislado.}$$

### Pruebas funcionales:

Para todas las pruebas de funcionalidad, las células fueron sembradas a una densidad de 300000 hepatocitos viables/ml de medio de cultivo, en placas de 96 pocillos precubiertas con colágeno tipo I (Biocoat™, BD Bioscience, Bélgica), con 100µl de suspensión celular por pocillo (30000 células vivas/pocillo) y cultivadas en un incubador a 37°C en una atmósfera de un 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de aire durante 16 horas (“overnight”).

- Actividad mitocondrial de la deshidrogenasa (MTT): La MTT de los hepatocitos en cultivo se realizó utilizando un método basado en la reducción de sal de bromuro de 3-(4,5- dimetil tiazol-2-il) -2,5-difenil tetrazolio en cristales insolubles de formazán de color violeta. Para ello, tras 16 horas en cultivo, se retiró el medio y las células se incubaron con reactivo MTT (500 µg/ml; Sigma-Aldrich) en medio de cultivo libre de suero (sin SFT y suplementado con dexametasona 10nM). Tras 4 horas de cultivo con el reactivo en incubador a 37°C y una atmósfera de un 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de aire, se eliminó el sobrenadante resultante, y los cristales de formazan formados en cada pocillo se disolvieron con 200 µl de DMSO. Tras la homogenización del contenido de cada pocillo en un agitador de placas durante 5 minutos, se leyó la absorbancia a 570 y 630 nm en un lector de placas (Synergy HTX- Bio Tek). El valor de MTT de cada pocillo se obtuvo restando al valor de absorbancia medido a 570 nm el valor de referencia a 620 nm. En cada aislamiento se determinó la MTT en 8 pocillos distintos y se realizó la media.
  
- Adhesión celular: para calcular la adhesión, se determinó la proteína de las células adheridas a placa y la total de las células sembradas. La proteína total, se determinó sobre un pellet, recogido el día del aislamiento correspondiente a 30000 células, en el que se encontraban los hepatocitos, vivos y muertos, que se centrifugó a 60 g durante 5 minutos a 4°C. El pellet

resultante se lavó 2 veces con PBS y finalmente se mezcló con una solución de Tritón al 2% en PBS para lisar las membranas celulares. El lisado celular se guardó -30 °C en tritón al 2% en PBS hasta su análisis posterior.

Para determinar la proteína adherida de cada aislamiento sobre 8 pocillos de siembra y tras 16 horas de cultivo, se eliminó el medio de incubación en el que se encontraban los hepatocitos, se lavaron las células adheridas a placa dos veces con PBS con calcio y magnesio y se lisaron las células con Tritón al 2% en PBS para disolver la proteína. Se recogió el sobrenadante y se guardó a -30° C hasta su análisis. Sobre los lisados celulares (del pellet celular y de las células adheridas tras el cultivo) se determinó la cantidad de proteína total y la adherida respectivamente, usando el kit comercial *Bicinchoninic acid (BCA) protein assay kit* (Sigma-Aldrich). En él se dispone de una solución de ácido Bicinconinico (BCA) que contiene carbonato de sodio, tartrato sódico y bicarbonato de sodio en NaOH 0,1 N y una solución de 4% de sulfato de cobre (II) pentahidratado. El ensayo se basa en la conversión de los iones cúpricos (Cu<sup>++</sup>), presentes en los enlaces peptídicos y en los residuos cisteína, cistina, tirosina, y triptófano, a iones cuprosos (Cu<sup>+</sup>) bajo condiciones alcalinas. La cantidad de iones cúpricos reducidos es función de la cantidad de proteína presente en la muestra.

Para esta determinación se utilizó una placa multipocillo en el que se analizaron las muestras, los estándares y el control (tritón al 2 % en PBS) por duplicado. Los reactivos se mezclaron en las proporciones indicadas en el protocolo. Tras dejar incubar 30 minutos a 37 °C se leyó en un lector de placas (Synergy HT, Biotek) a 562 nm. La absorbancia resultante es directamente proporcional a la cantidad de proteína presente en la solución. De forma que la cantidad de proteínas se calculó por extrapolación a la curva standard. La proteína adherida se calculó como la media de los 8 pocillos sembrados a tal fin.

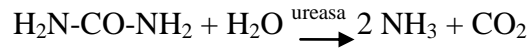
El porcentaje de adhesión celular se calculó como el porcentaje de la proteína adherida con respecto a la proteína total.

- Determinación de secreción de albúmina: Como uno de los indicadores de función de los hepatocitos se determinó la producción de albúmina. Para ello, se recogieron los sobrenadantes “pool” de 8 pocillos tras 16 horas de cultivo y se guardaron a -30° C hasta su determinación. El contenido de albúmina de los sobrenadantes se determinó mediante el ensayo inmunoabsorbente unido a enzima tipo sándwich, conocido como ELISA, se utilizó el kit comercial *Human Albumin Elisa Quantitation Set* (Laboratorios Bethyl, USA). Primero se incubó el anticuerpo, en la placa multipocillos, diluido con tampón de recubrimiento (0,05M de carbonato-bicarbonato pH 9.6) durante una hora, tras lavar con solución de lavado 5 veces (Tris 50 mM, NaCl 0,14 M, 0,05% Tween 20, pH 8.0) se añadieron a cada pocillo 200 µg de solución de posrecubrimiento (Tris 50 mM, NaCl 0,14 M, 1% BSA, pH 8.0).

Las muestras desconocidas, el blanco (medio de cultivo) y los estándares utilizados fueron diluidos apropiadamente en diluyente de muestra (Tris 50 mM, NaCl 0,14 M, 1% BSA, 0,05% Tween 20) y se añadieron a los pocillos por duplicado. Tras una incubación de una hora a temperatura ambiente fueron combinados con peroxidasa unida a un anticuerpo policlonal anti-cabra frente a albúmina humana. Después de una incubación de 20 minutos en oscuridad se paró la reacción con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2M y se midieron los resultados en un lector de placas a 450 nm. La cuantificación de albúmina se determinó por extrapolación en una curva estándar de cuatro parámetros, 4PL.

- Determinación de secreción de urea: Para cada aislamiento, se analizaron las muestras tomadas del sobrenadante del cultivo tras 16 horas, “pool” de 8 pocillos. Los sobrenadantes se guardaron a -20° C hasta su análisis en contenido en urea. La síntesis de urea en el medio se midió colorimétricamente usando el kit comercial *Quantichrom TM urea assay kit*

(Bioassays systems, USA). El principio se basa en la hidrólisis de urea a amonio y dióxido de carbono por la ureasa.



En una placa multipocillo se analizaron las muestras, los estándares y el blanco (medio de cultivo) por duplicado. El estándar a distintas concentraciones sirvió para realizar una curva patrón en el que se extrapolaron los resultados obtenidos por el lector de placas. Muestras, estándares y blanco se incubaron con 200 µl de reactivo de trabajo 30 minutos a temperatura ambiente. Tras la incubación se leyeron a 520 nm en un lector de placas. La intensidad del color es directamente proporcional a la concentración de urea que hay en la muestra.

#### **5.4.- Recogida de variables.**

Se recogieron los datos de un total de 38 variables, de las cuales 30 fueron obtenidos a través de la historia clínica del paciente y 8 a partir de la base de datos desarrollada por el equipo del laboratorio de aislamiento celular. Todas ellas fueron recogidas en una base de datos Microsoft Office Excel 2003 para su posterior análisis estadístico.

Las variables incluidas en el estudio fueron las siguientes.

- Datos de filiación del paciente:
  1. Número de aislamiento.
  2. Edad. Se refiere a la edad del paciente (años) en el momento en el que fue sometido a la intervención quirúrgica. Variable cuantitativa continua.



3. Sexo. Variable cualitativa dicotómica (hombre/mujer).
- Características clínicas y antecedentes patológicos del paciente:
4. Antecedentes oncológicos. Se refiere a la existencia de patología oncológica relacionada o no con la enfermedad hepática causante de la cirugía. Variable cualitativa dicotómica (Si/No).
  5. Tipo de antecedente oncológico. Se refiere al tipo de enfermedad oncológica que ha sufrido el paciente, relacionado o no con la enfermedad hepática causante de la cirugía. Variable cualitativa nominal.
  6. Antecedente de patología hepática. Se refiere a enfermedades o agresiones hepáticas previas, independientes de la patología actual que causa la cirugía. Variable cualitativa dicotómica (Si/No).
  7. Tipo de antecedente hepático. Se refiere a la patología hepática sufrida por el paciente antes de la cirugía como alcoholismo, esteatosis, cirrosis, hepatectomía previa.... Variable cualitativa nominal.
  8. Cirrosis. Se refiere a la existencia de cirrosis hepática previa a la cirugía. Esta variable se determinó según la existencia de hallazgos histológicos compatibles con cirrosis en estudios preoperatorios o en el análisis anatomopatológico de la propia pieza quirúrgica de la cual se extrajo la muestra. Variable cualitativa dicotómica (Si/ No).
  9. Grado de cirrosis en caso de existencia de cirrosis. Esta variable se determino realizando una valoración Child en los pacientes que presentaban hallazgos histológicos de cirrosis. Variable cualitativa ordinal (Child A/ Child B/Child C).

10. Esteatosis. Se refiere a la existencia de esteatosis hepática previa a la cirugía. Esta variable se determinó con la revisión tanto de pruebas de imagen preoperatoria así como de los hallazgos histológicos en el análisis anatomopatológico de la pieza de la que se extrajo la muestra. Variable cualitativa dicotómica (Si/No).
11. Grado de esteatosis hepática previa a la cirugía. Se consideró esteatosis leve cuando estaban afectados menos del 33% de hepatocitos, moderada entre 33-66% y grave más del 66%. Variable cualitativa ordinal (leve/ moderada/ grave).

- Determinaciones analíticas previas a la cirugía.

Se recogieron los datos analíticos de los pacientes, incluyendo analíticas de hasta un mes previo a la cirugía. En caso de la existencia de más de una analítica se selecciono la realizada más próxima al día de la cirugía. Todas ellas son variables cuantitativas continuas.

12. AST en suero (Aspartato aminotransferasa).
13. ALT en suero (Alanina aminotransferasa).
14. GGT en suero (Gamma glutamil transpeptidasa).
15. Fostatasa alcalina en suero.
16. Bilirrubina total en suero.
17. Actividad de Protombina.
18. Hemoglobina.
19. Hematocrito.

**Tabla 2. Valores analíticos estándar en la población**

	Unidades de Medición	Valores de referencia
AST	U/L	0-35
ALT	U/L	0-35
GGT	U/L	0-38
Fostatasa alcalina	U/L	30-120
Bilirrubina	mg/dL	0.30-1.20
Actividad de Protombina	%	80-120
Hemoglobina	g/dL	12.2-16.5
Hematocrito	%	36.0-48.0

- Datos relacionados con la enfermedad hepática causante de la cirugía.

20. Origen oncológico de la enfermedad hepática. Se refiere a la existencia de enfermedad oncológica en el estudio anatomopatológico de la lesión hepática reseçada. Variable cualitativa dicotómica. (Si/ No).

21. Etiología de la enfermedad hepática. Se refiere a la etiología confirmada de la lesión hepática reseçada tras el estudio anatomopatológico de la lesión. Variable cualitativa nominal.

22. Tratamiento quimioterápico previo a la cirugía. Se refiere a los pacientes que han sido sometidos a un tratamiento quimioterápico independientemente del momento en el que se realizó. Variable cualitativa dicotómica. (Si/ No).

23. Tiempo desde la quimioterapia. Se refiere al número de meses que transcurrieron desde el fin de la quimioterapia hasta la cirugía. Variable cuantitativa continua.

24. Fármacos quimioterápicos administrados. Se refiere a los tipos de fármacos que se emplearon como parte del tratamiento oncológico. Variable cualitativa nominal.
25. Oxaliplatino. Se refiere a los pacientes en los que se empleó oxaliplatino como parte del tratamiento quimioterápico. Variable cualitativa dicotómica. ( Si/No)
- Datos relacionados con la técnica de clampaje quirúrgico.
26. Clampaje vascular. Se refiere a si el paciente ha sido sometido o no a clampaje vascular. Variable cualitativa dicotómica. (Si/No).
27. Tipo de clampaje realizado. Variable cualitativa dicotómica. (Continuo / Intermitente).
28. Número total de clampajes. Se refiere al número de veces que se ha realizado clampaje. Variable cuantitativa discreta.
29. Tiempo máximo de clampaje. Se refiere al tiempo máximo de clampaje entre todos los clampajes que ha sufrido un paciente. Variable cuantitativa continua.
30. Tiempo total de clampaje. Se refiere a la suma de todos los clampajes que se realizan en un paciente. Variable cuantitativa continua.
- Datos relacionados con el aislamiento celular
31. Viabilidad celular. Se refiere al porcentaje de viabilidad celular obtenido tras el aislamiento. Variable cuantitativa continua.

32. Viabilidad > de 65. Se refiere a la respuesta de si el aislamiento ha obtenido una viabilidad superior a 65%. Variable cualitativa dicotómica (Si/No).
33. Viabilidad > de 75. Se refiere a la respuesta de si el aislamiento ha obtenido una viabilidad superior a 75%. Variable cualitativa dicotómica (Si/No).
34. Rendimiento celular. Se refiere a la determinación de rendimiento celular obtenido en cada aislamiento. Variable cuantitativa continua.
35. Adhesión celular. Se refiere a la determinación de adhesión celular obtenida en el cultivo de las células de cada aislamiento. Variable cuantitativa continua.
36. MTT. Se refiere a la determinación de MTT obtenida en el cultivo de las células de cada aislamiento. Variable cuantitativa continua.
37. Albúmina. Se refiere a la determinación de albúmina obtenida en el cultivo de las células de cada aislamiento. Variable cuantitativa continua.
38. Urea. Se refiere a la determinación de urea obtenida en el cultivo de las células de cada aislamiento. Variable cuantitativa continua.

### **5.5.- Análisis estadístico.**

Se realizó en primer lugar un análisis descriptivo de las variables a estudio. Para variables cualitativas se aportan frecuencias relativas y absolutas. Para variables cuantitativas se aporta media y error estandar (EE) o el intervalo de confianza al 95% (IC95%), y la mediana junto con los valores máximos y mínimos.

Para analizar la relación entre las variables a estudio, se realizó un análisis bivalente, correlación de Pearson o Spearman para evaluar relación lineal entre dos variables cuantitativas continuas. El coeficiente de correlación puede tomar valores entre -1 y 1, indicando el 0 nula correlación entre las variables. Se aplicó el test de Chi-Cuadrado para mostrar la relación entre variables cualitativas, y fue sustituido por el test exacto de Fisher cuando no se cumplieron los criterios de aplicación.

Para comparar medias entre grupos independientes se utilizó el test U Mann-Whitney para dos grupos y el test de Kruskal Wallis cuando la variable tenía más categorías. Para analizar normalidad de las variables, se utilizó el Test de Komolgorov-Smirnov.

Con el objetivo de valorar la influencia de diversas variables sobre la viabilidad, rendimiento y funcionalidad “in vitro” del hepatocito aislado, se llevan a cabo una serie de modelos predictivos basados en análisis de regresión. Se considera, como variable de medida de la validez, la capacidad explicativa del modelo ( $R^2$ ).  $R^2$  puede tomar valores entre 0 y 1. Se utiliza la prueba de Hosmer-Lemeshow para analizar la bondad de ajuste del modelo.

Regresión lineal múltiple:

VARIABLES RESULTADO: Se consideran las variables continuas de viabilidad, rendimiento y funcionalidad “in vitro” del hepatocito aislado.

VARIABLES INDEPENDIENTES: Se consideran las variables asociadas tanto al donante como al procedimiento quirúrgico estadísticamente significativas en el análisis bivalente.

Se estableció el nivel de significación estadística para un p valor menor a 0,05.

Para toda la investigación se ha utilizado el programa estadístico SPSS v22.0 (licencia Universidad de Zaragoza).

### **5.6.- Consideraciones éticas.**

Todos los pacientes fueron informados previamente a la cirugía de las características del estudio, detallando en cada caso el método de extracción de la muestra y los fines de la realización del mismo (Anexo 1).

Todas las muestras fueron obtenidas y procesadas de acuerdo a las normas establecidas y tras aprobación por el Comité Ético de Investigación Clínica de Aragón.

Se realizó un protocolo de recogida, así como un consentimiento informado específico para el estudio que aceptaron y firmaron todos los participantes del mismo (Anexo 2).

## **6.- RESULTADOS**

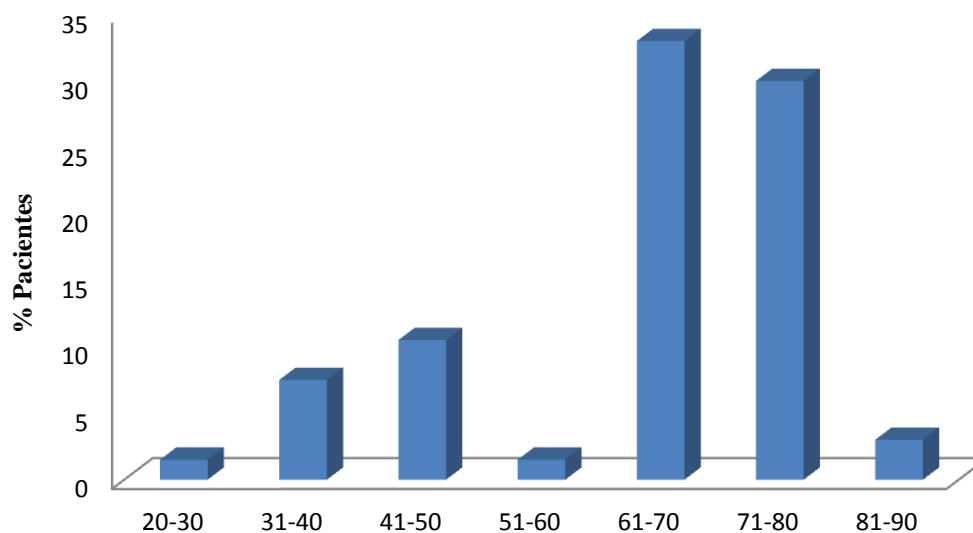


## 6.1.- Características basales de la población a estudio.

### 6.1.1.- Datos demográficos.

Dentro del presente estudio se han incluido un total de 67 pacientes, cuya edad media fue de  $62 \pm 1,6$  años, con un rango de edades entre los 27 y 81 años.

La distribución de la población según la edad se muestra en la figura 18.



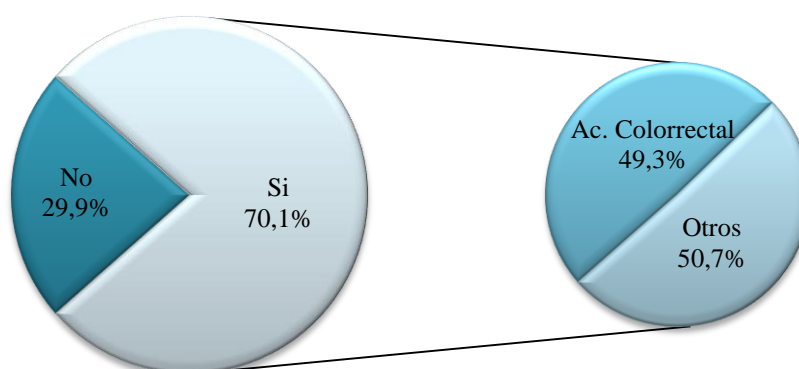
**Fig. 18- Distribución de la población por edad.**

En cuanto a la distribución de la población según el sexo, 43 pacientes fueron hombres (64,2%) y 24 fueron mujeres (35,8%).

Todos los pacientes pertenecen a la comunidad Autónoma de Aragón y han sido tratados por el sistema público Salud Aragón.

### 6.1.2.- Variables relacionadas con las características clínicas y los antecedentes patológicos del donante.

Entre los antecedentes patológicos de los pacientes analizados, 47 de ellos, un 70,1% del total habían presentado patología oncológica relacionada o no con la enfermedad hepática que indicó la cirugía. El adenocarcinoma colorrectal fue la estirpe oncológica más frecuente, sufrida por el 49,3% de los pacientes (Fig.19).



**Figura 19.- Distribución de antecedentes oncológicos**

En cuanto a los antecedentes relacionados con patología hepática, sólo afectaron a 13 de los 67 donantes (19,4%). Ocho pacientes habían sido sometidos a resecciones hepáticas previas, un paciente presentó hepatitis A, uno hígado azul y un último paciente presentaba enolismo crónico.

Tan sólo un paciente presentaba cirrosis previo a la cirugía (hay que tener en cuenta que la cirrosis fue considerada criterio de exclusión en sus grados Child B y C). Por lo que no fue posible realizar el análisis de la influencia de esta variable en la viabilidad, rendimiento y funcionalidad de los hepatocitos “in vitro”.

En cuanto a la presencia de esteatosis hepática se presentó en 7 de los 67 pacientes (10,4%), de ellos tres presentaban un grado leve y los otros cuatro se clasificaban como un grado moderado.

### 6.1.3.- Variables analíticas.

Se incluyeron en el estudio un total de ocho determinaciones analíticas, las cuales fueron analizadas en los tiempos preoperatorias.

En la tabla 3 mostramos la distribución de los valores analíticos medios obtenidos en los donantes previo a la cirugía, así como los valores estándar aceptados para la población general.

