

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA  
FACULTAT DE MEDICINA I ODONTOLOGÍA  
DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA



VNIVERSITAT  
DE VALÈNCIA

**INFLUENCIA DE LOS FACTORES DEL DONANTE EN  
EL AISLAMIENTO Y CULTIVO DE HEPATOCITOS  
HUMANOS**

**DIRECTORES:**

Dr. Rafael López Andújar

Dra. M<sup>a</sup> José Gómez-Lechón Moliner

Dra. Eugenia Pareja Ibars

M<sup>a</sup> Amparo Martínez Blasco

Valencia, 2012.



**D. RAFAEL LÓPEZ ANDÚJAR**, Doctor en Medicina, Profesor Asociado del Departamento de Cirugía de la Facultad de Medicina de Valencia, Jefe de la Unidad de Cirugía Hepatobiliopancreática y Trasplante del Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia.

**Dña. M<sup>a</sup> JOSÉ GÓMEZ-LECHÓN MOLINER**, Doctora en Ciencias Biológicas, Jefa de la Unidad de Hepatología Experimental del Centro de Investigación del Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia.

**Dña. EUGENIA PAREJA IBARS**, Doctora en Medicina, Profesora Asociada de la Universidad Cardenal Herrera Ceu San Pablo, Facultad de Odontología, Médico Adjunto de la Unidad de Cirugía Hepatobiliopancreática y Trasplante del Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia.

**CERTIFICAN:**

Que la Licenciada en Medicina y Cirugía M<sup>a</sup> AMPARO MARTÍNEZ BLASCO, ha realizado bajo nuestra dirección en el Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia, el presente trabajo titulado: “INFLUENCIA DE LOS FACTORES DEL DONANTE EN EL AISLAMIENTO Y CULTIVO DE HEPATOCITOS HUMANOS”, para optar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía.

Para que conste, firmamos la presente en Valencia, 22 de Mayo de 2012.

Dr. Rafael López Andújar    Dra. M<sup>a</sup> José Gómez-Lechón Moliner    Dra. Eugenia Pareja Ibars



## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero expresar mi agradecimiento a todos aquellos que han hecho posible que este trabajo vea la luz.

Al Dr. José Mir, porque de él aprendí lo que es el verdadero amor por la cirugía.

A la Dra. Eugenia Pareja, directora de esta tesis doctoral, por su entrega, dedicación, paciencia y haberme transmitido la energía necesaria para realización y finalización este trabajo. Gracias a su inestimable ayuda el trabajo se ha completado.

A la Dra. M<sup>a</sup> José Gómez-Lechón, directora de esta tesis doctoral, por todos sus conocimientos, su gran experiencia en el campo de la Hepatología Experimental y su disposición en todo momento.

Al Dr. Rafael López Andujar, director de esta tesis doctoral, por su disposición y por creer en esta tesis muchas veces más que yo misma.

Al Dr. Javier Escrig, por su gran y desinteresada ayuda, y haberme hecho ver la luz al final del túnel en el campo de la estadística cuando todo era oscuridad.

A mis compañeros, amigos y familia, por sus ánimos y por estar ahí en todo momento.

A mis padres, José Antonio y Amparo, y a mi hermano José Antonio. De ellos aprendí que todo es posible con humildad, dedicación, trabajo, esfuerzo y disciplina. Gracias a ellos he llegado donde estoy y soy lo que soy. Gracias por estar siempre ahí.

A mi hija Ana, este tiempo de dulce espera ha sido el impulso que necesitaba para finalizar con alegría el trabajo de tanto tiempo.

A mi marido Fernando, por su continua ayuda y entrega, por entenderme, por haberme ayudado a levantarme cuando había tocado fondo, y por su apoyo incondicional, tanto en los buenos como en los malos momentos.



*A Fernando y Ana.*



# ÍNDICE

Página:

<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>I.1. ANATOMÍA MICROSCÓPICA DEL HÍGADO.....</b>	<b>3</b>
I.1.1. Tipos celulares del hígado.....	3
I.1.2. La biomatriz extracelular.....	4
I.1.3. Organización estructural del tejido hepático.....	5
I.1.4. La proliferación celular del hepatocito.....	6
<b>I.2. EL HEPATOCITO: FISIOLOGÍA HEPÁTICA.....</b>	<b>6</b>
I.2.1. Metabolismo de los hidratos de carbono.....	7
I.2.2. Metabolismo de los lípidos.....	7
I.2.3. Metabolismo de aminoácidos y proteínas.....	7
I.2.4. Metabolismo de la bilirrubina.....	8
I.2.5. Metabolismo de las sales biliares.....	8
I.2.6. Metabolismo de los xenobióticos.....	8
<b>I.3. REALIDAD ACTUAL DEL TRASPLANTE HEPÁTICO .....</b>	<b>9</b>
<b>I.4. ALTERNATIVAS AL TRASPLANTE DE ÓRGANO ENTERO.....</b>	<b>11</b>
<b>I.5. TRASPLANTE CELULAR: GENERALIDADES.....</b>	<b>12</b>
<b>I.6. POSIBLES FUENTES DE HEPATOCITOS.....</b>	<b>13</b>
I.6.1. Terapia génica: Líneas celulares o replicación de hepatocitos.....	13
I.6.2. Hepatocitos xenogénicos.....	14
I.6.3. Hepatocitos fetales.....	14
I.6.4. Hepatocitos derivados de células madre.....	14
I.6.5. Células ovales.....	15
I.6.6. Células endoteliales sinusoidales.....	15
I.6.7. Hepatocitos procedentes de resecciones hepáticas por diversas patologías, de reducciones hepáticas o biparticiones (split), de pequeñas biopsias tomadas durante intervenciones quirúrgicas y de donantes cadáver.....	16
<b>I.7. AISLAMIENTO Y CULTIVO DE HEPATOCITOS.....</b>	<b>16</b>
<b>I.8. FUNCIONALIDAD Y SUPERVIVENCIA DE LOS HEPATOCITOS HUMANOS EN CULTIVO .....</b>	<b>18</b>
<b>I.9. CAPACIDAD DE LOS HEPATOCITOS HUMANOS EN CULTIVO PARA METABOLIZAR LOS FÁRMACOS.....</b>	<b>19</b>
<b>I.10. TRASPLANTE CELULAR HEPÁTICO.....</b>	<b>20</b>
I.10.1. Posibles indicaciones del TCH.....	20

I.10.2. Posibles contraindicaciones del TCH.....	21
I.10.3. Importancia de los componentes de la matriz extracelular.....	22
I.10.4. Mecanismos de injerto y proliferación de los hepatocitos trasplantados.....	22
I.10.5. Supervivencia de los hepatocitos en el receptor.....	23
I.10.6. Realización del implante en el receptor: cantidad, lugar del trasplante y vía de implante de los hepatocitos.....	23
I.10.7.Efectos adversos asociados al TCH.....	25
<b>I.11. ESTADO ACTUAL DEL TRASPLANTE DE HEPATOCITOS.....</b>	<b>26</b>
I.11.1. Experiencia clínica en animales.....	26
I.11.2. Experiencia clínica en humanos.....	27
<b>I.12. VENTAJAS DEL TRASPLANTE CELULAR HEPÁTICO.....</b>	<b>29</b>
<b>I.13. LIMITACIONES DEL TRASPLANTE CELULAR HEPÁTICO.....</b>	<b>30</b>
<b>II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>31</b>
<b>III. METODOLOGÍA.....</b>	<b>35</b>
<b>III.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN DEL ESTUDIO.....</b>	<b>37</b>
<b>III.2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN DEL ESTUDIO.....</b>	<b>38</b>
<b>III.3. OBTENCIÓN DEL TEJIDO HEPÁTICO.....</b>	<b>38</b>
<b>III.4. AISLAMIENTO DE LOS HEPATOCITOS HUMANOS A PARTIR DE TEJIDO HEPÁTICO.....</b>	<b>39</b>
<b>III.5. VIABILIDAD, RECUENTO CELULAR Y CULTIVO DE LOS HEPATOCITOS.....</b>	<b>41</b>
<b>III.6. ANÁLISIS FUNCIONAL DE LAS CÉLULAS: MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD 7-ETOXICUMARINA O-DEETILASA (ECOD) Y TESTOSTERONA-6-β HIDROXILASA EN LA SUSPENSIÓN.....</b>	<b>44</b>
<b>III.7. RECOGIDA DE DATOS, VARIABLES PREDICTORAS O INDEPENDIENTES.....</b>	<b>45</b>
<b>III.8. RECOGIDA DE DATOS, VARIABLES DEPENDIENTES O RESULTANTES.....</b>	<b>52</b>
<b>III.9. ESTUDIO ESTADÍSTICO.....</b>	<b>53</b>
III.9.1. Análisis univariante.....	53
III.9.2. Análisis multivariante.....	54
<b>I.V. RESULTADOS.....</b>	<b>55</b>
<b>IV.1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE VARIABLES DE DONANTES VIVOS (DV).....</b>	<b>57</b>
IV.1.1. Características clínicas y antecedentes personales de los DV.....	57

IV.1.2. Variables relacionadas con la intervención quirúrgica en los DV.....	57
<b>IV.2. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE VARIABLES DE DONANTES CADÁVER (DC).....</b>	<b>61</b>
IV.2.1. Características clínicas y antecedentes personales de los DC.....	61
IV.2.2. Variables relacionadas con el proceso de extracción hepática en los DC.....	62
<b>IV.3. ANÁLISIS DESCRIPTIVO Y COMPARATIVO DE TODAS LAS VARIABLES ENTRE AMBOS GRUPOS (DONANTES VIVOS Y DONANTES CADÁVER).....</b>	<b>63</b>
IV.3.1. Características clínicas y antecedentes personales de los donantes (DV/DC).....	63
IV.3.2. Parámetros analíticos de los donantes (DV/DC).....	66
IV.3.3. Variables relacionadas con la intervención quirúrgica/extracción hepática de los donantes (DV/DC).....	70
IV.3.4. Variables relacionadas con la biopsia de los donantes (DV/DC) .....	71
IV.3.5. Variables relacionadas con el aislamiento y cultivo de hepatocitos de los donantes (DV/DC).....	72
<b>IV.4. DONANTES VIVOS: Identificación de las variables predictoras o independientes de los donantes que influyen en los resultados del aislamiento de los hepatocitos.....</b>	<b>75</b>
IV.4.1. Viabilidad.....	75
IV.4.2. Rendimiento.....	84
IV.4.3. Actividad ECOD (7-etoxicumarina O-deetilasa).....	93
IV.4.4. Actividad testosterona-6-β hidroxilasa.....	100
<b>IV.5. DONANTES CADÁVER: Identificación de las variables predictoras o independientes de los donantes que influyen en los resultados del aislamiento de los hepatocitos.....</b>	<b>109</b>
IV.5.1. Viabilidad.....	109
IV.5.2. Rendimiento.....	121
IV.5.3. Actividad ECOD (7-etoxicumarina O-deetilasa).....	130
IV.5.4. Actividad testosterona-6-β hidroxilasa.....	136
<b>IV.6. RESUMEN.....</b>	<b>142</b>
<b>V. DISCUSIÓN.....</b>	<b>145</b>
<b>VI. CONCLUSIONES.....</b>	<b>171</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>175</b>

<b>VIII. ANEXOS.....</b>	<b>195</b>
<b>VIII.1. ÍNDICE DE TABLAS .....</b>	<b>197</b>
<b>VIII.2. ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>205</b>
<b>VIII.3. ABREVIATURAS.....</b>	<b>209</b>

## **I. INTRODUCCIÓN.**



## **I. INTRODUCCIÓN:**

### **I.1. ANATOMÍA MICROSCÓPICA DEL HÍGADO.**

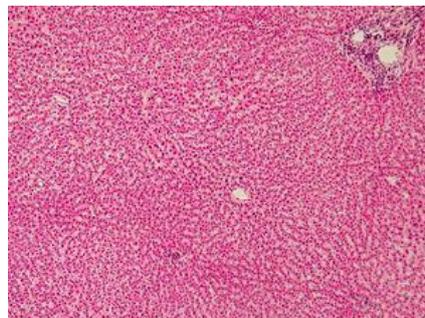
El hígado es la víscera de mayor tamaño del cuerpo humano. A lo largo de la historia ha sido considerado como un órgano central vital. Fue el segundo órgano en ser alotrasplantado en humanos. En el año 1963, Thomas Starzl realizó el primer trasplante hepático en un paciente con una atresia de vías biliares (1).

#### **I.1.1. Tipos celulares del hígado:**

En el hígado se distinguen diferentes tipos celulares:

- Células parenquimales o hepatocitos (70% del total) (Figura 1). Son las células que confieren al hígado sus características bioquímicas y funcionales. La organización celular de los hepatocitos define tres regiones diferenciadas en su membrana:
  - la membrana sinusoidal: está cubierta de microvilli, situada frente al canal sinusoidal y representa un 30% de la superficie del hepatocito.
  - la membrana basolateral: en la región de contacto estrecho entre los hepatocitos.
  - la membrana canalicular: sus repliegues forman el canalículo biliar, sólo representa un 15% del total de la membrana plasmática, pero tiene un papel muy activo en los procesos de transporte.

**Figura 1. Visión al microscopio de hepatocitos humanos.**



- Células endoteliales: se encuentran tapizando la luz del sinusoides. El espacio que se establece entre las células endoteliales y los hepatocitos se denomina espacio de Disse.
- Células de Kupfer: son macrófagos que colonizan el sinusoides. Forman parte del sistema reticuloendotelial del organismo y contribuyen a la eliminación del material que pudiera circular por sangre, evitando que pudiese entrar en contacto directo con el hepatocito. A través de la liberación de citoquinas (TNF, IL-1, IL-6), tienen un papel muy relevante en los procesos inflamatorios del hígado.
- Células de Ito: Se trata de lipocitos con capacidad de almacenar lípidos (fat storing cells), y constituyen el principal reservorio de vitamina A del organismo. Los lipocitos se encargan también de la producción de la matriz extracelular.
- Células de Pit: Se trata de linfocitos residentes en el hígado. Poseen una actividad de tipo citotóxica no dependiente de anticuerpo (natural killer), más intensa que la detectada en las células NK periféricas.
- Células epiteliales: Son células que forman los ductos biliares; estas células epiteliales son singulares ya que un subtipo de ellas posee la capacidad para diferenciarse tanto hacia célula epitelial como hacia hepatocito (2).

### **I.1.2. La biomatriz extracelular:**

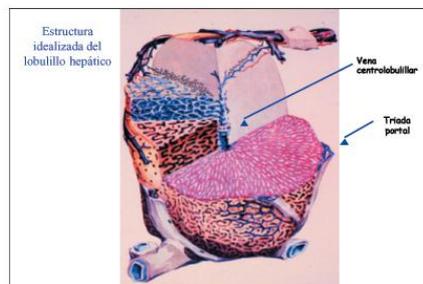
Del total del volumen hepático, aproximadamente el 85% lo constituyen las células hepáticas. El resto (15%) son elementos no celulares que denominamos *matriz extracelular*. Los componentes de dicha matriz son: colágeno (tipos I, III, IV y V), laminina, fibronectina y proteoglicanos. En la fibrosis hepática hay un aumento de presencia de colágeno tipo I, fibronectina, colágeno tipo IV y laminina.

En el curso de la regeneración hepática existe, además de un aumento del número de células, un proceso de remodelación de la estructura de la matriz extracelular, que implica una activa degradación y síntesis de sus componentes estructurales (2).

### I.1.3. Organización estructural del tejido hepático:

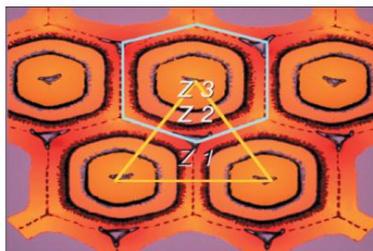
La unidad microscópica clásica del hígado es el lobulillo hepático. En el centro de cada lobulillo se dispone una vena central, tributaria de las venas suprahepáticas, y en su periferia se sitúan los espacios porta, que contienen las ramas arterial y portal, y el conducto biliar. Entre ambos sistemas vasculares se extienden las columnas de células hepáticas y los sinusoides intercelulares (Figura 2).

**Figura 2. El lobulillo hepático.**



Los sinusoides hepáticos constituyen una red vascular cuyos límites están constituidos por las paredes de las células hepáticas. Unen el territorio sanguíneo portal y arterial con el suprahepático. La masa hepática total está formada por el conjunto de éstas unidades estructurales (3). Posteriormente, se sustituyó el anterior concepto de lobulillo hepático como unidad estructural por el de acino, que sería en realidad una unidad estructural y funcional. Cada acino está centrado por un espacio porta, con una rama portal y otra arterial, que aportan sangre a los sinusoides de distintos lobulillos, con las venas centrolobulillares dispuestas en la periferia (Figura 3).

**Figura 3. El acino hepático.**



#### **I.1.4. La proliferación celular del hepatocito:**

El hígado es capaz de autorregenerarse cuando parte del tejido inicial desaparece, ya sea por hepatectomía parcial o por necrosis de los hepatocitos. Es capaz de un proceso de regeneración que se detiene cuando alcanza la masa y volumen iniciales. Desde el punto de vista celular, el fenómeno de la regeneración es el resultado de la combinación de un proceso hipertrófico y de un proceso hiperplásico, que involucra a todas las células hepáticas con aumento de su número a expensas de divisiones celulares.

El proceso de regeneración hepática está regulado por factores tanto estimuladores como inhibidores de la proliferación celular. Entre los factores estimuladores destacan: HGF (*hepatocyte growth factor*), TGF- $\alpha$  (transforming growth factor  $\alpha$ ) y el EGF (epidermal growth factor). Entre los factores inhibidores el más importante es el TGF- $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ ); estos factores inhibitorios son muy importantes para que la regeneración se mantenga dentro de los límites adecuados, y el proceso hiperplásico se detenga en el momento adecuado (2).

### **I.2. EL HEPATOCITO: FISIOLOGÍA HEPÁTICA.**

El hígado ocupa un lugar de primera importancia en la regulación del metabolismo energético del organismo. Recibe a través de la vena porta la mayor parte de los productos de absorción intestinal (carbohidratos, aminoácidos y ciertos ácidos grasos de cadena corta) y productos resultantes del catabolismo bacteriano de los nutrientes (amonio, fenoles, mercaptanos, ácidos grasos de cadena corta y aminas aromáticas).

Estos compuestos sufren diversos procesos metabólicos, captación, interconversión, almacenamiento y procesos de biotransformación que facilitan su eliminación. De este modo, la sangre que drena del hígado a la vena cava está desprovista de los productos tóxicos provenientes de la sangre portal (2).

### **I.2.1. Metabolismo de los hidratos de carbono:**

La glucosa no es el sustrato energético básico del hepatocito. Éste tiene la capacidad de almacenar glucosa y transformarla en glucógeno (glucogenogénesis). En ausencia de glucosa puede transformar los aminoácidos y los lípidos en glucógeno, puede realizar la glucogenólisis y luego transformar la glucosa en ácido pirúvico (glucólisis). Del mismo modo el hígado puede transformar la fructosa y la galactosa en glucosa, y posteriormente en glucógeno, lo que otorga al hepatocito un papel clave en la homeostasis de la glucosa (2,3).

### **I.2.2. Metabolismo de los lípidos:**

Únicamente los ácidos grasos de cadena corta llegan al hepatocito vía portal. El hígado sintetiza ácidos grasos a partir de precursores hidrocarbonados. Parte de esos ácidos grasos son destinados a la resíntesis de triglicéridos para su depósito y su secreción al plasma como lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL).

Además el hígado junto con el intestino, son los mayores productores de colesterol, que es el único sustrato de los ácidos biliares, por lo que las necesidades de sales biliares modularán en parte la síntesis de colesterol (2,3).

### **I.2.3. Metabolismo de aminoácidos y proteínas:**

El hígado cataboliza en condiciones normales más de la mitad de los aminoácidos exógenos, procedentes de la hidrólisis de las proteínas y de los péptidos alimentarios, transformándolos en urea. El ciclo de la urea ocurre exclusivamente en el hígado. Por tanto, la síntesis de urea a partir de amonio es una función típica hepática y un buen indicador del grado de preservación de las mitocondrias (3). Otra fracción de aminoácidos exógenos es utilizada por el hígado para la síntesis de proteínas.

El hígado es uno de los reservorios más importantes de aminoácidos libres, de este modo se asegura la síntesis de proteínas y enzimas que él mismo utiliza, y la síntesis de todas las proteínas plasmáticas (por ejemplo la albúmina), excepto las inmunoglobulinas que son sintetizadas por las células plasmáticas (3,4).

#### **I.2.4. Metabolismo de la bilirrubina (BR):**

La bilirrubina es un producto liposoluble y tóxico para el organismo, que procede del metabolismo del grupo *hem* de varias proteínas. Es transformada en el interior del hepatocito mediante reacciones de conjugación en un producto no tóxico e hidrosoluble, capaz de ser eliminado por la bilis; llega al intestino y se transforma de nuevo en bilirrubina libre, la cual es absorbida nuevamente por la mucosa intestinal, estableciéndose la circulación enterohepática de la bilirrubina (2,3,5,6).

#### **I.2.5. Metabolismo de las sales biliares:**

El colesterol es transformado en ácidos biliares en el hígado exclusivamente. Los ácidos biliares formados a partir del colesterol en el hígado se llaman ácidos biliares primarios (ácido cólico y quenodesoxicólico) y son conjugados antes de abandonar el hepatocito. En su paso por el intestino, estos ácidos biliares son transformados por acción de las bacterias en ácidos biliares secundarios (ácido desoxicólico y ácido litocólico). En el intestino las sales biliares facilitan la absorción de las grasas (2,4).

#### **I.2.6. 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 (2,4,7). Las reacciones de biotransformación de los xenobióticos son de dos tipos: fase 1 y fase 2:

- **Reacciones de fase 1:**

Son reacciones de oxidación, reducción e hidrólisis. El citocromo P450 (CYP) (enzima con actividad monooxigenasa) es el principal responsable del metabolismo oxidativo de los xenobióticos. Se trata de una familia de enzimas que están presentes en todas las especies. Todos los P450 se agrupan en familias y subfamilias según la similitud en la secuencia de ADN que los codifica. Existen diferencias interindividuales

en la actividad del P450 según edad, sexo, determinadas enfermedades, la dieta y el estado nutricional (7).

Las enzimas P450 se encuentran en todo el organismo pero fundamentalmente en el hígado, siendo éste el principal órgano de metabolización de los xenobióticos. Del mismo modo, existen varias familias del P450 que están implicadas fundamentalmente en el metabolismo de substratos endógenos, por ejemplo: las isoenzimas de la familia CYP3 intervienen en el metabolismo de la testosterona, el cortisol y la progesterona. La isoenzima CYP3A4 es la más abundantemente expresada y representa el 30-40% del total de proteína CYP en el hígado humano adulto (7).

- **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 glucorónico, glutatión, sulfato o aminoácidos. Tras éstas, se producen sustancias más fácilmente excretables (2).

### **I.3. REALIDAD ACTUAL DEL TRASPLANTE HEPÁTICO.**

En la actualidad el único tratamiento eficaz para las enfermedades hepáticas en estadio terminal es el trasplante hepático (TH). Los pacientes afectados de una hepatopatía terminal con una probabilidad de supervivencia al año sin el trasplante inferior al 90% son subsidiarios de éste.

Entre las enfermedades susceptibles de TH se encuentran las hepatopatías crónicas biliares y no biliares (cirrosis por virus C ó B, cirrosis alcohólica, autoinmune o secundaria a hemocromatosis), la insuficiencia hepática aguda grave (de cualquier origen), algunos tumores hepáticos, las enfermedades metabólicas de origen hepático, las enfermedades vasculares hepáticas, las enfermedades congénitas (por ejemplo atresia biliar) y el fracaso de un injerto previo (8).

El TH es un procedimiento consolidado en el mundo entero. Los resultados son buenos, con supervivencias a 1 y 5 años del 82% y 77% respectivamente (9,10). Sin embargo, debido a la escasez de donantes de órganos, la lista de espera de TH continúa creciendo, de manera que en el momento actual todavía existen pacientes que fallecen a la espera de ser trasplantados (8). Estos problemas se agudizan en el caso de fallo hepático fulminante (FHF) y en los niños, en los que es más difícil obtener un órgano a tiempo y que se adapte a las características anatómicas del receptor. Además, la edad de inclusión para el trasplante en los niños es la infancia temprana, existiendo una elevada morbimortalidad tras el TH. Es por ello, que los equipos de investigación en trasplante centran sus esfuerzos en la búsqueda de alternativas o complementos al trasplante de órgano sólido.

Los métodos sugeridos hasta el momento para intentar solucionar este problema han dado resultados parciales, sin conseguir resolverlo definitivamente. Surge la necesidad clínica urgente de encontrar estrategias alternativas o complementarias al trasplante hepático convencional como tratamiento de las enfermedades hepáticas terminales. De las distintas opciones terapéuticas que han sido propuestas, la que podría ser más prometedora por los resultados obtenidos en modelos animales y en los ensayos realizados en humanos, es el trasplante celular hepático (TCH) o Trasplante de Hepatocitos; éste, en el momento actual está emergiendo como una alternativa eficaz al trasplante de órgano sólido en algunas indicaciones.

Algunos pacientes, que se encuentran a la espera de recibir un TH, se podrían beneficiar del TCH. El objetivo sería la recuperación de las funciones hepáticas hasta disponer de injerto adecuado, suplir temporalmente la función hepatocitaria hasta una regeneración espontánea del parénquima hepático, y en los niños con errores congénitos del metabolismo, se podría suplir el déficit enzimático responsable de la enfermedad metabólica, bien como puente al trasplante de órgano sólido o bien hasta lograr una recuperación suficiente de función enzimática (9,11-14).

#### I.4. ALTERNATIVAS AL TRASPLANTE DE ÓRGANO ENTERO.

Diversos métodos han sido propuestos como alternativas al trasplante de órgano sólido:

- **Ingeniería de tejidos y sistemas bioartificiales** (también llamados “hígados artificiales”): Su objetivo es el desarrollo de productos alternativos a tejido u órganos que puedan facilitar la recuperación, el mantenimiento y la mejoría de las funciones vitales con la colaboración conjunta de la medicina y la ingeniería (15,16). El “bioreactor” como dispositivo en hígados artificiales contiene hepatocitos vivos y funcionalmente activos, que pueden ser tanto humanos como porcinos. Este sistema de soporte extracorpóreo podría ser útil para mantener a aquellos pacientes con fallo hepático hasta que fuera posible un TH. Sin embargo el uso de estos sistemas no está estandarizado y requiere todavía de un perfeccionamiento técnico (17).

- **Sistemas extracorpóreos de detoxificación hepática a través de membranas y sorbentes** (por ejemplo el sistema MARS: *Molecular Adsorbent Recirculating System*): Consta de una membrana de diálisis que contiene albúmina. La diálisis de albúmina es un sistema de soporte hepático artificial que permite la detoxificación de moléculas hidrosolubles y ligadas a la albúmina, con lo que mantiene la homeostasis del paciente (18,19).

- **Xenotrasplante:** El trasplante cruzado entre especies ofrece la posibilidad de disponer de órganos más fácilmente y resuelve el problema actual de las listas de espera. Starzl realizó en 1966 el primer TH a un humano con un hígado procedente de un primate (20). Las barreras para la estandarización del xenotrasplante son muy importantes y las principales limitaciones para la realización del mismo son el problema del rechazo y la transmisión de zoonosis. Sin embargo en la actualidad, contamos con la posibilidad de aplicar la ingeniería genética, por ejemplo a los cerdos, cuyo hígado es más similar al humano, para convertir sus tejidos en mucho más resistentes a la respuesta inmune humana (21).

- **Trasplante celular hepático (TCH):** De entre todos los métodos propuestos como alternativa al trasplante de órgano sólido, el TCH es el método que ha ofrecido resultados más prometedores, constituyendo el método con mayores posibilidades de éxito (9,11,12,22). Su finalidad es sustituir o reparar la función de las células o tejidos lesionados. Esta capacidad de reemplazar los tejidos degenerados se realiza por proliferación de células ya diferenciadas, los hepatocitos (23-25).

## **I.5. TRASPLANTE CELULAR: GENERALIDADES.**

El reciente desarrollo de la medicina regenerativa abre nuevas formas de actuación terapéutica para determinadas enfermedades, cuya causa reside en el deterioro celular de un órgano o tejido, y en las que no está indicado, no es posible o no es recomendable la realización de un trasplante del órgano sólido.

El Trasplante Celular (TC) tiene por finalidad sustituir o reparar la función de células o tejidos lesionados. El procedimiento está basado en trasplantar células individuales a un órgano receptor en cantidades suficientes para que sobrevivan y restauren la función normal del órgano lesionado (22).

El TC en determinados órganos abdominales es una realidad. El trasplante tanto de islotes pancreáticos como de hepatocitos es un hecho confirmado; se han realizado estudios en animales y en humanos con resultados variables y ambos ofrecen grandes expectativas en cuanto al tratamiento de diversas enfermedades. El hepatocito es la principal célula hepática en la que se basan las funciones del hígado, por tanto, el TCH se fundamenta en trasplantar hepatocitos (26-30).

El hígado posee una importante capacidad de regeneración. La regeneración hepática es una respuesta fundamental del hígado ante el daño tisular y depende fundamentalmente de la proliferación de células maduras. En el trasplante de órgano entero existe una respuesta regeneradora del hígado que depende del daño isquémico, el estrés metabólico, la respuesta inmune del receptor, el porcentaje de masa hepática trasplantada, el grado de esteatosis hepática y la edad del donante entre otros factores (31-34).

Los hepatocitos se encuentran en condiciones normales en estado de reposo proliferativo y mantienen su capacidad de división en respuesta a cualquier tipo de agresión tóxica, vírica o resección quirúrgica. La hepatectomía parcial es el modelo experimental más evidente de regeneración hepática que no se acompaña de lesión hepatocelular (35). Las células maduras del hígado proliferan para restablecer el tejido perdido, pero la velocidad de su respuesta es diferente. Durante el proceso de regeneración hepática los hepatocitos son los primeros en proliferar, inicialmente alrededor del espacio periportal y luego extendiéndose hacia las venas centrales; las restantes células proliferan después. Esto sugiere que son los hepatocitos los que producen el estímulo para la proliferación del resto de células (31,36). Todo lo anterior hace pensar que es el hepatocito maduro el que debe ser trasplantado. La finalidad del TCH es reponer el déficit de función del hígado, tratar de disminuir el daño a la célula hepática y potenciar los procesos de reparación del órgano.

El TCH ha sido objeto de estudio durante las últimas dos décadas. Las células trasplantadas son capaces de sobrevivir, pero no de proliferar si son trasplantadas en un hígado normal; sin embargo, tras el trasplante en el hígado o el bazo en un receptor aquejado de una enfermedad que afecte a los hepatocitos nativos, estos hepatocitos trasplantados son capaces de proliferar y expresar funciones diferenciadas de manera casi idéntica a su estado natural (5,37-41).

## **I.6. POSIBLES FUENTES DE HEPATOCITOS.**

Las posibles fuentes de las cuales se pueden obtener hepatocitos para TCH son:

### **I.6.1. Terapia génica: Líneas celulares o replicación de hepatocitos:**

La obtención de líneas celulares de hepatocitos “inmortales” que conservaran todas sus cualidades y sus funciones, proporcionaría una fuente ilimitada de hepatocitos para el trasplante. Se ha conseguido immortalizar hepatocitos modificando los medios de cultivo, pero éstos no presentan una buena actividad metabólica. Se ha demostrado que existen diferentes modos de obtener líneas celulares y varios genes se han utilizado con

este fin (42-44). Los ejemplos más representativos son el SV 40T y el hTERT (subunidad activa de la telomerasa humana). En células germinales, células madre y células cancerosas la telomerasa mantiene un equilibrio con la síntesis y adición de repeticiones teloméricas en el final de los cromosomas; pero las células somáticas humanas no presentan actividad telomerasa debido a la regulación catalítica de la subunidad de la transcriptasa reversa de la telomerasa (hTERT). Se ha demostrado que la reconstitución de la actividad telomerasa, vía la expresión de hTERT, capacita a las células somáticas humanas para preservar sus telómeros e induce una replicación indefinida celular manteniendo sus funciones fenotípicas. Es posible también manipular genéticamente *in vitro* los hepatocitos, para regular así la expresión genética e intensificar de esta manera una actividad enzimática concreta (42-47).

#### **I.6.2. Hepatocitos xenogénicos:**

Los hepatocitos de animales (cerdo, conejo, perro) podrían constituir una fuente de células para trasplantar. Existen estudios que han demostrado la eficacia del xenotrasplante de hepatocitos. Sin embargo este procedimiento presenta una serie de limitaciones que son: el riesgo de transmisión de zoonosis y la inmunogenicidad, aunque se ha visto que se puede corregir el fallo hepático y prolongar su supervivencia con una inmunosupresión adecuada (48-50).

#### **I.6.3. Hepatocitos fetales:**

Poseen características que los hacen potenciales donantes de células hepáticas para el TCH. Este tipo de hepatocitos tiene mayor capacidad de proliferación que los hepatocitos adultos, lo que podría facilitar su injerto y proliferación tras el trasplante (42,49,51).

#### **I.6.4. Hepatocitos derivados de células madre:**

El potencial de diferenciación de estas células y su elevado grado de plasticidad, las convierte en una herramienta altamente sofisticada para obtener, de forma ilimitada, recursos celulares de diferentes linajes (45,52). Es posible obtener células madre de diferentes fuentes; a partir de embriones (aunque ello plantea problemas éticos y la

posibilidad de desarrollar teratomas), o células madre pluripotentes inducidas, a través de la “reprogramación” de células somáticas del propio paciente (53).

Recientes estudios sugieren que existen células derivadas de la médula ósea y células hematopoyéticas derivadas de cordón umbilical que podrían diferenciarse hacia células hepáticas (54,55). También se está estudiando la posibilidad de trasplantar esas mismas células madre obtenidas de médula ósea o bien la obtención de células madre hematopoyéticas en sangre periférica, tras la administración de un factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), para su posterior reinfusión (56).

Se ha demostrado en animales, que las células madre se pueden diferenciar a hepatocitos funcionales ante la presencia en el medio de cultivo, de factores de crecimiento como HGF, ácido retinoico y  $\beta$ -NGF (factor de crecimiento neural) (57). También se han identificado en el hígado células progenitoras hepáticas que expresan marcadores de células madre y de hepatocitos (45). Se han realizado estudios muy prometedores con células madre mesenquimales adultas, derivadas de tejido adiposo en humanos, y se ha demostrado la posibilidad de obtener células de fenotipo hepático a partir de las mismas (58,59). Todas ellas podrían en el futuro, solucionar la escasez de hepatocitos para el trasplante, al ser capaces de diferenciarse en células hepáticas maduras (60-65).

#### **I.6.5. Células ovales:**

Son células precursoras de hepatocitos y células ductales biliares (22). Se activan cuando la lesión hepática es extensa y crónica o en caso de que se inhiba la capacidad proliferativa de los hepatocitos remanentes. Estas células se encuentran en el canal de Hering o adyacentes a él. Son menos numerosas, clonogénicas y bipotentes y responden durante más tiempo con una proliferación limitada. Por su potencial para diferenciarse en hepatocitos podrían ser el futuro en el trasplante celular (22, 66,67).

#### **I.6.6. Células endoteliales sinusoidales:**

Diversos estudios han demostrado que algunas enfermedades hepáticas hereditarias pueden ser tratadas con trasplante de células endoteliales en lugar de con

trasplante de hepatocitos, éste es el caso de la Hemofilia A (déficit de factor VIII). El factor VIII, es producido mayoritariamente por las células sinusoidales endoteliales y en menor medida por los hepatocitos. Con el trasplante de las células endoteliales sinusoidales, se ha demostrado una producción suficiente de factor VIII para prevenir el sangrado en animales, abriendo una nueva puerta en este tipo de enfermedades hepáticas hereditarias (45,47).

#### **I.6.7. Hepatocitos procedentes de resecciones hepáticas por diversas patologías, de reducciones hepáticas o biparticiones (split), de pequeñas biopsias tomadas durante intervenciones quirúrgicas y de donantes cadáver:**

En espera del desarrollo de tecnologías que consigan nuevas fuentes de hepatocitos humanos óptimos para TCH, actualmente, éstos provienen fundamentalmente de órganos descartados para implante (por arteriosclerosis, trauma hepático, fibrosis hepática), del tejido hepático redundante resultante de los procedimientos de reducción hepática para trasplante infantil, de donantes en asistolia o donantes neonatales (4,38,65,68-74).

### **I.7. AISLAMIENTO Y CULTIVO DE HEPATOCITOS.**

Es un hecho comprobado, que los hepatocitos aislados tanto frescos como criopreservados, son hepatocitos viables y presentan un amplio número de funciones hepáticas específicas *in vitro* (75-77). El aislamiento de los hepatocitos, a partir de tejido hepático procedente de diferentes donantes, se realiza mediante una perfusión enzimática con colagenasa, permitiendo obtener hepatocitos adultos funcionalmente activos (11,77-79). Posteriormente, para el control de calidad de los hepatocitos aislados es necesario medir la viabilidad de los mismos con azul tripan y la concentración celular en el espectrofotómetro (45,80).

Hay autores que consideran que es necesario modificar el protocolo tradicional de aislamiento de hepatocitos, con el fin de obtener mejoras respecto a la viabilidad de mismos (81). Una forma de mejorar las condiciones de aislamiento de los hepatocitos podría ser mediante el uso diferentes soluciones de preservación de tejido en el tiempo

de espera, hasta ser procesado para el aislamiento de hepatocitos. De hecho, en el caso del trasplante de órgano entero, uno de los factores que pueden influir en la función del injerto es la solución de preservación (82-85), por tanto, una manera de mejorar las condiciones de aislamiento de los hepatocitos podría ser el uso de diferentes soluciones de preservación hepática. En el caso de los hepatocitos aislados, no todos los factores que podrían influir en su aislamiento y cultivo están estudiados; pero sí existen estudios que demuestran, que cuando se utiliza solución de Celsior como solución de preservación del órgano, se obtienen mejores resultados (estadísticamente significativos) respecto a la viabilidad, rendimiento (referido al número de hepatocitos obtenidos por gramo de tejido) y capacidad de las mismas de crear uniones cuando se cultivan en monocapa, comparados con aquellos obtenidos de tejidos conservados con solución de la Universidad de Wisconsin. Sin embargo no se han demostrado diferencias significativas en cuanto a la capacidad metabólica de los hepatocitos aislados en ambos grupos (85-87). A pesar de los estudios, los resultados obtenidos en el aislamiento de hepatocitos no han demostrado utilidad hasta el momento, para predecir la función del injerto tras el TH (86,88,89).

Tras el aislamiento, los hepatocitos se cultivan en unas 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 (4,45,90-92).

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, de forma previa al TCH (93). Frente a esto, el hepatocito aislado fresco presenta generalmente una mayor viabilidad y se injerta mejor que el criopreservado (93).

Los aspectos más importantes para obtener un mayor éxito en la criopreservación son:

- La fuente de obtención de hepatocitos.
- La elección del agente crioprotector.
- La composición del medio de criopreservación.
- La densidad celular.
- La velocidad de congelación y descongelación (93).

## **I.8. FUNCIONALIDAD Y SUPERVIVENCIA DE LOS HEPATOCITOS HUMANOS EN CULTIVO.**

Los hepatocitos humanos son el modelo *in vitro* que más se acerca al hígado humano y el único que puede producir un perfil metabólico farmacológico similar al existente *in vivo*. Los hepatocitos en un medio de cultivo, con unas condiciones químicas definidas, expresan la mayoría de las funciones bioquímicas típicas hepáticas, entre ellas, la capacidad de metabolizar fármacos (4,69,71); sin embargo, una vez aislados, sobreviven durante un período limitado de tiempo y pierden el fenotipo diferenciado, fundamentalmente del P450, enzimas encargadas del metabolismo de los fármacos. Todo ello es probablemente consecuencia de la adaptación del hepatocito al nuevo medio *in vitro* (4).

Actualmente se han logrado avances importantes en la prolongación de la supervivencia de los hepatocitos, así como de sus funciones específicas; esto se consigue con la adición de diferentes suplementos como por ejemplo, factores de crecimiento u hormonas a los medios de cultivo existentes (4).

Los hepatocitos humanos en cultivo mantienen elevados niveles intracelulares de glucógeno, similares al hígado humano *in vivo*, al mismo tiempo que sintetizan urea, proteínas, apoproteínas, lipoproteínas, sales biliares, y mantienen la expresión de algunas proteínas transportadoras de membrana. Son capaces de sintetizar glucosa a partir de lactato y otros sustratos como fructosa, piruvato, glicerol y aminoácidos, y pueden secretar también glucosa (4,92,94). La gluconeogénesis y la glicólisis pueden ser estimuladas en los hepatocitos en cultivo por concentraciones cercanas al valor fisiológico de glucagón e insulina (92).

## **I.9. CAPACIDAD DE LOS HEPATOCITOS HUMANOS EN CULTIVO PARA METABOLIZAR LOS FÁRMACOS.**

El metabolismo de los fármacos es el principal determinante de su aclaramiento, de las diferencias farmacocinéticas entre individuos, así como de la eficacia y toxicidad de dichos fármacos (71). Los hepatocitos humanos *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. Por tanto, los hepatocitos aislados pueden ser un buen modelo para estudiar el metabolismo de los fármacos en humanos (4,71,92,94,95).

Existe gran variedad interindividual en las actividades CYP en los hepatocitos aislados al igual que sucede en el hígado *in vivo*. A pesar de ello, se ha constatado que los hepatocitos humanos reproducen los modelos de isoenzimas CYP hepáticos y que además expresan enzimas de conjugación (fase 2) similares al hígado humano (71). Se ha observado que la expresión de isoenzimas CYP experimenta una reducción a medida que pasa el tiempo de cultivo, y éste descenso se hace más evidente a partir de las 4 horas de cultivo (71).

Para evaluar el grado de conservación de la capacidad biotransformadora de xenobióticos de los hepatocitos se determina su capacidad oxidativa. Esto se realiza mediante la medición de la actividad 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). Se considera que los hepatocitos humanos aislados pueden ser una buena herramienta para predecir el perfil metabólico de un fármaco en el hombre (7,71).

## **I.10. TRASPLANTE CELULAR HEPÁTICO.**

### **I.10.1. Posibles indicaciones del TCH:**

El TCH ha sido objeto de investigación de laboratorio durante los últimos 20 años. En la actualidad se encuentra en fase clínico-experimental indicándose en el tratamiento de determinadas enfermedades hepáticas, pudiendo constituir una alternativa al TH o servir como tratamiento en los casos de insuficiencia hepática aguda o crónica y en determinadas metabolopatías en los niños (12,38,39,93).

- **Fallo hepático fulminante:**

El FHF es una enfermedad con una alta mortalidad (mayor al 80%) una vez los pacientes desarrollan un grado III ó IV de encefalopatía hepática (EH). La supervivencia a 1 año en estos pacientes tras el TH es superior al 60% (8), y el TCH podría mantener a los enfermos hasta lograr un injerto hepático (23,96-98).

- **Metabolopatías congénitas:**

Las metabolopatías congénitas son patologías que se presentan en la infancia, afectando a uno de cada 5000 nacimientos y presentan niveles variables de gravedad. Afectan al hígado debido a un déficit congénito en alguno de los sistemas metabólicos. El manejo de estos pacientes es complejo e incluye como medidas terapéuticas un tratamiento médico determinado, una dieta muy específica y una educación especial (99,100); todo ello repercute en la calidad de vida de estos niños y de sus familias, siendo frecuentes los episodios de descompensación que obligan a su hospitalización (101). En determinadas situaciones clínicas de estos pacientes, el TH se plantea como opción terapéutica (102-104). La aplicabilidad del TCH en estos casos se ha demostrado tras la realización de estudios en modelos animales y en humanos, constituyendo una alternativa realmente prometedora (101).

Las principales enfermedades que se consideran candidatas al TCH son: tirosinemia hereditaria tipo I, enfermedad de Wilson, déficit de  $\alpha$ 1-antitripsina, enfermedad de Van Gierke, enfermedad de Debrancher, galactosinemia, intolerancia a

la fructosa hereditaria, hemocromatosis, trastornos de la síntesis de ácidos biliares y colestasis intrahepática familiar progresiva tipo I, II y III, deficiencia de Factor VII, déficit de Ornitin-transcarbamilasa, enfermedad de Refsum, enfermedad de almacenamiento del glucógeno tipo Ia o síndrome de Crigler-Najjar tipo I (9,11,38,101,103-105).

- **Hepatopatía crónica reagudizada o cirrosis hepática descompensada:**

La hepatopatía crónica reagudizada o “acute chronic liver failure” (ACLF) es más frecuente en la edad adulta que en la infancia. Se trata de pacientes con muy mal pronóstico y escasas alternativas terapéuticas, ya que en muchos casos no son candidatos al TH.

En el caso de la cirrosis descompensada, el TCH permitiría mejorar la función hepática para superar la fase aguda y así aumentar la supervivencia y la calidad de vida, pudiendo servir como puente al TH (100).

#### **I.10.2. Posibles contraindicaciones del TCH:**

Las contraindicaciones se pueden dividir en aquellas relativas al donante o al receptor, siendo similares a las consideradas en el TH.

- Existen contraindicaciones relacionadas con el donante: hígados con virus hepáticos o VIH son rechazados como fuentes de hepatocitos. Del mismo modo, hígados muy grasos son rechazados por la escasa viabilidad de las células obtenidas. También se postulan tiempos de isquemia fría elevados, por encima de 18-24 horas como una razón para descartar los injertos hepáticos (13).

- Las posibles contraindicaciones relacionadas con el receptor son: shunt portocava previo, ya que podría aumentar la posibilidad de embolia pulmonar; sepsis con estado crítico del paciente o abuso de determinadas sustancias que puedan afectar a la calidad de vida postoperatoria del paciente. La presencia de trombosis portal en el receptor plantea la necesidad de realizar una evaluación cuidadosa antes de realizar el TCH (13).

### **I.10.3. Importancia de los componentes de la matriz extracelular:**

En el hígado, los hepatocitos están rodeados por una matriz extracelular; ésta es considerada fundamental para el mantenimiento funcional y estructural del mismo (106). Una vez los hepatocitos son aislados, se desligan de esta matriz extracelular, y esto les induce a la apoptosis en un corto período de tiempo tras el aislamiento si no se mantiene a los hepatocitos en un entorno artificial como es el cultivo donde disponen de hormonas y nutrientes que les permiten sobrevivir durante un tiempo limitado; sin embargo los mecanismos que llevan a los hepatocitos a dicha muerte no son bien conocidos.

Por otra parte, se ha demostrado una mayor proliferación celular y mayor secreción de proteínas tras el trasplante de hepatocitos que habían sido cultivados en una matriz extracelular enriquecida con determinados componentes, como laminina o colágeno tipo IV (106-108). Lo mismo sucede al enriquecer el medio de cultivo con factores de crecimiento. Está demostrado que la adición de estos factores, como el factor de crecimiento de hepatocitos con delección de 5 aminoácidos (dHGF), aumenta la proliferación, el metabolismo y la síntesis de proteínas de los hepatocitos cultivados, así como su supervivencia al ser trasplantados en ratones con fallo hepático agudo inducido por D-galactosamina (109,110).

### **I.10.4. Mecanismos de injerto y proliferación de los hepatocitos trasplantados:**

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. Estos hallazgos han sido demostrados en muchos estudios en animales cuando el TCH se realiza sobre un hígado patológico, no siendo así cuando el hígado es sano; sin embargo son escasos los estudios en humanos (5,97,105,111,112).

### **I.10.5. Supervivencia de los hepatocitos en el receptor:**

No se conocen exactamente los mecanismos que permiten la integración del hepatocito en el hígado o el bazo y su supervivencia. La técnica más empleada para determinar la supervivencia del hepatocito en el receptor es la biopsia hepática, con resultados variables, demostrándose supervivencias de hepatocitos del donante vivo incluso hasta los 11 meses post-trasplante (101,113,114). Entre los diversos métodos empleados para evaluar el injerto de los hepatocitos en el receptor se encuentran el procesamiento de la muestra con hematoxilina-eosina o la evaluación de secuencias de cromosoma X o Y (97,106).

### **I.10.6. Realización del implante en el receptor: cantidad, lugar del trasplante y vía de implante de los hepatocitos:**

Los aspectos más importantes a la hora de realizar el implante de hepatocitos son: el número de células a infundir, el número de infusiones necesarias, la vía de infusión y el lugar del implante de los hepatocitos.

Una masa celular que representa el 5-10% de masa hepática total es considerada por los investigadores clínicos como 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 (100,113,115-120). 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.

El lugar del trasplante de los hepatocitos es de suma importancia. En estudios en animales se ha realizado en diferentes lugares tales como el hígado, bazo, cavidad peritoneal o incluso en el tejido celular subcutáneo (42,121).

Cuando la arquitectura del hígado no está demasiado alterada, la presencia de una matriz fisiológica y el aporte sanguíneo vía portal, hace del hígado un sitio óptimo

para el TCH. La infusión de hepatocitos en el hígado puede realizarse, bien por infusión a través alguna vena, generalmente la porta (aunque también se ha descrito TCH a través de la vena cólica media en recién nacidos), o bien incluso mediante inyección en la pulpa esplénica, desde donde las células pueden migrar al hígado o permanecer en él (118,122,123).

El bazo es, de todos los órganos “no-hepáticos”, el mejor sitio para el injerto de las células. Del mismo modo que los hepatocitos pueden proliferar y sobrevivir al ser trasplantados en el hígado, también se han observado buenos resultados al utilizar el bazo como lugar de infusión de las células (121,124). En él, los hepatocitos trasplantados presentan una correcta ultraestructura y largas supervivencias, llegando incluso a desarrollar canalículos biliares. En unos meses los hepatocitos trasplantados proliferan en el bazo y reemplazan hasta el 40% del parénquima, esto se denomina *hepatización esplénica* (123,125).

En general, existe un acuerdo respecto a que la vía portal es la ruta de infusión de los hepatocitos en los niños con errores congénitos del metabolismo, ya que, en su mayoría, son hígados estructuralmente normales. Sin embargo en los casos de hepatitis aguda fulminante, donde se produce una necrosis hepática masiva o en los pacientes con una cirrosis hepática establecida, la vía de infusión de los hepatocitos de elección es la arteria esplénica, fundamentalmente para evitar la aparición de hipertensión portal (123).

