



# MODELO PARA EL ESTUDIO DE LA ISQUEMIA HEPÁTICA INTERMITENTE EN LA RATA. ISQUEMIA HEPÁTICA INTERMITENTE

## AN EXPERIMENTAL MODEL OF INTERMITTENT LIVER ISCHEMIA IN RATS. INTERMITTENT LIVER ISCHEMIA

Loureiro C, Portugal V, García-Alonso I, Méndez J.

Laboratorio de Cirugía Experimental. Facultad de Medicina y Odontología. UPV/EHU. Lejona.

(\*) El presente trabajo ha sido financiado por el Proyecto de la UPV/EHU 144.327-EA0206/96

### PALABRAS CLAVE

Isquemia hepática, hepatectomía parcial, ischemia-reperfusion, rata.

### KEY WORDS

Liver ischemia, partial hepatectomy, ischemia-reperfusion injury, rat.

### Correspondencia:

PROF. IGNACIO GARCÍA-ALONSO MONTOYA  
Dpto. de Cirugía y Radiología y M.F.  
Fac. de Medicina y Odontología  
B° Sarriena s/n  
48940-Leioa. España  
Tfno.: 946 012 816. Fax.: 946 012 781  
Email: ocpgamoi@lg.ehu.es

### RESUMEN

A pesar de los numerosos estudios publicados, no se conoce cuál es la duración máxima de isquemia hepática tolerable, ni existe una pauta terapéutica universalmente aceptada para prolongarla. Este trabajo presenta un modelo experimental de isquemia hepática intermitente asociada a hepatectomía, estudiando sus implicaciones. Se han realizado 7 series de animales (ratas hembras Sprague-Dawley) divididos en dos grupos: isquemia hepática total e isquemia parcial (lóbulo caudado y lateral derecho); en ambos grupos se practicó una hepatectomía del 70% al finalizar la isquemia. Para determinar el tiempo máximo de isquemia tolerable los animales han sido sometidos a periodos de isquemia progresivamente mayores (en duración y número) alternados con periodos de 5 minutos de reperfusion. Una vez fijado el modelo óptimo para el estudio, se ha realizado una serie de 45 animales sometidos a cuatro periodos de isquemia total de 20 minutos (con intervalos de 5 minutos de reperfusion) y hepatectomía 70%. En ella se ha valorado la supervivencia, así como los niveles séricos de bilirrubina total (Bil-T), alanino aminotransferasa (ALT), lactato deshidrogenasa (LDH), fosfatasa alcalina (FA) y gamma-glutamyl transpeptidasa (GGT) a las 24 y 48 horas, y a los 7 días. La supervivencia ha sido del 35%. Las alteraciones bioquímicas muestran dos momentos diferenciados: uno inicial (24 h.), con elevación de la ALT, y otro tardío (7º día), con incrementos persistentes de la GGT, FA y Bil-T. El modelo experimental desarrollado resulta válido para estudiar la isquemia hepática intermitente y ensayar tratamientos que permitan prolongar su duración.

### ABSTRACT

Despite of the great number of experimental studies on liver ischemia, the longest period tolerated has not yet been established, and there is not a commonly accepted therapy to prolong it. This work presents an experimental model of intermittent liver ischemia associated to partial hepatectomy. Seven series of female Sprague-Dawley rats have been divided in two groups: total liver ischemia and parcial liver ischemia (caudate and right lateral lobes); in both groups a 70% hepatectomy was performed at the end of the ischemia. To establish the longest tolerable ischemia, the animals were subjected to progressively greater ischemic periods (in duration and number), with five minutes of reperfusion between them. Once the most suitable model was established, 45 animals were subjected to four ischemic periods 20 minutes long (with 5 minutes intervals of reperfusion) and 70% hepatectomy. In this series both survival and serum levels of Total Bilirubine (T-Bil), alanin transaminase (ALT), lactate dehydrogenase (LDH), alkaline phosphatase (AP) and gamma-glutamyltranspeptidase (GGT) were determined on days 1, 2 and 7. Survival rate was down to 35%. Biochemical analyses show two different pictures: on the first day there were high ALT levels, while on the last day GGT, AP and T-Bil were elevated. The experimental model proves to be useful to study intermittent liver ischemia and allows future experiments to try treatments useful to safely prolong it.

## INTRODUCCIÓN

Durante los últimos años, la cirugía hepática ha experimentado un gran auge. Por un lado, el trasplante hepático se ha convertido en una opción terapéutica bien asentada. Por otro, la cirugía de resección hepática, ayudada por los últimos avances técnicos (bisturí ultrasónico, ecografía intraoperatoria...) se considera ya una técnica universalmente aceptada.