**Tabla 3.- Determinaciones analíticas preoperatorias**

	Mediana	Min-Max	Media	EE*	Valor estándar en la población
AST	23,5	14-347	36,4	6,03	0-35 U/L
ALT	21,0	4-512	40,5	8,97	0-35 U/L
GGT	51,5	13-1721	105,6	33,06	0-38 U/L
FA	94,0	32-1555	139,6	29,75	30-120 U/L
Bilirrubina	0,7	0,3-8,3	1,06	0,17	0,3-1,2 mg/dL
Act. Protombina	100,0	36-148	100,4	2,04	80-120 %
HB	13,7	9,5-17,1	13,6	0,20	12,2-16,5 g/dL
HTO	40,7	27,6-48,5	40,4	0,59	36-48 %

\*EE= error estándar de la media

#### 6.1.4.- Variables relacionadas con la enfermedad hepática causante de la cirugía.

Se revisaron los estudios anatomopatológico de todas las piezas hepáticas resecadas, entre las que se localizaron trece estirpes etiológicas diferentes, de las cuales el 82% eran de origen oncológico. En la tabla 4 se muestra una descripción detallada del origen etiológico de las patologías por las que los pacientes fueron sometidos a la resección hepática.

**Tabla 4.- Distribución etiológica de las lesiones hepáticas.**

Etiología	Nº de pacientes	%
Metástasis Carcinoma Colorrectal	35	52,3%
Colangiocarcinoma	7	10,5%
Hidatidosis	6	9%
Metástasis de origen diferente al Ca colorrectal	5	7,5%
Hemangioma	4	6%
Hepatocarcinoma	4	6%
Ca. Vesícula	4	6%
Adenoma	1	1,5%
Cistoadenoma	1	1,5%

Entre los donantes con etiología oncológica tan sólo 27 recibieron tratamiento quimioterápico previo a la cirugía. Por lo tanto, el 40,3% de todas las piezas fueron sometidas a tratamiento quimioterápico previo al aislamiento. El tiempo medio desde la administración del tratamiento adyuvante hasta la toma de la muestra fue de  $6,17 \pm 1,7$  meses, con un rango de entre 1 y 24 meses.

Entre los diferentes esquemas quimioterápicos que recibieron los donantes, se determinó de forma concreta, en cuáles de ellos se había empleado oxaliplatino, por los efectos hepáticos nocivos que este provoca. De los 27 pacientes, 23 (34,3%) recibieron tratamiento quimioterápico con oxaliplatino asociado o no a otros tratamientos y en los otros cuatro pacientes restantes que recibieron tratamiento adyuvante, no conocemos la terapia quimioterápica empleada por lo que no podemos determinar si fueron o no sometidos a este fármaco.

### 6.1.5.- Variables relacionadas con la técnica de clampaje.

La maniobra de clampaje vascular se realizó en 43 de los 67 pacientes, un 64,2% del total. De estos 43 clampajes, en un 17,9% (12 de 43) se realizó un clampaje continuo. En los 31 pacientes restantes (46,3%) se realizaron clampajes intermitentes.

La media de clampajes realizados en los donantes fue de  $1,5 \pm 0,2$ , con un rango que incluye desde 0 a 6 clampajes. En la figura 20 se describe la distribución del número de clampajes al que fueron sometidas las muestras a estudio.

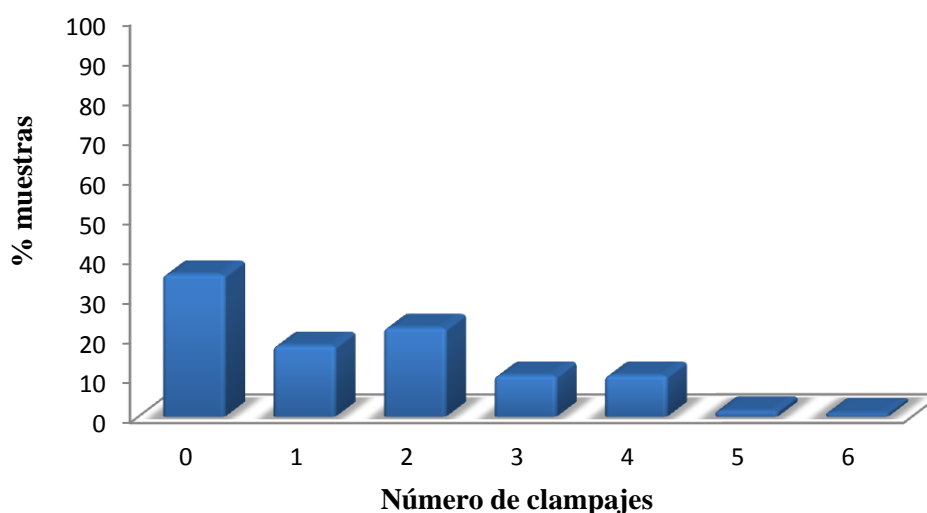


Fig. 20. Distribución del número de clampajes

Analizando de forma conjunta los clampajes continuos e intermitentes, la media de tiempo total de clampaje ascendió a  $23,6 \pm 2,9$  minutos, con un rango de entre 0 y 84 minutos; mientras que el tiempo máximo de isquemia al que fue sometido un paciente en un solo clampaje presentó una media de  $11,3 \pm 1,1$  minutos, con un rango de entre 0 y 33 minutos.

#### **6.1.6.- Variables relacionadas con el aislamiento celular.**

Se obtuvieron un total de 67 muestras, con un peso medio de  $12,9 \pm 0,9$  g.

Las variables elegidas para determinar el grado de afectación de la isquemia en las muestras hepáticas fueron la viabilidad y el rendimiento celular. En 60 de las 67 muestras (89,5%) se consiguió determinar la viabilidad del hepatocito, reduciendo esta cifra a 53 (79%) en las determinaciones del rendimiento celular.

Las pruebas de funcionalidad hepática (adhesión celular a placa, actividad MTT y producción de albúmina y urea), precisan de técnicas más complicadas por lo que no pudieron ser realizadas en todas las muestras, a pesar de ello se recogieron sus determinaciones como datos suplementarios que reforzasen nuestros resultados. La *n* en estos casos se limita a 25, 33, 19 y 19 respectivamente.

En la tabla 5 mostramos los valores medios obtenidos en las variables relacionadas con el aislamiento y cultivo celular.

En nuestro estudio se han tomado dos puntos de corte de viabilidad. Clasificamos como aislamientos de calidad aceptable aquellos que presentan un porcentaje de viabilidad superior a 65 %, y aislamiento de buena calidad cuando este porcentaje supera el 75%.

De los 67 cultivos realizados, el 86,7% (52 de 60) tuvieron niveles de viabilidad superior al 65% y el 31,7% (19 de 60) presentaron una viabilidad superior al 75%.

**Tabla 5.- Resultados medios en viabilidad, rendimiento y funcionalidad hepática.**

	N	Media na	Min-Max	Media	EE*
Viabilidad (%)	60	71,4	53,5-89,1	71,7	0,9
Rendimiento (10 <sup>6</sup> celula/g tejido)	53	2,0	0,3-16,1	2,9	0,3
Adhesión (%)	25	80,7	48,5-96,9	78,1	2,2
MTT (Abs)	33	0,8	0,2-1,7	0,7	0,1
Albúmina (µg de alb/ mg prot adh)	19	4,6	1,1-16,3	6,5	1,1
Urea (mg urea/ mg prot. Adh)	19	3258,5	1577,9-11633,1	4475,1	644,9

\*EE=error estándar

Abs= Absorbancia. Alb= Albúmina. Prot = proteína. Adh= Adheridas.

## 6.2.- Análisis de los objetivos específicos propuestos.

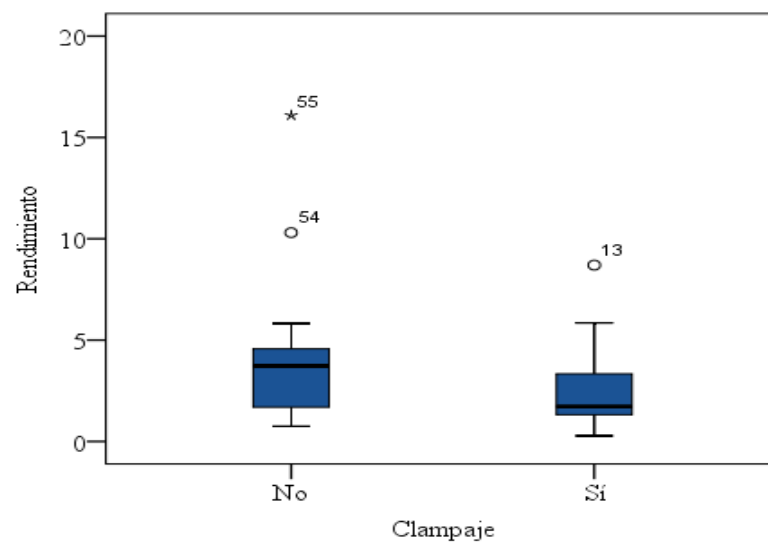
### 6.2.1.- Análisis del efecto del clampaje vascular sobre la viabilidad, el rendimiento celular tras el aislamiento y la funcionalidad de los hepatocitos aislados “in vitro”.

El análisis de los datos muestra una clara diferencia entre los valores medios de rendimiento celular tras el aislamiento (Fig. 21), según los donantes hayan sido sometidos o no a clampaje celular, con un descenso del rendimiento medio en los que si fueron sometidos a clampaje, pero estas diferencias no son estadísticamente significativas ( $p=0,057$ ).

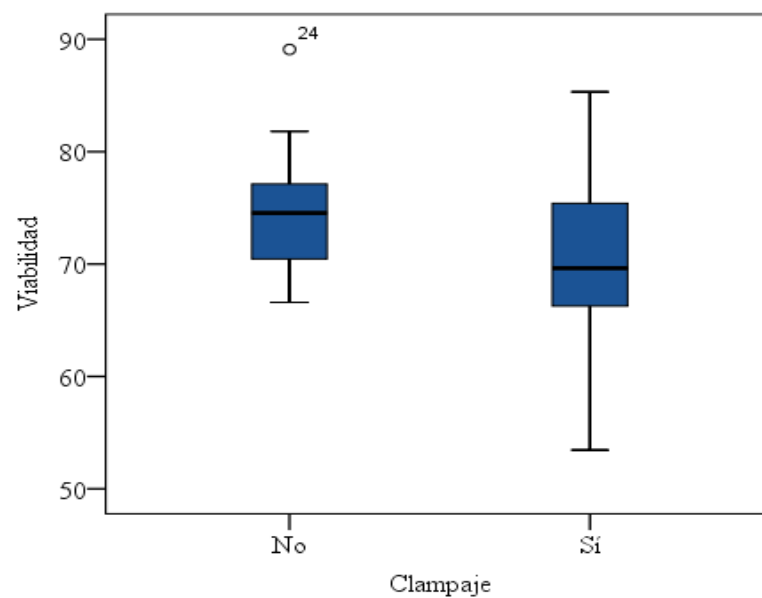
En cuanto a la viabilidad celular tras el aislamiento, si se encuentran diferencias significativas (Fig. 22). Las muestras hepáticas de pacientes no sometidos a clampaje presentaron un valor medio superior que los de las muestras de pacientes sometidos a clampaje ( $p=0,026$ ).

En las pruebas funcionales no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los valores medios según los pacientes hayan sido sometidos o no a clampaje vascular.

En la tabla 6 se muestra la influencia del clampaje sobre las variables a estudio.



**Figura 21. Comparación de los niveles medios de rendimiento entre clampaje si y clampaje no**



**Fig. 22. Comparación de los niveles medios de viabilidad entre clampaje si y clampaje no.**



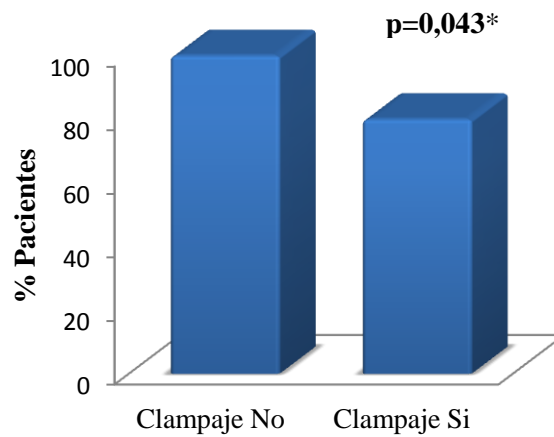
**Tabla 6. Influencia del clampaje en la viabilidad, rendimiento y funcionalidad hepática.**

CLAMPAJE		Mediana	Min-Max	Media	EE	p valor*
Viabilidad	No	74,5	66,6-89,1	74,6	1,2	<b>0,026</b>
	Si	69,6	53,5-85,3	70,3	1,2	
Rendimiento	No	3,7	0,8-16,1	4,1	0,9	0,057
	Si	1,7	0,3-8,7	2,3	0,2	
Adhesión	No	81,9	69-89,1	79,5	2,6	0,883
	Si	80,3	48,5-96,9	77,5	2,9	
MTT	No	0,6	0,2-1	0,6	0,1	0,832
	Si	0,7	0,2-1,7	0,7	0,0	
Albúmina	No	4,1	2,3-9,3	5,4	0,9	0,967
	Si	4,1	1,1-16,3	7,1	1,6	
Urea	No	3269,0	2391,6-5615,1	3655,5	449,8	0,967
	Si	3167,2	1577,9-11633,1	4953,2	978,1	

\*Test de U de Mann Whitney para la comparación de medias.

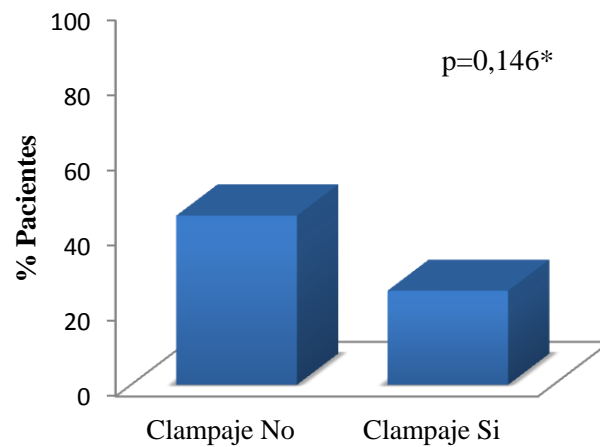
El análisis estadístico demuestra que el 100% de los pacientes no sometidos a clampaje tienen viabilidad mayor de 65% (aislamiento de calidad aceptable), en cambio, entre los pacientes sometidos a clampaje, tan sólo el 80% presentan viabilidades mayores del 65% (Fig.23). Considerándose esta diferencia estadísticamente significativas ( $p=0,043$ ).

En cuanto a la viabilidad mayor de 75% (aislamientos de calidad buena), el 45% de los pacientes no sometidos a clampaje presentaron una viabilidad  $>75\%$ , frente a solo el 25% de los pacientes sometidos a clampaje (Fig.24), si bien, en este caso las diferencias no resultaron estadísticamente significativas ( $p=0,146$ ).



\*Test exacto de Fisher

**Fig. 23. Influencia del clampaje en las muestras con viabilidad > 65 %**



\*Test exacto de Fisher

**Fig. 24. Influencia del clampaje en las muestras con viabilidad >75%**

### 6.2.2.- Análisis del efecto del tipo de clampaje, continuo o intermitente, sobre la viabilidad y el rendimiento celular tras el aislamiento y la funcionalidad de los hepatocitos aislados “in vitro”.

El análisis de los resultados muestra que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los valores medios referentes a la viabilidad y rendimiento celular tras el aislamiento según los pacientes hayan sido sometidos a clampaje continuo o intermitente.

En relación a la funcionalidad, sí se observan diferencias en la actividad MTT de los hepatocitos aislados cultivados “in vitro”, obteniendo un valor medio superior en los pacientes con clampaje intermitente ( $p=0,006$ ) (Fig.25). El resto de parámetros de funcionalidad tampoco muestran diferencias significativas en este punto.

En la tabla 7 se muestran los resultados obtenidos de la comparación de medias entre tipos de clampaje, contínuo o intermitente.

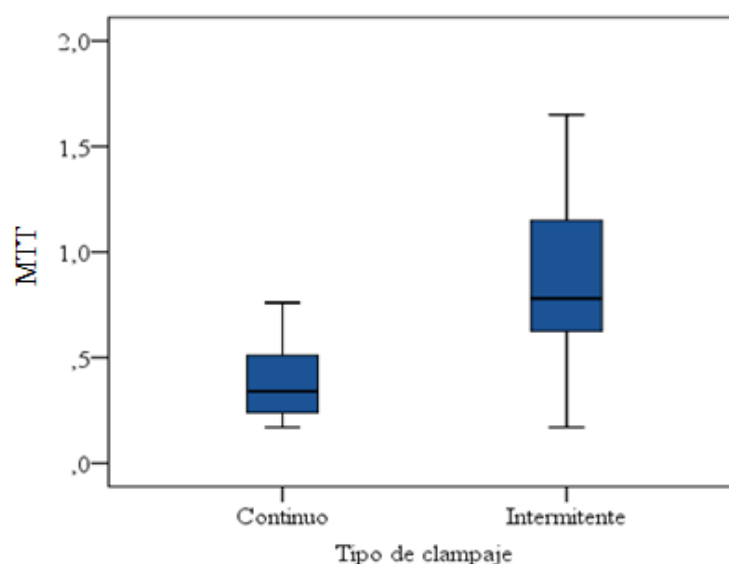


Fig. 25. Influencia del tipo de clampaje en los niveles medios de MTT

**Tabla 7.- Influencia del tipo de clampaje en la viabilidad, rendimiento y funcionalidad hepática “in vitro”**

CLAMPAJE		Mediana	Min-Max	Media	EE	p valor*
Viabilidad	Continuo	69,8	53,5-83,7	70,0	3,0	0,788
	Intermitente	69,2	58,6-85,3	70,4	1,2	
Rendimiento	Continuo	1,7	0,6-5,9	2,7	0,6	0,541
	Intermitente	1,7	0,3-8,7	2,1	0,3	
Adhesión	Continuo	79,9	66,9-87,1	77,8	3,6	1,000
	Intermitente	80,6	48,5-96,9	77,4	3,8	
MTT	Continuo	0,3	0,2-0,8	0,3	0,0	<b>0,006</b>
	Intermitente	0,7	0,2-1,7	0,8	0,0	
Albúmina	Continuo	4,1	3,7-4,6	4,1	0,4	1,000
	Intermitente	6,1	1,1-16,3	7,7	1,9	
Urea	Continuo	2872,4	2486,4-3258,5	2872,4	386,0	0,758
	Intermitente	4012,0	1577,9-11633,1	5369,3	1133,3	

\* Test de U de Mann-whitney

El análisis de los datos muestra que el tipo de clampaje no está relacionado con que las células obtenidas de las muestras del tejido resecado presenten una viabilidad mayor de 65 o de 75%.

La viabilidad fue superior a 65% (aislamientos de calidad aceptable) en el 72,2% de los paciente sometidos a clampaje continuo y en el 82,8% de los pacientes sometidos a clampaje intermitente ( $p=0,660$ ). La viabilidad fue superior a 75% (aislamientos de calidad buena) en el 36,4% de los pacientes con clampaje continuo y en el 20,7% de los pacientes sometidos a clampaje intermitente ( $p=0,418$ ). En ninguno de los dos casos se obtuvieron resultados estadísticamente significativos.

### 6.2.3.- Influencia del tiempo total de clampaje en el donante de la muestra sobre la viabilidad y el rendimiento celular tras el aislamiento y la funcionalidad de los hepatocitos “in vitro”.

Al realizar el análisis de correlación se observa una relación lineal negativa, baja pero estadísticamente significativa, entre el tiempo de clampaje y la viabilidad y el rendimiento celular tras el aislamiento, de forma que a medida que aumenta el tiempo de clampaje, van disminuyendo ambos parámetros.

En cuanto a las variables de funcionalidad, no existe una relación lineal estadísticamente significativa con el tiempo total de clampaje.

En la tabla 8 se muestra el coeficiente de correlación de Spearman así como el p valor asociado a cada una de las relaciones evaluadas.

**Tabla 8. Influencia del tiempo total de clampaje en la viabilidad, rendimiento y funcionalidad hepática “in vitro”**

	TIEMPO TOTAL	
	Coeficiente de Correlación	p valor*
Viabilidad	-0,332	<b>0,010</b>
Rendimiento	-0,309	<b>0,024</b>
Adhesión	-0,178	0,395
MTT	0,288	0,105
Albúmina	0,265	0,274
Urea	0,248	0,307

\*Coeficiente de correlación de Spearman

Los modelos de regresión lineal univariante que se muestran a continuación (Tabla 9 y 10) indican que:

- Al aumentar el tiempo total de clampaje en una unidad, la viabilidad disminuye en 0,081 unidades.
- Al aumentar el tiempo total de clampaje en una unidad, el rendimiento disminuye en 0,035 unidades.