Dada la necesidad de realizar infusiones de hepatocitos repetidas, se ha descrito la colocación de un reservorio subcutáneo (port-a cath) con canalización permanente del sistema venoso portal, lo que permitiría un fácil acceso y la posibilidad de repetir el procedimiento cuantas veces fuera necesario sin necesidad de tener que anestesiarse al niño cada vez que se realiza el TCH (123,125).

El trasplante en cavidad peritoneal y tejido celular subcutáneo podrían parecer lugares ideales para el injerto, debido a su acceso fácil y seguro; pero en la cavidad peritoneal, los hepatocitos no sobreviven más de tres días, debido al déficit de aporte vascular, aunque se han observado mayores supervivencias al trasplantar las células si éstas se encuentran encapsuladas (126,127).

Estudios en animales demuestran que el excesivo volumen necesario para el implante en el tejido celular subcutáneo hace inviable por ahora el procedimiento en humanos. Existen todavía dudas por resolver, tales como conocer si en esta localización aumentaría el grado de rechazo, es importante saber si la falta de sistema biliar sería peor para los hepatocitos, o si éstos pueden sobrevivir en buenas condiciones sin el aporte sanguíneo portal (128). También se está analizando, como alternativa, la posibilidades de realizar el implante de hepatocitos en el pulmón (125).

#### **I.10.7. Efectos adversos asociados al TCH:**

Dado que el TCH no representa un proceso quirúrgico mayor tiene una menor morbimortalidad, aunque no está exento de complicaciones. La infusión portal de hepatocitos puede producir una hipertensión portal transitoria (que se recupera tras unos minutos) y podría, teóricamente, ocasionar una trombosis portal y plantea la posibilidad de embolización de las células a los pulmones. Esto limita el número de células a trasplantar cada vez y reduce el injerto de dichas células. El trasplante en el bazo puede ocasionar problemas similares. En todos los casos existen también posibilidades de infección y sepsis, fundamentalmente ante la existencia de un acceso venoso o arterial (123,128).

Inicialmente se creía que las células hepáticas son menos inmunogénicas que los trasplantes de órgano entero, y que por tanto no sería necesaria una inmunosupresión tras el TCH (129). Sin embargo, éste puede presentar el problema de rechazo igual que el TH, ya que los hepatocitos expresan débilmente los antígenos del Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase I. Las células biliares y endoteliales también pueden ser las causantes del rechazo, por ello, la realización de un proceso de aislamiento y purificación mucho más estricto podría disminuir o incluso evitar por completo la necesidad de inmunosupresión. Por el momento se ha decidido, la infusión de bolos de esteroides antes de cada infusión de hepatocitos y la utilización de inmunosupresores (inhibidores de la calcineurina) como el tacrolimus (99-101,114,129).

## **I.11. ESTADO ACTUAL DEL TRASPLANTE DE HEPATOCITOS.**

### **I.11.1. Experiencia clínica en animales:**

Los estudios en animales se realizan en modelos de fallo hepático agudo y enfermedades metabólicas.

El TCH demostró en casos de Hipoalbuminemia (ratas Nagase analbuminémicas), una importante proliferación de los hepatocitos trasplantados con normalización de los niveles de albúmina en suero (130,131). También en animales con enfermedad de Wilson, concretamente en ratas Long-Evans, se demostró la transcripción normal del RNA mensajero del gen que está alterado en la enfermedad de Wilson (ATP7B,) y una reducción del depósito de cobre en el hígado de aproximadamente un 60%, con la consiguiente prevención del desarrollo de la enfermedad (132,133).

Otros ejemplos de metabolopatías tratadas con TCH en animales son: el síndrome de Crigler-Najjar en ratas Gunn (134), la hiperlipidemia hereditaria en conejos Watanabe (135), el déficit de glucoronil-transferasa en ratas (136), la tirosinemia hereditaria tipo I en ratones (137), la colestasis intrahepática progresiva familiar tipo 3 en ratones (138) y el déficit de ornitín-transcarbamilasa en ratones (139).

Además de enfermedades metabólicas, otros estudios han sido realizados en ratas con modelos de cirrosis descompensada inducida con fenobarbital y tetracloruro de carbono (CCL<sub>4</sub>); se demostró en estos casos, que el TCH intraesplénico originaba una importante mejoría del tiempo de protrombina, los valores séricos de bilirrubina y amonio, así como mejoría de la encefalopatía, prolongando la supervivencia desde los 15 a los 128 días (140). También se ha realizado el TCH en ratas en las que se indujo un FHF con D-galactosamina; tras el trasplante de hepatocitos se observó un aumento del número de células trasplantadas, con evidencia de síntesis de DNA entre el 3º y 14º día tras el trasplante (141).

### **I.11.2. Experiencia clínica en humanos:**

Dados los resultados obtenidos en animales, varios grupos de investigación pusieron en marcha el TCH en pacientes con insuficiencia hepática de distinta etiología. Los resultados obtenidos en el momento actual, son esperanzadores aunque plantean la necesidad de realizar ensayos clínicos controlados.

Podría decirse que la falta de fuentes para la obtención de hepatocitos constituye la principal limitación para la realización del TCH en pacientes con insuficiencia hepática aguda. Se plantea la necesidad de demostrar la verdadera efectividad de éste tratamiento en este tipo de patologías. Muchos pacientes sometidos a esta terapia, han recibido un trasplante de órgano entero antes de haber podido evaluar la efectividad del TCH. En el momento actual, parece que los pacientes con alteraciones congénitas del metabolismo podrían ser los ideales para estudiar el efecto del TCH, ya que podemos medir los resultados de esta terapia mediante la determinación de los niveles del enzima responsable del trastorno metabólico (39).

El primer TCH realizado en pacientes con ACLF fue llevado a cabo en 1992 por Mito *et al.* 1992 (142), infundiendo los hepatocitos en el bazo, a través de la arteria esplénica. Los autores detectaron la presencia de hepatocitos en el bazo entre 1 mes y 1 año, sin embargo, la mejoría clínica en estos pacientes no fue atribuida al TCH (142).

El grupo de Strom realizó el TCH a 7 pacientes (5 por fallo hepático agudo, 1 por déficit de alfa-1-antitripsina y 1 por déficit de ornitín-transcarbamilasa), tres de los cuales sobrevivieron hasta la realización del TH a los días 2, 3 y 10° tras el TCH respectivamente (37). Dos pacientes murieron al 4° y 7° día post THC por hemorragia intracraneal. Otro presentó un grado IV de encefalopatía pese al TCH y falleció al 4° día. A pesar de que los resultados no fueron concluyentes, se demostró en todos los casos una disminución de la presión intracraneal, una disminución de los niveles de amonio en sangre y la ausencia de secuelas en el lugar del TCH (tanto a nivel del bazo como de la vena porta o del hígado). El paciente con déficit de OTC normalizó los niveles de amonio en sangre 48 horas tras el procedimiento, aunque posteriormente empeoró, estando comatoso y falleció 43 días después debido a una neumonía. A pesar

de ello, la biopsia hepática realizada 4 semanas después del TCH demostró actividad OTC superior a la existente previamente al TCH (37).

Habibullah *et al.* 1994 (98), realizaron el TCH en 7 pacientes con FHF: 4 con grado IVb de encefalopatía (ninguno sobrevivió más de 87 horas), y 3 con grados III y IVa de encefalopatía, los cuales presentaron una evidente recuperación medida con el grado de encefalopatía y datos analíticos (BR, GOT, GPT, TP y amonio en sangre).

Bilir *et al.* 2000 (97) realizaron también el TCH a 5 pacientes con FHF (3 tóxico y 2 viral) con supervivencias de 6 h, 18 h, 14 días, 20 días y 52 días. La causa de muerte en los que fallecieron en las primeras 24 horas fue viremia y fallo multiorgánico. El resto de los pacientes fallecieron por sepsis, aspergilosis y fallo multiorgánico respectivamente, pero durante el tiempo de supervivencia se constató una mejoría evidente del grado de encefalopatía, un descenso de entre 2 y 5 puntos del INR, descenso del amonio arterial, mejoría en la Tomografía Computerizada cerebral, mejoría en el EEG y mejoría en el aclaramiento renal (97).

Otros autores han llevado a cabo el TCH en niños afectados de errores congénitos del metabolismo. El primer TCH en niños se realizó a una niña de 10 años con Síndrome de Crigler- Najjar tipo I (déficit congénito de uridina difosfogluconato-glucoronil transferasa (UDP-GT)), la cual sobrevivió más de 11 meses tras el TCH, con una alteración metabólica parcialmente corregida y unos requerimientos de fototerapia diaria que disminuyeron a 6-7 horas al día (113). Posteriormente Ambrosino *et al.* 2005 (143) realizaron el TCH en un niño con el mismo déficit metabólico, obteniendo una corrección parcial metabólica y consiguiendo una mejoría clínica, lo cual sirvió como puente al TH, realizándose éste 146 días después del TCH.

Sokal *et al.* 2003 (144) indicaron el TCH en una niña de 4 años con la enfermedad de Refsum; tras el TCH se objetivó una corrección significativa del déficit metabólico y una mejoría clínica a los 6 meses del TCH. Dhawan y su grupo llevaron también a cabo el TCH en dos hermanos con déficit congénito del Factor VII de la coagulación obteniendo mejoría y reposición de éste factor en sangre (14).

La realización del TCH en una paciente de 47 años diagnosticada de una glucogenosis tipo Ia, permitió que 7 meses después del TCH la paciente no hubiera vuelto a presentar episodios de hipoglucemia llevando una dieta normal (116). De los seis pacientes con deficiencia de OTC que han sido sometidos a un TCH, el procedimiento ha servido como puente al TH (23,96,145-147).

La experiencia de estos autores, demuestra que se trata de un procedimiento seguro, fácilmente reproducible y capaz de proporcionar células metabólicamente competentes a un hígado deficiente. Sin embargo son necesarios ensayos clínicos controlados para implementar y estandarizar el procedimiento. Es preciso conocer cuál es el número exacto de células a trasplantar y entender cuáles son los factores que influyen en la supervivencia y viabilidad de los hepatocitos trasplantados para mejorar la calidad, la eficacia y el injerto de los mismos; también es importante cómo detectar de forma precoz el rechazo para poder prevenirlo y conocer cuál es la inmunosupresión adecuada (117).

## **I.12. VENTAJAS DEL TRASPLANTE CELULAR HEPÁTICO.**

El TCH presenta una serie de ventajas en comparación con el TH:

- Permite mantener la función del hígado hasta la obtención de un injerto válido para TH (96,111). En determinados casos es posible conseguir la regeneración del órgano enfermo y la recuperación de la función del mismo, constituyendo una alternativa al trasplante de órgano sólido (38,113,133,148).
- Presenta menor morbimortalidad, ya que es un método menos invasivo y no requiere una cirugía mayor (11,37,121,123).
- Presenta menor coste (11,37,40,121).
- Permite maximizar los recursos de donación, con la posibilidad de utilizar células de un único donante para varios receptores (68,72,121,145). Dado que la mayoría de los hepatocitos aislados provienen de los órganos descartados para el TH

convencional, si se consiguiera optimizar el TCH, en determinados casos se podría evitar el trasplante, y de esa manera disponer de más injertos hepáticos para trasplantar en casos en los que no sea suficiente con el TCH (121).

- Ofrece la posibilidad de realizar el procedimiento de manera semiprogramada gracias al mantenimiento de las células criopreservadas (121,149).

- Ofrece la posibilidad de manipulación génica ex-vivo y la posibilidad de trasplante autólogo evitando la pauta de la inmunosupresión (9,37,121).

### **I.13. LIMITACIONES DEL TRASPLANTE CELULAR HEPÁTICO.**

Una de las principales limitaciones actuales para la generalización del uso del TCH, es la falta de fuentes adecuadas para la obtención de hepatocitos humanos viables. A fin de realizar el TCH en condiciones que aseguren el éxito del procedimiento, es necesario, disponer de hepatocitos viables y funcionalmente activos (39,68).

Los órganos ideales para la obtención de hepatocitos humanos serían aquellos que se utilizan para el implante de órgano sólido, sin embargo dada la escasez de hígados de donante cadáver, esta opción no es éticamente correcta (69). En estos momentos, por tanto, las fuentes de hepatocitos para aislamiento y TCH son fundamentalmente las reducciones hepáticas y los injertos no válidos para TH (11,121,150). Esto se traduce en una escasez en la cantidad de tejido hepático disponible para la obtención de hepatocitos viables, aptos para el TCH (121).

## **II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.**



## **II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.**

### **II. 1. PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO:**

De la revisión del estado actual del aislamiento de hepatocitos se pueden realizar las siguientes consideraciones:

1. El aislamiento de hepatocitos es un procedimiento que se encuentra estandarizado.
2. El trasplante celular hepático (TCH) puede ser una alternativa válida al trasplante hepático ortotópico en determinados casos.
3. El TCH es un procedimiento reproducible, aunque todavía es escaso el número de ocasiones en que se ha llevado a cabo en humanos.
4. Se desconoce con exactitud cuáles son los factores que influyen en el aislamiento y el cultivo de los hepatocitos humanos adultos. La identificación de dichos factores permitiría una mejor selección de los donantes de tejido hepático para el aislamiento de hepatocitos con el fin de realizar el TCH.

### **II.2. HIPÓTESIS DE TRABAJO:**

EXISTEN CARACTERÍSTICAS RELACIONADAS CON EL DONANTE Y FACTORES RELACIONADOS CON EL PROCESO DE OBTENCIÓN DE LOS HEPATOCITOS, QUE INFLUYEN EN EL AISLAMIENTO Y CULTIVO DE LOS MISMOS.

Para confirmar o rechazar esta hipótesis nos planteamos los siguientes objetivos:

### II.3. OBJETIVOS DEL ESTUDIO:

II.3.1. Conocer las características de los donantes de hepatocitos en nuestro medio y hacer un **análisis descriptivo y comparativo** entre los donantes vivos y cadáver.

II.3.2. Identificación de las **variables predictoras o independientes** de los donantes VIVOS que influyen en los resultados del aislamiento y cultivo de los hepatocitos:

- a) Viabilidad celular.
- b) Rendimiento del aislamiento celular.
- c) Actividad ECOD.
- d) Actividad testosterona-6- $\beta$  hidroxilasa.

II.3.3. Identificación de las **variables predictoras o independientes** de los donantes CADÁVER que influyen en los resultados del aislamiento de los hepatocitos:

- a) Viabilidad celular.
- b) Rendimiento del aislamiento celular.
- c) Actividad ECOD.
- d) Actividad testosterona-6- $\beta$  hidroxilasa.

### **III. METODOLOGÍA.**



### **III. METODOLOGÍA:**

Se trata de un estudio transversal, observacional y retrospectivo en el que se han revisado 172 historias clínicas correspondientes a 172 donantes de tejido hepático. Se han analizado dos grupos: biopsias procedentes de donantes vivos (pacientes intervenidos por diferentes patologías en cirugía programada) y biopsias procedentes de donantes cadáver.

#### **III.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN DEL ESTUDIO.**

- Donantes vivos (DV):

Se incluyeron todos los pacientes intervenidos por diferentes patologías, en cirugía programada, que firmaron el consentimiento informado de la intervención y de la toma de la biopsia hepática (aprobado por el Comité de Ética e Investigación Clínica del Hospital La Fe de Valencia). Los donantes de tejido hepático fueron intervenidos en el Servicio de Cirugía General y Aparato Digestivo del Hospital General de Valencia y en el Servicio de Cirugía General y Aparato Digestivo del Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia. La obtención de las biopsias de los donantes procedentes del Hospital La Fe se realizó en todos los casos por los mismos cirujanos (M.J.B, R.L.A y A.M.H). El período de la toma de las biopsias abarcó desde diciembre de 1995 hasta marzo de 2005. El número de DV incluidos en el estudio fue de 136.

- Donantes cadáver (DC):

Se incluyeron todos aquellos DC, que cumplían criterios para la donación del hígado, cuyos familiares firmaron el consentimiento de donación. La obtención de estas biopsias se realizó en todos los casos por el mismo cirujano (E.P.I). El período de la toma de las biopsias abarcó desde febrero de 2002 hasta marzo de 2005. El número de DC incluidos en el estudio fue de 36.

## III.2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN DEL ESTUDIO.

- Donantes vivos:
  - Hígado cirrótico.
  - Mala digestión enzimática de la biopsia durante el procesamiento (151).
  
- Donantes cadáver:
  - Pacientes que no cumplían criterios para la donación del hígado para TH (152).
  - Tiempo de isquemia fría superior a 960 minutos (16 horas). En este grupo se incluyeron muchas extracciones que tuvieron lugar entre semana por la tarde o durante el fin de semana. El procesamiento de las biopsias en el Hospital La Fe se realiza en horario de mañana (de 8 a 15 horas) y no existe un equipo de guardia localizado para realizar el procesamiento de las muestras fuera de este horario o durante los fines de semana, por tanto se excluyeron del estudio.
  - Mala digestión enzimática de la biopsia durante el procesamiento (151).

## III.3. OBTENCIÓN DEL TEJIDO HEPÁTICO.

### III.3.1. PRIMER GRUPO: DONANTES VIVOS:

Dentro de este grupo existen dos subgrupos:

- Donantes intervenidos de forma programada por patología benigna o maligna abdominal **no hepática:**

Las biopsias se tomaron en quirófano, con anestesia general, tras la apertura de la cavidad abdominal y previamente a la realización de la intervención. Se seccionó con tijera un fragmento en forma de cuña del lóbulo hepático izquierdo (segmento III de Couinaud). Las biopsias tenían un peso aproximado de 3 g y se recogieron en medio de cultivo Ham F12-Williams (1:1) a 4°C hasta su procesamiento.

- Donantes intervenidos de forma programada por patología benigna o maligna hepática:

Las biopsias se tomaron en quirófano, con anestesia general, tras realizar la resección hepática correspondiente al tipo de patología, con o sin clampaje vascular. De la pieza resecada se seccionó la parte correspondiente al tumor hepático, intentando conservar la mayor parte de hígado no patológico para enviar éste como muestra. Los pesos de las biopsias oscilaron entre 1 y 50 g y se colocaron en medio de cultivo Ham F12-Williams (1:1) a 4°C hasta su procesamiento.

En ambos casos el proceso de aislamiento se realizó inmediatamente en la Unidad de Hepatología Experimental del Centro de Investigación del Hospital Universitario La Fe de Valencia.

### **III.3.2. SEGUNDO GRUPO: DONANTES CADÁVER:**

Los líquidos de preservación hepática empleados durante la extracción en el donante cadáver fueron Wisconsin o Celsior. Las muestras se tomaron seccionando con tijera un fragmento en forma de cuña del lóbulo hepático izquierdo (segmento III de Couinaud), durante la cirugía de banco, y tenían un peso aproximado de 3 g. Dichas biopsias se introdujeron en un recipiente estéril con la misma solución de preservación utilizada durante la extracción, y permanecieron en él a 4 °C hasta su procesamiento (4,69).

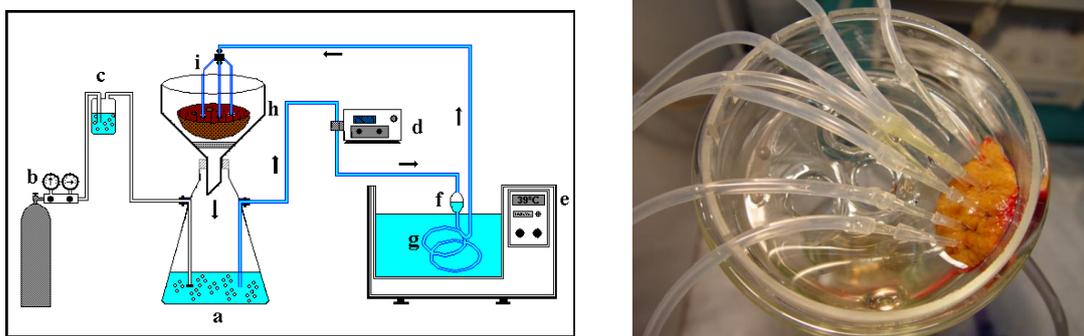
### **III.4. AISLAMIENTO DE LOS HEPATOCITOS HUMANOS A PARTIR DE TEJIDO HEPÁTICO.**

El aislamiento de los hepatocitos y todas las manipulaciones posteriores son procedimientos que se llevaron a cabo en condiciones de máxima asepsia. Todas las operaciones se realizaron en una cámara estéril equipada con una cabina de flujo laminar horizontal. El instrumental quirúrgico y material de vidrio se esterilizó por calor seco. Las soluciones salinas, agua y medio de cultivo eran estériles (calor húmedo en

autoclave o filtración a través de filtros Millipore de 22  $\mu\text{m}$  de poro). El material de plástico se esterilizó con óxido de etileno.

En ambos grupos el aislamiento de los hepatocitos se realizó mediante perfusión de la biopsia y digestión con colagenasa, según la técnica descrita por Gómez-Lechón y colaboradores (92,94). La perfusión se realizó en dos etapas, ambas a 37 °C y gaseadas con carbógeno (95% O<sub>2</sub>/ 5% CO<sub>2</sub>) (Figuras 4 y 5).

**Figura 4 y 5. Perfusión y digestión con colagenasa.**



A) Perfusión no recirculante del tejido hepático: Se realizó con una solución salina de Krebs-Ringer tamponada con HEPES 20 mM, pH 7,4 (Tabla 1), exenta de calcio pero conteniendo EGTA 0,5 mM, para lavar el tejido de sangre y debilitar las uniones intercelulares. Para ello se preparó un matraz sobre el que se colocó un embudo y un sistema de multicánulas. Se situó la cuña hepática sobre la superficie plana del embudo, se introdujeron las cánulas por los vasos accesibles en la superficie del corte y se inició la perfusión a un flujo de 16-18 mL/minuto.

B) Perfusión recirculante. Se utilizó la misma solución salina sin EGTA y conteniendo 5 mM de Cl<sub>2</sub>Ca y 0,05% de colagenasa, para conseguir la digestión completa del parénquima hepático. Posteriormente se sacó el hígado del embudo y se colocó en una placa petri de 10 cm de diámetro donde se disgregó el hígado con ayuda de una espátula, se retiró la cápsula de Glisson y se liberaron las células. A continuación, la suspensión de hepatocitos se filtró por una doble gasa estéril para eliminar pequeños fragmentos de tejido no digeridos y agregados celulares. Esta suspensión celular se lavó

dos veces a 4 °C con solución de Krebs-Ringer, mediante centrifugación a 150g durante 5 minutos y desechando en cada caso el sobrenadante.

**Tabla 1. Preparación de la solución Stock de Krebs-Ringer-Hepes sin Ca<sup>++</sup>.**

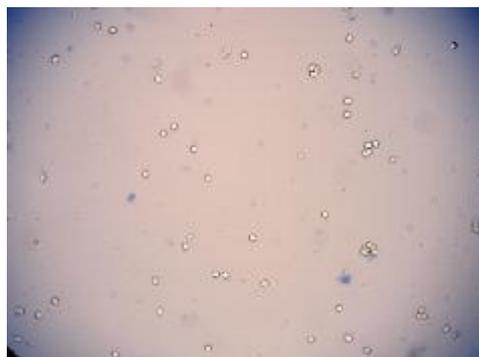
	Concentración (mM)
ClK	2,7
ClNa	140
PO <sub>4</sub> HNa.12 H <sub>2</sub> O	0,7
Glucosa	10
Hepes	9,14

mM=milimoles; ClK=Cloruro potásico; ClNa=Cloruro sódico; PO<sub>4</sub>HNa=Fosfato de sodio hidratado; H<sub>2</sub>O=Agua.

### III.5. VIABILIDAD, RECUENTO CELULAR Y CULTIVO DE LOS HEPATOCITOS.

- La **viabilidad** de la suspensión se determinó en la suspensión final mediante el test de exclusión del azul tripán (80). Este colorante es excluido por las células viables, que mantienen su membrana íntegra y tiñe de azul los núcleos de las células con la membrana dañada (Figura 6).

**Figura 6. Test de exclusión del azul tripán.**



La viabilidad de la suspensión se expresa en porcentaje.

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

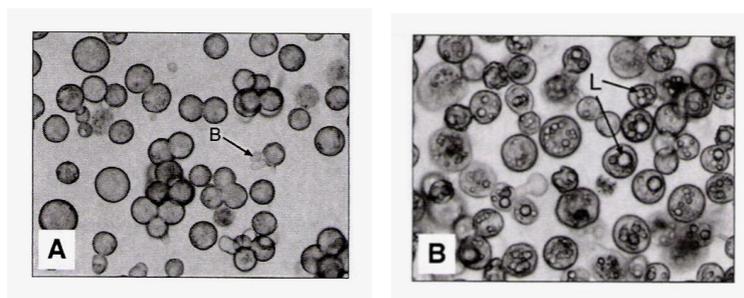
Una viabilidad se considera aceptable por encima del 50% (153). Las cifras normales de viabilidad en DV oscilan entre el 60 y el 91% (71,154-158), frente al DC, en el que oscilan entre 56-73% (74,79,81,159). Nuestro grupo ha establecido el punto de corte en la viabilidad celular en el 70%, ya que un aislamiento con ésta viabilidad se puede considerar un buen aislamiento. Existe un consenso no escrito, pero aceptado por todos los grupos que realizan el aislamiento de hepatocitos para terapia celular, por el cual hepatocitos con viabilidades por encima del 70% se podrían congelar. No se suelen aceptar viabilidades inferiores para la criopreservación ya que en líneas generales tras la descongelación, la viabilidad de las células disminuye al menos en un 20%, y estos hepatocitos descongelados, con viabilidades inferiores no serían óptimos para el TCH (81,160).

- La concentración celular de la suspensión se determinó espectrofotométricamente mediante la lectura de la suspensión a 660 nm. El número de células vivas por mililitro en la suspensión se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Absorbancia}_{\text{suspensión}} - \text{Absorbancia}_{\text{blanco}} \times 0,014 \times \text{Viabilidad} \times 0,037 = \text{n}^{\circ} \text{ de células vivas/mL}$$

El **rendimiento** del aislamiento viene dado por el número de células vivas obtenidas  $\times 10^6/\text{g}$  de tejido (Figura 7). Las cifras normales de rendimiento en DV oscilan entre  $4 \text{ cel/g} \times 10^6$  y  $18 \text{ cel/g} \times 10^6$  (71,154-158), frente al DC, en el que oscilan entre  $2$  y  $10 \text{ cel/g} \times 10^6$  (74,79,81,159). La siembra de los hepatocitos se realizó en placas de cultivo recubiertas con fibronectina y colágeno con el fin de mantener las características hepáticas de los hepatocitos en cultivo por más tiempo (77).

**Figura 7. Visión al microscopio de hepatocitos viables y no viables (A), y de hepatocitos con vacuolas de grasa (B).**



• **Cultivo:** La siembra se llevó a cabo, como ya se ha comentado, en placas de cultivo recubiertas con una mezcla de fibronectina y colágeno (77,92). A continuación se sembraron las células a una densidad de  $8 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> con medio de cultivo Ham F-12/ Williams (1:1) complementado de hormonas, suero y otros aditivos como se indica en la Tabla 2 y Figuras 8 y 9.

**Tabla 2. Composición del medio de cultivo Ham F12-Williams.**

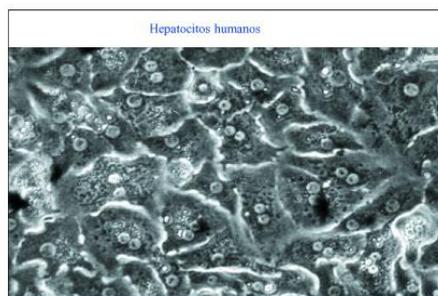
Componente	Para 100 mL de medio de cultivo	
	Siembra y primer cambio de medio	A partir de 24 horas de la siembra
Medio de cultivo base Ham F-12/ Williams (1:1) (v/v)		
BSA	0,2%	0,2%
Glucosa	17 mM	17 mM
Insulina	$10^{-8}$ M	$10^{-8}$ M
Bicarbonato 1M	26 mM	26 mM
Penicilina	50 mU/mL	50 mU/mL
Estreptomicina	50 µg/mL	50 µg/mL
NAME	0,64 mM	0,64 mM
L-Glutamina	0,2 mM	0,2 mM
Transferrina	0,025 mg/mL	0,025 mg/mL
Etanolamina	66,8 µM	66,8 µM
Ácido Linoléico	7,2 µM	7,2 µM
Ácido Ascórbico	0,62 mM	0,62 mM
Suero Ternera	2%	No lleva
Dexametasona $10^{-4}$ M	No lleva	$10^{-7}$ M

mM=milimoles; M=moles; mU/mL=miliunidades/mililitros;

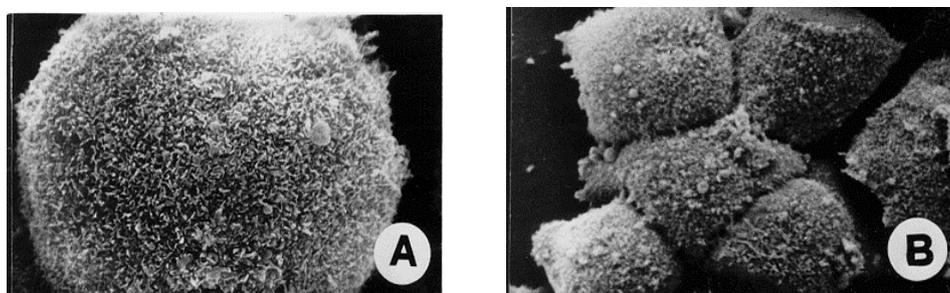
µg/mL=microgramos/mililitros; mg/mL=miligramos/mililitros; µM=micromoles;

BSA=Albumina sérica bovina; NAME=N-omega-nitro-L-arginina metilester.

**Figura 8. Visión al microscopio de hepatocitos humanos en cultivo.**



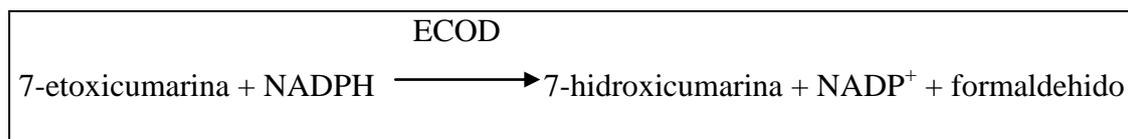
**Figura 9. Ultraestructura de los hepatocitos tras el aislamiento (A) y tras 24 horas de cultivo (B).**



### III.6. ANÁLISIS FUNCIONAL DE LAS CÉLULAS: MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD 7-ETOXICUMARINA O-DEETILASA (ECOD) Y TESTOSTERONA-6- $\beta$ HIDROXILASA EN LA SUSPENSIÓN.

El análisis funcional de las células se realizó tras 24 horas en cultivo. Para ello se midió la actividad 7-etoxicumarina O-deetilasa (ECOD) y la actividad Testosterona-6- $\beta$  hidroxilasa.

- La actividad **ECOD** se valoró mediante la técnica descrita por Greenlee (161) basada en la siguiente reacción:



El producto final de la reacción, 7-hidroxicumarina, es un compuesto fluorescente con máximos de excitación y emisión a 368 y 456 nm respectivamente. La 7-hidroxicumarina formada se calculó interpolando la fluorescencia emitida en la correspondiente curva patrón. La actividad ECOD se expresó como pmol de producto formado/ min x mg de proteína y es una actividad oxidativa representativa de varios isoenzimas del P450.

- La testosterona es un sustrato multienzimático en cuya hidroxilación en distintas posiciones intervienen diferentes isoenzimas del P450. La hidroxilación en posición 6  $\beta$  es llevada a cabo por el enzima **testosterona-6- $\beta$  hidroxilasa**, específica del isoenzima CYP3A4 dando lugar al metabolito 6- $\beta$ -OHT (6- $\beta$ -hidroxitestosterona). La evaluación del metabolito 6- $\beta$ -OHT formado durante la incubación de la testosterona con los hepatocitos en cultivo se basa en el análisis mediante HPLC (cromatografía líquida de alta eficacia) (162), con algunas modificaciones (89). La actividad de la testosterona-6- $\beta$  hidroxilasa se expresó como pmol de metabolito formado/ min x mg de proteína.

### **III.7. RECOGIDA DE DATOS, VARIABLES PREDICTORAS O INDEPENDIENTES.**

En los dos grupos de donantes se revisó minuciosamente la historia clínica. La información relativa a cada enfermo quedó recogida en una base de datos de Microsoft Excel 10.0 ®.

### **III.7.1. DONANTES VIVOS:**

#### **1. Características clínicas y antecedentes personales del donante:**

- Hospital de procedencia. Hospital en el que se realizó la intervención. Variable cualitativa nominal.
- Sexo. Variable categórica binaria (hombre/mujer).
- Edad (años). Variable cuantitativa continua.
- Peso del paciente (Kg). Variable cuantitativa continua.
- Talla (cm). Variable cuantitativa continua.
- Índice de masa corporal [IMC = peso(Kg)/talla<sup>2</sup>(m)]. Variable cuantitativa continua.
- Consumo previo de alcohol. Indica el consumo de alcohol de forma habitual por parte del donante previo a la intervención. Variable categórica binaria (si/no).
- Hipertensión arterial (HTA). Variable categórica binaria (si/no).
- Diabetes Mellitus (DM). Variable categórica binaria (si/no).
- Hipertrigliceridemia. Variable categórica binaria (si/no).
- Hipercolesterolemia. Variable categórica binaria (si/no).
- Medicación previa a la intervención. Indica si el donante tomaba alguna medicación de forma habitual previamente a la intervención. Variable categórica binaria (si/no).
- Quimioterapia preoperatoria. Indica si el donante recibió quimioterapia previamente a la intervención (en las 4-6 semanas previas a la intervención). Variable categórica binaria (si/no).
- Estancia en la Unidad de Cuidados Intensivos. Indica si el donante permaneció en la UCI en las horas previas a la extracción hepática. Variable categórica binaria (si/no).
- Transfusiones en las últimas 48 horas previas a la intervención. Indica si el donante recibió transfusiones de derivados hematopoyéticos en las 48 horas previas a la intervención. Variable categórica binaria (si/no).

## 2. Parámetros analíticos:

Se consideró el valor observado en la determinación preoperatoria más cercana a la intervención quirúrgica. Todos los valores analíticos se consideraron variables cuantitativas continuas (Tabla 3).

**Tabla 3. Parámetros analíticos (I).**

	Unidades de medición	Valores de referencia
Glucosa	mg/dL	76-110 mg/dL
Sodio	mEq/L	135-150 mEq/L
Potasio	mEq/L	3,5-5,5 mEq/L
BR total	mg/dL	0,1-1,1 mg/dL
GOT	UI/L	0-31 UI/L
GPT	UI/L	0-31 UI/L
GGT	UI/L	7-32 UI/L
FA	UI/L	35-104 UI/L
Urea	mg/dL	10-50 mg/dL
Creatinina	mg/dL	0,51-0,95 mg/dL
Proteínas Totales	g/dL	6,6-8,7 g/dL
Hb	g/dL	12-16 g/dL
HTO	%	37-47 %
Leucocitos	Número x 10 <sup>3</sup> /μL	4,5-10,8 x 10 <sup>3</sup> /μL
Neutrófilos	%	37-72 %
Plaquetas	Número x 10 <sup>3</sup> /μL	150-400 x 10 <sup>3</sup> /μL
Índice de Quick	%	70-100 %
Tiempo de Protrombina	segundos	14,2-17,9 seg

mg/dL=miligramos/decilitro; mEq/L=miliequivalentes/litro; UI/L=Unidades Internacionales/litro; g/dL=gramos/decilitro; μL=microlitros; seg=segundos; BR=Bilirrubina; GOT=transaminasa glutámico-oxalacética; GPT=transaminasa glutámico-pirúvica; GGT=gammaglutamiltranspeptidasa; FA=Fosfatasa Alcalina; Hb=Hemoglobina; HTO=Hematocrito.

### 3. Variables relacionadas con la intervención quirúrgica:

- Indicación de cirugía. Indica si el donante fue intervenido por patología benigna o maligna. Variable categórica binaria (benigna/maligna).
- Diagnóstico. Patología por la que se realizó la intervención. Variable cualitativa nominal.
- Resección hepática. Indica si el donante fue sometido a una resección hepática parenquimatosa, ya sea por patología benigna o maligna. No se incluyeron en este grupo los donantes intervenidos por patología benigna relacionada con la vesícula, la vía biliar, la cirugía del quiste hidatídico, ni los casos de tumores benignos hepáticos en los que se realizó enucleación del mismo, considerando a todo este grupo como donantes a los que no se realizó resección hepática. Variable categórica binaria (si/no).
- Metástasis hepáticas. Indica si el donante fue intervenido por metástasis hepáticas, independientemente del tumor primario. Variable categórica binaria (si/no).
- Tumor primario. Indica el órgano del que dependía el tumor primario en los donantes intervenidos por metástasis hepáticas. Variable cualitativa nominal.
- Parada cardíaca durante la intervención. Indica la existencia de algún episodio de parada cardíaca durante la intervención. Variable categórica binaria (si/no).
- Hipotensión prolongada. Indica la presencia de episodio de hipotensión prolongada durante la intervención (Tensión arterial sistólica <80 mmHg durante más de 30 minutos). Variable categórica binaria (si/no).
- Isquemia caliente. Indica si se realizó clampaje del pedículo vascular hepático durante la intervención. Variable categórica binaria (si/no).
- Tipo de isquemia caliente (ausente; continua; intermitente). Indica el tipo de isquemia caliente al que ha sido sometido el hígado previamente a la toma de la biopsia. Las resecciones hepáticas mayores en las que se realizó ligadura del pedículo vascular previo a la transección hepática, se han considerado como biopsias con isquemia caliente continua. En el caso de isquemia caliente intermitente los tiempos de clampaje fueron de 15 minutos, con un descanso de 5 minutos o mayor. Variable cualitativa ordinal.

- Tiempo de isquemia caliente (minutos). Indica el tiempo de isquemia caliente al que fue sometido el hígado previamente a la toma de la biopsia. Variable cuantitativa continua.

#### **4. Variables relacionadas con la biopsia:**

- Presencia de esteatosis. Esteatosis microscópica o macroscópica valorada por el anatomopatólogo. Variable categórica binaria (si/no) (163).
- Esteatosis por rangos: leve: 0-29%, moderada 30-59%, severa  $\geq 60\%$ . Variable cualitativa ordinal.
- Peso de la muestra (g). Indica el peso de la biopsia hepática, previamente a su procesamiento. Variable cuantitativa continua.

### **III.7.2. DONANTES CADÁVER:**

#### **1. Características clínicas y antecedentes personales del donante:**

- Hospital de procedencia. Hospital en el que se realizó la extracción hepática. Variable cualitativa nominal.
- Causa de la muerte. Variable cualitativa nominal.
- Sexo. Variable categórica binaria (hombre/mujer).
- Edad (años). Variable cuantitativa continua.
- Peso del paciente (Kg). Variable cuantitativa continua.
- Talla (cm). Variable cuantitativa continua.
- Índice de masa corporal [IMC = peso(Kg)/talla<sup>2</sup>(m)]. Se expresa en valores absolutos. Variable cuantitativa continua.
- Consumo previo de alcohol. Indica el consumo de alcohol de forma habitual por parte del donante previo al proceso de extracción. Variable categórica binaria (si/no).
- Hipertensión arterial (HTA). Variable categórica binaria (si/no).
- Diabetes Mellitus (DM). Variable categórica binaria (si/no).
- Hipertrigliceridemia. Variable categórica binaria (si/no).

- Hipercolesterolemia. Variable categórica binaria (si/no).
- Medicación previa a la intervención. Indica si el donante tomaba alguna medicación, de forma habitual previamente a la extracción hepática. Variable categórica binaria (si/no).
- Estancia en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI). Indica si el donante permaneció en UCI en las horas previas a la extracción hepática. Variable categórica binaria (si/no).
- Tiempo de estancia en la Unidad de Cuidados Intensivos (horas). Indica el tiempo que permaneció el donante en UCI previamente a la extracción hepática. Variable cuantitativa continua.
- Administración de antibióticos en la UCI. Variable categórica binaria (si/no).
- Transfusiones en las últimas 48 horas previas a la intervención. Indica si el donante recibió transfusiones de derivados hematopoyéticos en las 48 horas previas a la extracción hepática. Variable categórica binaria (si/no).

## **2. Parámetros analíticos:**

Se consideró el valor observado en la determinación preoperatoria más cercana al proceso de extracción. Todos los valores analíticos se consideraron variables cuantitativas continuas (Tabla 4).

**Tabla 4. Parámetros analíticos (II).**

	<b>Unidades de medición</b>	<b>Valores de referencia</b>
Glucosa	mg/dL	76-110 mg/dL
Sodio	mEq/L	135-150 mEq/L
Potasio	mEq/L	3,5-5,5 mEq/L
BR total	mg/dL	0,1-1,1 mg/dL
GOT	UI/L	0-31 UI/L
GPT	UI/L	0-31 UI/L
GGT	UI/L	7-32 UI/L
FA	UI/L	35-104 UI/L
Urea	mg/dL	10-50 mg/dL
Creatinina	mg/dL	0,51-0,95 mg/dL
Proteínas Totales	g/dL	6,6-8,7 g/dL
Hb	g/dL	12-16 g/dL
HTO	%	37-47 %
Leucocitos	Número x 10 <sup>3</sup> /μL	4,5-10,8 x 10 <sup>3</sup> /μL
Neutrófilos	%	37-72 %
Plaquetas	Número x 10 <sup>3</sup> /μL	150-400 x 10 <sup>3</sup> /μL
Índice de Quick	%	70-100 %
Tiempo de Protrombina	segundos	14,2-17,9 seg

mg/dL=miligramos/decilitro; mEq/L=miliequivalentes/litro; UI/L=Unidades Internacionales/litro;

g/dL=gramos/decilitro; μL=microlitros; seg=segundos; BR=Bilirrubina; GOT=transaminasa glutámico-oxalacética; GPT=transaminasa glutámico-pirúvica;

GGT=gamma glutamiltranspeptidasa; FA=Fosfatasa Alcalina; Hb=Hemoglobina;

HTO=Hematocrito.

### 3. Variables relacionadas con el proceso de extracción hepática:

- Parada cardiaca. Indica la existencia de algún episodio de parada cardiaca durante la extracción hepática. Variable categórica binaria (si/no).
- Hipotensión prolongada. Indica la presencia de episodio de hipotensión prolongada durante la extracción hepática (tensión arterial sistólica <80 mmHg durante más de 30 minutos). Variable categórica binaria (si/no).

- Tiempo de isquemia fría (minutos). Es el tiempo transcurrido entre la perfusión con solución de preservación a 4 °C y el procesamiento de la biopsia hepática. Variable cuantitativa continua.
- Tipo de solución de preservación. Indica el líquido de perfusión empleado durante la extracción hepática en los DC. Variable categórica binaria (Universidad de Wisconsin/Celsior).

#### **4. Variables relacionadas con la biopsia:**

- Presencia de esteatosis. Esteatosis microscópica o macroscópica valorada por el anatomopatólogo. Variable categórica binaria (si/no) (163).
- Esteatosis por rangos: leve: 0-29%, moderada 30-59%, severa  $\geq 60\%$ . Variable cualitativa ordinal.
- Peso de la muestra (g). Indica el peso de la biopsia hepática, previamente a su procesamiento. Variable cuantitativa continua.

### **III.8. RECOGIDA DE DATOS, VARIABLES DEPENDIENTES O RESULTANTES.**

Son las variables relacionadas con el aislamiento y cultivo de los hepatocitos:

- Viabilidad celular: porcentaje de células vivas, es decir, excluidas mediante el azul tripán (%). Variable cuantitativa continua.
- Rendimiento del aislamiento celular: número de células viables obtenidas  $\times 10^6/g$  de tejido hepático. Variable cuantitativa continua.
- Actividad ECOD (pmol/min/mg). Variable cuantitativa continua.
- Actividad Testosterona-6- $\beta$  hidroxilasa (pmol/min/mg). Variable cuantitativa continua.

### **III.9. ESTUDIO ESTADÍSTICO.**

Análisis estadístico de los datos:

#### **III.9.1. ANÁLISIS UNIVARIANTE:**

Para realizar el análisis estadístico se empleó el software SPSS 15.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA).

##### **A. Estadística descriptiva:**

- **Variables cuantitativas.**

La prueba no paramétrica de Kolmogórov-Smirnov se empleó para verificar que los datos seguían una distribución Normal. Se efectuó un análisis descriptivo de las características de los donantes por separado: vivos o cadáveres. Los estadísticos descritos fueron la media, mediana, desviación típica, el máximo y el mínimo.

- **Variables cualitativas.**

Para las variables cualitativas se realizaron tablas de distribución de la frecuencia de cada variable en cada uno de los 2 grupos, con su frecuencia y porcentaje.

##### **B. Estadística comparativa:**

- Para el análisis de dos variables cuantitativas se empleó el coeficiente de correlación de Pearson en el caso de las variables de distribución normal, y el coeficiente de correlación de Spearman en el caso de las variables de distribución no normal.

- Para analizar la relación entre variables cuantitativas y variables cualitativas categóricas binarias, se empleó la prueba no paramétrica de U-Mann-Whitney (variables no normales) y la prueba paramétrica t de Student (variables normales). En el caso de que la variable cualitativa tuviera tres o más grupos, se empleó la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis (variables no normales) y la prueba paramétrica análisis de la varianza (ANOVA) (variables normales).

- Para comparar variables cualitativas se empleó la prueba Chi Cuadrado ( $\chi^2$ ).
- En todos los casos un p-valor menor que 0,05 fue considerado estadísticamente significativo.

### **III.9.2. ANÁLISIS MULTIVARIANTE:**

Para el análisis multivariante se realizaron regresiones logísticas en el caso de variables discretas, y regresiones lineales en el caso de variables cuantitativas continuas. Del mismo modo que en el análisis univariante, en todos los casos, un p-valor menor que 0,05 fue considerado estadísticamente significativo. Se incluyeron también en el análisis multivariante todas aquellas variables que se aproximaban a la significación estadística ( $p < 0,1$ ) y aquellas que sin llegar a serlo, por su importancia parecían relevantes para el estudio.

#### **IV. RESULTADOS.**



## **IV. RESULTADOS:**

### **IV.1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE VARIABLES DE DONANTES VIVOS (DV).**

A continuación se expone el análisis descriptivo de determinadas variables que no son comunes a DV y DC; posteriormente se detallarán las variables comunes a DV y DC y se hará el estudio descriptivo y comparativo entre ambos grupos.

#### **IV.1.1. Características clínicas y antecedentes personales de los DV:**

- De los 136 DV incluidos en el estudio, 102 DV fueron intervenidos en el Hospital Universitario La Fe de Valencia y 34 en el Hospital General Universitario de Valencia.

- El número de DV que recibió QT preoperatoria se refleja en la Tabla 5.

**Tabla 5 . Quimioterapia preoperatoria en DV.**

<b>DV</b>		<b>N (%)</b>
<b>N=136</b>		
<b>QT Preoperatoria</b>	NO	125 (91,9%)
	SI	11 (8,1%)

DV=Donante Vivo; QT=Quimioterapia.

- El resto de características clínicas y antecedentes personales (sexo, edad, peso, talla, IMC, consumo previo de alcohol, hipertensión arterial, diabetes mellitus, hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia, medicación previa a la intervención, estancia en UCI y transfusiones en las últimas 48 horas) se expondrán en el apartado IV.3.I, en un análisis descriptivo y comparativo junto con los DC.

#### **IV.1.2. Variables relacionadas con la intervención quirúrgica en los DV.**

- Las patologías por las que fueron intervenidos los DV se reflejan en las Tablas 6.I y 6.II. En la mayoría de los DV, la indicación de la intervención en cirugía programada fue por patología benigna (Tabla 7).

**Tabla 6.I. Diagnóstico de los DV intervenidos en cirugía programada.**

<b>DV</b>	<b>N=136</b>	<b>N(%)</b>
Absceso Hepático Crónico + Fístula Cutánea		1 (0,7%)
Achalasia		1 (0,7%)
Adenoma Hepático		9 (6,6%)
Cistoadenoma Hepático + Colelitiasis		1 (0,7%)
Cistoadenoma Mucinoso Pancreático		1 (0,7%)
Colangiocarcinoma		1 (0,7%)
Colelitiasis		12 (8,8%)
Colelitiasis + Coledocolitiasis		2 (1,4%)
Enfermedad Crohn Ileal		1 (0,7%)
Estenosis Benigna Sigma		1 (0,7%)
Estenosis Benigna Píloro		2 (1,4%)
Estenosis Gástrica Cáustica		1 (0,7%)
Gist Gástrico		1 (0,7%)
Hemangioma Hepático		4 (2,9%)
Hepatocarcinoma		3 (2,2%)
Hernia Hiato		12 (8,8%)
Hernia Hiato + Colelitiasis		2 (1,4%)
Hiperplasia Nodular Focal		2 (1,4%)
Iatrogenia Biliar		1 (0,7%)
LOE Hepática		3 (2,2%)
Metástasis Esplénica		1 (0,7%)
Metástasis Hepáticas		19 (14%)
Neoplasia Colon		3 (2,2%)
Neoplasia Muñón Gástrico		1 (0,7%)
Neoplasia Páncreas		1 (0,7%)
Neoplasia Recto		2 (1,4%)
Neoplasia Vesícula Biliar		2 (1,4%)
Neoplasia Gástrica		23 (16,9%)
Neoplasia Cardías		1 (0,7%)
Obesidad Mórbida		1 (0,7%)
Oclusión Intestinal: Recidiva Neoplasia Colon		1 (0,7%)

DV=Donante Vivo; LOE=Lesión Ocupante de Espacio.

**Tabla 6.II. Diagnóstico de los DV intervenidos en cirugía programada.**

DV	N=136	N(%)
Poliposis Colónica Familiar		1 (0,7%)
Poliquistosis Hepato-Renal		1 (0,7%)
Pseudoquiste Pancreático		1 (0,7%)
Quiste Ovario		1 (0,7%)
Quiste Hepático Simple		1 (0,7%)
Quiste Hídático Hepático		11 (8,1%)
Tumoración Retroperitoneal		1 (0,7%)
Úlcus Duodenal-Estenosis Duodenal		2 (1,4%)
Úlcus Duodenal + Hernia De Hiato		1 (0,7%)

DV=Donante Vivo.

**Tabla 7. Benignidad o malignidad de la patología que condicionó la intervención de los DV.**

DV	N=136	N (%)
<b>BENIGNA</b>		77 (56,6%)
<b>MALIGNA</b>		59 (43,4%)

DV=Donante Vivo.

