

Universidad de San Carlos de Guatemala
Facultad de Ciencias Médicas

**LESION HEPATICA POR ISQUEMIA-REPERFUSION
-EFECTO PROTECTOR CON VERAPAMIL-**



RENE QUINTANA PALMA

Médico y Cirujano

INDICE

I.	INTRODUCCION.....	1
II.	DEFINICION DEL PROBLEMA.....	2
III.	JUSTIFICACION.....	3
IV.	OBJETIVOS.....	4
V.	REVISION BIBLIOGRAFICA.....	5
VI.	MATERIAL Y METODOS.....	18
VII.	PRESENTACION DE RESULTADOS.....	20
VIII.	ANALISIS Y DISCUSION DE RESULTADOS.....	27
IX.	CONCLUSIONES.....	29
X.	RECOMENDACIONES.....	30
XI.	RESUMEN.....	31
XII.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	32
XIII.	ANEXOS.....	34

I. INTRODUCCION

La lesión hepática por isquemia-reperfusión es una situación a la que el clínico se enfrenta cuando se requiere reparar una lesión hepática o hacer trasplantes del mismo, debido al tiempo prolongado al que se somete el hígado en isquemia.

El calcio juega un papel muy importante ya que cuando el hígado es sometido a isquemia prolongada, se pierde la homeostasis del mismo, provocando daño a nivel hepático, los cuales son irreversibles.

El objeto de nuestro estudio experimental realizado en ratas fue demostrar la utilidad del verapamil (calcioantagonista) como fármaco protector de la célula hepática sometida a isquemia y luego a reperfusión evitando así la lesión hepática por isquemia-reperfusión, haciendo mediciones de los niveles de transaminasas y mediante el estudio de biopsia hepática.

El mismo se realizó en el Laboratorio de Cirugía Experimental del Hospital General de Accidentes del IGSS, para lo cual se utilizaron tres grupos, de 10 ratas cada uno. Al primer grupo se le colocó clamp al hilio hepático para provocar isquemia y se utilizó solución salina intraperitoneal, así como medición de transaminasas GO y GP (pre-clamp y post-reperfusión) y biopsia hepática, siendo los resultados una elevación de enzimas y lesión histológica importante a nivel hepático. En el grupo dos, se utilizó verapamil (calcioantagonista) con resultados en los niveles enzimáticos entre límites normales y sin evidencia histológica de lesión demostrada por biopsia hepática; por lo que se concluye que el uso del verapamil protegió a la célula de la lesión hepática por isquemia-reperfusión. Al grupo tres, que fue grupo control sólo se realizaron TGO y TGP los cuales se encontraron entre límites normales.

Con base a lo anterior, consideramos que los fármacos o sustancias protectoras contra la lesión por isquemia-reperfusión tienen un efecto que favorece y protege a la célula del daño inducido por éste evento.

II. DEFINICION DEL PROBLEMA

La lesión por isquemia-reperfusión a nivel hepático está mediada principalmente por pérdida de la homeostasis del calcio, cuando éste órgano es sometido a stress oxidativo. Por lo tanto el uso de calcioantagonistas para bloquear el efecto negativo del calcio al sobrecargar a la célula y a la mitocondria, evita al reperfundir el hígado, el incremento de la lesión celular.(9, 15).

Las lesiones por isquemia reperfusión a nivel hepático, se han descrito en aquellos casos en los cuales se necesita realizar reparaciones de hígado o transplantes del mismo; debido al tiempo prolongado al que se somete al hígado en isquemia.

Cuando hay isquemia prolongada, está demostrado que existen cambios en la membrana celular que conllevan a la pérdida del balance de los iones de sodio y calcio. La sobrecarga del calcio, ocasiona disfunción de la membrana mitocondrial y daño irreversible.

Se han descrito algunas medidas terapéuticas para prevenir las lesiones por isquemia reperfusión , tales como el uso de depuradores de radicales libres, inhibidores de la producción de radicales libres, inhibidores de los neutrófilos, y antioxidantes , entre estos últimos, los bloqueadores de los canales del calcio y más específicamente el verapamil el cual fue sujeto de estudio en nuestra investigación(9).

III. JUSTIFICACION

Las lesiones hepáticas por isquemia-reperfusión, son cambios degenerativos irreversibles, los cuales podrian ser evitados mediante algunas alternativas, como el uso de inhibidores de los canales de calcio, como el verapamil.

Antecedentes de estudios realizados en ratas, demuestran que el uso del verapamil en estas lesiones, tienen efectos beneficiosos con protección a la célula hepática en comparación con otros grupos a los cuales no se realiza ningún tipo de maniobra terapéutica.

El clorhidrato de verapamil es una fenilalquilamina, derivado de la papaverina, el cual bloquea los canales del calcio (principalmente los canales L) en las membranas de las células del músculo liso y cardíaco. En nuestro estudio utilizamos este calcioantagonista por su efecto protector, evitando la lesión de la célula hepática que se encuentra en isquemia el cual es mediado por la acción del calcio. Y aprovechar también el bloqueo a nivel de la peroxidación que ocasiona la liberación de radicales libres de oxígeno.

Se realizó el siguiente estudio en ratas, con el fin de evaluar y determinar los beneficios del verapamil sobre las lesiones hepáticas inducidas por isquemia-reperfusión, con la idea que en un futuro pueda tener algún beneficio al ser aplicado en seres humanos, los cuales requieran un tratamiento a nivel hepático en el que tenga que recurrirse a la isquemia((17).

IV. OBJETIVOS

A. GENERALES:

- Evaluar el efecto del verapamil – calcioantagonista – como protector hepático a la lesión por isquemia-reperfusión en ratas.

B. ESPECIFICOS:

1. Determinar mediante la medición enzimática (transaminasas) el estado funcional del hígado luego de la utilización de verapamil comparado con un grupo control, luego de inducir isquemia- reperfundión.
2. Reconocer si hay lesión histológica asociado a las alteraciones de orden enzimático, mediante la toma de biopsia hepática.

V. REVISION BIBLIOGRAFICA

A. HIGADO

1. Anatomía :

a. Anatomía Microscópica:

El hígado está cubierto, por una cápsula gruesa de colágena y tejido elástico llamada cápsula de Glisson, que penetra en la masa del parénquima. Los sinusoides difieren de los capilares corrientes en que su revestimiento endotelial está compuesto de células fagocíticas especializadas, las células de Kupffer.

Las capas de hepatocitos tienen el grosor de una célula y están en íntima asociación con los sinusoides para facilitar el intercambio máximo entre nutrientes y productos del metabolismo. En el centro de cada lobulillo se encuentra una vena central, tributaria de sistema venoso hepático de salida. Las ramas de la arteria hepática y la vena porta desembocan directamente en los sinusoides. La bilis es secretada por los hepatocitos en el interior de los canículos.

b. Anatomía Macroscópica:

El hígado es el órgano más voluminoso en la economía: pesa de 1200 a 1600 gramos, ocupa el hipocondrio derecho y gran parte del epigastrio y se extiende por el hipocondrio izquierdo.

