

Estado oxidativo periférico en pacientes trasplantados de hígado*

J.A. González Correa, R. Aragonés Manzanares¹, M^aM. Arrebola Ramírez, A. Guerrero Loriguillo, J. Muñoz Marín, D. Ruiz Villafranca, G. Seller Pérez¹, J.P. De la Cruz Cortés

Resumen

Objetivo: valorar el estado oxidativo sanguíneo en pacientes sometidos a trasplante hepático.

Metodología: Estudio descriptivo, observacional, de seguimiento durante 48 h, de pacientes sometidos a trasplante hepático en el HRU "Carlos Haya" de Málaga. Intervención: extracción de sangre en 4 diferentes periodos (basal -t1-, posreperfusión -t2-, ingreso en UCI -t3- y 24 h ingreso en UCI -t4-). Determinación de magnitudes biológicas relativas al estado oxidativo: TBARS (sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico), concentraciones de glutatión y enzimas relacionadas (peroxidasa, reductasa y transferasa).

Resultados: Se incluyeron 89 pacientes (74% hombres, edad media 52 ± 10 años). No observamos cambios significativos en los datos de TBARS en relación con los valores basales del individuo. Sin embargo, evidenciamos un descenso estadísticamente significativo de los valores de glutatión total ($12,52 \pm 5,37$ -media ± 1 desviación típica- $\mu\text{mol}/\text{mg}$ prot -t1- vs $7,70 \pm 3,36$ -t2-, $7,92 \pm 3,51$ -t3-, $8,54 \pm 3,73$ -t4-). En relación con las actividades enzimáticas, sólo observamos un descenso significativo de la glutatión transferasa ($9,62 \pm 10,26$ $\mu\text{mol}/\text{min}$ -t1- vs $6,61 \pm 6,73$ -t2-, $6,41 \pm 11,17$ -t3-, $4,91 \pm 4,54$ -t4-) coincidiendo con las concentraciones más bajas de glutatión apuntadas anteriormente.

Conclusión: La depleción de las concentraciones de glutatión y la baja capacidad antioxidante constituyen la pieza clave en el desequilibrio del estado oxidativo valorado en nuestro estudio.

Palabras clave: Estado oxidativo. Trasplante hepático. Peroxidación lipídica. Glutatión

Summary. Blood oxidative status in patients under liver transplantation

Objective: to assess blood oxidative status in patients undergoing liver transplantation.

Methods: Descriptive, observational follow-up study during 48h, on patients undergoing liver transplantation in the HRU "Carlos Haya" (Málaga, Spain).

Intervention: blood samples were drawn in four periods: (t1) basal pre-surgical sample, (t2) post-reperfusion sample, (t3) admission at ICU, and (t4) 24h after ICU admission. Some biochemical properties related with oxidative status were analysed in each sample: TBARS (thiobarbituric acid- reactive substances), concentration of glutathione and its related enzymatic activities (peroxidase, reductase and transferase).

Results: 89 patients were included (74% men, mean age: 52 ± 10 y). No statistically significant changes were observed in TBARS values along follow-up. However, a statistically significant decrease in glutathione levels was observed: 12.52 ± 5.37 (mean \pm one typical deviation) $\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein at t1 vs 7.70 ± 3.36 at t2, 7.92 ± 3.51 at t3 and 8.54 ± 3.73 at t4. Respect to the glutathione-related enzyme activities, only a significant decrease in glutathione transferase activity was observed: 9.62 ± 10.26 $\mu\text{mol}/\text{min}$ at t1, 6.61 ± 6.73 at t2, 6.41 ± 11.17 at t3 and 4.91 ± 4.54 at t4, which could explain in part the depletion in glutathione concentration described above.

Conclusion: Decrease in glutathione concentration supports lower antioxidant ability in patients under liver transplantation, and can play a key role in the alteration of the oxidative status observed in our study.

Key words: Oxidative Stress. Liver Transplantation. Lipid Peroxidation. Glutathione

INTRODUCCIÓN

El trasplante es la única alternativa terapéutica para muchos de los pacientes con hepatopatías en fase terminal, consiguiendo una mayor supervivencia y calidad de vida. El número creciente de receptores, se acompaña de un aumento de la edad media del donante por la demanda de órganos. Este fenómeno estimula toda investigación que trate de aportar luz a la fisiopatología del fracaso

del injerto, al desarrollo de complicaciones o descubrir factores que influyan en la supervivencia del órgano y la mortalidad.