- El número de DV que han sido sometidos a una resección hepática, ya sea por patología benigna o maligna, no incluyéndose la patología benigna relacionada con la vesícula, la vía biliar, la cirugía del quiste hídático, ni los casos de tumores benignos hepáticos en los que se realizó enucleación del mismo, se recoge en la Tabla 8, junto con el número y porcentaje de DV intervenidos por metástasis hepáticas; el tipo de tumor primario que originó dichas metástasis se recoge en la Tabla 9.

**Tabla 8. Resección hepática y metástasis hepáticas en los DV.**

DV	N=136	N (%)
<b>Resección hepática</b>	NO	95 (69,9%)
	SI	41 (30,1%)
<b>Metástasis hepáticas</b>	NO	117 (86%)
	SI	19 (14%)

DV=Donante Vivo.

**Tabla 9. Tumor primario en los DV intervenidos por metástasis hepáticas.**

DV	N=136	N (%)
<b>COLON</b>		13 (68,4%)
<b>RECTO</b>		6 (31,6%)

DV=Donante Vivo

- Isquemia caliente: en la mayoría de los DV no se realizó isquemia caliente (86%). En 19 casos (14%) se realizó clampaje del pedículo vascular hepático en algún momento de la intervención, previo a la toma de la biopsia hepática, de forma continua en 14 de ellos e intermitente en 5 (Tabla 10). El tiempo medio de isquemia caliente fue de 10,61 minutos [0-240] (Tabla 11).

**Tabla 10. Isquemia Caliente y tipo en los DV.**

<b>DV</b>	<b>N=136</b>	<b>N (%)</b>
<b>CONTINUA</b>		14 (10,3%)
<b>INTERMITENTE</b>		5 (3,7%)
<b>AUSENTE</b>		117 (86%)

DV=Donante Vivo.

**Tabla 11. Tiempo de isquemia caliente en los DV.**

<b>DV</b>	<b>Media</b>	<b>Mediana</b>	<b>Desviación</b>	<b>Intervalo</b>
<b>N=136</b>			<b>típica</b>	
<b>Tiempo isquemia caliente (min)</b>	10,61	0	32,25	0-240

DV=Donante Vivo; min=minutos.

- El resto de variables relacionadas con la intervención quirúrgica (hipotensión prolongada y parada cardiaca) se expondrán en el apartado IV.3.3, en un análisis descriptivo y comparativo junto con los DC.

## IV.2. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE VARIABLES DE DONANTES CADÁVER (DC).

### IV.2.1. Características clínicas y antecedentes personales de los DC:

- Los DC procedían de todos los Hospitales de la Comunidad Valenciana, siendo mayoritariamente del Hospital General de Alicante (33,3%) (Tabla 12).

**Tabla 12. Hospital en el que se realizó la extracción hepática de los DC.**

DC	N=36	N (%)
Hospital de Alcoy		1 (2,8%)
Hospital de Alzira		2 (5,6%)
Hospital de Badalona		1 (2,8%)
Hospital Clínico de Valencia		2 (5,6%)
Hospital General de Elche		2 (5,6%)
Hospital de Elda		1 (2,8%)
Hospital General de Alicante		12 (33,3%)
Hospital General Castellón		1 (2,8%)
Hospital General de Valencia		3 (8,3%)
Hospital de Jaén		1 (2,8%)
Hospital La Fe de Valencia		5 (13,9%)
Hospital La Fe (Hospital Infantil)		1 (2,8%)
Hospital de Orihuela		1 (2,8%)
Hospital Dr. Peset de Valencia		1 (2,8%)
Hospital de Villajoyosa		2 (5,6%)

DC=Donante Cadáver.

- La causa de la muerte en el grupo de los DC se refleja en la Tabla 13.

**Tabla 13. Causa de la muerte de los DC.**

DC	N=36	N (%)
TCE		10 (27,8%)
AVC		25 (69,4%)
TEP		1 (2,8%)

DC=Donante Cadáver; TCE=Traumatismo craneoencefálico;

AVC=Accidente vascular cerebral; TEP=tromboembolismo pulmonar.

- La estancia en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) y la administración de antibióticos en UCI en los DC se recoge en la Tabla 14. El tiempo medio de estancia en UCI fue de 59,42 horas  $\pm$  62. Mínimo 6 y máximo 216 horas.

**Tabla 14. Estancia en UCI y administración de antibióticos en UCI en los DC.**

DC N=36		N (%)
UCI Preoperatoria	NO	0 (0%)
	SI	36 (100%)
Antibióticos en UCI	NO	16 (44,4%)
	SI	20 (55,6%)

DC=Donante Cadáver; UCI=Unidad Cuidados Intensivos.

- El resto de características clínicas y antecedentes personales (sexo, edad, peso, talla, IMC, consumo previo de alcohol, hipertensión arterial, diabetes mellitus, hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia, medicación previa a la intervención, estancia en UCI y transfusiones en las últimas 48 horas) se expondrán en el apartado IV.3.I, en un análisis descriptivo y comparativo junto con los DV.

#### **IV.2.2. Variables relacionadas con el proceso de extracción hepática en los DC:**

- La biopsia en los DC está sometida a un tiempo de isquemia fría que puede ser variable; y las soluciones de preservación empleadas para la perfusión de los órganos (Celsior y Wisconsin) fueron utilizadas en proporciones similares (Tablas 15, 16 y 17).

**Tabla 15. Tiempo de isquemia fría en los DC.**

DC N=36	Media	Mediana	Desviación típica	Intervalo
Tiempo isquemia fría (min)	622,2	752,50	326,65	0-1535

DC=Donante Cadáver; min=minutos.

**Tabla 16. Tiempo Isquemia fría en rangos en los DC**

Minutos	N (%)
0-299	7 (19,4%)
300-699	9 (25%)
700-900	15 (41,7%)
>900	5 (13,9%)

**Tabla 17. Líquido de perfusión en los DC.**

Líquido perfusión	N (%)
Wisconsin	19 (52,8%)
Celsior	17 (47,2%)

- El resto de variables relacionadas con la extracción hepática (hipotensión prolongada y parada cardíaca), se expondrán en el apartado IV.3.3, en un análisis descriptivo y comparativo junto con los DV.

### **IV.3. ANÁLISIS DESCRIPTIVO Y COMPARATIVO DE TODAS LAS VARIABLES ENTRE AMBOS GRUPOS (DONANTES VIVOS Y DONANTES CADÁVER).**

En los apartados siguientes se expondrá el análisis descriptivo y comparativo conjunto (DV/DC) del resto de variables.

#### **IV.3.1. Características clínicas y antecedentes personales de los donantes (DV/DC):**

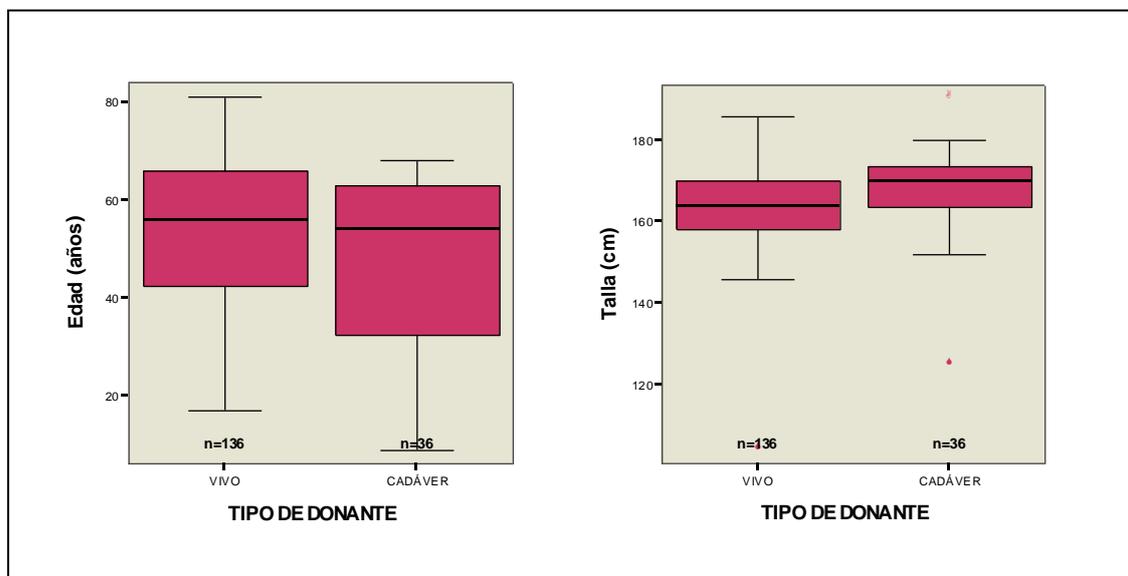
- Existen diferencias significativas en cuanto a la edad y la talla de los donantes, siendo más jóvenes y más altos los DC con una media de 46,44 años y 167 cm de altura ( $p=0,019$  y  $0,044$  respectivamente) frente a los DV. De los donantes que tomaban medicación previa, el 88,8% eran DV y 11,2% eran DC ( $p=0,000$ ) (Tablas 18, 19 y Figuras 10 y 11).

**Tabla 18. Comparativa de las características clínicas y antecedentes personales de los DV y DC (I).**

N=172	TIPO DE DONANTE	N	Media	Mediana	Desviación típica	Intervalo	p*
<b>Edad (años)</b>	DV	136	53,58	56	15,35	17-81	<b>0,019</b>
	DC	36	46,44	54	18,57	9-68	
<b>Peso (Kg)</b>	DV	136	67,36	67	11,57	43-140	0,064
	DC	36	71,58	72	11,99	25-90	
<b>Talla (cm)</b>	DV	136	163,54	164	9,86	104-186	<b>0,044</b>
	DC	36	167,64	170	10,74	125-190	
<b>IMC</b>	DV	136	25,14	24,77	3,98	19,57-46,77	0,782
	DC	36	25,31	25,04	3,09	16,02-31,21	

\*=t Student; Kg=Kilogramos; cm=centímetros; DV=Donante Vivo; DC=Donante Cadáver; IMC=Índice de Masa Corporal.

**Figura 10. Distribución de la edad y la talla en ambos grupos de donantes (DV y DC).**

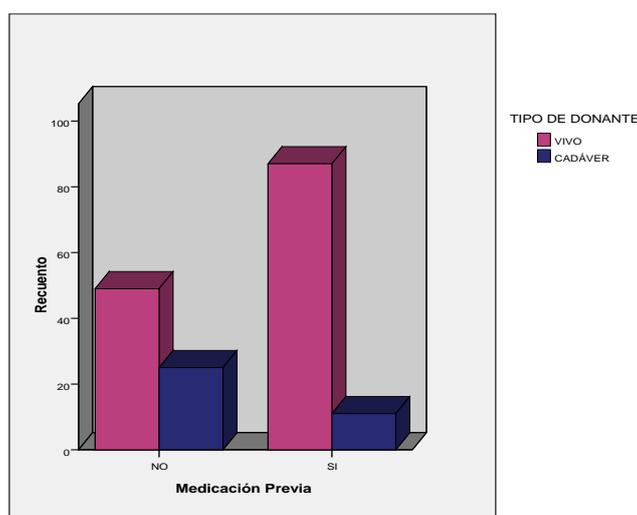


**Tabla 19. Comparativa de las características clínicas y antecedentes personales de los DV y DC (II).**

N=172			TIPO DE DONANTE		p*
			DV N (%)	DC N (%)	
Sexo	Mujer	N=81	69 (85,2%)	12 (14,8%)	0,063
	Hombre	N=91	67 (73,6%)	24 (26,4%)	
Consumo Alcohol	NO	N=159	127 (79,9%)	32 (20,1%)	0,475
	SI	N=13	9 (69,2%)	4 (30,8%)	
Hipertensión Arterial	NO	N=125	101 (80,8%)	24 (19,2%)	0,363
	SI	N=47	35 (74,5%)	12 (25,5%)	
Diabetes Mellitus	NO	N=156	123 (78,8%)	33 (21,2%)	1,0
	SI	N=16	13 (81,3%)	3 (18,8%)	
Hipertrigliceridemia	NO	N=160	127 (79,4%)	33 (20,6%)	0,717
	SI	N=12	9 (75,0%)	3 (25,0%)	
Hipercolesterolemia	NO	N=156	126 (80,8%)	30 (19,2%)	0,107
	SI	N=16	10 (62,5%)	6 (37,5%)	
<b>Medicación previa</b>	NO	N=74	49 (66,2%)	25 (33,8%)	<b>0,000</b>
	SI	N=98	87 (88,8%)	11 (11,2%)	
Transfusiones (48h)	NO	N=152	118 (77,6%)	34 (22,4%)	0,254
	SI	N=20	18 (90,0%)	2 (10,0%)	

\*= $\chi^2$  (Chi Cuadrado); h=horas; DV=Donante Vivo; DC=Donante Cadáver.

**Figura 11. Toma de medicación previa en ambos grupos de donantes (DV y DC).**



**IV.3.2. Parámetros analíticos de los donantes (DV/DC):**

- Las diferencias existentes respecto a los parámetros analíticos entre ambos grupos de donantes se recogen en las Tablas 20.I, 20.II y Figuras 12-16.

**Tabla 20.I. Comparativa de los parámetros analíticos de los DV y DC.**

N=172	TIPO DE DONANTE		Media	Mediana	Desviación típica	Intervalo	p*
Glucosa (mg/dL)	DV	N=136	102,81	95	34,01	11-259	0,000
	DC	N=36	190,04	167	65,75	96-360	
Sodio (mEq/L)	DV	N=136	139,78	140	3,39	130-151	0,000
	DC	N=36	148,51	147	11,66	124-174	
Potasio (mEq/L)	DV	N=136	4,31	4,3	0,41	3-5,4	0,000
	DC	N=36	3,87	4,0	0,63	2,6-5,9	
BR Total (mg/dL)	DV	N=136	0,89	0,59	1,12	0,2-7,2	0,735
	DC	N=36	0,97	0,6	1,18	0,1-5,4	
GOT (UI/L)	DV	N=136	54,08	22	203,26	6-2345	0,904
	DC	N=36	51,74	29	50,34	11-212	
GPT (UI/L)	DV	N=136	70,65	22	228,67	8-2540	0,259
	DC	N=36	45,92	21	57,92	5-264	
GGT (UI/L)	DV	N=136	100,14	38	183,04	9-1288	0,130
	DC	N=36	53,17	52	48,28	10-251	
FA (UI/L)	DV	N=136	146,82	93	218,09	33-2271	0,187
	DC	N=36	98,31	99	43,56	38-317	
Urea (mg/dL)	DV	N=136	35,08	34	11,57	12-85	0,199
	DC	N=36	38,38	35	19,75	13-90	
Creatinina (mg/dL)	DV	N=136	0,86	0,8	0,23	0,4-2	0,024
	DC	N=36	0,97	0,9	0,35	0,4-2,3	
Proteínas Totales (g/dL)	DV	N=136	7,06	7,1	0,49	5,5-8,8	0,000
	DC	N=36	6,12	6,1	0,62	4,8-7,9	

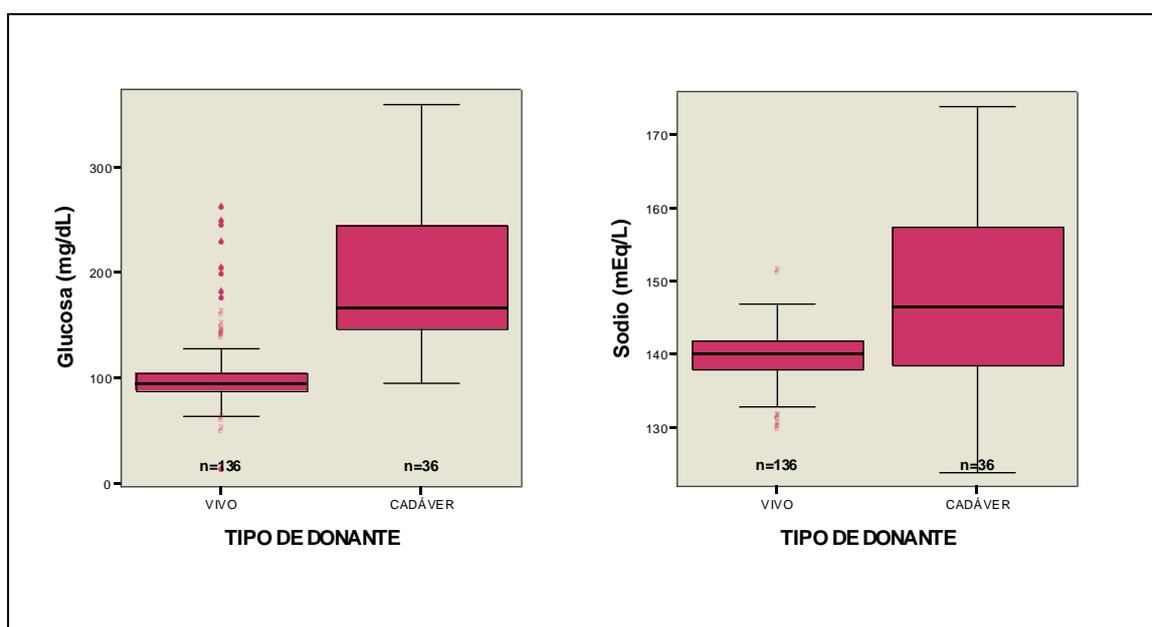
\*=t Student; mg/dL=miligramos/decilitro; mEq/L=miliequivalentes/litro; UI/L=Unidades Internacionales/litro; g/dL=gramos/decilitro; µL=microlitros; seg=segundos; DV=Donante Vivo; DC=Donante Cadáver; BR=Bilirrubina; GOT=transaminasa glutámico-oxalacética; GPT=transaminasa glutámico-pirúvica; GGT=gammaglutamiltranspeptidasa; FA=Fosfatasa alcalina.

Tabla 20.II. Comparativa de los parámetros analíticos de los DV y DC.

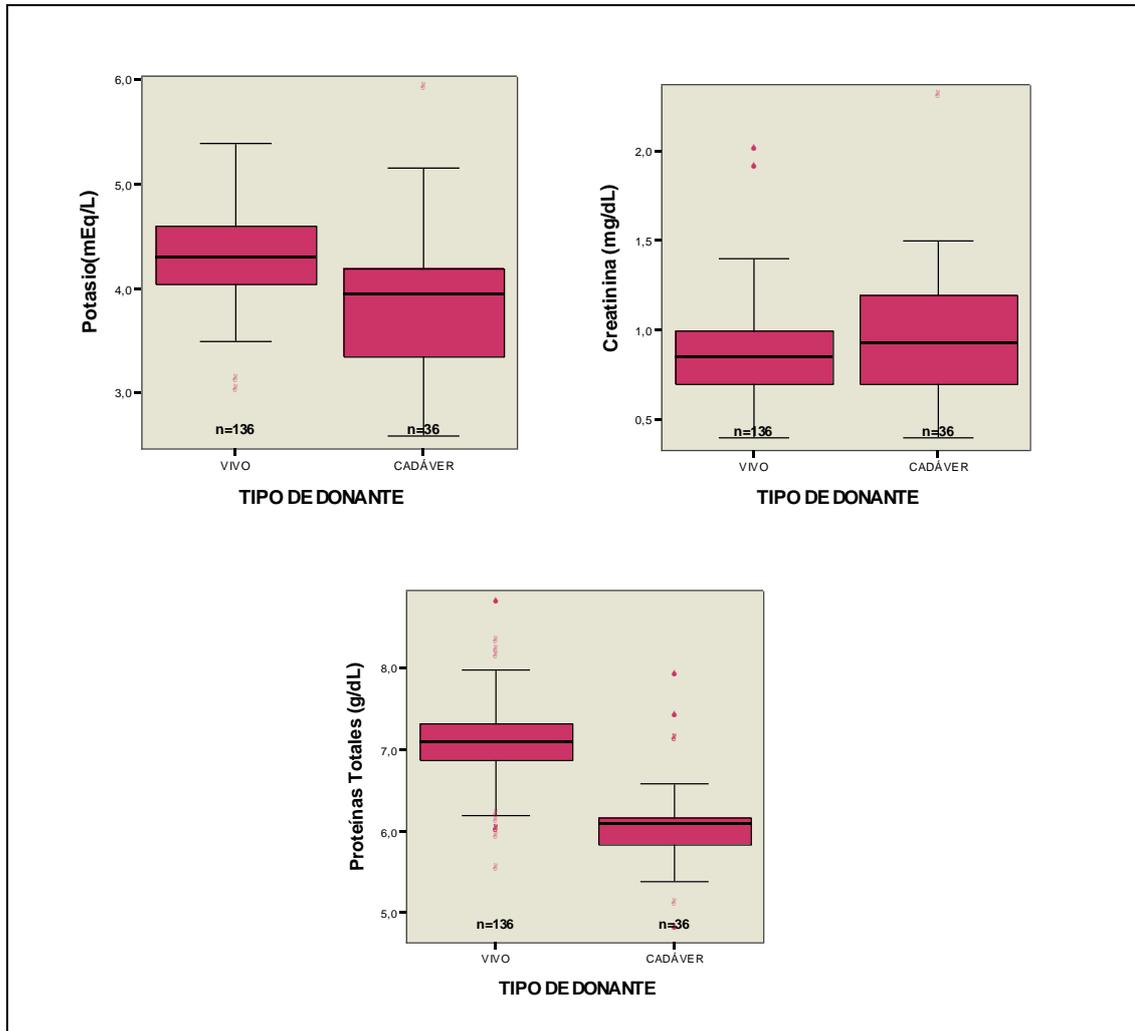
N=172	TIPO DE DONANTE	Media	Mediana	Desviación típica	Intervalo	p*
<b>Hb (g/dL)</b>	DV N=136	13,10	13,45	2,12	5,2-17,4	<b>0,06</b>
	DC N=36	11,75	11,8	2,57	5,7-16,4	
<b>HTO (%)</b>	DV N=136	39,87	40,7	5,62	20,3-51,4	<b>0,000</b>
	DC N=36	35,48	36,6	7,62	16-47,5	
<b>Leucocitos (x 10<sup>3</sup>/μL)</b>	DV N=136	7,274	6,7	2,45	2,8-18,2	<b>0,000</b>
	DC N=36	13,195	11,04	7,00	2,8-33	
<b>Neutrófilos (%)</b>	DV N=136	60,21	60,4	11,14	30,2-93	<b>0,000</b>
	DC N=36	81,38	83,85	14,97	37-94	
<b>Plaquetas (x10<sup>3</sup>/μL)</b>	DV N=136	242,59	238	70,438	21,9-477	<b>0,019</b>
	DC N=36	208,89	196,36	93,54	68-445	
<b>Índice Quick (%)</b>	DV N=136	94,85	100	12,72	50-149	<b>0,000</b>
	DC N=36	71,46	73	19,21	28-100	
<b>Tiempo de Protombina (seg)</b>	DV N=136	12,268	12,0	1,08	10,5-16,5	<b>0,000</b>
	DC N=36	15,117	15,2	2,69	3,9-23	

\*=t Student; g/dL=gramos/decilitro; μL=microlitros; seg=segundos; DV=Donante Vivo; DC=Donante Cadáver; Hb=hemoglobina; HTO=hematocrito.

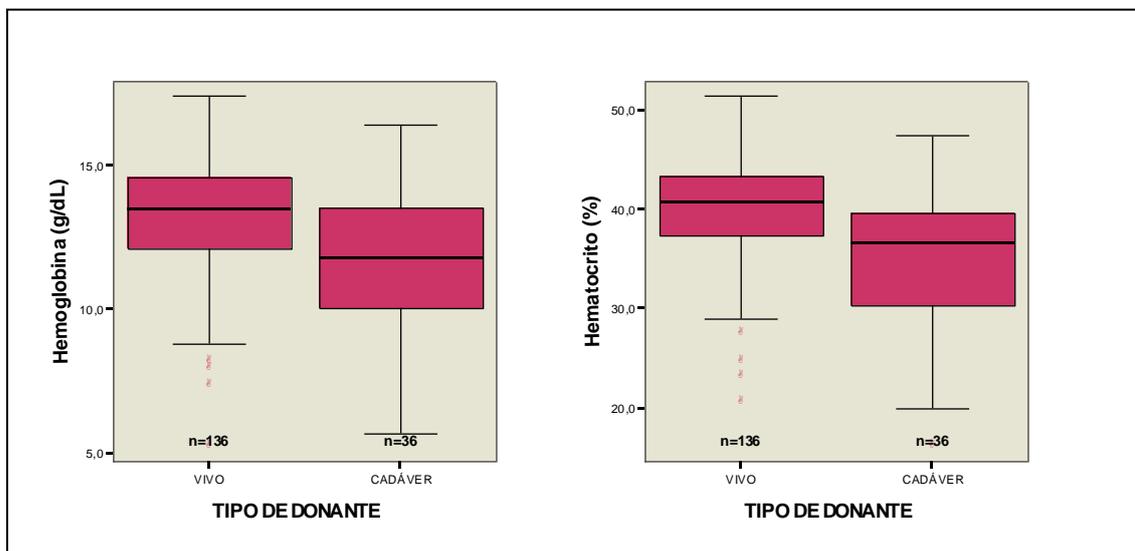
Figura 12. Distribución de los valores de Glucosa y Sodio en ambos grupos de donantes (DV y DC).



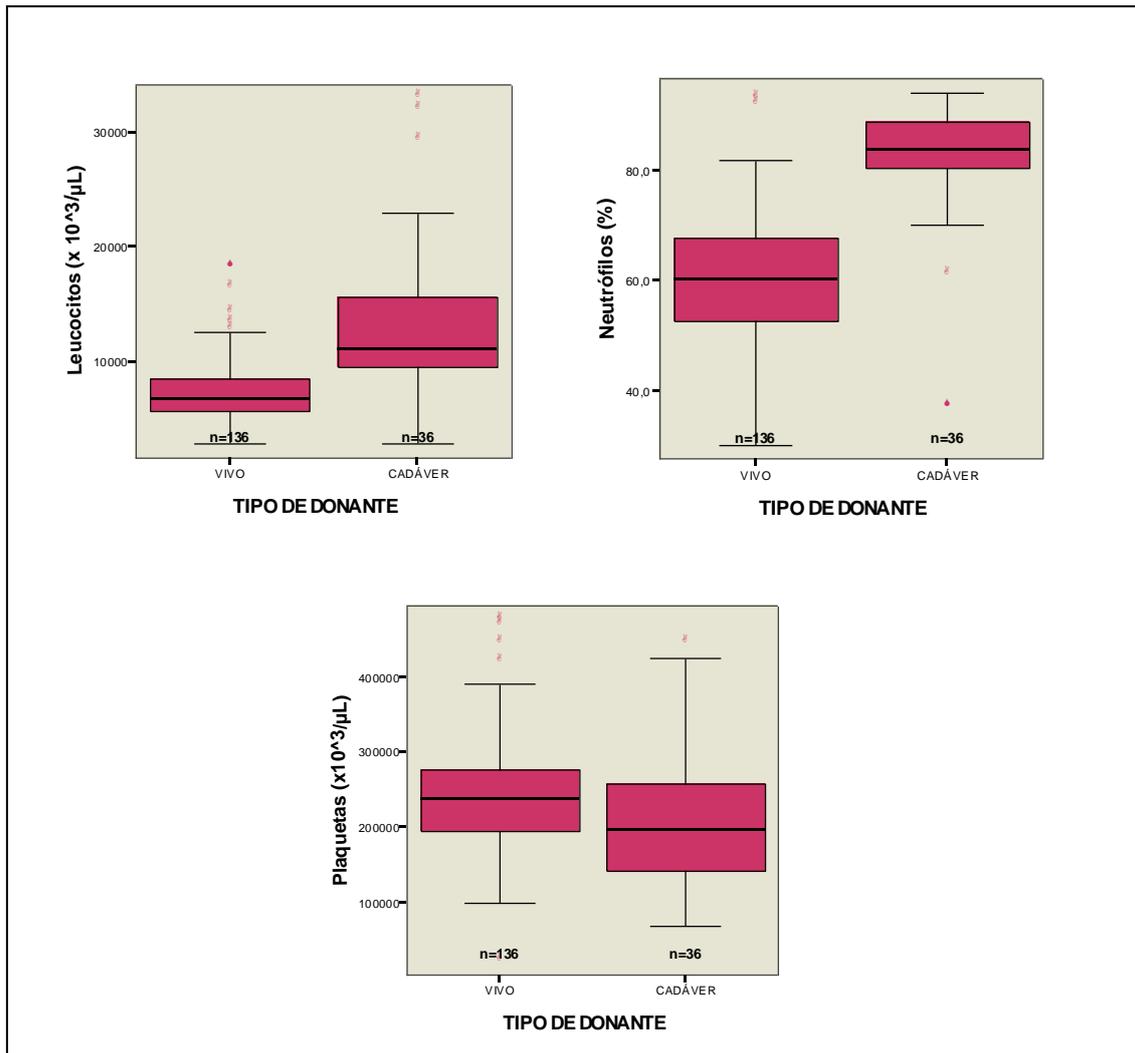
**Figura 13. Distribución de los valores de Potasio, Creatinina y Proteínas Totales en ambos grupos de donantes (DV y DC).**



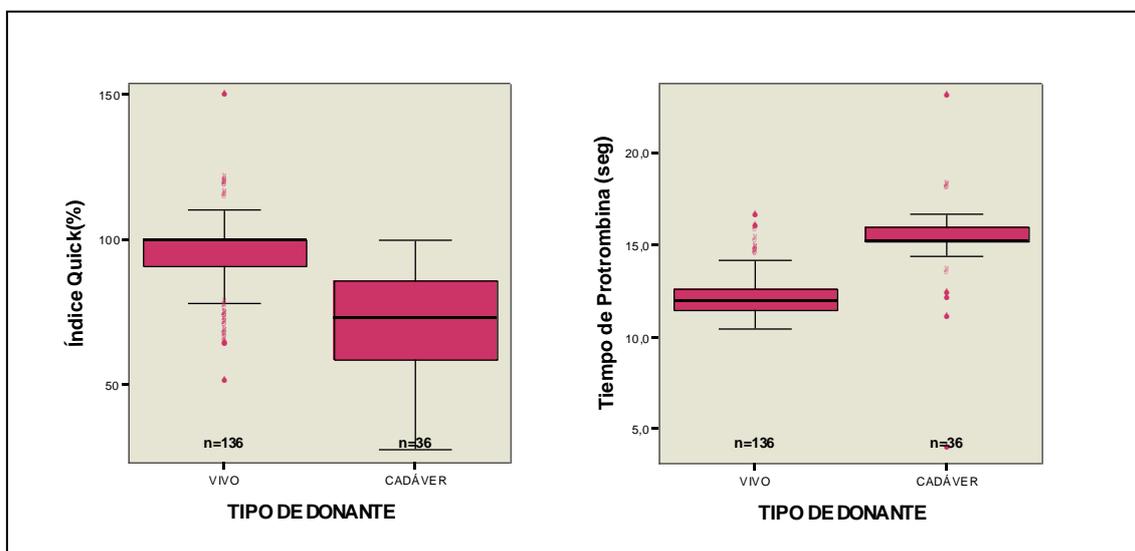
**Figura 14. Distribución de los valores de Hemoglobina y Hematocrito en ambos grupos de donantes (DV y DC).**



**Figura 15. Distribución del número de Leucocitos, Neutrófilos y Plaquetas en ambos grupos de donantes (DV y DC).**



**Figura 16. Distribución de los valores de Índice de Quick y Tiempo de Protrombina en ambos grupos de donantes (DV y DC).**



### IV.3.3. Variables relacionadas con la intervención quirúrgica/extracción hepática de los donantes (DV/DC):

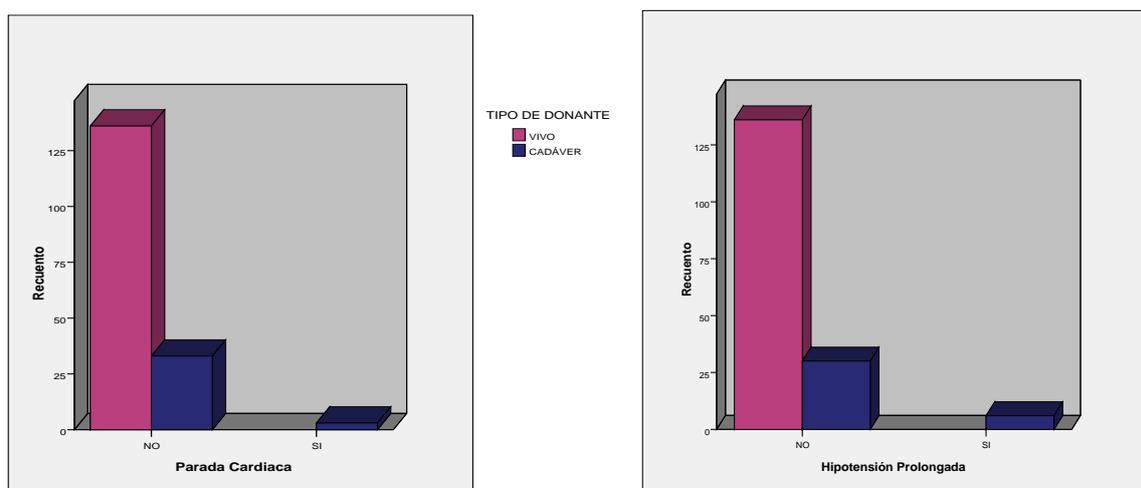
- Existen diferencias en algunas variables relacionadas con la intervención (extracción hepática en los DC) en ambos grupos de donantes. Ninguno de los DV sufrió parada cardiaca durante la intervención o episodio de hipotensión prolongada (Tabla 21 y Figura 17).

**Tabla 21. Comparativa de las variables relacionadas con la intervención quirúrgica en ambos grupos de donantes (DV y DC).**

N=172			TIPO DE DONANTE		p*
			DV N (%)	DC N (%)	
Parada Cardiaca	NO	N=169	136 (80,5%)	33 (19,5%)	0,009
	SI	N=3	0 (0,0%)	3 (100,0%)	
Hipotensión Prolongada	NO	N=166	136 (81,9%)	30 (18,1%)	0,000
	SI	N=6	0 (0,0%)	6 (100,0%)	

\*= Estadístico exacto de Fisher; DV=Donante Vivo; DC=Donante Cadáver.

**Figura 17. Parada cardiaca e Hipotensión prolongada en ambos grupos de donantes (DV y DC).**



#### IV.3.4. Variables relacionadas con la biopsia de los donantes (DV/DC):

- Existen diferencias respecto a las variables relacionadas con la biopsia en ambos grupos de donantes. Las diferencias más significativas se observan en la esteatosis de la biopsia hepática, de los donantes que no tenían esteatosis en la biopsia, el 83,5% eran DV ( $p=0,004$ ) (Tablas 22, 23 y Figura 18).

**Tabla 22. Comparativa de las variables relacionadas con la biopsia en ambos grupos de donantes (DV y DC) (I).**

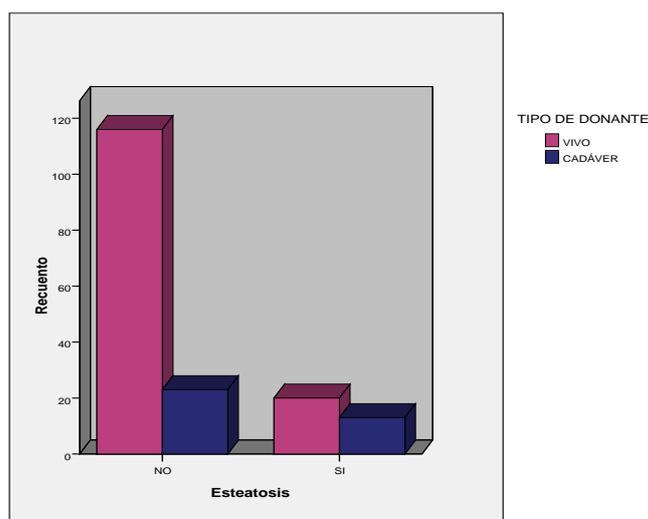
N=172	TIPO DE DONANTE	Media	Mediana	Desviación típica	Intervalo	p*
Peso	DV N=136	5,07	2,97	7,30	0,3-50	0,51
Muestra (g)	DC N=36	2,65	2,35	1,76	1,2-12	

\*= t Student; g=gramos; DV=Donante Vivo; DC=Donante Cadáver.

**Tabla 23. Comparativa de las variables relacionadas con la biopsia en ambos grupos de donantes (DV y DC) (II).**

N=172	TIPO DE DONANTE		p*	
	DV N (%)	DC N (%)		
Esteatosis	NO	N=139	116 (83,5%) 23 (16,5%)	0,004
	SI	N=33	20 (60,6%) 13 (39,4%)	
Esteatosis	0-29 (%)	N=165	132 (80,0%) 33 (20,0%)	0,160
	30-59 (%)	N=7	4 (57,1%) 3 (42,9%)	
	≥60 (%)	N=0	0 (0,0%) 0 (0,0%)	

\*= $\chi^2$  (Chi Cuadrado); DV=Donante Vivo; DC=Donante Cadáver.

**Figura 18. Distribución de la Esteatosis en ambos grupos de donantes (DV y DC).**

#### **IV.3.5. Variables relacionadas con el aislamiento y cultivo de hepatocitos de los donantes (DV/DC):**

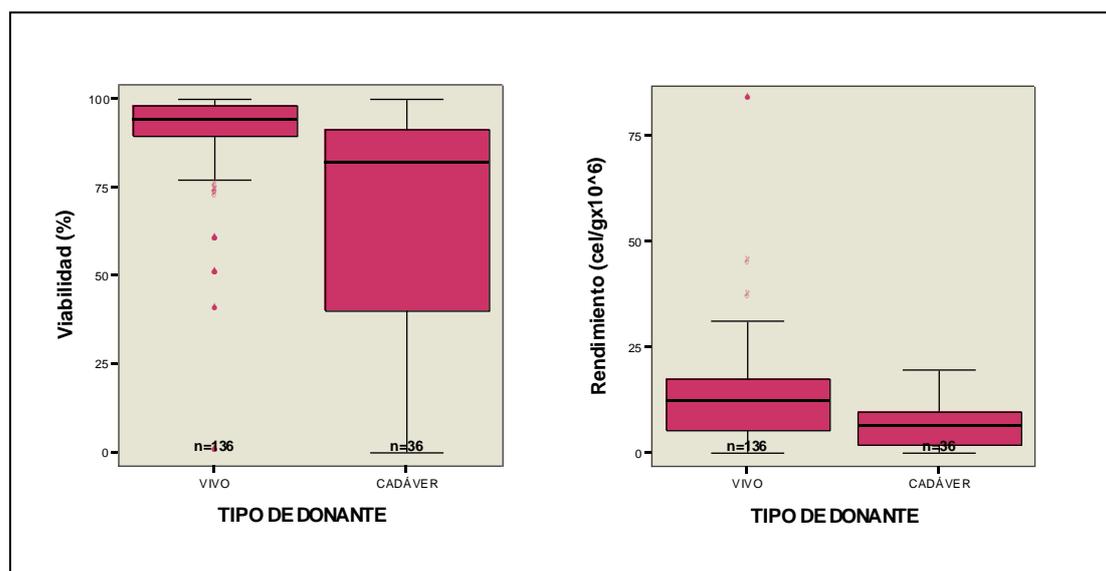
La variable más importante a la hora de analizar el resultado del aislamiento es la procedencia de la biopsia, es decir, si procede de un DV o de un DC. El hecho de que la biopsia proceda de un DV influye de forma estadísticamente significativa en la viabilidad y rendimiento del aislamiento celular (Tabla 24 y Figura 19).

**Tabla 24. Comparativa de las variables relacionadas con el aislamiento y cultivo de los hepatocitos en ambos grupos de donantes (DV y DC).**

N=172	TIPO DE DONANTE	Media	Mediana	Desviación típica	Intervalo	p*
<b>Viabilidad (%)</b>	DV N=136	90,11	94,00	14,97	0-100	<b>0,000</b>
	DC N=36	67,17	82,00	35,84	0-100	
<b>Rendimiento (cel/g x10<sup>6</sup>)</b>	DV N=136	12,87	12,03	10,43	0-83	<b>0,002</b>
	DC N=36	7,08	6,21	5,94	0-20	
ECOD (pmol/min/mg)	DV N=56	15,97	15,24	7,02	3,8-38,4	0,202
	DC N=11	12,60	9,00	11,64	2,9-39,6	
Testosterona-6-β hidroxilasa (pmol/min/mg)	DV N=53	70,26	57,30	49,28	7,6-212,6	0,947
	DC N=8	71,93	67,55	66,54	3,2-171	

\*=t Student; cel/g=células/gramo; pmol/min/mg=picomoles/minuto/miligramo; DV=Donante Vivo; DC=Donante Cadáver; ECOD= 7-etoxicumarina O-deetilasa.

**Figura 19. Distribución de la Viabilidad y Rendimiento del aislamiento celular en ambos grupos de donantes (DV y DC).**



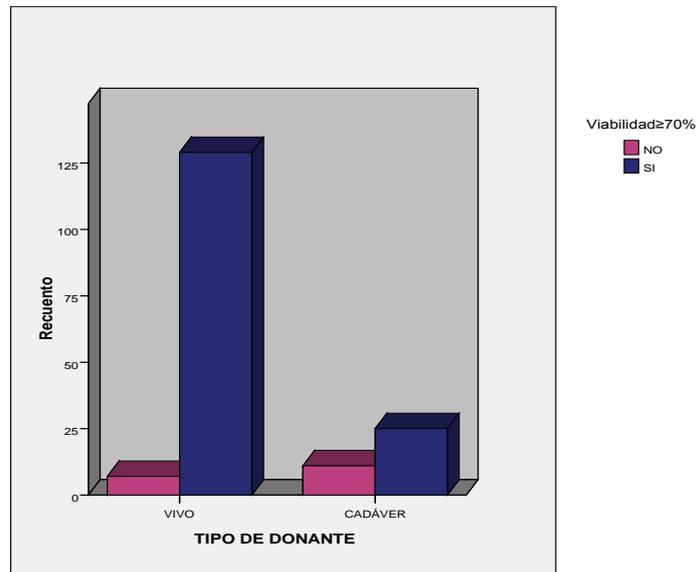
Estableciendo como punto de corte en la viabilidad el 70%, como muestra de un buen aislamiento, vemos que el 94,9% de los DV presentan una viabilidad  $\geq 70\%$  frente al 69,4% de los DC (Tabla 25 y Figura 20).

**Tabla 25. Influencia de la variable tipo de donante (DV-DC) en la viabilidad  $\geq 70\%$  del aislamiento de hepatocitos humanos.**

N=172			Viabilidad		p*
			<70%	$\geq 70\%$	
TIPO DE DONANTE	DV	N=136	7 (5,1%)	129 (94,9%)	0,000
	DC	N=36	11 (30,6%)	25 (69,4%)	

\*= Chi cuadrado; DV=Donante Vivo; DC=Donante Cadáver.

**Figura 20. Distribución de la Viabilidad  $\geq 70\%$  en ambos grupos de donantes (DV y DC).**



#### IV.4. DONANTES VIVOS: Identificación de las variables predictoras o independientes de los donantes que influyen en los resultados del aislamiento de los hepatocitos.

##### IV.4.1. VIABILIDAD:

- Características clínicas y antecedentes personales de los DV:

- Nuestro estudio demostró que, de las características clínicas y los antecedentes personales de los DV, sólo el IMC influye negativamente y de forma estadísticamente significativa en la viabilidad de los hepatocitos aislados (Tablas 26, 27 y Figura 21).

**Tabla 26. Influencia de las características clínicas y antecedentes personales en la viabilidad del aislamiento de hepatocitos de los DV (I).**

Viabilidad (%) N=136		N	Viabilidad media (%)	p*
Sexo	Hombre	67	91%	0,812
	Mujer	69	89%	
Consumo de alcohol	NO	127	90%	0,199
	SI	9	87%	
Hipertensión Arterial	NO	101	89%	0,689
	SI	35	93%	
Diabetes Mellitus	NO	123	90%	0,683
	SI	13	89%	
Hipertrigliceridemia	NO	127	91%	0,222
	SI	9	80%	
Hipercolesterolemia	NO	126	91%	0,223
	SI	10	81%	
Medicación previa	NO	49	90%	0,936
	SI	87	90%	
Quimioterapia preoperatoria	NO	125	91%	0,389
	SI	11	80%	
Transfusiones en las últimas 48 h	NO	118	91%	0,908
	SI	18	83%	

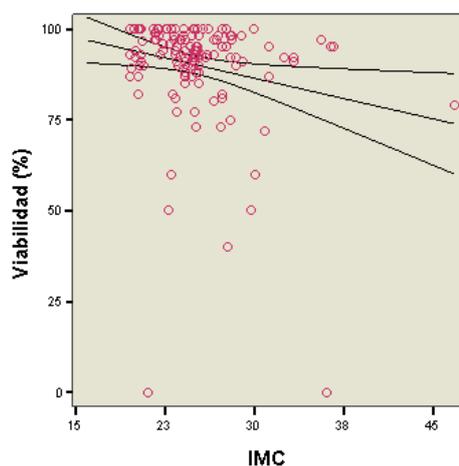
\*= U-Mann-Whitney; h=horas.

**Tabla 27. Influencia de las características clínicas y antecedentes personales en la viabilidad del aislamiento de hepatocitos de los DV (II).**

Viabilidad (%) N=136	Coefficiente de correlación de Spearman	P
Edad (años)	-0,76	0,382
Peso (Kg)	-0,143	0,096
Talla (cm)	0,065	0,449
<b>IMC</b>	<b>-0,170</b>	<b>0,048</b>

Kg=Kilogramos; cm=centímetros; IMC=Índice de Masa Corporal.

**Figura 21. Influencia del IMC en la viabilidad del aislamiento de hepatocitos en los DV.**



- Parámetros analíticos:

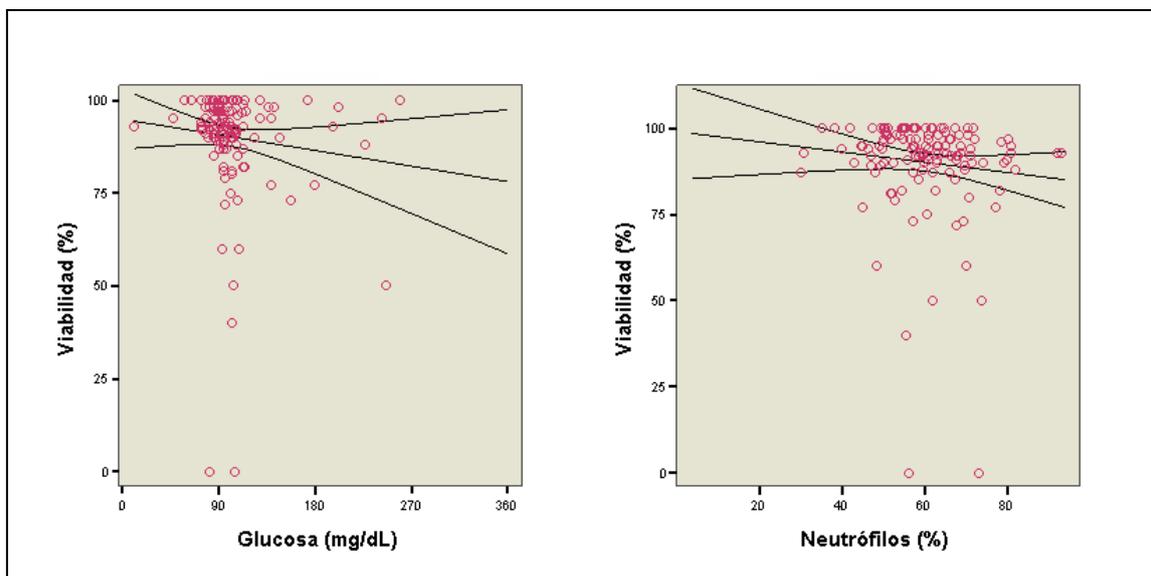
La viabilidad de los hepatocitos humanos procedentes de biopsias de DV se ve influenciada negativamente y con significación estadística por los valores de glucemia en sangre y el porcentaje de neutrófilos ( $p=0,014$  y  $p=0,020$  respectivamente), de forma que a mayor valor de dichas variables, menor es la viabilidad de los hepatocitos. El análisis del resto de parámetros estudiados no mostró significación estadística (Tablas 28, 29 y Figura 22).

**Tabla 28. Influencia de los parámetros analíticos en la viabilidad del aislamiento de hepatocitos de los DV (I).**

<b>Viabilidad (%)</b> N=136	<b>Coefficiente de correlación de Spearman</b>	<b>p</b>
<b>Glucosa (mg/dL)</b>	<b>-0,211</b>	<b>0,014</b>
Sodio (mEq/L)	0,042	0,624
Potasio (mEq/L)	0,008	0,922
BR total (mg/dL)	-0,120	0,163
GOT (UI/L)	-0,068	0,428
GPT (UI/L)	-0,110	0,201
GGT (UI/L)	-0,068	0,433
FA (UI/L)	-0,103	0,233
Urea (mg/dL)	-0,057	0,512
Creatinina (mg/dL)	0,119	0,169
Proteínas Totales (g/dL)	0,031	0,718
Hb (g/dL)	0,049	0,570
HTO (%)	0,093	0,281
Leucocitos (x 10 <sup>3</sup> /μL)	0,072	0,403
<b>Neutrófilos (%)</b>	<b>-0,199</b>	<b>0,020</b>
Plaquetas (x 10 <sup>3</sup> /μL)	0,025	0,775
Índice de Quick (%)	-0,049	0,570
Tiempo de Protombina (seg)	-0,147	0,088

mg/dL=miligramos/decilitro; mEq/L=miliequivalentes/litro; UI/L=Unidades Internacionales/litro; g/dL=gramos/decilitro; μL=microlitros; seg=segundos; BR=Bilirrubina; GOT=transaminasa glutámico-oxalacética; GPT=transaminasa glutámico-pirúvica; GGT=gamma glutamiltranspeptidasa; FA=Fosfatasa Alcalina; Hb=Hemoglobina; HTO=Hematocrito.

**Figura 22. Influencia de la Glucosa y los Neutrófilos en la viabilidad del aislamiento de hepatocitos en los DV.**



**Tabla 29. Influencia de los parámetros analíticos en la viabilidad del aislamiento de hepatocitos de los DV (II).**

Viabilidad (%) N=136		N	Viabilidad media (%)	p*
Glucosa (mg/dL)	<120	119	90%	0,858
	≥120	17	89%	
Sodio (mEq/L)	<160	136	90%	n.a.
	≥160	0		
GGT Rangos (UI/L)	<55	78	92%	0,428 (K-W)
	55-120	37	88%	
	>120	21	88%	
FA Rangos (UI/L)	<90	66	92%	0,263 (K-W)
	90-150	23	94%	
	>150	47	86%	

\*=U-Mann-Whitney; K-W=Kruskal-Wallis; n.a.=no analizado;

mg/dL=miligramos/decilitro; mEq/L=miliequivalentes/litro; UI/L=Unidades

Internacionales/litro; GGT=gammaglutamiltranspeptidasa; FA=Fosfatasa Alcalina.

