

Laboratorio de Ciugía Experimental.
 Universidad del País Vasco.
 Vizcaya.

Prevención del daño isquémico en el trasplante hepatocelular en la rata

Echevarría, M. I.; García-Alonso, I.; Portugal, V.; Barceló, P., y Méndez, J.

SUMMARY

The aim of this study was to evaluate the efficacy of certain antioxidant and/or hepatotrophic drugs on the sensitivity to ischemia of hepatocytes implanted into the spleen. Twenty four hours after hepatocellular transplantation, animals were submitted to 15 minutes of normothermic ischemia followed by 70% hepatectomy. Hepatocytic function was assessed 24 h later by measuring the intensity of the regenerative response, both in the liver and in the spleen. All drugs increased the percentage of regenerating hepatocytes, but only allopurinol and cyclosporine achieved significance. However none of the drugs were useful for hepatocytes implanted in the spleen, allopurinol having a deleterious effect.

KEY WORDS: Almagate, Hepatocellular transplantation, ischemia, cyclosporin A, folic acid, allopurinol, superoxide dismutase.

Echevarría, M. I.; García-Alonso, I.; Portugal, V.; Barceló, P., y Méndez, J. Prevention of the ischemic injury in hepatocellular transplantation in the rat. Rev Esp Enf Digest, 1994, 86, 894-897.

RESUMEN

El objetivo de este trabajo consiste en valorar la capacidad de ciertos fármacos antioxidantes y/o hepatotróficos de disminuir la susceptibilidad a la isquemia de los hepatocitos implantados en el bazo. Para ello, veinticuatro horas después del implante esplénico, se ha sometido a los animales a un camlaje del hilio hepático, tronco celiaco y arteria mesentérica superior durante 15 minutos, seguido de hepatectomía parcial del 70%. La capacidad funcional de los hepatocitos se ha valorado cuantificando la intensidad de su respuesta regenerativa, tanto en bazo como en hígado, a las 24 horas. Todos los tratamientos han aumentado el porcentaje de hepatocitos en regeneración en el hígado, pero sólo el alopurinol y la ciclosporina han alcanzado significación estadística. En cambio, ninguno de ellos ha resultado útil para los hepatocitos del bazo, llegando el alopurinol a ser nocivo.

PALABRAS CLAVE: Trasplante hepatocelular, isquemia, ciclosporina A, ácido fólico, alopurinol, superóxido dismutasa.

INTRODUCCION

El trasplante de hepatocitos aislados, probado con éxito en numerosos modelos animales (1) se perfila hoy como una de las modalidades terapéuticas más prometedoras para los pacientes afectados de enzimopatías hepáticas congénitas (2). Estas patologías, que hoy requieren un trasplante hepático, podrían resolverse, una vez superados los problemas inmunológicos, con el implante percutáneo de un número relativamente pequeño de hepatocitos normales.

Recientemente hemos publicado un trabajo demostrando que estas células, implantadas en el bazo de animales singénicos, son capaces de responder a los estímulos regenerativos; y lo hacen a la vez y con la misma intensidad que los hepatocitos del hígado, lo que prueba la integración de los mismos dentro de la masa hepática global del huésped (3).

En el presente trabajo nos hemos planteado cómo proteger a los hepatocitos frente a la agresión que supone el periodo de relativa anoxia inherente al proceso de aislamiento e inoculación de los mismos a partir de un donante, vivo o cadáver, así como la posterior reperusión de los mismos (4). Para ello hemos diseñado un modelo experimental en el que sometemos a los hepatocitos recién inoculados a un corto periodo de isquemia normotérmica que disminuye sensiblemente la capacidad regenerativa hepatocitaria.

Sobre este modelo valoramos la posible eficacia de dos tipos de tratamientos. En primer lugar, la administración de ciclosporina A, fármaco cuya capacidad hepatotrófica se ha comprobado en distintas situaciones: hígado en reposo (5), tras hepatectomías parciales del 40% (6) ó 70% (7), así como en el implante esplénico de hepatocitos (8). De hecho, este fármaco ha demostrado ser útil en un modelo similar de isquemia hepática normotérmica (5).