**Tabla 9. Modelo de regresión lineal univariante viabilidad-tiempo total de clampaje**

	B	IC 95% B	p
T° TOTAL	-0,081	-0,158-(-0,004)	0,039
Constante	73,760	71,146-76,375	0,000

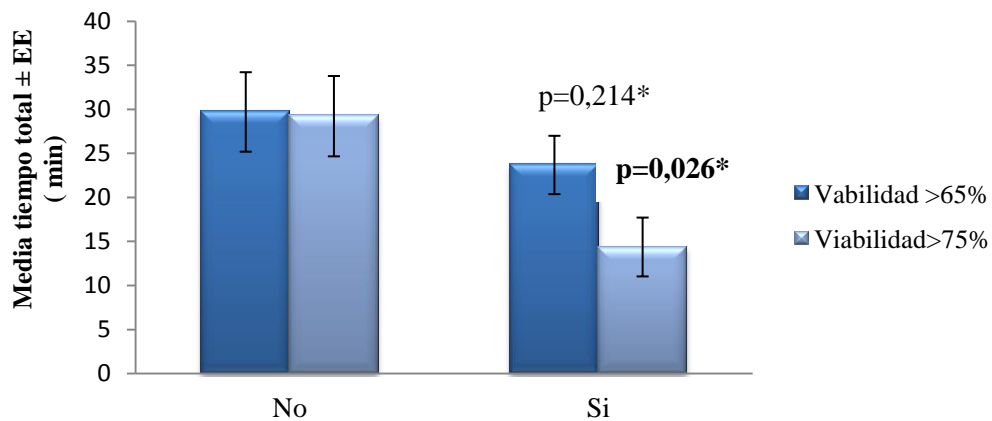
$$\text{Viabilidad} = 73,76 - 0,08 * \text{T° Total}$$

**Tabla 10. Modelo de regresión lineal univariante Rendimiento-tiempo total de clampaje**

	B	IC 95% B	p
T° TOTAL	-0,035	-0,066-(-0,005)	0,023
Constante	3,798	2,750-4,846	0,000

$$\text{Rendimiento} = 3,80 - 0,04 * \text{T° Total}$$

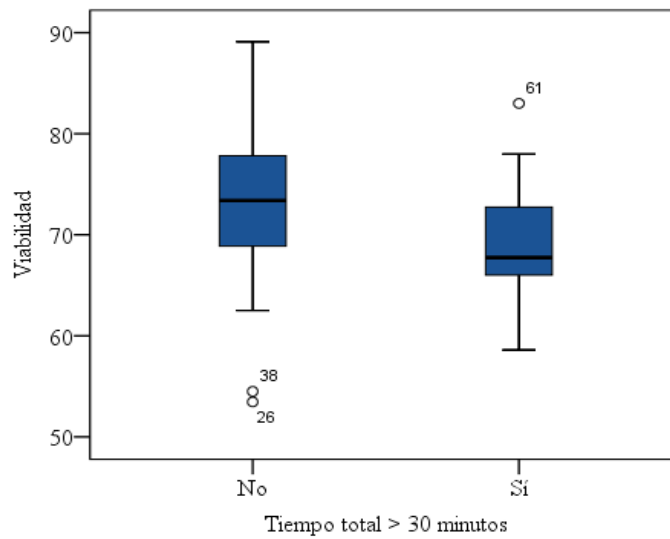
No existen diferencias significativas en cuanto al tiempo medio total ( $p=0,214$ ) entre los pacientes con viabilidad superior a 65% y los que no alcanzan esta cifra. Si se observan diferencias significativas entre los pacientes con viabilidad mayor de 75% y menor que ésta en cuanto al tiempo medio total ( $p=0,026$ ). En la Figura 26 se muestra la relación entre los pacientes con viabilidad superior a 65 y 75% y los tiempos de clampaje total medio al que estuvieron sometidos.



\* Test de U de Mann-whitney

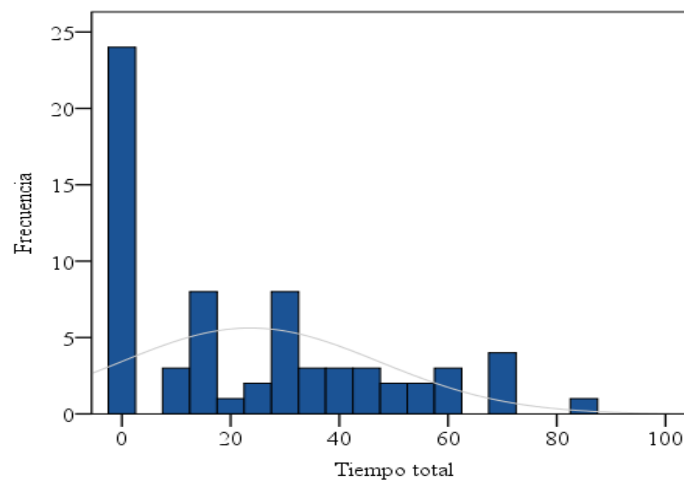
**Figura 26.- Media  $\pm$  EE del tiempo total en los aislamientos con viabilidad superior y no a 65 y 75%.**

Estudios previos han considerado los 30 minutos de clampaje el tiempo a partir del cual se producen consecuencias en la viabilidad de los hepatocitos aislados. En nuestro estudio, a partir de 30 minutos se observan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, de forma que los pacientes que superan este tiempo tienen una viabilidad media de 69,2% frente a una viabilidad de 73,2% de los que no lo superan ( $p=0,017$ ) (Fig.27).



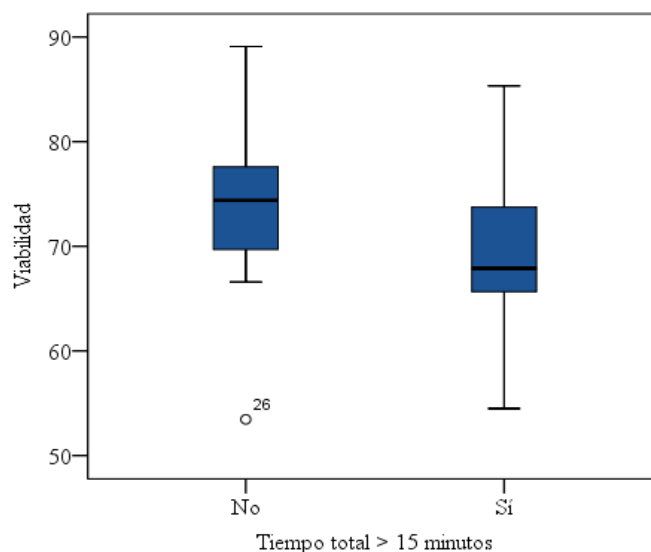
**Figura 27. Influencia del tiempo total de clampaje >30min en la viabilidad.**

También observamos diferencias significativas en la viabilidad para los puntos de corte de 20 minutos ( $p=0,014$ ) o 10 minutos ( $p=0,048$ ). Cabe destacar que por la distribución de nuestros datos, el punto de corte óptimo a considerar son **15 minutos**, mediana del tiempo total en nuestra población (Fig.28). Los pacientes con tiempo total superior a 15 minutos tienen una viabilidad media de 69,7% frente al 74,0% de los que el tiempo total es inferior ( $p=0,008$ ) (Fig.29).



**Figura 28. Distribución del tiempo total en nuestra población.**





**Figura 29. Influencia del tiempo total de clampaje >15min en la viabilidad.**

**6.2.4.- Análisis en los pacientes sometidos a clampaje intermitente, de la influencia del número de clampajes o el tiempo máximo de cada uno de ellos sobre la viabilidad y el rendimiento celular tras el aislamiento y la funcionalidad de los hepatocitos aislados “in vitro”.**

Al realizar el análisis valorando la relación entre el número de clampajes y el tiempo de estos en los pacientes sometidos a clampaje intermitente, tan sólo se observa relación lineal positiva estadísticamente significativa entre el número de clampajes y los niveles de albúmina, de forma que al aumentar el número de clampajes aumenta el nivel de albúmina producida por los hepatocitos en cultivo.

En las tablas 11 y 12 se aporta el coeficiente de correlación de Spearman así como el p valor asociado al estudio de la relación entre el “número de clampajes” y el “tiempo máximo” con las variables de viabilidad, rendimiento y funcionalidad hepática.

**Tabla 11. Relación lineal entre el número de clampajes y las variables a estudio.**

	Nº de CLAMPAJES	
	Coefficiente de Correlación	p valor*
Viabilidad	-0,091	0,640
Rendimiento	-0,071	0,724
Adhesión	-0,167	0,587
MTT	0,085	0,753
Albúmina	0,642	<b>0,045</b>
Urea	0,591	0,072

**Tabla 12. Relación lineal entre el tiempo máximo de clampaje y las principales variables a estudio.**

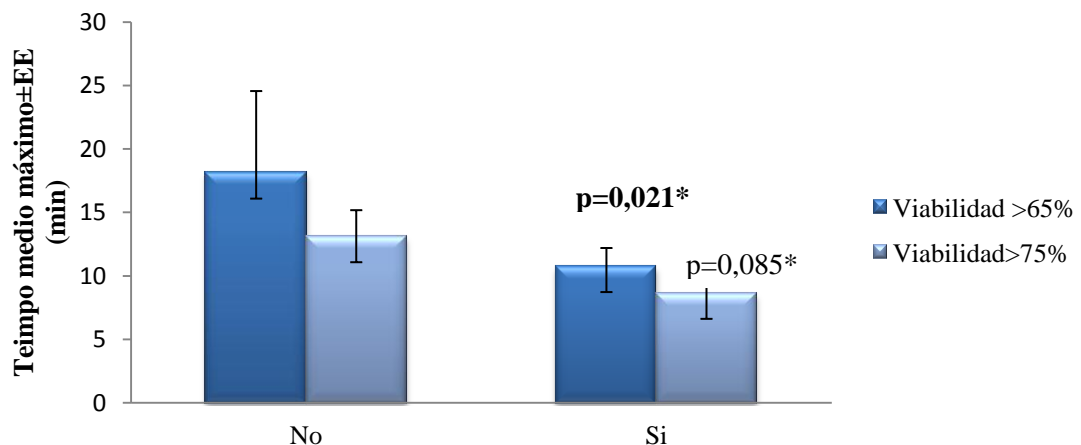
	Tº MAXIMO	
	Coefficiente de Correlación	p valor*
Viabilidad	-0,113	0,560
Rendimiento	-0,305	0,122
Adhesión	-0,166	0,587
MTT	0,201	0,456
Albúmina	0,277	0,456
Urea	0,240	0,504

Tras los resultados obtenidos se realizó un modelo de regresión lineal para valorar la influencia del tiempo máximo de clampaje sobre los niveles de albúmina. Se comprueba que al aumentar el tiempo máximo de clampaje en una unidad, la albúmina aumenta en 0.609 unidades, pero sin significación estadística ( $p=0.378$ ).

A continuación, se muestra un análisis realizado de los pacientes según presentaran o no viabilidad superior a 65 y 75%, relacionándolo con el número de clampajes y el tiempo máximo de estos. En este caso incluimos para el análisis la N total del estudio y no sólo aquellos que fueron sometidos a clampaje intermitente.

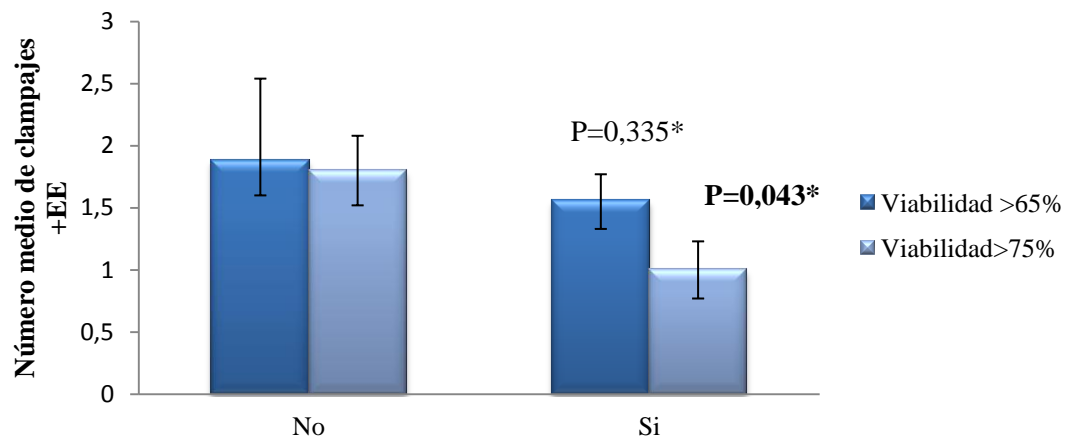
No existen diferencias significativas en cuanto al número medio de clampajes ( $p=0,335$ ) entre los pacientes con viabilidad superior a 65% (aislamientos de calidad aceptable) y los que no, pero sí en cuanto al tiempo medio máximo ( $p=0,021$ ), siendo este mayor en los pacientes con viabilidad inferior a 65% (Fig. 30 y 31).

Al realizar la misma comparación pero valorando pacientes que obtuvieron o no viabilidad superior a 75% (aislamientos de calidad buena), sí existen diferencias significativas en cuanto al número medio de clampajes ( $p=0,043$ ), siendo mayor en los pacientes con viabilidad inferior a 75%. La diferencia de medias no es significativa en cuanto al tiempo máximo ( $p=0,085$ ) (Fig. 30 y 31).



\* Test U de Mann-Whitney

**Figura 30. Influencia del tiempo máximo de clampaje (media  $\pm$  EE) en aislamientos con viabilidad superior o no a 65 y 67%**



\* Test U de Mann-Whitney

**Figura 31. Influencia del número de clampajes (media ± EE) en los aislamientos con viabilidad superior o no a 65 y 75%**

**6.2.5. Análisis del efecto de las variables derivadas del donante así como del procedimiento (diferentes a la isquemia por clampaje) sobre la viabilidad y rendimiento celular tras el aislamiento y la capacidad funcional de los hepatocitos aislados.**

#### **6.2.5.1. Edad**

Valorando la relación lineal entre las variables resultado de viabilidad, rendimiento y funcionalidad hepática, la edad del paciente no muestra relación estadísticamente significativa con ninguna de ellas (Tabla 13).

**Tabla 13.- Influencia de la edad en la viabilidad, el rendimiento celular y la funcionalidad hepática “in vitro”.**

	EDAD	
	Coefficiente de Correlación	p valor*
Viabilidad	-0,129	0,327
Rendimiento	-0,117	0,404
Adhesión	-0,229	0,271
MTT	-0,195	0,277
Albúmina	0,296	0,219
Urea	0,319	0,183

\*Coeficiente de correlación de Spearman

### 6.2.5.2. Sexo

La variable sexo del paciente tan solo presentó diferencias significativas en la variable MTT, observándose niveles de actividad MTT significativamente mayores en las muestras de donantes hombres que en las de donantes mujeres. En la tabla 14 se muestran los estadísticos descriptivos por sexo y las diferencias entre sus medias.

**Tabla 14. Influencia del sexo en la viabilidad, el rendimiento celular y la funcionalidad de los hepatocitos “in vitro”.**

SEXO		Mediana	Min-Max	Media	EE	p valor*
Viabilidad	Hombre	69,9	53,3-89,1	70,7	1,2	0,085
	Mujer	74,4	61,7-83,7	73,6	1,2	
Rendimiento	Hombre	1,9	0,3-8,7	2,3	0,3	0,211
	Mujer	3,7	0,6-16,1	3,8	0,8	
Adhesión	Hombre	79	48,5-96,9	76,6	2,4	0,197
	Mujer	84,7	69,0-95,9	84,1	4,6	
MTT	Hombre	0,8	0,2-1,7	0,7	0,0	<b>0,033</b>
	Mujer	0,3	0,2-0,9	0,4	0,1	
Albumina	Hombre	5,0	1,6-16,3	7,0	1,2	0,219
	Mujer	3,1	1,1-7,9	4,0	2,0	
Urea	Hombre	3256,0	1577,9-11633,1	4626,1	746,0	0,823
	Mujer	3269,0	2125,2-3669,1	3669,7	1027,1	

\*Test de U de Mann Whitney

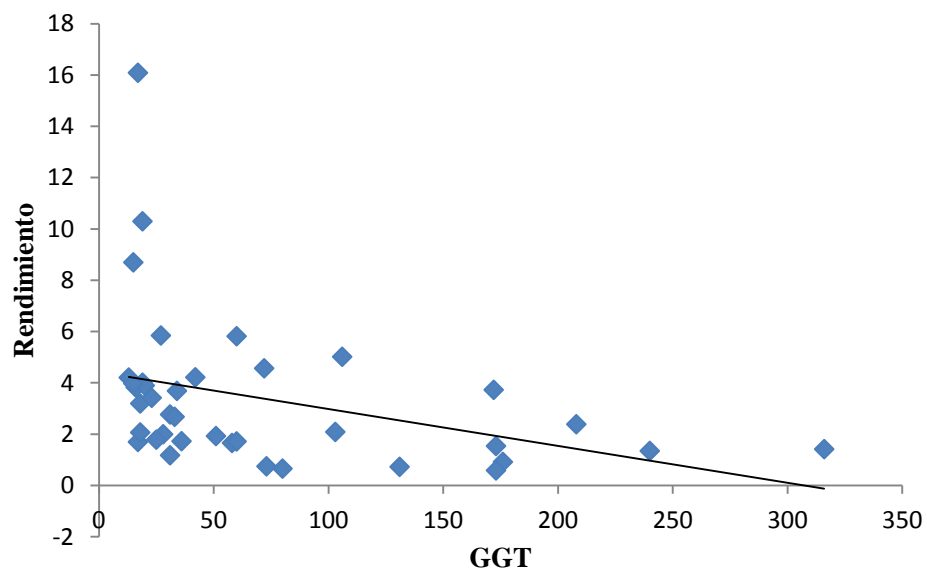
### 6.2.5.3. Variables analíticas del paciente

Valorando la relación lineal entre las variables resultado de viabilidad y funcionalidad hepática con las variables analíticas determinadas en muestras sanguíneas de los pacientes donantes previamente a la cirugía, no se observa relación alguna entre ellas.

Sólo se observa relación estadísticamente significativa entre los niveles preoperatorios de GGT del paciente y el rendimiento celular del aislamiento (Fig.32). Esta es una relación moderada negativa, de forma que al aumentar el nivel de GGT disminuye el rendimiento celular del aislamiento.

En cuanto a las pruebas funcionales la determinación de producción de albumina por el hepatocito presenta una relación lineal negativa con los niveles de bilirrubina preoperatoria del pacientes, sin llegar a ser este resultado estadísticamente significativo.

En la tabla 15 se muestra el coeficiente de correlación y el p valor para cada una de las relaciones estudiadas.



**Figura 32. Relación lineal entre GGT y Rendimiento celular.**

**Tabla 15. Relación lineal entre las determinaciones analíticas preoperatorias y las principales variables a estudio.**

		Viabilidad	Rendimiento	Adhesión	MTT	Albúmina	Urea
AST	Coef. Correlac.	0,1	-0,195	-0,063	0,009	-0,223	-0,268
	P valor	0,469	0,184	0,782	0,962	0,390	0,298
ALT	Coef. Correlac.	-0,082	-0,124	-0,112	0,109	-0,323	-0,162
	P valor	0,545	0,390	0,603	0,553	0,192	0,520
GGT	Coef. Correlac.	-0,218	-0,517	-0,298	0,193	-0,005	-0,251
	P valor	0,151	<b>0,001</b>	0,262	0,378	0,989	0,457
FA	Coef. Correlac.	0,188	-0,212	0,338	-0,023	-0,359	-0,547
	P valor	0,222	0,207	0,217	0,918	0,309	0,102
Bilirrubina	Coef. Correlac.	0,007	-0,082	-0,303	-0,035	-0,575	-0,258
	P valor	0,961	0,600	0,222	0,866	<b>0,050</b>	0,418
Act. Protombina	Coef. Correlac.	0,148	0,009	0,140	-0,113	-0,146	-0,049
	P valor	0,269	0,952	0,505	0,531	0,552	0,841
HB	Coef. Correlac.	0,015	0,211	0,169	0,144	-0,280	-0,306
	P valor	0,908	0,133	0,418	0,425	0,246	0,202
HTO	Coef. Correlac.	-0,072	0,213	0,202	0,214	-0,083	-0,148
	P valor	0,590	0,130	0,334	0,231	0,734	0,544

#### 6.2.5.4. Etiología oncológica.

Al analizar la influencia de la etiología oncológica de las muestras obtenidas se observa que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los valores medios referentes a viabilidad, rendimiento celular y funcionalidad hepática según los pacientes hayan sido sometidos a la resección hepática por patologías de origen benigno o maligno.

En la tabla 16 se recogen los resultados relacionados con la etiología de origen oncológico.