- Variables relacionadas con la intervención quirúrgica:

- De todas las variables relacionadas con la intervención quirúrgica de los DV estudiadas, la única que merece mención especial es el hecho de que el DV sea intervenido por patología benigna o maligna. Los donantes intervenidos por patologías benignas presentan mayor viabilidad en el aislamiento, aunque el resultado no alcanza la significación estadística (Tablas 30 y 31).

**Tabla 30. Influencia de las variables relacionadas con la intervención quirúrgica en la viabilidad del aislamiento de hepatocitos de los DV (I).**

Viabilidad (%) N=136		N	Viabilidad media (%)	p*
Indicación	Benigna	77	92%	0,056
	Maligna	59	88%	
Resección hepática	NO	95	91%	0,680
	SI	41	88%	
Metástasis hepáticas	NO	117	90%	0,937
	SI	19	88%	
Parada cardiaca	NO	136	90%	n.a.
	SI	0		
Hipotensión prolongada	NO	136	90%	n.a.
	SI	0		
Isquemia caliente	NO	117	91%	0,962
	SI	19	84%	
Tiempo Isquemia caliente (min)	<30	119	91%	0,496
	≥30	17	84%	
Tipo de isquemia caliente	Continua	14	81%	0,998 (K-W)
	Intermitente	5	93%	
	Ausente	117	91%	

\*=U-Mann-Whitney; min=minutos; K-W=Kruskal-Wallis; n.a.=no analizado.

**Tabla 31. Influencia de las variables relacionadas con la intervención quirúrgica en la viabilidad del aislamiento de hepatocitos de los DV(II).**

Viabilidad (%) N=136	Coefficiente de correlación de Spearman	p
Tiempo isquemia caliente (min)	0,005	0,950

min=minutos.

- Variables relacionadas con la biopsia:

Ninguna de las variables relacionadas con la biopsia influye de forma significativa en la viabilidad de los hepatocitos (Tablas 32 y 33).

**Tabla 32. Influencia de las variables relacionadas con la biopsia en la viabilidad del aislamiento de hepatocitos de los DV (I).**

Viabilidad (%) N=136		N	Viabilidad media (%)	p*
Esteatosis	NO	116	90%	1 (U-M-W)
	SI	20	88%	
Esteatosis (%)	0-29	132	91%	0,127
	30-59	4	66%	
	≥60	0		

\*= Kruskal-Wallis; U-M-W= U-Mann-Whitney.

**Tabla 33. Influencia de las variables relacionadas con la biopsia en la viabilidad del aislamiento de hepatocitos de los DV (II).**

Viabilidad (%) N=136	Coefficiente de correlación de Spearman	p
Peso de la muestra (g)	-0,80	0,357

g=gramos.

## - ANÁLISIS MULTIVARIANTE:

En el análisis multivariante de la variable “*viabilidad*” en los DV, de todas la variables estudiadas, la única que mantiene la significación estadística es el IMC, de forma que a mayor IMC, menor es la viabilidad de los hepatocitos (Tabla 34).

**Tabla 34. Influencia de las variables de los DV en la viabilidad del aislamiento de hepatocitos. Modelo Lineal General.**

Viabilidad (%)	B	Error típ.	t	gl	Sig.	I.C. al 95%.	
						Límite inferior	Límite superior
Intersección	119,322	10,715	11,136	1	0,000	98,128	140,517
<b>IMC</b>	-0,735	0,318	-2,312	1	<b>0,022</b>	-1,364	-0,106
Glucosa (mg/dL)	-0,034	0,038	-0,886	1	0,377	-0,110	0,042
Neutrófilos (%)	-0,120	0,117	-1,024	1	0,308	-0,352	0,112

mg/dL=miligramos/decilitro; Error típ=Error típico; gl=grados de libertad; Sig.=significación; I.C.=Intervalo de Confianza; IMC=Índice Masa Corporal.

➤ En apartados anteriores se ha expuesto que un aislamiento con una **viabilidad superior al 70%** es un buen resultado. En base a nuestros resultados observamos que las biopsias procedentes de DV en cuyo aislamiento se obtuvo una viabilidad  $\geq 70\%$ , presentan cifras de BR más bajas, frente a aquellas cuya viabilidad fue menor al 70%, con cifras de BR algo más altas ( $p=0,042$ ). Así, podríamos establecer un punto de corte en cifras de  $BR \geq 1$  mg/dL, ya que por encima de esas cifras la viabilidad es inferior al 70% ( $p=0,013$ ) (Tablas 35, 36 y Figura 23). De los DV que no recibieron quimioterapia preoperatoria, la mayoría presentaron una viabilidad de los hepatocitos aislados  $\geq 70\%$ ; lo mismo ocurrió con el IMC: de los DV cuyo IMC era inferior a 30, un 96%, presentaron viabilidades de los hepatocitos  $\geq 70\%$ , aunque ninguna de las dos variables alcanzó la significación estadística (Tabla 36). El resto de variables fueron analizadas pero obtuvieron una significación estadística por encima de 0,1.

**Tabla 35. Variables que influyen en la viabilidad  $\geq 70\%$  del aislamiento de hepatocitos en los DV (I).**

N=136	Viabilidad (%)	N	Media	Desviación típica	p*
Edad (años)	<70 %	7	57,71	18,67	0,565 (t Student)
	$\geq 70\%$	129	53,36	15,21	
Urea (mg/dL)	<70 %	7	40,71	7,56	0,066
	$\geq 70\%$	129	34,78	11,69	
<b>BR total (mg/dL)</b>	<70 %	7	1,47	1,15	<b>0,042</b>
	$\geq 70\%$	129	0,86	1,11	
GOT (UI/L)	<70 %	7	63,40	67,36	0,075
	$\geq 70\%$	129	53,57	208,23	
GPT (UI/L)	<70 %	7	100,77	140,79	0,071
	$\geq 70\%$	129	69,02	232,75	

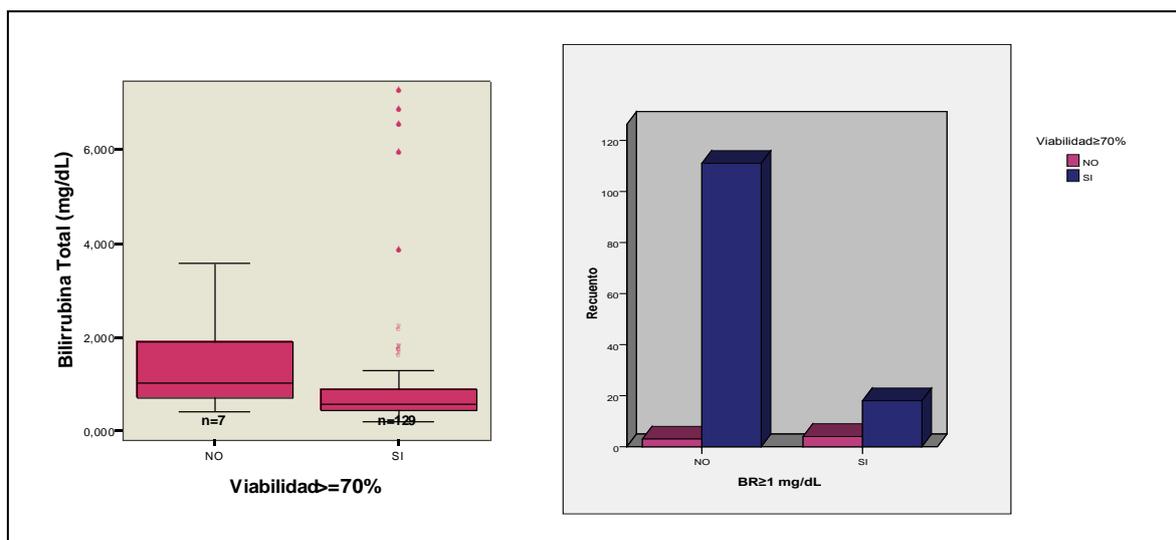
\*= U-Mann-Whitney mg/dL=miligramos/decilitro; UI/L=Unidades Internacionales/litro; BR=Bilirrubina; GOT=transaminasa glutámico-oxalacética; GPT=transaminasa glutámico-pirúvica.

**Tabla 36. Variables que influyen en la viabilidad  $\geq 70\%$  del aislamiento de hepatocitos en los DV (II).**

N=136			Viabilidad		p*
			<70% N (%)	$\geq 70\%$ N (%)	
QT Preoperatoria	NO	N = 125	5 (4,0%)	120 (96,0%)	0,1
	SI	N=11	2 (18,2%)	9 (81,8%)	
<b>BR<math>\geq 1</math> (mg/dL)</b>	<1	N= 114	3 (2,6%)	111 (97,4%)	<b>0,013</b>
	$\geq 1$	N=22	4 (18,2%)	18 (81,8%)	
IMC $\geq 30$	<30	N=124	5 (4,0%)	119(96,0%)	0,117
	$\geq 30$	N=12	2(16,7%)	10 (83,3%)	

\*=Estadístico exacto de Fisher; mg/dL=miligramos/decilitro; QT=Quimioterapia; BR=Bilirrubina; IMC=Índice de Masa Corporal.

**Figura 23. Influencia de la Bilirrubina Total y la Bilirrubina  $\geq 1$  en la viabilidad  $\geq 70\%$  del aislamiento de hepatocitos en los DV.**



**- ANÁLISIS MULTIVARIANTE:**

Las únicas variables con valor pronóstico independiente en este análisis son la BR al establecer un punto de corte en 1mg/dL y la QT preoperatoria. Ambas variables influyen de forma significativa en la viabilidad de los hepatocitos al establecer un punto de corte en 70%, es decir, los DV con cifras de bilirrubina  $< 1$  mg/dL y aquellos que no han recibido QT preoperatoria tienen una viabilidad superior al 70% (Tabla 37).

**Tabla 37. Influencia de las variables de los DV en la viabilidad  $\geq 70\%$  del aislamiento de hepatocitos. Modelo de Regresión Logística.**

Viabilidad $\geq 70\%$	B	E.T.	Wald	gl	Sig.	Exp(B)	I.C. 95,0% para EXP(B)	
							Inferior	Superior
BR $< 1$ (mg/dL)	3,153	1,165	7,327	1	<b>0,007</b>	23,411	2,387	229,628
GOT	0,008	0,010	0,692	1	0,406	1,008	0,989	1,028
GPT	-0,006	0,008	0,728	1	0,394	0,994	0,979	1,008
QT preoperatoria (NO)	3,196	1,291	6,132	1	<b>0,013</b>	24,439	1,947	306,747
Constante	-1,636	1,430	1,308	1	0,253	0,195		

mg/dL=miligramos/decilitro; E.T=Error Típico; gl=grados de libertad; Sig=significación; Exp=Exponencial; I.C.=Intervalo Confianza; BR=Bilirrubina; GOT=transaminasa glutámico-oxalacética; GPT=transaminasa glutámico-pirúvica; QT=Quimioterapia.

#### IV.4.2. RENDIMIENTO:

- Características clínicas y antecedentes personales de los donantes:

Las características y antecedentes personales de los DV no han influido de forma significativa en el rendimiento de los hepatocitos aislados (Tablas 38 y 39).

**Tabla 38. Influencia de las características clínicas y antecedentes personales en el rendimiento del aislamiento de hepatocitos de los DV (I).**

Rendimiento (cel/g x10 <sup>6</sup> ) N=136		N	Media	p*
Sexo	Hombre	67	14	0,322
	Mujer	69	12	
Consumo de alcohol	NO	127	13	0,386
	SI	9	14	
Hipertensión Arterial	NO	101	13	0,416
	SI	35	13	
Diabetes Mellitus	NO	123	13	0,475
	SI	13	13	
Hipertrigliceridemia	NO	127	13	0,655
	SI	9	10	
Hipercolesterolemia	NO	126	13	0,201
	SI	10	9	
Medicación previa	NO	49	15	0,170
	SI	87	12	
QT preoperatoria	NO	125	13	0,079
	SI	11	8	
Transfusiones en las últimas 48 h	NO	118	13	0,059
	SI	18	9	

\*=U-Mann-Whitney; cel/g=células/gramo; QT=Quimioterapia; h=horas.

**Tabla 39. Influencia de las características clínicas y antecedentes personales en el rendimiento del aislamiento de hepatocitos de los DV (II).**

<b>Rendimiento (cel/g x10<sup>6</sup>) N=136</b>	<b>Coefficiente de correlación de Spearman</b>	<b>p</b>
Edad (años)	0,11	0,896
Peso (Kg)	0,034	0,697
Talla (cm)	-0,044	0,610
IMC	0,043	0,619

cel/g=células/gramo; Kg=kilogramos; cm=centímetros.

- Parámetros analíticos:

De todos los parámetros analíticos de los DV estudiados, sólo los valores de GOT y el índice de Quick demostraron influencia estadísticamente significativa en el rendimiento de los hepatocitos, siendo éste mayor cuanto menor es el valor de GOT en sangre y cuanto mayor es el índice de Quick (Tablas 40, 41 y Figura 24).

**Tabla 40. Influencia de los parámetros analíticos en el rendimiento del aislamiento de hepatocitos de los DV (I).**

<b>Rendimiento (cel/g x10<sup>6</sup>) N=136</b>	<b>Coefficiente de correlación de Spearman</b>	<b>p</b>
Glucosa (mg/dL)	-0,011	0,902
Sodio (mEq/L)	0,118	0,171
Potasio (mEq/L)	-0,007	0,937
BR total (mg/dL)	-0,005	0,954
<b>GOT (UI/L)</b>	<b>-0,189</b>	<b>0,028</b>
GPT (UI/L)	-0,105	0,226
GGT (UI/L)	-0,131	0,127
FA (UI/L)	-0,017	0,848
Urea (mg/dL)	-0,027	0,756
Creatinina (mg/dL)	-0,008	0,925
Proteínas Totales (g/dL)	0,065	0,452
Hb (g/dL)	0,133	0,122
HTO (%)	0,064	0,460
Leucocitos (x 10 <sup>3</sup> /μL)	0,018	0,837
Neutrófilos (%)	-0,056	0,517
Plaquetas (x 10 <sup>3</sup> /μL)	-0,043	0,617
<b>Índice de Quick (%)</b>	<b>0,270</b>	<b>0,001</b>
Tiempo de Protombina (seg)	0,145	0,092

cel/g=células/gramo; mg/dL=miligramos/decilitro;

mEq/L=miliequivalentes/litro; UI/L=Unidades Internacionales/litro;

g/dL=gramos/decilitro; μL =microlitros; seg=segundos; BR=Bilirrubina;

GOT=transaminasa glutámico-oxalacética; GPT=transaminasa glutámico-

pirúvica; GGT=gammaglutamiltranspeptidasa; FA=Fosfatasa Alcalina;

Hb=Hemoglobina; HTO=Hematocrito.

**Tabla 41. Influencia de los parámetros analíticos en el rendimiento del aislamiento de hepatocitos de los DV (II).**

Rendimiento (cel/g x10 <sup>6</sup> ) N=136		N	Media	p*
Glucosa (mg/dL)	<120	119	13	0,808 (U-M-W)
	≥120	17	14	
Sodio (mEq/L)	<160	136	13	n.a.
	≥160	0	0	
GGT Rangos (UI/L)	<55	78	13	0,340
	55-120	37	12	
	>120	21	12	
FA Rangos (UI/L)	<90	66	12	0,910
	90-150	23	12	
	>150	47	15	

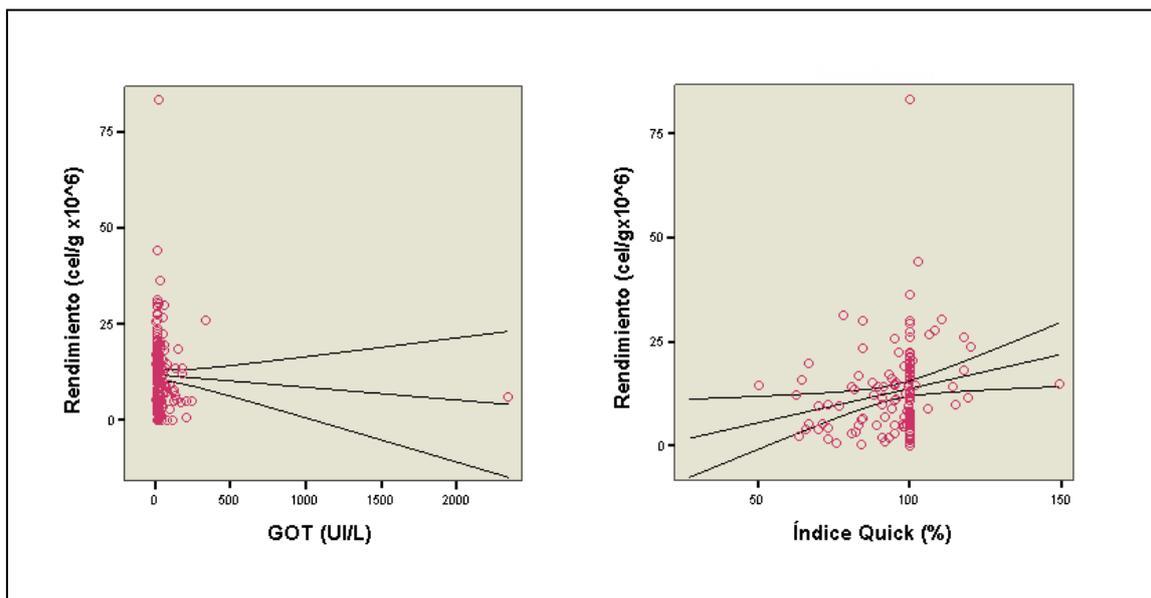
\*Kruskal-Wallis; U-M-W=U-Mann-Whitney; n.a.=no analizado;

cel/g=células/gramo; mg/dL=miligramos/decilitro; mEq/L=miliequivalentes/litro;

UI/L=Unidades Internacionales/litro; GGT=gammaglutamiltranspeptidasa;

FA=Fosfatasa Alcalina.

**Figura 24. Influencia de la GOT y el Índice de Quick en el rendimiento del aislamiento de hepatocitos en los DV.**



- Variables relacionadas con la intervención quirúrgica:

Los DV a los que se ha realizado algún tipo de resección hepática (por patología benigna o maligna), los intervenidos por metástasis hepáticas y aquellos cuyo hígado fue sometido a isquemia caliente durante la intervención, presentan menor rendimiento tras el aislamiento de los hepatocitos ( $p < 0,05$ ). El tipo y tiempo de la isquemia caliente influyen también negativamente en el rendimiento (Tablas 42, 43 y Figuras 25-27).

**Tabla 42. Influencia de las variables relacionadas con la intervención quirúrgica en el rendimiento del aislamiento de hepatocitos de los DV (I).**

<b>Rendimiento (cel/g x10<sup>6</sup>)</b>		<b>N</b>	<b>Media</b>	<b>p*</b>
<b>N=136</b>				
Indicación	Benigna	77	14	0,191
	Maligna	59	11	
<b>Resección hepática</b>	NO	95	15	<b>0,000</b>
	SI	41	8	
<b>Metástasis hepáticas</b>	NO	117	14	<b>0,003</b>
	SI	19	7	
Parada cardiaca	NO	136	13	n.a.
	SI	0		
Hipotensión prolongada	NO	136	13	n.a.
	SI	0		
<b>Isquemia caliente</b>	NO	117	14	<b>0,003</b>
	SI	19	7	
<b>Tiempo Isquemia caliente (min)</b>	<30	119	14	<b>0,002</b>
	≥30	17	7	
<b>Tipo de isquemia caliente</b>	Continua	14	7	<b>0,012</b> (K-W)
	Intermitente	5	8	
	Ausente	117	14	

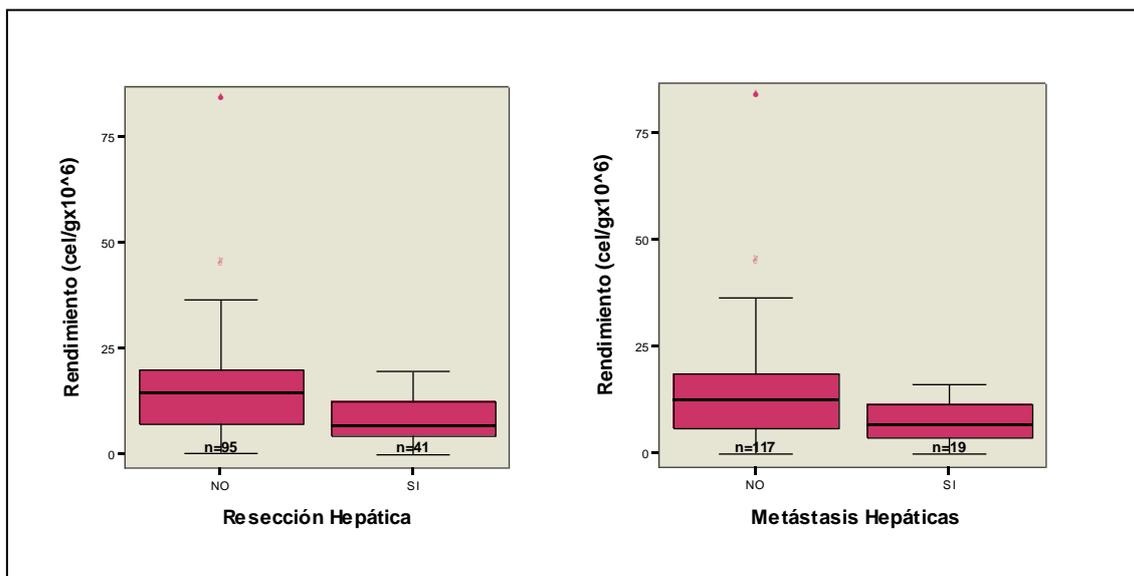
\*=U-Mann-Whitney; K-W=Kruskal-Wallis; n.a.= no analizado; cel/gr=células/gramo; min=minutos.

**Tabla 43. Influencia de las variables relacionadas con la intervención quirúrgica en el rendimiento del aislamiento de hepatocitos de los donantes vivos (II).**

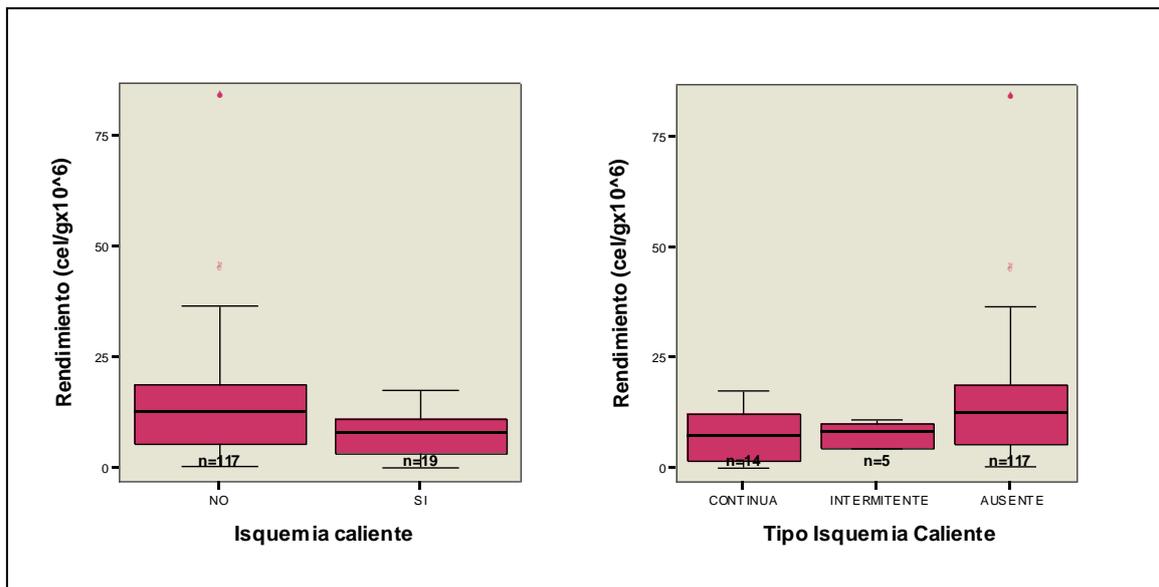
Rendimiento (cel/g x10 <sup>6</sup> ) N=136	Coefficiente de correlación de Spearman	p
Tiempo de isquemia caliente (minutos)	- 0,258	0,002

cel/g=células/gramo.

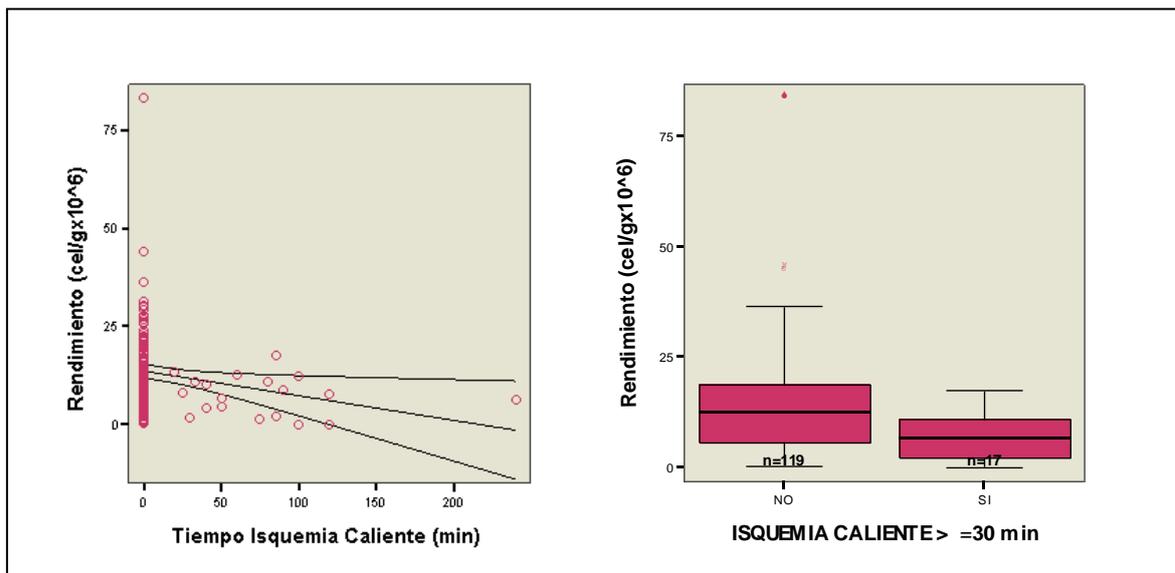
**Figura 25. Influencia de la Resección Hepática y las Metástasis Hepáticas en el rendimiento del aislamiento de hepatocitos en los DV.**



**Figura 26. Influencia de la Isquemia Caliente y el Tipo en el rendimiento del aislamiento de hepatocitos en los DV.**



**Figura 27. Influencia del Tiempo de Isquemia Caliente y la Isquemia  $\geq 30$  minutos en el rendimiento del aislamiento de hepatocitos en los DV.**



- VARIABLES RELACIONADAS CON LA BIOPSIA:

Las biopsias sin esteatosis presentan un rendimiento de los hepatocitos aislados mayor, con cifras de 14 cel/g x10<sup>6</sup> frente a 9 cel/g x10<sup>6</sup> de las biopsias con esteatosis, aunque sin alcanzar la significación estadística (Tablas 44 y 45).

**Tabla 44. Influencia de las variables relacionadas con la biopsia en el rendimiento del aislamiento de hepatocitos de los DV (I).**

Rendimiento (cel/g x10 <sup>6</sup> ) N=136		N	Media	p*
Esteatosis	NO	116	14	0,056 (U-M-W)
	SI	20	9	
Esteatosis (%)	0-29	132	13	0,157
	30-59	4	7	
	≥60	0		

\*= Kruskal-Wallis; U-M-W=U-Mann-Whitney; cel/g=células/gramo.

**Tabla 45. Influencia de las variables relacionadas con la biopsia en el rendimiento del aislamiento de hepatocitos de los DV (II).**

Rendimiento (cel/g x10 <sup>6</sup> ) N=136	Coefficiente de correlación de Spearman	p
Peso de la muestra (g)	-0,017	0,844

cel/g=células/gramo; g=gramos.

### - ANÁLISIS MULTIVARIANTE:

Las únicas variables que, de forma significativa y de manera independiente, influyeron en el rendimiento de los hepatocitos aislados en los DV, fueron el valor del Índice de Quick y la resección hepática. Influyeron de manera favorable un mayor Índice de Quick y el hecho de que al donante no se le hubiera realizado una resección hepática (Tabla 46).

**Tabla 46. Influencia de las variables de los DV en el rendimiento del aislamiento de hepatocitos. Modelo Lineal General.**

Rendimiento (cel/g x10 <sup>6</sup> )	B	Error típ.	t	gl	Sig.	I.C. al 95%.	
						Límite inferior	Límite superior
Intersección	-9,063	7,457	-1,215	1	0,226	-23,820	5,693
Índice Quick(%)	0,169	0,067	2,508	1	<b>0,013</b>	0,036	0,302
QT Preoperatoria (NO)	0,016	5,820	0,003	1	0,998	-11,500	11,533
<b>Resección hepática (NO)</b>	6,888	2,845	2,422	1	<b>0,017</b>	1,259	12,517
Metástasis hepáticas (NO)	11,945	14,048	0,850	1	0,397	-15,853	39,742
Isquemia caliente (NO)	0,086	6,859	0,013	1	0,990	-13,486	13,658

cel/g=células/gramo; Error típ=Error típico; gl=grados de libertad; Sig.=significación; I.C.=Intervalo de Confianza; QT=Quimioterapia.

#### IV.4.3. Actividad ECOD (7-etoxicumarina O-deetilasa):

- Características clínicas y antecedentes personales de los donantes:

Ninguna de las características y antecedentes personales de los DV influye de forma significativa en la actividad ECOD de los hepatocitos aislados (Tablas 47 y 48).

**Tabla 47. Influencia de las características clínicas y antecedentes personales en la actividad ECOD de los hepatocitos aislados de los DV(I).**

Actividad ECOD (pmol/min/mg) N=56		N	Media	p*
Sexo	Hombre	26	17,82	0,062
	Mujer	30	14,36	
Consumo de alcohol	NO	55	16,02	0,714
	SI	1	13,39	
Hipertensión Arterial	NO	44	16,28	0,508
	SI	12	14,81	
Diabetes Mellitus	NO	53	15,70	0,223
	SI	3	20,66	
Hipertrigliceridemia	NO	54	16,16	0,341
	SI	2	10,78	
Hipercolesterolemia	NO	54	16,07	0,097
	SI	2	13,23	
Medicación previa	NO	16	17,37	0,377
	SI	40	15,41	
QT preoperatoria	NO	53	15,95	0,803
	SI	3	16,36	
Transfusiones en las últimas 48 h	NO	49	15,70	0,607
	SI	7	17,81	

\*=t-Student; pmol/min/mg=picomoles/minuto/miligramo; h=horas;

ECOD=7-etoxicumarina O-deetilasa; QT=Quimioterapia.

**Tabla 48. Influencia de las características clínicas y antecedentes personales en la actividad ECOD de los hepatocitos aislados de los DV (II).**

<b>Actividad ECOD (pmol/min/mg) N=56</b>	<b>Coefficiente de correlación de Pearson</b>	<b>p</b>
Edad (años)	0,042	0,760
Peso (Kg)	-0,013	0,924
Talla (cm)	0,163	0,230
IMC	-0,130	0,339

pmol/min/mg=picomoles/minuto/miligramo; Kg=kilogramos; cm=centímetros;  
ECOD=7-etoxicumarina O-deetilasa; IMC=Índice Masa Corporal.

- Parámetros analíticos:

De todos los parámetros analíticos estudiados del DV, sólo el tiempo de protrombina influye de forma positiva y con significación estadística en la actividad ECOD de los hepatocitos aislados (Tablas 49, 50 y Figura 28).

**Tabla 49. Influencia de los parámetros analíticos en la actividad ECOD de los hepatocitos aislados de los DV (I).**

<b>Actividad ECOD (pmol/min/mg) N=56</b>	<b>Coefficiente de correlación de Pearson</b>	<b>p</b>
Glucosa (mg/dL)	-0,022	0,870
Sodio (mEq/L)	-0,152	0,262
Potasio (mEq/L)	0,056	0,684
BR total (mg/dL)	0,109	0,422
GOT (UI/L)	0,049	0,720
GPT (UI/L)	0,100	0,466
GGT (UI/L)	0,083	0,543
FA (UI/L)	-0,150	0,270
Urea (mg/dL)	0,013	0,926
Creatinina (mg/dL)	0,027	0,846
Proteínas Totales (g/dL)	-0,210	0,119
Hb (g/dL)	-0,263	0,059
HTO (%)	-0,233	0,083
Leucocitos (x 10 <sup>3</sup> /μL)	0,025	0,855
Neutrófilos (%)	-0,035	0,799
Plaquetas (x 10 <sup>3</sup> /μL)	-0,025	0,855
Índice de Quick (%)	-0,178	0,188
<b>Tiempo de Protombina (seg)</b>	<b>0,266</b>	<b>0,048</b>

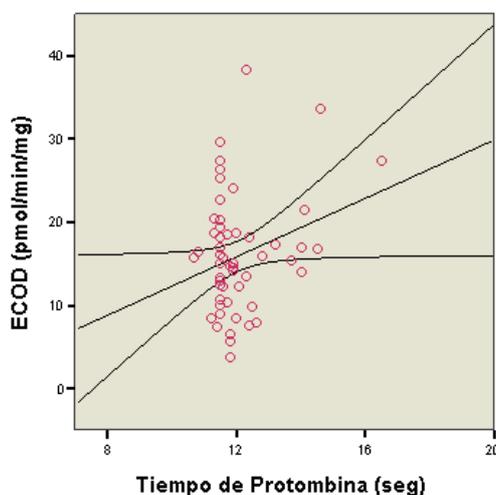
pmol/min/mg=picomoles/minuto/miligramo; mg/dL=miligramos/decilitro;  
 mEq/L=miliequivalentes/litro; UI/L=Unidades Internacionales/litro;  
 g/dL=gramos/decilitro; μL =microlitros; seg=segundos; ECOD=7-etoxicumarina O-  
 deetilasa; BR=Bilirrubina; GOT=transaminasa glutámico-oxalacética;  
 GPT=transaminasa glutámico-pirúvica; GGT=gamma glutamiltranspeptidasa;  
 FA=Fosfatasa Alcalina; Hb=Hemoglobina; HTO=Hematocrito.

**Tabla 50. Influencia de los parámetros analíticos en la actividad ECOD de los hepatocitos aislados de los DV (II).**

Actividad ECOD (pmol/min/mg) N=56		N	Media	p*
Glucosa (mg/dL)	<120	51	15,9	0,819 (t Student)
	≥120	5	16,7	
Sodio (mEq/L)	<160	56	16	n.a.
	≥160	0		
GGT Rangos (UI/L)	<55	38	16,31	0,876
	55-120	14	15,24	
	>120	4	15,32	
FA Rangos (UI/L)	<90	34	17,23	0,214
	90-150	13	13,31	
	>150	9	15,06	

\*=ANOVA; n.a.= no analizado; pmol/min/mg=picomoles/minuto/miligramo;  
mg/dL=miligramos/decilitro; mEq/L=miliequivalentes/litro; UI/L=Unidades  
Internacionales/litro; ECOD=7-etoxicumarina O-deetilasa;  
GGT=gammaglutamiltranspeptidasa; FA=Fosfatasa Alcalina.

**Figura 28. Influencia del Tiempo de Protrombina en la actividad ECOD de los hepatocitos aislados en los DV.**



- Variables relacionadas con la intervención quirúrgica:

Tampoco al analizar las variables relacionadas con la intervención quirúrgica de los DV se encontró influencia estadísticamente significativa de ninguna de ellas en la actividad ECOD de los hepatocitos aislados (Tablas 51 y 52).

**Tabla 51. Influencia de las variables relacionadas con la intervención quirúrgica en la actividad ECOD de los hepatocitos aislados de los DV (I).**

Actividad ECOD (pmol/min/mg) N=56		N	Media	p*
Indicación	Benigna	32	14,78	0,159
	Maligna	24	17,56	
Resección hepática	NO	39	16,55	0,336
	SI	17	14,63	
Metástasis hepáticas	NO	47	16,01	0,926
	SI	9	15,77	
Parada cardiaca	NO	56	15,97	n.a.
	SI	0		
Hipotensión prolongada	NO	56	15,97	n.a.
	SI	0		
Isquemia caliente	NO	47	16,25	0,514
	SI	9	14,52	
Tiempo Isquemia caliente (min)	<30	49	16,09	0,765
	≥30	7	15,13	
Tipo de isquemia caliente	Continua	5	15,89	0,651 (ANOVA)
	Intermitente	4	12,81	
	Ausente	47	16,25	

\*=t Student; pmol/min/mg=picomoles/minuto/miligramo; min=minutos; ECOD=7-etoxicumarina O-deetilasa; n.a.= no analizado.

**Tabla 52. Influencia de las variables relacionadas con la intervención quirúrgica en la actividad ECOD de los hepatocitos aislados de los DV (II).**

Actividad ECOD (pmol/min/mg) N=56	Coefficiente de correlación de Pearson	p
Tiempo de isquemia caliente (min)	-0,105	0,442

pmol/min/mg=picomoles/minuto/miligramo; min=minutos; ECOD=7-etoxicumarina O-deetilasa.

- Variables relacionadas con la biopsia:

De las variables analizadas relacionadas con la biopsia del DV, la presencia de esteatosis y que ésta presente un porcentaje entre el 30% y el 59%, influye de forma negativa en la actividad ECOD de los hepatocitos aislados, aunque sin ser el resultado estadísticamente significativo (Tablas 53 y 54).

**Tabla 53. Influencia de las variables relacionadas con la biopsia en la actividad ECOD de los hepatocitos aislados de los DV (I).**

Actividad ECOD (pmol/min/mg) N=56		N	Media	p*
Esteatosis	NO	46	16,63	0,062 (t Student)
	SI	10	12,91	
Esteatosis (%)	0-29	54	16,32	0,051
	30-59	2	6,50	
	≥60	0		

\*=ANOVA; pmol/min/mg=picomoles/minuto/miligramo; ECOD=7-etoxicumarina O-deetilasa.

**Tabla 54. Influencia de las variables relacionadas con la biopsia en la actividad ECOD de los hepatocitos aislados de los DV (II).**

Actividad ECOD (pmol/min/mg) N=56	Coefficiente de correlación de Pearson	p
Peso de la muestra (g)	-0,040	0,769

pmol/min/mg=picomoles/minuto/miligramo; g=gramos; ECOD=7-etoxicumarina O-deetilasa.

### - ANÁLISIS MULTIVARIANTE:

Las variables con valor pronóstico independiente en el análisis multivariante de la actividad ECOD en DV son el hematocrito y el sexo. A mayores cifras de hematocrito menor es la actividad ECOD del aislamiento, presentando las mujeres menor actividad ECOD en el aislamiento (Tabla 55).

**Tabla 55. Influencia de las variables de los DV en la actividad ECOD de los hepatocitos aislados. Modelo Lineal General.**

Actividad ECOD (pmol/min/mg)	B	Error típ.	t	gl	Sig.	I.C. al 95%.	
						Límite inferior	Límite superior
Intersección	26,951	15,834	1,702	1	0,095	-4,852	58,753
<b>HTO (%)</b>	-0,406	0,180	-2,255	1	<b>0,029</b>	-0,768	-0,044
Tiempo de Protombina (seg)	0,675	0,891	0,757	1	0,452	-1,115	2,466
<b>Sexo (Mujer)</b>	-8,871	4,284	-2,071	1	<b>0,044</b>	-17,475	-0,266
Esteatosis (NO)	0,085	3,271	0,026	1	0,979	-6,484	6,655

pmol/min/mg=picomoles/minuto/miligramo; ECOD=7-etoxicumarina O-deetilasa; Error típ=Error típico; gl=grados de libertad; Sig.=significación; I.C.=Intervalo de Confianza; HTO=Hematocrito.

#### IV.4.4. Actividad TESTOSTERONA-6- $\beta$ HIDROXILASA:

- Características clínicas y antecedentes personales de los donantes:

Al analizar la influencia de las características clínicas y antecedentes personales de los DV en la actividad testosterona-6- $\beta$  hidroxilasa, observamos que las mujeres, los donantes con menos peso y aquellos con menor estatura presentan mayor actividad testosterona-6- $\beta$  hidroxilasa en el aislamiento ( $p < 0,05$ ) (Tablas 56, 57 y Figura 29).

**Tabla 56. Influencia de las características clínicas y antecedentes personales en la actividad testosterona-6- $\beta$  hidroxilasa de los hepatocitos aislados de los DV (I).**

Actividad testosterona-6- $\beta$ hidroxilasa (pmol/min/mg) N=53		N	Media	p*
Sexo	Hombre	25	45,5	0,000
	Mujer	28	92,3	
Consumo de alcohol	NO	52	71,2	0,133
	SI	1	19,8	
Hipertensión Arterial	NO	42	64,4	0,167
	SI	11	92,7	
Diabetes Mellitus	NO	50	71	1,00
	SI	3	58,5	
Hipertrigliceridemia	NO	50	71,4	0,577
	SI	3	50,5	
Hipercolesterolemia	NO	50	71,2	0,484
	SI	3	47,1	
Medicación previa	NO	15	88,5	0,158
	SI	38	63	
QT preoperatoria	NO	49	68,1	0,239
	SI	4	97	
Transfusiones en las últimas 48 h	NO	44	68,8	0,554
	SI	9	77,3	

\*=U-Mann-Whitney; pmol/min/mg=picomoles/minuto/miligramo; h=horas;

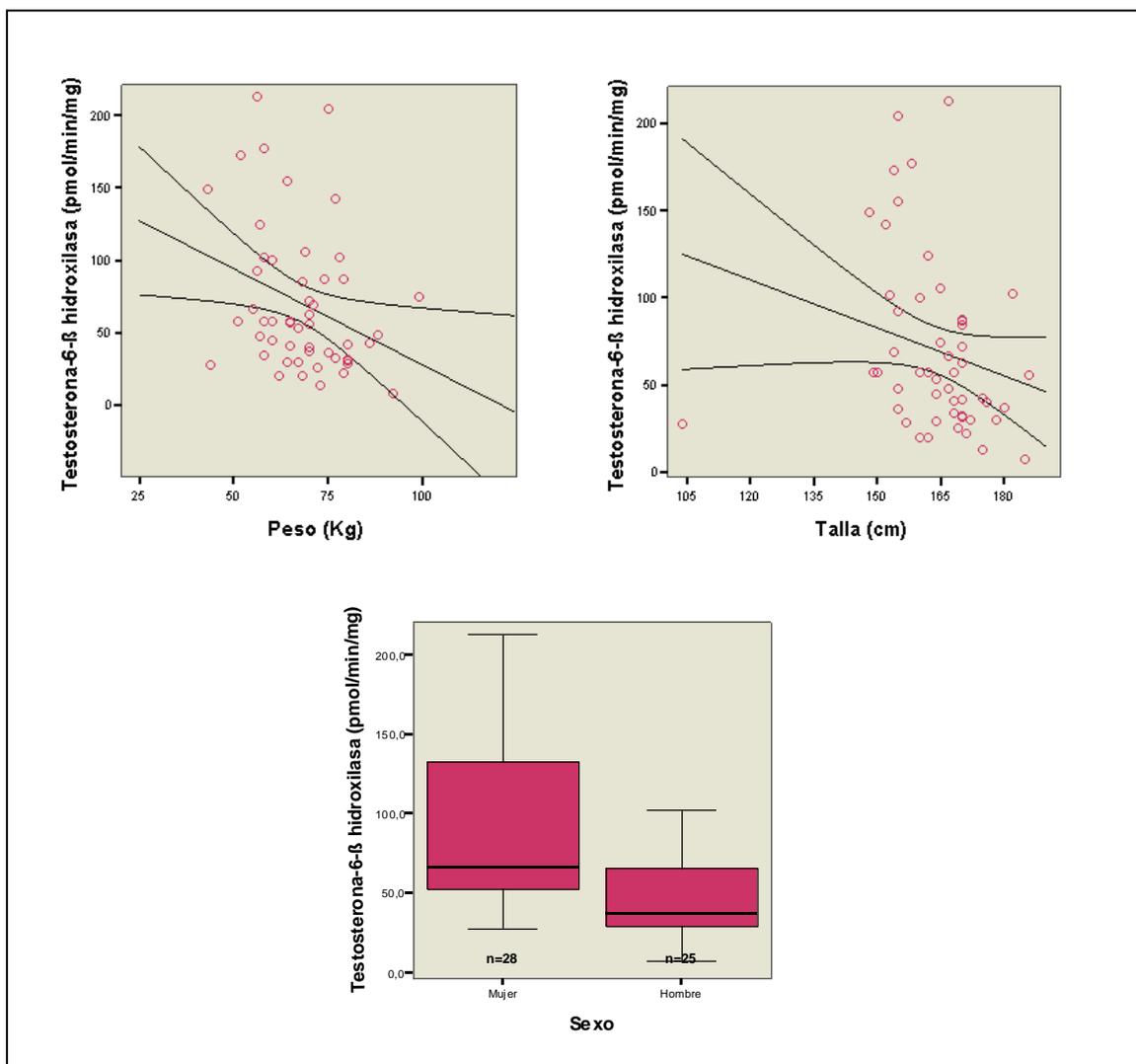
QT=Quimioterapia.

**Tabla 57. Influencia de las características clínicas y antecedentes personales en la actividad testosterona-6-β hidroxilasa de los hepatocitos aislados de los DV (II).**

Actividad testosterona-6-β hidroxilasa (pmol/min/mg) N=53	Coefficiente de correlación de Spearman	p
Edad (años)	-0,065	0,642
<b>Peso (Kg)</b>	<b>-0,340</b>	<b>0,013</b>
<b>Talla (cm)</b>	<b>-0,387</b>	<b>0,004</b>
IMC	-0,181	0,194

pmol/min/mg=picomoles/minuto/miligramo; Kg=kilogramos; cm=centímetros;  
IMC=Índice Masa Corporal.

**Figura 29. Influencia del Peso, la Talla y el Sexo en la actividad testosterona-6-β hidroxilasa de los hepatocitos aislados en los DV.**



- Parámetros analíticos:

En nuestro estudio observamos que a mayores valores en sangre de bilirrubina total, creatinina, hemoglobina y hematocrito, menor es la actividad testosterona-6- $\beta$  hidroxilasa del aislamiento ( $p < 0,05$ ). Si la GGT la dividimos en rangos, presentan mayor actividad testosterona-6- $\beta$  hidroxilasa en el aislamiento aquellos pacientes con cifras de GGT comprendidas entre 55 y 120 ( $p = 0,04$ ) (Tablas 58, 59 y Figuras 30-32).

**Tabla 58. Influencia de los parámetros analíticos en la actividad testosterona-6- $\beta$  hidroxilasa de los hepatocitos aislados de los DV (I).**

Actividad testosterona-6- $\beta$ hidroxilasa (pmol/min/mg) N=53	Coefficiente de correlación de Spearman	p
Glucosa (mg/dL)	-0,152	0,278
Sodio (mEq/L)	-0,268	0,052
Potasio (mEq/L)	0,022	0,877
<b>BR total (mg/dL)</b>	<b>-0,274</b>	<b>0,047</b>
GOT (UI/L)	0,175	0,210
GPT (UI/L)	0,152	0,278
GGT (UI/L)	0,095	0,497
FA (UI/L)	0,152	0,278
Urea (mg/dL)	-0,081	0,566
<b>Creatinina (mg/dL)</b>	<b>-0,414</b>	<b>0,002</b>
Proteínas Totales (g/dL)	-0,198	0,156
<b>Hb (g/dL)</b>	<b>-0,329</b>	<b>0,016</b>
<b>HTO (%)</b>	<b>-0,335</b>	<b>0,014</b>
Leucocitos ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	-0,005	0,970
Neutrófilos (%)	0,109	0,437
Plaquetas ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	0,140	0,317
Índice de Quick (%)	0,031	0,825
Tiempo de Protombina (seg)	-0,059	0,675

pmol/min/mg=picomoles/minuto/miligramo; mg/dL=miligramos/decilitro;

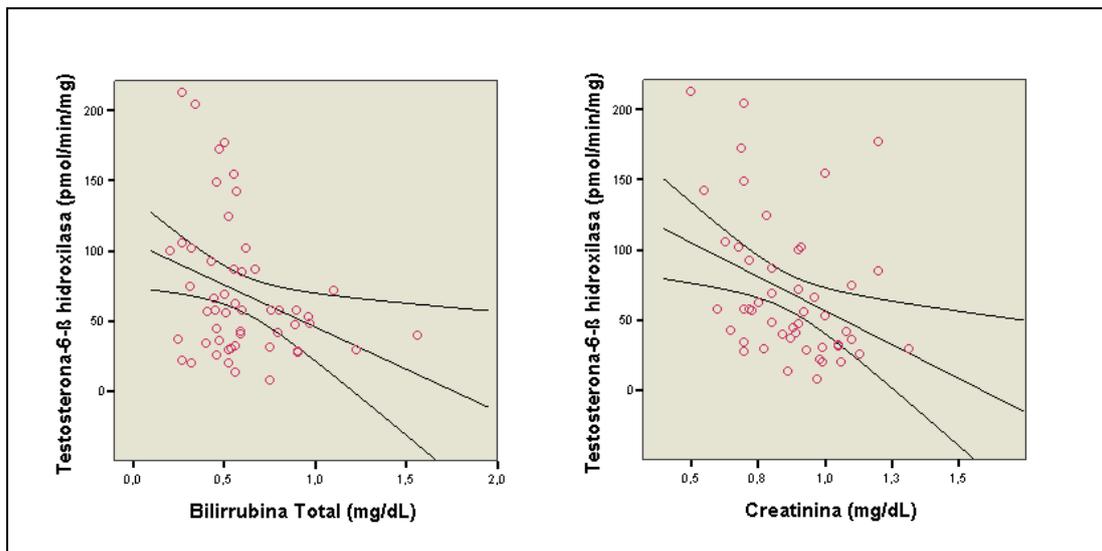
mEq/L=miliequivalentes/litro; UI/L=Unidades Internacionales/litro; g/dL=gramos/decilitro;

$\mu\text{L}$ =microlitros; seg=segundos; BR=Bilirrubina; GOT=transaminasa glutámico-oxalacética;

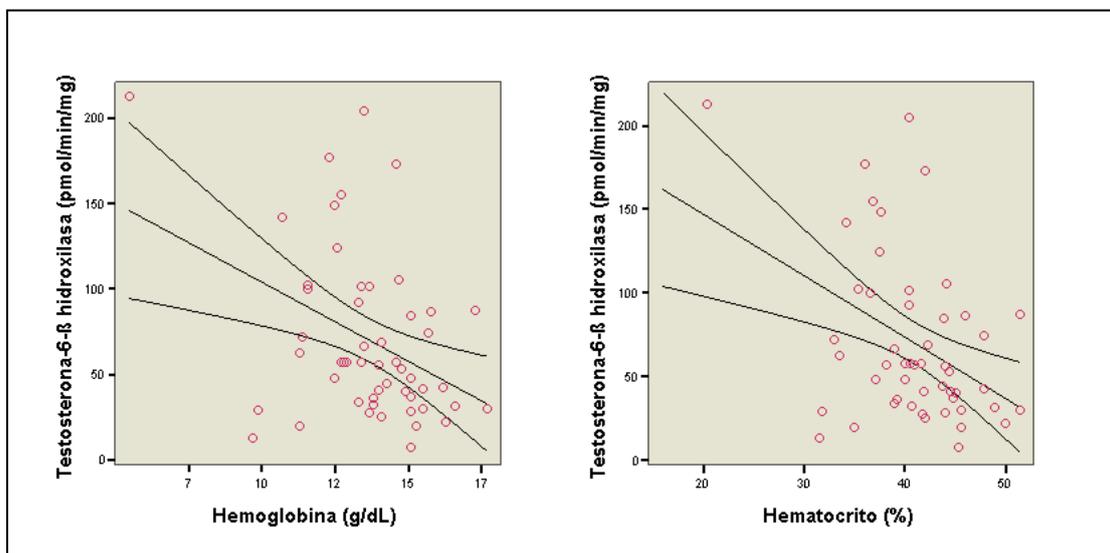
GPT=transaminasa glutámico-pirúvica; GGT=gammaglutamiltranspeptidasa; FA=Fosfatasa

Alcalina; Hb=Hemoglobina; HTO=Hematocrito.