El peritoneo se refleja en el hígado y forma diez diversos ligamentos que son: i. Ligamento falciforme; ii. Ligamento redondo; iii y iv epiplón gastrohepático y ligamento hepatoduodenal; v, vi, vii y viii ligamento coronario, con sus dos hojas superior e inferior; ix y x ligamentos triangulares derecho e izquierdo.

c. Lóbulos y Segmentos:

El ligamento falciforme divide el hígado desde el punto de vista topográfico, pero no desde los puntos de vista anatómica o funcional, en un gran lóbulo derecho y un lóbulo izquierdo menor, además en la cara visceral, una serie de surcos y fosas dispuestas en forma de H separan otros dos lóbulos, que son el lóbulo de Spiegel o cuadrado, y el lóbulo caudado. El hígado también puede ser dividido en segmentos anatómicos con base en la distribución de las ramas de la arteria hepática, vena porta y conductos biliares.(13, 14).

d. Riego Sanguíneo, Linfáticos y Nervios:

El hígado tiene como carácter único entre las vísceras abdominales, su riego sanguíneo doble. La arteria hepática nace del tronco celiaco y llega al hígado en el epiplón menor. En el hilio hepático, se divide en arterias hepáticas derecha e izquierda. La vena porta, avalvular, lleva sangre al hígado de estómago, intestino delgado, intestino grueso, páncreas y bazo. Se forma por la unión de las venas mesentérica superior y esplénica detrás de la cabeza del páncreas y por detrás de la primera porción del duodeno, hasta introducirse en el borde del epiplón menor y llegar al hilio hepático en donde se divide en ramas derecha e izquierda.

La corriente venosa de salida del hígado, es llevada por las venas hepáticas avalvulares que desembocan en la vena cava inferior por debajo del diafragma. El flujo venoso, que comienza en las venas centrales de los lobulillos hepáticos, pasa progresivamente por las venas mayores sublobulillares y venas de mayor calibre, hasta desembocar en las venas mayores hepáticas derecha e izquierda.

La inervación del hígado incluye fibras simpáticas de las ramas de los nervios dorsales séptimo a décimo, y fibras parasimpáticas que cursan en los neumogástricos derecho e izquierdo. Los nervios forman un plexo hepático. La inervación aferente depende de los nervios espláncnicos simpáticos y del nervio frénico derecho.(13, 14).

2. Fisiología:

El hígado es el centro del metabolismo del cuerpo. En el hígado se llevan a cabo síntesis, modificaciones, almacenamiento, desdoblamiento y excreción de muchas de las sustancias de las que depende la vida.

Las principales funciones del hígado, las conocidas pueden dividirse en ocho categorías:

a. Formación y Excreción de Bilis:

Se excreta, en promedio, un volumen de 600 a 1000 ml. al día.

b. Metabolismo de Carbohidratos:

En el metabolismo de los carbohidratos, el hígado efectúa las siguientes funciones: a. almacenamiento de glucógeno; b. conversión de galactosa y fructosa a glucosa y c. gluconeogénesis.(7).

c. Metabolismo Lipídico:

i. mantener un ritmo muy fuerte de oxidación de ácidos grasos para suministrar energía al organismo; ii. formación de la mayor parte de lipoproteínas; iii. formación de grandes cantidades de colesterol y fosfolípidos; iv. conversión de grandes cantidades de carbohidratos y proteínas en grasas.

d. Metabolismo de Proteínas:

i. desaminación de los aminoácidos; ii. formación de urea para suprimir el amoníaco de los líquidos corporales; iii. es el único órgano que produce albúmina y globulina alfa del plasma; y iv. interconversiones entre los diferentes aminoácidos y otros compuestos.

e. Coagulación de la Sangre:

El hígado es el centro primario de la síntesis de la mayor parte de las proteínas en la coagulación sanguínea. Sintetiza: fibrinógeno, protrombina y los factores V, VII, VIII, IX, X, XI, y XII.

f. Metabolismo de las Vitaminas:

Todas las vitaminas son almacenadas en el hígado y éste órgano participa en su utilización. Es el sitio principal de almacenamiento de vitamina A, D, E, K y B12.

g. Destoxificación:

Por oxidación, reducción, metilación, acetilación, esterificación, y conjugación, el hígado degrada o modifica gran variedad de sustancias endógenas, verbigracia, hormonas esteroideas, fármacos y sustancias químicas. Es por eso que el hígado es el centro de destoxificación del organismo.

h. Fagocitosis e Inmunidad:

Por acción de las células de Kupffer de su sistema reticuloendotelial el hígado viene a ser un gran filtro en donde son eliminados bacterias, língentos y otros restos celulares de la sangre, por fagocitosis. Además, las células de kupffer son fuente importante de la globulina gamma, que participa en los mecanismos de defensa inmunitarios.(7).

B. LESION POR ISQUEMIA REPERFUSION

La muerte celular es un proceso caótico que puede ser inducida de dos formas.

La apoptosis o la muerte celular programada (suicidio celular) es un mecanismo fisiológico, para remover las células viejas, dañadas o anormales. La apoptosis se inicia por la activación de una endonucleasa y se caracteriza por la fragmentación del DNA en 180-200 partes. Estas células son ingeridas por los macrófagos sin la liberación de las enzimas proteolíticas o especies tóxicas de oxígeno y el proceso no se acompaña de inflamación.

Por el contrario la necrosis (asesinato celular), es un proceso patológico que afecta a las poblaciones celulares y da como resultado destrucción tisular focal, inflamación y a menudo algunas consecuencias sistémicas de carácter serio. La isquemia la cual puede progresar o llevar a necrosis y es responsable como causa única y común de muerte en el mundo Occidental (enfermedad cardíaca isquémica), es a menudo también encontrada en cirugía, especialmente en procedimientos vasculares o en trasplantes. Paradójicamente la reperfusión de tejidos isquémicos puede dar como resultado una prolongación de la lesión.

1. Isquemia:

Cuando se interrumpe el aporte sanguíneo a los tejidos, se inicia una secuencia de eventos químicos que llevan a disfunción celular, edema celular e intersticial y por último a un caos celular y muerte de la misma. El oxígeno es el combustible básico y es crucial para la función celular, el metabolismo aeróbico llena las uniones celulares de fosfato de alta energía requerida para la función celular normal. La falta o la pérdida de oxígeno da como resultado un metabolismo anaeróbico y un incremento en la concentración de ácido láctico local. La acidosis resultante altera la cinética enzimática, menos moléculas de alta energía pueden ser creadas y la célula es privada de la energía necesaria para mantener su homeostasis.

Los tejidos pueden tolerar la hipoxia por diferentes periodos de tiempo, el músculo esquelético puede recuperarse luego de horas de isquemia, mientras que la lesión de las neuronas es irreversible luego de pocos minutos de hipoxia. La importancia de la membrana celular del esqueleto celular y la regulación de iones en el contexto de la muerte celular se ha documentado a través de los años, no hay un proceso único que haya sido identificado como factor crítico que lleve de la isquemia a la muerte celular, la disminución o depleción en los almacenes celulares de energía especialmente de ATP da como resultado un fallo en la homeostasis celular caracterizada por la pérdida de los gradientes de los iones a través de la membrana celular.