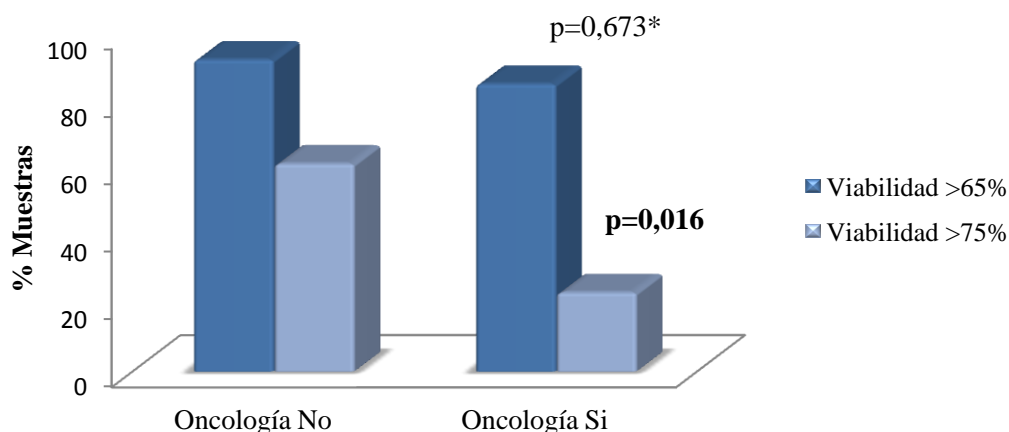


**Tabla 16. Influencia del origen oncológico con la viabilidad, rendimiento y funcionalidad del hepatocito “in vitro”.**

ETIOL. ONCOLÓGICA		Mediana	Min-Max	Media	EE	p valor*
Viabilidad	No	76,2	62,5-83,7	74,6	1,7	0,090
	Si	70,46	53,5-89,1	70,9	1,07	
Rendimiento	No	3,4	0,6-5,9	2,9	0,4	0,432
	Si	1,76	0,3-16,1	2,8	0,4	
Adhesión	No	85,9	80,0-91,4	85,8	2,3	0,075
	Si	77,3	48,5-96,9	76,6	2,4	
MTT	No	0,4	0,2-0,9	0,4	0,1	0,152
	Si	0,7	0,2-1,7	0,7	0,0	
Albumina	No	4,5	1,1-7,9	4,5	3,4	0,425
	Si	4,6	1,6	16,3	1,17	
Urea	No	3870,1	2125,2-5615,1	3870,1	1744	0,690
	Si	3258,5	1577,9-11633,1	4546,3	705	

\*Test de U de Mann-Whitney

Sin embargo, de forma estadísticamente significativa ( $p=0,016$ ), el 23,4% de los pacientes con lesión de origen oncológico presentan en el tejido aislado una viabilidad celular mayor del 75% (aislamientos de calidad buena) frente al 61.5% de los pacientes con lesión de origen no oncológico. El porcentaje de pacientes que presentan valores de viabilidad celular superior a 65% (aislamientos de calidad aceptable) también es superior en los donantes con etiología no oncológica, pero en este caso los resultados no son estadísticamente significativos (Figura 33).



\*Test exacto de Fisher

**Figura 33. Influencia de la etiología oncológica en el porcentaje de viabilidad > de 65 y 75%**

#### 6.2.5.5. Quimioterapia.

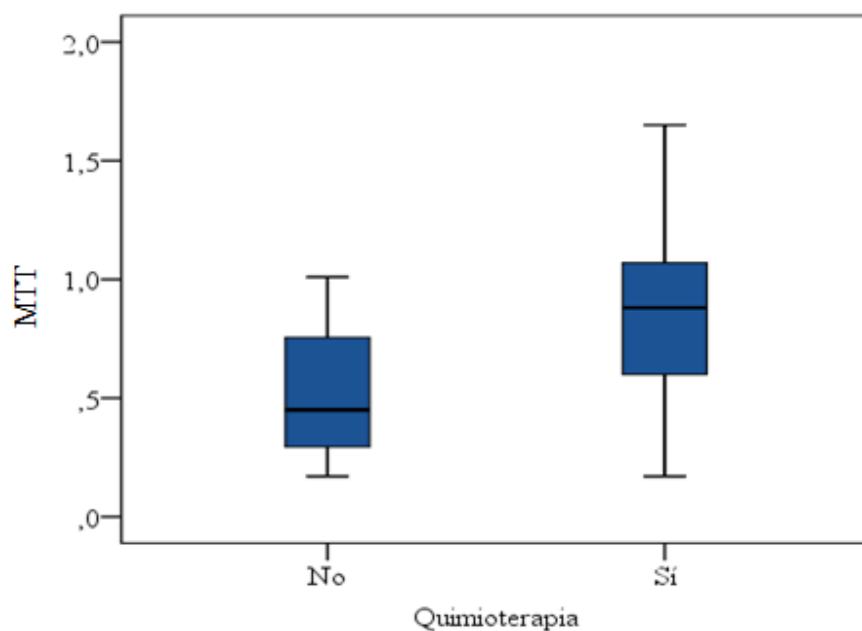
Al analizar las diferencias en la viabilidad y rendimiento celular entre los pacientes sometidos a tratamiento quimioterápico y los que no lo recibieron, se observan mayores valores medios en los pacientes no sometidos a quimioterapia, si bien estas diferencias no resultan estadísticamente significativas ( $p=0,051$ ).

En cuanto a la funcionalidad hepática, tan sólo se observan diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,014$ ) en los valores medios de actividad MTT, de forma que se observa una mayor actividad MTT en los hepatocitos obtenidos de pacientes que recibieron tratamiento quimioterápico (Fig.34). En la tabla 17 se muestran todos los resultados de este análisis.

**Tabla 17.- Influencia del tratamiento quimioterápico en la viabilidad, rendimiento y funcionalidad del hepatocito “in vitro”**

QUIMIOTERAPIA		Mediana	Min-Max	Media	EE	p valor*
Viabilidad	No	73,8	53,5-83,7	72,8	1,1	0,051
	Si	69,1	54,5-89,1	70,3	1,4	
Rendimiento	No	2,5	0,3-16,1	3,4	0,5	0,112
	Si	1,7	0,9-5,8	2,0	0,2	
Adhesión	No	82,3	48,5-96,9	78,1	3,9	0,532
	Si	77,3	65,6-95,9	78,1	2,3	
MTT	No	0,5	0,2-1,0	0,5	0,0	0,014
	Si	0,9	0,2-1,7	0,8	0,0	
Albumina	No	3,4	1,1-13,7	4,6	1,4	0,069
	Si	6,1	2,3-16,3	7,9	1,4	
Urea	No	2914,7	1577,9-11633,1	4055,1	1164,5	0,238
	Si	3430,5	2407,2-9001,4	4780,5	761,9	

\*Test de U de Mann-Whitney



**Figura 34. Influencia del tratamiento con quimioterapia en los niveles medios de MTT**

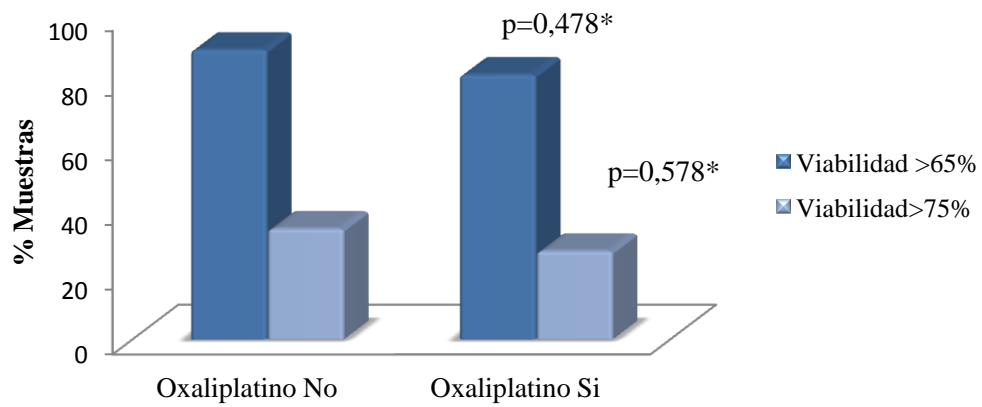
Tampoco existen diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ) entre los valores medios referentes a viabilidad y rendimiento celular según los pacientes hayan recibido tratamiento con oxaliplatino o no. En cuanto a las pruebas funcionales, la MTT continua siendo la única variable que muestra una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos de pacientes, de manera que los hepatocitos de pacientes tratados con oxaliplatino mostraron una actividad MTT media superior a los hepatocitos de aquellos pacientes que no recibieron tratamiento con oxaliplatino ( $p = 0,009$ ) (Tabla 18).

**Tabla 18.- Influencia de el tratamiento con oxaliplatino en la viabilidad, rendimiento y funcionalidad del hepatocito “in vitro”**

OXALIPLATINO		Mediana	Min-Max	Media	EE	p valor*
Viabilidad	No	73,0	53,5-83,7	72,3	1,1	0,165
	Si	69,0	54,5-89,1	70,7	1,8	
Rendimiento	No	2,5	0,3-16,1	3,2	0,5	0,205
	Si	1,7	0,9-5,8	2,0	0,3	
Adhesión	No	82,3	48,5-96,9	78,4	3,6	0,437
	Si	76,3	65,6-95,9	77,7	2,6	
MTT	No	0,5	0,2-1,1	0,5	0,7	<b>0,009</b>
	Si	0,8	0,3-1,7	0,8	0,1	
Albumina	No	3,4	1,1-13,7	4,6	1,5	0,075
	Si	6,1	2,3-16,3	7,9	1,5	
Urea	No	2914,7	1577,9-11633,1	4055,1	1164,5	0,310
	Si	3430,5	2407,2-9001,4	4780,5	761,9	

\*Test de U de Mann-Whitney

Analizando de forma específica las muestras según alcancen o no porcentajes de viabilidad superior a 65 y 75%, se observa que el porcentaje de muestras que alcanzan estos niveles es inferior en el grupo de donantes tratados con oxaliplatinos, comparado con el de los donantes que no recibieron este tratamiento, aunque sin llegar a la significación estadística (Fig. 35).



\*Test exacto de Fisher

**Figura 35.- Influencia del tratamiento con oxaliplatino en la viabilidad superior a 65 y 75 %**

## **7.- DISCUSIÓN**

La cirugía de resección hepática ha protagonizado grandes avances en los últimos treinta años, considerándose en la actualidad la técnica de elección en gran número de lesiones hepáticas de etiología tanto benigna como maligna<sup>7</sup>.

La maniobra de clampaje vascular aporta un mejor control del sangrado quirúrgico con un descenso de las pérdidas hemáticas del paciente y con ello una mejoría en la morbilidad postoperatoria. A pesar de que su uso se remonta a principios del Siglo XX cuando Pringle<sup>2</sup> la describe para el control del sangrado en los traumas hepáticos, es en los últimos 30 años cuando las diferentes técnicas de clampaje vascular se han convertido en una práctica habitual durante la cirugía de resección hepática.

Las publicaciones sobre el tema se han sucedido durante este tiempo. El estudio del daño hepático por isquemia-reperfusión<sup>57, 165</sup>, el análisis del tiempo máximo de isquemia que puede tolerar el parénquima hepático<sup>166, 167</sup>, los tipos de clampaje<sup>168</sup> o la utilidad del preacondicionamiento han sido los puntos analizados con mayor interés.

La mayoría de estas publicaciones se basan en revisiones con un número limitado de pacientes y con gran heterogeneidad entre ellas en cuanto al tipo de clampaje y al tiempo de isquemia, pero existen algunas revisiones sistemáticas que intentan sacar conclusiones de los datos publicados.

El equipo de revisores de Cochrane publica en 2007 y 2009<sup>169, 170</sup> dos revisiones con el objetivo de analizar las ventajas y desventajas del uso de clampaje durante la cirugía hepática y las diferentes técnicas existentes para su realización. Las revisiones concluyen diciendo que la maniobra de oclusión intermitente parece segura en la cirugía de resección hepática, aunque no puede ser recomendada de forma rutinaria y consideran la maniobra de Pringle como la técnica que posee más evidencias para ser empleada en la aplicación clínica. Estas conclusiones se basan, como hemos comentado, en estudios con un número limitado de pacientes y con un uso heterogéneo del tipo de clampaje, lo que no permite obtener conclusiones definitivas y el propio revisor comenta la necesidad de realizar nuevos estudios aleatorizados.

Más recientes son las revisiones de trabajos que intentan determinar si el clampaje de un solo hemihígado es menos perjudicial para el paciente que el clampaje del pedículo hepático

completo. Así, en 2011, Wang y col.<sup>168</sup> publican un meta-análisis a propósito del tema en el que concluyen que la oclusión vascular de un hemihígado, a pesar de presentar menos lesión hepática durante el postoperatorio, no ofrece beneficios satisfactorios en la morbilidad de los pacientes sometidos a resección hepática.

En todos estos trabajos, el análisis de los resultados se valora teniendo en cuenta los determinantes analíticos de funcionalidad hepática de los pacientes durante el periodo postoperatorio. A pesar de que los resultados de estos estudios han propuesto unas pautas aceptables en la práctica clínica diaria. Es difícil obtener a través de ellos conclusiones específicas del daño del hepatocito por el proceso de isquemia-reperfusión, ya que hay que tener en cuenta que la funcionalidad hepática postoperatoria del paciente va a estar influenciada por otros determinantes como el tamaño del remanente hepático, la anemia postoperatoria, la situación basal de los pacientes, la hepatitis tóxica por exceso de fármacos que el paciente puede sufrir o la aparición de complicaciones de la propia cirugía.

Los hepatocitos aislados tanto frescos como criopreservados, son células viables y presentan un amplio número de funciones hepáticas específicas “in vitro”. Son un recurso empleado a diario en el estudio de funciones y enfermedades hepáticas, desempeñan un papel clave para estudios farmacotológicos y son la base de la terapia celular hepática<sup>171, 172</sup>. El uso del hepatocito para estos fines está condicionado por la disponibilidad de células hepáticas viables. El aumento en la demanda de hepatocitos ha llevado a la publicación de estudios que intentan determinar las características tanto del donante de la muestra como del proceso de resección de la misma que pueden influir en el aislamiento, con el fin de maximizar la disponibilidad de células hepáticas, empleando muestras de mayor calidad. Estos trabajos se basan en el hecho de que el comportamiento del hepatocito en el aislamiento celular a partir de una muestra hepática va a ser un reflejo del comportamiento del resto de hepatocitos de un paciente en su propio organismo, de forma que tanto las características del donante como las agresiones a las que haya sido sometido ese tejido hepático durante la cirugía van a influir de forma directa en la calidad del hepatocito aislado.

El fin de nuestro trabajo es analizar los efectos de la isquemia caliente producida en el hígado durante las maniobras de clampaje vascular en la resección hepática, sobre la viabilidad y funcionalidad “in vitro” de los hepatocitos aislados del tejido resecado, así como sobre el rendimiento celular de los mismos. Para ello se han analizado un total de 67 muestras



hepáticas, obtenidas todas ellas de cirugías de resección realizadas por un mismo cirujano, empleando en todos los casos la misma técnica de clampaje y determinando en todos ellos el número y tiempo de los mismos. Además todas las muestras fueron analizadas por el mismo equipo investigador, cuyo laboratorio se encuentra localizado en el edificio del hospital en el que se realizaron las extracciones, facilitando así la recogida de las muestras, y asegurando un tiempo de isquemia fría inferior a 30 minutos en todos los casos.

Hasta el momento, los estudios publicados sobre el efecto de la isquemia caliente en la viabilidad, el rendimiento y la funcionalidad de los hepatocitos aislados, son escasos y heterogéneos. La mayoría de ellos se han realizado, como ya hemos comentado, con el fin de obtener las características de la muestra hepática que presenta mejor calidad para el aislamiento, tomando la isquemia como una variable más, sin realizar un estudio específico de características como el número de clampajes, el tiempo o tipo de los mismos y no teniendo presente la importancia de la homogeneidad de la técnica realizada por los diferentes cirujanos que obtuvieron la muestra<sup>140-147</sup>.

La mayoría de estos trabajos basan sus resultados en la determinación de la viabilidad y el rendimiento celular de los aislamientos, siendo muy escasos los que incluyen además pruebas de funcionalidad del hepatocito “in vitro” en su valoración.

### **7.1.- Validez del diseño del estudio:**

Previo a la discusión de los resultados obtenidos en cada uno de los objetivos del estudio, consideramos importante discutir la validez del diseño del estudio empleado.

El objetivo de nuestro estudio fue demostrar la influencia del daño por isquemia-reperfusión en la viabilidad de los hepatocitos aislados, el rendimiento celular del aislamiento y la funcionalidad hepática de los hepatocitos aislados y cultivados “in vitro”. Como ya se ha mencionado previamente, para adecuar nuestros resultados a estos objetivos propusimos un diseño específico para el mismo.

Se aceptaron tan sólo muestras hepáticas resultantes de resecciones quirúrgicas por diferentes patologías, evitando muestras de hígados rechazados para trasplante y aquellas de donantes

cadáver. También se rechazaron pacientes con patología hepática crónica, con el fin de evitar factores que influyeran de forma negativa en nuestros resultados. Se aceptaron tan sólo muestras obtenidas de intervenciones quirúrgicas realizadas por un mismo cirujano, asegurando así una misma técnica quirúrgica y un uso uniforme de las maniobras de clampaje. Los datos referentes al tiempo y número de clampajes fueron detallados por el propio cirujano en el protocolo quirúrgico, evitando pérdidas o errores en la recogida de los mismos. Todas las muestras fueron aisladas y analizadas por un único equipo investigador, manteniendo de esta manera una homogeneidad tanto en las técnicas de aislamiento y cultivo “in vitro” de hepatocitos, como de las técnicas analíticas empleadas.

El tamaño muestral de nuestro estudio (n=67) fue limitado por tratarse de un trabajo experimental prospectivo. Hasta 2014, todos los trabajos publicados con el fin de analizar las variables que influyen en la calidad del aislamiento y cultivo de hepatocitos, presentaban un tamaño muestral pequeño, con un número que oscilaba entre 10 y 149 donantes. Es en este año cuando Lee y col.<sup>147</sup> publican el trabajo más numeroso hasta la fecha, con 1034 muestras analizadas. Este elevado número de muestras les permitió obtener un mayor número de variables que de forma significativa influían en la calidad de los aislamientos realizados.

Hoy en día ninguno de los trabajos publicados con el fin de analizar la viabilidad, el rendimiento y la funcionalidad de los hepatocitos aislados ha sido diseñado de forma específica para determinar el daño por isquemia-reperfusión durante la maniobra de clampaje quirúrgico, por lo que a pesar de que en muchas ocasiones presentan resultados en este punto, quizás su diseño muestre errores que influyan de forma negativa en sus resultados.

La mayoría de trabajos que incluyen la variable isquemia caliente, sólo valoran la existencia o no de clampaje vascular, sin tener en cuenta el tiempo de clampaje, ni la maniobra que se empleó para dicho fin. Así trabajos como el de Lee y col.<sup>147</sup>, el más numeroso hasta la fecha con un total de 1034 muestras, sólo analiza la variable isquemia caliente en 602 de ellas y tan sólo recogen entre sus variables la existencia de isquemia caliente y el tiempo total de la misma, sin tener en cuenta el tipo de clampaje de los diferentes grupos quirúrgicos que aportan muestras ni el esquema de clampaje continuo o intermitente que éstos realizaron. Situaciones similares a ésta ocurren en otras publicaciones como las de Martínez<sup>142</sup> o Kawahara y col.<sup>154</sup>.

El trabajo de Vondran y col.<sup>151</sup> presenta una uniformidad quirúrgica similar a la de nuestro estudio, todas sus muestras provienen de resecciones hepáticas y todas ellas realizadas por un mismo equipo quirúrgico. Además excluyen también donantes con enfermedad hepática crónica y describen de forma clara en sus resultados el tipo de clampaje empleado y el tiempo del mismo. Sin embargo, al analizar los datos de forma detallada, tan sólo se realizó clampaje vascular en 6 pacientes y en todos ellos se empleó clampaje continuo. De esta forma los autores no pudieron comparar la influencia del uso de clampaje continuo e intermitente, además el número limitado de muestras sometidas a clampaje no les permitió obtener resultados sobre la influencia de la isquemia caliente en los aislamientos.

El trabajo de Lloyd y col.<sup>141</sup> también nos aporta unos datos claros en cuanto al tipo de maniobra de clampaje empleado, así como el tiempo de la misma. Analizaron 67 muestras a partir de las cuales presentan resultados sobre la isquemia caliente, describen una maniobra homogénea de clampaje en los pacientes que fueron sometidos a isquemia, empleando la maniobra de Pringle en la cual alternan 10 minutos de clampaje con 5 de reperusión. Como ocurre en el trabajo de Vondran y col.<sup>151</sup>, el empleo de una sola técnica de clampaje no les permitió comparar la influencia del uso de clampaje continuo e intermitente. Pero además este trabajo presenta otros factores que afectan a los resultados obtenidos: incluye entre sus muestras donantes de resecciones hepáticas así como de donantes multiorgánicos y entre los donantes de resecciones hepáticas una elevada proporción son por resecciones realizadas en centros localizados lejos del laboratorio de aislamiento, lo que provoca en muchos casos tiempos de isquemia fría que superan los 200 minutos.

Quizás el trabajo con un mejor diseño para comparar sus resultados con los obtenidos en nuestro estudio es el publicado por Alexandre y col.<sup>153</sup>. En él incluyen tan solo muestras resultantes de resecciones hepáticas, además describen de forma detallada el tiempo de clampaje, así como el empleo de clampaje continuo e intermitente y los tiempos específicos en cada caso. Sin embargo, este estudio no aporta datos sobre el número de clampajes realizados ni de la técnica empleada. Tampoco se da constancia de si los pacientes fueron intervenidos por un único o diferentes cirujanos.

Ritcher y col.<sup>145</sup> en su trabajo intentan comparar los resultados obtenidos por los grupos de Lloyd y de Alexandre, incluyendo así entre sus datos muestras analizadas en las dos publicaciones. Esto lo convierte en el único trabajo que nos aporta conclusiones en cuanto a la

influencia del uso de diferentes estrategias de clampaje, sin embargo, además del tipo de clampaje hay muchos otros detalles tanto del donante de la muestra como de la técnica realizada en el aislamiento que difieren en estos trabajos.