En segundo lugar valoramos la eficacia de sustancias antioxidantes ensayadas también previamente en el citado modelo (alopurinol, superóxido dismutasa, ácido fólico) (9).

MATERIAL Y METODOS

En el estudio se han utilizado ratas Fisher F-344, machos de 250 g de peso. (Estabulario de la Facultad de Medicina y Odontología, UPV/EHU). Todas las experiencias se han rea-

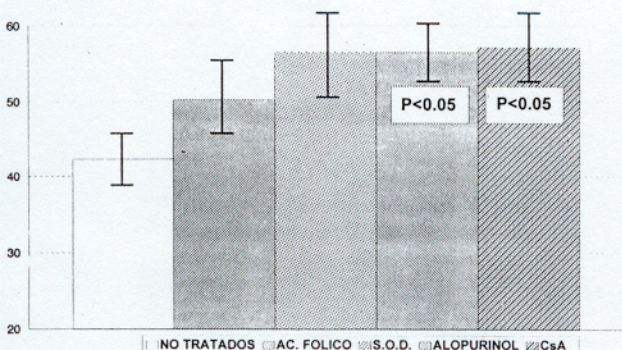


FIG. 1.—Todos los tratamientos ensayados han aumentado el porcentaje de hepatocitos del hígado que se encuentran regenerando veinticuatro horas después practicar una hepatectomía parcial del 70%, precedida de 15 minutos de isquemia hepática normotérmica, en animales con un implante esplénico de hepatocitos. Sin embargo, este aumento sólo ha alcanzado significación estadística en el caso del alopurinol y la ciclosporina A.

lizo entre las 9 a.m. y 11 a.m. y los animales han tenido libre acceso a la comida (A-04, Panlab) y agua, hasta el momento e inmediatamente después de las intervenciones.

Todos los procedimientos quirúrgicos se han realizado bajo anestesia con éter. El aislamiento de los hepatocitos se ha llevado a cabo mediante perfusión continua con colagenasa al 0,05% siguiendo el método descrito por Seglen (10), valorándose su viabilidad mediante el test de exclusión con azul tripan. Para realizar los implantes se extrajo el bazo a través de una laparotomía media inyectándose en su polo inferior 1 ml de medio EMEM que contenía 22×10^6 hepatocitos viables.

La isquemia hepática se indujo 24 horas después, clampando el hilio hepático durante 15 minutos, mediante clips para aneurismas cerebrales de Yassargil. Con el fin de evitar la congestión esplénica, se asoció el clampaje del tronco celíaco y de la arteria mesentérica superior a su salida de la aorta. Tras todo ello, se cerró el abdomen. Una vez finalizado el periodo de isquemia, se procedió a la reapertura de la laparotomía retirándose los diferentes clips vasculares. La recuperación del flujo sanguíneo se comprobó mediante la objetivación del latido de la a. hepática y de las arterias rectas del intestino.

La hepatectomía del 70% se realizó mediante la técnica descrita por Higgins (11), inmediatamente después de iniciar la reperfusión. Con la excepción de la ciclosporina A (CsA, Sandimun; Sandoz) que se inoculó por vía i.p., el resto de los fármacos utilizados en el estudio se han administrado mediante perfusión intravenosa lenta (133 microl/min) controlada por una bomba de infusión (Lymphography Injector II, Cordis/Hyperion). Para ello, se procedió a disecar la vena femoral izquierda, introduciéndose en ella un catéter 27G (Biatrol-Farma) que se fijó mediante un clamp vascular. La perfusión se comenzó 10 minutos antes de la reperfusión, finalizándose inmediatamente antes de ésta. Una vez concluida, se extrajo el catéter y se realizó hemostasia de la vena mediante compresión digital, observándose en todos los casos la permeabilidad del vaso.

La experiencia consta de 5 series de 10 animales cada una. El grupo control fue sometido a isquemia y hepatectomía

parcial, sin recibir tratamiento farmacológico alguno. A otro grupo se le administraron dos dosis de Ciclosporina A (20 mg/kg, i.p.), 24 h y 2 h antes de la intervención. Los tres grupos restantes recibieron un fármaco antioxidante disuelto en 2 ml de suero fisiológico: *superóxido dismutasa* (SOD) 6 mg/kg (Ontosein-Orgoteina, Zambelletti; España), *ácido fólico* 2,5 mg/kg (Lederfolin, Lederle) y *alopurinol* 50 mg/kg (Sigma A-8003, disuelta en suero fisiológico alcalinizado).