Dentro de este estado de cosas, la hemorragia intraoperatoria se ha convertido, de forma indudable, en el principal factor pronóstico, tanto de la morbilidad como de la mortalidad, después de una resección hepática<sup>1</sup>. El pinzamiento temporal del pedículo hepático, según la técnica descrita por Prigle<sup>2</sup>, es el recurso técnico más utilizado para limitar la hemorragia en el plano de resección.

Sin embargo, este efecto beneficioso se ve limitado por los efectos adversos de la interrupción del flujo vascular "hepatópeto", fundamentalmente la isquemia hepática y la venostasis esplácnica. La isquemia o la hipoxia hepática pueden originar, según su duración y la capacidad funcional previa del órgano, desde una disfunción transitoria hasta un fracaso hepático y la muerte del paciente en algunas ocasiones. Adicionalmente, cuando la oclusión es prolongada, se produce una intensa congestión de la pared del intestino con rotura de la integridad de la barrera intestinal. Los consiguientes fenómenos de traslocación bacteriana, la liberación de mediadores químicos inflamatorios o de radicales del oxígeno en la sangre portal pueden ser tóxicos para el hígado<sup>3</sup>. También ha sido probado que la congestión esplácnica origina un secuestro de plasma a nivel intestinal condicionando una disminución de la volemia efectiva, originando un descenso del flujo sanguíneo hepático durante la reperusión<sup>4</sup>. Además de las repercusiones a nivel local de la isquemia y reperusión hepáticas, se ha objetivado la aparición de lesiones sistémicas que dentro de un síndrome de reacción inflamatoria sistémica pueden evolucionar hacia una situación de fracaso multiorgánico<sup>5</sup>.

En los casos en que la isquemia hepática se realiza para la práctica de hepatectomías de diferentes extensiones, se suma otra exigencia al funcionalismo hepático, dado que las consecuencias de la isquemia han de ser soportadas por una masa hepática reducida. Lo mismo puede decirse de la aplicación de la isquemia en hígados cirróticos, en que aunque la masa hepática total sea normal, desde un punto de vista funcional se encuentra reducida, más aun si se realiza algún tipo de resección.

Habida cuenta de las citadas implicaciones de la isquemia hepática, se han realizado numerosos estudios sobre la misma. A pesar de ello, aun no se conoce cual es el tiempo máximo tolerable de ésta, ni existe una pauta terapéutica aceptada de forma universal, que permita prolongar este tiempo, minimizando la mortalidad y las alteraciones funcionales.

Con el objetivo de reducir al mínimo las consecuencias de la isquemia hepática mantenida, se ha planteado la realización de los pinzamientos vasculares de forma discontinua. Sin embargo, sus ventajas frente al clampaje continuo están aún por establecer. La administración de diferentes fármacos (fundamentalmente antioxidantes) antes, durante o después de la isquemia hepática, también pretende reducir los efectos adversos de ésta.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### ANIMALES

El estudio se ha realizado en ratas Sprague-Dawley (OFA) hembras (210-250 gramos) suministradas por el Estabulario de la Universidad del País Vasco (UPV/EHU). Se han respetado en todo momento las indicaciones de la "Guía nacional española para el cuidado animal en experimentación y otros fines científicos" (Real Decreto 223/88).

Los animales han sido estabulados en grupos de cuatro, manteniéndose en ritmo circadiano de 12 horas, con alimentación (A-04, Panlab) y agua ad libitum. Las experiencias se han realizado siempre entre las 16 y las 23 horas bajo anestesia general.

### TÉCNICAS QUIRÚRGICAS

La isquemia hepática se ha provocado ocluyendo el pedículo vascular mediante clips de Yassargil. En unos casos (isquemia total) se han colocado dos clips rectos en el pedículo porta hepatis; en otros (isquemia parcial) se han bloqueado de manera independiente mediante sendos clips curvos de Yassargil los pedículos de los lóbulos caudado y lateral derecho. Una vez realizado el clampaje, o retirado el mismo, se ha cerrado la cavidad abdominal. No se ha practicado ningún procedimiento para obtener descompresión del territorio esplácnico. La isquemia hepática se ha realizado de forma intermitente, con periodos de isquemia de diferente duración y periodos de reperusión de cinco minutos en todos los casos.

Un minuto antes de terminar el último periodo de isquemia, se ha realizado una hepatectomía del 70%, según la técnica descrita por Higgins y Anderson<sup>6</sup>.

Como vía de administración de fármacos, se ha introducido en la vena femoral derecha (previa disección) un catéter de linfografía (27 G), fijándolo mediante un clip de Yassargil. En todos los animales se ha infundido un bolo de 0,8 cc de suero fisiológico al comienzo de la intervención, y 0,2 cc adicionales medio minuto antes de la finalización de cada uno de los periodos de isquemia. Una vez concluida la intervención, se retiraba el catéter y se realizaba hemostasia de la vena mediante compresión digital.

