

Laboratorio de Cirugía Experimental y Dpto. de Biología Celular.
Universidad del País Vasco.
Lejona.

Efecto de los islotes pancreáticos sobre el trasplante hepatocelular en bazo

Conty, J. L.*; García-Alonso, I.*; Portugal, V.*; Alonso, A.**; Castro, B.**; y Méndez, J.*

RESUMEN

Objetivo: valorar el posible efecto beneficioso de la asociación de islotes pancreáticos al implante hepatocelular en el bazo.

Hipótesis: la adición de islotes pancreáticos proporcionará a los hepatocitos del bazo insulina/glucagón en cantidades y proporciones similares a las que reciben los hepatocitos del hígado, mejorando así su funcionalismo.

Diseño experimental: la posible mejora del funcionalismo hepatocitario se valora mediante cuantificación de la actividad regenerativa tras estímulo (hepatectomía parcial y/o ciclosporina).

Métodos: la presencia de islotes activos en el bazo se constata mediante técnicas de inmunodetección con anticuerpos (Ac. Antiinsulina). La regeneración hepatocitaria se cuantifica mediante microspectrofotometría (cuantificación de mediantes relativos de DNA).

Resultados: aunque se ha demostrado la presencia de islotes insulín-positivos junto a los hepatocitos del bazo, no se ha podido constatar una influencia positiva sobre su respuesta regenerativa.

Conclusiones: son necesarios nuevos estudios para poder establecer conclusiones definitivas sobre la utilidad de los implantes ectópicos de hepatocitos.

PALABRAS CLAVE: trasplante hepatocelular, islotes pancreáticos, regeneración hepatocitaria.

INTRODUCCIÓN

Durante las últimas décadas, el trasplante hepático ortotópico (THO) se ha perfeccionado considerablemente y en la actualidad constituye una alternativa terapéutica bien

consolidada para aquellos pacientes con enfermedades hepatobiliares progresivas e irreversibles (1). No obstante, esta opción quirúrgica sigue teniendo sus limitaciones, fundamentalmente por la escasez de donantes y por su gran morbimortalidad (2, 3).

Este hecho ha motivado en el seno de los equipos de trasplante la constante inquietud por encontrar alternativas al THO (4). Entre ellas, una de las más esperanzadoras es el implante de una suspensión de hepatocitos en el seno de un determinado órgano (5). Este trasplante hepatocelular (THC) busca aportar tejido hepático en forma de injerto libre que pueda asumir, temporal o definitivamente, todas o alguna de las funciones hepáticas (6, 7).

En esta línea se vienen desarrollando numerosas investigaciones quirúrgicas en un intento de perfeccionar los modelos experimentales y posibilitar su extrapolación a la clínica humana. A nivel experimental han sido numerosos los lugares utilizados como receptores de los hepatocitos transplantados (peritoneo, cápsula suprarrenal, etc), siendo el bazo el más utilizado (8). Recientes estudios funcionales realizados en este modelo, han mostrado que en situaciones de máxima exigencia funcional (isquemia hepática, trasplante hepático, etc) se pone de manifiesto la escasa viabilidad del injerto hepatocelular en el seno del parénquima esplénico. Como justificación se ha sugerido la existencia de un factor humoral en el flujo sanguíneo portal responsable del mantenimiento de la integridad hepatocelular (9-11) y del que carece el modelo esplénico.

Recientemente, se ha atribuido el origen de este factor hepatotrófico (bien la insulina o el glucagón) a los islotes de Langerhans. En este contexto, Ricordi et al (12, 13) han demostrado la mejoría en la viabilidad del implante hepatocelular cuando éste se realiza conjuntamente con islotes pancreáticos.

En un intento de valorar la relación entre las exigencias funcionales hepatocitarias y la importancia de un microambiente hepatotrófico (islotes pancreáticos) ha surgido nuestra hipótesis de trabajo. Si la asociación de islotes pancreáticos al implante de hepatocitos en bazo tiene una trascendencia real en relación al correcto funcionalismo de estas células, esto se debería traducir en una mejor respuesta a los estímulos regenerativos habituales.

* Laboratorio de Cirugía Experimental.

** Dpto. de Biología Celular.

Este trabajo ha sido financiado por el Proyecto 94-327-E089/90 de la U.P.V./E.H.U.