**Figura 30. Influencia de la Bilirrubina Total y la Creatinina en la actividad testosterona-6- $\beta$  hidroxilasa de los hepatocitos aislados en los DV.**



**Figura 31. Influencia de la Hemoglobina y el Hematocrito en la actividad testosterona-6- $\beta$  hidroxilasa de los hepatocitos aislados en los DV.**

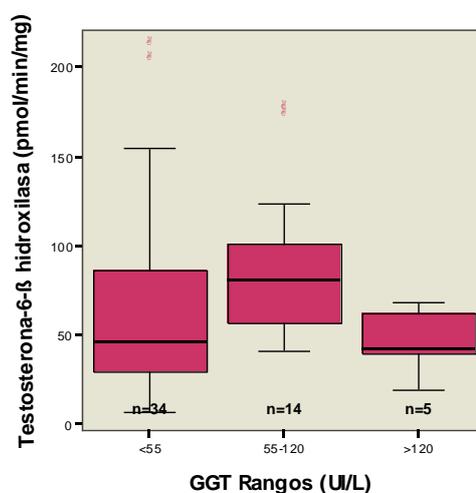


**Tabla 59. Influencia de los parámetros analíticos en la actividad testosterona-6-β hidroxilasa de los hepatocitos aislados de los DV (II).**

Actividad testosterona-6-β hidroxilasa (pmol/min/mg) N=53		N	Media	p*
Glucosa (mg/dL)	<120	49	70,7	0,775 (U-M-W)
	≥120	4	64,9	
Sodio (mEq/L)	<160	53	70,3	n.a.
	≥160	0	0	
GGT Rangos (UI/L)	<55	34	65,7	0,04
	55-120	14	89,8	
	>120	5	46,7	
FA Rangos (UI/L)	<90	31	64	0,275
	90-150	12	83	
	>150	10	74,4	

\*=Kruskal-Wallis; U-M-W=U-Mann-Whitney; n.a.=no analizado;  
 pmol/min/mg=picomoles/minuto/miligramo; mg/dL=miligramos/decilitro;  
 mEq/L=miliequivalentes/litro; UI/L=Unidades Internacionales/Litro;  
 GGT=gammaglutamiltranspeptidasa; FA=Fosfatasa Alcalina.

**Figura 32. Influencia de la GGT en Rangos en la actividad testosterona-6-β hidroxilasa de los hepatocitos aislados en los DV.**



- VARIABLES RELACIONADAS CON LA INTERVENCIÓN QUIRÚRGICA:

Los DV intervenidos por metástasis y a los que se ha realizado algún tipo de resección hepática (por patología benigna o maligna), presentan mayor actividad testosterona-6- $\beta$  hidroxilasa en el aislamiento ( $p < 0,05$ ) (Tablas 60, 61 y Figura 33).

**Tabla 60. Influencia de las variables relacionadas con la intervención quirúrgica en la actividad testosterona-6- $\beta$  hidroxilasa de los hepatocitos aislados de los DV (I).**

Actividad testosterona-6- $\beta$ hidroxilasa (pmol/min/mg) N=53		N	Media	p*
Indicación	Benigna	30	63,1	0,584
	Maligna	23	79,6	
Resección hepática	NO	33	57,4	<b>0,004</b>
	SI	20	91,5	
Metástasis hepáticas	NO	43	62,3	<b>0,036</b>
	SI	10	104,4	
Parada cardiaca	NO	53	70,3	n.a.
	SI	0		
Hipotensión prolongada	NO	53	70,3	n.a.
	SI	0		
Isquemia caliente	NO	44	66,3	0,222
	SI	9	89,5	
Tiempo Isquemia caliente (min)	<30	46	66,9	0,312
	$\geq$ 30	7	92,6	
Tipo de isquemia caliente	Continua	6	84,6	0,462 (K-W)
	Intermitente	3	99,2	
	Ausente	44	66,3	

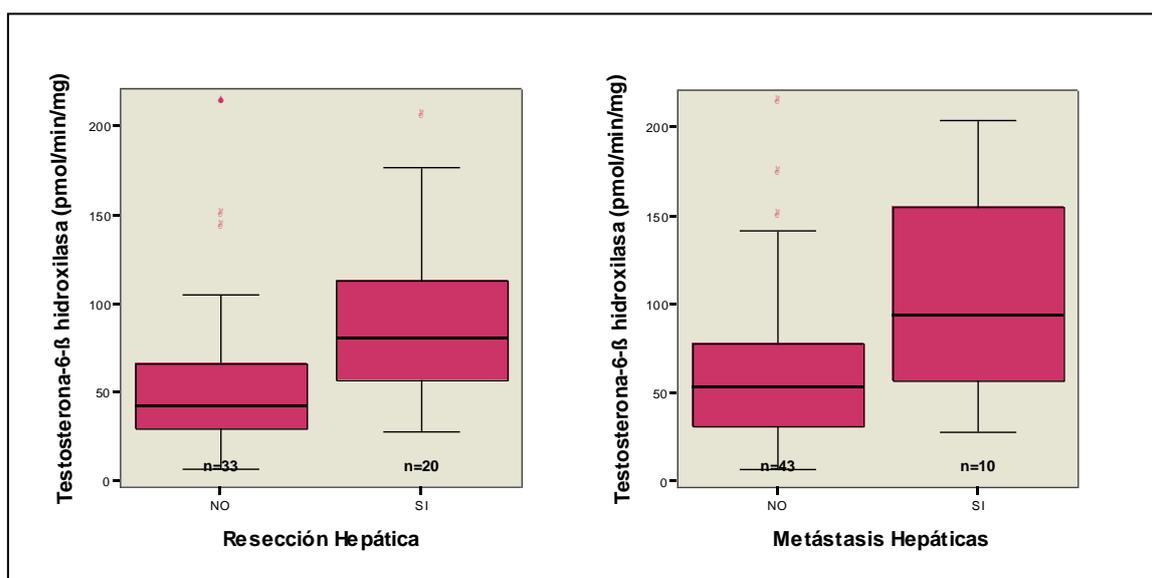
\*=U-Mann-Whitney; K-W=Kruskal Wallis; pmol/min/mg=picomoles/minuto/miligramo; min=minutos; n.a.=no analizado.

**Tabla 61. Influencia de las variables relacionadas con la intervención quirúrgica en la actividad testosterona-6-β hidroxilasa de los hepatocitos aislados de los DV (II).**

Actividad testosterona-6-β hidroxilasa (pmol/min/mg) N=53	Coefficiente de correlación de Spearman	p
Tiempo de isquemia caliente (min)	0,166	0,236

pmol/min/mg=picomoles/minuto/miligramo; min=minutos

**Figura 33. Influencia de la Resección Hepática y las Metástasis Hepáticas en la actividad testosterona-6-β hidroxilasa de los hepatocitos aislados en los DV.**



- Variables relacionadas con la biopsia:

El peso de la muestra influye en la actividad testosterona-6-β hidroxilasa, de modo que a mayor peso de la misma, mayor es la actividad de la enzima en el aislamiento ( $p < 0,05$ ) (Tablas 62, 63 y Figura 34).

**Tabla 62. Influencia de las variables relacionadas con la biopsia en la actividad testosterona-6-β hidroxilasa de los hepatocitos aislados de los DV (I).**

Actividad testosterona-6-β hidroxilasa (pmol/min/mg) N=53		N	Media	p*
Esteatosis	NO	43	66,5	0,351 (U-M-W)
	SI	10	86,3	
Esteatosis (%)	0-29	51	69,8	0,388
	30-59	2	81,4	
	≥60	0		

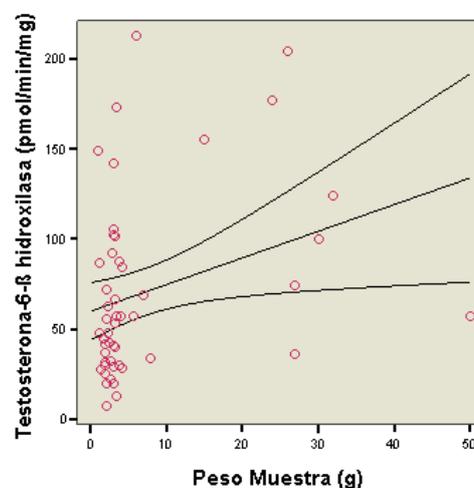
\*=Kruskal Wallis; U-M-W=U-Mann-Whitney; pmol/min/mg=picomoles/minuto/miligramo.

**Tabla 63. Influencia de las variables relacionadas con la biopsia en la actividad testosterona-6-β hidroxilasa de los hepatocitos aislados de los DV (II).**

Actividad testosterona-6-β hidroxilasa (pmol/min/mg) N=53	Coefficiente de correlación de Spearman	p
Peso de la muestra (g)	0,372	0,006

pmol/min/mg=picomoles/minuto/miligramo; g=gramos.

**Figura 34. Influencia del peso de la muestra en la actividad testosterona-6-β hidroxilasa de los hepatocitos aislados en los DV.**



### - ANÁLISIS MULTIVARIANTE:

La única variable con factor pronóstico independiente en el análisis multivariante de la actividad testosterona-6- $\beta$  hidroxilasa en los DV, es el hematocrito, que influye de forma negativa en su actividad. El resto pierde toda significación estadística en el análisis (Tabla 64).

**Tabla 64. Influencia de las variables de los DV en la actividad testosterona-6- $\beta$  hidroxilasa de los hepatocitos aislados. Modelo Lineal General.**

Actividad testosterona-6- $\beta$ hidroxilasa (pmol/min/mg)	B	Error típ.	t	gl	Sig.	I.C. al 95%.	
						Límite inferior	Límite superior
Intersección	215,220	55,090	3,907	1	0,000	104,262	326,177
BR Total (mg/dL)	-41,463	21,453	-1,933	1	0,060	-84,671	1,745
<b>HTO (%)</b>	-2,958	1,106	-2,674	1	<b>0,010</b>	-5,186	-0,730
Sexo (Mujer)	39,765	27,894	1,426	1	0,161	-16,417	95,946
Resección hepática (NO)	-73,709	41,449	-1,778	1	0,082	-157,192	9,774
Metástasis hepáticas (NO)	51,901	46,325	1,120	1	0,268	-41,402	145,205

pmol/min/mg=picomoles/minuto/miligramo; Error típ=Error típico; gl=grados de libertad; Sig.=significación; I.C.=Intervalo de Confianza; BR=Bilirrubina; HTO=Hematocrito.

#### IV.5. DONANTES CADÁVER: Identificación de las variables predictoras o independientes de los donantes que influyen en los resultados del aislamiento de los hepatocitos.

##### IV.5.1. VIABILIDAD:

- Características clínicas y antecedentes personales de los donantes:

De todos los parámetro analizados, se ha evidenciado que el tiempo en UCI influye de forma negativa en la viabilidad de los hepatocitos aislados, de manera que a mayor tiempo en UCI menor es la viabilidad en el aislamiento ( $p=0,013$ ). Podemos establecer un punto de corte en 72 horas en UCI, por encima de las cuales la viabilidad desciende del 76% al 50% ( $p=0,028$ ) (Tablas 65, 66 y Figura 35).

**Tabla 65. Influencia de las características clínicas y antecedentes personales en la viabilidad del aislamiento de hepatocitos de los DC (I).**

<b>Viabilidad (%) N=36</b>	<b>Coefficiente de correlación de Spearman</b>	<b>p</b>
Edad (años)	-0,065	0,707
Peso (Kg)	-0,112	0,515
Talla (cm)	-0,006	0,970
IMC	-0,236	0,165
<b>Tiempo en UCI (h)</b>	<b>-0,412</b>	<b>0,013</b>

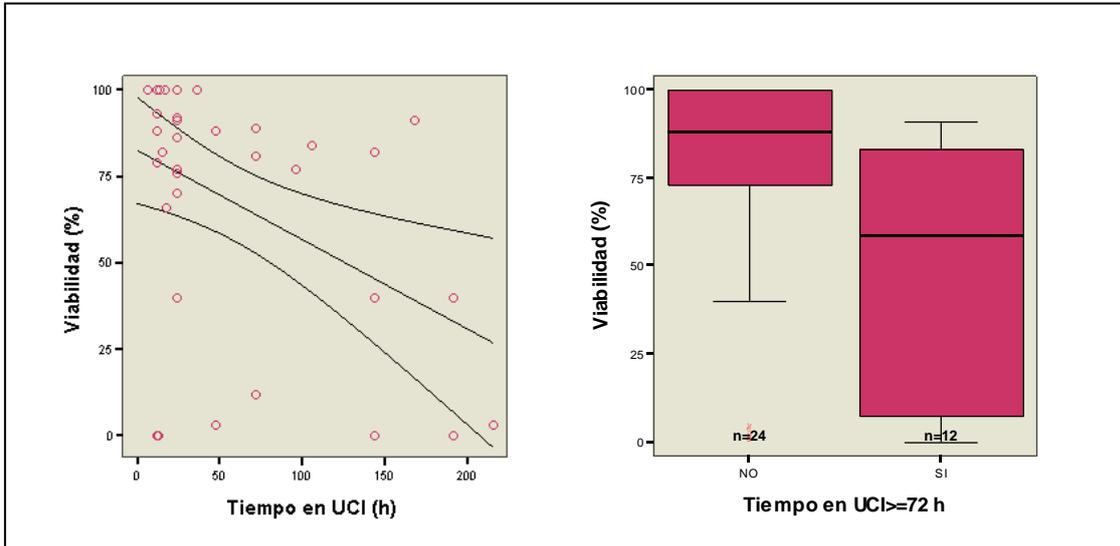
Kg=kilogramos; cm=centímetros; IMC=Índice Masa Corporal; h=horas;  
UCI=Unidad Cuidados Intensivos.

**Tabla 66. Influencia de las características clínicas y antecedentes personales en la viabilidad del aislamiento de hepatocitos de los DC (II).**

Viabilidad (%) N=36		N	Viabilidad media (%)	p*
Sexo	Hombre	24	69%	0,686
	Mujer	12	64%	
Consumo de alcohol	NO	32	67%	0,704
	SI	4	69%	
Hipertensión Arterial	NO	24	67%	0,723
	SI	12	68%	
Diabetes Mellitus	NO	33	67%	0,455
	SI	3	67%	
Hipertrigliceridemia	NO	33	64%	0,121
	SI	3	100%	
Hipercolesterolemia	NO	30	64%	0,130
	SI	6	84%	
Medicación previa	NO	25	64%	0,534
	SI	11	75%	
Antibióticos en UCI	NO	16	79%	0,087
	SI	20	57%	
<b>Tiempo en UCI h</b>	<72	24	76%	<b>0,028</b>
	≥72	12	50%	
Transfusiones en las últimas 48 h	NO	34	67%	0,835
	SI	2	77%	

\*=U-Mann-Whitney; h=horas; UCI=Unidad Cuidados Intensivos.

**Figura 35. Influencia del Tiempo en UCI en la viabilidad del aislamiento de hepatocitos en los DC.**



- Parámetros analíticos:

De todos los parámetros analíticos estudiados, ninguno influye de forma significativa en la viabilidad del aislamiento de los hepatocitos del DC (Tablas 67 y 68).

**Tabla 67. Influencia de los parámetros analíticos en la viabilidad del aislamiento de hepatocitos de los DC (I).**

<b>Viabilidad (%) N=36</b>	<b>Coefficiente de correlación de Spearman</b>	<b>p</b>
Glucosa (mg/dL)	-0,002	0,991
Sodio (mEq/L)	-0,249	0,143
Potasio (mEq/L)	-0,023	0,894
BR total (mg/dL)	-0,109	0,526
GOT (UI/L)	0,118	0,492
GPT (UI/L)	0,005	0,977
GGT (UI/L)	-0,013	0,940
FA (UI/L)	-0,013	0,940
Urea (mg/dL)	-0,198	0,248
Creatinina (mg/dL)	0,033	0,847
Proteínas Totales (g/dL)	-0,113	0,512
Hb (g/dL)	0,098	0,570
HTO (%)	0,131	0,448
Leucocitos (x 10 <sup>3</sup> /μL)	0,049	0,776
Neutrófilos (%)	-0,149	0,387
Plaquetas (x 10 <sup>3</sup> /μL)	0,122	0,479
Índice de Quick (%)	0,092	0,594
Tiempo de Protombina (seg)	-0,251	0,140

mg/dL=miligramos/decilitro; mEq/L=miliequivalentes/litro; UI/L=Unidades Internacionales/litro; g/dL=gramos/decilitro; μL=microlitros; seg=segundos; GOT=transaminasa glutámico-oxalacética; GPT=transaminasa glutámico-pirúvica; GGT=gammaglutamiltranspeptidasa; FA=Fosfatasa Alcalina; Hb=Hemoglobina; HTO=Hematocrito.

**Tabla 68. Influencia de los parámetros analíticos en la viabilidad del aislamiento de hepatocitos de los DC (II).**

Viabilidad (%) N=36		N	Media (%)	p*
Glucosa (mg/dL)	<120	3	88%	0,455
	≥120	33	65%	
Sodio (mEq/L)	<160	27	72%	0,147
	≥160	9	52%	
GGT Rangos (UI/L)	<55	31	68%	0,145 (K-W)
	55-120	3	39%	
	>120	2	92%	
FA Rangos (UI/L)	<90	11	65%	0,793 (K-W)
	90-150	23	69%	
	>150	2	56%	

\*=U-Mann-Whitney; K-W=Kruskal-Wallis; mg/dL=miligramos/decilitro;

mEq/L=miliequivalentes/litro; UI/L=Unidades Internacionales/litro;

GGT=gammaglutamiltranspeptidasa; FA=Fosfatasa Alcalina.

- Variables relacionadas con el proceso de extracción hepática:

La viabilidad de los hepatocitos humanos aislados procedentes de biopsias obtenidas de DC se ve influenciada de forma negativa por el tiempo de isquemia fría, de modo que cuanto mayor es el tiempo de isquemia fría, menor es la viabilidad de los hepatocitos aislados ( $p=0,001$ ). Aquellas biopsias con un tiempo de isquemia fría superior o igual a 700 minutos presentan una viabilidad media de 53% frente al 85% que tienen aquellas con tiempos de isquemia fría inferiores a 700 minutos ( $p=0,000$ ). Sin embargo, observamos que al dividir el tiempo de isquemia fría en rangos, la viabilidad es mayor (85%) en aquellas biopsias con tiempos de isquemia fría comprendidos entre 300 y 699 minutos ( $p=0,005$ ). En cuanto al líquido de perfusión utilizado, tienen mayor viabilidad las biopsias perfundidas con solución de Celsior aunque el resultado no alcanza la significación estadística (Tablas 69-71 y Figura 36).

**Tabla 69. Influencia de las variables relacionadas con el proceso de extracción hepática en la viabilidad del aislamiento de hepatocitos de los DC (I).**

Viabilidad (%) N=36		N	Viabilidad media (%)	p*
Parada cardiaca	NO	33	65%	0,238
	SI	3	91%	
Hipotensión prolongada	NO	30	69%	0,749
	SI	6	60%	

\*=U-Mann-Whitney.

**Tabla 70. Influencia del tiempo de isquemia fría en la viabilidad del aislamiento de hepatocitos de los DC.**

Viabilidad (%) N=36	Coefficiente de correlación de Spearman	p
Tiempo isquemia fría (min)	<b>-0,544</b>	<b>0,001</b>

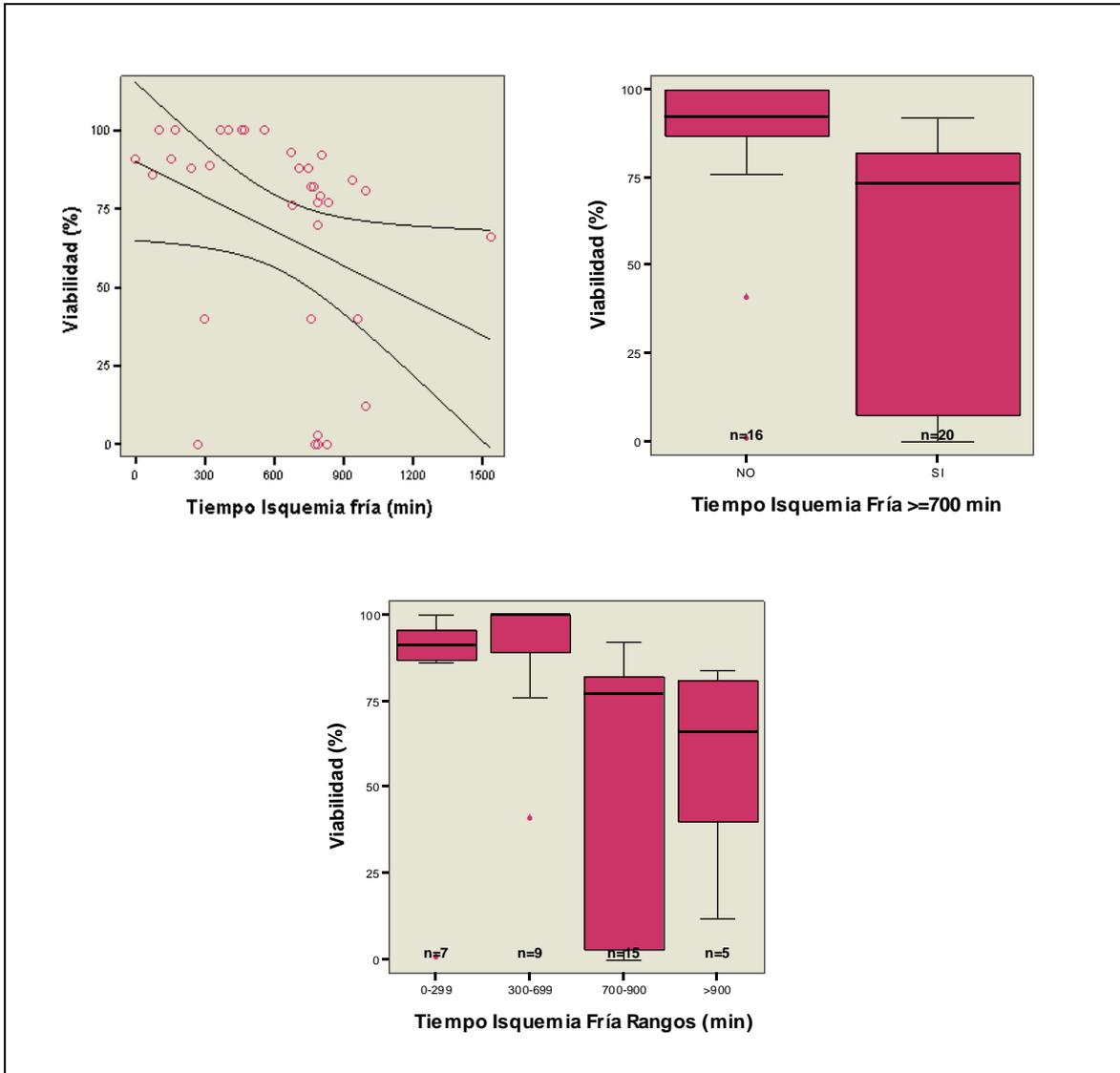
min=minutos.

**Tabla 71. Influencia de las variables relacionadas con el proceso de extracción hepática en la viabilidad del aislamiento de hepatocitos de los DC (II).**

Viabilidad (%) N=36		N	Viabilidad media (%)	p*
<b>Tiempo Isquemia fría (min)</b>	<700	16	85%	<b>0,000</b>
	≥700	20	53%	
Tiempo Isquemia fría (min)	<900	31	69%	0,207
	≥900	5	57%	
<b>Tiempo isquemia fría Rangos (min)</b>	0-299	7	79%	<b>0,005</b> (K-W)
	<b>300-699</b>	9	88%	
	700-900	15	52%	
	>900	5	56%	
Líquido de perfusión	Wisconsin	19	53%	0,181
	Celsior	17	83%	

\*= U Mann Whitney; K-W=Kruskal-Wallis; min=minutos.

**Figura 36. Influencia del Tiempo de Isquemia fría en la viabilidad del aislamiento de hepatocitos en los DC.**



- VARIABLES RELACIONADAS CON LA BIOPSIA:

Ni la esteatosis ni el peso de la biopsia influyen de forma significativa en la viabilidad del aislamiento de los DC (Tablas 72 y 73).

**Tabla 72. Influencia de las variables relacionadas con la biopsia en la viabilidad del aislamiento de hepatocitos de los DC (I).**

Viabilidad (%) N=36		N	Viabilidad media (%)	p*
Esteatosis	NO	23	71%	0,289
	SI	13	60%	
Esteatosis (%)	0-29	33	68%	0,388 (K-W)
	30-59	3	54%	
	≥60	0		

\*=U-Mann-Whitney; K.W=Kruskal-Wallis.

**Tabla 73. Influencia de las variables relacionadas con la biopsia en la viabilidad del aislamiento de hepatocitos de los DC (II).**

Viabilidad (%) N=36	Coefficiente de correlación de Spearman	p
Peso de la muestra (g)	-0,034	0,846

g=gramos.

## - ANÁLISIS MULTIVARIANTE:

Las variables con valor pronóstico independiente en el análisis de la viabilidad en los DC son: el líquido de perfusión y el tiempo de isquemia fría. Al utilizar solución de preservación tipo Celsior y con tiempos de isquemia fría menores, la viabilidad en el aislamiento es mayor ( $p=0,042$  y  $p=0,038$  respectivamente) (Tabla 74).

**Tabla 74. Influencia de las variables de los DC en la viabilidad del aislamiento de hepatocitos. Modelo Lineal General.**

Viabilidad (%)	B	Error típ.	t	gl	Sig.	I.C. al 95%.	
						Límite inferior	Límite superior
Intersección	87,048	13,201	6,594	1	0,000	60,160	113,937
Tiempo en UCI (h)	-0,165	0,089	-1,861	1	0,072	-0,346	0,016
<b>Tiempo Isquemia fría (min)</b>	-0,034	0,016	-2,159	1	<b>0,038</b>	-0,065	-0,002
<b>Líquido perfusión (Celsior)</b>	22,854	10,793	2,118	1	<b>0,042</b>	0,870	44,838

h=horas; min=minutos; Error típ.=Error típico; gl=grados de libertad; Sig.=significación; I.C.=Intervalo de Confianza; UCI=Unidad Cuidados Intensivos.

➤ Del mismo modo que en los DV, en los DC también podría considerarse un buen aislamiento aquel cuyos hepatocitos tengan una **viabilidad superior o igual al 70%**. Existen algunas variables de los DC que se relacionan con una viabilidad  $\geq 70\%$  del aislamiento. Observamos que el tiempo de isquemia fría influye negativamente en el aislamiento, de manera que el tiempo medio de isquemia fría en aquellas biopsias con viabilidad  $\geq 70\%$  es de 544,20 minutos, frente a los 799,55 minutos de las biopsias con viabilidad  $< 70\%$  ( $p=0,044$ ). De las biopsias perfundidas con Celsior, el 94,1% presentan una viabilidad  $\geq 70\%$  ( $p=0,02$ ). El resto de variables fueron analizadas pero obtuvieron una significación estadística por encima de 0,1 (Tablas 75 y 76). Las variables estadísticamente significativas en el análisis realizado se reflejan en la Figura 37.

**Tabla 75. Variables que influyen en la viabilidad  $\geq 70\%$  del aislamiento de los hepatocitos en los DC (I).**

<b>N=36</b>	<b>Viabilidad <math>\geq 70\%</math></b>	<b>N</b>	<b>Media</b>	<b>Desviación típica</b>	<b>p*</b>
Sodio (mEq/L)	NO	11	154,08	13,61	0,099
	SI	25	146,06	10,03	
<b>Tiempo isquemia fría (min)</b>	NO	11	799,55	337,36	<b>0,044</b>
	SI	25	544,20	295,68	
Tiempo UCI (h)	NO	11	97,73	80,93	0,062
	SI	25	42,56	43,68	(U-M-W)

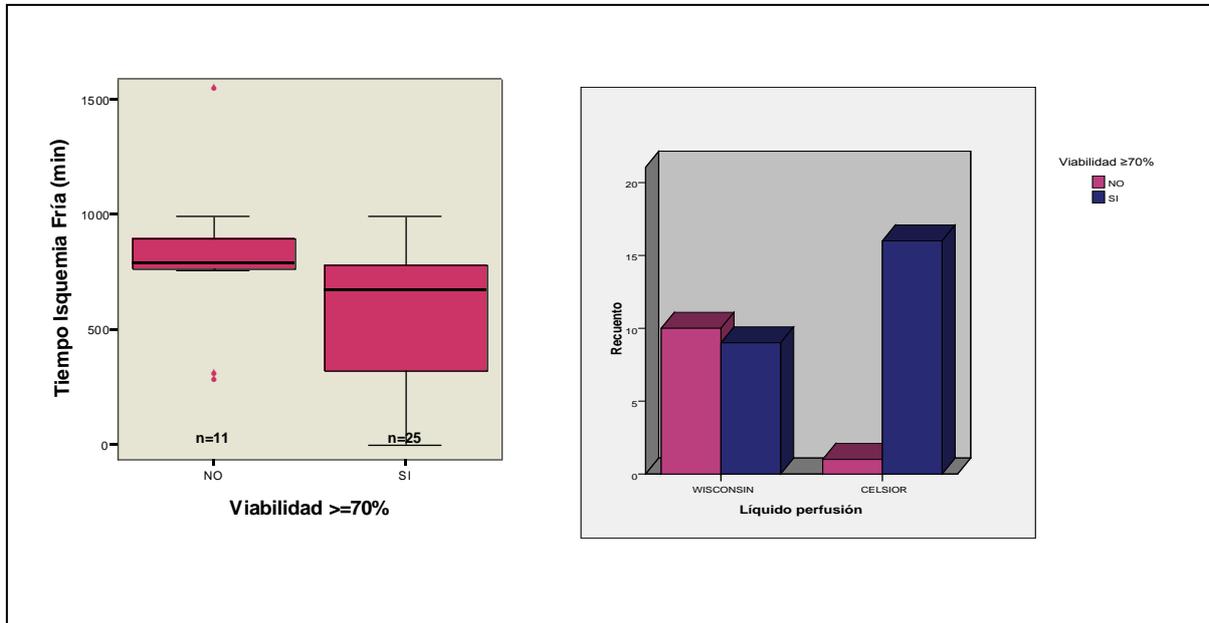
\*=t Student; U-M-W=U-Mann-Whitney; mEq/L=miliequivalentes/litro; min=minutos; h=horas; UCI=Unidad Cuidados intensivos.

**Tabla 76. Variables que influyen en la viabilidad  $\geq 70\%$  del aislamiento de los hepatocitos en los DC (II).**

<b>N=36</b>			<b>Viabilidad</b>		<b>p*</b>
			<b>&lt;70%</b>	<b><math>\geq 70\%</math></b>	
		<b>N (%)</b>	<b>N (%)</b>		
Sodio (mEq/L)	<160	N=27	6 (22,2%)	21 (77,8%)	0,096
	$\geq 160$	N=9	5 (55,6%)	4 (44,4%)	
Tiempo Isquemia fría (min)	<700	N=16	2 (12,5%)	14 (87,5%)	0,067
	$\geq 700$	N=20	9 (45,0%)	11 (55,0%)	
<b>Líquido perfusión</b>	Wisconsin	N=19	10 (52,6%)	9 (47,4%)	<b>0,002</b>
	<b>Celsior</b>	N=17	1 (5,9%)	16 (94,1%)	

\*=  $\chi^2$  (Chi Cuadrado); mEq/L=miliequivalentes/litro; min=minutos.

**Figura 37. Influencia del Tiempo de Isquemia fría y el Líquido de perfusión en la viabilidad  $\geq 70\%$  del aislamiento de hepatocitos en los DC.**



### - ANÁLISIS MULTIVARIANTE:

Las variables con valor pronóstico independiente al analizar la viabilidad  $\geq 70\%$  son: el líquido de perfusión y el tiempo de isquemia fría. Empleando líquido de perfusión tipo Wisconsin se obtienen viabilidades en el aislamiento por debajo del 70% y con el líquido de perfusión Celsior se obtienen viabilidades superiores al 70% ( $p=0,010$ ). A medida que aumenta el tiempo de isquemia fría, la viabilidad descende por debajo del 70% ( $p=0,030$ ) (Tabla 77).

**Tabla 77. Influencia de las variables de los DC en la viabilidad  $\geq 70\%$  del aislamiento de los hepatocitos. Modelo de Regresión Logística.**

#### VARIABLES DE LA ECUACIÓN.

Viabilidad $\geq 70\%$	B	E.T.	Wald	gl	Sig.	Exp(B)	I.C. 95,0% para EXP(B)	
							Inferior	Superior
Sodio(mEq/L)	-0,079	0,052	2,282	1	0,131	0,924	0,835	1,024
Tiempo isquemia fría (min)	-0,004	0,002	4,705	1	<b>0,030</b>	0,996	0,992	1,000
Líquido perfusión (Celsior)	3,272	1,277	6,561	1	<b>0,010</b>	26,360	2,156	322,253
Constante	14,199	8,147	3,038	1	0,081	1467529,576		

mEq/L=miliequivalentes/litro; min=minutos; E.T=Error Típico; gl=grados de libertad; Sig.=significación; Exp=Exponencial; I.C.=Intervalo Confianza; UCI=Unidad Cuidados Intensivos.

#### IV.5.2. RENDIMIENTO:

- Características clínicas y antecedentes personales de los donantes:

Ninguna de las variables analizadas influye de manera significativa en el rendimiento de los hepatocitos recién aislados (Tablas 78 y 79).

**Tabla 78. Influencia de las características clínicas y antecedentes personales en el rendimiento del aislamiento de hepatocitos de los DC (I).**

Rendimiento (cel/g x10 <sup>6</sup> ) N=36		N	Media	p*
Sexo	Hombre	24	7,84	0,246
	Mujer	12	5,56	
Consumo de alcohol	NO	32	6,94	0,769
	SI	4	8,16	
Hipertensión Arterial	NO	24	7,51	0,517
	SI	12	6,21	
Diabetes Mellitus	NO	33	7,32	0,327
	SI	3	4,44	
Hipertrigliceridemia	NO	33	7,17	0,773
	SI	3	6,11	
Hipercolesterolemia	NO	30	7,00	0,852
	SI	6	7,47	
Medicación previa	NO	25	7,28	0,732
	SI	11	6,61	
Antibióticos en UCI	NO	16	9,29	0,052
	SI	20	5,31	
Tiempo en UCI h	<72	24	7,77	0,347
	≥72	12	5,70	
Transfusiones en las últimas 48 h	NO	34	7,16	0,578
	SI	2	5,77	

\*=t Student; cel/g=células/gramo; h=horas; UCI=Unidad Cuidados Intensivos.

**Tabla 79. Influencia de las características clínicas y antecedentes personales en el rendimiento del aislamiento de hepatocitos de los DC (II).**

<b>Rendimiento (cel/g x10<sup>6</sup>) N=36</b>	<b>Coefficiente de correlación de Pearson</b>	<b>p</b>
Edad (años)	-0,156	0,363
Peso (Kg)	-0,158	0,358
Talla (cm)	-0,090	0,601
IMC	-0,220	0,196
Tiempo en UCI (h)	-0,273	0,108

cel/g=células/gramo; Kg=kilogramos; cm=centímetros; h=horas;  
IMC=Índice Masa Corporal; UCI=Unidad Cuidados Intensivos.

- Parámetros analíticos:

El rendimiento del aislamiento de los hepatocitos humanos a partir de biopsias obtenidas de DC se ve influenciado de forma negativa por las cifras de sodio y de neutrófilos, de manera que a medida que aumentan los valores séricos de ambos, menor es el rendimiento en el aislamiento ( $p=0,032$  y  $p=0,008$  respectivamente). Podemos establecer un punto de corte tanto en los valores de glucemia en sangre como en los valores de sodio, de modo que los donantes con glucemias  $\geq 120$  mg/dL y con cifras de sodio  $\geq 160$  mEq/L, presentan también menor rendimiento en el aislamiento ( $p=0,006$  y  $p=0,053$ ) (Tablas 80, 81 y Figuras 38 y 39).

**Tabla 80. Influencia de los parámetros analíticos en el rendimiento del aislamiento de hepatocitos de los DC (I).**

<b>Rendimiento (cel/g x10<sup>6</sup>) N=36</b>	<b>Coefficiente de correlación de Pearson</b>	<b>p</b>
Glucosa (mg/dL)	-0,139	0,420
<b>Sodio (mEq/L)</b>	<b>-0,358</b>	<b>0,032</b>
Potasio (mEq/L)	-0,159	0,354
BR total (mg/dL)	0,033	0,847
GOT (UI/L)	0,129	0,454
GPT (UI/L)	0,082	0,634
GGT (UI/L)	-0,108	0,532
FA (UI/L)	-0,133	0,438
Urea (mg/dL)	0,024	0,890
Creatinina (mg/dL)	0,242	0,155
Proteínas Totales (g/dL)	-0,243	0,154
Hb (g/dL)	-0,144	0,404
HTO (%)	-0,191	0,265
Leucocitos (x 10 <sup>3</sup> /μL)	-0,176	0,304
<b>Neutrófilos (%)</b>	<b>-0,433</b>	<b>0,008</b>
Plaquetas (x 10 <sup>3</sup> /μL)	0,002	0,989
Índice de Quick (%)	0,112	0,514
Tiempo de Protombina (seg)	-0,160	0,351

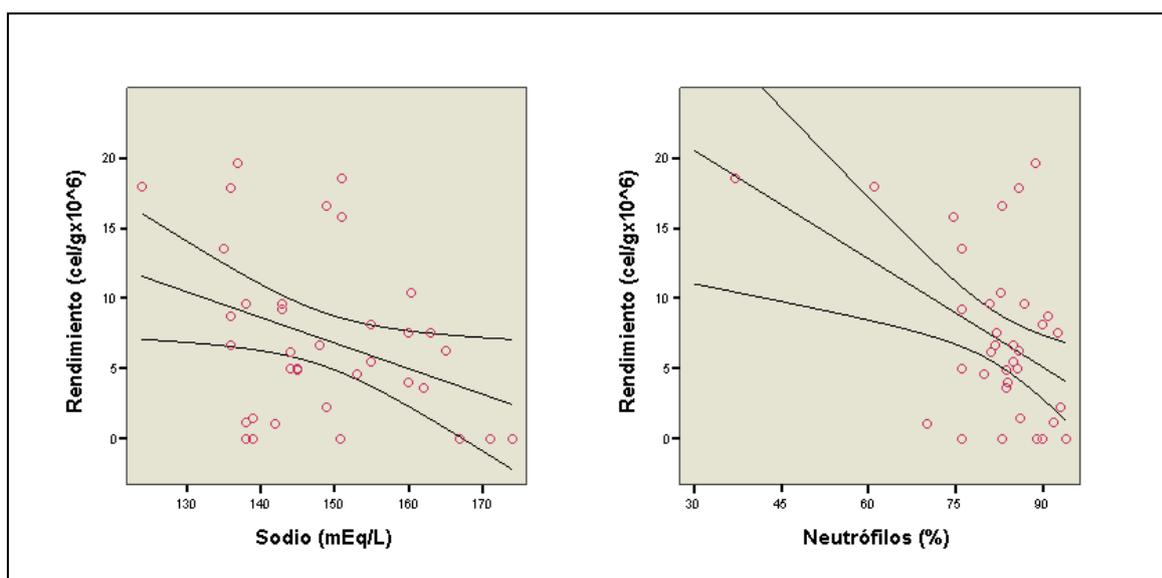
cel/g=células/gramo; mg/dL=miligramos/decilitro; mEq/L=miliequivalentes/litro; UI/L=Unidades Internacionales/litro; g/dL=gramos/decilitro; μL=microlitros; seg=segundos; BR=Bilirrubina; GOT=transaminasa glutámico-oxalacética; GPT=transaminasa glutámico-pirúvica; GGT=gammaglutamiltranspeptidasa; FA=Fosfatasa Alcalina; Hb=Hemoglobina; HTO=Hematocrito.

**Tabla 81. Influencia de los parámetros analíticos en el rendimiento del aislamiento de hepatocitos de los DC (II).**

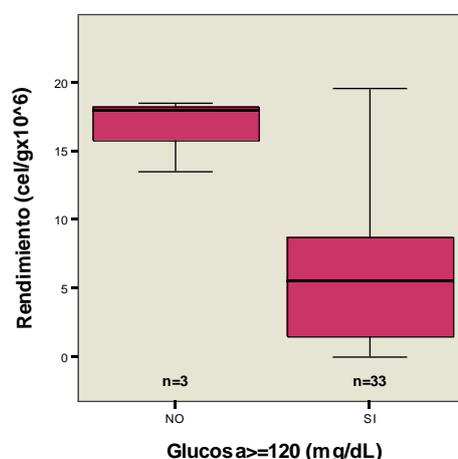
Rendimiento (cel/g x10 <sup>6</sup> ) N=36		N	Media	p*
Glucosa (mg/dL)	<120	3	16,69	<b>0,006</b>
	≥120	33	6,20	
Sodio (mEq/L)	<160	27	7,98	0,053
	≥160	9	4,37	
GGT Rangos (UI/L)	<55	31	7,68	0,289 (ANOVA)
	55-120	3	2,28	
	>120	2	4,92	
FA Rangos (UI/L)	<90	11	5,63	0,327 (ANOVA)
	90-150	23	8,12	
	>150	2	3,04	

\*=t Student; cel/g=células/gramo; mg/dL=miligramos/decilitro;  
mEq/L=miliequivalentes/litro; UI/L=Unidades Internacionales/litro;  
GGT=gammaglutamiltranspeptidasa; FA=Fosfatasa Alcalina.

**Figura 38. Influencia del Sodio y los Neutrófilos en el rendimiento del aislamiento de hepatocitos en los DC.**



**Figura 39. Influencia de la Glucosa  $\geq 120$  en el rendimiento del aislamiento de hepatocitos en los DC.**



- VARIABLES RELACIONADAS CON EL PROCESO DE EXTRACCIÓN HEPÁTICA:

El rendimiento del aislamiento de los hepatocitos humanos, a partir de biopsias obtenidas de DC, se ve influenciado negativamente por el tiempo de isquemia fría. Aquellas biopsias con isquemias  $\geq 700$  minutos presentan un rendimiento medio de  $4,88 \text{ cel/g} \times 10^6$ , frente a  $9,83 \text{ cel/g} \times 10^6$  que se obtienen de aquellas con tiempos de isquemia fría  $< 700$  minutos ( $p=0,013$ ). Sin embargo, si dividimos el tiempo de isquemia fría en rangos, observamos que presentan mayor rendimiento ( $11,73 \text{ cel/g} \times 10^6$ ) aquellas biopsias con tiempos de isquemia comprendidos entre 300 y 699 minutos ( $p=0,031$ ). En cuanto al líquido de preservación utilizado, observamos que el rendimiento es mayor en las biopsias perfundidas con solución de Celsior, aunque el resultado no alcanza la significación estadística. Los resultados se recogen en las Tablas 82-84 y la Figura 40.

**Tabla 82. Influencia de las variables relacionadas con la extracción hepática en el rendimiento del aislamiento de hepatocitos de los DC (I).**

Rendimiento (cel/g x10 <sup>6</sup> ) N=36		N	Media	p*
Parada cardiaca	NO	33	6,79	0,491
	SI	3	10,30	
Hipotensión prolongada	NO	30	7,45	0,319
	SI	6	5,24	

\*=t Student; cel/g=células/gramo.

**Tabla 83. Influencia del tiempo de isquemia fría en el rendimiento del aislamiento de hepatocitos de los DC.**

Rendimiento (cel/g x10 <sup>6</sup> ) N=36	Coefficiente de correlación de Pearson	p
Tiempo isquemia fría (min)	-0,265	0,118

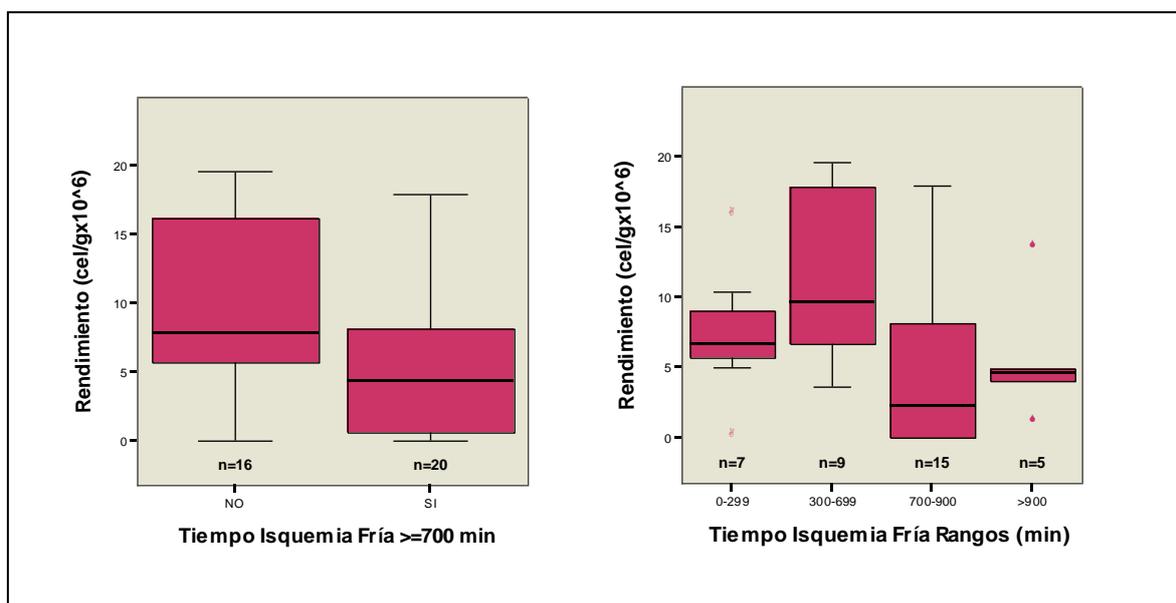
cel/g=células/gramo; min=minutos

**Tabla 84. Influencia de las variables relacionadas con la extracción hepática en el rendimiento del aislamiento de hepatocitos de los DC (II).**

Rendimiento (cel/g x10 <sup>6</sup> ) N=36		N	Media	p*
<b>Tiempo Isquemia fría (min)</b>	<700	16	9,83	<b>0,013</b>
	≥700	20	4,88	
Tiempo Isquemia fría (min)	<900	31	7,32	0,497
	≥900	5	5,61	
<b>Tiempo isquemia fría Rangos (min)</b>	0-299	7	7,38	<b>0,031</b> (ANOVA)
	<b>300-699</b>	9	11,73	
	700-900	15	4,64	
	>900	5	5,61	
Líquido de perfusión	Wisconsin	19	6,26	0,381
	Celsior	17	8,00	

\*= t Student; cel/g=células/gramo; min=minutos.

**Figura 40. Influencia del Tiempo de Isquemia fría en el rendimiento del aislamiento de hepatocitos en los DC.**



- Variables relacionadas con la biopsia:

De las variables relacionadas con la biopsia, la única que influye de forma significativa en el rendimiento del aislamiento es el peso de la misma, y lo hace forma positiva, es decir, a medida que aumenta el peso de la muestra, aumenta el rendimiento del aislamiento (Tablas 85, 86 y Figura 41).

**Tabla 85. Influencia de las variables relacionadas con la biopsia en el rendimiento del aislamiento de hepatocitos de los DC (I).**

Rendimiento (cel/g x10 <sup>6</sup> )		N	Media	p*
N=36				
Esteatosis	NO	23	8,40	0,065 (t Student)
	SI	13	4,73	
Esteatosis (%)	0-29	33	7,36	0,349
	30-59	3	3,95	
	≥60	0		

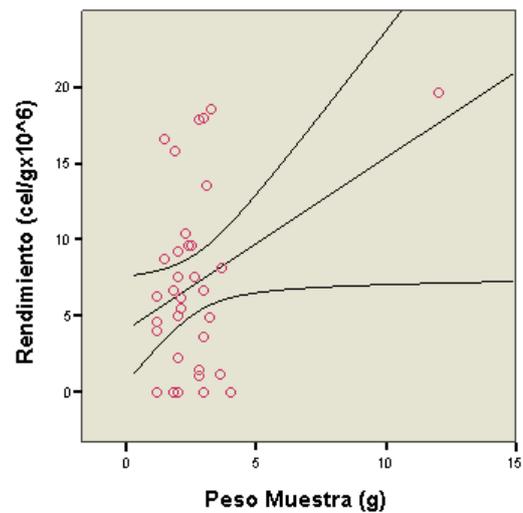
\*=ANOVA; cel/g=células/gramo.