### PARÁMETROS ESTUDIADOS

Supervivencia: en las series preliminares (empleadas para la definición del modelo experimental) se realizó seguimiento de los animales durante tres semanas tras la intervención. Habida cuenta que ninguno de los animales falleció más tarde del quinto día, en la serie definitiva se consideraron supervivientes los animales que alcanzaron con vida los 7 días tras la cirugía.

Se han determinado (mediante espectrofotometría) los niveles séricos de bilirrubina total, gamma-glutamil transpeptidasa (GGT), alanino aminotransferasa (ALT), lactato deshidrogenasa (LDH) y fosfatasa alcalina (FA) a las 24, 48 horas y 7 días. Los valores normales empleados como controles se han obtenido de diez animales no sometidos a procedimiento quirúrgico alguno. Los días primero y segundo, se extrajeron 1,2 cc de sangre, mediante punción de la vena yugular derecha, bajo anestesia general. El séptimo día, coincidiendo con la anestesia para el sacrificio del animal, se obtuvieron 5 cc de sangre de la vena cava infrarrenal.

La sangre (sin aditivo alguno) se centrifugó durante 10 minutos a 3.000 r.p.m. El suero obtenido se dividió en cinco alícuotas y se congeló a -85° C hasta el momento del estudio bioquímico.

### GRUPOS EXPERIMENTALES

Para definir el modelo se han realizado dos grupos de experiencias: isquemia hepática total y parcial. Partiendo de tres periodos de isquemia de 10 minutos, separados por cinco minutos de reperusión, se fueron aumentando progresivamente la duración y/o el número de dichos periodos, obteniendo tiempos globales de isquemia más prolongados en cada serie respecto a la precedente (Figura 1). Estas series se han compuesto de 5 animales en cada uno de los grupos (isquemia total o parcial), salvo en el último de ellos (5 periodos de 20 minutos de isquemia) en los que se emplearon 10 animales en cada grupo.

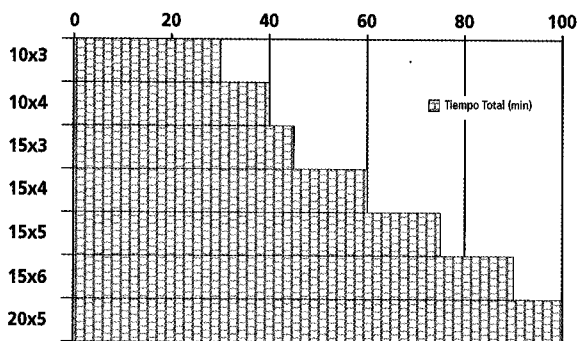


Figura 1.- Series preliminares.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el estudio de supervivencia de las series preliminares, se realizó una serie adicional de isquemia total con cuatro periodos de 20 minutos, compuesta por 10 animales.

El estudio definitivo de este trabajo se ha realizado en 45 animales sometidos a 4 periodos de isquemia hepática total de 20 minutos, con periodos de reperusión de 5 minutos, y hepatectomía del 70% al final del procedimiento.

### ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La comparación de la supervivencia obtenida en los diferentes grupos, se ha realizado mediante el test exacto de Fisher. Los resultados de las determinaciones bioquímicas se han comparado con los valores normales mediante la T de Student. Ambos análisis se han llevado a cabo mediante el programa informático GraphPad Prism(r). Se han aceptado como significativas aquellas diferencias para las cuales el valor de la "p" fue inferior a 0,05.

### RESULTADOS

#### SERIES PRELIMINARES

Los primeros ensayos se realizaron con isquemia hepática parcial. A pesar de que el periodo total de isquemia se prolongó más allá de la hora y media, la mortalidad inducida por

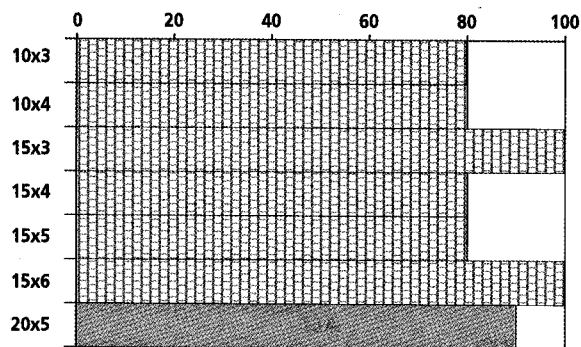


Figura 2.- Porcentaje de supervivencia (isquemia parcial). En el eje vertical número de periodos y su duración.

este insulto fue mínima (Figura 2). De hecho, la comparación de los diferentes grupos entre sí mediante el test exacto de Fisher, mostró que las leves diferencias observables no alcanzan significación estadística.