Podemos considerar que el diseño del estudio es el único hasta la fecha que permite estudiar de forma fiable el efecto del clampaje continuo e intermitente, considerando los tiempos y el número de clampajes. Además la homogeneidad de la técnica empleada permite disminuir al máximo la variabilidad debida a otros factores diferentes a los estudiados. En vista a los estudios realizados hasta la fecha en la literatura, el diseño permite ver cosas que otros estudios no permiten. También debemos considerar que la falta de estudios con un diseño como el empleado en nuestro caso, hace que los resultados obtenidos por nuestro grupo no puedan ser directamente contrastados con dichos estudios.

### **7.2.- Validez de los aislamientos realizados.**

Consideramos un punto importante previo a realizar una discusión de los resultados obtenidos, el analizar la idoneidad de los aislamientos realizados por nuestro equipo.

En nuestro trabajo todas las muestras fueron procesadas por un mismo equipo investigador empleando en todos ellos una técnica uniforme tanto para el aislamiento y el cultivo de los hepatocitos como para la determinación de los factores de viabilidad, rendimiento celular y funcionalidad del hepatocito “in vitro”. Esto es una práctica habitual en la mayoría de los trabajos publicados, obteniendo todos ellos sus resultados a partir de procesos realizados por un único equipo investigador. Tan sólo algunas publicaciones puntuales como la de Ritcher y col.<sup>145</sup> incluyen en sus estudios aislamientos de diferentes grupos de trabajo con procedimientos similares pero no idénticos, lo que compromete la obtención de resultados concluyentes al introducir una fuente más de variabilidad.

En cuanto a la técnica para el aislamiento, la perfusión de colagenasa en dos pasos fue la empleada por nuestro grupo, así como por la mayoría de grupos estudiados. Incluyendo todos ellos pequeñas modificaciones en el proceso. Tan sólo en el trabajo de Baccarani y col.<sup>165</sup> no mantiene una técnica común al del resto de publicaciones, realizando su proceso en base al empleo de una perfusión de colagenasa en cuatro tiempos.

### 7.2.1- Viabilidad

En los estudios publicados, las cifras obtenidas en la viabilidad de los aislamientos oscilan entre el 60 y el 91%<sup>155,173</sup>, cifras similares a las obtenidas en nuestro trabajo, con una viabilidad media de  $71,7 \pm 7,2\%$ .

Al analizar los trabajos que se han publicado con el fin de valorar los factores que influyen en la calidad del hepatocito, observamos cifras de viabilidad media muy similares a las obtenidas por nuestro grupo, así Lee y col.<sup>147</sup> muestran una viabilidad media de 78,6% y Vondran y col.<sup>151</sup> de 70,3%. Tan sólo trabajos como el de Bhogal y col.<sup>143</sup> en el que se incluyen hígados de donantes cirróticos, pendientes de trasplante, presentan cifras de viabilidad media muy inferior con porcentajes que descienden hasta el 40%.

La viabilidad es el parámetro más relevante a la hora de determinar la calidad de un aislamiento. A pesar de que se considera aceptable el obtener un porcentaje de viabilidad por encima del 50%, existe un consenso aceptado por la mayoría de grupos en el que no se aceptan viabilidades inferiores a 70% para la criopreservación, ya que esta disminuye al menos un 20% tras la descongelación, de manera que tras la misma se convertiría en cultivos no viables<sup>142,155</sup>.

Teniendo en cuenta esta premisa, al realizar el análisis de los resultados en nuestro trabajo, hemos tomado dos puntos de corte de viabilidad: Viabilidad superior al 65% considerando el aislamiento como aceptable y viabilidad superior a 75% considerándolo en este caso aislamiento de buena calidad. Esto nos ha permitido realizar un análisis específico de las variables en los aislamientos que conseguían viabilidades de calidad aceptable o buena.

### 7.2.2.- Rendimiento

El rendimiento del aislamiento celular se considera importante, sin embargo no es un factor tan decisivo como la viabilidad en el momento de seleccionar un buen donante

de hepatocitos. Además sus resultados son muy variables por lo que no es posible establecer una cifra como punto de corte óptimo para el TCH.

Al analizar el rendimiento del aislamiento, observamos la existencia de una gran variabilidad entre los grupos. Publicaciones como la de Martínez y col.<sup>142</sup> o Vondran y col.<sup>151</sup> presentan rendimientos muy elevados con cifras de  $12,03 \times 10^6$  cels. /g y  $18,7 \times 10^6$  cels. /g respectivamente. Sin embargo los rendimientos de otras publicaciones como la de Lloyd y col.<sup>141</sup> y Alexandre y col.<sup>153</sup> reducen estas cifras a  $5,4 \times 10^6$  cels. /g y  $4 \times 10^6$  cels. /g.

En nuestro estudio se obtuvieron niveles bajos de rendimiento en comparación con el resto de grupos con unos valores medios de  $2,9 \times 10^6$  cels. /g.

### 7.2.3.- Pruebas funcionales.

Si bien unos resultados aceptables en los parámetros de viabilidad y rendimiento son suficientes para considerar un aislamiento de calidad, la realización de pruebas funcionales nos aporta una visión más real sobre la calidad funcional del hepatocito. Son muy pocos los trabajos publicados con el fin de analizar los factores que influyen en la calidad del aislamiento y cultivo del hepatocito que incluyan pruebas funcionales en el análisis de sus resultados, además los parámetros de funcionalidad empleados diferentes entre los distintos grupos. Así, el trabajo publicado por Martínez Blasco<sup>142</sup> en 2012, incluye en sus resultados las variables actividad ECOD y testosterona-6- $\beta$  hidroxilasa como parámetros indicadores de funcionalidad hepática, mientras otros trabajos como el de Vondran y col.<sup>151</sup> emplean la determinación de proteínas totales y la producción de urea y albúmina con este mismo fin.

Las pruebas sobre la actividad del citocromo P450 y la determinación de las enzimas responsables en el metabolismo de fármacos, como las que analiza el grupo de Martínez Blasco<sup>142</sup> son especialmente útiles en estudios de metabolismo de fármacos o en el ámbito clínico del hepatocito dedicado a trasplante, en el que los beneficiarios van a recibir gran cantidad de fármacos. Sin embargo, no suelen utilizarse en pruebas de screening como la que proponemos en nuestro estudio.

La producción de urea por el hepatocito en cultivo es un buen indicador del rendimiento hepático y del grado de preservación mitocondrial, trabajos como el nuestro, o como el de Vondran y col.<sup>151</sup> lo incluyen entre sus variables al considerarlo un buen marcador de funcionalidad ya que sirve para estimar el estado del hepatocito.

La determinación de producción de albúmina por el hepatocito fue otra de las pruebas funcionales empleadas en el equipo de Vondran y col.<sup>151</sup> y que también incluimos en nuestro estudio. Su presencia refleja la capacidad que tiene el hígado para sintetizar proteínas, además sus niveles pueden indicar si los hepatocitos han sufrido algún tipo de daño durante la isquemia de reperfusión debida a la cirugía, por lo que consideramos que su cuantificación es muy útil como marcador de daño celular.

Además de las determinaciones de producción de albúmina y urea, en nuestro trabajo también se realizó la determinación de la adhesión celular a placa y la actividad de MTT. El primero es un buen indicador de la calidad de las suspensiones celulares, siendo el segundo un buen método para medir la supervivencia y proliferación celular.

Existen dos limitaciones importantes a la hora de emplear las pruebas funcionales en el análisis de la calidad funcional del hepatocito. La primera es que son pruebas que aumentan la dificultad técnica del procedimiento y los costes del mismo, lo que conlleva que en estudios como el nuestro no pueda ser realizada en todas las muestras, obteniendo una “n” de menor tamaño en estas determinaciones y probablemente dificultando la obtención de resultados significativos. La segunda limitación es la gran variabilidad interindividual entre donantes, ya que dependen de muchos otros factores como el tipo de alimentación o el estado nutricional<sup>147</sup>, lo que dificulta la extracción de resultados concluyentes cuando el número de resecciones es reducido o limitante.

### **7.3.- Estudio de los factores que influyen en la viabilidad, rendimiento y funcionalidad del hepatocito “in vitro”**

Con el fin de extraer conclusiones claras de los resultados obtenidos en base a los objetivos de nuestro estudio, realizamos un análisis detallado de los diferentes puntos del mismo:

#### **7.3.1.- Influencia del uso de clampaje vascular en la viabilidad de los hepatocitos aislados, el rendimiento celular del aislamiento y la funcionalidad hepática de los hepatocitos aislados y cultivados “in vitro”.**

En el presente estudio la isquemia caliente que se produce al realizar la maniobra de clampaje vascular durante la cirugía de resección hepática, provocó un daño por isquemia-reperfusión en el hepatocito que conllevó un descenso significativo en la viabilidad del aislamiento.

El clampaje supuso un descenso significativo del porcentaje de viabilidad obtenida en los aislamientos, de manera que a partir de todas las muestras que no habían sido sometidas a clampaje se obtuvieron aislamientos de calidad al menos aceptable (viabilidad >65%), mientras que un 20% de las muestras que si fueron sometidas a las maniobras de clampaje los aislamientos resultaron de calidad no aceptable (viabilidad <65%). En cuanto a los aislamientos de calidad buena (viabilidad >75%) éstos se dieron en un 45% de las muestras que no fueron sometidas a clampaje, descendiendo esta cifra al 25% cuando los aislamientos se obtenían de muestras que si habían sido sometidas, si bien en esta ocasión las diferencias no llegaron a ser estadísticamente significativas.

El empleo del clampaje vascular no influyó de forma significativa en el rendimiento celular del aislamiento. Sin embargo, los resultados muestran un rendimiento celular medio claramente inferior en los aislamientos obtenidos de muestras de donantes que fueron sometidos a clampaje frente a las obtenidas de donantes no sometidos a clampaje y aunque, las diferencias no alcanzan la significación estadística si se observa una tendencia ( $p=0,057$ ). Seguramente, un mayor tamaño muestral nos permitiría obtener resultados significativos en este punto.



En cuanto a las pruebas funcionales, no existen diferencias estadísticamente significativas entre los valores medios de ninguno de los cuatro parámetros funcionales analizados.

Las maniobras de clampaje son una variable constante en los trabajos publicados a la hora de identificar aquellas muestras hepáticas que conllevan un aislamiento y cultivo de calidad. Trabajos como el de Alexandre y col.<sup>153</sup> muestran resultados similares a los obtenidos en nuestra serie, con un descenso de la viabilidad y el rendimiento celular en los pacientes sometidos a clampaje. En el trabajo de Lee et al<sup>147</sup>, el más numeroso publicado hasta la fecha (N=1034), la isquemia caliente se estudió en 602 pacientes con un descenso significativo en el rendimiento celular de aquellas muestras cuyos donantes fueron sometidos a clampaje, en este caso el descenso de la viabilidad no fue significativo.

También existen estudios que contradicen nuestros resultados, así Vondran y col.<sup>151</sup> consideran que la isquemia caliente no es una variable influyente en el rendimiento celular ni en la viabilidad del aislamiento, si bien, a pesar de ser un estudio con un diseño adecuado y con una técnica quirúrgica estandarizada, tan solo se realizó clampaje en 6 de las 50 muestras analizadas por lo que sus resultados con respecto a este punto son poco concluyentes.

El trabajo de Martínez<sup>142</sup> publicado en 2012 es el único que incluye pruebas funcionales a la hora de analizar la influencia de la isquemia caliente en la calidad del cultivo. Al igual que en nuestro estudio, el tiempo de isquemia caliente tampoco influyó significativamente en la funcionalidad del hepatocito.

En la tabla 19 mostramos un resumen de los resultados obtenidos por los diferentes grupos en cuanto a la influencia de la isquemia caliente en la viabilidad y funcionalidad de los hepatocitos aislados, así como en el rendimiento del aislamiento.

**Tabla 19. Comparación de los resultados publicados sobre la influencia del clampaje vascular en la viabilidad y el rendimiento celular y los obtenidos en el presente estudio.**

	Año	N	Viabilidad	Rendimiento	Pruebas funcionales
<i>Lee y col.</i> <sup>147</sup>	2014	602	No	Si*	--
<i>Martínez y col.</i> <sup>142</sup>	2012	136	No	Si**	No
<i>Vondran y col.</i> <sup>151</sup>	2007	50	No	No	--
<i>Lloyd y col.</i> <sup>141</sup>	2004	67	No	No	--
<i>Alexandre y col.</i> <sup>153</sup>	2002	149	Si	Si***	--
<b>Presente estudio</b>	2015	667	Si****	No	No

\*p= 0.00068

\*\*p=0.003

\*\*\*p=0,009

\*\*\*\*p=0.026

Además de estos estudios, cabe destacar el realizado por Kawahara y col.<sup>154</sup> en 2010 en el que con el fin de valorar la calidad de los hepatocitos aislados previo a la realización de un trasplante celular, además de determinar el rendimiento celular del aislamiento y la viabilidad de los hepatocitos, propone un estudio experimental empleando un modelo de ratón de trasplante de hepatocitos humanos, de manera que consideran el índice de proliferación de los hepatocitos humanos injertados en este modelo de ratón como un parámetro más en la determinación de la calidad del hepatocito. Tras analizar los datos el autor concluye que la isquemia caliente es un parámetro que influye de forma significativa tanto en el porcentaje de viabilidad de los aislamientos como en la tasa de éxito de los trasplantes realizados.

### **7.3.2.- Influencia de la técnica de clampaje (continuo-intermitente) en la viabilidad de los hepatocitos aislados, el rendimiento celular del aislamiento y la funcionalidad hepática de los hepatocitos aislados y cultivados “in vitro” .**

La revisión publicada por el grupo Cochrane en 2007<sup>169</sup> considera la oclusión intermitente de la triada portal como la técnica con mayor número de evidencias publicadas en cuanto a la seguridad de su uso y su efectividad en la protección del sangrado quirúrgico, considerándola así la técnica de elección en la práctica clínica.

Los resultados obtenidos en este estudio no muestran diferencias significativas en la viabilidad de los hepatocitos aislados ni en el rendimiento celular del aislamiento al comparar las muestras de donante sometidos a clampaje continuo o intermitente. Analizando de forma detallada los datos de nuestro estudio, el tiempo de isquemia entre los pacientes sometidos a clampaje continuo e intermitente no presenta una distribución homogénea. Entre los donantes sometidos a clampaje continuo en ningún caso el tiempo total excedió los 30 minutos, sin embargo, en aquellos en los que el clampaje fue intermitente presentaron tiempos de isquemia de entre 20 y 84 minutos. Así podemos considerar que la gran variabilidad de tiempos dentro del clampaje intermitente dificultó la obtención de resultados estadísticamente significativos en la viabilidad y el rendimiento celular.

En cuanto a las pruebas de funcionalidad hepática sí que se observan diferencias significativas en el parámetro MTT, obteniendo valores superiores en las muestras sometidas a clampaje intermitente, en comparación con aquellas que fueron sometidas a clampaje continuo, considerándolo así un factor protector en la calidad funcional del hepatocito. Hasta la fecha ningún trabajo había presentado resultados significativos en cuanto a la influencia del tipo de clampaje en las diferentes pruebas de funcionalidad hepática.

Los trabajos publicados muestran resultados contradictorios sobre el efecto del uso de clampaje continuo o intermitente sobre la viabilidad y rendimiento celular o la funcionalidad hepática, al contrario de lo que sucede en la mayoría de indicaciones

sobre el uso de clampaje en la práctica clínica, donde se recomienda el empleo intermitente del mismo. En los estudios publicados por Wagenveld y col.<sup>176</sup> en el 2000 y posteriormente por Alexandre y col.<sup>153</sup> en 2002, indican que el empleo de clampaje intermitente es más perjudicial para el tejido hepático que el uso de clampaje continuo. Posteriormente, en 2004, Ritcher y col.<sup>145</sup> realizaron un análisis específico de esta variable. En su trabajo incluyeron 58 de los 170 pacientes pertenecientes al estudio francés publicado por Alexandre et al<sup>174</sup> en el 2003, y los 72 pacientes del estudio de Lloyd y col.<sup>141</sup> en 2004 en el Reino Unido. En el estudio francés se realizó clampaje continuo e intermitente. Entre los clampajes intermitentes el tiempo de clampado fue variable, oscilando de 7-40 minutos, con un tiempo de reperusión entre 5 y 15 minutos. En el estudio del Reino Unido se realizó en todos los pacientes un clampaje intermitente con 10 minutos de clampaje y 5 de reperusión. A la hora de analizar la influencia del clampado continuo en comparación del intermitente Ritcher y col. concluyeron que en estos pacientes la realización del clampaje intermitente presenta diferencias significativas en el rendimiento del cultivo sólo en aquellos casos en los que el clampaje se había realizado según la técnica francesa y no cuando se realizó siguiendo las indicaciones del grupo del Reino Unido, es decir, 10 minutos clampado y 5 perfundido. Ante los resultados obtenidos, los autores sugieren que el daño celular no parece estar relacionado sólo por la vasoconstricción post-isquemia causada por la interrupción del suministro de sangre y oxígeno como sugieren Uhlmann y col.<sup>175</sup> y Wagenveld y col.<sup>176</sup> en sus trabajos, sino también por el tiempo de isquemia *per se*, como ya sugirieron Lloyd y col.<sup>141</sup> previamente.

Quizás en parte el autor tenga razón al considerar los tiempos de isquemia como parte de la causa que provocó una diferencia en sus resultados, sin embargo los resultados obtenidos por nuestro grupo en cuanto a las diferencias en la funcionalidad hepática según el empleo de los distintos tipos de clampaje abre una puerta al estudio en profundidad de este tema, pudiendo llegar a demostrarse en un análisis futuro con un mayor número de muestras el factor protector del clampaje intermitente en el daño por isquemia-reperusión.

### **7.3.3.- Influencia del tiempo total de clampaje sobre la viabilidad de los hepatocitos aislados, el rendimiento celular del aislamiento y la funcionalidad hepática de los hepatocitos aislados y cultivados “in vitro”.**

Durante mucho tiempo se temió que la isquemia caliente, al privar de oxígeno a los hepatocitos podía provocar daño celular e insuficiencia hepática postoperatoria. Esta afirmación ha sido debatida por múltiples estudios que han demostrado con sus resultados que el hígado sano y el hígado cirrótico pueden soportar hasta 120 minutos y 30 minutos de isquemia caliente respectivamente sin que se produzcan alteraciones significativas<sup>177-179</sup>.

En nuestro estudio el tiempo total de clampaje influyó de forma significativa en el aislamiento, de manera que a medida que aumentaba el tiempo de clampaje se producía un descenso tanto de la viabilidad de los hepatocitos aislados como del rendimiento celular del aislamiento.

Como se ha comentado con anterioridad, en nuestro trabajo hemos considerados aislamientos de buena calidad a aquellos que presentaron una viabilidad > 75%. Pues bien, al analizar de forma específica los aislamientos que obtuvieron estos resultados, el tiempo medio de isquemia total en ellos fue significativamente inferior al que presentaron los pacientes con viabilidades menores del 75%. Por lo que podemos considerar que los aislamientos de buena calidad provienen de muestras que fueron sometidas a menores tiempos de isquemia.

Por contra, cuando se analizó la influencia del tiempo total en los parámetros de funcionalidad hepática, no se encontró efecto significativo del tiempo total de clampaje sobre ninguno de los parámetros analizados.

Los resultados obtenidos están en concordancia con los obtenidos en otros estudios previos. Alexandre y col.<sup>153</sup> en 2002 ya relataban la existencia de una correlación negativa entre la duración de la isquemia y el porcentaje de viabilidad del aislamiento. Consideraban que los pacientes sometidos a un tiempo total de isquemia superior a 30 minutos presentaban una disminución significativa de la viabilidad. En cuanto al

rendimiento, a pesar de observar también datos que sugerían la presencia de esa correlación negativa, no obtuvieron resultados estadísticamente significativos. Posteriormente trabajos más recientes como el de Martínez<sup>142</sup> en 2012 han corroborado estos resultados, situando también el punto de inflexión en los 30 minutos.

El trabajo de Kawahara y col.<sup>154</sup> en modelo de ratón de trasplante de hepatocitos humanos, muestra resultados similares. Mostrando una correlación negativa entre el tiempo total de isquemia caliente y la viabilidad del aislamiento. Además también demuestra la existencia de esta correlación negativa del tiempo de isquemia caliente con la tasa de éxito del trasplante de hepatocitos humanos en el ratón.

Analizamos también el tiempo de isquemia total a partir del cual el aislamiento va a presentar una disminución significativa de la viabilidad. A pesar de que apoyamos las conclusiones publicadas por Martínez y Alexandre al considerar que los pacientes sometidos a un clampaje superior a 30 minutos presentan viabilidades significativamente inferiores a los que fueron sometidos a clampajes inferiores a 30 minutos. En nuestro trabajo se ha demostrado que tiempos de clampaje total inferiores a 30 minutos también van a provocar un descenso en el porcentaje de viabilidad, situando en nuestro caso el punto de referencia los 15 minutos, de manera que los pacientes sometidos a un tiempo de clampaje superior a 15 minutos presentan daño hepático por isquemia-reperfusión que se ve reflejado con un descenso significativo de la viabilidad celular en los aislamientos.