**Tabla 86. Influencia de las variables relacionadas con la biopsia en el rendimiento del aislamiento de hepatocitos de los DC (II).**

Rendimiento (cel/g x10 <sup>6</sup> ) N=36	Coefficiente de correlación de Pearson	P
Peso de la muestra (g)	0,335	0,045

cel/g=células/gramo; g=gramos.

**Figura 41. Influencia del Peso de la muestra en el rendimiento del aislamiento de hepatocitos en los DC.**



### - ANÁLISIS MULTIVARIANTE:

Las variables con valor pronóstico independiente en el análisis son: los valores de sodio, el porcentaje de neutrófilos y el tiempo de isquemia fría, de forma que a mayores valores de sodio, mayor porcentaje de neutrófilos en sangre y mayor tiempo de isquemia fría, menor es el rendimiento del aislamiento ( $p < 0,05$ ) (Tabla 87).

**Tabla 87. Influencia de las variables de los DC en el rendimiento del aislamiento de hepatocitos. Modelo Lineal General.**

Rendimiento (cel/g x10 <sup>6</sup> )	B	Error típ.	t	gl	Sig.	I.C. al 95%.	
						Límite inferior	Límite superior
Intersección	55,540	11,974	4,638	1	0,000	31,149	79,931
<b>Sodio (mEq/L)</b>	-0,167	0,071	-2,343	1	<b>0,025</b>	-0,311	-0,022
<b>Neutrófilos (%)</b>	-0,244	0,080	-3,056	1	<b>0,005</b>	-0,407	-0,081
<b>Tiempo Isquemia fría (min)</b>	-0,006	0,003	-2,301	1	<b>0,028</b>	-0,011	-0,001

cel/g=células/gramo; mEq/L=miliequivalentes/litro; min=minutos; Error típ=Error típico; ; gl=grados de libertad; Sig=significación; I.C.=Intervalo de Confianza.

#### IV.5.3. Actividad ECOD (7-etoxicumarina O-deetilasa):

- Características clínicas y antecedentes personales de los DC:

Ninguna de las características clínicas y antecedentes personales de los DC influyen de forma significativa en la actividad ECOD de los hepatocitos aislados (Tablas 88 y 89).

**Tabla 88. Influencia de las características clínicas y antecedentes personales en la actividad ECOD de los hepatocitos aislados de los DC (I).**

Actividad ECOD (pmol/min/mg) N=11		N	Media	p*
Sexo	Hombre	5	16,89	0,287
	Mujer	6	9,03	
Consumo de alcohol	NO	9	14,08	0,167
	SI	2	5,95	
Hipertensión Arterial	NO	6	13,68	0,773
	SI	5	11,31	
Diabetes Mellitus	NO	10	13,58	0,410
	SI	1	2,90	
Hipertrigliceridemia	NO	10	13,58	0,410
	SI	1	2,90	
Hipercolesterolemia	NO	8	15,22	0,084
	SI	3	5,64	
Medicación previa	NO	7	17,38	0,068
	SI	4	4,25	
Antibióticos en UCI	NO	7	8,48	0,124
	SI	4	19,83	
Tiempo en UCI h	<72	9	9,95	0,111
	≥72	2	24,55	
Transfusiones en las últimas 48 h	NO	10	12,70	0,939
	SI	1	11,69	

\*=t-Student; pmol/min/mg=picomoles/minuto/miligramo; h=horas; ECOD=7-etoxicumarina O-deetilasa; UCI=Unidad Cuidados Intensivos.

**Tabla 89. Influencia de las características clínicas y antecedentes personales en la actividad ECOD de los hepatocitos aislados de los DC (II).**

<b>Actividad ECOD (pmol/min/mg) N=11</b>	<b>Coefficiente de correlación de Pearson</b>	<b>p</b>
Edad (años)	-0,323	0,333
Peso (Kg)	-0,508	0,111
Talla (cm)	-0,449	0,166
IMC	-0,394	0,230
Tiempo en UCI (h)	0,117	0,732

pmol/min/mg=picomoles/minuto/miligramo; Kg=kilogramos;  
 cm=centímetros; h=horas; ECOD=7-etoxicumarina O-deetilasa;  
 IMC=Índice Masa Corporal; UCI=Unidad Cuidados Intensivos.

- Parámetros analíticos:

De todos los parámetros analíticos analizados, sólo las cifras de potasio y de FA en sangre influyen de forma positiva en la actividad ECOD del aislamiento de hepatocitos de DC, de manera que cuanto mayores son las cifras de potasio y FA, mayor es la actividad ECOD ( $p < 0,05$ ) (Tablas 90, 91 y Figura 42).

**Tabla 90. Influencia de los parámetros analíticos en la actividad ECOD de los hepatocitos aislados de los DC (I).**

Actividad ECOD (pmol/min/mg) N=11	Coefficiente de correlación de Pearson	p
Glucosa (mg/dL)	-0,074	0,830
Sodio (mEq/L)	-0,178	0,600
<b>Potasio (mEq/L)</b>	<b>0,676</b>	<b>0,023</b>
BR total (mg/dL)	-0,079	0,817
GOT (UI/L)	0,425	0,193
GPT (UI/L)	0,429	0,188
GGT (UI/L)	0,481	0,134
<b>FA (UI/L)</b>	<b>0,817</b>	<b>0,002</b>
Urea (mg/dL)	0,152	0,656
Creatinina (mg/dL)	-0,445	0,170
Proteínas Totales (g/dL)	-0,413	0,207
Hb (g/dL)	-0,068	0,843
HTO (%)	-0,054	0,874
Leucocitos ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	0,421	0,197
Neutrófilos (%)	-0,141	0,679
Plaquetas ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	0,255	0,449
Índice de Quick (%)	0,268	0,426
Tiempo de Protombina (seg)	0,428	0,189

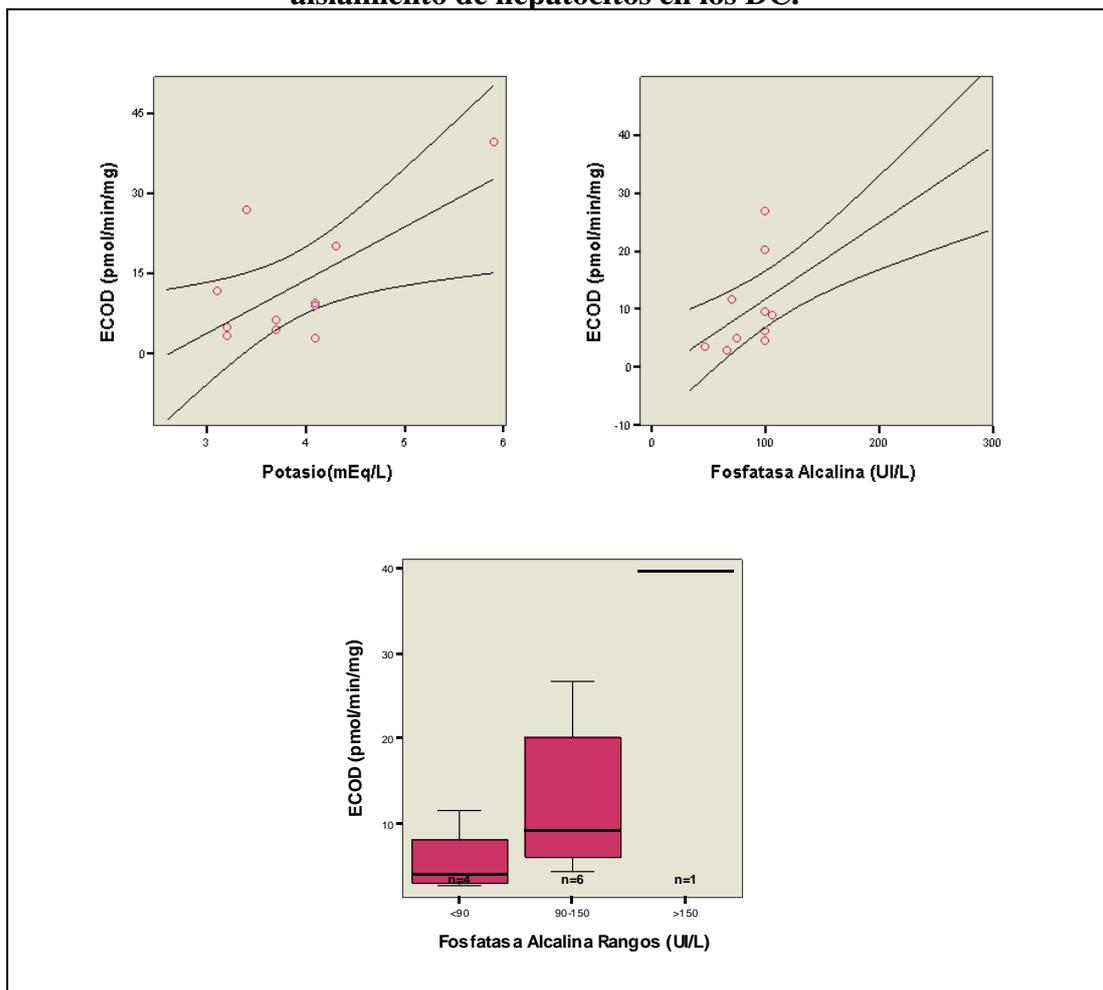
pmol/min/mg=picomoles/minuto/miligramo; mg/dL=miligramos/decilitro;  
 mEq/L=miliequivalentes/litro; UI/L=Unidades Internacionales/litro;  
 g/dL=gramos/decilitro;  $\mu\text{L}$  =microlitros; seg=segundos; ECOD=7-  
 etoxicumarina O-deetilasa; BR=Bilirrubina; GOT=transaminasa glutámico-  
 oxalacética; GPT=transaminasa glutámico-pirúvica;  
 GGT=gammaglutamiltranspeptidasa; FA=Fostasa Alcalina; Hb=Hemoglobina;  
 HTO=Hematocrito.

**Tabla 91. Influencia de los parámetros analíticos en la actividad ECOD de los hepatocitos aislados de los DC (II).**

Actividad ECOD (pmol/min/mg) N=11		N	Media	p*
Glucosa (mg/dL)	<120	1	4,50	0,494
	≥120	10	13,42	
Sodio (mEq/L)	<160	8	13,91	0,573
	≥160	3	9,14	
FA Rangos (UI/L)	<90	4	5,72	<b>0,011</b> (ANOVA)
	90-150	6	12,70	
	>150	1	39,58	

\* t Student ; pmol/min/mg=picomoles/minuto/miligramo; mg/dL=miligramos/decilitro; mEq/L=miliequivalentes/litro; UI/L=Unidades Internacionales/litro; ECOD=7-etoxicumarina O-deetilasa; GGT=gammaglutamiltranspeptidasa; FA=Fosfatasa Alcalina.

**Figura 42. Influencia del Potasio y la Fosfatasa Alcalina en la actividad ECOD del aislamiento de hepatocitos en los DC.**



- VARIABLES RELACIONADAS CON EL PROCESO DE EXTRACCIÓN HEPÁTICA:

Ninguna de las variables analizadas influye de forma significativa en la actividad ECOD de los hepatocitos aislados de DC; únicamente el tipo de solución de preservación Celsior aumenta la actividad ECOD, aunque el resultado no alcanza la significación estadística (Tablas 92-94).

**Tabla 92. Influencia del tiempo de isquemia fría en la actividad ECOD de los hepatocitos aislados de los DC.**

<b>Actividad ECOD (pmol/min/mg) N=11</b>	<b>Coefficiente de correlación de Pearson</b>	<b>p</b>
Tiempo isquemia fría (min)	0,252	0,455

pmol/min/mg=picomoles/minuto/miligramo; min=minutos; ECOD=7-etoxicumarina O-deetilasa;

**Tabla 93. Influencia de las variables relacionadas con la extracción hepática en la actividad ECOD de los hepatocitos aislados de los DC (I).**

<b>Actividad ECOD (pmol/min/mg) N=11</b>		<b>N</b>	<b>Media</b>	<b>p*</b>
Tiempo Isquemia fría (min)	<700	6	12,43	0,963
	≥700	5	12,81	
Tiempo Isquemia fría (min)	<900	9	9,71	0,453
	≥900	2	25,63	
Tiempo isquemia fría Rangos (min)	0-299	2	4,55	0,260 (ANOVA)
	300-699	3	15,11	
	700-900	4	8,24	
	>900	2	25,63	
Líquido de perfusión	Wisconsin	7	17,38	0,068
	Celsior	4	4,25	

\*=t Student; pmol/min/mg=picomoles/minuto/miligramo; min=minutos; ECOD=7-etoxicumarina O-deetilasa.

**Tabla 94. Influencia de las variables relacionadas con la extracción hepática en la actividad ECOD de los hepatocitos aislados de los DC (II).**

Actividad ECOD (pmol/min/mg) N=11		N	Media	p*
Parada cardiaca	NO	11	12,60	n.a.
	SI	0		
Hipotensión prolongada	NO	10	13,25	0,591
	SI	1	6,20	

\*=t Student; pmol/min/mg=picomoles/minuto/miligramo; ECOD=7-etoxicumarina O-deetilasa; n.a.=no analizado.

- Variables relacionadas con la biopsia:

Ninguna de las variables relacionadas con la biopsia influye de forma estadísticamente significativa en la actividad ECOD de los hepatocitos aislados de DC (Tablas 95 y 96).

**Tabla 95. Influencia de las variables relacionadas con la biopsia en la actividad ECOD de los hepatocitos aislados de los DC (I).**

Actividad ECOD (pmol/min/mg) N=11		N	Media	p*
Esteatosis	NO	7	16,43	0,158 (t Student)
	SI	4	5,90	
Esteatosis (%)	0-29	10	13,25	0,591
	30-59	1	6,20	
	≥60	0		

\*=ANOVA; pmol/min/mg=picomoles/minuto/miligramo; ECOD=7-etoxicumarina O-deetilasa.

**Tabla 96. Influencia de las variables relacionadas con la biopsia en la actividad ECOD de los hepatocitos aislados de los DC (II).**

Actividad ECOD (pmol/min/mg) N=11	Coefficiente de correlación de Pearson	p
Peso de la muestra (g)	0,420	0,198

pmol/min/mg=picomoles/minuto/miligramo; g=gramos; ECOD=7-etoxicumarina O-deetilasa.

#### IV.5.4. Actividad TESTOSTERONA-6- $\beta$ HIDROXILASA:

- Características clínicas y antecedentes personales de los donantes:

Tras analizar todas las características clínicas y antecedentes personales de los donantes, observamos que los DC que tomaban medicación previamente, presentan una actividad testosterona-6- $\beta$  hidroxilasa en el aislamiento de los hepatocitos menor que los que no tomaban medicación ( $p=0,023$ ). También la edad, el peso del donante y el IMC influyen de forma negativa en la actividad testosterona- $\beta$  hidroxilasa, de modo que a mayor edad, peso o IMC menor es la actividad enzimática de los hepatocitos aislados ( $p<0,05$ ) (Tablas 97, 98 y Figuras 43 y 44).

**Tabla 97. Influencia de las características clínicas y antecedentes personales en la actividad testosterona-6- $\beta$  hidroxilasa de los hepatocitos aislados de los DC (I).**

Actividad testosterona-6- $\beta$ hidroxilasa (pmol/min/mg) N=8	Coefficiente de correlación de Pearson	p
Edad (años)	<b>-0,727</b>	<b>0,041</b>
Peso (Kg)	<b>-0,799</b>	<b>0,017</b>
Talla (cm)	-0,564	0,145
IMC	<b>-0,742</b>	<b>0,035</b>
Tiempo en UCI (h)	-0,158	0,708

pmol/min/mg=picomoles/minuto/miligramo; Kg=kilogramos; cm=centímetros; h=horas; IMC=Índice Masa Corporal; UCI=Unidad Cuidados Intensivos.

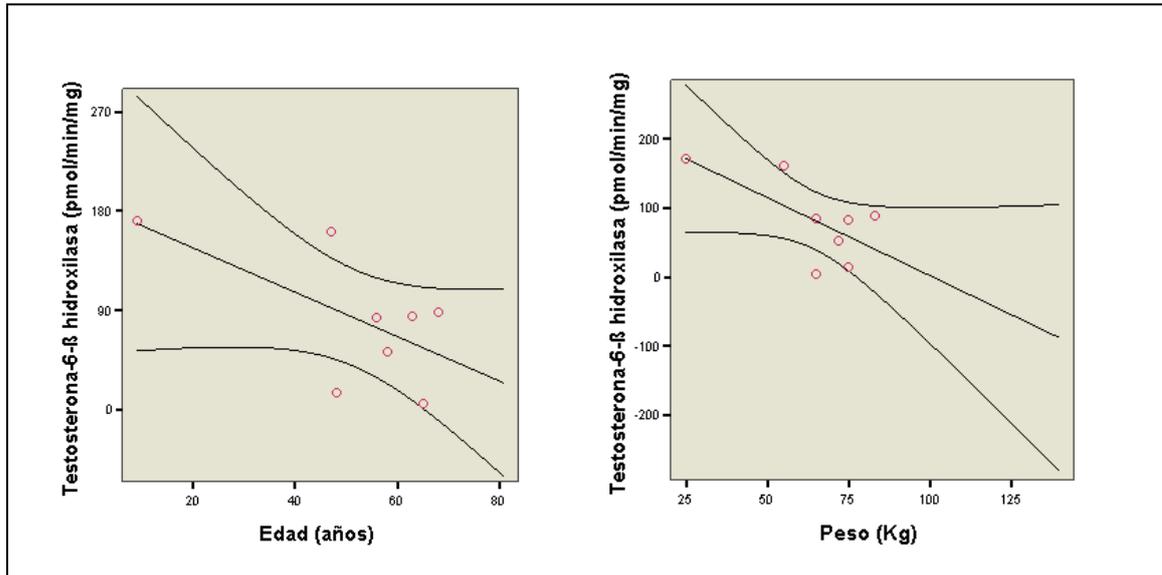
**Tabla 98. Influencia de las características clínicas y antecedentes personales en la actividad testosterona-6- $\beta$  hidroxilasa de los hepatocitos aislados de los DC (II).**

Actividad testosterona-6- $\beta$ hidroxilasa (pmol/min/mg) N=8		N	Media	p*
Sexo	Hombre	4	85,32	0,609
	Mujer	4	58,54	
Consumo de alcohol	NO	7	70,40	0,879
	SI	1	82,60	
Hipertensión Arterial	NO	5	94,62	0,189
	SI	3	34,12	
Diabetes Mellitus	NO	8	71,93	n.a.
	SI	0		
Hipertrigliceridemia	NO	8	71,93	n.a.
	SI	0		
Hipercolesterolemia	NO	6	84,71	0,201
	SI	2	33,58	
Medicación previa	NO	6	92,93	<b>0,023</b>
	SI	2	8,93	
Antibióticos en UCI	NO	5	53,49	0,344
	SI	3	102,66	
Tiempo en UCI h	<72	6	87,21	0,590
	$\geq$ 72	2	68,50	
Transfusiones en las últimas 48 h	NO	8	71,93	n.a.
	SI	0		

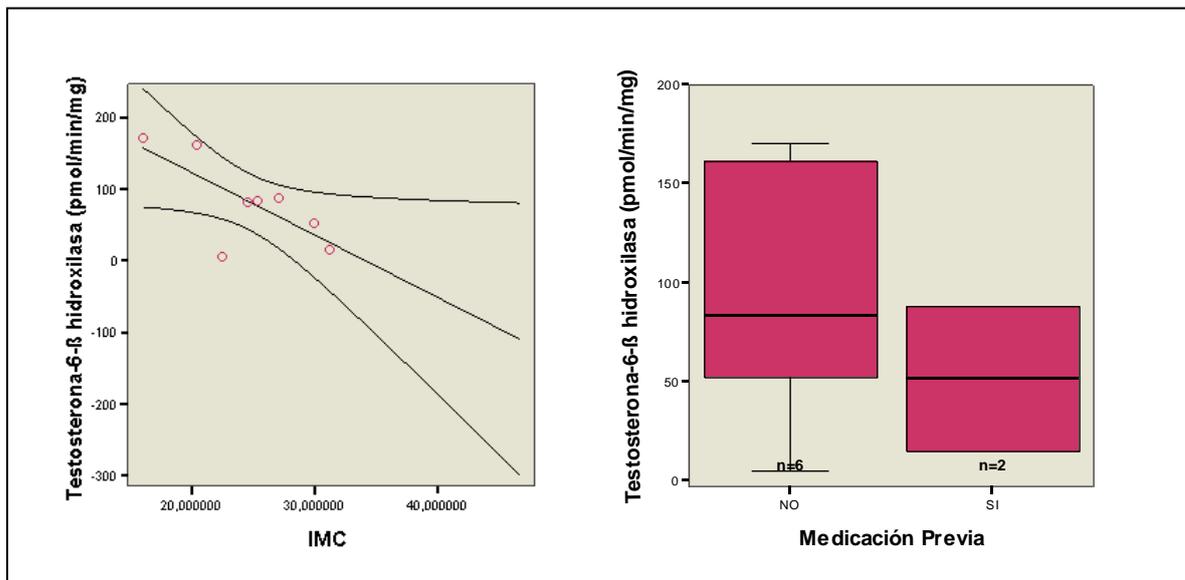
\*=t-Student; pmol/min/mg=picomoles/minuto/miligramo; h=horas;

UCI=Unidad de Cuidados Intensivos; n.a.=no analizado.

**Figura 43. Influencia de la Edad y el Peso en la actividad testosterona-6-β hidroxilasa del aislamiento de hepatocitos en los DC.**



**Figura 44. Influencia del IMC y la Medicación previa en la actividad testosterona-6-β hidroxilasa del aislamiento de hepatocitos en los DC.**



- Parámetros analíticos:

Ninguno de los parámetros analíticos estudiados influyen de forma significativa en la actividad testosterona-6- $\beta$  hidroxilasa de los hepatocitos procedentes de DC (Tablas 99 y 100).

**Tabla 99. Influencia de los parámetros analíticos en la actividad testosterona-6- $\beta$  hidroxilasa de los hepatocitos aislados de los DC (I).**

Actividad testosterona-6- $\beta$ hidroxilasa (pmol/min/mg) N=8	Coefficiente de correlación de Pearson	p
Glucosa (mg/dL)	0,247	0,555
Sodio (mEq/L)	-0,189	0,654
Potasio (mEq/L)	0,210	0,618
BR total (mg/dL)	-0,140	0,740
GOT (UI/L)	0,235	0,575
GPT (UI/L)	-0,217	0,606
GGT (UI/L)	0,216	0,608
FA (UI/L)	0,123	0,773
Urea (mg/dL)	-0,395	0,333
Creatinina (mg/dL)	-0,652	0,080
Proteínas Totales (g/dL)	-0,352	0,393
Hb (g/dL)	-0,151	0,721
HTO (%)	-0,165	0,696
Leucocitos ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	0,682	0,062
Neutrófilos (%)	0,313	0,450
Plaquetas ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	0,422	0,298
Índice de Quick (%)	0,407	0,318
Tiempo de Protombina (seg)	0,069	0,871

pmol/min/mg=picomoles/minuto/miligramo; mg/dL=miligramos/decilitro;  
mEq/L=miliequivalentes/litro; UI/L=Unidades Internacionales/litro;  
g/dL=gramos/decilitro;  $\mu\text{L}$  =microlitros; seg=segundos; BR=Bilirrubina;  
GOT=transaminasa glutámico-oxalacética; GPT=transaminasa glutámico-  
pirúvica; GGT=gammaglutamiltranspeptidasa; FA=Fosfatasa Alcalina;  
Hb=Hemoglobina; HTO=Hematocrito.

**Tabla 100. Influencia de los parámetros analíticos en la actividad testosterona-6-β hidroxilasa de los hepatocitos aislados de los DC (II).**

Actividad testosterona-6-β hidroxilasa (pmol/min/mg) N=8		N	Media	p*
Glucosa (mg/dL)	<120	1	14,67	0,399
	≥120	7	80,11	
Sodio (mEq/L)	<160	6	86,62	0,194
	≥160	2	27,84	
FA Rangos (UI/L)	<90	1	5,20	0,455 (ANOVA)
	90-150	6	95,09	
	>150	1	84,50	

\*= t Student; pmol/min/mg=picomoles/minuto/miligramo;

mg/dL=miligramos/decilitro; mEq/L=miliequivalentes/litro; UI/L=Unidades

Internacionales/litro GGT=gammaglutamiltranspeptidasa; FA=Fosfatasa Alcalina.

- Variables relacionadas con el proceso de extracción hepática:

Ninguna de estas variables influye significativamente en la actividad testosterona-6-β hidroxilasa de los hepatocitos aislados de DC (Tablas 101-103).

**Tabla 101. Influencia de las variables relacionadas con la extracción hepática en la actividad testosterona-6-β hidroxilasa de los hepatocitos aislados de los DC (I).**

Actividad testosterona-6-β hidroxilasa (pmol/min/mg) N=8		N	Media	p*
Parada cardiaca	NO	8	71,93	n.a.
	SI	0		
Hipotensión prolongada	NO	7	81,75	0,304
	SI	1	3,19	

\*=t Student; pmol/min/mg=picomoles/minuto/miligramo; n.a.=no analizado.

**Tabla 102. Influencia del tiempo de isquemia fría en la actividad testosterona-6- $\beta$  hidroxilasa de los hepatocitos aislados de los DC.**

Actividad testosterona-6- $\beta$ hidroxilasa (pmol/min/mg) N=8	Coefficiente de correlación de Pearson	p
Tiempo isquemia fría (min)	-0,269	0,519

pmol/min/mg=picomoles/minuto/miligramo; min=minutos.

**Tabla 103. Influencia de las variables relacionadas con la extracción hepática en la actividad testosterona-6- $\beta$  hidroxilasa de los hepatocitos aislados de los DC (II).**

Actividad testosterona-6- $\beta$ hidroxilasa (pmol/min/mg) N=8	N	Media	p*	
Tiempo Isquemia fría (min)	<700	5	111,18	0,075
	$\geq$ 700	3	34,79	
Tiempo Isquemia fría (min)	<900	7	82,253	0,975
	$\geq$ 900	1	84,500	
Tiempo isquemia fría Rangos (min)	0-299	1	88,000	0,923 (ANOVA)
	300-699	3	102,033	
	700-900	3	60,557	
	>900	1	84,500	
Líquido de perfusión	Wisconsin	6	92,933	0,447
	Celsior	2	51,335	

\*= t Student; pmol/min/mg=picomoles/minuto/miligramo; min=minutos.

- Variables relacionadas con la biopsia:

La única variable que merece mención en este caso es la presencia de esteatosis en la biopsia, ya que implica menor actividad testosterona-6- $\beta$  hidroxilasa tras el aislamiento (23,45 pmol/min/mg versus 101,020 pmol/min/mg de las biopsias con esteatosis), aunque el resultado no llega a ser estadísticamente significativo, al igual que el resto de las variables analizadas (Tablas 104 y 105).

**Tabla 104. Influencia de las variables relacionadas con la biopsia en la actividad testosterona-6- $\beta$  hidroxilasa de los hepatocitos aislados de los DC (I).**

Actividad testosterona-6- $\beta$ hidroxilasa (pmol/min/mg) N=8		N	Media	p*
Esteatosis	NO	5	101,02	0,065 (t Student)
	SI	3	23,45	
Esteatosis (%)	0-29	7	81,75	0,932
	30-59	1	88,00	
	$\geq 60$	0		

\*=ANOVA; pmol/min/mg=picomoles/minuto/miligramo.

**Tabla 105. Influencia de las variables relacionadas con la biopsia en la actividad testosterona-6- $\beta$  hidroxilasa de los hepatocitos aislados de los DC (II).**

Actividad testosterona-6- $\beta$ hidroxilasa (pmol/min/mg) N=8	Coefficiente de correlación de Pearson	p
Peso de la muestra (g)	0,601	0,115

pmol/min/mg=picomoles/minuto/miligramo; g=gramos.

#### **IV.6. RESUMEN.**

Se expone en este apartado un resumen de las variables que han sido significativas en el análisis univariante y multivariante (Tablas 106 y 107).

**Tabla 106. Variables estadísticamente significativas en el análisis univariante de los DV y DC.**

	DV	DC
<b>Viabilidad (%)</b>	IMC	Tiempo UCI (h)
	Glucosa (mg/dL)	Tiempo UCI $\geq$ 72 h
	Neutrófilos (%)	Tiempo isquemia fría (min)
		Tiempo isquemia fría $>700$ min
<b>Viabilidad <math>\geq 70\%</math></b>	BR Total (mg/dL)	Tiempo isquemia fría (min)
	BR $\geq 1$ mg/dL	Líquido perfusión (Celsior)
<b>Rendimiento (cel/g <math>\times 10^6</math>)</b>	GOT (UI/L)	Sodio (mEq/L)
	Índice Quick (%)	Neutrófilos (%)
	Resección Hepática (SI/NO)	Glucosa $\geq 120$ mg/dL
	Metástasis Hepáticas (SI/NO)	Tiempo isquemia fría $>700$ min
	Isquemia caliente (SI/NO)	Tiempo isquemia fría Rangos (min)
	Tipo isquemia caliente	Peso muestra
	Tiempo isquemia caliente (min)	
<b>Actividad ECOD (pmol/min/mg)</b>	Tiempo Protrombina (seg)	Potasio (mEq/L)
		FA (UI/L)
		FA Rangos (UI/L)
<b>Actividad testosterona-6-<math>\beta</math> hidroxilasa (pmol/min/mg)</b>	Sexo (Mujer)	Edad (años)
	Peso (Kg)	Peso (Kg)
	Talla (cm)	IMC
	BR Total (mg/dL)	Medicación previa (SI/NO)
	Creatinina (mg/dL)	
	Hb (g/dL)	
	HTO (%)	
	GGT Rangos (UI/L)	
	Resección hepática (SI/NO)	
	Metástasis hepáticas (SI/NO)	
Peso muestra (g)		

cel/g=células/gramo; pmol/min/mg=picomoles/minuto/miligramo; mg/dL=miligramos/decilitro; min=minutos; h=horas; mEq/L=miliequivalentes/litro; UI/L=Unidades Internacionales/litro; g=gramos; g/dL=gramos/decilitro; seg=segundos; Kg=kilogramos; ECOD=7-etoxicumarina O-deetilasa; IMC=Índice masa corporal; BR=Bilirrubina; GOT=transaminasa glutámico-oxalacética; GGT=gammaglutamiltranspeptidasa; FA=Fosfatasa Alcalina; Hb=Hemoglobina; HTO=Hematocrito.

**Tabla 107. Variables estadísticamente significativas en el análisis multivariante de los DV y DC.**

	DV	DC
<b>Viabilidad (%)</b>	IMC	Tiempo isquemia fría (min)
		Líquido perfusión (Celsior)
<b>Viabilidad <math>\geq 70\%</math></b>	BR $\geq 1$ mg/dL	Tiempo isquemia fría (min)
	QT preoperatoria (SI/NO)	Líquido perfusión (Celsior)
<b>Rendimiento (cel/g x10<sup>6</sup>)</b>	Índice de Quick (%)	Sodio (mEq/L)
	Resección hepática (SI/NO)	Neutrófilos (%)
		Tiempo isquemia fría (min)
<b>Actividad ECOD (pmol/min/mg)</b>	HTO (%)	
	Sexo (Hombre)	
<b>Actividad testosterona-6-<math>\beta</math> hidroxilasa (pmol/min/mg)</b>	HTO (%)	

cel/g=células/gramo; pmol/min/mg=picomoles/minuto/miligramo; mg/dL=miligramos/decilitro; min=minutos; mEq/L=miliequivalentes/litro; ECOD=7-etoxicumarina O-deetilasa; IMC=Índice masa corporal; BR=Bilirrubina; HTO=Hematocrito.

## **V. DISCUSIÓN.**



## **V. DISCUSIÓN:**

Se considera que el tejido hepático humano presenta una gran variabilidad con respecto a su calidad, consecuencia de distintos factores, entre los que se encuentran principalmente las características de los donantes y el proceso de aislamiento de las células en el laboratorio (164), sin embargo se desconocen cuáles son exactamente los factores del donante que aportan una mayor rentabilidad al procedimiento de aislamiento de hepatocitos.

Hasta el momento actual, los estudios existentes son limitados y heterogéneos, debido al empleo de diferentes protocolos de aislamiento y de criopreservación celular, distintos criterios en la valoración de la funcionalidad del hepatocito, disparidad en los tipos de biopsias hepáticas utilizadas en cuanto a etiología y tamaño, así como características del donante dentro del mismo estudio. Todo ello hace difícil poder comparar resultados y extraer conclusiones válidas aplicables para distintos grupos de trabajo.

Con el fin de intentar obviar estas limitaciones hemos realizado un estudio en el que se analizan un gran número de variables con la finalidad de conocer las características de los donantes de hepatocitos en nuestro medio, y saber cual es la influencia de estas características en el resultado del aislamiento celular y las características funcionales del cultivo.

El objetivo es disponer de criterios objetivos para seleccionar aquellos donantes de tejido hepático en nuestro medio, de los que se podrían aislar hepatocitos de mayor calidad con la finalidad en un futuro, de la realización del trasplante de hepatocitos o trasplante celular hepático (TCH), maximizando con ello los recursos.

**VIABILIDAD:**

De los distintos parámetros que se tienen en cuenta para caracterizar la calidad de un aislamiento, la viabilidad es considerada como el más relevante (81,91). Se ha debatido en múltiples ocasiones cuál es la viabilidad que deben tener los hepatocitos para poder ser considerados aptos para la realización del TCH. La criopreservación es uno de los métodos más utilizados para almacenar hepatocitos durante largo tiempo. Sin embargo, el proceso de criopreservación/descongelación lesiona considerablemente el hepatocito, ocasionando daño mitocondrial, pérdida de la capacidad de síntesis de ATP, anomalías en la actividad enzimática de la cadena respiratoria celular y con ello una significativa disminución de la viabilidad de los hepatocitos (91,93).

A la hora de la realización del TCH es importante llevarlo a cabo con hepatocitos de calidad. Distintos autores consideran que para su realización, las células deberían tener una viabilidad superior al 60% (74,165). Nuestro grupo ha establecido un punto de corte de la viabilidad en 70%, considerando que un aislamiento con ésta viabilidad como mínimo se puede considerar un buen aislamiento. Valores inferiores no se suelen aceptar para la criopreservación, ya que en general tras la descongelación, ésta disminuye al menos en un 20%, y estos hepatocitos descongelados con viabilidades bajas no serían óptimos para realizar el TCH (81). Por ello se requieren suspensiones de hepatocitos recién aislados con una viabilidad elevada para que soporten adecuadamente el proceso de criopreservación.

**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; es decir, no podríamos establecer una cifra como punto de corte óptimo para el TCH. Existen donantes en los que tras el aislamiento se ha obtenido una buena viabilidad pero el rendimiento no ha sido tan bueno, pese a lo cual, si la funcionalidad de acuerdo a los parámetros determinados es también adecuada, podrían ser útiles para su uso en terapia celular.

## **ACTIVIDAD ENZIMÁTICA:**

Los xenobióticos son compuestos químicos que no forman parte de la composición habitual del cuerpo humano. El organismo cuenta con una serie de enzimas capaces de convertirlos en sustancias más hidrosolubles y más fáciles de excretar. Son reacciones de oxidación, reducción e hidrólisis. El citocromo P450 (CYP) (enzima con actividad monooxigenasa) es el principal responsable del metabolismo oxidativo de los xenobióticos (7).

El conocimiento de las rutas metabólicas de los fármacos y de su toxicidad son claves para determinar la eficacia y el riesgo de dichos fármacos. Los hepatocitos humanos son el modelo que más se aproxima al hígado humano y son considerados como una herramienta eficaz *in vitro* para anticipar el metabolismo de un fármaco y para poner en evidencia el riesgo de dicho fármaco en humanos (71). La actividad 7-etoxicumarina O-deetilasa (ECOD) es una actividad oxidativa representativa de varios isoenzimas del P450, y la enzima testosterona-6- $\beta$  hidroxilasa es indicativa de la actividad CYP3A4 (la enzima CYP más abundante en el hígado humano) (7). En nuestro estudio hemos querido analizar la influencia de un gran número de variables en la actividad ECOD y testosterona-6- $\beta$  hidroxilasa como parámetros indicadores de funcionalidad hepática.

### **V.1. Resultados del aislamiento y cultivo.**

#### **V.1.1. Donantes vivos (DV):**

En una revisión de las distintas publicaciones existentes en la literatura que analizan las características de los DV de hepatocitos, observamos como sólo los estudios de los grupos de Alexandre *et al.* 2002 (154) y Richert *et al.* 2004 (156) son comparables al nuestro en cuanto a tamaño muestral, ya que el primero incluye 149 donantes y un número aceptable de variables estudiadas, y el segundo consigue reclutar 130 donantes, analizando datos conjuntos de donantes del grupo francés, Alexandre *et al.* 2002 (154), y donantes reclutados por el grupo de Lloyd *et al.* 2004 (156).

- Viabilidad: El análisis de la viabilidad media de los DV en nuestra serie fue del  $90,11 \pm 14,97\%$ ; este resultado es comparable al de algunas series, con viabilidades comprendidas entre el 59 y el 89% (154,155,156,157,158).

Destaca el estudio de Bhogal *et al.* 2011 (153), que presentó viabilidades medias del 40%, una cifra significativamente menor al resto de grupos, esto probablemente es debido a que todos los aislamientos del estudio se realizaron de hígados procedentes de resecciones hepáticas, y en su mayor parte de pacientes cirróticos con indicación de Trasplante Hepático (TH).

El trabajo de Richert *et al.* 2004 (156) merece una mención a parte, ya que realizó un análisis investigando las variables viabilidad y rendimiento en dos grandes grupos: comparó donantes de los grupos de Lloyd *et al.* 2004 (155) y Alexandre *et al.* 2002 (154), aunque para compararlos no incluyó exactamente los mismos donantes que éstos en sus respectivas publicaciones. Es decir: Alexandre *et al.* 2002 (154), en su artículo hablaban de 149 DV, pero Richert *et al.* 2004 (156) sólo tomaron 58 donantes de todos ellos; el grupo de Lloyd *et al.* 2004 (155) incluyó en su estudio 60 DV y 7 donantes cadáver (DC), sin embargo, Richert *et al.* 2004 (156) incluyeron menos DV y más DC reclutados del grupo inglés de Lloyd (155) (72 y 11 respectivamente).

En el estudio del grupo francés, Alexandre *et al.* 2002 (154), con 58 DV incluidos, las biopsias procedían de resecciones hepáticas por patología benigna (31%) o maligna (69%). La serie del grupo inglés, Lloyd *et al.* 2004 (155) constaba de 11 DC y 72 DV, a los que igualmente se había realizado una resección hepática, en su mayor parte por metástasis hepáticas, representando la patología benigna únicamente un 0,6% de los casos, frente al 56,6% de nuestra serie. Al comparar ambos grupos (inglés y francés), observaron únicamente diferencias significativas en la viabilidad, siendo mayor en el grupo inglés (83,4%), comparado con la del grupo francés (60,1%), lo que sugiere una digestión enzimática más uniforme en el grupo inglés de Lloyd *et al.* 2004 (155,156). Sin embargo estos grupos no son del todo comparables al tratarse de dos poblaciones diferentes, ya que en el estudio del grupo de Alexandre *et al.* 2002 (154) sólo hay DV y en el del grupo de Lloyd *et al.* 2004 (155) hay DV y DC juntos.

- **Rendimiento:** Al analizar el rendimiento del aislamiento, observamos la existencia de una mayor variabilidad entre los grupos. En nuestro estudio el rendimiento medio del aislamiento de los DV fue de  $12,03 \times 10^6$  cel/g de tejido. Estas cifras son superiores a otras series como la de Kawahara *et al.* 2010 (158) (cuyo rendimiento se sitúa en  $6 \times 10^6$  cel/g), o Lloyd *et al.* 2004 (155) y Alexandre *et al.* 2002 (154), con un rendimiento de  $5,4 \times 10^6$  cel/g y  $4 \times 10^6$  cel/g respectivamente. Sólo la serie de Vondran *et al.* 2008 (157) supera a la nuestra, describiendo un rendimiento en el aislamiento de  $18,7 \times 10^6$  cel/g.

- **Actividad enzimática:** El único grupo que estudia la actividad enzimática de forma similar a la nuestra es el de Vondran *et al.* 2008 (157), ya que incluyó en su análisis las actividades 7-etoxiresorufina O-deetilasa (EROD) (representativa de la isoenzima CYP1A2) y ECOD, y obtuvo medias de actividad ECOD de 15,3 nmol/L/h.

#### **V.1.2. Donantes cadáver (DC):**

En nuestra serie se incluyeron 36 DC no rechazados para TH, constituyendo la mayor serie en la literatura con este tipo de donantes en la que se valora la influencia de un considerable número de variables en el aislamiento de hepatocitos humanos. Existen series algo más amplias que la nuestra, pero se trata de series que incluyen en sus estudios un mayor número de injertos hepáticos, aunque todos ellos desestimados para TH, mayoritariamente por esteatosis, fibrosis o cirrosis, y además no realizan un estudio tan exhaustivo de las variables de los donantes (42,81). El grupo de Hughes *et al.* 2006 (74), realizó el estudio en una serie algo menor a la nuestra, 20 pacientes, con órganos rechazados para TH, aunque en este caso se trataba de donantes a corazón parado, analizando sólo dos variables: el tiempo de isquemia caliente y el tiempo de isquemia fría. Esta heterogeneidad entre los grupos hace difícil la comparación de nuestros resultados con los mismos.

- **Viabilidad:** La viabilidad media obtenida por nuestro grupo tras el aislamiento de los hepatocitos de DC fue del 67,17 %, comparable a la de otros grupos (64-77%) (79,81,155,159,165) y superior a la de otros autores (74).

Cabe destacar el estudio de Baccarani *et al.* 2003 (79), ya que no hizo un análisis de las diferentes variables de los donantes, sino que se limitó a realizar un estudio comparativo de la viabilidad y el rendimiento según las distintas causas por las que se rechazó el órgano para TH (fundamentalmente esteatosis y cirrosis). Es llamativa la viabilidad media que obtuvieron (73%). Esto es debido a una modificación en la perfusión de colagenasa, pasando de los 2 pasos utilizados habitualmente, a 4 pasos. El autor detectó diferencias no significativas en la viabilidad, aunque ésta fue menor en hígados cirróticos (66%, frente al 77% de los hígados esteatósicos) (79).

- Rendimiento: Las cifras de rendimiento del aislamiento en nuestro grupo fueron de  $7,08 \times 10^6$  cel/g, aproximándose a las obtenidas por Baccarani *et al.* 2003 (79), cuyo rendimiento medio en el aislamiento era de  $7,2 \times 10^6$  cel/g, y además siendo el rendimiento significativamente menor en los DC con hígados cirróticos ( $1 \times 10^6$  cel/g, frente a  $9 \times 10^6$  cel/g de los DC con hígados esteatósicos) en ese estudio.

Sin embargo, las cifras de rendimiento obtenidas en nuestro estudio son superiores a las obtenidas por Hughes *et al.* 2006 (74), Alexandrova *et al.* 2005 (81) y Lloyd *et al.* 2004 (155), que obtienen rendimientos entre  $2,2$  y  $3,6 \times 10^6$  cel/g, y algo inferiores a las publicadas por Groothuis *et al.* 1995 (159) o Bonora-Centelles *et al.* 2010 (165), con rendimientos de  $12,5 \times 10^6$  cel/g y  $10,1 \times 10^6$  cel/g respectivamente.

- Actividad enzimática: no es posible comparar nuestros datos globales de actividad ECOD y testosterona-6- $\beta$  hidroxilasa en DV ya que ningún otro grupo ha hecho el análisis de estos datos.

### **V.1.3. Análisis comparativo de los resultados del aislamiento celular entre donante vivo y donante cadáver en nuestro estudio:**

- Viabilidad y rendimiento: Al comparar los resultados de viabilidad y rendimiento, entre DV y DC, observamos que la viabilidad de los hepatocitos obtenidos de DV fue mayor (90,11%) que la de los DC (67,17%); el rendimiento del aislamiento también fue mayor en los DV, con una media de  $12,03 \times 10^6$  cel/g frente a  $6,21 \times 10^6$  cel/g de los DC, siendo las diferencias estadísticamente significativas en ambos casos.

Otros autores, como Lloyd *et al.* 2004 (155) también obtienen mayor viabilidad y rendimiento en los DV, aunque sus resultados no alcanzan la significación estadística.

- Actividad enzimática: Los resultados obtenidos tras la medición de las actividades enzimáticas ECOD y testosterona-6- $\beta$  hidroxilasa no mostraron diferencias significativas entre los dos grupos, siendo la actividad ECOD en DV de 15,97 pmol/min/mg frente a 12,60 pmol/min/mg de los DC, y la actividad testosterona-6- $\beta$  hidroxilasa en DV de 70,26 pmol/min/mg frente a 71,93 pmol/min/mg en DC. Ninguno de los estudios publicados hasta la fecha ha estudiado y comparado la actividad enzimática en el aislamiento de hepatocitos de DV y DC.

- Características de los donantes: Al comparar las características de los donantes entre DV y DC hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas en muchas de ellas.

En primer lugar *la edad* del donante constituye un factor importante, estudiado por algunos de los grupos (79,81,155). En nuestra serie los DC eran más jóvenes y más altos, con una media de edad de 46,44 años y 167 cm de altura, siendo estos resultados comparables a los de otros autores (79,81,155).

Respecto a los *parámetros analíticos*, el estudio estadístico realizado demostró diferencias estadísticamente significativas en las cifras de glucosa, sodio, creatinina, número de leucocitos, porcentaje de neutrófilos y tiempo de protrombina, entre los dos grupos de donantes, siendo los valores más elevados en los DC. Este resultado podría estar relacionado con la estancia, a veces prolongada, de estos donantes en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI), ya que en general suelen estar más deteriorados y han estado sometidos a mayor estrés que los DV. Por el contrario, cuando los parámetros analíticos analizados fueron las cifras de potasio, proteínas totales, hemoglobina, hematocrito, número de plaquetas e índice de Quick, se demostraron diferencias estadísticamente significativas, siendo en este caso los DV los que presentaban valores más altos en dichos parámetros, resultado lógico, ya que son pacientes sometidos a cirugías electivas y que por tanto se encuentran generalmente en mejores condiciones que los DC.

Otra de las variables del donante que desempeña un papel muy importante en la gran variabilidad que presenta el tejido hepático humano, es la presencia de *esteatosis hepática*. El análisis estadístico en nuestro estudio constató diferencias significativas entre nuestros dos grupos, ya que el 36,1% de las biopsias procedentes de DC presentaba esteatosis, frente al 14,7% de las biopsias procedentes de DV.

## **V.2. DONANTES VIVOS: variables predictoras o independientes de los donantes que influyen en los resultados del aislamiento y cultivo de los hepatocitos.**

La influencia de las características y antecedentes personales de los DV en el aislamiento y cultivo de los hepatocitos, ha sido estudiada con mayor o menor exhaustividad por los diferentes grupos.

1.- La **edad** ha sido uno de los parámetros más estudiado por los distintos autores, aunque las series son pequeñas y el número de variables estudiadas escaso. En nuestra serie, el análisis univariante evidenció que la edad no influye en la viabilidad, en el rendimiento ni en la actividad enzimática del aislamiento de hepatocitos, coincidiendo con Alexandre *et al.* 2002 (154), Richert *et al.* 2004 (156) y Blanco *et al.* 2000 (166). Sin embargo difiere de las series de Lloyd *et al.* 2004 (155), Vondran *et al.* 2008 (157) y Kawahara *et al.* 2010 (158), aunque no existe homogeneidad entre los resultados de todos los grupos. Para algunos autores la edad avanzada influye negativamente y de forma significativa en la viabilidad (155,158), sin influir en el rendimiento del aislamiento; frente a otros que describen una influencia negativa estadísticamente significativa en el rendimiento del aislamiento, de modo que aquellos pacientes con edades inferiores a 50 años, presentan un rendimiento de media de  $25,5 \times 10^6$  cel/g, frente a aquellos con edades superiores a 50 años, que tienen un rendimiento medio de  $16,8 \times 10^6$  cel/g, no encontrando influencia de la edad respecto a la viabilidad (157). Posiblemente este resultado obtenido por el grupo de Vondran *et al.* 2008 (157), no sea debido a la edad en sí, sino a la distribución de patologías por edades, ya que la indicación de la cirugía en los donantes mayores de 50 años fue fundamentalmente por tumores primarios y secundarios, mientras que los donantes menores de 50 años la cirugía se indicó fundamentalmente por patologías benignas.

2.- El **sexo**, en nuestro estudio, únicamente influye de forma significativa en la actividad testosterona-6- $\beta$  hidroxilasa. Las mujeres presentan mayor actividad de esta enzima en el aislamiento, con cifras de 92,3 pmol/min/mg, frente a 45,5 pmol/min/mg de los hombres ( $p=0,000$ ), de acuerdo a lo publicado por otros autores en hígado humano (167,168). Al incluir la actividad ECOD en el análisis multivariante, se ha observado que el resultado sí llega a ser estadísticamente significativo, aunque en este caso, presentan mayor actividad ECOD las biopsias aisladas de los hombres que en las de las mujeres. No existe influencia del sexo en viabilidad y rendimiento al igual que en los otros grupos (154-158). Es difícil dar una explicación lógica a estos resultados. Posiblemente es debido a la gran variabilidad interindividual en cuanto a la actividad enzimática, y a la dependencia de ésta de muchos otros factores como puede ser el tipo de alimentación, el estado nutricional, etc. (7).

3.- El Índice de masa Corporal (**IMC**), en nuestro estudio tiende a influir negativamente en todas las variables del aislamiento, aunque lo hace con significación estadística sólo en la viabilidad, tanto en el análisis univariante como multivariante, de modo que a mayor IMC, menor viabilidad de los hepatocitos aislados. El resto de grupos no han analizado esta variable, aunque parece lógico que la viabilidad sea menor en pacientes con mayor sobrepeso, ya que los hepatocitos presentan mayor acumulación de grasa. Sólo el grupo de Lloyd *et al.* 2004 (155) analiza el IMC sin encontrar influencias en el resultado del aislamiento.