Estos resultados nos llevaron a ensayar un insulto mayor, mediante clampaje en bloque del pedículo portal. Tras repetir los mismos grupos que en la serie anterior, sólo al realizar cinco periodos de isquemia de veinte minutos cada uno se registró un descenso importante de la supervivencia (Figura 3). De hecho, la supervivencia en este grupo descendió bruscamente desde el 80% en los grupos anteriores, hasta el 20% (se obtiene una  $p < 0.001$  al aplicar el test exacto de Fisher).

En la serie de isquemia total con 4 periodos de isquemia hepática de 20 minutos compuesta de 10 animales, se obtuvo una supervivencia del 40%. Con el fin de disminuir parcialmente la mortalidad y por tanto el número de animales necesarios para obtener suficientes supervivientes a los siete días, escogimos este último como modelo experimental definitivo.

### SERIE DEFINITIVA

De los 45 animales, 20 sobrevivieron a las 24 horas, lo que supone una supervivencia del 44.4%. Tres animales más fallecieron a las 48 horas, siendo la supervivencia global en este momento del 37.8%. Otro animal murió a los 4 días, ofreciendo una supervivencia del 35.6%. Desde este día hasta el final del seguimiento (7 días) no se produjeron más muertes.

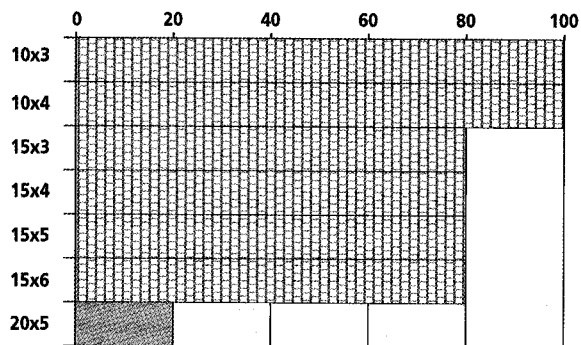


Figura 3.- Porcentaje de supervivencia (isquemia total). En el eje vertical número de periodos y su duración.

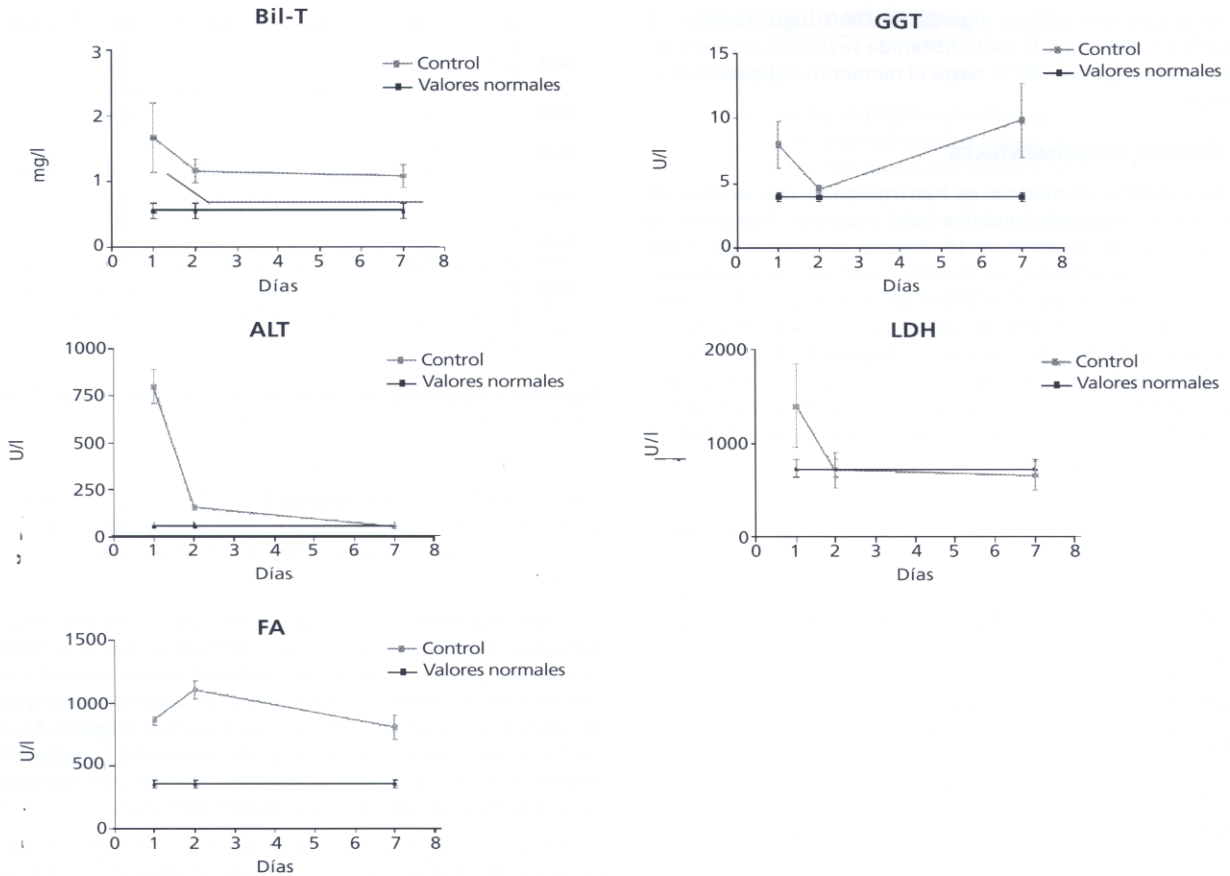


Figura 4.- Niveles séricos de Bil-T, GGT, ALT, LDH y FA.