Los animales fueron sacrificados a las 24 horas, extrayéndose el bazo y un fragmento de hígado, que se incluyeron en parafina. Sobre secciones histológicas de 5 μ m de espesor, teñidas con reactivo de Schiff mediante la reacción de Feulgen-Rossenbeck, se cuantificó el DNA nuclear hepatocitario mediante un microespectrofotómetro ($\lambda=560$ nm). Así se obtuvo el contenido de DNA en unidades arbitrarias de 100 núcleos hepatocitarios de cada animal. Estos valores se distribuyeron en un histograma de frecuencias, lo que permitió, mediante el método descrito por Bartel (12), calcular diferentes curvas gaussianas ajustadas sobre los distintos niveles de ploidía. Esto nos ha permitido estimar el porcentaje de hepatocitos en regeneración (P.H.R.) y el gradiente regenerativo (GR); entendido este último como el cociente del contenido medio en DNA de los hepatocitos regenerantes y el contenido medio en DNA de los hepatocitos estáticos.

Una vez obtenidos los datos correspondientes a cada animal se calcularon los valores medios de cada serie. La comparación de resultados se realizó, dada la distribución no normal de los mismos, mediante el test de la suma de rangos, considerándose como significativos aquellos valores que mostraron una $p < 0,05$.

Todos los experimentos se han llevado a cabo siguiendo la normativa vigente sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos (R.D. 223/1988 del 14 de marzo y la Orden de 13 de octubre de 1989).

RESULTADOS

Todos los tratamientos ensayados han aumentado el porcentaje de hepatocitos en regeneración (P.H.R.) en el hígado (fig. 1), pasando de un 42% (D.S.: 13,3) en los animales no

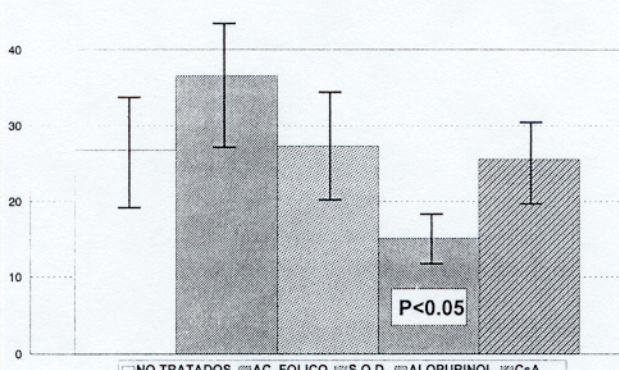


FIG. 2.—Los tratamientos ensayados no han logrado mejorar la respuesta regenerativa de los hepatocitos implantados en el bazo, que en su conjunto ha sido inferior a la observada en el hígado. En el caso del alopurinol se observa una significativa disminución del P.H.R.

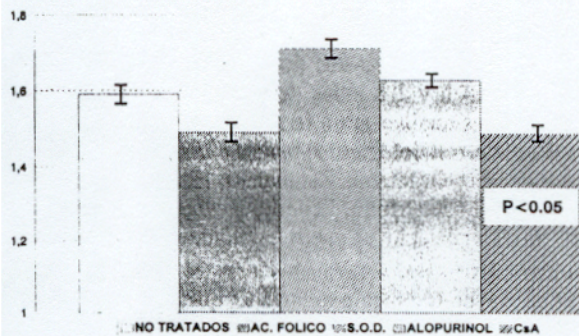


FIG. 3.—La ciclosporina A ha disminuido el Gradiente Regenerativo hepatocitario del hígado, mientras que los fármacos antioxidantes no han producido modificaciones significativas.

tratados a un 50-57% en aquellos que recibieron antioxidantes o ciclosporina. Sin embargo, y debido fundamentalmente a la dispersión de los resultados, estas diferencias sólo han alcanzado significación estadística en el caso del alopurinol (M=56,5%; D.S.=11,8; p=0,0199) y de la ciclosporina A (M=57,2%; D.S.: 11,8; p=0,0199).