4.- Del resto de características clínicas y antecedentes personales de los donantes analizadas en nuestro estudio, ninguna muestra influencias estadísticamente significativas en el aislamiento y cultivo celular. Sólo la **quimioterapia preoperatoria** parece que influye en la viabilidad y el rendimiento del aislamiento, de forma que los DV que no han recibido QT preoperatoria presentan una viabilidad y un rendimiento del aislamiento celular superior a la de los que sí la han recibido, sin que el estudio univariante demuestre resultados estadísticamente significativos ( $p<0,1$ ). Sin embargo, en nuestro estudio, al incluir esta variable en el análisis multivariante de la viabilidad superior al 70%, se observó que la QT preoperatoria influía negativamente en ésta y el resultado obtenido sí fue estadísticamente significativo. Esto podría correlacionarse con lo demostrado por diferentes autores, en estudios realizados con pacientes intervenidos por metástasis hepáticas de carcinoma colorrectal que han recibido quimioterapia

preoperatoria, debido al daño hepático demostrado al utilizar determinados agentes quimioterápicos, como son la esteatohepatitis o el daño sinusoidal del irinotecan y el oxaliplatino respectivamente (169,170). En la literatura existente, ningún autor encontró influencia de dichas variables en el aislamiento de hepatocitos (154-158).

5.- Los **parámetros analíticos** influyen de forma diferente en el aislamiento de los hepatocitos.

- En nuestra serie, las cifras de **glucemia** en sangre influyen de forma negativa y estadísticamente significativa en la viabilidad de los hepatocitos, siendo menor la viabilidad cuanto mayor es la cifra de glucemia en sangre; sin embargo el estudio multivariante no demuestra significación estadística. No existen datos en la literatura que analicen la influencia de esta variable en el resultado del aislamiento de los hepatocitos.

- El análisis de la influencia las cifras de bilirrubina, GOT, GPT, FA y GGT en el aislamiento y cultivo de los hepatocitos, tiene un gran interés dado que sus valores son un fiel reflejo del grado de citolisis y de colestasis existente.

En nuestra serie, las cifras de **bilirrubina** influyen de forma negativa a la hora de obtener una viabilidad del aislamiento superior al 70% y en la actividad testosterona-6- $\beta$  hidroxilasa del aislamiento. Los donantes con valores de bilirrubina superiores a 1 mg/dL, presentan una viabilidad inferior al 70% en el aislamiento y el resultado se mantiene al realizar el análisis multivariante. Sólo el estudio del grupo de Lloyd *et al.* 2004 (155) encuentra en su estudio una influencia negativa de las cifras de bilirrubina en la viabilidad del aislamiento, sin especificar si este resultado tiene significación estadística. La bilirrubina es tóxica y ello puede justificar que valores altos de bilirrubina afecten negativamente la viabilidad de los hepatocitos aislados como se ha descrito en cultivos de hepatocitos (171).

En cuanto a las cifras de **GOT y GPT**, en nuestro estudio, observamos que cuanto mayor es su valor en sangre, menores son la viabilidad y rendimiento del aislamiento celular, así como mayor es la actividad de las enzimas ECOD y testosterona-6- $\beta$  hidroxilasa, aunque en el estudio estadístico sólo la GOT presenta

resultados significativos en el rendimiento del aislamiento, significación que se pierde en el análisis multivariante. Los rangos utilizados para analizar la GGT y la FA han sido establecidos de acuerdo con las cifras normales e iguales al grupo de Vondran *et al.* 2008 (157). La GGT dividida en rangos ofrece un resultado estadísticamente significativo al analizar la actividad testosterona-6- $\beta$  hidroxilasa, son aquellos pacientes con cifras de GGT entre 55 y 120 UI/L los que presentan mayor actividad enzimática (89,8 pmol/min/mg) en comparación con aquellos con cifras de GGT por debajo de 55 UI/L o por encima de 120 UI/L ( $p=0,04$ ). Los grupos de Lloyd *et al.* 2004 (155), Richert *et al.* 2004 (156) y Kawahara *et al.* 2010 (158) no encuentran influencia de éstos parámetros en el aislamiento, sin embargo el grupo de Alexandre *et al.* 2002 (154) describe que a mayores cifras de GGT, menor es el porcentaje de hígado digerido y menor el rendimiento del aislamiento ( $p<0,05$ ). El grupo de Vondran *et al.* 2008 (157) describe ante colestasis elevadas, una influencia negativa en el rendimiento y en la viabilidad, aunque sin significación estadística; sin embargo el análisis de las cifras de GGT de forma aislada, demuestra una disminución de la viabilidad ante valores de GGT superiores a 60 UI/L (157). El análisis de los distintos trabajos publicados indica que las enzimas hepáticas tienen influencia en el aislamiento, aunque existe mucha variabilidad entre los resultados (154,157).

- La **creatinina**, en nuestro estudio, influye de forma negativa y significativa en la actividad testosterona-6- $\beta$  hidroxilasa del aislamiento (sin corroborarse el resultado tras el análisis multivariante), pero no lo hace en el resto de variables estudiadas, resultado que coincide con las observaciones del grupo de Lloyd *et al.* 2004 (155).

- La **hemoglobina** y el **hematocrito**, en nuestra serie, influyen de forma negativa en la actividad enzimática, aunque sólo es estadísticamente significativo el resultado en el caso de la actividad testosterona-6- $\beta$  hidroxilasa. Además el hematocrito es la única variable que se mantiene estadísticamente significativa en el análisis multivariante de la actividad testosterona-6- $\beta$  hidroxilasa. Al incluir el hematocrito en el análisis multivariante de la actividad ECOD, ésta es la única variable con significación estadística ( $p=0,011$ ) junto con el sexo, que influye en la misma. Por lo tanto, a mayores cifras de hematocrito menor es la actividad ECOD y testosterona-6- $\beta$  hidroxilasa del aislamiento. Este hecho podría explicarse, con los conocimientos que tenemos actualmente, de la siguiente forma: A mayores cifras de hematocrito, existe mayor

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. No existen datos en la literatura que analicen la influencia de estas variables en el resultado del aislamiento de los hepatocitos.

- El porcentaje de **neutrófilos** influye de forma negativa y significativa en la viabilidad de los hepatocitos aislados de los DC. Aunque el resultado no mantiene la significación estadística tras el análisis multivariante, esto se podría explicar de manera que aquellos donantes con mayor porcentaje de neutrófilos podrían tener algún tipo de infección, y que este hecho, disminuya la viabilidad tras el aislamiento de los hepatocitos.

- El **Índice de Quick**, indicador de la función de síntesis hepática, influye de forma positiva en el rendimiento del aislamiento, con resultado estadísticamente significativo en nuestro estudio, de forma que a mayor índice de Quick, mayor es el rendimiento de los hepatocitos aislados. Además, este parámetro constituye una de las variables con valor pronóstico independiente, ya que mantiene la significación estadística en el análisis multivariante. El resultado entra dentro de lo esperable, dado que el índice de Quick es un fiel indicador del grado de reserva funcional hepática.

- El tiempo de **protrombina**, en nuestra serie, influye de manera positiva en la actividad ECOD del aislamiento ( $p=0,048$ ). Por el contrario, observamos que sólo el grupo de Vondran *et al.* 2008 (157) ha estudiado estas dos variables, y no encuentra influencia de los parámetros de coagulación en la viabilidad, rendimiento ni en la actividad ECOD del aislamiento.

La enorme variabilidad enzimática interindividual entre los diferentes seres humanos, debida a diferencias fenotípicas (consumo de drogas, alcohol, medicamentos, hábitos alimentarios, etc.) o genotípicas (polimorfismo genético de ciertas isoenzimas del P450), independiente del sexo o la edad, es un hecho conocido (4,71). Por tanto es difícil correlacionar los cambios de cualquier variable con los cambios en las

actividades enzimáticas, dejando abierto este punto a futuros estudios con mayor disponibilidad de datos.

#### 6.- Variables relacionadas con la intervención:

- Una de las variables estudiadas ha sido la patología de base que ha motivado la intervención del donante. En nuestro estudio la mayoría de las biopsias procedían de DV intervenidos por patología benigna, frente al resto de las series, en las que el aislamiento de hepatocitos se realizó de hígados provenientes de resecciones hepáticas, en su mayoría por metástasis (154-158).

- En nuestra serie, los donantes intervenidos por **patología maligna**, presentan menor viabilidad y rendimiento de los hepatocitos aislados que los donantes intervenidos por patología benigna ( $p > 0,05$ ), al igual que el grupo de Vondran *et al.* 2008 (157). Diferentes series analizadas por otros autores y descritas en la literatura, no encuentran influencias de la benignidad o malignidad de la patología por la que fueron intervenidos los donantes sobre la viabilidad y rendimiento celular (154-156,158). En cuanto a la actividad enzimática de los hepatocitos aislados, en nuestro estudio no encontramos influencias estadísticamente significativas de la benignidad o malignidad de la patología que condicionó la intervención sobre dicha actividad, al igual que se ha descrito en la serie analizada por Vondran *et al.* 2008 (157).

- En nuestro estudio, los donantes intervenidos por **metástasis hepáticas** (19%) presentan un menor rendimiento ( $p < 0,05$ ), que aquellos no intervenidos por metástasis (aunque pierde la significación estadística en el análisis multivariante). El grupo de Vondran *et al.* 2008 (157) no encuentra diferencias en su estudio en los resultados del aislamiento entre DV intervenidos por tumores primarios o metástasis hepáticas. Otros autores no encuentran diferencias en el aislamiento de donantes intervenidos o no por metástasis hepáticas (154-156,158). Esto puede ser debido a que la mayoría de estos autores incluyen series de donantes intervenidos fundamentalmente por metástasis. Lo mismo sucede con los resultados del grupo de Bhogal *et al.* 2011 (153), que no encuentra influencias del tipo de patología que condicionó la intervención, ya que más del 50% son hígados cirróticos.

- En nuestro estudio, los donantes a los que se ha realizado algún tipo de **resección hepática** presentan un rendimiento menor que aquellos a los que no se ha realizado resección hepática ( $p=0,00$ ). El rendimiento del aislamiento es una variable con valor pronóstico independiente, ya que mantiene la significación estadística en el análisis multivariante, a diferencia del resultado obtenido con la variable “metástasis hepáticas”; de modo que presentan peor rendimiento en el aislamiento aquellos pacientes a los que se ha realizado algún tipo de resección hepática, ya sea ésta menor o mayor. Este resultado podría estar en relación con el estado funcional de unos hepatocitos patológicos.

Observamos también, que los DV intervenidos por metástasis hepáticas y aquellos a los que se ha realizado algún tipo de resección hepática, presentan mayor actividad testosterona-6- $\beta$  hidroxilasa en el aislamiento de hepatocitos ( $p=0,010$  y  $p=0,036$  respectivamente), aunque al incluir las variables en el análisis multivariante, ambas pierden la significación estadística.

- La **maniobra de Pringle** expone al hígado a una isquemia caliente, sin embargo esta maniobra no se realiza de forma sistemática en todas las cirugías hepáticas.

Los donantes sometidos a **isquemia caliente** durante la intervención, en nuestra serie, presentan menor viabilidad y el rendimiento del aislamiento, aunque sólo en el caso del rendimiento los resultados son estadísticamente significativos, y no hay diferencias en cuanto al tipo de isquemia (continua o intermitente). En el análisis multivariante del rendimiento del aislamiento, vemos que la variable “isquemia caliente” pierde toda significación estadística ( $p=0,990$ ).

El **tiempo de isquemia caliente**, no influye significativamente en la viabilidad o la actividad enzimática de los hepatocitos aislados, pero sin embargo sí influye de forma negativa y significativa en el rendimiento del aislamiento, aunque el resultado no se mantiene en el análisis multivariante.

En nuestro estudio sólo en un 14% de los donantes se realizó clampaje del pedículo en algún momento de la intervención, y en estos casos el rango de isquemia caliente se sitúa entre 0 y 240 minutos. Hemos podido establecer un punto de corte en

30 minutos para la isquemia caliente, por encima del cual el rendimiento disminuye de forma estadísticamente significativa.

Coincidiendo con nuestros resultados, Alexandre *et al.* 2002 (154) demuestran menor rendimiento del aislamiento en aquellos donantes sometidos a clampaje del pedículo, independientemente de si éste ha sido continuo o intermitente, y además detecta un descenso en el rendimiento del aislamiento cuando el tiempo de isquemia caliente es superior a 30 minutos, aunque sin significación estadística. Kawahara *et al.* 2010 (158) demuestran en su estudio la influencia negativa de la isquemia caliente y el tiempo de la misma en la viabilidad del aislamiento, pero no en el rendimiento. Sin embargo estos resultados se oponen a los presentados por otros, que no encuentran influencia de la isquemia caliente en el aislamiento (155,157). Una vez más existe disparidad entre los resultados de los diferentes grupos y esto podría justificarse por la diferencia en la duración de los períodos de isquemia y de descanso durante la maniobra de Pringle.

Al analizar conjuntamente las variables relacionadas con la intervención (resección hepática, metástasis hepáticas, isquemia caliente) y la administración o no de QT preoperatoria, observamos que en el análisis multivariante en el caso del rendimiento, la única variable que mantiene la significación estadística es el hecho de haberse realizado o no una resección hepática. Los donantes a los que se ha hecho algún tipo de resección hepática (sea esta mayor o menor), presentan menor rendimiento en el aislamiento ( $p < 0,05$ ), por tanto, debe existir algún factor relacionado con lo que sucede durante la cirugía en una resección hepática, que es lo que realmente marca el hecho de que el rendimiento sea menor, independientemente de si ha recibido QT, ha tenido isquemia caliente o está operado de metástasis hepáticas.

#### 7.- Variables relacionadas con la biopsia:

- La **esteatosis hepática** puede ser caracterizada de forma cualitativa y cuantitativa. La evaluación cuantitativa está basada en el porcentaje de hepatocitos que contienen inclusiones de grasa en el citoplasma, pudiendo clasificarse en dos grupos: esteatosis macrovesicular y microvesicular (163,172). La esteatosis del injerto constituye un factor importante a la hora de la realización de un TH, dado que influye en el

funcionamiento del injerto hepático. La presencia de una esteatosis severa (>60%) está asociada a disfunción primaria del injerto (172-174), motivo por el cual, la esteatosis es un factor ampliamente estudiado y que consideramos de gran importancia en el aislamiento de los hepatocitos.

En nuestro estudio la presencia de esteatosis en la biopsia implica un menor rendimiento y actividad ECOD en el aislamiento, aproximándose el resultado a la significación estadística ( $p=0,056$  y  $p=0,062$  respectivamente). Nuestros resultados concuerdan con los de otros grupos que describen mayor rendimiento y viabilidad en las biopsias sin esteatosis aunque sin significación estadística (153,156-158). Alexandre *et al.* 2002 (154) encuentran influencia de la esteatosis únicamente en el rendimiento del aislamiento, sin ser tampoco el resultado estadísticamente significativo.

Sin embargo, el grupo de Lloyd *et al.* 2004 (155) obtiene resultados claros: las biopsias con esteatosis presentan mayor viabilidad (88%) ( $p=0,035$ ), aunque este grupo realiza la estimación de la esteatosis de forma visual, criterio subjetivo, que podría explicar las diferencias de los resultados.

En nuestra serie, la mayoría de los DV (85,3%) no presentaban esteatosis; el resto de casos (14,7%) sí presentaba esteatosis, pero sólo en 2 donantes la esteatosis era superior al 40%, lo cual representa un porcentaje muy pequeño del total, que podría justificar que los resultados carezcan de significación estadística. Recientes estudios sugieren que la adición de N-acetilcisteína al líquido de perfusión puede mejorar el rendimiento del aislamiento de los hepatocitos procedentes de hígados esteatósicos (175).

- El **peso de la muestra** en nuestra serie influye únicamente en la actividad testosterona-6- $\beta$  hidroxilasa. Sin embargo el aumento de tamaño del tejido influye de forma negativa en el rendimiento del aislamiento, aunque sin significación estadística. Ello se explica por el hecho de que a medida que la muestra es mayor, el acceso del líquido de perfusión a las zonas más distales del tejido hepático es más costoso y por tanto el rendimiento disminuye.

Al comparar los resultados con los otros grupos observamos cierta disparidad. Kawahara *et al.* 2010 (158) describen una influencia negativa estadísticamente significativa entre el peso de la biopsia y el rendimiento del aislamiento. Richert *et al.* 2004 (156) describen una disminución del rendimiento con biopsias cuyo peso es superior a 150 g y sin embargo observan un rendimiento mayor en las biopsias con pesos comprendidos entre los 50g y los 100 g, aunque sus resultados no son estadísticamente significativos. Para otros autores (155), el peso de la biopsia influye de forma significativa en la viabilidad del aislamiento y en el rendimiento, de manera que las biopsias entre 51 y 75 g presentan mayor viabilidad. Los resultados no son del todo equiparables a los nuestros, ya que los grupos de Lloyd *et al.* 2004 (155) y Richert *et al.* 2004 (156) incluyen en su análisis DC y DV, procediendo las biopsias de estos últimos de resecciones hepáticas, con lo cual la media del peso de sus muestras (175 g) es mucho mayor que el de las nuestras (5,07 g).

Otros autores (154) difieren en sus resultados, en los que el peso de la biopsia no influye ni en la viabilidad ni en el rendimiento del aislamiento, pero sí lo hace de forma negativa en el porcentaje de hígado digerido, de forma que biopsias con peso superior a 100 g presentan menor porcentaje de hígado digerido ( $p < 0,05$ ).

### **V.3. DONANTES CADÁVER: variables predictoras o independientes de los donantes que influyen en los resultados del aislamiento de los hepatocitos.**

Las características y antecedentes personales de los DC fueron ampliamente estudiadas en nuestra serie:

1.- La **edad y el sexo** son unos de los parámetros más estudiados por los autores. En nuestro estudio los pacientes de mayor edad presentan menor actividad testosterona-6- $\beta$  hidroxilasa ( $p < 0,05$ ). El resto de variables analizadas no influyen en el aislamiento en nuestra serie. Ni el grupo de Alexandrova *et al.* 2005 (81) ni Bonora-Centelles *et al.* 2010 (165) en sus respectivos estudios encuentran influencias de la edad ni el sexo en el aislamiento de los hepatocitos. Sólo el grupo de Groothuis *et al.* 1995 (159) encuentra una influencia negativa con significación estadística de la edad en el rendimiento del aislamiento. El resto de grupos no analiza estas variables (69,74,79).

2.- Del resto de variables analizadas, los donantes que tomaban **medicación** previamente a la donación del órgano y aquellos con mayor **IMC**, presentan menor actividad testosterona-6- $\beta$  hidroxilasa ( $p < 0,05$ ). El **tiempo en UCI** influye negativamente en la viabilidad y en el rendimiento, pero sólo es estadísticamente significativo en el caso de la viabilidad. De esta manera podemos establecer un tiempo límite de estancia en UCI en 72 horas, ya que los hepatocitos de los DC con estancias en UCI inferiores a 72 horas tienen una viabilidad media del 76% frente al 50% que presentan aquellos con estancias en UCI superiores a las 72 horas ( $p = 0,028$ ). Sólo Hughes *et al.* 2006 (74) analizan este parámetro sin encontrar influencias significativas en el resultado del aislamiento. Cabe reseñar también en nuestro estudio, que aquellos DC que han recibido **antibióticos** durante su estancia en UCI tienen menor viabilidad y rendimiento en el aislamiento de los hepatocitos ( $p = 0,087$  y  $p = 0,05$  respectivamente). Quizás esto sea debido a que algunos antibióticos se metabolizan en el hígado y esto influye de alguna manera en el aislamiento. No podemos comparar nuestros resultados con los del resto de grupos, ya que ninguno ha analizado la influencia de estas variables en el aislamiento de hepatocitos (79,81,159,165). La explicación de los resultados se podría deber a que una mayor estancia en UCI supone una mayor administración de medicamentos y un deterioro progresivo de los donantes. Sin embargo, tanto el tiempo de estancia en UCI como la administración de antibióticos en la unidad, pierden la significación estadística al incluirlas en el análisis multivariante.

3.- Analizando los diferentes **parámetros analíticos** observamos que ninguno tiene una influencia significativa en la viabilidad; únicamente merece ser mencionado un factor: el sodio, y en concreto las cifras de **sodio** superiores a 160 mEq/L, ya que de aquellos DC con natremias inferiores a 160 mEq/L, el 77,8% tienen viabilidades superiores al 70%, aunque el resultado no alcanza la significación estadística ( $p = 0,099$ ). Al analizar la influencia de los parámetros analíticos en el rendimiento, observamos que los valores de sodio sí influyen estadísticamente y de forma negativa en el rendimiento del aislamiento tanto en el análisis univariante como multivariante. Observamos que estos resultados se correlacionan con lo estudiado en los DC para TH, puesto que orientan sobre el estado y el buen funcionamiento del injerto y pueden ser determinantes a la hora de aceptar o rechazar a un paciente como donante para TH, ya que donantes con cifras elevadas de sodio en sangre son considerados subóptimos (176). Vemos por tanto,

que en cierto modo, las cosas son parecidas para el aislamiento de hepatocitos, ya que los resultados son peores cuando la natremia es superior a los 160 mEq/L.

- Las cifras de **glucemia** superiores a 120 mg/dL también influyen negativamente en el rendimiento del aislamiento, siendo la media de 6,20 cel/g x10<sup>6</sup> frente al 16,69 cel/g x10<sup>6</sup> de los DC con glucemias inferiores a 120 mg/dL (p=0,006).

- Del resto de parámetros analíticos estudiados: en nuestra serie se observa que a mayor **porcentaje de neutrófilos**, menor es el rendimiento del aislamiento (p=0,008). Esta variable se mantiene como factor pronóstico independiente en el análisis multivariante, por tanto, vemos que posiblemente el hecho importante en relación al rendimiento del aislamiento de hepatocitos, no es la estancia en UCI, ni la administración de antibióticos sino posiblemente, el hecho de presentar algún tipo de infección en el momento de la donación. La actividad ECOD de los hepatocitos se ve influenciada por las cifras de **potasio** en sangre y **fosfatasa alcalina** (FA), siendo mayor la actividad ECOD cuanto mayores son estos dos valores (p<0,05). Tampoco en este caso podemos comparar con el resto de autores (74,79,81,159,165).

4.-Las variables relacionadas con el **proceso de preservación hepática** son, las que a priori, parecen más interesantes en el grupo de los DC, ya que podríamos influir en ellas de uno u otro modo.

- En nuestra serie, el **tiempo de isquemia fría** influye negativamente y de forma estadísticamente significativa tanto en la viabilidad como en el rendimiento del aislamiento de los hepatocitos como era de esperar. Sin embargo, tanto la viabilidad como el rendimiento son mayores con tiempos de isquemia fría entre 300 y 699 minutos (5 y 11 h), siendo los resultados de viabilidad y rendimiento peores con isquemias frías por debajo de 300 minutos y por encima de 700 minutos. Quizás esto podría interpretarse, aunque con cautela, como que cierto grado de isquemia fría podría favorecer el resultado del aislamiento de hepatocitos. Por tanto hemos establecido un punto de corte en 700 minutos, por debajo del cual la viabilidad media de los hepatocitos asciende al 85% y el rendimiento a 9,83 cel/g x10<sup>6</sup>, frente al 53% de viabilidad y 4,88 cel/g x10<sup>6</sup> de rendimiento si la isquemia fría es superior a 700 minutos (p<0,05). Al igual que hemos comentado previamente, al establecer como punto de

corte una viabilidad del 70%, vemos que las biopsias con viabilidades superiores a este valor tenían un tiempo de isquemia fría menor (544,20 minutos de media), frente a 799,55 minutos de las biopsias con viabilidades inferiores al 70% ( $p=0,044$ ). En nuestro estudio, el tiempo de isquemia fría se mantiene como variable con valor pronóstico independiente al realizar el análisis multivariante tanto en el caso de la viabilidad como en el rendimiento del aislamiento.

Al comparar nuestros resultados con los de otros grupos, observamos que Lloyd *et al.* 2004 (155) no pueden establecer relación entre la isquemia fría y la viabilidad o el rendimiento del aislamiento, debido al escaso número de pacientes incluidos. El grupo de Baccarani *et al.* 2003 (79) no analiza el tiempo de isquemia fría en su estudio. Nuestros resultados son similares a los obtenidos por Hughes *et al.* 2006 (74) y Alexandrova *et al.* 2005 (81), ya que ambos observan una influencia negativa del tiempo de isquemia fría en la viabilidad, pero al contrario que lo obtenido en nuestros resultados, no ven influencias del tiempo de isquemia fría en el rendimiento del aislamiento. El grupo de Alexandrova *et al.* 2005 (81), subdivide sus DC en cuatro grupos según el tiempo de isquemia fría, y sí encuentra diferencias estadísticamente significativas en la viabilidad del aislamiento al comparar los grupos entre sí, viendo que aquellos donantes con tiempos de isquemia fría inferiores a 10 horas (600 min), presentan mayor viabilidad en el aislamiento (75%), (resultado algo peor al obtenido por nuestro grupo), y aquellos con tiempos de isquemia fría superiores a 20 horas (1200 min) presentan un descenso importante en la viabilidad del aislamiento (51%). También Bonora-Centelles *et al.* 2010 (165) en su estudio demuestran una peor viabilidad en el aislamiento a partir de 900 minutos (15 h) de isquemia fría. En nuestra serie sólo había 5 casos con isquemias superiores a 900 minutos y tres de ellos presentaban viabilidades superiores al 66%. El hecho de que en nuestra serie haya tan pocos casos con isquemias elevadas es debido a que se dejaron de utilizar esos hígados para obtener biopsias como ya se ha apuntado anteriormente. Quizás si tuviéramos más casos con isquemias superiores a 900 minutos el resultado en cuanto a la viabilidad del aislamiento habría sido estadísticamente significativo a partir de ese tiempo de isquemia. Por ello en nuestro estudio hemos establecido como punto de corte 700 minutos (11 h).

- El **líquido de perfusión** del órgano ha sido analizado ya que podría ser un factor importante en el posterior aislamiento de hepatocitos. El tipo de líquido ha sido

estudiado en el caso de los DC en relación a la función posterior del injerto tras TH; no se han podido demostrar diferencias significativas en la función del injerto según la utilización de solución de Celsior o solución de Wisconsin (87,174). En nuestro estudio observamos que los resultados del aislamiento de las biopsias de órganos perfundidos con solución Celsior son mejores que los de las biopsias de órganos perfundidos con solución de Wisconsin, tanto en viabilidad como en rendimiento, aunque el resultado no alcanza la significación estadística en el análisis univariante.

Sin embargo, buscando un punto de corte en la viabilidad como indicador de un buen aislamiento, vemos que el líquido de perfusión sí influye, de forma estadísticamente significativa, en el hecho de obtener una viabilidad por encima del 70% a favor de la solución tipo Celsior, de forma que el 94,1% de las biopsias perfundidas con ésta solución tienen una viabilidad superior al 70% y sólo un 47,4% de las biopsias perfundidas con Wisconsin tienen una viabilidad por encima del 70% ( $p=0,002$ ). Al incluir la variable en el análisis multivariante, observamos una vez más que se mantiene con valor pronóstico independiente (a favor de la solución de preservación Celsior) en el caso de la viabilidad pero no en el rendimiento. Resultados similares obtienen Serralta *et al.* 2005 (85), en su estudio con 30 pacientes, compara los resultados del aislamiento en dos grupos (biopsias perfundidas con solución tipo Celsior y con solución tipo Wisconsin), y obtiene mejor viabilidad y rendimiento en el aislamiento celular de las biopsias perfundidas con Celsior, sin encontrar influencias en la actividad enzimática del aislamiento; este resultado podría estar relacionado con la menor viscosidad de la solución de Celsior frente a la de Wisconsin, lo que conllevaría una mejor perfusión de la biopsia en zonas más distales y en definitiva, una mejor preservación celular con la consiguiente obtención de una mayor viabilidad y rendimiento.

5.- En cuanto a las **variables relacionadas con la biopsia**, la esteatosis es también un factor ampliamente estudiado en los DC para TH, y es un factor importante ya que una esteatosis severa (>60%) está asociada a disfunción primaria del injerto (172-174). En nuestro grupo el 91,7% de los DC presentaron una **esteatosis** inferior al 30%. Ningún donante presentó una esteatosis superior al 60%. Ésta es la diferencia más significativa con el resto de grupos (74,79,81,159,165). Las series de Baccarani *et al.* 2003 (79) y Alexandrova *et al.* 2005 (81) no son del todo comparables a la nuestra, ya que son

órganos rechazados para TH en su mayor parte por presentar una esteatosis macrovesicular superior al 60% y cirrosis, centrándose el análisis en la comparación de la viabilidad y rendimiento del aislamiento entre hígados cirróticos y esteatósicos. En nuestra serie, contamos con hígados que han sido trasplantados en todos los casos y la cirrosis constituye un criterio de exclusión.

- En nuestro estudio el **porcentaje de esteatosis** de la biopsia no influye en ninguna de las variables estudiadas, sin embargo Bonora-Centelles *et al.* 2010 (165) concluyen que los hígados con esteatosis superiores al 40% presentan peores cifras de viabilidad con respecto a los hígados normales ( $p < 0,001$ ).

- El **peso de la muestra** en nuestra serie, influye de forma significativa únicamente en el rendimiento del aislamiento, siendo éste mayor en las biopsias más pesadas. Ninguno de los otros grupos ha analizado esta variable por lo tanto no podemos comparar los resultados (74,79,81,159,165). Observamos sin embargo, que en los DV de nuestro estudio, el peso de la muestra influye de forma negativa en el rendimiento del aislamiento (aunque sin significación estadística), al contrario que los resultados obtenidos en los DC. Posiblemente se pueda encontrar una explicación, ya que la media del peso de la muestra en los DV es de 5,07 g, con un rango entre 0,3-50 g, y en los DC el peso medio de la muestra es de 2,65 g, siendo la muestra más pesada en estos DC de 12 g). Quizás hasta 12 g de peso de la muestra el rendimiento aumenta, y es por encima de ese peso cuando la biopsia deja de profundirse bien y el rendimiento cae (como sucede en los DV).

○ A modo de resumen y de síntesis final de este estudio, podemos decir que la viabilidad del aislamiento es el mejor parámetro para la evaluación de la calidad del tejido hepático aislado con la finalidad de la realización del TCH. El rendimiento es menos importante, ya que un rendimiento bajo puede asociarse a una viabilidad elevada. La actividad enzimática del aislamiento da una idea del estado funcional de las células, pero no es determinante a la hora de seleccionar unos hepatocitos para el TCH.

En nuestro medio contamos con dos grandes fuentes potenciales de donantes de hepatocitos, los DV y los DC. La obtención de hepatocitos de ambos grupos de donantes presenta sus limitaciones. En el caso de los DV, hasta el momento sólo se ha

realizado el aislamiento de hepatocitos en el seno de estudios y con la consiguiente aprobación por parte del donante y con las lógicas limitaciones del volumen hepático donado; y en el caso de los DC, el uso de hepatocitos para aislamiento celular se ve limitado por la escasez de donantes cadavéricos y la excesiva demanda de ellos por parte de pacientes en lista de espera para trasplante ya que estos órganos de entrada son prioritarios para el trasplante de órgano entero.

Según nuestro estudio ambos grupos son diferentes en cuanto a las características clínicas, antecedentes personales, parámetros analíticos, etc.

Al analizar la influencia de los factores de los donantes en el aislamiento celular, tras el análisis univariante en los DV, podemos concluir que los resultados del aislamiento son mejores en aquellos donantes que presentan menor IMC, menores valores en sangre de glucosa, bilirrubina total, GOT, neutrófilos, mayor índice de Quick, aquellos donantes a los que no se ha realizado una resección hepática, aquellos que no están intervenidos por metástasis hepáticas y aquellos que han presentado menor tiempo de isquemia caliente durante la cirugía.

En el caso de los DC, tras el análisis univariante podemos concluir que los resultados del aislamiento son mejores en aquellos donantes que han permanecido menos tiempo en UCI (menos de 72 horas), aquellos con menor tiempo de isquemia fría (menor a 700 minutos), aquellos donantes en los que se ha empleado solución tipo Celsior para la perfusión y preservación del hígado, los donantes con biopsias más pesadas, y aquellos DC con menores valores en sangre de glucosa, sodio y neutrófilos.

Tras analizar los dos grupos conjuntamente, el resultado más relevante de nuestro estudio es el hecho de que los DV son los que tienen hepatocitos de mayor calidad en cuanto a los resultados de viabilidad y rendimiento del aislamiento, con una viabilidad media 90,11% y un rendimiento medio de 12,87 cel/g  $\times 10^6$ , frente al 67,17% de viabilidad media y 7,08 cel/g  $\times 10^6$  de rendimiento medio en los DC ( $p=0,000$  y  $p=0,002$  respectivamente). Por tanto podemos concluir que los **DV son los mejores donantes de hepatocitos**; y basándonos en nuestros resultados del análisis multivariante, a la hora de la elección deberíamos seleccionar aquellos DV con menor IMC, aquellos a los que no se les haya realizado una resección hepática, donantes que

no hayan recibido quimioterapia, que presenten cifras de bilirrubina por debajo de 1 mg/dL y que tengan mayores valores de índice de Quick.

El hecho de que los DV sean los mejores donantes de hepatocitos, podría abrir un nuevo campo en el ámbito de la medicina y la cirugía, y es la posibilidad de la donación programada y altruista de tejido hepático por parte de donantes vivos y sanos, con lo que se podría disponer de mayor cantidad de hepatocitos aislados y de calidad con la finalidad del trasplante celular hepático.

## **VI. CONCLUSIONES.**



## **VI. CONCLUSIONES:**

- 1. Existen grandes diferencias entre las características de los DV y DC.**
  
- 2. Los donantes vivos presentan mayor viabilidad y rendimiento tras el aislamiento de hepatocitos que los donantes cadáver.**
  
- 3. Existen características relacionadas con el DV que influyen en el aislamiento y cultivo de hepatocitos de forma independiente:**
  - **Sobre la viabilidad celular:** el IMC, los valores de bilirrubina <1 mg/dL y la quimioterapia preoperatoria,.
  - **Sobre el rendimiento:** el Índice de Quick y la resección hepática.
  - **Sobre la actividad ECOD:** el sexo y los valores de hematocrito.
  - **Sobre la actividad Testosterona-6- $\beta$  hidroxilasa:** los valores de hematocrito.
  
- 4. Existen características relacionadas con el DC que influyen en el aislamiento y cultivo de hepatocitos de forma independiente:**
  - **Sobre la viabilidad celular:** el tiempo de isquemia fría y el líquido de perfusión.
  - **Sobre el rendimiento:** el tiempo de isquemia fría y el líquido de perfusión.

En base a nuestros resultados y en respuesta a la hipótesis planteada en el estudio, podemos afirmar que:

**EXISTEN CARACTERÍSTICAS RELACIONADAS CON EL DONANTE Y FACTORES RELACIONADOS CON EL PROCESO DE OBTENCIÓN DE LOS HEPATOCITOS QUE INFLUYEN EN EL AISLAMIENTO Y CULTIVO DE LOS MISMOS.**



## **VII. BIBLIOGRAFÍA.**



## **VII. BIBLIOGRAFÍA:**

1. Rutkauskas S, Gedrimas V, Pundzius J, Barauskas G, Basevicius A. Clinical and anatomical basis for the classification of the structural parts of liver. *Medicina (Kaunas)* 2006;42(2):98-106.
2. Castell JV. Hígado: generalidades. En: *Enfermedades Digestivas*. Tomo III, Ed. Vinardell F, Rodes y otros. Ed. Aula Médica, Madrid-Barcelona 1998. p.1640-56.
3. Terés J, Sánchez-Tapias JM, Bordas JM, Bru C, Montaña X. Hepatología: generalidades. En: *Farreras-Rozman. Medicina Interna*. Vol 1. 13ª Edición. Ed. Harcourt Brace 1995. p. 267-80.
4. Gómez-Lechón MJ, Donato MT, Castell JV, Jover R. Human hepatocytes as a tool for studying toxicity and drug metabolism. *Curr Drug Metab* 2003 Aug;4(4):292-312.
5. Gupta S, Chowdhury JR. Therapeutic potencial of hepatocyte transplantation. *Semin Cell Dev Biol* 2002 Dec;13(6):439-46.
6. Guyton AC, Hall JE. Funciones secretoras del aparato digestivo. En: *Tratado de fisiología médica*. 9ª Edición. Ed. McGraww-Hill, Interamericana; 1996. p.883-902.
7. 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 Mª José Gómez-Lechón. Madrid 2004. p 29-62.
8. Berenguer M, Carrión JV, Berenguer J. Indicaciones de trasplante en la cirrosis. En: *El trasplante hepático*. Ed. Generalitat Valenciana. Conselleria de Sanitat, 2001. p. 23-34.
9. Rust C. and Gores G.J. Hepatocyte transplantation in Acute Liver Failure: A New Therapeutic Option for the Next Millennium?. *Liver Transpl* 2000 Jan;6(1):41-3.
10. Abbasoglu O. Liver transplantation: yesterday, today and tomorrow. *World J Gastroenterol*. 2008 May 28;14(20):3117-22.
11. Mitry RR, Hughes RD, Dhawan A. Progress in human hepatocytes: isolation, culture and cryopreservation. *Semin Cell Dev Biol* 2002 Dec;13(6):463-7.
12. Mitry R. Dhawan A. Hepatocyte transplantation from bench to the bedside. *BIMDG Bulletin* Autum 2002:1-4.

13. Mazaris EM, Roussos CT, Papalois VE. Hepatocyte transplantation: a review of worldwide clinical developments and experiences. *Exp Clin Transplant* 2005 Jun;3(1):306-15.
14. Dhawan A, Mitry RR, Hughes RD, Lehec S, Terry C, Bansal S, Arya R, Wade JJ, Verma A, Heaton ND, Rela M, Mieli-Vergani G. Hepatocyte transplantation for inherited factor VII deficiency. *Transplantation* 2004 Dec 27;78(12):1812-4.
15. Kobayashi N. Life support of artificial liver: development of bioartificial liver to treat liver failure. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2009;16(2):113-7.
16. Yu CB, Pan XP, Li LJ. Progress in bioreactors of bioartificial livers. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2009 Apr;8(2):134-40.
17. Gerlach JC, Mutig K, Sauer IM, Schrade P, Efimova E, Mieder T, Naumann G, Grunwald A, Pless G, Mas A, Bachmann S, Neuhaus P, Zeilinger K. Use of primary human liver cells originating from discarded grafts in a bioreactor for liver support therapy and the prospects of culturing adult liver stem cells in bioreactors: a morphologic study. *Transplantation* 2003 Sep 15;76(5):781-6.
18. Catalina-Rodríguez MV, Bañares-Vañizares R. Artificial liver support systems: update on albumin dialysis (MARS). *Gastroenterol Hepatol* 2005 Oct;28(8):453-60.
19. Lafuente S, Bertran MJ, Escorsell A. [Artificial liver support. Literature review]. *Med Clin (Barc)*. 2011 Apr 23;136(11):484-7.
20. Starzl TE. Orthotopic heterotransplantation. En: *Experience in Hepatic Transplantation*. Ed. Starzl TE, Philadelphia: WB Saunders 1969. p 408.
21. Cooper DK. A brief history of cross-species organ transplantation. *Proc (Bayl Univ Med Cent)*. 2012 Jan;25(1):49-57.
22. Taléns-Visconti R, Bonora-Centelles A, Castell JV, Gómez-Lechón MJ. Alternative sources of hepatocytes for cell therapy. *Gastroenterol Hepatol* 2006 Jun-Jul;29(6):366-76.
23. Strom SC, Fisher RA, Thompson MT, Sanyal AJ, Cole PE, Ham JM, Posner MP. Hepatocyte transplantation as a bridge to orthotopic liver transplantation in terminal liver failure. *Transplantation* 1997 Feb 27;63(4):559-69.
24. Ostrowska A, Bode DC, Pruss J, Bilir B, Smith GD, Zeisloft S. Investigation of functional and morphological integrity of freshly isolated and cryopreserved human hepatocytes. *Cell Tissue Bank* 2000;1(1):55-68.

25. Bruzzone P, Strom SC. Historical aspects of hepatocyte transplantation. *Transplant Proc* 2006;38:1179–1180.
26. Ryan EA, Lakey JR, Rajotte RV, Korbutt GS, Kin T, Imes S, Rabinovitch A, Elliott JF, Bigam D, Kneteman NM, Warnock GL, Larsen I, Shapiro AM. Clinical outcomes and insulin secretion after islet transplantation with the Edmonton protocol. *Diabetes* 2001 Apr;50(4):710-9.
27. Lakey JR, Warnock GL, Rajotte RV, Ao Z, Suarez-Almazor ME, Shapiro AM, Kneteman NM. Factors in cadaveric donors that affect recovery of human islets of Langerhans. *Transplant Proc* 1995 Dec;27(6):3265.
28. Lakey JR, Warnock GL, Rajotte RV, Suarez-Alamazor ME, Ao Z, Shapiro AM, Kneteman NM. Variables in organ donors that affect the recovery of human islets of Langerhans. *Transplantation* 1996 Apr 15;61(7):1047-53.
29. Zeng Y, Torre MA, Karrison T, Thistlethwaite JR. The correlation between donor characteristics and the success of human islet isolation. *Transplantation* 1994 Mar 27;57(6):954-8.
30. Goss JA, Soltes G, Goodpastor SE, Barth M, Lam R, Brunicardi FC, Froud T, Alejandro R, Ricordi C. Pancreatic islet transplantation: the radiographic approach. *Transplantation* 2003 Jul 15;76(1):199-203.
31. Olthoff K.M. Hepatic regeneration in living donor liver transplantation. *Liver Transpl* 2003 Oct 9;10 Suppl 2:35-41.
32. Jaeschake H, Lemasters JJ. Apoptosis versus oncotic necrosis in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Gastroenterology* 2003 Oct;125(4):1246-57.
33. Ramírez P, Marín JM, Piñero A, Chávez-Cartaya R, Parrilla P. Experimental research applied to the clinical setting: liver ischemic-reperfusion. *Cir Esp* 2000;67:281-91.
34. Selzner N, Rudiger H, Graf R, Clavien PA. Protective strategies against ischemic injury of the liver. *Gastroenterology* 2003 Sep;125(3):917-36.
35. Fausto N, Campbell JS, Riehle KJ. Liver regeneration. *Hepatology* 2006 Feb 43;2 Suppl 1:45-53.
36. Michalopoulos GK, DeFrances MC. Liver regeneration. *Science* 1997 Apr 4;276(5309):60-6.

37. Strom SC, Fisher RA, Rubinstein WS, Barranger JA, Towbin RB, Charron M, Miele L, Pisarov LA, Dorko K, Thompson MT, Reyes J. Transplantation of human hepatocytes. *Transplant Proc* 1997 Jun;29(4):2103-6.
38. Strom S, Fisher R. Hepatocyte transplantation: New possibilities for therapy. *Gastroenterology* 2003 Feb;124(2):568-71.
39. Horslen SP, Fox IJ. Hepatocyte transplantation. *Transplantation* 2004 May 27;77(10):1481-6.
40. Laconi E, Laconi S. Principles of hepatocyte repopulation. *Semin Cell Dev Biol* 2002 Dec;13(6):433-8.
41. Zheng YW, Ohkohchi N, Taniguchi H. Quantitative evaluation of long-term liver repopulation and the reconstitution of bile ductules after hepatocellular transplantation. *World J Gastroenterol* 2005 Oct 21;11(39):6176-81.
42. Baccarani U, Adani GL, Sainz M, Donini A, Risaliti A, Bresadola F. Human hepatocyte transplantation for acute liver failure: state of the art and analysis of cell sources. *Transplant Proc* 2005 Jul-Aug;37(6):2702-4.
43. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL, Shay JW. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 1994 Dec 23;266:2011-5.
44. Wege H, Le HT, Chui MS, Liu L, Wu J, Giri R, Malhi H, Sappal BS, Kumaran V, Gupta S, Zern MA. Telomerase reconstitution immortalizes human fetal hepatocytes without disrupting their differentiation potential. *Gastroenterology* 2003 Feb;124(2):432-44.
45. Kobayashi N, Fujiwara T, Westerman KA, Inoue Y, Sakaguchi M, Noguchi H, Miyazaki M, Cai J, Tanaka N, Fox IJ, Leboulch P. Prevention of acute liver failure in rats with reversibly immortalized human hepatocytes. *Science* 2000 Feb 18;287:1258-62.
46. Tsuruga Y, Kiyono T, Matsushita M, Takahashi T, Kasai N, Matsumoto S, Todo S. Effect of intrasplenic transplantation of immortalized human hepatocytes in the treatment of acetaminophen-induced acute liver failure SCID mice. *Transplant Proc* 2008 Mar;40(2):617-9.
47. Haridass D, Narain N, Ott M. Hepatocyte transplantation: waiting for stem cells. *Curr Opin Organ Transplant* 2008 Dec;13(6):627-32.

48. Nagata H, Ito M, Cai J, Edge AS, Platt JL, Fox IJ. Treatment of cirrhosis and liver failure in rats by hepatocyte xenotransplantation. *Gastroenterology* 2003 Feb;124(2):422-31.
49. Vijayalakshmi V, Naseem B, Khan AA, Capoor AK, Habibullah CM. Comparison of biochemical and cytotoxic functions of hepatocytes from goat, pig and human fetuses. *J Gastroenterol Hepatol* 2004 Sep;19(9):1029-35.
50. Bissig KD, Le TT, Woods NB, Verma IM. Repopulation of adult and neonatal mice with human hepatocytes: a chimeric animal model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007 Dec 18;104(51):20507-11.
51. Régimbeau JM, Mallet VO, Bralet MP, Gilgenkrantz H, Houssin D, Soubrane O. Transplantation d'hépatocytes isolés: Principes, mécanismes, applications expérimentales et résultats chez l'homme. *Gastroenterol Clin Biol* 2002 ;26 :591-601.
52. Muraca M. Evolving concepts in cell therapy of liver disease and current clinical perspectives. *Dig Liver Dis* 2011 Mar;43(3):180-7.
53. Stutchfield BM, Forbes SJ, Wigmore SJ. Prospects for stem cell transplantation in the treatment of hepatic disease. *Liver Transpl* 2010 Jul;16(7):827-36.
54. Ellor S, Shupe T, Petersen B. Stem cell therapy for inherited metabolic disorders of the liver. *Exp Hematol* 2008 Jun;36(6):716-25.
55. Moon YJ, Yoon HH, Lee MW, Jang IK, Lee DH, Lee JH, Lee SK, Lee KH, Kim YJ, Eom YW. Multipotent progenitor cells derived from human umbilical cord blood can differentiate into hepatocyte-like cells in a liver injury rat model. *Transplant Proc* 2009 Dec;41(10):4357-60.
56. Piscaglia AC, Campanale M, Gasbarrini A, Gasbarrini G. Stem cell-based therapies for liver diseases: state of the art and new perspectives. *Stem Cells Int* 2010 Sep 1;2010:259461.
57. Kuai XL, Cong XQ, Li XL, Xiao SD. Generation of hepatocytes from cultured mouse embryonic stem cells. *Liver Transpl* 2003 Oct;9(10):1094-9.
58. Bonora-Centelles A, Jover R, Mirabet V, Lahoz A, Carbonell F, Castell JV, Gómez-Lechón MJ. Sequential hepatogenic transdifferentiation of adipose tissue-derived stem cells: relevance of different extracellular signaling molecules, transcription factors involved, and expression of new key marker genes. *Cell Transplant* 2009;18(12):1319-40.

59. Bonora-Centelles A, Jover R, Donato MT, Lahoz A, Pareja E, Castell JV, Mir J, Gómez-Lechón MJ. Desarrollo, análisis y optimización de modelos celulares hepáticos para estudios de fármaco-toxicología y terapia celular. *An R Acad Nac Farm* 2008; 74:283-306.
60. Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, Wang X, Finegold M, Weissman IL, Grompe M. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med* 2000 Nov;6(11):1229-34.
61. Oh SH, Miyazaki M, Kouchi H, Inoue Y, Sakaguchi M, Tsuji T, Shima N, Higashio K, Namba M. Hepatocyte growth factor induces differentiation of adult rat bone marrow cells into a hepatocyte lineage in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 2000 Dec 20;279(2):500-4.
62. Miyazaki M, Akiyama I, Sakaguchi M, Nakashima E, Okada M, Kataoka K, Huh NH. Improved conditions to induce hepatocytes from rat bone marrow cells in culture. *Biochem Biophys Res Commun* 2002 Oct 18;298(1):24-30.
63. Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, Jiang Y, Blackstad M, Lund T, Lenvik T, Johnson S, Hu WS, Verfaillie CM. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest* 2002 May;109(10):1291-302.
64. Miki T, Cai H, Lehmann T, et al. Production of hepatocytes from human amniotic stem cells. *Hepatology* 2002;36:20.
65. Min AD, Theise ND. Prospects for cell-based therapies for liver disease. *Panminerva Med* 2004 Mar;46(1):43-8.
66. Fausto N, Campbell JS. The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation. *Mech Dev.* 2003 Jan;120(1):117-30.
67. Oh SH, Hatch HM, Petersen BE. Hepatic oval 'stem' cell in liver regeneration. *Semin Cell Dev Biol.* 2002 Dec;13(6):405-9.
68. Mitry RR, Dhawan A, Hughes RD, Bansal S, Lehec S, Terry C, Heaton ND, Karani JB, Mieli-Vergani G, Rela M. One liver, three recipients: segment IV from split-liver procedures as a source of hepatocytes for cell transplantation. *Transplantation* 2004 May 27;77(10):1614-6.
69. Serralta A, Donato MT, Orbis F, Castell JV, Mir J, Gómez-Lechón MJ. Functionality of cultured human hepatocytes from elective samples, cadaveric grafts and hepatectomies. *Toxicol In Vitro* 2003 Oct-Dec;17(5-6):769-74.