Para corroborar dicha hipótesis hemos diseñado este trabajo experimental en el que valoramos el efecto que tiene el cotransplante de islotes pancreáticos sobre la regeneración de hepatocitos implantados en el parénquima esplénico de la rata. En los grupos experimentales se induce la regeneración hepática mediante hepatectomía parcial y/o tratamiento con ciclosporina A.

MÉTODOS

Se han empleado ratas singénicas WAG, hembras de 200-250 g de peso, suministradas por el Estabulario de la Facultad de Medicina de la U.P.V./E.H.U. (Lejona). Los animales se han mantenido en ritmo circadiano de 12 h, con alimentación (A-04, Panlab) y bebida «ad libitum». 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 del 13 de Octubre de 1989).

Aislamiento de hepatocitos

Bajo anestesia con éter, y previa heparinización sistémica (200 UI), se cánula la porta con un catéter de Teflón 14G, a través del cual se inicia la perfusión del hígado con una solución de Hank, a 37° C (14). Tras 5 min de lavado se procede a la digestión enzimática con colagenasa tipo I al 0,5% (Sigma) en EMEM. Concluida la perfusión se deposita el hígado en una placa de Petri con colagenasa al 0,5%, se incide la cápsula con bisturí y mediante una agitación mecánica suave se liberan los hepatocitos. La solución de hepatocitos obtenida se filtra y se centrifuga a 700 rpm durante cuatro minutos (tres lavados sucesivos). Tras el último pase se resuspenden las células en 10 cc de medio EMEM y se procede a valorar la concentración celular obtenida en una cámara de Neubauer, así como la viabilidad de las células mediante el test de exclusión con Azul Tripán.

Aislamiento de islotes pancreáticos

Los islotes se obtienen mediante la técnica descrita por Lacy y Kostianovsky (15) y modificada posteriormente por Sutherland et al (16). Bajo anestesia con éter, el extremo proximal del conducto biliar común se cánula con un catéter de teflón (23G) y se perfunde lentamente el páncreas con 20 ml de una solución a 4° C de HBSS y colagenasa tipo XI (Sigma) a una concentración de 0,3 mg/ml. A continuación se realiza una pancreatectomía total y el páncreas se deposita en un matraz con 5 ml adicionales de solución de colagenasa, para su incubación posterior en un baño termostático a 37° C durante 25 min. Tras la digestión enzimática, el páncreas se disgrega mecánicamente y la suspensión celular obtenida se centrifuga varias veces a 1.000 rpm durante un minuto. El sedimento celular resultante se suspende en 10 ml de una solución de dextrano al 27% (Sigma). Se crea el gradiente discontinuo mediante la adición

de una capa inferior de 4 ml de solución de dextrano al 27% y dos capas superiores, consistentes en 6 ml de dextrano al 23% y 4 ml de dextrano al 11%, respectivamente. Este gradiente se centrifuga primero a 400 rpm durante 4 min y después a 2.000 rpm durante 12 min. Los islotes puros son recogidos con una pipeta Pasteur de la interfase entre las dos capas superiores de dextrano. La identificación y posterior cuantificación de los islotes pancreáticos se realiza mediante la tinción con difeniltiocarbazona (Ditizona).

Inoculación de hepatocitos e islotes en el bazo

Las suspensiones de hepatocitos e islotes se mezclan y centrifugan una vez más a 500 rpm durante 4 min. De esta solución final de hepatocitos y de islotes pancreáticos se inocula 1 ml (que contiene aproximadamente 22 millones de hepatocitos y 300 islotes) en la pulpa esplénica a través del polo inferior del bazo de la rata (aguja de 20G).

Regeneración hepatocitaria

En los animales sometidos a transplante hepatocelular (con o sin islotes pancreáticos) la hepatectomía parcial del 70%, según técnica de Higgins (17), se llevó a cabo 24 horas después de la inoculación esplénica. La ciclosporina A (Sandimun®, Sandoz, Ltd) se ha administrado como estimulante de la regeneración hepatocitaria (18, 19) en dosis diarias de 20 mg/kg ip, iniciando el tratamiento la víspera de la intervención y continuándose hasta 24 horas después de la inoculación celular (tabla I).