La necrosis por isquemia está bien documentada, demostrando que existen cambios en la membrana celular que conlleva a la pérdida del balance de los iones de sodio y calcio, seguido por acidosis, shock osmótico, apolotonamiento de cromatina y picnosis nuclear. Los iones de sodio se mueven hacia adentro de

la célula, llevando con ellos un volumen de agua que mantiene el equilibrio osmótico con el medio ambiente que rodea a la célula o sea el espacio intersticial y los iones de potasio escapan de la célula al intersticio.

Estos cambios se acompañan de la activación de la fosfolipasa mitocondrial, de una pérdida precipitada de la fosforilación oxidativa y una caída en la producción de ATP lo que conlleva al fallo de la capacidad sintética y homeostática de la célula. La sobrecarga del calcio ocasiona disfunción de la membrana mitocondrial y daño irreversible. La autólisis secundaria (edema de los lisosomas, dilatación y apareamiento de vesículas en el retículo endoplásmico, pérdida de enzimas y proteínas y pérdida de la compartimentalización celular) por lo tanto la integridad de la membrana no puede mantenerse y por lo tanto la célula muere(9).

2. Reperfusión:

El restablecimiento del flujo sanguíneo tiene dos consecuencias benéficas para el tejido isquémico: al restablecer el aporte de energía se remueven los metabolitos tóxicos, a pesar de que la reperfusión es un pre-requisito para la recuperación de una lesión por isquemia. Sin embargo el retorno de los metabolitos tóxicos hacia la circulación sistémica puede generar graves y serias consecuencias metabólicas y la reperfusión puede inducir más daño tisular local.

Como consecuencias sistémicas de la reperfusión, la revascularización de un tejido isquémico especialmente el de una extremidad isquémica da como resultado una serie de problemas sistémicos caracterizados por acidosis metabólica, hiperkalemia, mioglobinemia, mioglobinuria y fallo renal, denominándose a ésta entidad Síndrome Metabólico Mionefropático. Puede existir edema pulmonar no cardiogénico, caracterizado por incremento en la permeabilidad capilar y acumulación de neutrófilos que han migrado al pulmón luego de la activación de agentes liberados desde el tejido isquémico reperfundido.

a. Lesión por Reperfusión:

Paradójicamente, la reperfusión del tejido isquémico resulta en más daño o lesión. Varios estudios han identificado a los radicales libres de oxígeno como mediadores del componente de la reperfusión en la lesión por isquemia-reperfusión.

b. Fenómeno de No-Reflujo:

Los intentos de reperfusión puede que no siempre sean exitosos, porque existe una obstrucción progresiva microcirculatoria, éste proceso se denomina

fenómeno de no-reflujo, y está relacionado con lo prolongado del intervalo isquémico (9, 11).

3. Radicales Libres de Oxígeno:

Un radical libre es una molécula inestable que contiene uno o más electrones impares. Varios radicales libres de oxígeno pueden ser producidos por reducción o excitación de la molécula de oxígeno. El superóxido es un producto del metabolismo celular normal derivado de sistema mitocondrial de la membrana reticular endoplásmica y nuclear a través de un proceso de transporte de electrones y de proteínas solubles tales como la hemoglobina, oxidasa de aldehído y la xantina oxidasa.

El superóxido puede inactivar enzimas específicas, pero es más importante el precursor del peróxido de hidrógeno y el altamente reactivo radical hidroxilo. La formación de superóxido in vivo siempre se acompaña de la producción de peróxido de hidrógeno, el cual es un oxidante poderoso que puede inactivar el DNA pero que puede ser desarmado o inactivado en los tejidos por acción de las peroxidases.

El radical hidroxilo es formado a través de la vía del hierro catalizado Haber-Weiss o reacción de Fenton. Los radicales superóxido liberan hierro de la ferritina la cual reacciona con el peróxido de hidrógeno para producir radicales hidroxilo. El radical hidroxilo es el más reactivo de los radicales libres en los sistemas biológicos y es probablemente responsable de la mayoría del daño celular que ocurre a partir de los radicales libres. Este provoca peroxidación lipídica y puede oxidar grupos sulfidrílo, inactivar las enzimas del citocromo y altera el transporte de proteínas a través de la membrana. Los otros dos radicales que pueden ser producidos a partir del oxígeno son el radical perhidroxil el cual es un poderoso oxidante tanto como el superóxido, éste último puede inactivar a las proteínas y se ha sugerido que tanto el oxígeno solo también los radicales hidroxilo son los iniciadores directos de la peroxidación lipídica.

Varios mecanismos han sido identificados en los sistemas biológicos, pequeñas cantidades de radicales libres se producen fisiológicamente de fugas o pérdidas en sitios de la cadena de transporte de electrones a nivel mitocondrial. En estados patológicos los radicales libres se derivan del metabolismo de la xantina-oxidasa, de los neutrófilos activados, de la oxidación de las catecolaminas de las células endoteliales y las prostaglandinas(5,10,12).

a. Radicales Libres de Oxígeno en la Lesión por Isquemia Reperusión:

El mecanismo de producción del superóxido durante el periodo de isquemia-reperusión ha sido revisado extensamente por Welbourn.

La enzima xantina-oxidasa es la mayor fuente de producción de radicales libres en el tejido post-isquémico. Durante la isquemia, la xantina oxidasa, producida por la conversión de xantina-deshidrogenasa se acumula en los tejidos. Mc Cord ha hipotetizado que el calcio activado por las proteínas, cataliza la conversión (D-O) durante la isquemia. Se ha probado que la conversión D-O toma sólo 10 segundos en el tejido intestinal, 8 minutos en el músculo cardíaco y 30 minutos en el hígado, bazo, riñón y pulmón lo que puede explicar la diferencia en la susceptibilidad a la lesión por isquemia-reperusión de estos órganos.

Durante la isquemia los niveles tisulares de hipoxantina derivado del AMP están incrementados. La xantina-oxidasa utiliza el oxígeno molecular para convertir la hipoxantina a xantina, liberando superóxido durante este proceso. Además durante la isquemia los niveles de nueva enzima (hipoxantina-oxidasa) y de uno de sus substitutos (hipoxantina) se elevan en el tejido isquémico una vez ocurre la reperusión del tejido el segundo substrato para la enzima (oxígeno molecular) es introducido y la reacción se lleva a cabo produciendo una carga masiva de radical libre. Durante la isquemia el hierro es liberado también dentro de los tejidos, durante la reperusión el superóxido y el peróxido de hidrógeno son producidos, el superóxido promueve la liberación de hierro ferroso libre en tal cantidad que el hierro está disponible para catalizar la conversión de peróxido de hidrógeno en radicales hidroxil vía la reacción de Haber-Weiss o Fenton(1,8).

b. Peroxidación Lipídica:

El efecto más dañino de los radicales libres es la peroxidación lipídica. Las membranas celulares se componen de ácidos grasos poliinsaturados y fosfolípidos. Los radicales libres de oxígeno pueden causar daño celular ya que inducen a la peroxidación lipídica, la cual da como resultado un daño estructural y funcional en la célula. La peroxidación lipídica es un fenómeno complejo que se inicia con la abstracción de un átomo de hidrógeno de un grupo metileno posicionado entre dos uniones insaturadas de una molécula lipídica. El resultado es la formación de un nuevo radical libre lipídico con carbono centrado, el cual en presencia del oxígeno da como resultado la generación de peróxidos lipídicos o hidroperóxidos lipídicos(9).