Los factores relacionados con la supervivencia siguen siendo objeto de estudio y, hasta el momento, no existe un modelo que prediga completamente la misma, a pesar de los numerosos esfuerzos por conseguirlo (1-3). Se han buscado factores pretrasplante, del postoperatorio inmediato (4-6), del donante y del órgano trasplantado (7) que influyan en la mortalidad a corto y largo plazo.

El mecanismo que desencadena la disfunción del injerto no es del todo conocido, sospechándose que el estado oxidativo, alterado en la isquemia-reperfusión, pudiera estar implicado.

Se ha encontrado una relación estadísticamente significativa entre el aumento de la peroxidación lipídica plasmática y una mala evolución del injerto (8). Asimismo, las concentraciones de malonildialdehído (MDA) elevadas en biopsia hepática se relacio-

*Este trabajo corresponde a una comunicación científica presentada y premiada en el XXIII Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular, celebrado en Cádiz el 20, 21 y 22 de octubre de 2004

Laboratorio de Investigaciones Antitrombóticas e Isquemia Tisular
Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina

¹Unidad de Cuidados Intensivos

Hospital Regional Universitario "Carlos Haya". Málaga

nan con los órganos no viables, lo que apunta a un aumento de la peroxidación lipídica previa a la reperfusión (9).

La monitorización de estas magnitudes durante las fases precoces de la isquemia-reperfusión, han demostrado una respuesta rápida de estrés oxidativo, con un incremento de niveles de peroxidación lipídica en plasma (10).

Sin embargo, otros autores no han encontrado diferencias en el estado oxidativo que implicaran una disfunción en el injerto, restando incluso importancia al papel del estrés oxidativo en la isquemia-reperfusión (11).

Por este motivo, planteamos el presente trabajo con el objetivo de valorar el estado oxidativo sanguíneo en pacientes sometidos a trasplante hepático.

MATERIAL Y MÉTODOS

Población estudiada

Estudio realizado sobre todos los pacientes sometidos a trasplante ortotópico de hígado en el Hospital Regional Universitario Carlos Haya, hospital de tercer nivel, durante el periodo comprendido entre octubre del 2000 y octubre del 2002 (89 pacientes). Se siguió en todo momento la sistemática sobre trasplante hepática elaborada por la Comisión de Trasplantes del Centro. Se establecieron cuatro periodos para la obtención de sangre y la posterior valoración del estado oxidativo periférico. Los periodos fueron los siguientes: basal (t1, previo a la cirugía), posreperfusión (t2, establecido a los cinco minutos de la reperfusión del órgano trasplantado), tras el ingreso en la UCI (t3, postoperatorio inmediato) y a las 24 h del ingreso en UCI (t4, postoperatorio tardío).

Criterios de inclusión

Todos los pacientes mayores de 18 años sometidos a trasplante ortotópico hepático realizados en el Hospital Carlos Haya durante el periodo de estudio.

Criterios de exclusión

Pacientes que se negaron a participar en el mismo mediante rechazo de la firma del consentimiento informado, y aquellos pacientes en que la indicación para trasplante se debió a hepatitis fulminante, ya que la situación de estrés oxidativo en este cuadro podría sesgar los resultados del estudio.

Procedimiento

Procesamiento de las muestras

Se extrajeron 15 mL de sangre del paciente en cada uno de los periodos del estudio, anticoagulando la muestra con citrato sódico 3,8% en proporción 1:10.

Una vez obtenido el plasma (centrifugación de sangre a 2.500 x g durante 15 min a 18°C) y, tras purificación del precipitado hemático, se realizó un lavado de los hematíes, utilizando ClNa (4°C) en un volumen equivalente al del sedimento hemático. Tras agitar suavemente se centrifugó (1.000 g durante 10 min a 4°C), desechándose el sobrenadante. Al anterior precipitado hemático se añadió agua destilada a 4°C en una relación volumétrica de 1:3. Posteriormente se agitó energicamente y se incubó a 4°C durante 15 minutos. Posteriormente se centrifugó (2.000 g durante 10 minutos a 4°C)

para obtener un tercer sobrenadante y un tercer sedimento. Se desprecio este último correspondiendo a las membranas eritrocitarias. El tercer sobrenadante se alicuotó y congeló a -80°C, en tubos cónicos siliconados de 1 mL de capacidad (se almacenó un total de 500 µL) (12).

Valoración de la peroxidación lipídica

Para la determinación de la peroxidación lipídica se cuantificaron en plasma las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) siguiendo la metodología descrita previamente por nuestro grupo de trabajo (13). La absorbancia fue determinada a 532 nm (Perkin Elmer C-532001 spectrophotometer, Norwalk, USA) y la concentración de proteínas mediante el método de Bradford et al (14).