Los animales se han sacrificado 48 horas después de la inoculación celular, obteniéndose fragmentos de hígado y bazo de cada animal, que se incluyeron en parafina. Sobre secciones histológicas de 5 micras de espesor, teñidas con reactivo de Schiff mediante la reacción de Feulgen, se cuantificó el DNA nuclear hepatocitario calculándose el porcentaje de hepatocitos en regeneración (%HR) (19), así como el gradiente regenerativo (GR: cociente del contenido medio en DNA de los hepatocitos regenerantes y el contenido medio en DNA de los hepatocitos estáticos) (20).

El análisis estadístico de los resultados se ha llevado a cabo mediante el test de la suma de rangos. Se han aceptado como significativas, aquellas diferencias con una $p < 0,05$.

TABLA I
Series experimentales

	Inoculación de hepatocitos	Inoculación de hepatocitos + islotes
Control (sin estímulo regenerativo)	5	5
Hepatectomía 70%	10	10
Ciclosporina A (20 mg/kg/día)	5	5
Hepatectomía 70% + CsA	10	10

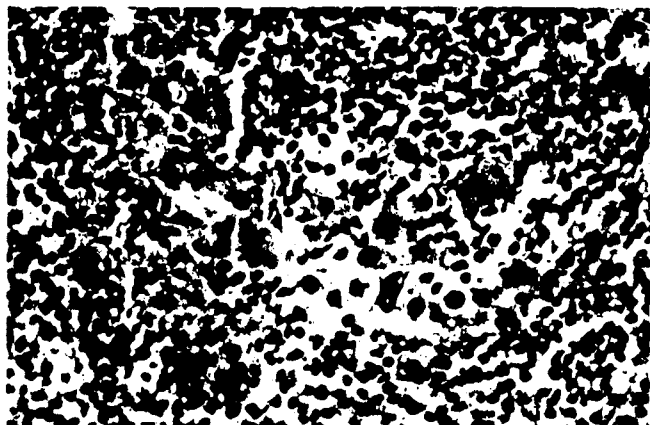


FIG. 1.— Los hepatocitos son fácilmente distinguibles por su núcleo característico entre los linfocitos del parénquima esplénico (Hematoxilina-Eosina, 400 X).

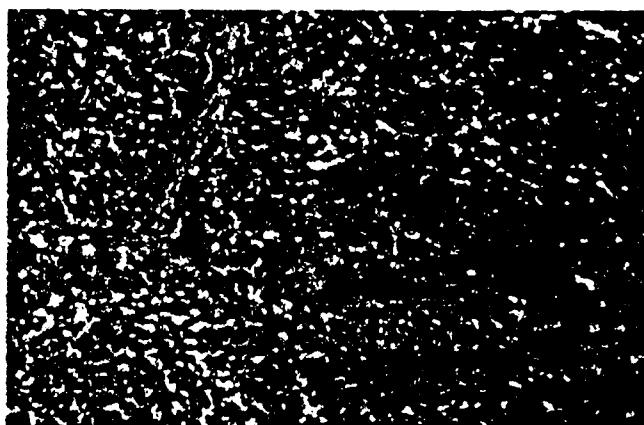


FIG. 2.— Se observan células insulín-positivas junto a hepatocitos en el seno de un folículo linfoide del bazo (Hematoxilina-Eosina, 200 X).

RESULTADOS

Viabilidad de las células aisladas

El tiempo transcurrido desde la interrupción del flujo sanguíneo en el hígado hasta la inoculación de los últimos hepatocitos osciló entre los 45 y los 115 minutos, sin que se hayan objetivado diferencias significativas entre la viabilidad de los hepatocitos al final del aislamiento y al terminar de inocular los animales. El número de hepatocitos obtenidos en cada digestión enzimática ha oscilado entre 250 y 360 millones (con un valor medio de 307 millones). La viabilidad de los hepatocitos aislados ha sido alta (87 a 98%, con una media de 94%).

El tiempo de isquemia en el caso de los islotes pancreáticos ha sido muy superior debido a la necesidad de utilizar cuatro páncreas por experiencia, oscilando entre los 60 y los 160 minutos. El número medio de islotes obtenido de cada aislamiento se sitúa en torno a los 1.600 islotes, permitiendo una media de 300 a 340 islotes pancreáticos por implante.