4. Estrés Oxidativo:

El estrés oxidativo, está asociado a un disturbio en el balance pro-oxidante/antioxidante, a favor de la fracción pro-oxidante. El apareamiento de especies oxígeno reactivas conocidas como pro-oxidantes es un atributo de la vida normal aeróbica. La existencia y desarrollo de células en un medio ambiente que contenga oxígeno no sería posible sin la presencia de sistemas de defensa que incluyen algunas enzimas poderosas y componentes no enzimáticos antioxidantes.

La vida aeróbica se caracteriza por una formación balanceada de pro-oxidantes y de un consumo similar por los antioxidantes. Para mantener la homeostasis debe de existir como requisito la continua producción y regeneración de la capacidad antioxidante y si esto no es posible o no ocurre se acumula el daño oxidativo dando como resultado eventos patofisiológicos. La mayoría de pro-oxidantes son radicales libres(15).

Tabla No. 1

Especies oxígeno reactivas de interés en el estrés oxidativo.

O ₂	superóxido (anión)
HO ₂	radical peroxidrilo
H ₂ O ₂	peróxido de hidrógeno
HO (OH)	radical hidroxilo
RO	alcoxy radical
ROO	radical peroxi
ROOH	hidroperóxido orgánico
Ag O ₂ (IO ₂)	molécula solitaria de oxígeno
RO	carboxilo excitado(15).

C. DISTRIBUCION INTRACELULAR DEL CALCIO:

La compartimentalización es una característica importante de todas las funciones celulares, y este se puede observar rápidamente en la homeostasis del calcio en el cual las células se compartimentalizan y controlan los niveles intracelulares del calcio, mediante métodos complejos pero integrales.

En general el calcio está presente a nivel intracelular ligado a proteínas ligadoras del calcio o secuestrado dentro del retículo endoplásmico y la mitocondria. En lo que respecta a este almacenamiento o proceso de compartimentalización mantiene el calcio citosólico libre intracelular en el rango de 0.1 a 0.4 mM, mientras que el calcio(Ca⁺⁺) total celular varía en concentraciones de 3 a 30mM por mg de proteína celular. Esta compartimentalización del calcio le permite a la célula alterar rápidamente el calcio citosólico para regular la función y metabolismo celular(3,21).

1. Metabolismo de la Lesión Celular:

a. Vacuolización de la Membrana Plasmática:

El mantenimiento de la integridad de la membrana plasmática es uno de los aspectos que se ha investigado ampliamente en la evaluación de la lesión celular y la pérdida de la homeostasis del calcio. Existe evidencia actual muy

significativa que correlaciona la vacuolización de las membranas plasmáticas con la lesión hepatocelular. Nicotera y colaboradores consideran que esta vacuolización involucra a proteínas del citoesqueleto, a iones de calcio y a proteasas dependientes de calcio. Como punto de vista opuesto la vacuolización de la superficie celular es también una consecuencia temprana de una lesión inducida por hipoxia o por agentes químicos y que puede ser independiente del calcio citosólico libre.

2. Cambios Patológicos en la Homeostasis del Calcio:

Se observó años atrás que hepatocitos matados con T-butilhidroperóxido llevaba a estas células a liberar calcio almacenado en los compartimentos mitocondrial y extra mitocondrial, pero cuando se previene la oxidación con NADPH, solamente la reserva de calcio del retículo endoplásmico es liberado llegando a la conclusión que ésta capacidad de secuestro era gobernada por los estados del thiol. Está determinado también que éste tipo de secuestro es sustitutivo únicamente para el daño oxidativo y es dependiente de ATPasa de calcio. Durante la síntesis el estrés oxidativo hay una pérdida importante de síntesis de ATP y del balance iónico todo con el fin de mantener el estado de redox del glutatión y así prevenir la lesión celular.

De igual importancia es el aspecto que gobierna el papel de la alteración de la homeostasis del calcio en la lesión celular y es la perturbación del mango del calcio a nivel mitocondrial y es donde el mecanismo de eflujo del calcio participa activamente. La manifestación patológica más aparente en la muerte celular es la acumulación del calcio y se propuso que la pérdida de continuidad en la barrera de la membrana celular permite el influjo de calcio siendo esto la vía final común para la muerte celular(4,21).

D. LESION HEPATICA POR ISQUEMIA REPERFUSION:

La intolerancia del hígado a la isquemia continua siendo uno de los problemas más importantes durante la resección hepática o durante el trasplante hepático. A pesar de que el mecanismo exacto de lesión hepática por isquemia reperfusión aun no está bien aclarado, la incapacidad para mantener la homeostasis del calcio intracelular parece ser la clave durante un evento de isquemia. Esto da como resultado una sobrecarga de calcio a nivel intracelular y a nivel mitocondrial.

La reperfusión luego del insulto isquémico incrementa el daño celular, esto es debido probablemente a la liberación de radicales libres de oxígeno con la subsecuente peroxidación de la membrana lipídica durante el periodo de reperfusión. La sobrecarga celular de calcio puede también disparar la liberación de radicales libres de oxígeno y potencia el daño a la membrana celular por el radical de oxígeno (17).

1. Estado Actual del Calcio en la Lesión Hepatocelular:

La pregunta más importante acerca de la lesión hepatocelular es si existe un mecanismo único o unificado el cual involucre a la pérdida de regulación de los niveles del calcio celular (Ca^{++}). En este contexto, las alteraciones en la homeostasis del calcio han sido propuestas y juegan el papel más importante en la lesión celular inducida por una diversidad de situaciones tales como una intoxicación química y estados anormales fisiológicos como la isquemia.

2. Homeostasis Normal del Calcio Hepatocelular:

a. Transporte del Calcio a través de la Membrana Plasmática:

Las células de los mamíferos están típicamente bañadas por el fluido extracelular (plasma o medio) el que contiene más de 2 mM de calcio. Este es el que da la capacidad a las células de regular y de mantener libre el calcio ionizado intracelular en un rango micromolar. El mantenimiento de este gradiente de 10,000 pares de calcio es vital para la viabilidad celular, es por esto que es concebible que el proceso que lleva al daño o lesión hepatocelular puede incluir alteraciones en la homeostasis del calcio.

Los sistemas de transporte del calcio a través de la membrana celular parece que varía ampliamente con cada tejido y quizá aun con cada tipo de célula. Se incluyen entre estos sistemas heterogéneos los canales del calcio de los tejidos excitables, los intercambios Na^{++}/Ca^{++} en tejidos excitables y en otros tejidos especializados; los sistemas de calcio ATPasa y los sistemas de eflujo de calcio. Estos últimos dos sistemas parece ser los que gobiernan la homeostasis del calcio a nivel de la célula hepática. Se hicieron análisis recientes tomando en cuenta también el metabolismo del sodio a nivel hepático llegando a la conclusión que el flujo de calcio a nivel celular hepático dependiente del sodio juega un papel crítico en la homeostasis del calcio a nivel de la célula hepática (3,21).