Valoración de la defensa antioxidante

Mediante la cuantificación en plasma del contenido celular de glutatión [total (GT), oxidado (GSSG) y reducido (GSH)], así como las principales actividades enzimáticas, a nivel eritrocitario, que controlan sus contenidos intracelulares: glutatión peroxidasa (GSH-px), glutatión reductasa (GSH-rd) y glutatión transferasa (GSH-tf).

La determinación de la concentración de glutatión se realizó mediante espectrofluorimetría, siguiendo la técnica descrita por Hissin y Hill (15). Para el desarrollo de esta experiencia se tomaron 0,5 mL de plasma añadiendo un volumen fijo de tampón fosfato sódico 0,1 M (pH 8,0) de 3,75 mL y 1 mL de ácido fosfórico al 25% y posterior centrifugación (13.000 g durante 30 min a 4°C). Por último, tras la adición de 0,9 mL de tampón fosfato sódico y 50 µL de O-Phtaldehído se procedió a la lectura en el espectrofluorímetro, utilizando una longitud de onda de excitación de 350 nm y de emisión de 440 nm (Fluostar Galaxi, BMG Lab Technology, Chapel Hill, USA).

Paralelamente se cuantificó el glutatión oxidado tras añadir a 200 µL de sobrenadante 8 µL de 4-vinil-piridina, con el objeto de bloquear todo paso de glutatión reducido a oxidado.

Las actividades enzimáticas GSH-px, GSHrd y GSHtf se determinaron mediante cinética espectrofotométrica. El contenido hemático fue diluido en tampón fosfato salino 0,1 M (pH 7,0) y ácido fosfórico al 25%. Posteriormente se centrifugó (13.000 g durante 15 min a 4°C). Se determinó la concentración de proteínas en el sobrenadante tras neutralizar con NaOH y a continuación se determinaron las actividades enzimáticas:

- *Glutatión peroxidasa*. La actividad GSH-px fue determinada siguiendo el método descrito por Flohé y Gunzler (16). Se tomó de cada muestra un volumen equivalente a 25 µg de proteínas, añadiéndole tampón fosfato potásico 0,1 M, en un volumen necesario para conseguir 880 µL, 53 µL de glutatión-reductasa, 133 µL de GSH, 100 µL de NADPH. Se agitó la microcubeta por inversión y se incubó en un baño termostato a de 37°C durante tres minutos. Transcurrido este tiempo se extrajo la microcubeta del baño, y se le adiciónó a la muestra 100 µL de terbutil-hidroperóxido, agitando de nuevo por inversión, e introduciéndola en el espectrofotómetro. A continuación se realizó la lectura a una longitud de onda de 340 nm durante 5 minutos, midiendo el decremento de la absorbancia de la muestra cada 30 segundos.

- *Glutatión reductasa*. La actividad GSSG-rd fue determinada siguiendo el método descrito por Flohé y Gunzler (16). Las cantidades de muestras y tampón son iguales a las empleadas en el análisis de GSH-px. Tras añadir 100 µL de NADPH se agitó la cubeta por inversión e incubó a 37°C durante 3 minutos; posterior-

mente se añadieron 100 µL de GSSG, se agitó por inversión y, por último, se procedió a la lectura a 340 nm durante tres minutos. Lo que se cuantificó en este caso fue el decremento de absorbancia cada 30 segundos, obteniéndose el cero con el tampón.

• *Glutathion transferasa*. La actividad de GSH-tf fue determinada siguiendo el método descrito por Warlhom et al (17). Las cantidades de muestra y tampón fueron iguales a las empleadas en el análisis de las anteriores actividades enzimáticas. La solución se agitó por inversión y se incubó durante 3 min a 37° C. A continuación, se añadieron 50 µL de 1-cloro 2,4-Dinitrobenzeno (CDNB), se agitó nuevamente por inversión realizándose la lectura espectrofotométrica a una longitud de onda de 340 nm.

Todos los reactivos químicos utilizados han sido suministrados por Sigma Chemical Corp. (St. Louis, MO, USA).

Tratamiento estadístico

La valoración estadística de los resultados se realizó mediante la utilización del programa para ordenador personal SPSS ver. 12.0 (SPSS Inc., 2004), licenciado para su uso por el Servicio Central de Informática de la Universidad de Málaga.

Una vez confirmada la homogeneidad de las varianzas, se realizó una comparación de medias mediante la prueba estadística ANOVA, aplicando posteriormente la prueba de mínimas diferencias significativas. Asimismo se utilizó la prueba estadística de comparaciones individuales. Se consideró como mínima significación estadística aquella diferencia $P = 0,05$. Los datos recogidos en el texto y en las tablas expresan la media \pm una desviación típica.