Observaciones histológicas

Los hepatocitos localizados en la pulpa esplénica presentan una apariencia morfológica normal con un núcleo cen-

tral y abundante citoplasma. Es frecuente que adopten una disposición epitelial en cordones celulares que asemejan su distribución natural en el parénquima hepático (Fig. 1). Los islotes pancreáticos, identificados por la presencia de insulina en el citoplasma de las células, se localizan en torno a las agrupaciones de hepatocitos en el seno de la pulpa esplénica (Fig. 2).

Regeneración hepatocitaria hepática

La inoculación esplénica ha incrementado las cifras basales de regeneración hepatocitaria (tabla II), siendo este incremento algo menor en los animales que recibieron islotes en su implante. El tratamiento con CsA induce una clara respuesta regenerativa, que sigue siendo menor en los implantes con islotes, aunque tampoco en este caso alcance significación estadística ($p = 0,111$). En cambio, en los animales sometidos a hepatectomía del 70% se alcanzan las cifras habituales de %HR, sin que existan diferencias atribuibles a los islotes. Lo mismo ocurre en las series que incluyen los dos estímulos regenerativos, en las que se aprecia el conocido efecto aditivo de los mismos.

En cuanto a la velocidad del proceso regenerativo -valorada por el GR- sólo se observan incrementos significativos en los animales sometidos a hepatectomía parcial, y en

TABLA II
Actividad regenerativa de los hepatocitos hepáticos

	Porcentaje de hepatocitos en regeneración		Gradiente Regenerativo	
	Sin islotes	Con islotes	Sin islotes	Con islotes
Sin estímulo regenerativo	8 + 1	6 ± 2	1,64 ± 0,16	1,50 ± 0,17
Hepatectomía 70%	42 ± 15*	35 ± 7*	1,57 ± 0,14	1,46 ± 0,06
Ciclosporina A	28 ± 11*	26 ± 17*	1,50 ± 0,17	1,48 ± 0,09
Hep. + Ciclosp.	36 ± 14*	34 ± 17*	1,48 ± 0,07	1,57 ± 0,20

* Las diferencias son significativas frente a la serie «sin estímulo regenerativo», en su propia columna. No hay diferencias significativas entre las series con y sin islotes pancreáticos.

TABLA III
Actividad regenerativa de los hepatocitos implantados en el bazo

	Porcentaje de hepatocitos en regeneración		Gradiente Regenerativo	
	Sin islotes	Con islotes	Sin islotes	Con islotes
Sin estímulo regenerativo	16 ± 5	10 ± 5	1,44 ± 0,88	1,56 ± 0,10
Hepatectomía 70%	42 ± 10*	43 ± 14*	1,62 ± 0,12*	1,60 ± 0,15
Ciclosporina A	24 ± 10	16 ± 4*	1,55 ± 0,14	1,46 ± 0,15
Hep. + Ciclosp.	52 ± 14*	57 ± 6*	1,49 ± 0,09	1,47 ± 0,20

* Las diferencias son significativas frente a la serie «sin estímulo regenerativo», en su propia columna. No hay diferencias significativas entre las series con y sin islotes pancreáticos.

aquellos inoculados con hepatocitos e islotes pero sin recibir ningún estímulo regenerativo.

Regeneración hepatocitaria en el bazo

El estudio de la regeneración hepatocitaria en el bazo ha demostrado diferencias en la respuesta regenerativa de esta población celular frente al hígado nativo. En primer lugar, el porcentaje de hepatocitos que entra en síntesis en el bazo es siempre menor que en el hígado. Pero además, la mayor actividad regenerativa se alcanza tras la inducción con ciclosporina en vez de con la hepatectomía parcial, y no se observa el habitual efecto sumatorio de ambos estímulos (tabla III). Al igual que ocurre en el hígado, la adición de islotes al implante no ha incrementado la respuesta regenerativa. Por último, el estudio del GR ha demostrado la ausencia de variaciones en la velocidad de síntesis del DNA; incluso está ausente la habitual tras hepatectomía parcial.

DISCUSIÓN

En líneas generales, se puede decir que la respuesta regenerativa de los hepatocitos implantados en el bazo no se ha beneficiado de la presencia de islotes pancreáticos, por lo que con nuestra investigación no hemos podido confirmar la hipótesis de partida.