### **7.3.4.- Influencia del número de clampajes o el tiempo máximo de cada uno de ellos sobre la viabilidad de los hepatocitos aislados, el rendimiento celular del aislamiento y la funcionalidad hepática de los hepatocitos aislados y cultivados “in vitro”**

Hasta la fecha no se han publicado trabajos que estudien de forma específica el efecto del tiempo máximo de clampaje o el número total de los mismos sobre la viabilidad y el rendimiento celular de los aislamientos y la funcionalidad hepática de los hepatocitos aislados.

En nuestro estudio el tiempo máximo de clampaje no influyó de forma significativa en la viabilidad de los hepatocitos, el rendimiento celular ni la funcionalidad hepática de los hepatocitos aislados, sin embargo, al analizar de forma específica los aislamientos que fueron considerados como aceptables por alcanzar cifras de viabilidad superior al 65%, el tiempo máximo medio en estos, fue significativamente inferior en comparación con aquellos aislamientos que no superaron el 65% de viabilidad.

El número total de clampajes, tampoco influyó de forma significativa en la viabilidad de los hepatocitos ni en el rendimiento celular del aislamiento. En cuanto a las pruebas funcionales, tan sólo la albúmina mostró un ligero, pero significativo aumento de sus niveles al aumentar el número de clampajes, si bien este dato se extrae del análisis de tan sólo 10 muestras por lo que no podemos tomarlo como un resultado concluyente.

En este caso, al analizar de forma específica los aislamientos que fueron catalogados como buenos por presentar cifras de viabilidad superiores al 75%, se observó que el número medio de clampajes realizados en los donantes de las muestras de estos aislamientos fue significativamente inferior al que presentaban los donantes de aislamientos con viabilidad inferior al 75%.

Tras estos resultados podemos considerar que el número de clampajes y el tiempo máximo de estos, influyó de forma significativa en la capacidad de obtención de aislamientos de calidad buena y aceptable. Siendo probable que un aumento en el

tamaño muestral de nuestro estudio nos permitiera obtener una influencia directa entre estos factores y las variables de calidad del aislamiento.

Como ya se ha comentado, hasta hoy no existen trabajos que analicen estas dos variables de forma específica, si bien en el trabajo de Ritcher y col.<sup>145</sup> que comparan pacientes del grupo francés de Alexandre<sup>174</sup> y del grupo del Reino Unido de Lloyd<sup>141</sup>, se observaron diferencias significativas entre el uso de diferentes patrones de clampaje, de forma que el uso de un clampaje con tiempos máximos menores como el que empleó el grupo de Lloyd, no presentó diferencias significativas con los pacientes que no precisaron clampaje, mientras en el uso de clampaje según la maniobra del grupo de Alexandre en el que se usaron tiempos más largos de isquemia, estas diferencias sí que estuvieron presentes, y de forma significativa.

Así podemos considerar que a pesar de que precisamos de estudios más específicos y con mayor número de pacientes, los diferentes esquemas de clampaje parecen influir sobre la viabilidad y el rendimiento celular del aislamiento de hepatocitos humanos y la funcionalidad de los mismos.



### **7.3.5.- Variables asociadas tanto al paciente donante de la muestra como al procedimiento, que influyen en el resultado del aislamiento del hepatocito.**

#### **7.3.5.1.- Edad.**

En nuestro estudio la edad del donante de la muestra hepática no influyó en la viabilidad de los hepatocitos ni en el rendimiento celular. Tampoco influyó en los resultados de ninguno de los parámetros analizados de funcionalidad hepática. Por lo tanto, consideramos que la edad del paciente no afecta a la calidad final del aislamiento celular.

La edad del donante es una variable constante en el estudio de los factores que influyen en la calidad del aislamiento hepático, pero los resultados publicados hasta la fecha son muy variables. Blanco y col.<sup>180</sup> en 2000 y posteriormente Richert y col.<sup>145</sup> y Martínez<sup>142</sup> en 2004 y 2012 respectivamente, presentan resultados similares a los obtenidos en nuestro estudio, al no encontrar relación significativa entre la edad y los parámetros que analizan para determinar la calidad del aislamiento.

Entre los trabajos que presentan resultados significativos en este punto todos consideran la edad como un factor negativo para la calidad del aislamiento, sin embargo estos trabajos no siguen un patrón uniforme a la hora de analizar la edad de los donantes. Vondran y col.<sup>151</sup> compararon donantes con edades superiores a 50 años, observando en éstos un descenso significativo en el rendimiento celular. Al analizar sus resultados, los autores concluyeron que en su grupo de pacientes resecaados la edad estaba relacionada con la etiología del tumor aislado, de forma que los pacientes de menor edad presentaban lesiones benignas, por lo que consideraron que sus resultados no permitían concluir que la edad por si misma afectara el rendimiento celular. Bhogal y col.<sup>143</sup> también mostraron un descenso significativo de la viabilidad en donantes de mayor edad, pero en este caso las diferencias aparecieron cuando la edad del donante era superior a los 60 años. Bonora-Centelles y col.<sup>144</sup> por su parte, debieron ascender la edad de los pacientes a 80 años para conseguir un descenso

significativo, reflejándose el descenso en este caso tanto en la viabilidad de los hepatocitos como en el rendimiento celular.

Obtenemos resultados más concluyentes en los trabajos publicados por Kawahara y col.<sup>153</sup> en el que afirmaron la existencia de una correlación negativa de la edad del donante con la viabilidad del aislamiento y con la tasa de éxito de trasplante en ratones transplantados con hepatocitos humanos. Y también en la reciente publicación de Lee y col.<sup>147</sup> con 1034 muestras en las que obtuvieron un descenso significativo tanto de la viabilidad de los hepatocitos como del rendimiento celular en aquellas muestras de tejido resecado pertenecientes a los pacientes de mayor edad.

Pese a los resultados obtenidos en este estudio y en vista de los resultados de otros estudios, la edad del donante de la muestra hepática es un factor que parece influir en la calidad final del cultivo de hepatocitos. Probablemente la falta de significación en nuestro estudio así como en otros estudios publicados se deba a las limitaciones en el tamaño muestral empleado.

#### **7.3.5.2.- Sexo**

El sexo no se considera un parámetro que influya en la calidad final del aislamiento del hepatocito, así en nuestro estudio, al igual que en la mayoría de estudios publicados no existe influencia del sexo en la viabilidad de los hepatocitos aislados ni en el rendimiento celular del aislamiento<sup>153, 154</sup>.

Sí encontramos diferencias significativas en la actividad de MTT entre los dos sexos, de manera que las muestras obtenidas de donantes varones presentaron niveles superiores de MTT que las que fueron obtenidas de donantes mujeres, lo que reflejaba un mayor nivel de actividad mitocondrial en éstos.

El trabajo de Martínez<sup>142</sup> también encontró diferencias significativas entre sexos al analizar las pruebas de funcionalidad hepática, pero en este caso con resultados contradictorios. Determinaron una mayor actividad de la enzima testosterona-6-β hidroxilasa en las muestras de donante mujer, sin embargo, al

incluir la actividad ECOD en el análisis multivariante, observaron un aumento significativo de la actividad de la misma en las muestras de donantes varones. Los autores no encontraron una explicación lógica a estos resultados, considerándolos una consecuencia de la gran variabilidad interindividual en cuanto a la actividad enzimática, y a la dependencia de ésta de muchos otros factores como el tipo de alimentación o el estado nutricional<sup>147</sup>.

### 7.3.5.3.- Parámetros analíticos

Entre las múltiples variables analíticas estudiadas por los diferentes grupos de trabajo, quizás los más analizados y los que en más ocasiones han mostrado una influencia en la calidad de las células aisladas son los niveles de bilirrubina y la actividad de las enzimas GOT y GGT en suero<sup>147-153</sup>.

De las variables analizadas por nuestro equipo (AST, ALT, GGT, fosfatasa alcalina, bilirrubina total, actividad de protombina, hemoglobina y hematocrito) tan sólo los niveles de GGT en sangre preoperatoria mostraron influencias significativas en la calidad del aislamiento, observándose una relación negativa con el rendimiento celular, de manera que al aumentar los niveles de GGT del donante de la muestra, disminuyó el rendimiento celular del aislamiento. En cuanto a los resultados en la viabilidad y funcionalidad de los hepatocitos ninguna de las variables analizadas presentaron diferencias significativas.

Alexandre y col.<sup>153</sup>, ya en 2002, publicaron resultados similares, con un descenso en el rendimiento celular de las muestras con niveles altos de GGT. Vondran y col.<sup>151</sup> en 2008, además de observar un descenso significativo de la viabilidad en los pacientes con GGT elevada, encontraron también una afectación significativa de la funcionalidad de las células aisladas en estos pacientes, al observarse un descenso en el contenido total de proteínas totales y en la síntesis de albúmina en los hepatocitos procedentes de las muestras de donantes que presentaban niveles elevados de GGT. Existe una explicación

lógica para estos resultados, ya que un nivel de GGT elevado en suero es un conocido marcador de daño hepático causado por factores tales como cirrosis, hepatitis o el abuso crónico de alcohol.

La existencia de colestasis en las determinaciones analíticas preoperatorias es otro punto de interés analizado por los diferentes grupos. Mientras Richert y col.<sup>145</sup> mostraron resultados similares a los de nuestro trabajo, al no encontrar influencias entre el nivel de colestasis de los pacientes y la calidad final del aislamiento, Alexandre y col.<sup>153</sup> describen un menor crecimiento del cultivo, aunque en sus resultados las diferencias no alcanzan la significación estadística. Es en el trabajo de Vondran y col.<sup>151</sup> donde sí se observa un descenso significativo en la viabilidad del aislamiento, pero este descenso sólo se produce cuando los pacientes presentan un perfil analítico de colestasis severa. En nuestro estudio tan sólo 8 pacientes presentaron signos de colestasis en las analíticas preoperatorias, por lo que probablemente este bajo número de pacientes con colestasis pudo hacer que no se observase su efecto negativo a nivel de la viabilidad y funcionalidad del hepatocito.

Por su parte Lee y col.<sup>147</sup> en su trabajo, quizás por el hecho de presentar un número mucho mayor de muestras analizadas, encuentran influencias significativas en un mayor número de perfiles analíticos. Así consideran que los niveles elevados de fosfatasa alcalina, GOT, GPT, GGT, bilirrubina total y tiempo parcial de tromboplastina provocan un descenso significativo en el rendimiento celular. Y la viabilidad desciende de forma significativa en muestras de donantes con niveles elevados de GOT, GPT, GGT y bilirrubina total. Estos resultados se obtienen del análisis univariable de los mismos. Al realizar el análisis multivariante, tan sólo los niveles elevados de GOT producen un descenso significativo del rendimiento celular, quedando los niveles de GGT y de bilirrubina total como los parámetros analíticos influyentes en la viabilidad del aislamiento.

En cuanto al resto de parámetros analíticos estudiados por los diferentes grupos no existen datos concluyentes. Aunque cabe destacar los resultados obtenidos por el equipo de Martínez<sup>142</sup> al observar un descenso significativo de la

actividad ECOD y testosterona-6- $\beta$  hidroxilasa del aislamiento en los cultivos de muestras de donantes con niveles elevados de hematocrito. La explicación que encuentran los autores a estos resultados fue que a mayores cifras de hematocrito, existe mayor cantidad de oxígeno en sangre, lo cual llevaría a pensar que para obtener la misma actividad enzimática “in vivo”, podría ser suficiente una menor cantidad de enzima, de tal modo que un nivel sostenido de hematocrito elevado podría conducir a una menor síntesis del enzima, y por tanto, al determinar la actividad del enzima “in vitro”, al haber menor cantidad de enzima, la actividad también es menor. Si bien es un argumento interesante, en la actualidad no existen datos en la literatura que permitan aceptar esta afirmación.

#### **7.3.5.4.- Fibrosis hepática**

La fibrosis hepática se desarrolla en respuesta a muchos tipos de enfermedades hepáticas crónicas. Su desarrollo está estrechamente vinculada con la inflamación y la muerte celular, por lo que no es de extrañar que los hepatocitos aislados de hígados fibróticos tengan una viabilidad significativamente menor.

En nuestro estudio no se ha podido realizar un análisis adecuado de esta variable, ya que uno de los criterios de exclusión del mismo fue la existencia de cirrosis moderada o severa (Child B y C). Esta premisa ha limitado a un solo paciente el número de muestras que presentan cirrosis hepática en el análisis histológico de las piezas. Muchas otras publicaciones como los trabajos de Ritcher y col.<sup>145</sup> o Vondran y col.<sup>151</sup> tampoco aportan resultados significativos al considerar también la cirrosis como criterio de exclusión.

Serene y col si incluyeron en su estudio pacientes con cirrosis hepática encontrando en sus resultados una disminución significativa tanto del rendimiento como de la viabilidad del aislamiento en aquellos hígados que presentaban fibrosis septal<sup>147</sup>.

Bhogal y col.<sup>181</sup> en 2010 realizaron un estudio específico de este punto, valorando la funcionalidad de hepatocitos aislados de muestras de hígados enfermos frente muestras de hígados sanos. Su estudio mostraba que los hepatocitos aislados de tejido hepático enfermo estaban sometidos a un microambiente hipóxico crónico, que conllevaba una mayor producción de ROS en respuesta a esa situación de hipoxia/ reoxigenación, induciendo así la apoptosis del propio hepatocito. Los autores en vista a los datos obtenidos concluyeron que existían importantes diferencias funcionales y metabólicas entre los hepatocitos aislados de hígados normales y los hepatocitos aislados de hígados con enfermedad en fase terminal.

Este mismo grupo en 2011, tras aceptar la fibrosis hepática por enfermedad hepática como un claro factor negativo en la calidad del aislamiento de hepatocitos, y realizaron un posterior estudio comparando la viabilidad y rendimiento celular y funcionalidad de los hepatocitos de hígados de todo tipo: muestras hepáticas normales, muestras de resecciones hepáticas (tumores benignos y tumores malignos) y muestras de hígados cirróticos. Entre los hígados cirróticos diferenciaron las enfermedades que lo habían provocado, así los clasificaron en: Hígados de pacientes con enfermedad hepática alcohólica; cirrosis biliar; colangitis esclerosante primaria y otras enfermedades hepáticas en fase terminal (fibrosis quística, hepatitis autoinmune...). Tras el análisis de los resultados los autores concluyeron que la obtención de aislamientos viables a partir de hígados cirróticos era posible aunque con un descenso importante de la tasa de éxito de los aislamientos. Además, al analizar de forma específica las diferentes enfermedades, observaron que las muestras de hígados con cirrosis de origen alcohólico presentaban rendimientos celulares y niveles de producción de albúmina significativamente más bajos que el resto de las muestras de hígados cirróticos, mientras que las muestras procedentes de hígados con cirrosis biliar presentaban una mayor tasa de éxito del aislamiento de hepatocitos humanos que el resto de muestras cirróticas, con mayores rendimiento y mayores niveles de producción de albúmina y urea<sup>143</sup>.

### 7.3.5.5.- Esteatosis hepática.

A la hora de analizar las alteraciones histológicas de las muestras hepáticas que pueden influir en los resultados del aislamiento, la esteatosis hepática es la más repetida entre los diferentes grupos.

En nuestro estudio no hemos observado que la existencia de esteatosis hepática influya significativamente en la viabilidad, rendimiento o funcionalidad del aislamiento, si bien hay que tener en cuenta que tan sólo 7 de los 67 pacientes presentaban signos de esteatosis hepática en el análisis histopatológico, lo que no permite obtener resultados concluyentes de los datos recogidos en este punto.

Los hepatocitos esteatóxicos tienen mayores niveles de especies reactivas de oxígeno intracelulares y son por tanto potencialmente más susceptibles a los daños, lo que justificaría los resultados obtenidos por la mayoría de autores como Vondran y col.<sup>151</sup> o Lee y col.<sup>147</sup>, quienes observan una clara influencia negativa de la esteatosis hepática en la viabilidad de sus aislamientos. Tan sólo el estudio de Lloyd y col.<sup>151</sup> muestra resultados contradictorios en este punto, considerando la presencia de esteatosis como un factor con influencia positiva en la viabilidad del aislamiento. La determinación subjetiva de la esteatosis en este grupo, a través de una estimación visual de la misma, podría explicar las diferencias encontradas en sus resultados.

Alexandrova y col.<sup>155</sup> en 2005 publican un artículo en el que proponen un procedimiento de rutina para el aislamiento de hepatocitos a partir de órganos de donantes rechazados para trasplante, entre los que se incluyen muestras de hígados esteatóxicos. Sus resultados muestran que las muestras obtenidas a partir de órganos que presentan niveles de esteatosis severa derivan generalmente en aislamientos fallidos, concluyendo que no es económicamente viable el uso de hígados con esteatosis severa para aislamiento de hepatocitos.

Trabajos posteriores como el de Sagias y col.<sup>146</sup> proponen de nuevo el uso de estos hígados para el aislamiento de hepatocitos, buscando maniobras que

consigan aumentar el rendimiento de los mismos. Tras su estudio los autores sugieren que la adición de N-acetilcisteína durante la perfusión de las soluciones de digestión, puede mejorar el rendimiento celular en el aislamiento de hepatocitos de hígados esteatósicos.

#### **7.3.5.6.- Etiología oncológica**

Parece lógico pensar que las muestras obtenidas de hígados con enfermedades oncológicas presenten peores resultados de viabilidad y rendimiento celular, así como de funcionalidad de los hepatocitos aislados, sin embargo todavía no se han obtenido resultados concluyentes que lo confirmen.

En nuestro trabajo no se observaron diferencias significativas en la viabilidad, rendimiento ni funcionalidad de los hepatocitos entre las muestras de pacientes con etiología hepática benigna o maligna. Sin embargo, al analizar de forma específica los considerados como aislamientos de buena calidad (viabilidad > 75%), el porcentaje de muestras con lesiones de origen oncológico fue significativamente inferior al que presentaron las muestras con lesiones de origen benigno, de manera que mientras la mayor parte de las muestras benignas dieron origen a aislamientos de buena calidad, en las muestras de hígados oncológicos menos de una cuarta parte consiguieron alcanzar esta calidad en el aislamiento.

Entre los estudios publicados en la literatura encontramos diferentes resultados. Así, estudios como los Lee y col.<sup>147</sup> y Kawahara y col.<sup>154</sup> no evidencian que la etiología oncológica de la lesión que indica la resección hepática previa a la obtención de la muestra, sea un factor que influya en la viabilidad y rendimiento celular ni en la funcionalidad de los hepatocitos aislados.

Por el contrario, estudios como el de Vondran y col.<sup>151</sup>. muestran que los hepatocitos aislados de donantes intervenidos por patología benigna, presentan mayor viabilidad y rendimiento que aquellos donantes que son intervenidos por una patología de origen oncológico.



Es fácil obtener una explicación lógica al hecho de que el origen de la patología hepática influya en los resultados del aislamiento ya que en los hígados con patología benigna, el parénquima hepático circundante no afectado conserva su función normal y por ello será de alto valor para el aislamiento de hepatocitos. Sin embargo, en los tumores malignos primarios como el hepatocarcinoma o el colangiocarcinoma, la inflamación crónica, la cirrosis y un complejo patrón de estímulos como el producido por citoquinas o factores de crecimiento producen una alteración en todo el parénquima hepático, disminuyendo la calidad del tejido para el aislamiento de hepatocitos. El tejido hepático circundante a tumores secundarios a menudo no presenta cambios, lo que resulta en un aumento del rendimiento celular en comparación con los tumores primarios.

#### **7.3.5.7.- Tratamiento quimioterápico.**

Como en la mayoría de trabajos, las metástasis hepáticas de carcinoma colorrectal fueron la causa más frecuente de resección hepática en nuestros donantes. Este hecho hace que el número de muestras sometidas a tratamiento quimioterápico en los meses previos a la toma de la misma fuese elevado. Al analizar las diferencias en la viabilidad y rendimiento celular entre los pacientes sometidos a tratamiento quimioterápico y los que no lo recibieron, no encontramos diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo estas diferencias significativas si se ven reflejadas en las pruebas funcionales de nuestros aislamientos, de forma que los hepatocitos aislados de pacientes sometidos a tratamiento quimioterápico presentaron niveles medios de MTT significativamente superiores a los de los pacientes que no los recibieron.

En 2006, Hewes y col.<sup>150</sup> publican un trabajo con el objetivo de analizar la influencia de la quimioterapia en la viabilidad y funcionalidad de los hepatocitos. Para ello analizan 47 muestras de hígados con metástasis colorrectal. Tras analizar sus resultados los autores no encuentran diferencias significativas entre los aislamientos sometidos o no a quimioterapia antes de la

resección. Tampoco observan diferencias en la actividad del citocromo P450 ni de las enzimas de fase II.

Trabajos posteriores han mostrado resultados contradictorios, así el trabajo de Martínez<sup>142</sup> muestra una influencia negativa del uso de quimioterápicos preoperatorios en la viabilidad del aislamiento, mientras otros estudios como el de Lee y col.<sup>147</sup> obtienen un aumento significativo del rendimiento celular en estos pacientes. Los autores proponen las siguientes explicaciones a los resultados obtenidos. Mientras que Lee y col. consideran que el uso de quimioterápicos produce una reducción de las proteínas de la matriz extracelular, como el colágeno, permitiendo una digestión más completa de la pieza de hígado con colagenasa y por tanto provocando así un aumento en el rendimiento del aislamiento de hepatocitos. Martínez explica sus resultados por la afectación del daño hepático demostrado al utilizar determinados agentes quimioterápicos, como son la esteatohepatitis o el daño sinusoidal del irinotecan y el oxaliplatino respectivamente.