La respuesta regenerativa en los hepatocitos afincados en el bazo ha sido diferente (fig. 2). Así, en los animales no tratados el P.H.R. del bazo ha sido netamente inferior al observado en el hígado (27% vs. 42%). En cuanto a los tratamientos ensayados, el ácido fólico ha producido un ligero aumento del P.H.R. (M=36%; D.S.=16,4 vs. M=27%; D.S.: 14,5), pero sin alcanzar significación estadística, mientras que la S.O.D. y la ciclosporina no han producido variaciones, con un 27% (D.S.=13,9) y un 25% (D.S.=10,8), respectivamente. En cambio, en los animales tratados con alopurinol se ha producido una disminución significativa del P.H.R., descendiendo hasta el 15% (D.S.=6,6; p<0,05). En conjunto, la dispersión de los resultados ha sido similar a la acontecida en el hígado.

En cuanto al GR de los hepatocitos hepáticos (fig. 3) los diferentes tratamientos antioxidantes no han inducido diferencias frente a los no tratados (M=1,59; D.S.=0,13). Sin embargo, los animales tratados con CsA muestran un significativo descenso del mismo (M=1,48; D.S.=0,12; p<0,05).

Si analizamos los hepatocitos situados en el bazo (fig. 4) observamos que la única modificación significativa corresponde al alopurinol (M=1,81; D.S.: 0,17) que ha incrementado el GR frente a los no tratados (M=1,65; D.S.: 0,15; p<0,05).

DISCUSION

Tal y como ya habíamos observado en experiencias previas (3, 8), si bien con animales de características diferentes (Sprague-Dawley, machos de 250 g), tanto la ciclosporina como los antioxidantes mejoran la respuesta regenerativa (tras hepatectomía parcial) del hígado sometido a isquemia normotérmica. Constatar de nuevo este efecto de un modelo ligeramente diferente refuerza la idea de que estas sustancias pueden ser útiles como medida de soporte al injerto hepático en los trasplantes; y de modo especial en los segmentarios donde la regeneración hepatocitaria es fundamental para

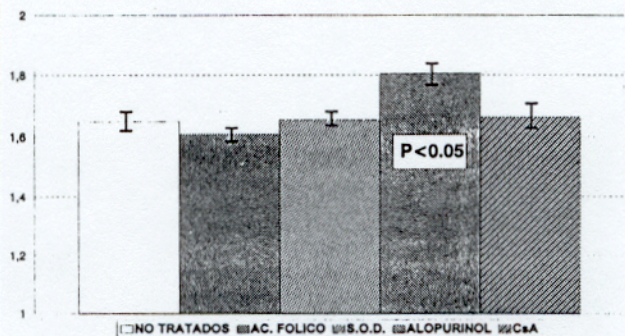


FIG. 4.—Gradiente regenerativo hepatocitario del bazo. Tan sólo el alopurinol ha incrementado este índice, lo que coincide con la disminución del porcentaje de hepatocitos regenerantes inducida por este mismo fármaco.

adaptar la masa hepática trasplantada a las necesidades del receptor.

Además, si comparamos el P.H.R. en el hígado obtenido en la serie no tratada, con las cifras obtenidas por nosotros con anterioridad en un modelo de isquemia hepática y hepatectomía sin THC (7) (41,9% vs 8,85%) observamos que el trasplante hepatocelular ha incrementado la respuesta regenerativa. Estos hallazgos coinciden con los resultados obtenidos por Francavilla (13) y Herrera (14) quienes han constatado la existencia de un estímulo regenerativo después de trasplante hepático ortotópico. Indudablemente, la inoculación de hepatocitos en un órgano con drenaje al sistema portal, como es el bazo, mejora de manera ostensible el P.H.R. en condiciones de isquemia reperfusión.

En cambio, al analizar los resultados observados con los hepatocitos del bazo vemos que la respuesta regenerativa es menor que la del hígado y no se produce sincrónicamente. Esto se contradice con trabajos previos en los que estas células ectópicas regeneraban con la misma intensidad y ritmo que las del hígado (8). Todo parece indicar que el problema radica en que, en nuestro modelo, los hepatocitos «esplénicos» son más sensibles al daño isquémico que los del hígado, lo que les impide regenerar adecuadamente. A la vista de esto, y antes de discutir los resultados obtenidos, debemos reflexionar sobre el carácter idóneo o no de nuestro modelo experimental.