Ante este resultado, caben dos posibles interpretaciones: bien que el modelo utilizado para contrastar la hipótesis no es adecuado, o bien que dicha hipótesis de trabajo no es cierta.

La primera causa de fracaso del modelo podría radicar en un funcionamiento anómalo de los islotes inoculados. Precisamente para constatar dicha capacidad funcional se ha recurrido a un marcaje con anticuerpos monoclonales contra la insulina, que ha puesto de manifiesto su presencia en las células implantadas en el bazo. A partir de este dato, se ha dado por supuesta la integridad funcional de los islotes pancreáticos afincados en el bazo. El que conservándose las células beta se hubieran dañado otras células insulares, resulta poco probable, aunque quizás debería considerarse.

Existen varias circunstancias que desde un punto de vista teórico podrían causar un funcionamiento anómalo de los islotes. El más evidente es el escaso tiempo transcurrido desde el implante hasta la exigencia funcional evaluada;

quizás 24 horas no sea tiempo suficiente para que los islotes recuperen su plena capacidad funcional tras la agresión que supone la extracción e implante de los mismos. Sin embargo, la demostración de insulina citoplasmática en el bazo parece contradecir ese supuesto. En otros modelos en que hemos estudiado la capacidad regenerativa de hepatocitos inoculados en el bazo, hemos constatado que 24 horas son suficientes para que dichas células respondan con normalidad (5) a los estímulos regenerativos. Sin embargo, pudiera ocurrir que dicho periodo no sea suficiente para que los islotes coimplantados liberen las hormonas al medio extracelular, y/o éstas a su vez estimulen a los hepatocitos incrementando su tasa regenerativa. Por otra parte Fernández-Cruz et al (22) han demostrado la necesidad que tienen los islotes de regenerar su árbol microvascular tras el implante. Al diseñar este trabajo, consideramos que dada la riqueza vascular de la pulpa esplénica y el relativo pequeño tamaño de los islotes, el aporte sanguíneo a los mismos estaría asegurado. En cualquier caso, esta hipótesis requiere nuevas experiencias en las que el intervalo entre el implante y el estímulo regenerativo se prolongue hasta un mínimo de siete días.

Otra posible justificación radica en el periodo de isquemia al que han sido sometidos los islotes hasta su implante definitivo en el bazo, que ha sido sensiblemente superior al de los hepatocitos. De hecho, en nuestro laboratorio hemos objetivado que las situaciones de isquemia enlentecen e incluso deterioran el funcionalismo hepatocitario (23), que con posterioridad parece recuperarse. No obstante, los resultados favorables obtenidos por otros autores (reversión de la diabetes o del fracaso hepático agudo) utilizando una técnica de aislamiento e inoculación en todo similar a la nuestra, restan credibilidad a este planteamiento (24-26).

Aún aceptando el correcto funcionamiento de los islotes implantados, cabe plantearse si son capaces de responder a los mecanismos normales de control de su actividad. Aunque los islotes mantuvieran su capacidad de secreción endocrina intacta, si no fuesen capaces de modificar selectivamente sus tasas de producción hormonal, no resultarían eficaces de cara a favorecer la regeneración de los hepatocitos ectópicos.

Hasta aquí hemos considerado el inadecuado funcionamiento de los islotes pancreáticos como posible causa de que el implante de éstos no haya incrementado la respuesta regenerativa de los hepatocitos implantados en el bazo. Sin embargo, cabe aún otro enfoque diferente, y es que la causa de esta falta de efecto se deba a que el número de islotes

implantados no haya sido suficiente. En este sentido, hay que tener en cuenta que la inmunodetección realizada con anticuerpos ha servido para poner de manifiesto la presencia de islotes, pero no que el número de islotes insulino-positivos en el bazo coincida con el número de islotes implantados. No obstante, los investigadores que han practicado el trasplante de islotes con esta misma técnica nunca se ha encontrado con una pérdida importante de islotes (24, 27). También es cierto que en la mayor parte de esos modelos existe alguna situación metabólica que somete a los islotes a un requerimiento funcional aumentado [diabetes mellitus (28), insuficiencia hepática aguda (27)]. Quizás la ausencia en nuestro modelo de un estímulo de estas características fuera la responsable de que, a pesar de utilizar el mismo número de islotes que otros autores, no obtengamos el suficiente nivel hormonal de los mismos.