En la **Tabla I** se detalla la media y el error estándar de los valores séricos de los enzimas estudiados, tanto en animales no sometidos a procedimiento quirúrgico alguno (valores normales), como en el grupo experimental a las 24 y 48 horas, y a los siete días del insulto isquémico.

Los animales del grupo experimental presentaron un incremento de los niveles séricos de Bil-T que se mostró significativo a las 48 horas y a los siete días. La combinación de isquemia y hepatectomía ha producido una elevación de los niveles séricos de GGT a las 24 horas, que se mantiene aunque atenuada a las 48 horas, y aparece aún aumentada el séptimo día. Estas diferencias no llegan a alcanzar significación estadística. También se aprecia un incremento de ALT a las 24 horas, que se reduce a las 48 horas ( $p < 0,05$ ), normalizándose a los siete días. Por su parte, la LDH, que aparece aumentada a las 24 h.,

se normaliza a partir de las 48 horas ( $p > 0,05$ ). Por último, la FA aparece elevada en los tres momentos del estudio ( $p < 0,05$ ).

## DISCUSIÓN

La elección del animal de experimentación es un determinante de toda investigación. En las investigaciones sobre isquemia hepática, el animal más frecuentemente empleado ha sido la rata en virtud de su manejabilidad y fácil estabulación. En nuestro modelo hemos escogido dentro de éstas, fundamentalmente en nuestra experiencia previa, la cepa "Sprague-Dawley".

Los trabajos publicados sobre isquemia hepática en ratas emplean diferentes técnicas de aplicación de la misma. La realización de experiencias sobre hígados aislados<sup>7</sup> permite la

Tabla I.

### NIVELES SÉRICOS MEDIOS Y ERROR ESTÁNDAR DE LOS DIFERENTES PARÁMETROS BIOQUÍMICOS ESTUDIADOS

	BILIRRUBINA TOTAL (MG/L)	GGT (U/L)	ALT (U/L)	LDH (U/L)	FA (U/L)
Valores normales	0,56 ± 0,12	3,9 ± 0,28	60,3 ± 1,45	732 ± 91,8	355 ± 28,7
24 horas	1,67 ± 0,53	8 ± 1,79	798 ± 91,3	1398 ± 448	862 ± 35,8
48 horas	1,17 ± 0,18	4,53 ± 0,27	158 ± 13,9	720 ± 191	1110 ± 73,1
7 días	1,08 ± 0,17	9,87 ± 2,85	54 ± 5,31	658 ± 152	808 ± 95,1

prolongación del periodo isquémico por encima de los límites establecidos para la supervivencia del animal. Esto permite un estudio cronológico de los fenómenos isquémicos, posibilitando además diferenciar, en todo momento, el periodo isquémico del periodo de reperfusión. Éste es el método idóneo para el ensayo de soluciones de preservación. Sin embargo, las condiciones en que se desarrolla el experimento se alejan de las fisiológicas. Esto es de especial importancia cuando se intenta realizar un estudio fisiopatológico o de procesos biológicos dependientes de la continuidad anatomofuncional de un organismo (por ejemplo, la regeneración hepática).

Debido a esto, hemos empleado un modelo experimental "in vivo" que, además, permite remedar una situación de isquemia y reperfusión con resección hepática, manteniendo las relaciones del hígado con el resto de estructuras del organismo.

La técnica empleada para la inducción de la isquemia hepática es concordante en la mayor parte de estudios, utilizándose clips o clampas microquirúrgicas. Esto permite una interrupción del flujo homogénea, posibilitando una fácil revascularización. Otros métodos como el empleo de ligaduras<sup>8</sup>, "vascular loops"<sup>9</sup>, torniquetes<sup>10</sup>, embolización con microesferas<sup>11</sup> o estados de bajo flujo<sup>12</sup>, o bien no permiten dicha homogeneidad o bien no son reversibles.