Por una parte, las características histofisiológicas del bazo pudieran condicionar una mayor lesión isquémica en los hepatocitos trasplantados. Además, en nuestro modelo experimental la asociación de un clampaje del tronco celíaco y portal, induce una derivación de la sangre proveniente del territorio mesentérico inferior hacia el bazo. Esta situación puede traducirse en una congestión esplénica y un mayor daño isquémico.

Por otra parte, la inducción de la isquemia sólo 24 horas después del trasplante hepatocelular quizá sea una agresión demasiado temprana. En anteriores trabajos habíamos observado que después de 24 horas los hepatocitos trasplantados respondían adecuadamente a la hepatectomía parcial. Sin embargo, la anoxia puede resultar una agresión desmesurada para unas células (los hepatocitos esplénicos) todavía en proceso de adaptación a su nuevo ambiente sin haber replecionado adecuadamente sus reservas energéticas.

Como se deduce de lo expuesto anteriormente, parece bastante probable que nuestro modelo haya dado lugar a una noxa isquémica excesiva para los fines propuestos. Sin embargo, y dado que con el fin de evitar desviaciones subjetivas en los resultados las mediciones se realizaron en todo momento sobre muestras codificadas a partir de una tabla de números aleatorios, esto no ha podido ser apreciado hasta haber completado la experiencia.

Si nos centramos en las modificaciones inducidas en la regeneración de los hepatocitos situados en el brazo, el ácido fólico ha mostrado su carácter antioxidante (15) al proteger a dichas células frente a la isquemia. Este incremento de la actividad regenerativa no sólo muestra un carácter cuantitativo (P.H.R.) sino que se acompaña de una disminución del GR. Esto nos permite interpretar este efecto como una celosis regenerativa, encontrándose la mayoría de las células en las fases iniciales de la síntesis de DNA. Este efecto que concuerda con los obtenidos en trabajos anteriores nos hace reforzar la hipótesis del carácter no sólo antioxidante (16) sino hepatotrófico (17) del ácido fólico.

Por su parte, los animales tratados con alopurinol han empeorado sus parámetros regenerativos. Este resultado negativo del alopurinol como protector hepático concuerda con lo comunicado por Metzger (18) y Nordstrom (19) quienes han demostrado la ineficacia de la administración de este fármaco para mejorar la capacidad de resucitación del hígado. Sin embargo, la excesiva alcalinidad de la solución obtenida para su uso i.v. (20) así como la administración cercana a la reperfusión (21) del mismo aparecen como explicaciones lógicas a su falta de efectividad. Finalmente, la ciclosporina A tampoco ha mostrado a nivel de los hepatocitos ectópicos su probado efecto hepatotrófico.

En reusmen, podemos concluir que los fármacos antioxidantes ensayados, así como la ciclosporina A se han mostrado eficaces en mejorar la respuesta regenerativa del hígado tras trasplante hepatocelular intraesplénico asociado a isquemia hepática y hepatectomía del 70%. En cambio, a nivel esplénico ningún fármaco ha resultado claramente eficaz; si bien es cierto que el ácido fólico parece mejorar todos los parámetros regenerativos (aunque esa mejoría no alcance significación estadística).

El desarrollo de un nuevo diseño experimental en el que la lesión isquémica postrasplante sea de menor intensidad nos deberá mostrar la verdadera eficacia terapéutica de estas sustancias.