Otra posible causa de la falta de efecto estimulador de los islotes en el implante hepatocelular pudiera ser que los hepatocitos implantados en el bazo, en ausencia de islotes, ya hubiesen alcanzado su máxima capacidad regenerativa. Si la tasa regenerativa de los hepatocitos del bazo igualara la tasa de los hepatocitos nativos, no cabría esperar un efecto positivo por parte de la adición de islotes. Sin embargo, en otras experiencias llevadas a cabo en nuestro laboratorio se había observado que esto no es así (23). De hecho, en nuestro modelo existe, al menos teóricamente, un margen de mejora para la respuesta regenerativa de los hepatocitos del bazo, como se aprecia en los animales sometidos a hepatectomía con ciclosporina que duplican la tasa regenerativa de la serie estimulada únicamente con ciclosporina.

Lo que resulta llamativo es que la máxima respuesta regenerativa se obtenga en los hepatocitos del bazo. Esto podría deberse a que por estar inmersos en los lagos vasculares del bazo, todos los hepatocitos tienen un microambiente rico en oxígeno, similar a la zona periportal del lobulillo hepático; y es en esa zona donde se observa la mayor actividad regenerativa de los hepatocitos (29).

Retomando el planteamiento inicial de esta discusión, si no aceptamos la incorrección del modelo, entonces debemos concluir con el rechazo de nuestra hipótesis de trabajo: "la adición de islotes al implante hepatocitario esplénico aportaría los factores hepatotróficos necesarios para asegurar su perfecto funcionalismo". En este sentido, Yu et al (30), tras sus estudios con derivación selectiva del flujo portal, sugieren la existencia de otros factores ajenos al páncreas (probablemente derivados del riego sanguíneo intestinal) fundamentales para la regeneración hepatocitaria. Y si esto es así, sería coherente que el aporte de islotes al bazo no suponga beneficio, pues seguirían careciendo de los factores hepatotróficos presentes en la sangre venosa de la vena mesentérica superior.

Correspondencia:

Ignacio García-Alonso Montoya.
Lab. de Cirugía Experimental.
Fac. de Medicina y Odontología.
48940 Lejona.

BIBLIOGRAFÍA

1. Balan V, Wiesner RH. Liver transplantation. *Current Opinion in Gastroenterology* 1993;9:383-90.
2. Calne RY. Recent advances in clinical transplantation of the liver and pancreas. *Transplant Proc* 1983;15:1263-8.
3. Maddrey WC, Van Thiel DH. Liver transplantation: an overview. *Hepatology* 1988;8(4):948-59.
4. Kasai S, Sawa M, Kondoh K, Ebata H, Mito M. Intraesplenic hepatocyte transplantation in mammals. *Transplant Proc* 1987;19(1):992-4.
5. García-Alonso I, Barceló P, Portugal V, Bilbao J, L. de Tejada I, Méndez J. Estudio de la respuesta regenerativa de hepatocitos implantados en el bazo. *Rev Esp Enferm Dig* 1991;80(4):247-51.
6. Nordlinger B, Mariani P, Calmus Y. Transplantation d'hépatocytes isolés. *Gastroenterol Clin Biol* 1994;18:68-77.
7. Strain AJ. Isolated hepatocytes: use in experimental and clinical hepatology. *Gut* 1994;35:433-6.
8. Hillan KJ, Burt AD, George WD, Malsween RNM, Griffiths MR, Bradley JA. Intraesplenic hepatocyte in rats with experimental liver injury: morphological and morphometric studies. *J Pathol* 1989;159:67-73.
9. Michalopoulos GK, Zarnegar R. Hepatocyte growth factor. *Hepatology* 1992;15(1):149-55.
10. Kamei T, Falgui L, Lacy PE, Callery MP, Flye MW. Allogenic islets transplanted intraportally maintain hepatic integrity following portacaval shunt in rats. *Transplant Proc* 1990;22(2):810-3.
11. Yu W, Wan X, Wright JR, Coddington D, Bitter-Suermann H. The effect of intrahepatic islet isografts on liver integrity following heterotopic auxiliary liver isotransplantation in rats. *Transplant Proc* 1992;24(6):2920-1.
12. Ricordi C, Lacy PE, Callery MP, Park PW, Flue MW. Trophic factors from pancreatic islets in combined hepatocyte-islet allografts enhance hepatocellular survival. *Surgery* 1989;105(2 part 1):218-23.
13. Ricordi C, Zeng Y, Tzakis A, Alejandro R, Demetris A, Fung J, Bereiter D, Mintz D, Starzl TE. Evidence that canine pancreatic islets promote the survival of human hepatocytes in nude mice. *Transplantation* 1991;52(4):749-50.
14. Seglen PO. Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol* 1976;13:29-83.
15. Lacy PE, Kostianovsky M. Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes* 1967;16:35.
16. Kaufman DR, Sutherland DER. Pancreatic islet isolation in rats with ductal collagenase distention, stationary digestion and dextran separation. *Transplantation* 1988;45(2):493-5.
17. Higgins GM, Anderson RM. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch Path* 1931;12:186-202.
18. Kim YI, Salvini P, Auxilia F, Calne RY. Effect of CsA on hepatocyte proliferation after partial hepatectomy in rats: Comparison with standar immunosuppressive agents. *Am J Surg* 1988;155:245-9.
19. García-Alonso I, Méndez JJ, Barberá E. Cyclosporin modifies liver regeneration following partial hepatectomy. *Surg Res Com* 1989;6:43-9.