E. MECANISMOS DE DEFENSA:

Existen varios mecanismos endógenos que inhiben a la lesión por isquemia-reperusión y un sin número de drogas que han demostrado tener un efecto protector.

1. Depuradores o Purificadores de Radicales Libres:

Los depuradores de los radicales libres son agentes que interactúan con las especies reactivas de oxígeno y las inhiben sin causar daños.

2. Inhibición en la Producción de Radicales Libres:

Otro tipo de abordaje para modificar la lesión por radicales libres es inhibir a las enzimas involucradas en su producción.

3. Inhibición de Neutrófilos:

La acumulación de los neutrófilos en la microvasculatura luego de la reperusión conlleva a lesión subsecuente. La inhibición de los radicales libres producidos por los neutrófilos, o la prevención de la quimiotracción o la prevención de la adherencia de los neutrófilos puede modificar la lesión por reperusión.

4. Antioxidantes:

Los antioxidantes son agentes que interrumpen la peroxidación, ellos previenen el daño tisular y la producción de peróxidos y los consecuentes radicales libres(9).

5. Verapamil:

Recientemente ha sido foco de mucha atención el papel que juegan los bloqueadores de los canales del calcio en la prevención de la lesión por isquemia reperusión. Los efectos protectores de estas sustancias en la lesión por isquemia reperusión a nivel hepático ha sido discutida en varios modelos experimentales.

El tratamiento previo con verapamil ha demostrado que mejora la sobrevivencia, reduce la liberación de enzimas y reduce el daño histológico después de 90 minutos de isquemia hepática. La interacción molecular entre los bloqueadores de los canales del calcio y la liberación de los radicales de oxígeno o la lesión por radicales de oxígeno aun no ha sido aclarada. El calcio está involucrado en varios pasos de los mecanismos que dan por resultado una lesión por radicales de oxígeno hacia los componentes celulares. Otro efecto protector del verapamil podría ser su efecto vasodilatador.

Las alteraciones en la homeostasis del calcio son un factor crítico en la patogénesis del daño isquémico hepático y puede mediar daños de los radicales libres de oxígeno durante el periodo de reperusión. Esto resulta en recargo de calcio intracelular y mitocondrial, la activación de enzimas proteolíticas y el deterioro de la generación de ATP por el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa(2,3,6,16,17,18).

Tabla No. 2

Mecanismos de defensa contra la lesión por isquemia reperfusión

-Depurador de radicales libres:

Catalasa	depuradores de superóxido y
Superóxido dismutasa	peróxido de hidrógeno
Nafazatrom	

Manitol	
Dimetil thiourea	depuradores de radicales
Dimetil sulfóxido	hidroxil.
Mereapto propionil glicina	

Histidina	depurador de oxígeno solitario.
-----------	---------------------------------

-Inhibidores de la producción de radicales libres:

Alopurinol	inhbidor de xantin-oxidasa
------------	----------------------------

Desferroxinamina	agente quelante de hierro
------------------	---------------------------

-Inhibidores de los neutrófilos:

Adenosina	modula la producción de aniones superóxido
-----------	--

Transformador del factor de crecimiento B	inhibición de la adhesión
Anticuerpos monoclonales Para CD 11-CD 18	de neutrófilos.

Antiproteasas	inhibición de la actividad de proteasa de neutrófilos
---------------	--

Perfluoroquímicos	supresión de la quimiotaxis de los neutrófi- los y la degeneración de lisosimas
-------------------	--

-Antioxidantes:

Vitamina E	
Propanolol	interrumpen la
Bloqueadores de canales de calcio	peroxidación
Captopril	
Nafazatrom	

F. MANIOBRA DE PRINGLE:

Es una maniobra útil para controlar y reparar heridas hepáticas extensas y para efectuar resecciones de hígado. Consiste en la oclusión de la arteria hepática y de la vena porta, pinzando transversalmente el pedículo con una pinza vascular (19, 20).

VI. MATERIAL Y METODOS

A. METODOLOGIA

1. **Tipo de Estudio:** Descriptivo-Experimental en ratas.
2. **Sujeto de Estudio:** Ratas blancas (Sprague-Dawley) entre 250-300 gramos de peso.
3. **Universo de la Muestra:** Treinta ratas, el cual es un número significativo para fines del estudio, al igual que otros ya realizados(17,18).
Grupo 1 isquemia-reperfusión + solución salina.
Grupo 2 isquemia-reperfusión + verapamil.
Grupo 3 control (no isquemia-reperfusión).
4. **Criterios de Exclusión:** Ratas con peso menor de 250 grms.(todas las ratas alcanzan este peso al ser adultas) y ratas con transaminasas anormales.
5. **Procedimiento:** Las ratas que cumplieron los requisitos de peso, fueron anestesiadas con una sola dosis de pentotal sódico (40mg/kg intraperitoneal) , y en caso necesario con nueva dosis. La temperatura del animal se mantuvo a 32 grados centígrados utilizando luces incandescentes. A las ratas de los grupos 1 y 2 se les realizó incisión mediana, así como determinación de niveles de transaminasas GO y GP pre-clamp; seguidamente se expuso el hilio hepático y se aplicó clamp (maniobra de Pringle) durante 90 minutos: irrigándose solución salina al primer grupo y verapamil a 2.5mg/kg intraperitonealmente al grupo No.2. Luego se determinó los niveles de transaminasas post-reperfusión y biopsia hepática a ambos grupos. El grupo 3, de control sólo se realizaron pruebas de transaminasas.
6. **Variables:**

variable	definición conceptual	definición operacional	escala de medición	unidad de medida
Peso	peso de un cuerpo en comparación con otro	peso ratas al momento del estudio	numérica	gramos
Transaminasas	enzima producida por el hígado	muestra obtenida luego de reperfundir	numérica	un/Lt.
Tiempo de isquemia	tiempo a obstruir flujo sanguíneo	90 minutos de isquemia	numérica	minutos
Tiempo de Reperfusión	tiempo desde el retiro del clamp	45 minutos post retirado el clamp	numérica	minutos
Biopsia Hepática	fragmento de tejido hepático luego de reperfundir	observación de lesión histológica	nominal	-----

7. Instrumentos de Recolección de Datos:

- Boleta de recolección de datos.

8. Ejecución de la Investigación

- Selección del tema: 1 de Febrero 1999.
- Aprobación del tema: 16 de Febrero 1999.
- Diseño del protocolo de investigación: 17 - 18 de Febrero 1999.
- Revisión de bibliografía: 18 - 22 de Febrero 1999.
- Ejecución del protocolo: 23 - 28 de Febrero de 1999.
- Aprobación del protocolo: Marzo de 1999.
- Realización de investigación o trabajo de campo: Abril - Mayo 1999.
- Informe final: Junio de 1999.