Correspondencia:

M. I. Echevarría
Laboratorio de Cirugía Experimental
Facultad de Medicina y Odontología
Universidad del País Vasco
48940 Lejona (Vizcaya)

3. García-Alonso I, Barceló P, Portugal V, Bilbao J, De Tejada IL y Méndez J. Estudio de la respuesta regenerativa de los hepatocitos implantados en el bazo. *Rev Esp Enf Digest* 1991; 80 (4): 247-251.
4. Marsh DC, Hjelmsaug JA, Vreugdenhil PK, Kerr JA, Rice MJ, Belzer FO y Southard JH. Hypothermic preservation of Hepatocytes. III. Effects of resuspension media on viability after up to 7 days of storage. *Hepatology* 1991; 13 (3): 500-508.
5. Portugal V, García-Alonso I, Bilbao J, Barceló P, Múgica P y Méndez J. Hepatotrophic effect of cyclosporin A on ischemic rat liver. *Rev Esp Enf Digest* 1993; 83: 255-259.
6. García-Alonso I, Méndez J, Barberá E. Cyclosporin modifies liver regeneration following partial hepatectomy. *Sur Res Commun* 1989; 6: 43-49.
7. García-Alonso I, Portugal V, Iturburu I, L. de Tejada I y Méndez J. Modifications induced by cyclosporin A on ischemic liver regeneration. *Surg Res Commun* 1990; 9: 227-233.
8. García-Alonso I, Barceló P, López de Tejada I, Portugal V, Bilbao J y Méndez J. Efectos del trasplante hepatocelular intraesplénico sobre la actividad regenerativa del hígado. *Cirugía Española* 1992; 51 (6): 440-444.
9. Portugal V, García-Alonso I, Bilbao J, Barceló P y Méndez J. Efecto de terapéuticas antioxidantes en la regeneración del hígado isquémico. *Rev Esp Enf Digest* 1993; 83 (6): 434-348.
10. Seglen PO. Preparation of rat liver cells. III. Enzymatic requirements for tissue dispersion. *Exp Cell Res* 1973; 82: 391-398.
11. Higgins GM y Anderson RM. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch Patol* 1931; 12: 186-202.
12. Bartels PH. Numerical evaluation of cytologic data. I. description of profiles. *Anal Cytology* 1979; 4: 20-28.
13. Francavilla A, Ove P, Polimeno L, Coetzee M, Makowka L, Barone M, Van Thiel DH y Starzl TE. Regulation of liver size and regeneration: importance in liver transplantation. *Transplant Proc* 1988; 20 (1, sup 1): 494-497.
14. Herrera N, Pereira F, Herrera J, Díaz del Río M, Matey P, Maganto P, Tendillo FJ y Castillo-Olivares JL. Regeneration study in liver transplantation. Experimental model in pigs. *Eur Surg Res* 1992; 24 (S2): 20.
15. Lewis AS, Murphy L, McAlla C, Fleary M y Purcell S. Inhibition of mammalian xanthine oxidase by folate compounds and amethopterin. (Folic acid is a potent inhibitor of xanthine oxidase). *J Biol Chem* 1984; 259: 12-15.
16. Bilbao J, García-Alonso I, Portugal V, Barceló P, Apecechea A y Méndez J. Efficacy of antioxidant therapy (folic acid and alphas-tocopherol) in intestinal lesions produced by reperfusion. *Cirugía Española* 1992; 51 (4): 262-265.
17. Portugal V, García-Alonso I, Emparan C, Conty JL, Pereira JG y Méndez J. Effect of folic acid on hepatic regeneration: antioxidant and/or hepatotrophic effect. *Hepatogastroenterology* (Ed. Española) 1993; 3 (S1): 305.
18. Metzger J, Dore SP y Lauterburg H. Oxidant stress during reperfusion of ischemic liver: no evidence for a role of Xanthine Oxidase. *Hepatology* 1988; 8: 580-584.
19. Nordstrom G, Seeman T y Hasselgren P. Beneficial effect of allopurinol in liver ischemia. *Surgery* 1985; 97: 679-683.
20. Gez Rodríguez E, Griño J y Miravittles M. Alopurinol en líquido de perfusión en el trasplante renal. *Farm Clin* 1989; 6: 490-494.
21. Castillo M, Toledo-Pereyra LH, Prough D, Sharpio E, Gordon D y Choudhury S. Effective timing of allopurinol administration in the ischemic liver. *Transplantation* 1989; 47: 727-730.

BIBLIOGRAFIA

1. Bumgardner GL, Fasola C, Sutherland DER. Prospects for hepatocyte transplantation. *Hepatology* 1988; 8: 1158-1161.
2. Gupta S y Chowdhury JR. Hepatocyte transplantation: back to the future. *Hepatology* 1992; 15: 156-162.