Probablemente, las diferencias encontradas pueden ser debidas a la generalización de las terapias quimioterápicas, sin tener en cuenta el tipo específico de tratamiento que ha llevado cada paciente. Con el fin de analizar de forma específica la afectación de ciertos quimioterápicos en nuestro estudio se analizó de forma específica a los pacientes que habían sido sometidos a oxaliplatino o irinotecan, estos quimioterápicos fueron elegidos al existir estudios en la literatura que demuestran el daño hepático que ambos provocan<sup>182,183</sup>. En el caso del irinotecan no fue posible la realización de su análisis ya que ninguno de nuestros donantes recibió su tratamiento, en cuanto al oxaliplatino, tras el análisis de los datos no se observó influencia significativa del mismo sobre la viabilidad o el rendimiento celular de los aislamientos.

## **7.4.- Limitaciones del estudio**

### **7.4.1.- Tamaño muestral**

La principal limitación de nuestro estudio, al igual que en la mayoría de estudios publicados es el tamaño muestral.

La mayoría de trabajos experimentales presentan un número de muestras reducidas. En nuestro caso, el limitar las muestras a aquellas procedentes de resecciones hepáticas realizadas por un único equipo quirúrgico y el hecho de excluir entre nuestros pacientes a portadores de VHC, VHB y enfermos de cirrosis Child B y C, ha limitado el número de muestras a 67, a pesar de ampliar el tiempo de recogida de las mismas a 5 años.

### **7.4.2.- Limitación de las pruebas funcionales.**

Al inicio del trabajo se incluyeron las pruebas funcionales como variables a determinar en todas las muestras, sin embargo las dificultades técnicas para la realización de las mismas y su elevado coste no permitió que fuesen analizadas en todos los casos. La actividad de MTT es la que se realizó de forma más numerosa llegando al 50% de las muestras obtenidas (n=33). Esta sea quizás la causa de que sea la variable de funcionalidad de la que se han obtenido un mayor número de resultados significativos.

### **7.4.3.- Variables sin capacidad de análisis.**

Entre las variables independientes de la isquemia que influyen en la calidad del aislamiento y cultivo de hepatocito, existen algunas que tras la realización de la recogida de datos se observó un número mínimo o una distribución

heterogénea de las mismas no siendo posible la realización del análisis estadístico.

Así son el caso de la cirrosis hepática, presente en un solo paciente o de la esteatosis hepática con tres pacientes con afectación leve y cuatro con afectación moderada.

A pesar de las limitaciones, el trabajo tiene validez y nos ha permitido alcanzar los objetivos planteados. Sin embargo, teniendo en cuenta que la principal limitación es el limitado tamaño muestral, consideramos que éste estudio ha sido como un primer paso, proponiéndonos como siguiente objetivo una ampliación del número de muestras que nos permita confirmar los resultados obtenidos.



## **8.- CONCLUSIONES**

1. La realización de clampaje vascular durante la cirugía de resección hepática provoca un descenso significativo de la viabilidad de los hepatocitos aislados del tejido resecado.
2. Un tiempo de clampaje total superior a 15 minutos provoca un descenso significativo de la viabilidad celular del aislamiento de los hepatocitos aislados del tejido resecado
3. El incremento del tiempo total de clampaje por encima de los 15 minutos provoca un descenso significativo tanto de la viabilidad como del rendimiento celular en el aislamiento de los hepatocitos del tejido resecado.
4. La discontinuidad del clampaje durante la resección hepática no mejora la viabilidad de los hepatocitos aislados de las muestras resecadas ni el número de células viables obtenidas por g de tejido, si bien la actividad MTT de los hepatocitos aislados es significativamente superior para aquellas muestras de pacientes sometidos a clampaje intermitente, que para aquellas de pacientes sometidos a clampaje continuo
5. Las muestras obtenidas de donantes sometidos a un menor número de clampajes y a un menor tiempo máximo de los mismos dan lugar a un mayor número de aislamientos con viabilidades celulares superiores al 65 y 75%.
6. Los niveles elevados de GGT preoperatoria del paciente provocan un descenso en el rendimiento celular del aislamiento de los hepatocitos del tejido resecado, siendo ésta la única variable de las estudiadas diferente al uso de clampaje vascular que influye de forma significativa en la calidad de los hepatocitos aislados de resecciones hepáticas.

# ***BIBLIOGRAFÍA***



**BIBLIOGRAFÍA**

1. *Mc Clusky DA, Skandalakis LJ, Colborn GL et al. Hepatic Surgery and hepatic surgical anatomy: Historical partners in progress. World J Surg. 1997; 21: 330-42.*
2. *Pringle JH. Notes of the arrest of hepatic hemorrhage due to trauma. Ann Surg. 1908; 48:541-9.*
3. *Foster JH, Berman MH. Solid liver tumours. Major Probl Clin Surg. 1977; 22:1-342.*
4. *Jarnagin WR, Gonen M, Fong Y, et al. Improvement in perioperative outcome after hepatic resection. Analysis of 1803 consecutive cases over the past decade. Ann Surg. 2002; 236:397-407.*
5. *Robles R, Marin C, Fernandez JA, et al. Hacia la mortalidad cero en las resecciones hepáticas. Presentación de 200 casos consecutivos. Cir Esp. 2005;78(1):19-27.*
6. *Casanova D, Figueras J, Pardo F. Cirugía Hepática. Guías de la Asociación Española de Cirujanos. Madrid: Arán; 2004.*
7. *Hugh TJ, Poston TJ. Benign liver tumor and masses. En: Blumgart LH, Fong Y, editors. Surgery of the liver and biliary tract. London: WB Saunders; 2000. p. 1397-422.*
8. *Ramia JM, Muffak K, Villar J, et al. Tumores hepáticos sólidos benignos. Cir Esp. 2005; 77(5):247-53.*
9. *Martin L, Rodríguez, Correo F. Tumores hepáticos benignos. En: Bruguera M, Miño G, Pons F, Moreno R, editores. Tratamiento de las enfermedades hepáticas y biliares. Madrid: ELBA S.A; 2001. p. 239-45.*
10. *D'Angélica M, Fong J. Hígado. En: Beauchamp RD, Evers BM, Mattox KL. Sabiston. Tratado de Cirugía. Madrid: Elsevier; 2005. p. 1513-573.*

11. Hermann P, Pugliese V, Machado MAC, et al. Hepatic adenoma and focal nodular hyperplasia: differential diagnosis and treatment. *World J Surg.* 2000; 24:372-6.
12. Foster JH, Berman MM. The malignant transformation of liver cell adenomas. *Arch Surg.* 1994; 129: 712-717.
13. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide. Sources, methods and major patterns in Globocan 2012. *Int J Cancer.* 2015; 1:136(5):E359-86.
14. Bilbao I, Lázaro JL, Castells L, Charco R. Estado actual del hepatocarcinoma y prespectivas futuras. *Jano: medicina y humanidades.* 2010; 1762:49-59.
15. Donato F, Tagger A, Gelatti U, et al. Alcohol and hepatocellular carcinoma: The effect of lifetime intake and hepatitis virus infections in men and women. *Am J Epidemiol.* 2002; 155:323-31.6.
16. El-Serag HB, Hampel H, Javadi F. The association between diabetes and hepatocellular carcinoma: A systematic review of epidemiologic evidence. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2006; 4:369-80.
17. Colli A, Fraquelli M, Casazza G, et al. Accuracy of ultrasonography, spiral CT, magnetic resonance, and alpha-fetoprotein in diagnosing hepatocellular carcinoma: a systematic review. *Am J Gastroenterol.* 2006; 101:513-23.
18. Lau WY. Primary hepatocellular carcinoma. En: Blumgart LH, Fong Y, editors. *Surgery of the liver and biliary tract.* London: WB Saunders; 2000. p. 1423-450
19. Forner A, Ayuso C, Isabel Real M, et al. Diagnóstico y tratamiento del carcinoma hepatocelular. *Conferencia de Consenso. Med Clin.* 2009; 132:272-87.
20. Fuster J, García-Valdecasas JC. Tumores primarios de Hígado. En: Parrilla P, Landa JI. *Manual de la Asociación Española de Cirujanos.* Madrid: Panamericana; 2009.p.657-664.

21. *Mazzaferro V. Results of liver transplantation: with or without Milan criteria? Liver Transpl. 2007; 13(11 Suppl 2):S44-7.*
22. *Fong Y, Kemeny N, Lawrence TS. Cancer of the liver and biliary tree. En: DeVita VT, Hellmans S, Rosenberg SA. Cancer Principles and Practice of Oncology. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2001.p. 1162-1203.*
23. *Weber SM, Jarnagin WR, Klimstra D, et al. Intrahepatic cholangiocarcinoma: Resectability, recurrence pattern, and out-comes. J Am Coll Surg. 2001; 193: 384-391.*
24. *La Quaglia MP. Liver tumors in children. En: Blumgart LH, Fong Y. Surgery of the liver and Biliary tract. London: WB Saunders; 2000. p. 1423-1450.*
25. *Lipshutz G, Brennan T, Warren R. Thorotrast-induced liver neoplasia: a collective review. J Am Coll Surg. 2002; 195: 713-8.*
26. *Bruguera M, Rodes J. Tumores mesenquimatosos malignos del hígado. En: Rodes J, Benhamon JP, Bircher J, Maintyre N, Rirreto M. Tratado de hepatología clínica. Masson-Salvat Medicina; 1993. p. 1244-6.*
27. *Shrikhande S, Kleeff J, Adyanthaya K, et al. Management of hepatobiliary cystadenocarcinoma. Dig Surg. 2003; 20: 60-3.*
28. *Noronha V, Shafi N, Obando JA, et al. Primary non-Hodgkin's lymphoma of the liver. Crit Rev Oncol Hematol. 2005; 53: 199-207.*
29. *Adam R, Hoti E, Bredt LC. Estrategias oncoquirúrgicas en el cáncer hepático metastático. Cir Esp. 2011; 89:10-9.*
30. *Winter, J. Metastatic malignant liver tumors Colorectal cancer. En: Jarnagin & Blumgart. Blumgart's Surgery of the Liver, Pancreas and Biliary Tract. 5th ed. Saunder: Elsevier; 2012. p. 1290-304.*
31. *Kemeny N, Kemeny ML. Dawson Liver Metastases. En: Abeloff'S. Clinical Oncology. 4th ed. Churchill Livingstone. Elsevier; 2008.*

32. Vauthey J. *Highlight of the AHPBA 2006 Consensus Conference: focus on improving resectability in patients with hepatic colorectal metastases*. San Francisco, 2006.
33. Solbiati L, Livraghi T, Goldberg SN et al. *Percutaneous radio-frequency ablation of hepatic metastases from colorectal cancer: long-term results in 117 patients*. *Radiology*. 2004; 221(1):159-66.
34. Ohlson B, Stenram U, Tranberg KG, et al. *Resection of colorectal liver metastases: 25-year experience*. *World J Surg*. 1998; 22: 268-277.
35. Khan S, Nagorney DM, Que FG. *Metastatic malignant liver tumors: Neuroendocrine*. En: Jarnagin & Blumgart. *Blumgart's Surgery of the Liver, Pancreas and Biliary Tract*. 5th ed. Saunders. Elsevier; 2012. p. 1305-18.
36. Clary B. *Treatment of isolated neuroendocrine liver metastases*. *J Gastrointest Surg*. 2006; 10, 332-334.
37. Sutcliffe R, Maguire D, Ramage J, et al. (2004). *Management of neuroendocrine liver metastases*. *Am J Surg*. 187, 39-46.
38. Adam R, Chiche L, Aloia T, et al. *Hepatic resection for noncolorectal nonendocrine liver metastases. Analysis of 1452 patients and development of a prognostic mode*. *Ann Surg*. 2006; 244 (4): 524-535.
39. Blanc JF, Lepreux S. *Histophysiologie Hépatique*. En: *Encycl Med Chir*. Paris: Elsevier; 2002. p. 13.
40. Geerts A. *History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells*. *Semin Liver Dis*. 2001; 21:311-335.
41. Lauth WW, Greenway CV. *Conceptual review of de hepatic vascular bed*. *Hepatology*. 1987; 7:952-963.
42. Schmucker DL. *Liver function and phase I drug metabolism in the elderly: a paradox*. *Drugs Aging*. 2001; 18(11):837-51.

43. Henry A. *Bile Secretion*. En: Jarnagin & Blumgart. *Blumgart's Surgery of the Liver, Pancreas and Biliary Tract*. 5th ed. Saunder: Elsevier; 2012. p. 113-22.
44. Cooper AJL. *Animo acid metabolism and synthesis or urea*. En: Zakim D, Boyer TD. *Hepatology: A text book of Liver Disease*. Philadelphia: WB Saunders; 2003. p. 81-126.
45. Zakim D. *Metablolism of glucose and fatty acids by the liver*. En: Zakim D, Boyer TD. *Hepatology: A text book of Liver Disease*. Philadelphia: WB Saunders; 2003. p. 49-80.
46. Castell JV. *Hígado: generalidades*. En: Vinardell F. *Enfermedades Digestivas*. Vol 3. Madrid-Barcelona: Aula Médica; 1998. p.1640-56.
47. Donato MT. *¿Qué es el citocromo P-450 y cómo funciona?* En: Gómez-Lechón LJ. *Citocromo P-450. Monografía nº14 de la Real Academia de Farmacia*. Marid; 2004. p. 29-62.
48. Casanova D, figueras J, Pardo F. *Anatomía quirúrgica del hígado. Fundamentos de las resecciones hepáticas*. En: *Cirugía hepática. Guías clínicas de la Asociación Española de Cirujanos*. Madrid: Aran Ediciones; 2004. p. 25-42.
49. Couniaud C. *Le foie. Études anatomiques et chirurgicales*. París: Masson; 1957.p. 469-79.
50. Lázaro L. *Anatomía quirúrgica del hígado: importancia para las resecciones hepáticas*. En: Lazaro L. *Cirugía hepática*. La Habana: Editorial Ciencias médicas; 2009. p. 13-33.
51. Strasberg S, Belghity J, Clavien PA, Gadzije E, Garden JO, Lau WY, Makkuchi M, Strong RW. *The Brisbane 2000 Terminologyof liver anatomy and resection. Terminology committee of the international Hepato-pancreato- Biliary Association: Chairman: HPB 2000; 2: 333-339*.

52. Ibrahim S, Chen CL, Lin CC, et al. Intraoperative blood loss is a risk factor for complications in donors after living donor hepatectomy. *Liver Transplant.* 2006; 12(6): 950-7.
53. Launois B, Jamieson GG. *Modern operative techniques in liver surgery.* Edinburgh, London: Churchill Livingstone; 1993.
54. Bismuth H, Castaing D, Garden OJ, et al. Major hepatic resection under total vascular exclusion. *Ann Surg.* 1989; 210:13-9.
55. Elias D, Lasser P, Dabaene B, et al. Intermittent vascular exclusion of the liver (without vena cava clamping) during major hepatectomy. *Br J Surg.* 1995; 82: 1535-39.
56. Elias-Miro M, Jimenez Castro M, Peralta C. Ischemia-reperfusion injury Associated with Liver Transplantation in 2011: Past and Future. En: Abdeldayem H, Allam N. *Liver transplantation- Basic issues.* 2012.p. 22-56.
57. Papadopoulos D, Siempis T, Theodoracou E, et al. Hepatic ischemia and reperfusion injury and trauma: current concepts. *Arch trauma Res.* 2013; 2(2): 63-70.
58. Fondevila C, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW, et al. Hepatic ischemia/reperfusion injury a fresh look. *Exp Mol Pathol.* 2003; 74:86-93.
59. Ildefonso JA, Arias-Díaz J. Fisiopatología de la lesión hepática por isquemia reperusión. *Cir Esp.* 2010; 87 (4): 202-209.
60. Jaeschke H. Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury. *J Gastroenterol Hepatol.* 2000; 15:718-24.
61. Ardizzone G, Stratta C, Valzan S, et al. Acute blood leukocyte reduction after liver reperfusion: A marker of ischemic injury. *Transplantation Proceedings.* 2006; 38:1076-7.
62. Jaeschke H, Lemasters JJ. Apoptosis versus oncotic necrosis in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Gastroenterology.* 2003; 125:1246-57.

63. Schwabe RF, Brenner DA. Mechanisms of liver injury. I. TNF alpha-induced liver injury: Role of IKK, JNK, and ROS Pathways. *J Physiol-Gastroin Liver Physiol.* 2006; 290:583-9.
64. Pevni D FI, Schwartz D, Schwartz I, et al. New evidence for the role of TNF-Alpha in liver ischaemic/reperfusion injury. *Eur J Clin Invest.* 2008; 38:649-55.
65. Glantzounis GK, Salacinski HJ, Yang W, et al. The contemporary role of antioxidant therapy in attenuating liver ischemia-reperfusion injury: A review. *Liver Transplant.* 2005; 11:1031-47.
66. Nieminen AL, Byrne AM, Herman B, et al. Mitochondrial permeability transition in hepatocytes induced by t-BuOOH: NAD (P) H and reactive oxygen species. *American Journal of Physiology.* 1997; 272:1286-94.
67. Fan C, Zwacka RM, Engelhardt JF. Therapeutic approaches for ischemia/reperfusion injury in the liver. *J Mol Med.* 1999; 77:577-92.
68. Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J.* 1994; 298:249-58.
69. Cuzzocrea S, Riley DP, Caputi AP, et al. Antioxidant therapy: A new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacological Reviews.* 2001; 53:135-59.
70. Chida N, Hirasawa Y, Ohkawa T, et al. Pharmacological profile of FR260330, a novel orally active inducible nitric oxide synthase inhibitor. *Eur J Pharmacol.* 2005; 509:71-6.
71. Hsu C-M, Wang J-S, Liu C-H, et al. Kupffer cells protect liver from ischemia-reperfusion injury by an inducible nitric oxide synthase-dependent mechanism. *Shock.* 2002; 17:280-5.
72. Collard CD, Lekowsky R, Jordan JE, et al. Complement activation following oxidative stress. *Mol Immunol.* 1999; 36:941-8.

73. Cutrin JC, Perrelli MG, Cavalieri B et al. Microvascular dysfunction induced by reperfusion injury and protective effect of ischemic preconditioning. *Free Radical Biol Med.* 2002; 33: 1200-8.
74. Zwacka RM, Zhang Y, Halldorson J, et al. CD4 (p) T-lymphocytes mediate ischemia/reperfusion- induced inflammatory responses in mouse liver. *J Clin Invest.* 1997; 100: 279–289.
75. Hanschen M ZS, Krombach F, Khandoga A. Reciprocal activation between CD4p T cells and Kupffer Cells during hepatic ischemia-reperfusion. *Transplantation.* 2008; 86:710–8.
76. Weaver CT, Harrington LE, Mangan PR, et al. Th17: An effector CD4T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity.* 2006; 24:677–88.
77. Arias-Díaz J, Ildefonso JA, Muñoz JJ, et al. Both tacrolimus and sirolimus decrease Th1/Th2 ratio, and increase regulatory T lymphocytes in the liver after ischemia/reperfusion. *Lab Invest.* 2009; 89:433–45.
78. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation.* 1986; 74:1124-36.
79. Clavien PA, Yadav S, Sindram D, et al. Protective effects of ischemic preconditioning for liver resection performed under inflow occlusion in humans. *Ann Surg.* 2000; 232: 155–162.
80. Peralta C, Hotter G, Closa D, et al. Protective effect of preconditioning on the injury associated to hepatic ischemia-reperfusion in the rat: role of nitric oxide and adenosine. *Hepatology.* 1997; 25:934-7.
81. Grande L, Roselló-Catafau J, Peralta C. El precondicionamiento isquémico del hígado: de las bases moleculares a la aplicación clínica. *Cir Esp.* 2006; 80 (5): 275-82.
82. McCuskey RS. Morphological mechanism for regulating blood flow through hepatic sinusoids. *Liver.* 2000; 20:3-7.



83. Peralta C, Hotter , Closa D. et al. The protective role of adenosine in inducing nitric oxide synthesis in rat liver ischemia preconditioning is mediated by activation of adenosine A2 receptors. *Hepatology*. 1999; 29:126-32.
84. Koti RS, Tsui J, Lobos E, et al. Nitric oxide synthase distribution and expression with ischemic preconditioning of the rat liver. *FASEB J*. 2005; 19:1155-7.
85. Peralta C, Closa D, Xaus C, et al. Hepatic preconditioning in rats is defined by a balance of adenosine and santhine. *Heptatology*. 1998; 28:768-73.
86. Ricciardi R, Meyers WC, Schaffer BK, et al. Protein Kinase C inhibition abrogates hepatic ischemic preconditioning responses. *J Surg Res*. 2001; 97:144-9.
87. Teoh N, Dela Pena A, Farreli G. Hepatic ischemic preconditioning in mice is associated with activation of NF-KappaB, p 38 kinase, and cell cycle entry. *Hepatology*. 2002; 36:94-102.
88. Peralta C, Bulbena O, Xaus C, et al. Ischemic preconditioning: a defense mechanism against the reactive oxygen species generated after hepatic ischemia reperfusion. *Transplantation*. 2002; 73:1203-11.
89. Glenemann M, Vollmar B, Nussler AK, et al. Ischemic preconditionin protects from hepatic ischemia/reperfusion-injury by preservation of microcirculation and mitochondrial redox-state. *J Hepatol*. 2003; 38:59-66.
90. Peralta C, Bartrons R, Rivera L, et al. Hepatic preconditioning preserves energy metabolism during sustained ischemia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*.2000; 279:163-71.
91. Peralta C, Fernández L, Panes J, et al. Preconditioning protects aganist systemic disorders associated with hepatic ischemia-reperfusion through blockade of tumor necrosis factor-induced P- selectin up regulation in the rat. *Hepatology*.2001; 33:100-13.