B. RECURSOS

1. Materiales Físicos:

- Laboratorio de Cirugía Experimental del Hospital General de Accidentes IGSS.
- Instrumental quirúrgico.
- Materiales de sutura.
- Laboratorio clínico del Hospital General de Accidentes IGSS.
- Laboratorio de patología.
- Boleta de recolección de datos.

2. Materiales humanos:

- Médicos del Departamento de Cirugía IGSS.

Cuadro No.1

Valores de transaminasas glutámico pirúvica y oxalacética, pre-clamp y post-reperusión en grupo No.1 (tratado con solución salina). Laboratorio de Cirugía Experimental Hospital General de Accidentes IGSS, Junio 1,999.

No. Ratas	Valores de transaminasas			
	Oxalacética		Pirúvica	
	pre-clamp	post-reperusión	pre-clamp	post-reperusión
1	58	200	56	209
2	52	234	50	233
3	40	236	38	237
4	53	230	52	231
5	46	204	42	206
6	50	208	48	206
7	50	206	48	203
8	46	195	44	193
9	40	210	38	214
10	42	190	38	195
X	47.70	211.30	45.40	212.70

Fuente: Boleta de recolección de datos.

Cuadro No.2

Valores de transaminasas glutámico pirúvica y oxalacética, pre-clamp y post-reperusión en grupo No.2 (tratado con verapamil). Laboratorio de Cirugía Experimental Hospital General de Accidentes IGSS, Junio 1,999.

No. Ratas	Valores de transaminasas			
	Oxalacética		Pirúvica	
	pre-clamp	post-reperusión	pre-clamp	post-reperusión
1	50	54	48	56
2	52	50	48	56
3	34	32	38	29
4	55	103	56	104
5	50	100	48	106
6	25	30	28	31
7	34	40	36	42
8	54	102	52	102
9	48	58	50	62
10	50	52	48	54
X	45.20	62.10	45.20	64.20

Fuente: Boleta de recolección de datos.

CUADRO No. 3

Valores de transaminasas glutámico oxalacética en ratas, según grupos de estudio (isquemia hepática tratados con solución salina o verapamil) y grupo control. Laboratorio de Cirugía Experimental Hospital General de Accidentes IGSS, junio 1,999.

Valor transaminasa glutámico oxalacética *			
Grupo No. Rata	No. 1	No.2	No.3
	Clamp + Sol. Salina	Clamp + Verapamil	Grupo Control
1	200	54	50
2	234	50	42
3	236	32	44
4	230	103	48
5	204	100	43
6	208	30	50
7	206	40	43
8	195	102	44
9	210	58	45
10	190	52	44
X	211.30	62.10	45.30

* Valor normal = 12-65 u/l

Fuente: Boleta de recolección de datos.

CUADRO No. 4

Valores de transaminasas glutámico pirúvica en ratas según grupo de estudio (isquemia hepática tratados con solución salina o verapamil) y grupo control. Laboratorio Cirugía Experimental Hospital General de Accidentes IGSS, junio 1,999.

Valor transaminasa glutámico pirúvica *			
Grupo No. Rata	No. 1	No.2	No.3
	Clamp + Sol. Salina	Clamp + Verapamil	Grupo Control
1	209	56	38
2	233	56	40
3	237	29	42
4	231	104	32
5	206	106	33
6	206	31	36
7	203	42	35
8	193	102	34
9	214	62	32
10	195	54	31
X	212.70	64.20	35.30

* Valor normal = 10-63 u/l

Fuente: Boleta de recolección de datos.

CUADRO No. 5

Resultados de biopsia hepática en ratas con isquemia del hígado, según grupo de estudio (tratados con solución salina o verapamil. Laboratorio de Cirugía Experimental Hospital General de Accidentes IGSS, junio 1,999.

*Grado de lesión (biopsia hepática)	Grupo de estudio	
	No.1 Clamp + Sol. Salina	No.2 Clamp + Verapamil
0	—	6(60%)
1	—	4(40%)
2	4(40%)	—
3	5(50%)	—
4	1(10%)	—
TOTAL	10(100%)	10(100%)

* Grado de lesión:

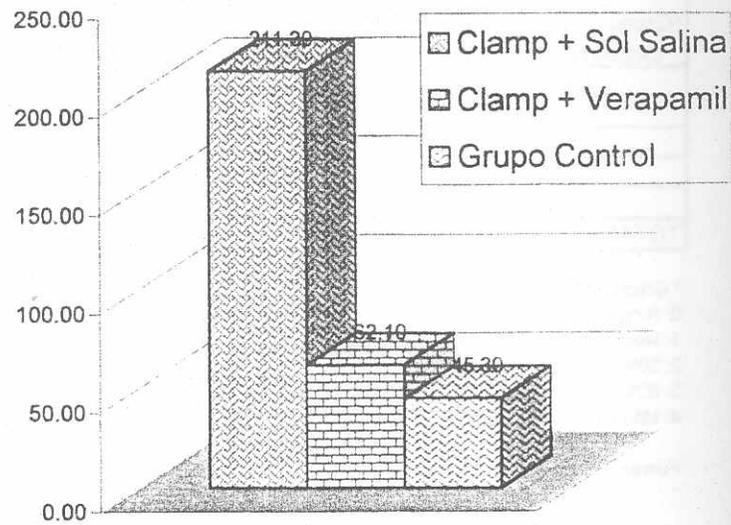
- 0: Ningún grado de necrosis
- 1: Necrosis de algunas células únicas
- 2: 30% de necrosis lobular
- 3: 60% de necrosis lobular
- 4: Más del 60% de necrosis lobular

Fuente: Boleta de recolección de datos.

Gráfica No. 1

Valores de transaminasas glutámico oxalacética en ratas, según grupos de estudio (isquemia hepática tratados con solución salina o verapamil) y grupo control. Laboratorio de Cirugía Experimental Hospital General de Accidentes IGSS, junio 1,999.

TGP U/Lt.