En cuanto a la extensión de la isquemia realizada, una revisión crítica de la literatura nos muestra dos tendencias: por una parte aquellas situaciones en las que se realiza isquemia de parte del hígado<sup>13</sup>, preservando la función hepática durante el procedimiento y permitiendo periodos de isquemia más prolongados; por otra aquellas que realizan la interrupción total del flujo hepático<sup>14</sup>, con importantes consecuencias fisiopatológicas como son el estado anhepático y la congestión del territorio esplácnico (condicionando un descenso de la volemia hepática efectiva durante la reperfusión). Estudios específicos han mostrado la gran sensibilidad de las ratas frente a la congestión esplácnica, habiendo sido informada una mortalidad del 50% con una oclusión de la vena porta de 30 minutos<sup>15</sup>. Para evitar este punto limitante de la idoneidad de la isquemia hepática total como modelo experimental, se han empleado diferentes maniobras: desarrollo de cortocircuitos porto sistémicos<sup>16</sup>; asociar a la isquemia hepática un clampaje del tronco celiaco y de la arteria mesentérica superior<sup>4</sup>; realizar isquemia hepática parcial con extirpación<sup>17</sup> o ligadura<sup>18</sup> de los segmentos hepáticos no sometidos a isquemia, al final del procedimiento. Dado que estos métodos no están exentos de complicaciones (dificultad técnica, isquemia intestinal asociada, modificación de la tolerancia a la isquemia, etc.) otros autores han desarrollado modelos animales de isquemia hepática total sin aplicar medidas de descongestión esplácnica<sup>19</sup>. Asimismo, en humanos, es práctica clínica habitual utilizar la maniobra de Pringle sin asociar procedimiento alguno de descompresión del territorio esplácnico.

En este sentido, habitualmente se utilizan clampajes intermitentes para aumentar la capacidad del hígado para tolerar la isquemia prolongada y el estasis venoso esplácnico (periodos de 20 minutos con 5 de desclampaje, en el caso de hígados sanos, y de 10 minutos con 5 de desclampaje en hígados cirróticos)<sup>20</sup>. Algunos detractores de estas maniobras consideran que varios periodos de reperfusión podrían ser más deletéreos para el hígado y aumentarían las pérdidas hemáticas. Sin embargo, ha sido demostrado que la pérdida sanguínea durante la hepatectomía con isquemia intermitente es compa-

rable a la obtenida con el clampaje continuo, pero con un menor daño parenquimatoso y un menor grado de lesiones sistémicas<sup>21</sup>. Basándonos en estos datos, decidimos emplear en el presente estudio un modelo de isquemia hepática intermitente.

Para completar nuestro diseño experimental hemos asociado una hepatectomía del 70% al objeto de conseguir una exigencia funcional que, de manera probada en experiencias previas<sup>6,22,23</sup>, es superada por las ratas, además de un estímulo que nos permita cuantificar la regeneración hepática, como otro parámetro funcional hepático.

A la hora de diseñar nuestras experiencias, inicialmente enfrentamos las técnicas de isquemia hepática total e isquemia hepática parcial asociadas a hepatectomía del 70%, tratando de identificar la duración idónea del periodo isquémico capaz de inducir una mortalidad suficientemente elevada para posteriormente poder valorar diferencias en la supervivencia ante distintos tratamientos farmacológicos. De manera general optamos por periodos progresivos de isquemia, aumentando el número y la duración de los clampajes, manteniendo periodos de reperfusión de 5 minutos, siguiendo las observaciones realizadas por otros autores<sup>15</sup>. Basándonos en experiencias previas de nuestro Laboratorio<sup>22</sup> (en las que obteníamos una mortalidad del 60% con la realización de hepatectomía del 70% tras aplicación de un único periodo de isquemia hepática de 20 minutos con clampaje asociado de la arteria mesentérica superior y del tronco celiaco, con el fin de evitar la congestión esplácnica) comenzamos con 3 periodos de 10 minutos. Posteriormente, fueron aumentando los mismos hasta 5 periodos de 20 minutos, alcanzando en el grupo de isquemia hepática total un 80% de mortalidad. Para alcanzar el objetivo por el que había sido diseñado este modelo, creímos necesario reducir dicha mortalidad, optando por cuatro periodos de isquemia total de 20 minutos de duración. Con esto, obtuvimos una mortalidad adecuada (60%) para los objetivos señalados.

Con el objeto de obtener un estudio cronológico de las alteraciones funcionales hepáticas, hemos optado por realizar las determinaciones séricas de varios marcadores bioquímicos de hepatopatía a las 24, 48 horas y siete días del procedimiento quirúrgico. Teniendo en cuenta que en nuestro modelo sólo esperamos encontrar lesión hepática y no trastornos del árbol biliar, se ha optado por determinar Bil-T, obviando la determinación de su fraccionamiento.

En cuanto a las determinaciones de aminotransferasas, dado que la ALT es más específica para valorar el daño hepático y en algunos estudios experimentales sobre isquemia hepática, varios autores objetivan un pico más tardío en el caso de la ALT que en el de la aspartato-aminotransferasa (AST)<sup>24,25</sup>, hemos optado por la determinación de la ALT en nuestro modelo, dados los momentos elegidos para realizar las determinaciones bioquímicas.