Consideraciones éticas

Aunque se trata de un estudio sin intervención, supone la extracción de una cantidad adicional de sangre al paciente (aunque en ningún caso la punción específica para el estudio) por lo que se consideró necesaria la aprobación del mismo por el Comité de Ética e Investigación Clínica del centro. A todos los pacientes se les presentó para su firma un consentimiento informado previo a la inclusión en el estudio, documento que a su vez había sido sometido previamente a la aprobación del mencionado comité.

RESULTADOS

Se incluyeron 89 pacientes en el estudio, la mayoría hombres (74%, $n = 65$), siendo la media de edad de $52,3 \pm 10$ años. En relación con la patología que motivó el trasplante, la viral (60%) y etílica (29%) fueron las más frecuentes. En el momento del trasplante el 70% de los pacientes se encontraban en un estadio "B" de Child Pough.

Los valores de TBARS no se modificaron durante los distintos periodos analizados en relación con el nivel que presentaba el paciente antes del trasplante (tabla I).

Sin embargo si aparecieron cambios en la defensa antioxidante, observándose una disminución de las concentraciones de glutatión total en plasma en los distintos tiempos de extracción con respecto a la concentración basal. Esta disminución resultó estadísticamente significativa (tabla II). Esta reducción de las concentraciones de glutatión fue a expensas del glutatión reducido, ya que el porcentaje de glutatión oxidado con respecto al glutatión total no se vio modificado con respecto a los valores basales (tabla III).

Tabla I. Valores de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) plasmático en los distintos tiempos de extracción en pacientes sometidos a trasplante hepático

Tiempo de extracción	TBARS (µmol/mg proteína)
Basal	35,65 \pm 14,14
Posrreperusión	35,08 \pm 11,51
Ingreso en UCI	34,56 \pm 10,92
24 h del ingreso en UCI	35,09 \pm 11,57

Media \pm Desviación típica
UCI: Unidad de Cuidados Intensivos

Tabla II. Valores de glutatión total plasmático en los distintos tiempos de extracción en pacientes sometidos a trasplante hepático

Tiempo de extracción	Glutatión total (µmol/mg proteína)
Basal	12,52 \pm 5,37
Posrreperusión	7,70 \pm 3,36*
Ingreso en UCI	7,92 \pm 3,51*
24 h del ingreso en UCI	8,54 \pm 3,73*

Media \pm Desviación típica
UCI: Unidad de Cuidados Intensivos
* $P < 0,05$ con respecto al valor basal

Tabla III. Valores de glutatión total plasmático en los distintos tiempos de extracción en pacientes sometidos a trasplante hepático

Tiempo de extracción	% GSSG/GT
Basal	18,20 \pm 12,54
Posrreperusión	18,94 \pm 12,68
Ingreso en UCI	17,37 \pm 9,62
24 h del ingreso en UCI	18,38 \pm 9,78

Media \pm Desviación típica
UCI: Unidad de Cuidados Intensivos
GT: Glutatión total, GSSG: Glutatión oxidado

En relación con las actividades enzimáticas, no se modificó la actividad GSH-px, aunque se redujeron las actividades GSSG-rd y GSH-tf (tabla IV).

DISCUSIÓN

El trasplante es la única alternativa terapéutica para muchos de los pacientes con hepatopatías en fase terminal, consiguiendo una mayor supervivencia y calidad de vida.

Los factores relacionados con la supervivencia siguen siendo objeto de estudio y, hasta el momento, no existe un modelo que prediga completamente la misma, a pesar de los numerosos esfuerzos por conseguirlo (1-3).

Se ha encontrado una relación estadísticamente significativa entre el aumento de lipoperoxidación medida en plasma y un postoperatorio inmediato tórpido del trasplante hepático en humanos, así como una mala evolución del injerto (8). Las concentraciones de TBARS elevadas en biopsia hepática se relacionan con los órganos no viables lo que apunta a un aumento de la lipoperoxidación previa a la reperusión (9).

Tabla IV. Actividades de las enzimas relacionadas con el glutatión en los distintos tiempos de extracción en pacientes sometidos a trasplante hepático

Tiempo de extracción	GSH-px ($\mu\text{mol}/\text{min}$)	GSSG-rd ($\mu\text{mol}/\text{min}$)	GSH-tf ($\mu\text{mol}/\text{min}$)
Basal	58,07 \pm 24,87	9,14 \pm 11,05	9,62 \pm 10,26
Posreperusión	55,53 \pm 23,41	8,59 \pm 13,16	6,61 \pm 6,73
Ingreso en UCI	62,85 \pm 35,63	7,76 \pm 14,33	6,41 \pm 11,17
24 h del ingreso en UCI	59,73 \pm 27,71	6,54 \pm 8,85	4,91 \pm 4,54*

Media \pm Desviación típica

UCI: Unidad de Cuidados Intensivos

GSH-px: glutatión peroxidasa, GSSG-rd: glutatión reductasa, GSH-tf: glutatión transferasa.