92. De Jonge J, Olthoff KM. Liver regeneration: mechanism and clinical relevance. En: Jarnagin & Blumgart: *Blumgart's Surgery of the Liver, Pancreas and Biliary Tract*. 5th ed. Saunders. Elsevier; 2012. p. 70-101.
93. Clavien PA, Selzner M, Ridiger HA. A Prospective randomized study in 100 consecutive patients undergoing major liver resection with versus without ischemic preconditioning. *Ann Surg*. 2003; 238:83-50.
94. Azulay D, Del Gaudio M, Andreani P, et al. Effects of 10 minutes of ischemic preconditioning of de cadaveric liver on the graft's preservation and function: the ying and the yang. *Ann Surg*. 2005; 242(1): 133-9.
95. Jassem W, Fuggle SV, Cerundolo L, et al. Ischemic preconditioning of cadaver donor livers protects allografts following transplantation. *Transplantation*. 2006;81(2):169-74.
96. O'Neil S, Leuschner S, Mc Nally SJ, et al. Meta-analysis of ischaemic preconditioning for liver resections. *Br J Surg*. 2013; 100: 1689–1700.
97. Sakaguchi T, Gu X. Cloning of de human claudin-25-flanking reion reveled a TATAless promoter with conserved binding sites in mouse and human for caudal-related homeodomain proteins and hepatocyte nuclear factor-1 alpha. *J. Biol. Chem*. 2002; 277, 21361-21370.
98. Parviz F, Matullo, C. Hepatocyte nuclear factor 4 alpha control the development of a hepatic epithelium and liver morphogenesis. *Nat Genet*. 2003; 34: 292-296.
99. Rausa FM, Tan Y, Costa RH. Association between hepatocyte nuclear factor 6 and FOX A2 DNA binding domains stimulates FOX A2 transcriptional activity but inhibits HNF6 DNA binding. *Mol Cell Biol*. 2003;23:437-449.
100. Odom DT, Zizlsperger N, Gordon DB, et al. Control of pancreas and liver gene expression by HNF transcription factors. *Science*. 2004; 303:1378-1381.

101. Troadec, M.B., Glaise, D, Lamirault G, et al. Hepatocyte iron loading capacity is associated with differentiation and repression of motility in the HepaRG cell line. *Genomics*. 2006; 87,93-103.
102. Carre N, Cauzac M, Girard J, et al. Dual effect of the adapter growth factor receptor-bound protein 14 (grb14) on insulin action in primary hepatocytes. *Endocrinology*. 2008; 149, 3109–3117.
103. Pascussi JM, Gerbal-Chaloin S, Duret C, et al. The tangle of nuclear receptors that controls xenobiotic metabolism and transport: crosstalk and consequences. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2008; 48, 1–32.
104. Wallington J, Ning J, Titheradge M.A. The control of hepatic glycogen metabolism in an in vitro model of sepsis. *Mol Cell Biochem*. 2008; 308, 183–192.
105. Aninat C, Seguin P, Descheemaeker PN, et al. Catecholamines induce an inflammatory response in human hepatocytes. *Crit. Care Med*. 2008; 36, 848–854.
106. Gómez-Lechón MJ, Donato MT, Castell JV, et al. Human hepatocytes in primary culture: the choice to investigate drug metabolism in man. *Curr Drug Metab*. 2004 ; 5(5):443-62.
107. Donato MT. ¿Qué es el citocromo P-450 y cómo funciona? En: *Citocromo P-450. Monografía nº14 de la Real Academia de Farmacia*. Ed: María Cascales Angosto y M<sup>a</sup> José Gómez-Lechón. Madrid 2004. p. 29-62.
108. Boyer JL. Bile canalicular secretion-tales from Vienna and Yale. *Wien Med Wochenschr*.2008;158,534-38
109. Govindarajan R, Endres CJ, Whittington D, et al. Expression and hepatobiliary transport characteristics of the concentrative and equilibrative nucleoside transporters in sandwich-cultured human hepatocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2008; 295,570-80.

110. McRae MP, Lowe CM, Tiam X, et al. Ritonavir, saquinavir, and efavirenz, but not nevirapine, inhibit bile acid transport in human and rat hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006; 318, 1068–1075.
111. Jigorel E, Le Vee M, Boursier-Neyret C, et al. Differential regulation of sinusoidal and canalicular hepatic drug transporter expression by xenobiotics activating drug-sensing receptors in primary human hepatocytes. *Drug Metab. Dispos.* 2006; 34, 1756–1763.
112. Guguen-Guillouzo C, Guillouzo A. General Review on In vitro Hepatocyte Models and Their Applications. En: Walker JM. *Hepatocytes Methods and Protocols.* Montpellier, France. Patrick Maurel; 2010. p. 1-40.
113. Mazier D, Landau I, Druilhe P, Miltgen F, et al. Cultivation of the liver forms of *Plasmodium vivax* in human hepatocytes. *Nature.* 1984; 307, 367–369.
114. Prudencio M, Rodriguez CD, Ataíde R, et al. Dissecting in vitro host cell infection by *Plasmodium* sporozoites using flow cytometry. *Cell Microbiol.* 2008; 10, 218–224.
115. Pareja E, Cortés M, Gómez Lechón MJ, et al. Estado actual y perspectivas futuras del trasplante de hepatocitos. *Cir Esp.* 2014; 92(2): 74-81.
116. Dhawan A, Strom SC, Sokal E, et al. Human hepatocyte transplantation. *Methods Mol Biol.* 2010; 640:525-34.
117. Matas AJ, Sutherland DE, Steffes MW, et al. Hepatocellular transplantation for metabolic deficiencies: Decrease of plasma bilirubin in Gunn rats. *Science.* 1976; 192:892-4.
118. Sutherland DE, Numata M, Matas AJ, et al. Hepatocellular transplantation in acute liver failure. *Surgery.* 1997; 82:124-32.
119. Mito M, Kusano M. Hepatocyte transplantation in man. *Cell Transplant.* 1993; 2:65-74.

120. Fox I, Chowdhury JR, Kaufmann SS, et al. Treatment of the Crigler-Najjar syndrome type I with hepatocyte transplantation. *N Engl J Med.* 1998; 338:1422-6.
121. Berry MN, Friend SD. High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study. *J. Cell Biol.* 1969; 43:506-520.
122. Seglen PO. Preparation of rat liver cells. Effect of Ca<sup>2+</sup> on enzymatic dispersion of isolated, perfused liver. *Exp. Cell Res.* 1972; 74:450-454.
123. Bissel DM, Hammaker LE, Meyer UA. Parenchymal cells from adults rat liver in nonproliferating monolayer culture. I. Functional studies. *J Cell Biol.* 1973; 59:722-734.
124. Guguen-Guillouzo C, Campion JP, Brissot P, et al. High yield preparation of isolated human adult hepatocytes by enzymatic perfusion of the liver. *Cell Biol Int Rep.* 1982; 6:625-628.
125. Terry C, Dhawan A, Mitry RR, et al. Optimization of the cryopreservation and thawing protocol for human hepatocytes for use in cell transplantation. *Liver Transpl.* 2010; 16(2):229-37.
126. Gómez-Lechón MJ, Fabra R, López P, et al. Isolation and Culture of Human Hepatocytes from Surgical Liver Biopsies. En: Castell JV, Gómez-Lechón MJ. *In Vitro Alternatives To Animal Pharmacotoxicology.* Madrid : Farmaindustria; 1992. p. 129-48.
127. De Loecker R, Fuller B, Gruwetz J, et al. The effects of cryopreservation on membrane integrity, membrane trans-transport and protein synthesis in rat hepatocytes. *Criobiology.* 1990, 27:14-152.
128. Hewitt NJ. Optimisation of the Cryopreservation of Primary Hepatocytes. En: Walker JM. *Hepatocytes Methods and Protocols.* Montpellier, France: Patrick Maurel; 2010. p.83-104.

129. Puppi J, Strom SC, Hughes RD, et al. *Improving the Techniques for Human Hepatocyte Transplantation: Report from a Consensus Meeting in London*. *Cell Transplant*. 2012; 21:1-10.
130. Taléns R, Bonora-Centelles A, Castell JV, et al. *Fuentes alternativas de hepatocitos para la terapia celular*. *Gastroenterol Hepatol*. 2006; 29(6):366-76.
131. Rodríguez-Antona C, Donato MT, Boobis A, et al. *Cytochrome P450 expression in human hepatocytes and hepatoma cell lines: molecular mechanisms that determine lower expression in cultured cells*. *Xenobiotica*. 2002; 32:505-20.
132. Tsuruga Y, Kiyono T, Matsushita M, et al. *Effect of intrasplenic transplantation of immortalized human hepatocytes in the treatment of acetaminophen-induced acute liver failure SCID mice*. *Transplant Proc*. 2008; 40(2):617-9.
133. Haridass D, Narain N, Ott M. *Hepatocyte transplantation: waiting for stem cells*. *Curr Opin Organ Transplant*. 2008; 13(6):627-32.
134. Nagata H, Ito M, Cai J, et al. *Treatment of cirrhosis and liver failure in rats by hepatocyte xenotransplantation*. *Gastroenterology*. 2003; 124:422-31.
135. Bissig KD, Le TT, Woods NB, et al. *Repopulation of adult and neonatal mice with human hepatocytes: a chimeric animal model*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104(51):20507-11.
136. Kakinuma S, Tanaka Y, Chinzei R, et al. *Human umbilical cord blood as a source of transplantable hepatic progenitor cells*. *Stem Cells*. 2003; 21: 217-27.
137. Fausto N, Campbell JS. *The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation*. *Mech Dev*. 2003; 120:117-30.
138. Dianat N, Steichen C, Vallier L, et al. *Human pluripotent stem cells for modelling human liver diseases and cell therapy*. *Curr Gene Ther*. 2013; 13:120–32.

139. Basma H, Soto-Gutiérrez A, Yannam GR, et al. Differentiation and transplantation of human embryonic stem cell-derived hepatocytes. *Gastroenterology*. 2009; 136:990–9.
140. Puglisi MA, Saulnier N, Piscaglia AC, et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells and hepatic differentiation: Old concepts and future perspectives. *Eur Rev Med Pharma Sci*. 2011; 15:355–64.
141. Lloyd TD, Orr S, Patel R, et al. Effect of patient, operative and isolation factors on subsequent yield and viability of human hepatocytes for research use. *Cell Tissue Bank*. 2004; 5:81-87
142. Martínez Blasco MA. *Influencia de los factores del donante en el aislamiento y cultivo de hepatocitos humanos*. Valencia: Departamento de Cirugía Facultad de Medicina y Odontología, Universidad de Valencia. 2012.
143. Bhogal RH, Hodson J, Bartlett DC, et al. Isolation of primary human hepatocytes from normal and diseased liver tissue: a one hundred liver experience. *PLoS One*. 2011; 6(3):e18222.
144. Bonora-Centelles A, Jover R, Donato MT, et al. Desarrollo, análisis y optimización de modelos celulares hepáticos para estudios de farmacotoxicología y terapia celular. *An. R. Acad. Nac. Farm*. 2008, 74: 283-306.
145. Ritchert L, Alexandre E, Lloyd T, et al. Tissue collection, transport and isolation procedures required to optimize human hepatocyte isolation from waste liver surgical resections. A multilaboratory study. *Liver Int*. 2004; 24:371-378.
146. Sagias FG, Mitry RR, Hughes RD, et al. N-acetylcysteine improves the viability of human hepatocytes isolated from severely steatotic donor liver tissue. *Cell Transplant*. 2010; 19(11):1487–92.
147. Lee SML, Schelcher C, Laubender RP, Froese N, Thasler RMK, et al. An Algorithm that Predicts the Viability and the Yield of Human Hepatocytes Isolated from Remnant Liver Pieces Obtained from Liver Resections. *PLoS ONE*. 2014. 9(10): e107567. doi:10.1371/journal.pone.0107567.

148. Johnston DE. Special considerations in interpreting liver function tests. *Am Farm Physician*.1999; 59: 2223–2230.
149. Shin WG, Park SH, Jun SY, et al. Simple tests to predict hepatic fibrosis in nonalcoholic chronic liver diseases. *Gut Liver*.2007; 1: 145–150.
150. Hewes JC, Riddy D, Morris RW, et al. A prospective study of isolated human hepatocyte function following liver resection for colorectal liver metastases: the effects of prior exposure to chemotherapy. *J Hepatol*. 2006; 45: 263–270.
151. Vondran FW, Katenz E, Schwartlander R, et al. Isolation of primary human hepatocytes after partial hepatectomy: criteria for identification of the most promising liver specimen. *Artif Organs*. 2008; 32(3):205-13.
152. Dalglish AG, O’Byrne K. Inflammation and cancer: the role of the immune response and angiogenesis. *Cancer Treat Res* 2006; 130:1–38.
153. Alexandre E, Cahn M, Abadie-Viollon C, et al. Influence of pre-, intra- and post-operative parameters of donor liver on the outcome of isolated human hepatocytes. *Cell Tissue Bank* .2002; 3: 223–233.
154. Kawahara T, Toso C, Douglas DN, et al. Factors affecting hepatocyte isolation, engraftment, and replication in an in vivo model. *Liver Transpl*. 2010; 16: 974–982.
155. Alexandrova K, Griesel C, Barthold M, et al. Large-scale isolation of human hepatocytes for therapeutic application. *Cell Transplant* 2005; 14(10):845-53.
156. Castell JV, Gómez-Lechón MJ. Liver cell culture techniques. En: Dhawan A, Hughes RD. *Hepatocyte transplantation*. 2009. p. 35-44.
157. Donato MT, Lahoz A, Montero S, et al. Functional Assessment of the quality of Human Hepatocyte Preparations for Cell Transplantation. *Cell transplant*. 2008; 17:1211-19.



158. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay. *J. Immunol. Methods*. 1983; 65: 55–63.
159. Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival, Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Methods* 1986; 89: 271–277
160. Gómez-Lechón MJ, Castell JV, Donato MJ. Hepatocytes--the choice to investigate drug metabolism and toxicity in man: in vitro variability as a reflection of in vivo. *Chem-Bio Interact*. 2007; 168; 30–50.
161. La Hoz A, Donato MT, Castell JV, et al. Strategies to in vitro assessment of major human CYP enzyme activities by using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Curr. Drug Metab*. 9:12–19; 2008.
162. Hewitt NJ, Lechón MJ, Houston JB, et al. Primary hepatocytes: current understanding of the regulation of metabolic enzymes and transporter proteins and pharmaceutical practice for the use of hepatocytes in metabolism, enzyme induction, transporter, and clearance and hepatotoxicity studies. *Drug Metab Rev* 2007; 39; 159–234
163. Solanas E, Sostres C, Serrablo A, et al. Effect of Dimethyl Sulfoxide and Melatonin on the Isolation of Human Primary Hepatocytes. *Cells Tissues Organs*, 2015 Sep 19. Epub ahead of print.
164. Strom SC, Jirtle RL, Jones RS, et al. Isolation, culture and transplantation of human hepatocytes. *J Nat Cancer Inst*. 1982; 68 (5):77-8
165. Baccarani U, Sanna A, Cariani A, et al. Isolation of human hepatocytes from livers rejected for liver transplantation on a national basis: results of a 2-year experience. *Liver Transpl* 2003; 9(5):506-12.
166. Teoh NC. Hepatic ischemia reperfusion injury: Contemporary perspectives on pathogenic mechanisms and basis for hepa toprotection-the good, bad and deadly. *J Gastroenterol Hepatol*. 2011;26 (1):180-7.

167. Huguet C, Gavelli A, Chielli A, et al. Liver ischemia for Hepatic Resection: Where is the Limit?. *Surg* 1992; 111(3):251-259.
168. Hai-Qing W, Jia-Yin Y, Lu-Nan Y. Hemihepatic versus total hepatic inflow occlusion during hepatectomy: A systematic review and meta-analysis. *World J Gastroenterol*. 2011; 17(26): 3158-3164.
169. Gurusamy KS, Kumar Y, Sharma D, et al. Methods of vascular occlusion for elective liver resections. *BRCochrane Database Syst Rev*. 2007; (4): CD006409.
170. Gurusamy KS, Kumar Y, Ramamoorthy R, et al. Vascular occlusion for elective liver resections. *Cochrane Database Syst Rev*. 2009; (1):CD007530.
171. Gomez-Lechon MJ, Donato MT, Castell JV, et al. Human hepatocytes in primary culture: the choice to investigate drug metabolism in man. *Curr Drug Metab* 2004; 5:443–62.
172. Li AP. Human hepatocytes: isolation, cryopreservation and applications in drug development. *Chem Biol Interact*. 2007; 168:16–29.
173. Hughes RD, Mitry RR, Dhawan A, et al. Isolation of hepatocytes from livers from non-heart-beating donors for cell transplantation. *Liver Transpl* 2006; 12(5):713-7.
174. Alexandre E, Cahn M, Viollon-Abadie C, et al. Influence of pre-,intra- and post-operative parameters of donor liver on the outcome of isolated human hepatocytes. *Drug Metab Rev* 2003; 35:116.
175. Uhlmann D, Uhlmann S, Palmes D, et al. Endothelin receptor blockade as a therapeutic strategy in ameliorating post-ischemic damage to the liver micro-circulation. *J. Cardiovasc Pharmacol*. 2000; 36:351-53.
176. Wagenveld BA, Gulink TM, Gelderblom HC, et al. Continuous or intermittent vascular clamping during hemihepatectomy in pigs: hyaluronic acid kinetics in the assessment of early microvascular damage. *Eur J Surg* 2000; 166:255-61.

177. Delva E, Camus Y, Nordlinger B, et al. Vascular Occlusions for Liver Resections: Operative Management and Tolerance to Hepatic Ischemia: 142 Cases. *Ann Surg.* 1989; 209(2): 211-218
178. Huguet C, Gavelli A, Chieco A, et al. Liver Ischemia for Hepatic Resection: Where is the Limit?. *Surg* 1992; 111(3): 251-259.
179. Nuzzo G, Giuliante F, Giovannini I, et al. Hepatic Resections in Normothermic Ischemia. *Surgery* 1996; 120(5): 852-858.
180. Blanco JG, Harrison PL, Evans WE, et al. Human cytochrome P450 maximal activities in pediatric versus adult liver. *Drug Metab Dispos.* 2000; 28(4):379-82.
181. Bhogal Rh, Curbishley SM, Weston CJ, et al. Reactive oxygen species mediate human hepatocyte injury during hypoxia/reoxygenation. *Liver Transpl.* 2010; 16(11):1303-13.
182. Makowiec F, Möhrle S, Neeff H, et al. Chemotherapy, liver injury, and postoperative complications in colorectal liver metastases. *J Gastrointest Surg.* 2011; 15(1):153-64.
183. Quan D, Gallinger S, Nhan C, et al. The role of liver resection for colorectal cancer metastases in an era of multimodality treatment: A systematic review. *Surgery* 2012; 151(6):860-70

**ANEXOS**



## HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

El Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa de Zaragoza, esta llevando a cabo estudios que tienen como finalidad optimizar el trasplante de células hepáticas. La persona encargada de dicho estudio es la Dra. Trinidad Serrano, hepatóloga del Servicio de Digestivo. El estudio se realiza en animales de experimentación, pero se precisa la obtención de células hepáticas humanas. Estas células hepáticas se aíslan de pequeños fragmentos de tejido hepático obtenido en resecciones hepáticas quirúrgicas o de hígados donados para trasplante hepático que una vez extraídos no han podido ser utilizados por diversas causas. La obtención de estas muestras no supondrá en ningún caso la modificación de la intervención quirúrgica ni el incremento del riesgo de la misma. La colaboración con este estudio es absolutamente voluntaria, por lo que puede negarse sin que de ello se derive ninguna repercusión sobre su atención sanitaria. Los datos obtenidos en el análisis del material tisular así como los datos clínicos que se manejen (edad, sexo y consumo de alcohol o fármacos) serán mantenidos en absoluta confidencialidad. Cada muestra obtenida será codificada sin que en ningún momento figure el código junto con los datos que identifican al paciente.

Le animamos a que si usted no está seguro, consulte esta información y la aceptación en la participación del estudio, con sus familiares o con su médico habitual.

Zaragoza a .....de.....20

Consentimiento informado estudio \_\_\_\_\_

Versión \_\_\_\_\_, fecha \_\_\_\_\_



### CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo, .....(nombre y apellidos)

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido información suficiente sobre el estudio.

He hablado con:.....(nombre del investigador)

Comprendo que mi participación es voluntaria y presto libremente mi conformidad para participar en el estudio.

Firma del participante o familiar: .....

Fecha: .....

He explicado la naturaleza y el propósito del estudio al paciente mencionado.

Firma del investigador: .....

Fecha: .....

Consentimiento informado estudio\_\_\_\_\_

Versión\_\_\_\_\_, fecha\_\_\_\_\_