70. Pareja E, Martínez A, Cortés M, Bonora A, Moya A, Sanjuán F, Gómez-Lechón MJ, Mir J. Hepatic cell transplantation. Technical and methodological aspects. *Cir Esp* 2010 Mar;87(3):139-47.
71. Gómez-Lechón MJ, Donato MT, Castell JV, Jover R. Human hepatocytes in primary culture: the choice to investigate drug metabolism in man. *Curr Drug Metab* 2004 Oct;5(5):443-62.
72. Baccarani U, Sainz-Barriga M, Adani GL, Risaliti A, Bresadola F, Donini A, Baccarani U, Sanna A, Bresadola F, Donini A. Human hepatocyte isolation for liver cell therapy: whole marginal livers or healthy segments from splitting? *Transplantation* 2005 Jan 27;79(2):249.
73. Haghghi KS, Woon WW, Akhter J, Marr PJ, Bolton E, Riordan S, Morris DL. A new source of hepatocytes for transplantation. *Transplant Proc* 2004 Oct;36(8):2466-8.
74. Hughes RD, Mitry RR, Dhawan A, Lehec SC, Girlanda R, Rela M, Heaton ND, Muiesan P. Isolation of hepatocytes from livers from non-heart-beating donors for cell transplantation. *Liver Transpl* 2006 May;12(5):713-7.
75. Chesné C, Guyomard C, Fautrel A, Poullain MG, Frémond B, De Jong H, Guillouzo A. Viability and function in primary culture of adult hepatocytes from various animal species and human beings after cryopreservation. *Hepatology* 1993 Aug;18(2):406-14.
76. Fisher RL, Gandolfi AJ, Brendel K. Human liver quality is a dominant factor in the outcome of in vitro studies. *Cell Biol Toxicol* 2001;17(3):179-89.
77. Gómez-Lechón MJ, Donato MT, Castell JV. Use of cultured hepatocytes to investigate drug metabolism and toxicity. *Toxicol In Vitro* 1997;10:63-70.
78. Donini A, Baccarani U, Piccolo G, Lavaroni S, Dialti V, Cautero N, Risaliti A, Degrassi A, Scalamogna M, Bresadola F. Hepatocyte isolation using human livers discarded from transplantation: analysis of cell yield and function. *Transplant Proc* 2001 Feb-Mar;33(1-2):654-5.
79. Baccarani U, Sanna A, Cariani A, Sainz-Barriga M, Adani GL, Zambito AM, Piccolo G, Risaliti A, Nanni-Costa A, Ridolfi L, Scalamogna M, Bresadola F, Donini A. Isolation of human hepatocytes from livers rejected for liver transplantation on a national basis: results of a 2-year experience. *Liver Transpl* 2003 May;9(5):506-12.

80. Baur H, Kasperek S, Pfaff E. Criteria of viability of isolated liver cells. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 1975 Jun;356(6):827-38.
81. Alexandrova K, Griesel C, Barthold M, Heuft HG, Ott M, Winkler M, Schrem H, Manns MP, Bredehorn T, Net M, Vidal MM, Kafert-Kasting S, Arseniev L. Large-scale isolation of human hepatocytes for therapeutic application. *Cell Transplant* 2005;14(10):845-53.
82. Audet M, Alexandre E, Mustun A, David P, Chenard-Neu MP, Tiollier J, Jaeck D, Cinqualbre J, Wolf P, Boudjema K. Comparative evaluation of Celsior solution versus Viaspan in a pig liver transplantation model. *Transplantation* 2001 Jun 27;71(12):1731-5.
83. Boggi U, Signori S, Vistoli F, Del Chiaro M, Pietrabissa A, Croce C, Barsotti M, Bartolo TV, Amorese G, Capocasale E, Della Valle R, Mazzone MP, Mosca F. University of Wisconsin solution versus Celsior solution in clinical pancreas transplantation. *Transplant Proc* 2005 Mar;37(2):1262-4.
84. Caruana M, Battle T, Fuller B, Davidson B. Isolation of human hepatocytes after hepatic warm and cold ischemia: a practical approach using University of Wisconsin solution. *Cryobiology* 1999 Mar;38(2):165-8.
85. Serralta A, Donato MT, Martinez A, Pareja E, Orbis F, Castell JV, Mir J, Gómez-Lechón MJ. Influence of preservation solution on the isolation and culture of human hepatocytes from liver grafts. *Cell Transplant* 2005;14(10):837-43.
86. Olinga P, Maring JK, Merema M, Hof IH, Slooff MJ, Meijer DK, Groothuis GM. The capability of isolated hepatocytes and liver slices of donor livers to predict graft function after liver transplantation. *Liver* 2000 Oct;20(5):374-80.
87. Lopez-Andujar R, Deusa S, Montalvá E, San Juan F, Moya A, Pareja E, DeJuan M, Berenguer M, Prieto M, Mir J. Comparative prospective study of two liver graft preservation solutions: University of Wisconsin and Celsior. *Liver Transpl*. 2009 Dec;15(12):1709-17.
88. Mitry RR, Hughes RD, Aw MM, Terry C, Mieli-Vergani G, Girlanda R, Muiesan P, Rela M, Heaton ND, Dhawan A. Human hepatocyte isolation and relationship of cell viability to early graft function. *Cell Transplant* 2003;12(1):69-74.
89. Donato MT, Castell JV, Gómez-Lechón MJ. Effect of model inducers on cytochrome P450 activities of human hepatocytes in primary culture. *Drug Metab Dispos* 1995 May;23(5):553-8.

90. Terry C, Dhawan A, Mitry RR, Lehec SC, Hughes RD. Optimization of the cryopreservation and thawing protocol for human hepatocytes for use in cell transplantation. *Liver Transpl* 2010 Feb;16(2):229-37.
91. Stéphenne X, Najimi M, Sokal EM. Hepatocyte cryopreservation: is it time to change the strategy? *World J Gastroenterol* 2010 Jan 7;16(1):1-14
92. Gómez-Lechón MJ, Fabra R, López P, Donato MT, Montoya A, Larrauri A, Trullenque R, Castell JV. Isolation and Culture of Human Hepatocytes from Surgical Liver Biopsies. En: *In Vitro Alternatives To Animal Pharmacotoxicology*. Castell JV, Gómez-Lechón MJ. eds. Ed. Farmaindustria, Madrid ;1992. p. 129-48.
93. Puppi J, Strom SC, Hughes RD, Bansal S, Castell JV, Dagher I, Ellis EC, Nowak G, Ericzon BG, Fox IJ, Gómez-Lechón MJ, Guha C, Gupta S, Mitry RR, Ohashi K, Ott M, Reid LM, Roy-Chowdhury J, Sokal E, Weber A, Dhawan A. Improving the Techniques for Human Hepatocyte Transplantation: Report from a Consensus Meeting in London. *Cell Transplant* 2011 Apr 1.
94. Gómez-Lechón MJ, Donato T, Ponsoda X, Fabra R, Trullenque R, Castell JV. Isolation, Culture and Use of Human Hepatocytes In Drug Research. En: *In Vitro Methods in Pharmaceutical Research*. Castell JV, Gómez-Lechón MJ. eds. Academic Press. London;1997. p. 129-54.
95. Ponsoda X, Pareja E, Gómez-Lechón MJ, Fabra R, Carrasco E, Trullenque R, Castell JV. Drug biotransformation by human hepatocytes. In vitro/in vivo metabolism by cells from the same donor. *J Hepatol* 2001 Jan;34(1):19-25.
96. Puppi J, Tan N, Mitry RR, Hughes RD, Lehec S, Mieli-Vergani G, Karani J, Champion MP, Heaton N, Mohamed R, Dhawan A. Hepatocyte transplantation followed by auxiliary liver transplantation--a novel treatment for ornithine transcarbamylase deficiency. *Am J Transplant* 2008 Feb;8(2):452-7.
97. Bilir BM, Guinette D, Karrer F, Kumpe DA, Krysl J, Stephens J, McGavran L, Ostrowska A, Durham J. Hepatocyte transplantation in acute liver failure. *Liver Transpl* 2000 Jan;6(1):32-40.
98. Habibullah CM, Syed IH, Qamar A, Taher-Uz Z. Human fetal hepatocyte transplantation in patients with fulminant hepatic failure. *Transplantation* 1994 Oct 27;58(8):951-2.
99. Burlina AB. Hepatocyte transplantation for inborn errors of metabolism. *J Inherit Metab Dis* 2004;27(3):373-83.

100. Akhter J, Johnson LA, Gunasegaram A, Riordan SM, Morris DL. Hepatocyte transplantation: a review of laboratory techniques and clinical experiences. *Surgeon* 2007 Jun;5(3):155-64.
101. Ostrowska A, Karrer FM, Bilir BM. Histological identification of purified and cryopreserved allogeneic hepatocytes following transplantation in a murine model without host immunosuppression. *Transpl Int* 1999;12(3):188-94.
102. Saudubray JM, Sedel F, Walter JH. Clinical approach to treatable inborn metabolic diseases: an introduction. *J Inher Metab Dis* 2006;29:261-74.
103. Campeau PM, Scriver CR, Mitchell JJ. A 25-year longitudinal analysis of treatment efficacy in inborn errors of metabolism. *Mol Genet Metab* 2008;95:11-6.
104. Sze YK, Dhawan A, Taylor RM, Bansal S, Mieli-Vergani G, Rela M, Heaton N. Pediatric liver transplantation for metabolic liver disease: experience at King's College Hospital. *Transplantation* 2009 Jan 15;87(1):87-93.
105. Vons C, Loux N, Simon L, Mahieu-Caputo D, Dagher I, Andreoletti M, Borgnon J, Di Rico V, Bargy F, Capron F, Weber A, Franco D. Transplantation of hepatocytes in nonhuman primates: a preclinical model for the treatment of hepatic metabolic diseases. *Transplantation* 2001 Sep 15;72(5):811-8.
106. Zavan B, Brun P, Vindigni V, Amadori A, Habeler W, Pontisso P, Montemurro D, Abatangelo G, Cortivo R. Extracellular matrix-enriched polymeric scaffolds as a substrate for hepatocyte cultures: in vitro and in vivo studies. *Biomaterials* 2005 Dec;26(34):7038-45.
107. Ohashi K, Kay MA, Kuge H, Yokoyama T, Kanehiro H, Hisanaga M, Ko S, Nagao M, Sho M, Nakajima Y. Heterotopically transplanted hepatocyte survival depends on extracellular matrix components. *Transplant Proc* 2005 Dec;37(10):4587-8.
108. Blaheta RA, Kronenberger B, Woitaschek D, Schick C, Oppermann E, Auth MK, Strain AJ, Weber S, Encke A, Markus BH. Interference of soluble mediators into liver matrix triggered dedifferentiation of human hepatocytes. *Transplant Proc* 1999 Feb-Mar;31(1-2):502-4.
109. Chen Y, Kobayashi N, Suzuki S, Soto-Gutierrez A, Rivas-Carrillo JD, Tanaka K, Navarro-Alvarez N, Fukazawa T, Narushima M, Miki A, Okitsu T, Amemiya H, Tanaka N. Transplantation of human hepatocytes cultured with deleted variant of hepatocyte growth factor prolongs the survival of mice with acute liver failure. *Transplantation* 2005 May 27;79(10):1378-85.

110. Selden C, Hodgson H. Cellular therapies for liver replacement. *Transpl Immunol* 2004 Apr;12(3-4):273-88.
111. Quaglia A, Lehec SC, Hughes RD, Mitry RR, Knisely AS, Devereaux S, Richards J, Rela M, Heaton ND, Portmann BC, Dhawan A. Liver after hepatocyte transplantation for liver-based metabolic disorders in children. *Cell Transplant* 2008;17(12):1403-14.
112. Vons C. Transplantation of isolated hepatocytes, is it an alternative for total liver transplantation? On the treatment of hereditary hepatic metabolic diseases. *J Chir (Paris)* 2001 Dec;138(6):342-6.
113. Fox IJ, Chowdhury JR, Kaufman SS, Goertzen TC, Chowdhury NR, Warkentin PI, Dorko K, Sauter BV, Strom SC. Treatment of the Crigler-Najjar syndrome type I with hepatocyte transplantation. *N Engl J Med* 1998 May 14;338(20):1422-6.
114. Brent L, Bain AG, Butler R, Horsburgh T, Opara SC, Wood PJ. The antigenicity of purified liver parenchyma cells. *Transplant Proc* 1981;13:860-2.
115. Dhawan A, Strom SC, Sokal E, Fox IJ. Human hepatocyte transplantation. *Methods Mol Biol.* 2010;640:525-34.
116. Muraca M, Gerunda G, Neri D, Vilei MT, Granato A, Feltracco P, Meroni M, Giron G, Burlina AB. Hepatocyte transplantation as a treatment for glycogen storage disease type 1a. *Lancet* 2002 Jan 26;359:317-8.
117. Smets F, Najimi M, Sokal EM. Cell transplantation in the treatment of liver diseases. *Pediatr Transplant* 2008 Feb;12(1):6-13.
118. Gewartowska M, Olszewski WL. Hepatocyte transplantation-biology and application. *Ann Transplant* 2007;12(1):27-36.
119. Kawashita Y, Guha C, Yamanouchi K, Ito Y, Kamohara Y, Kanematsu T. Liver repopulation: a new concept of hepatocyte transplantation. *Surg Today.* 2005;35(9):705-10.
120. Hughes RD, Mitry RR, Dhawan A. Hepatocyte transplantation for metabolic liver disease: UK experience. *J R Soc Med* 2005;98:341-345.
121. Strom SC, Chowdhury JR, Fox IJ. Hepatocyte transplantation for the treatment of human disease. *Semin Liver Dis* 1999;19(1):39-48.
122. Meyburg J, Hoerster F, Weitz J, Hoffmann GF, Schmidt J. Use of the middle colic vein for liver cell transplantation in infants and small children. *Transplant Proc.* 2008 May;40(4):936-7.

123. Darwish AA, Sokal E, Stephenne X, Najimi M, de Goyet Jde V, Reding R. Permanent access to the portal system for cellular transplantation using an implantable port device. *Liver Transpl* 2004 Sep;10(9):1213-5.
124. Nagata H, Ito M, Shirota C, Edge A, McCowan TC, Fox IJ. Route of hepatocyte delivery affects hepatocyte engraftment in the spleen. *Transplantation* 2003 Aug 27;76(4):732-4.
125. Fox IJ, Schafer DF, Yannam GR. Finding a home for cell transplants: location, location, location. *Am J Transplant* 2006 Jan;6(1):5-6.
126. Baldini E, Cursio R, De Sousa G, Margara A, Honiger J, Saint-Paul MC, Bayer P, Raimondi V, Rahmani R, Mouiel J, Gugenheim J. Peritoneal implantation of cryopreserved encapsulated porcine hepatocytes in rats without immunosuppression: viability and function. *Transplant Proc* 2008;40(6):2049-52.
127. Weber A, Groyer-Picard MT, Franco D, Dagher I. Hepatocyte transplantation in animal models. *Liver Transpl*. 2009 Jan;15(1):7-14.
128. Gupta S, Rajvanshi P, Sokhi R, Slehria S, Yam A, Kerr A, Novikoff PM. Entry and integration of transplanted hepatocytes in rat liver plates occur by disruption of hepatic sinusoidal endothelium. *Hepatology* 1999 Feb;29(2):509-19.
129. Allen KJ, Mifsud NA, Williamson R, Bertolino P, Hardikar W. Cell-mediated rejection results in allograft loss after liver cell transplantation. *Liver Transpl* 2008 May;14(5):688-94.
130. Lilja H, Arkadopoulos N, Blanc P, Eguchi S, Middleton Y, Meurling S, Demetriou AA, Rozga J. Fetal rat hepatocytes: isolation, characterization, and transplantation in the Nagase analbuminemic rats. *Transplantation* 1997 Nov 15;64(9):1240-8.
131. Oren R, Dabeva MD, Petkov PM, Hurston E, Laconi E, Shafritz DA. Restoration of serum albumin levels in nagase analbuminemic rats by hepatocyte transplantation. *Hepatology* 1999 Jan;29(1):75-81.
132. Yoshida Y, Tokusashi Y, Lee GH, Ogawa K. Intrahepatic transplantation of normal hepatocytes prevents Wilson's disease in Long-Evans cinnamon rats. *Gastroenterology* 1996 Dec;111(6):1654-60.
133. Allen KJ, Cheah DM, Wright PF, Gazeas S, Pettigrew-Buck NE, Deal YH, Mercer JF, Williamson R. Liver cell transplantation leads to repopulation and functional correction in a mouse model of Wilson's disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2004 Nov;19(11):1283-90.

134. Matas AJ, Sutherland DE, Steffes MW, Mauer SM, Sowe A, Simmons RL, Najarian JS. Hepatocellular transplantation for metabolic deficiencies: decrease of plasms bilirubin in Gunn rats. *Science* 1976 May 28;192:892-4.
135. Wiederkehr JC, Kondos GT, Pollak R. Hepatocyte transplantation for the low-density lipoprotein receptor-deficient state. A study in the Watanabe rabbit. *Transplantation* 1990 Sep;50(3):466-71.
136. Groth CG, Arborgh B, Björkén C, Sundberg B, Lundgren G. Correction of hyperbilirubinemia in the glucuronyltransferase-deficient rat by intraportal hepatocyte transplantation. *Transplant Proc* 1977 Mar;9(1):313-6.
137. Overturf K, Al-Dhalimy M, Tanguay R, Brantly M, Ou CN, Finegold M, Grompe M. Hepatocytes corrected by gene therapy are selected in vivo in a murine model of hereditary tyrosinaemia type I. *Nat Genet* 1996 Mar;12(3):266-73.
138. De Vree JM, Ottenhoff R, Bosma PJ, Smith AJ, Aten J, Oude Elferink RP. Correction of liver disease by hepatocyte transplantation in a mouse model of progressive familial intrahepatic cholestasis. *Gastroenterology* 2000 Dec;119(6):1720-30.
139. Michel JL, Rabier D, Rambaud C, Kamoun P, Brousse N, Vassault A, Pla M, Calise D, Revillon Y. Intrasplenic transplantation of hepatocytes in spf-ash mice with congenital ornithine transcarbamylase deficiency. *Chirurgie* 1993;119(10):666-71.
140. Kobayashi N, Ito M, Nakamura J, Cai J, Gao C, Hammel JM, Fox IJ. Hepatocyte transplantation in rats with decompensated cirrhosis. *Hepatology* 2000 Apr;31(4):851-7.
141. Gupta S, Rajvanshi P, Irani AN, Palestro CJ, Bhargava KK. Integration and proliferation of transplanted cells in hepatic parenchyma following D-galactosamine-induced acute injury in F344 rats. *J Pathol* 2000 Feb;190(2):203-10.
142. Mito M, Kusano M, Kawaura Y. Hepatocyte transplantation in man. *Transplant Proc* 1992 Dec;24(6):3052-3.
143. Ambrosino G, Varotto S, Strom SC, Guariso G, Franchin E, Miotto D, Caenazzo L, Basso S, Carraro P, Valente ML, D'Amico D, Zancan L, D'Antiga L. Isolated hepatocyte transplantation for Crigler-Najjar syndrome type 1. *Cell Transplant* 2005;14:151-7.

144. Sokal EM, Smets F, Bourgois A, Van Maldergem L, Buts JP, Reding R, Bernard Otte J, Evrard V, Latinne D, Vincent MF, Moser A, Soriano HE. Hepatocyte transplantation in a 4-year-old girl with peroxisomal biogenesis disease: technique, safety, and metabolic follow-up. *Transplantation* 2003 Aug 27;76(4):735-8.
145. Meyburg J, Das AM, Hoerster F, Lindner M, Kriegbaum H, Engelmann G, Schmidt J, Ott M, Pettenazzo A, Luecke T, Bertram H, Hoffmann GF, Burlina A. One liver for four children: first clinical series of liver cell transplantation for severe neonatal urea cycle defects. *Transplantation* 2009 Mar 15;87(5):636-41.
146. Horslen SP, McCowan TC, Goertzen TC, Warkentin PI, Cai HB, Strom SC, Fox IJ. Isolated hepatocyte transplantation in an infant with a severe urea cycle disorder. *Pediatrics*. 2003 Jun;111(6 Pt 1):1262-7.
147. Stéphenne X, Najimi M, Smets F, Reding R, de Ville de Goyet J, Sokal EM. Cryopreserved liver cell transplantation controls ornithine transcarbamylase deficient patient while awaiting liver transplantation. *Am J Transplant*. 2005 Aug;5(8):2058-61.
148. Khan AA, Habeeb A, Parveen N, Naseem B, Babu RP, Capoor AK, Habibullah CM. Peritoneal transplantation of human fetal hepatocytes for the treatment of acute fatty liver of pregnancy: a case report. *Trop Gastroenterol*. 2004 Jul-Sep;25(3):141-3.
149. Terry C, Dhawan A, Mitry RR, Hughes RD. Cryopreservation of isolated human hepatocytes for transplantation: State of the art. *Cryobiology*. 2006; 53:149–59.
150. Hughes RD, Mitry RR, Dhawan A. Hepatocyte transplantation in the treatment of liver diseases - future seems bright after all. *Pediatr Transplant* 2008 Feb;12(1):4-5.
151. Strain AJ. Isolated hepatocytes: use in experimental and clinical hepatology. *Gut* 1994;35:43-436.
152. Murray KF, Carithers RL Jr; AASLD. AASLD practice guidelines: Evaluation of the patient for liver transplantation. *Hepatology*. 2005 Jun;41(6):1407-32.
153. Bhogal RH, Hodson J, Bartlett DC, Weston CJ, Curbishley SM, Haughton E, Williams KT, Reynolds GM, Newsome PN, Adams DH, Afford SC. Isolation of primary human hepatocytes from normal and diseased liver tissue: a one hundred liver experience. *PLoS One* 2011 Mar 29;6(3):e18222.
154. Alexandre E, Cahn M, Abadie-Viollon C, Meyer N, Heyd B, Manton G, Cinqualbre J, David P, Jaeck D, Richert L. Influence of pre-, intra- and post-

- operative parameters of donor liver on the outcome of isolated human hepatocytes. *Cell Tissue Bank* 2002;3(4):223-33.
155. Lloyd TD, Orr S, Patel R, Crees G, Chavda S, Vadyar H, Berry DP, Sherlock D, Dennison AR. Effect of patient, operative and isolation factors on subsequent yield and viability of human hepatocytes for research use. *Cell Tissue Bank* 2004;5(2):81-7.
156. Richert L, Alexandre E, Lloyd T, Orr S, Viollon-Abadie C, Patel R, Kingston S, Berry D, Dennison A, Heyd B, Manton G, Jaeck D. Tissue collection, transport and isolation procedures required to optimize human hepatocyte isolation from waste liver surgical resections. A multilaboratory study. *Liver Int* 2004 Aug;24(4):371-8.
157. Vondran FW, Katenz E, Schwartlander R, Morgul MH, Raschok N, Gong X, Cheng X, Kehr D, Sauer IM. Isolation of primary human hepatocytes after partial hepatectomy: criteria for identification of the most promising liver specimen. *Artif Organs* 2008 Mar;32(3):205-13.
158. Kawahara T, Toso C, Douglas DN, Nourbakhsh M, Lewis JT, Tyrrell DL, Lund GA, Churchill TA, Kneteman NM. Factors affecting hepatocyte isolation, engraftment and replication in an in vivo model. *Liver Transpl.* 2010 Aug;16(8):974-82.
159. Groothuis GM, Sandker GW, Pruijm J, Weert B, Slooff MJ, Meijer DK. Comparison of human hepatocytes isolated from livers accepted or discarded for orthotopic transplantation. *Toxicol In Vitro* 1995 Dec;9(6):951-8.
160. Mitry RR, Lehec SC, Hughes RD. Cryopreservation of human hepatocytes for clinical use. *Methods Mol Biol.* 2010;640:107-13.
161. Greenlee WF, Poland A. An improved assay of 7-ethoxycoumarin O-deethylase activity: induction of hepatic enzyme activity in C57BL/6J and DBA/2J mice by phenobarbital, 3-methylcholanthrene and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *J Pharmacol Exp Ther* 1978 Jun;205(3):596-605.
162. Wortelboer HM, de Kruif CA, van Iersel AA, Falke HE, Noordhoek J, Blaauboer BJ. The isoenzyme pattern of cytochrome P450 in rat hepatocytes in primary culture, comparing different enzyme activities in microsomal incubations and in intact monolayers. *Biochem Pharmacol* 1990 Dec 1;40(11):2525-34.

163. Brunt EM, Kleiner DE, Wilson LA, Belt P, Neuschwander-Tetri BA; NASH Clinical Research Network (CRN). Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) activity score and the histopathologic diagnosis in NAFLD: distinct clinicopathologic meanings. *Hepatology*. 2011 Mar;53(3):810-20.
164. Sahi J, Hamilton G, Sinz M, Barros S, Huang SM, Lesko LJ, LeCluyse EL. Effect of troglitazone on cytochrome P450 enzymes in primary cultures of human and rat hepatocytes. *Xenobiotica* 2000 Mar;30(3):273-84.
165. Bonora-Centelles A, Donato MT, Lahoz A, Pareja E, Mir J, Castell JV, Gómez-Lechón MJ. Functional characterization of hepatocytes for cell transplantation: customized cell preparation for each receptor. *Cell Transplant* 2010;(19):21-28.
166. Blanco JG, Harrison PL, Evans WE, Relling MV. Human cytochrome P450 maximal activities in pediatric versus adult liver. *Drug Metab Dispos* 2000 Apr;28(4):379-82.
167. Wolbold R, Klein K, Burk O, Nüssler AK, Neuhaus P, Eichelbaum M, Schwab M, Zanger UM. Sex is a major determinant of CYP3A4 expression in human liver. *Hepatology* 2003 Oct;38(4):978-88.
168. Hunt CM, Westerkam WR, Stave GM. Effect of age and gender on the activity of human hepatic CY3A4. *Biochem Pharmacol* 1992;44:275-83.
169. Makowiec F, Möhrle S, Neeff H, Drognitz O, Illerhaus G, Opitz OG, Hopt UT, zur Hausen A. Chemotherapy, liver injury, and postoperative complications in colorectal liver metastases. *J Gastrointest Surg*. 2011 Jan;15(1):153-64.
170. Quan D, Gallinger S, Nhan C, Auer RA, Biagi JJ, Fletcher GG, Law CH, Moulton CA, Ruo L, Wei AC, McLeod RS. The role of liver resection for colorectal cancer metastases in an era of multimodality treatment: A systematic review. *Surgery*. 2012 Feb 6. [Epub ahead of print].
171. Gómez-Lechón MJ, Fabra R, Trullenque R, Castell JV. Toxicity of unconjugated or conjugated bilirubin to human hepatocytes. *Toxicol In Vitro* 1996;9:141-148.
172. Selzner M, Clavien PA. Fatty liver in liver transplantation and surgery. *Semin Liver Dis*. 2001;21(1):105-13. Review.
173. Verran D, Kussyk T, Painter D, Fisher J, Koorey D, Strasser S, Stewart G, McCaughan G. Clinical experience gained from the use of 120 steatotic donor livers for orthotopic liver transplantation. *Liver Transpl*. 2003 May;9(5):500-5.

174. Durand F, Renz JF, Alkofer B, Burra P, Clavien PA, Porte RJ, Freeman RB, Belghiti J. Report of the Paris consensus meeting on expanded criteria donors in liver transplantation. *Liver Transpl.* 2008 Dec;14(12):1694-707.
175. Sagias FG, Mitry RR, Hughes RD, Lehec SC, Patel AG, Rela M, Mieli-Vergani G, Heaton ND, Dhawan A. N-acetylcysteine improves the viability of human hepatocytes isolated from severely steatotic donor liver tissue. *Cell Transplant.* 2010;19(11):1487-92.
176. Attia M, Silva MA, Mirza DF. The marginal liver donor: an update. *Transpl Int.* 2008 Aug;21(8):713-24.



## **VIII. ANEXOS.**



## **VIII.1. ÍNICE DE TABLAS:**

**Tabla 1.** Preparación de la solución Stock de Krebs-Ringer-Hepes sin  $\text{Ca}^{++}$ .

**Tabla 2.** Composición del medio de cultivo Ham F12-Williams.

**Tabla 3.** Parámetros analíticos (I).

**Tabla 4.** Parámetros analíticos (II).

**Tabla 5 .** Quimioterapia preoperatoria en DV.

**Tabla 6.I.** Diagnóstico de los DV intervenidos en cirugía programada.

**Tabla 6.II.** Diagnóstico de los DV intervenidos en cirugía programada.

**Tabla 7.** Benignidad o malignidad de la patología que condicionó la intervención de los DV.

**Tabla 8.** Resección hepática y metástasis hepáticas en los DV.

**Tabla 9.** Tumor primario en los DV intervenidos por metástasis hepáticas.

**Tabla 10.** Isquemia Caliente y tipo en los DV.

**Tabla 11.** Tiempo de isquemia caliente en los DV.

**Tabla 12.** Hospital en el que se realizó la extracción hepática de los DC.

**Tabla 13.** Causa de la muerte de los DC.

**Tabla 14.** Estancia en UCI y administración de antibióticos en UCI en los DC.

**Tabla 15.** Tiempo de isquemia fría en los DC.

**Tabla 16.** Tiempo Isquemia fría en rangos en los DC

**Tabla 17.** Líquido de perfusión en los DC.

**Tabla 18.** Comparativa de las características clínicas y antecedentes personales de los DV y DC (I).

**Tabla 19.** Comparativa de las características clínicas y antecedentes personales de los DV y DC (II).

**Tabla 20.I.** Comparativa de los parámetros analíticos de los DV y DC.

**Tabla 20.II.** Comparativa de los parámetros analíticos de los DV y DC.

**Tabla 21.** Comparativa de las variables relacionadas con la intervención quirúrgica en ambos grupos de donantes (DV y DC).

**Tabla 22.** Comparativa de las variables relacionadas con la biopsia en ambos grupos de donantes (DV y DC) (I).

**Tabla 23.** Comparativa de las variables relacionadas con la biopsia en ambos grupos de donantes (DV y DC) (II).

**Tabla 24.** Comparativa de las variables relacionadas con el aislamiento y cultivo de los hepatocitos en ambos grupos de donantes (DV y DC).

**Tabla 25.** Influencia de la variable tipo de donante (DV-DC) en la viabilidad  $\geq 70\%$  del aislamiento de hepatocitos humanos.

**Tabla 26.** Influencia de las características clínicas y antecedentes personales en la viabilidad del aislamiento de hepatocitos de los DV (I).

**Tabla 27.** Influencia de las características clínicas y antecedentes personales en la viabilidad del aislamiento de hepatocitos de los DV (II).

**Tabla 28.** Influencia de los parámetros analíticos en la viabilidad del aislamiento de hepatocitos de los DV (I).

**Tabla 29.** Influencia de los parámetros analíticos en la viabilidad del aislamiento de hepatocitos de los DV (II).

**Tabla 30.** Influencia de las variables relacionadas con la intervención quirúrgica en la viabilidad del aislamiento de hepatocitos de los DV (I).

**Tabla 31.** Influencia de las variables relacionadas con la intervención quirúrgica en la viabilidad del aislamiento de hepatocitos de los DV(II).

**Tabla 32.** Influencia de las variables relacionadas con la biopsia en la viabilidad del aislamiento de hepatocitos de los DV (I).

**Tabla 33.** Influencia de las variables relacionadas con la biopsia en la viabilidad del aislamiento de hepatocitos de los DV (II).

**Tabla 34.** Influencia de las variables de los DV en la viabilidad del aislamiento de hepatocitos. Modelo Lineal General.

**Tabla 35.** Variables que influyen en la viabilidad  $\geq 70\%$  del aislamiento de hepatocitos en los DV (I).

**Tabla 36.** Variables que influyen en la viabilidad  $\geq 70\%$  del aislamiento de hepatocitos en los DV (II).

**Tabla 37.** Influencia de las variables de los DV en la viabilidad  $\geq 70\%$  del aislamiento de hepatocitos. Modelo de Regresión Logística.

**Tabla 38.** Influencia de las características clínicas y antecedentes personales en el rendimiento del aislamiento de hepatocitos de los DV (I).

**Tabla 39.** Influencia de las características clínicas y antecedentes personales en el rendimiento del aislamiento de hepatocitos de los DV (II).

**Tabla 40.** Influencia de los parámetros analíticos en el rendimiento del aislamiento de hepatocitos de los DV (I).

**Tabla 41.** Influencia de los parámetros analíticos en el rendimiento del aislamiento de hepatocitos de los DV (II).

**Tabla 42.** Influencia de las variables relacionadas con la intervención quirúrgica en el rendimiento del aislamiento de hepatocitos de los DV (I).

**Tabla 43.** Influencia de las variables relacionadas con la intervención quirúrgica en el rendimiento del aislamiento de hepatocitos de los donantes vivos (II).

**Tabla 44.** Influencia de las variables relacionadas con la biopsia en el rendimiento del aislamiento de hepatocitos de los DV (I).

**Tabla 45.** Influencia de las variables relacionadas con la biopsia en el rendimiento del aislamiento de hepatocitos de los DV (II).

**Tabla 46.** Influencia de las variables de los DV en el rendimiento del aislamiento de hepatocitos. Modelo Lineal General.

**Tabla 47.** Influencia de las características clínicas y antecedentes personales en la actividad ECOD de los hepatocitos aislados de los DV(I).

**Tabla 48.** Influencia de las características clínicas y antecedentes personales en la actividad ECOD de los hepatocitos aislados de los DV (II).

**Tabla 49.** Influencia de los parámetros analíticos en la actividad ECOD de los hepatocitos aislados de los DV (I).

**Tabla 50.** Influencia de los parámetros analíticos en la actividad ECOD de los hepatocitos aislados de los DV (II).

**Tabla 51.** Influencia de las variables relacionadas con la intervención quirúrgica en la actividad ECOD de los hepatocitos aislados de los DV (I).

**Tabla 52.** Influencia de las variables relacionadas con la intervención quirúrgica en la actividad ECOD de los hepatocitos aislados de los DV (II).

**Tabla 53.** Influencia de las variables relacionadas con la biopsia en la actividad ECOD de los hepatocitos aislados de los DV (I).

**Tabla 54.** Influencia de las variables relacionadas con la biopsia en la actividad ECOD de los hepatocitos aislados de los DV (II).

**Tabla 55.** Influencia de las variables de los DV en la actividad ECOD de los hepatocitos aislados. Modelo Lineal General.

**Tabla 56.** Influencia de las características clínicas y antecedentes personales en la actividad testosterona-6- $\beta$  hidroxilasa de los hepatocitos aislados de los DV (I).

**Tabla 57.** Influencia de las características clínicas y antecedentes personales en la actividad testosterona-6- $\beta$  hidroxilasa de los hepatocitos aislados de los DV (II).

**Tabla 58.** Influencia de los parámetros analíticos en la actividad testosterona-6- $\beta$  hidroxilasa de los hepatocitos aislados de los DV (I).

**Tabla 59.** Influencia de los parámetros analíticos en la actividad testosterona-6- $\beta$  hidroxilasa de los hepatocitos aislados de los DV (II).

**Tabla 60.** Influencia de las variables relacionadas con la intervención quirúrgica en la actividad testosterona-6- $\beta$  hidroxilasa de los hepatocitos aislados de los DV (I).

**Tabla 61.** Influencia de las variables relacionadas con la intervención quirúrgica en la actividad testosterona-6- $\beta$  hidroxilasa de los hepatocitos aislados de los DV (II).

**Tabla 62.** Influencia de las variables relacionadas con la biopsia en la actividad testosterona-6- $\beta$  hidroxilasa de los hepatocitos aislados de los DV (I).

**Tabla 63.** Influencia de las variables relacionadas con la biopsia en la actividad testosterona-6- $\beta$  hidroxilasa de los hepatocitos aislados de los DV (II).

**Tabla 64.** Influencia de las variables de los DV en la actividad testosterona-6- $\beta$  hidroxilasa de los hepatocitos aislados. Modelo Lineal General.

**Tabla 65.** Influencia de las características clínicas y antecedentes personales en la viabilidad del aislamiento de hepatocitos de los DC (I).

**Tabla 66.** Influencia de las características clínicas y antecedentes personales en la viabilidad del aislamiento de hepatocitos de los DC (II).

**Tabla 67.** Influencia de los parámetros analíticos en la viabilidad del aislamiento de hepatocitos de los DC (I).

**Tabla 68.** Influencia de los parámetros analíticos en la viabilidad del aislamiento de hepatocitos de los DC (II).

**Tabla 69.** Influencia de las variables relacionadas con el proceso de extracción hepática en la viabilidad del aislamiento de hepatocitos de los DC (I).

**Tabla 70.** Influencia del tiempo de isquemia fría en la viabilidad del aislamiento de hepatocitos de los DC.

**Tabla 71.** Influencia de las variables relacionadas con el proceso de extracción hepática en la viabilidad del aislamiento de hepatocitos de los DC (II).

**Tabla 72.** Influencia de las variables relacionadas con la biopsia en la viabilidad del aislamiento de hepatocitos de los DC (I).

**Tabla 73.** Influencia de las variables relacionadas con la biopsia en la viabilidad del aislamiento de hepatocitos de los DC (II).

**Tabla 74.** Influencia de las variables de los DC en la viabilidad del aislamiento de hepatocitos. Modelo Lineal General.

**Tabla 75.** Variables que influyen en la viabilidad  $\geq 70\%$  del aislamiento de los hepatocitos en los DC (I).

**Tabla 76.** Variables que influyen en la viabilidad  $\geq 70\%$  del aislamiento de los hepatocitos en los DC (II).

**Tabla 77.** Influencia de las variables de los DC en la viabilidad  $\geq 70\%$  del aislamiento de los hepatocitos. Modelo de Regresión Logística.

**Tabla 78.** Influencia de las características clínicas y antecedentes personales en el rendimiento del aislamiento de hepatocitos de los DC (I).

**Tabla 79.** Influencia de las características clínicas y antecedentes personales en el rendimiento del aislamiento de hepatocitos de los DC (II).

**Tabla 80.** Influencia de los parámetros analíticos en el rendimiento del aislamiento de hepatocitos de los DC (I).

**Tabla 81.** Influencia de los parámetros analíticos en el rendimiento del aislamiento de hepatocitos de los DC (II).

**Tabla 82.** Influencia de las variables relacionadas con la extracción hepática en el rendimiento del aislamiento de hepatocitos de los DC (I).

**Tabla 83.** Influencia del tiempo de isquemia fría en el rendimiento del aislamiento de hepatocitos de los DC.

**Tabla 84.** Influencia de las variables relacionadas con la extracción hepática en el rendimiento del aislamiento de hepatocitos de los DC (II).

**Tabla 85.** Influencia de las variables relacionadas con la biopsia en el rendimiento del aislamiento de hepatocitos de los DC (I).

**Tabla 86.** Influencia de las variables relacionadas con la biopsia en el rendimiento del aislamiento de hepatocitos de los DC (II).

**Tabla 87.** Influencia de las variables de los DC en el rendimiento del aislamiento de hepatocitos. Modelo Lineal General.

**Tabla 88.** Influencia de las características clínicas y antecedentes personales en la actividad ECOD de los hepatocitos aislados de los DC (I).

**Tabla 89.** Influencia de las características clínicas y antecedentes personales en la actividad ECOD de los hepatocitos aislados de los DC (II).

**Tabla 90.** Influencia de los parámetros analíticos en la actividad ECOD de los hepatocitos aislados de los DC (I).

**Tabla 91.** Influencia de los parámetros analíticos en la actividad ECOD de los hepatocitos aislados de los DC (II).

**Tabla 92.** Influencia del tiempo de isquemia fría en la actividad ECOD de los hepatocitos aislados de los DC.

**Tabla 93.** Influencia de las variables relacionadas con la extracción hepática en la actividad ECOD de los hepatocitos aislados de los DC (I).

**Tabla 94.** Influencia de las variables relacionadas con la extracción hepática en la actividad ECOD de los hepatocitos aislados de los DC (II).

**Tabla 95.** Influencia de las variables relacionadas con la biopsia en la actividad ECOD de los hepatocitos aislados de los DC (I).

**Tabla 96.** Influencia de las variables relacionadas con la biopsia en la actividad ECOD de los hepatocitos aislados de los DC (II).

**Tabla 97.** Influencia de las características clínicas y antecedentes personales en la actividad testosterona-6- $\beta$  hidroxilasa de los hepatocitos aislados de los DC (I).

**Tabla 98.** Influencia de las características clínicas y antecedentes personales en la actividad testosterona-6- $\beta$  hidroxilasa de los hepatocitos aislados de los DC (II).

**Tabla 99.** Influencia de los parámetros analíticos en la actividad testosterona-6- $\beta$  hidroxilasa de los hepatocitos aislados de los DC (I).

**Tabla 100.** Influencia de los parámetros analíticos en la actividad testosterona-6- $\beta$  hidroxilasa de los hepatocitos aislados de los DC (II).

**Tabla 101.** Influencia de las variables relacionadas con la extracción hepática en la actividad testosterona-6- $\beta$  hidroxilasa de los hepatocitos aislados de los DC (I).

**Tabla 102.** Influencia del tiempo de isquemia fría en la actividad testosterona-6- $\beta$  hidroxilasa de los hepatocitos aislados de los DC.

**Tabla 103.** Influencia de las variables relacionadas con la extracción hepática en la actividad testosterona-6- $\beta$  hidroxilasa de los hepatocitos aislados de los DC (II).

**Tabla 104.** Influencia de las variables relacionadas con la biopsia en la actividad testosterona-6- $\beta$  hidroxilasa de los hepatocitos aislados de los DC (I).

**Tabla 105.** Influencia de las variables relacionadas con la biopsia en la actividad testosterona-6- $\beta$  hidroxilasa de los hepatocitos aislados de los DC (II).

**Tabla 106.** Variables estadísticamente significativas en el análisis univariante de los DV y DC.

**Tabla 107.** Variables estadísticamente significativas en el análisis multivariante de los DV y DC.



## **VIII.2. ÍNICE DE FIGURAS:**

**Figura 1.** Visión al microscopio de hepatocitos humanos.

**Figura 2.** El lobulillo hepático.

**Figura 3.** El acino hepático.

**Figuras 4 y 5.** Perfusión y digestión con colagenasa.

**Figura 6.** Test de exclusión del azul tripán.

**Figura 7.** Visión al microscopio de hepatocitos viables y no viables (A), y de hepatocitos con vacuolas de grasa (B).

**Figura 8.** Visión al microscopio de hepatocitos humanos en cultivo.

**Figura 9.** Ultraestructura de los hepatocitos tras el aislamiento (A) y tras 24 horas de cultivo (B).

**Figura 10.** Distribución de la edad y la talla en ambos grupos de donantes (DV y DC).

**Figura 11.** Toma de medicación previa en ambos grupos de donantes (DV y DC).

**Figura 12.** Distribución de los valores de Glucosa y Sodio en ambos grupos de donantes (DV y DC).

**Figura 13.** Distribución de los valores de Potasio, Creatinina y Proteínas Totales en ambos grupos de donantes (DV y DC).

**Figura 14.** Distribución de los valores de Hemoglobina y Hematocrito en ambos grupos de donantes (DV y DC).

**Figura 15.** Distribución del número de Leucocitos, Neutrófilos y Plaquetas en ambos grupos de donantes (DV y DC).

**Figura 16.** Distribución de los valores de Índice de Quick y Tiempo de Protrombina en ambos grupos de donantes (DV y DC).

**Figura 17.** Parada cardiaca e Hipotensión prolongada en ambos grupos de donantes (DV y DC).

**Figura 18.** Distribución de la Esteatosis en ambos grupos de donantes (DV y DC).

**Figura 19.** Distribución de la Viabilidad y Rendimiento del aislamiento celular en ambos grupos de donantes (DV y DC).

**Figura 20.** Distribución de la Viabilidad  $\geq 70\%$  en ambos grupos de donantes (DV y DC).

**Figura 21.** Influencia del IMC en la viabilidad del aislamiento de hepatocitos en los DV.

**Figura 22.** Influencia de la Glucosa y los Neutrófilos en la viabilidad del aislamiento de hepatocitos en los DV.

**Figura 23.** Influencia de la Bilirrubina Total y la Bilirrubina  $\geq 1$  en la viabilidad  $\geq 70\%$  del aislamiento de hepatocitos en los DV.

**Figura 24.** Influencia de la GOT y el Índice de Quick en el rendimiento del aislamiento de hepatocitos en los DV.

**Figura 25.** Influencia de la Resección Hepática y las Metástasis Hepáticas en el rendimiento del aislamiento de hepatocitos en los DV.

**Figura 26.** Influencia de la Isquemia Caliente y el Tipo en el rendimiento del aislamiento de hepatocitos en los DV.

**Figura 27.** Influencia del Tiempo de Isquemia Caliente y la Isquemia  $\geq 30$  minutos en el rendimiento del aislamiento de hepatocitos en los DV.

**Figura 28.** Influencia del Tiempo de Protrombina en la actividad ECOD de los hepatocitos aislados en los DV.

**Figura 29.** Influencia del Peso, la Talla y el Sexo en la actividad testosterona-6- $\beta$  hidroxilasa de los hepatocitos aislados en los DV.

**Figura 30.** Influencia de la Bilirrubina Total y la Creatinina en la actividad testosterona-6- $\beta$  hidroxilasa de los hepatocitos aislados en los DV.

**Figura 31.** Influencia de la Hemoglobina y el Hematocrito en la actividad testosterona-6- $\beta$  hidroxilasa de los hepatocitos aislados en los DV.

**Figura 32.** Influencia de la GGT en Rangos en la actividad testosterona-6- $\beta$  hidroxilasa de los hepatocitos aislados en los DV.

**Figura 33.** Influencia de la Resección Hepática y las Metástasis Hepáticas en la actividad testosterona-6- $\beta$  hidroxilasa de los hepatocitos aislados en los DV.

**Figura 34.** Influencia del peso de la muestra en la actividad testosterona-6- $\beta$  hidroxilasa de los hepatocitos aislados en los DV.

**Figura 35.** Influencia del Tiempo en UCI en la viabilidad del aislamiento de hepatocitos en los DC.

**Figura 36.** Influencia del Tiempo de Isquemia fría en la viabilidad del aislamiento de hepatocitos en los DC.

**Figura 37.** Influencia del Tiempo de Isquemia fría y el Líquido de perfusión en la viabilidad  $\geq 70\%$  del aislamiento de hepatocitos en los DC.

**Figura 38.** Influencia del Sodio y los Neutrófilos en el rendimiento del aislamiento de hepatocitos en los DC.

**Figura 39.** Influencia de la Glucosa  $\geq 120$  en el rendimiento del aislamiento de hepatocitos en los DC.

**Figura 40.** Influencia del Tiempo de Isquemia fría en el rendimiento del aislamiento de hepatocitos en los DC.

**Figura 41.** Influencia del Peso de la muestra en el rendimiento del aislamiento de hepatocitos en los DC.

**Figura 42.** Influencia del Potasio y la Fosfatasa Alcalina en la actividad ECOD del aislamiento de hepatocitos en los DC.

**Figura 43.** Influencia de la Edad y el Peso en la actividad testosterona-6- $\beta$  hidroxilasa del aislamiento de hepatocitos en los DC.

**Figura 44.** Influencia del IMC y la Medicación previa en la actividad testosterona-6- $\beta$  hidroxilasa del aislamiento de hepatocitos en los DC.



### **VIII.3. ABREVIATURAS:**

ACLF: Acute Chronic Liver Failure

ADN: Ácido Desoxi-ribonucleico

ATP: Adenosín-trifosfato

AVC: Accidente Vascular Cerebral

BR: Bilirrubina

BSA: Albúmina sérica bovina

BT: Bilirrubina Total

$\beta$ -NGF: Factor de Crecimiento Neural  $\beta$

cel/g: células/gramo

cm: centímetros

Ca<sup>++</sup>: Calcio

Cl<sub>2</sub>Ca: Cloruro cálcico

ClK: Cloruro potásico

ClNa: Colruro sódico

Cols: Colaboradores

Conc: Concentración

CO<sub>3</sub> H<sup>-</sup>: Ion bicarbonato

Desv. Tip: Desviación Típica

dHGF: Factor de crecimiento de hepatocitos con delección de 5 aminoácidos

dL: decilitro

DC: Donante Cadáver

DM: Diabetes Mellitus

DV: Donante Vivo

ECOD: 7-etoxicumarina O-deetilasa

EGF: epidermal growth factor

EGTA: Ácido etileclicol-bis-(beta-aminoetiléter)-N, N, N',N'-tetracético

EH: Encefalopatía Hepática

EPG: Factor de crecimiento epidérmico

EROD: 7-etoxiresorufina O-deetilasa

E.T: Error Típico

EVB: Exploración vía biliar

Exp: Exponencial  
FA: Fosfatasa Alcalina  
FHF: Fallo Hepático Fulminante  
g: gramos  
gl: grados de libertad  
g/dL: gramos/decilitro  
g/L: gramos/litro  
G-GSF: Factor estimulante del crecimiento de colonias de granulocitos  
GGT: gammaglutamiltranspeptidasa  
GIST: Tumor del estroma gastrointestinal  
GOT: transaminasa glutámico-oxalacética  
GPT: transaminasa glutámico-pirúvica  
h: hora  
Hb: Hemoglobina  
HCC: HEPATOCARCINOMA  
HEPES: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid  
HGF: Factor de crecimiento de hepatocitos  
HH: Hernia de Hiato  
H<sub>2</sub>O: Agua  
HPLC: High performance liquid chromatography (Cromatografía líquida de alta eficacia)  
HTA: Hipertensión arterial  
HTG: HIPERTRIGLICERIDEMIA  
HTO: Hematocrito  
I.C: Intervalo de confianza  
IL: Illinois  
IMC: Índice de Masa Corporal  
K: Potasio  
Kg: Kilogramos  
K-R: Krebs-Ringer  
L: Litros  
LOE: Lesión ocupante de espacio  
m: metros

mEq/L: miliequivalentes/litro  
mg: miligramos  
mg/dL: miligramos/decilitro  
mg/mL: miligramos/mililitro  
min: minutos  
mL: mililitros  
M: moles  
Mm: micrometros  
mM: Milimoles  
mmHg: milímetros de Mercurio  
mU: miliunidades  
 $\mu$ L: microlitros  
 $\mu$ m: micrometros  
 $\mu$ M: micromoles  
N: Número de pacientes  
Na: Sodio  
NADP: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato  
NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma reducida)  
NAME: N-omega-nitro-L-arginina metilester  
Neo = Neoplasia  
nº: número  
nm: nanometros  
°C: grados Centígrados  
OTC: Ornitin- transcarbamilasa  
p: Significación estadística  
pmol: picomoles  
PO<sub>4</sub>HNa: Fosfato de sodio hidratado  
Prot. Tot: Proteínas Totales  
QT: Quimioterapia  
R: Pearson  
Rpm: Revoluciones por minuto  
seg: segundos  
Sdme: Síndrome

Sig: Significación  
ST: Suero de ternera  
SE: Error estándar  
TAS: Tensión Arterial Sistólica  
TC: Trasplante Celular  
TCE: Traumatismo Craneoencefálico  
TCH: Trasplante Celular Hepático  
TEP: Tromboembolismo pulmonar  
TGF- $\alpha$ : Transforming growth factor  $\alpha$   
TGF- $\beta$ : Transforming growth factor  $\beta$   
TH: Trasplante Hepático  
TP: Tiempo de Protrombina  
UCI: Unidad de Cuidados Intensivos  
UDP-GT: Difosfogluconato-gluconil transferasa  
UI/L: Unidades Internacionales/litro  
US: United States of America  
VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana  
 $\chi^2$ : Chi Cuadrado