Asimismo, las situaciones que originan daño hepatocelular agudo también pueden elevar los valores de la LDH. En la lesión hepática anóxica, se producen incrementos intensos de la LDH sérica y por ello hemos considerado útil la determinación de este parámetro. Debido a la posible aparición de elevaciones de PA en lesiones hepáticas parenquimatosas sin existir un trastorno de la excreción biliar es por lo que hemos decidido realizar la determinación de la misma. Finalmente, también hemos determinado los niveles de GGT, habida cuenta

que parece ser más sensible para detectar los daños hepáticos menores, que el resto de los parámetros anteriores<sup>26</sup>. Los cinco parámetros estudiados suponen una batería bioquímica que nos permitirá un fiel conocimiento del funcionalismo hepático, fácilmente reproducible y con un bajo coste económico. La posible correlación entre las variaciones de los parámetros bioquímicos estudiados y las modificaciones observadas en la supervivencia, nos permitiría valorar hasta qué punto es la lesión local (a nivel hepático) la responsable del fallecimiento de los animales.

Analizando de modo global nuestro modelo, debemos señalar que hemos obtenido una mortalidad en el grupo control del 65% lo que nos permitirá realizar valoraciones de las posible mejoras aportadas por diferentes tratamientos. El posible efecto negativo de los tratamientos también puede ser valorado con el presente modelo, aunque con menor sensibilidad que en caso de la mejoría.

Por otro lado, la congestión esplácnica no parece la responsable de la mortalidad acaecida, dado que ésta ha sido similar a la obtenida con un único periodo de isquemia hepática total de 20 minutos de duración con clampaje asociado del tronco celiaco y la arteria mesentérica superior<sup>22</sup>, lo que evita la citada congestión. Asimismo, es posible argumentar que los periodos de isquemia iniciales de este modelo pueden actuar como un acondicionamiento isquémico. El citado acondicionamiento se define como uno o varios cortos periodos de isquemia que confieren un estado de protección frente a un daño subsecuente por isquemia prolongada y reperfusión. Sin embargo, en los estudios en que se ha empleado la citada maniobra en el hígado, el periodo inicial de isquemia solo confiere protección si es de a lo sumo 10 minutos de duración, empeorando los resultados respecto a la ausencia del mismo cuando es de 20 minutos<sup>27</sup>. Por lo anterior, y por la ausencia de un periodo de isquemia más prolongado tras los primeros, es por lo que no puede considerarse que haya sido realizado un acondicionamiento.

Los resultados obtenidos en el estudio de los marcadores bioquímicos nos permiten valorar la cronología de las alteraciones funcionales a nivel hepático. En este sentido, podemos objetivar dos periodos diferenciados: uno inicial, señalado por la elevación de la ALT a las 24 horas, y otro tardío, mostrado por la elevación persistente de la GGT, FA y Bil-T a los siete días.

Por tanto, indicar que la realización de cuatro periodos de isquemia hepática total de veinte minutos de duración, con periodos de reperfusión de cinco minutos y hepatectomía del 70% en la rata, se muestra como un modelo experimental válido para el estudio de la eficacia de diferentes tratamientos en limitar las lesiones por isquemia reperfusión hepáticas.