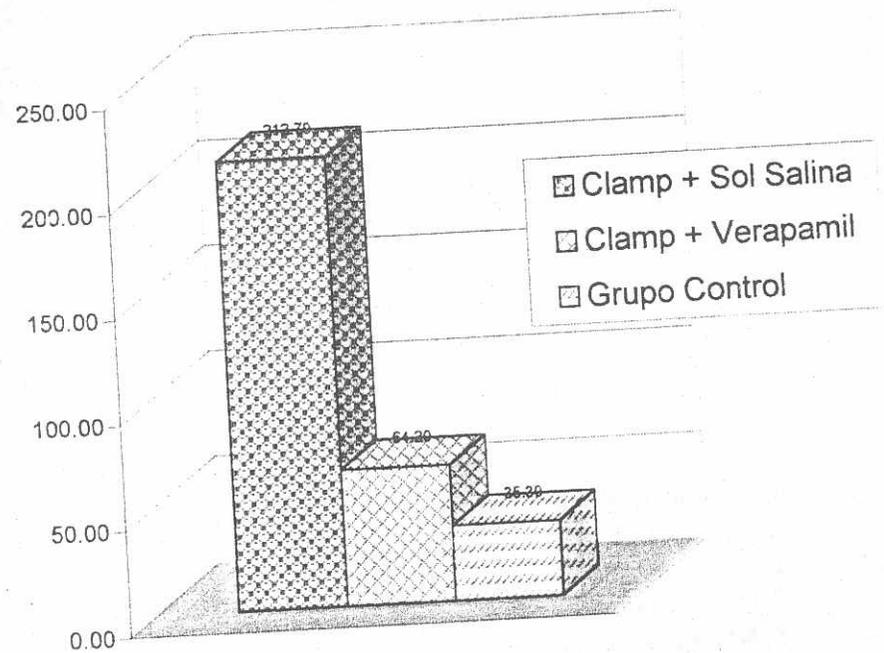


Fuente: Cuadro No. 3

Gráfica No. 2

Valores de transaminasas glutámico pirúvica en ratas, según grupos de estudio (isquemia hepática tratados con solución salina o verapamil) y grupo control. Laboratorio de Cirugía Experimental Hospital General de Accidentes IGSS, junio 1,999.

TGP U/Lt.

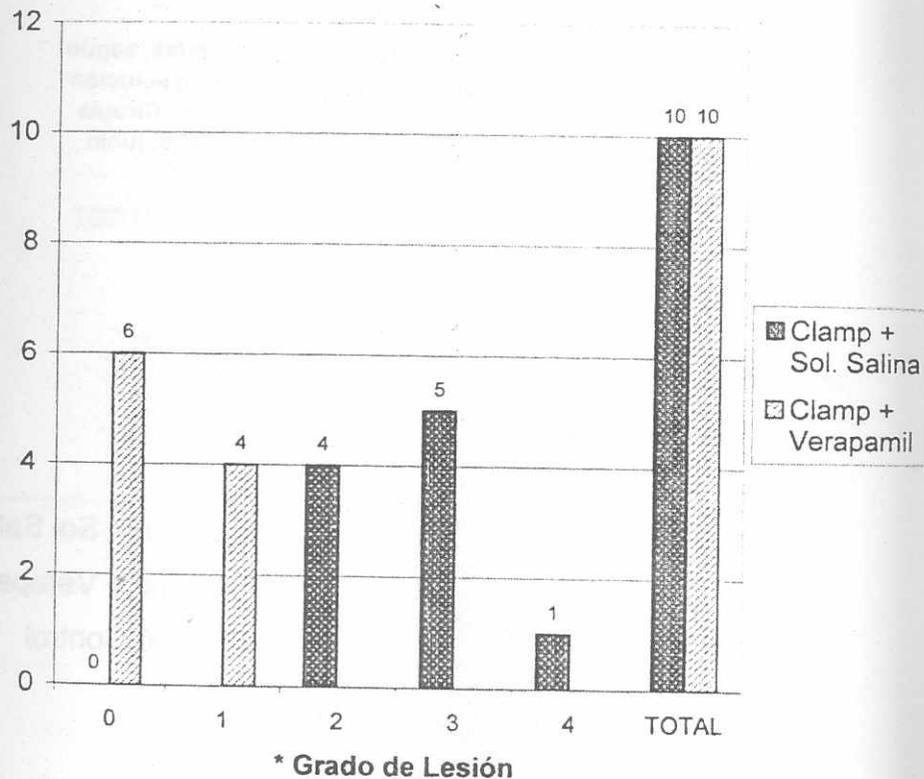


Fuente: Cuadro No. 4

Gráfico No.3

Resultados de biopsia hepática en ratas con isquemia del hígado, según grupo de estudio (tratados con solución salina o verapamil). Laboratorio de Cirugía Experimental Hospital General de Accidentes IGSS, junio 1,999.

No. de Casos



- * 0: Ningún grado de necrosis.
- 1: Necrosis de algunas células únicas.
- 2: 30% de necrosis lobular.
- 3: 60% de necrosis lobular.
- 4: Más del 60% de necrosis lobular.

Fuente: Cuadro No. 5

VIII. ANALISIS Y DISCUSION DE RESULTADOS

En el trabajo de cirugía experimental que realizamos para de determinar el uso del efecto protector del verapamil en el Síndrome de Isquemia-Reperfusion provocado en las ratas a través de colocar clamp a nivel del hilio hepático. podemos analizar lo siguiente: el cuadro No. 1 correspondiente al grupo en el cual se utilizó solución salina, pudimos observar que los valores de transaminasas GP y GO post-reperfusion se encontraron notablemente elevados en comparación con los valores de transaminasas pre-clamp los cuales se encontraron entre limites normales. En el cuadro No. 2 correspondiente al grupo en el cual se utilizó verapamil se encontró que los valores de transaminasa pre-clamp y post-reperfusion se mantuvieron entre limites normales desmostrando el efecto protector del verapamil a la célula hepática.

En el cuadro No. 3 en el cual se compararon los valores de la transaminasa glutámico oxalacética (TGO) de los tres grupos, se determinó que los valores de la TGO en el grupo No.1 (tratados con solución salina) se encontraron notablemente elevados en todas las ratas, en comparación en con el grupo control en el cual la TGO se encontró entre limites normales; en el grupo No. 2 (tratados con verapamil) de los diez casos, 6 de ellos (60%) los valores de la TGO se encontraron entre limites normales, demostrándose que se conservó la función hepática normal; en 4 casos restantes (40%) hay elevación aunque no marcada de la TGO, que consideramos que pudo deberse a múltiples factores en los que podríamos mencionar hipotermia transoperatoria, mala respuesta hemodinámica al hacer el clamp hepático y manipulación excesiva del hígado.

En el cuadro No. 4 en el cual se compararon los valores de la transaminasa glutámico piruvica (TGP) de los tres grupos, se pudo determinar que en el grupo No.1 (tratado con solución salina) los valores de la TGP se encontraron notablemente elevadas en comparación con el grupo control en el cual los valores de la TGP fueron normales; en el grupo No. 2 (tratado con verapamil) 6 casos (60%) tuvieron valores normales de TGP lo que permite demostrar el efecto favorable del verapamil como protector hepático a la lesión por isquemia-reperfusion; en el resto de los casos, 4 (40%) la TGP sufrió leve elevación lo que también pudo corresponder a los múltiples factores que igualmente elevaron la TGO.

En el grupo control sólo se tomó muestras de enzimas hepáticas (TGO-TGP) en donde el reporte fue normal.

Con respecto al cuadro No. 5, el estudio histológico del hígado luego de ser sometido a isquemia, se determinó el grado de lesión, dando como resultado en el grupo de solución salina que todos los casos (10) presentaron lesión hepática por isquemia-reperfusion en 40% (4 casos) en grado 2 que representa un 30% de necrosis lobular, 50% (5 casos) con grado 3 que es 60% de necrosis lobular y 10% (1 caso) en grado 4 que representa más del 60% de necrosis lobular.