20. García-Alonso I, Barceló P, López de Tejada I, Portugal V, Bilbao J, Méndez J. Efectos del transplante hepatocelular intraesplénico sobre la actividad regenerativa del hígado. *Cirugía Española* 1992;6(51):440-4.
21. Portugal V, García-Alonso I, Bilbao J, Barceló P, Múgica P, Méndez J. Estudio de la acción hepatotrófica de la ciclosporina A en un modelo de isquemia hepática en la rata. *Rev Esp Enferm Dig* 1993;83(4):255-9.
22. Mendola JF, Goity C, Fernández-Álvarez J, Sáenz A, Benarroch G, Fernández-Cruz L, Gomis R. Immunocytochemical study of pancreatic islet revascularization in islet isograft. *Transplantation* 1994;57(5):725-30.
23. García-Alonso I, Portugal V, Barceló P, Díaz J, Iturburu I, Méndez J. Modificaciones inducidas por la ciclosporina A sobre la respuesta regenerativa del hígado isquémico en la rata. *Cir Esp* 1990;47(4):393-7.
24. Barneo L, Esteban MM, Tejada F, García C, Marín B. Comparison of various techniques for rat islet preparation. *Transplant Proc* 1990;22(2):777-8.
25. Callery MP, Kamei T, Flye MW, Davis C, Swanson C, Olack B, Lacy PE, Scharp DW. Intrahepatic islet autografts in dogs function despite completely diverting portacaval shunt. *Transplant Proc* 1990;22(2):767-70.
26. Federlin KF, Bretzel RG, Hering BJ. Recent achievements in experimental and clinical islet transplantation. *Diabetic Medicine* 1991;8:5-12.
27. Xiangdong W, Ar Rajab A, Ahren B, Andersson R, Bengmark S. Improvement of the effects of intraesplenic transplantation of hepatocytes after 90% hepatectomy in the rat by cotransplantation with pancreatic islets. *Transplantation* 1991;52(3):462-6.
28. Kaufman DB, Morel P, Field MJ, Tzardis P, Minn SR, Sutherland DER. Canine islet autografts: functional outcome as influenced by islet number and purity. *Transplant Proc* 1990;22(2):771-4.
29. García-Alonso I, Méndez JJ, Barberá E. Changes in succinate dehydrogenase zonation following cyclosporin-treatment in normal and regenerating rat liver. *Cell Mol Biol* 1988;34(6):605-14.
30. Yu W, Wan X, Wright JR, Coddington D, Bitter-Suermann H. Heterotopic liver transplantation in rats: effect of intrahepatic islet isografts and split portal blood flow on liver integrity after auxiliary liver is transplantation. *Surgery* 1994;115(1):108-17.

Recibido: 21-X-96.