#### BIBLIOGRAFÍA

1. Nagao T, Goto S, Kawano N, Inoue S, Mizuta T, Morioka Y et al. Hepatic resection for hepatocellular carcinoma. Clinical features and long-term prognosis. *Ann Surg* 1987; 205(1): 33-40.
2. Pringle JH. Notes on the arrest of hepatic hemorrhage due to trauma. *Ann Surg* 1908; 48: 541-549.
3. Colletti LM, Green M. Lung and liver injury following hepatic ischemia/reperfusion in the rat is increased by exogenous lipopolysaccharide which also increases hepatic TNF production in vivo and in vitro. *Shock* 2001; 16(4): 312-319.
4. Yamamoto S, Nitta N, Ozaki N, Morimoto T, Kamiyama Y, Yamaoka Y et al. Deleterious effects of splanchnic congestion on hepatic energy metabolism following repeated portal triad cross-clamping in dogs. *Circ Shock* 1988; 26(2): 193-201.
5. Kimura N, Muraoka R, Horiuchi T, Tabo T, Uchinami M, Yokomachi J et al. Intermittent hepatic pedicle clamping reduces liver and lung injury. *J Surg Res* 1998; 78(1): 11-17.
6. Higgins GM, Anderson RM. Experimental pathology of the liver. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch Pathol* 1931; 12: 186-202.
7. Uchida Y, Tamaki T, Tanaka M, Kaizu T, Tsuchihashi S, Takahashi T et al. Induction of specific stress response increases resistance of rat liver allografts to cold ischemia and reperfusion injury. *Transpl Int* 2003; 16(6): 396-404.
8. Ontell SJ, Makowka L, Trager J, Mazzaferro V, Ove P, Starzl TE. Pharmacologic modulation of experimental postischemic hepatic function. *Ann Surg* 1989; 209(2): 200-210.
9. Delgado VE, Delgado E, Fernández N, De Miguel E. Efecto protector del alopurinol en la preservación hepática. Estudio experimental. *Cir Esp* 1990; 48(6): 623-630.
10. Spiegel HU, Hauss J, Langhans P, Brown S, Brälsch CE. Hypoxia and reoxygenation after temporary occlusion of the liver hilus. *Eur Surg Res* 1990; 22 Supl 1: 74-75.
11. Stridbeck H, Holmin T, Höggerstrand I. Effect of repeated normothermic ischemia on normal liver parenchyma. An experimental study in pigs. *Acta Radiol* 1987; 28(2): 215-219.
12. Vaquero C, Alvarez-Conde JL, Gutierrez V, Vaquero A, Rodríguez-Tobes LA, Carbajo MA et al. Estudio a nivel estructural de las repercusiones de la isquemia hepática. Estudio morfométrico. *Rev Esp Investig Quir* 1999; 2(3): 195-199.
13. Serracino-Inglott F, Virlos IT, Habib NA, Williamson RC, Mathie RT. Differential nitric oxide synthase expression during hepatic ischemia-reperfusion. *Am J Surg* 2003; 185(6): 589-595.
14. Chiappa A, Makuuchi M, Zbar AP, Biella F, Bellomi M, Biffi R et al. Effects of the free radical scavenger dimethyl sulphoxide on experimental normothermic ischaemia of the liver. *Dig Surg* 2003; 20(3): 238-245.
15. Isozaki H, Adam R, Gigou M, Szekely AM, Shen M, Bismuth H. Experimental study of the protective effect of intermittent hepatic pedicle clamping in the rat. *Br J Surg* 1992; 79(4): 310-313.
16. Jawan B, Goto S, Pan TL, Lai CY, Luk HN, Eng HL et al. The protective mechanism of magnolol, a Chinese herb drug, against warm ischemia-reperfusion injury of rat liver. *J Surg Res* 2003; 110(2): 378-382.
17. Ratia T, Navidad R, Arribas J, Martínez P, Santamaría L, Granell J et al. Effect of pentoxifylline pretreatment on normothermic liver ischemia and reperfusion in the rat. *Transplantation* 1995; 6(2): 63-70.

18. Hayashi H, Chaudry IH, Clemens MG, Baue AE. Hepatic ischemia models for determining the effects of ATP-MgCl<sub>2</sub> treatment. *J Surg Res* 1986; 40(2): 167-175.
19. Stein HJ, Oosthuizen MMJ, Hinder RA, Lamprechts H. Oxygen free radicals and glutathione in hepatic ischemia/reperfusion injury. *J Surg Res* 1991; 50(4): 398-402.
20. Bismuth H, Castaing D, Borie D. Conduite générale des hépatectomies. *Encyclopédie Médico-Chirurgicale. Techniques chirurgicales, vol 3, Appareil digestif*. Paris: Elsevier, 1997: 40-761.
21. Belghiti J, Noun R, Malafosse R, Jagot P, Sauvanet A, Pierangeli F et al. Continuous versus intermittent portal triad clamping for liver resection. A controlled study. *Ann Surg* 1999; 229(3): 369-375.
22. Portugal V. Estudio de la regeneración hepatocitaria en el hígado sometido a isquemia normotérmica [tesis doctoral]. Lejona: 1992.
23. Skawran S, Palmes D, Bundy T, Bahde R, Stratmann U, Spiegel HU. Acute liver failure: development and evaluation of a new experimental model for investigating the pathogenesis and therapeutic strategies. *Eur Surg Res* 2003; 35(3): 224.
24. Van Wagenveld BA, Van Gulik TM, Gelderblom HC, Scheepers JJG, Bosma A, Endert E et al. Prolonged continuous or intermittent vascular inflow occlusion during hemihepatectomy in pigs. *Ann Surg* 1999; 229(3): 376-384.
25. Asakawa H, Jeppsson B, Mack P, Hultberg B, Hogerstrand I, Bengmark S. Acute ischemic liver failure in the rat: a reproducible model not requiring portal decompression. *Eur Surg Res* 1989; 21(1): 42-48.
26. Turcotte JG, ed. Vol 3. Liver. En: Zuidema GD, ed. *Shackelford's surgery of the alimentary tract, 3.™ ed*. Filadelfia: WB Saunders, 1991.
27. Yin D-P, Sankary HN, Chong ASF, Ma L-L, Shen J, Foster P et al. Protective effect of ischemic preconditioning on liver preservation-reperfusion injury in rats. *Transplantation* 1998; 66(2): 152-157.