En el grupo con isquemia-reperfusión más verapamil se obtuvieron 6 casos (60%) con ningún grado de necrosis (grado 0) y cuatro casos (40%) con necrosis de algunas células únicas (grado 1), lo que permite establecer que el verapamil (calcioantagonista) tiene efecto protector a nivel hepático para la lesión por isquemia-reperfusión cuando esta isquemia es controlada.

IX. CONCLUSIONES

1. La elevación de las transaminasas GO y GP fue notablemente alta en las ratas de grupo en que se realizó clamp del pedículo hepático y sólo se utilizó como vehículo solución salina.
2. El grupo de ratas en que se utilizó verapamil en el momento de inducir isquemia al hígado tuvo un efecto protector a la célula hepática lo que se demostró con valores entre rangos normales tanto para TGO y TGP.
3. El estudio histopatológico del hígado demostró lesión importante en la arquitectura celular hepática en el grupo tratado con solución salina.
4. La administración de verapamil protegió a la célula hepática de la lesión por isquemia-reperfusión.

X. RECOMENDACIONES

1. Realizar más estudios experimentales que involucre lesión hepática por isquemia-reperfusión para que sea de conocimiento general.
2. La lesión por isquemia-reperfusión es una entidad que puede causar trastornos serios a nivel hepático por lo tanto el clínico debe de conocer ésta condición para que sea tratada adecuadamente.
3. Hacer uso de medicamentos como el verapamil con más libertad y en forma adecuada en estudios de isquemia -reperfusión a nivel hepático y así poder evitar lesiones a este nivel.

XI. RESUMEN

El presente trabajo de tesis Lesión Hepática por Isquemia-Reperfusión, Efecto Protector con Verapamil, Estudio Experimental en Ratas, fue realizado en el Laboratorio de Cirugía Experimental del Hospital General de Accidentes del IGSS.

Se partió del conocimiento de que las lesiones hepáticas son frecuentes cuando se efectúan reparaciones o trasplantes del mismo, ya que éste es sometido a isquemia durante determinado tiempo, en el cual se pierde la homeostasis del calcio dando como resultado lesiones hepáticas por isquemia-reperfusión.

Se tomaron tres grupos de ratas (10 ratas cada grupo), al primer grupo se realizó una incisión mediana, se realizaron pruebas de transaminasas GO y GP pre-clamp, se colocó clamp al hilio hepático se irrigó intraperitonealmente solución salina y se provocó isquemia durante 90 minutos; al grupo dos se irrigó verapamil; luego a ambos grupos se les realizó medición de transaminasas y se tomó biopsia hepática luego de reperfundir el hígado por 45 minutos; el grupo 3 fue grupo control y sólo se realizaron medición de transaminasas.

El grupo 1 en el cual se utilizó solución salina los valores de transaminasas se elevaron hasta cuatro veces su valor normal y la biopsia hepática demostró lesión importante a nivel histológico; el grupo 2 los valores de transaminasas se encontraron entre límites normales y la biopsia hepática demostró que el verapamil protegió a la célula hepática del daño por isquemia-reperfusión; al grupo (control) se realizaron medición de transaminasas las cuales se encontraron entre los límites normales.

Por lo anterior se concluye que las transaminasas sufrieron elevación en el grupo en el cual se utilizó como vehículo la solución salina; al grupo que se irrigó verapamil las transaminasas se mantuvieron entre límites normales, demostrando que el verapamil protegió a la célula hepática de la lesión por isquemia-reperfusión. Recomendándose tener conocimiento sobre las lesiones hepáticas causadas durante la isquemia-reperfusión; además hacer uso del verapamil en estudios en los cuales se involucre isquemia-reperfusión a nivel hepático.

XII. BIBLIOGRAFIA

1. Bast Aalt, et, al. "Oxidants and antioxidants: state of the art". American Journal of Medicine 1991, September 30; vol 91: 2 - 12.
2. Bolling, S.F., Schirmer W. J., Gott V. L., Flaherty J.T., Bulkley B.H., Gardner T.J. "Enhanced myocardial protection with verapamil prior to post-ischemic reflow". Surgery 1983; 283 - 290.
3. Burke, T., Arnold, P., Gordon, J., et, al. "Protective effect of intrarenal calcium membrane blockers before or after renal ischemia: funcional, morphological and mitochondrial studies". J. Clin Invest. 1984; 74: 1830 - 1841.
4. Cochrane, C.G. "Cellular injury by oxidants". American Journal of Medicine 1991, September 30; vol 91: 23 - 30.
5. Chambers, D.E., Parks, D.A., Patterson, G. el, al. "Role of oxygen derived free radicals in myiocardial ischemia". Fed Proc. 1983; 47: 1093.
6. Chengs, S., Ragsdale, J.R., Sasaki, A.W., Lee, R.G., Deveney, C.W., Pinson C.W. "Verapamil improves rat hepatic preservation with U.W. solution". J. Surg. Res 1991; 50: 560 - 564.
7. Guyton. "Tratado de Fisiología Médica". Octava edición. Editorial Interamericana Mc. Graw Hill 1992.
8. Gregory, B. et, al. "Pathophysiology of free radical mediate reperfusion injury". Journal of vascular Surgery 1987; March: vol 5 (3): 512 - 516.
9. Grace, P.A. "Ischemia-reperfusion injury". British Journal Surgery 1994, November 30; vol 81: 637 - 647.

10. Halliwell, B. "Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role human disease". American Journal of Medicine 1991; vol 91: 2 - 12.
11. Misawa, K. et, al. "Role of sialyl lewis in total hepatic ischemia and reperfusion". Journal of the American College of Surgeons 1996; March: vol 182: 251 - 256.
12. Mc Cord, J.M. "Oxygen derived free radicals in post-ischemic tissue injury". Amer. J. Surg. 1993; January: 165: 96 - 100.
13. Quiroz, F. et, al. "Tratado de anatomía humana". Editorial Porrúa. México D.F. 1981. Vigésima segunda edición, tomo 2.
14. Rouviere, H., Delmas, A. "Anatomía humana". Masson S.A. Barcelona 1991. Novena edición, tomo 2.
15. Sies, H. "Oxidative stress: from basic research to clinical application". American Journal of Medicine 1991; September 30: vol 91: 31 - 38.
16. Stein, H.J., Oosthuizen, M.M.J., Hinder, R.A. "Verapamil improves survival of rat heperemic island skin flaps. Surgery 1989; 106: 610 - 617.
17. Stein, H. et, al. "Effect of verapamil on hepatic ischemia-reperfusion injury". Amer. J. Surg. 1993; January: 165: 96 - 100.
18. Shinohara, M., Kayashimak, Konomi, K. "Protective effects of verapamil on ischaemia - induced hepatic damage in the rat". Eur. Surg. Res. 1990; 22: 256 - 262.
19. Schawartz. "Principles of Surgery International". Sixth edition. Mc Graw Hill. 1994.
20. Sabinston. "Tratado de patología quirúrgica". Treceava edición. Editorial Interamericana Mc Graw Hill 1991, tomo 2.
21. Thomas, C.E., Reed, D.J. "Current status of calcium in hepatocellular injury". American Association for the Study of Liver Diseases. 1989; vol 10: (3): 357 - 384.

XIII. ANEXOS