* $P < 0,05$ con respecto al valor basal

En nuestro estudio las concentraciones de TBARS no sufren cambios importantes con respecto a la concentración basal. Este hecho puede estar relacionado con varios factores. Por un lado, la respuesta antioxidante puede haber mantenido los valores de peroxidación lipídica en un límite admisible en periodos de tiempo cercano al peri y postoperatorio (aunque esto suponga una disminución de las concentraciones de glutatión que posteriormente se relacione con otras complicaciones). Por otro lado, otros factores, por ejemplo el tratamiento inmunosupresor, pueden incrementar los niveles de peroxidación lipídica, si bien este incremento se apreciará en estadios más tardíos del postrasplante.

No obstante, podrían influir otros factores, como es el hecho del componente dilucional presente en las transfusiones, así como que el aporte de concentrado de hemáties pueda disminuir temporalmente el número de radicales libres, en virtud a una disminución de la actividad oxidativa de la hemoglobina consecuencia de la conservación (bajo condiciones fisiológicas cada día el 3% de la hemoglobina total se convierte a la forma oxidada metahemoglobina) (18).

La influencia de los radicales libres en la lesión por isquemia-reperusión hepática ha quedado patente en diferentes estudios. Durante la reperusión la cantidad y la rapidez con que se generan los radicales libres excede la capacidad endógena antioxidante generándose un estrés oxidativo. La administración de *scavengers* de los radicales libres en diferentes estudios experimentales en animales (19) ha demostrado su efecto protector.

La monitorización de los mismos durante las fases precoces de la isquemia-reperusión, ha demostrado una respuesta rápida de estrés oxidativo, con un incremento de niveles de peroxidación lipídica en plasma que podemos dividir en dos grupos, la mayoría de los trasplantados (65%) presentan una respuesta precoz a los 5 min y el resto a los 120 min (10).

Los cambios bioquímicos que definen el desbalance del estatus oxidativo ocurren en las fases iniciales de la reperusión, alcanzando los niveles más altos de oxidación a los cinco minutos del comienzo de la misma. Los resultados demuestran un incremento de radicales superóxido durante la reperusión del injerto (20).

Nuestro estudio trata de aportar luz al comportamiento oxidativo del enfermo trasplantado incluyendo, además de la cirugía, el postoperatorio inmediato. Las concentraciones basales de glutatión se reducen de forma significativa tras la reperusión, donde alcanza su concentración más baja, coincidiendo con otros autores (21), sin que se observe recuperación después de 48 horas.

A continuación comprobaremos, valorando el porcentaje de glutatión oxidado respecto del total, si existe una actitud defensiva por parte del organismo (hígado principalmente).

El porcentaje de GSSG respecto al glutatión total no cambia apenas a lo largo de los diferentes tiempos analizados, lo que indica

una capacidad defensiva baja. Es decir, el sistema antioxidante se ha visto desbordado durante la reperusión, aportando en las sucesivas determinaciones un preocupante grado de inactividad que, a nuestro juicio, pudiera condicionar la evolución del trasplante, principalmente en estadios tempranos del mismo.

En relación con los resultados obtenidos, y dado que no existen diferencias significativas en relación con los porcentajes de GSSG/GT, podemos afirmar que el momento de máxima agresión oxidativa se produce entre la reperusión y las primeras 24 h. Además, nuestro estudio aporta que durante todos los periodos analizados cercanos a la intervención, la capacidad defensiva es baja. Este hecho es revelador: independientemente de la recuperación funcional del hígado, determinada por magnitudes bioquímicas convencionales, el órgano trasplantado presenta una baja capacidad defensiva que va a repercutir en determinados procesos que pueden, incluso, ensombrecer la evolución. Aquí se abre la puerta, y se aporta desde el punto de vista aplicativo, variables claves para una posible intervención: por un lado, preservar el órgano donante teniendo en consideración la disminución de glutatión. Por el otro, administrar sustancias antioxidantes (22) o *scavengers* (23) al paciente receptor desde etapas lo más precoces posibles.

Diferentes procesos patológicos en los que se altera el estado oxidativo evidencian una reducción en las actividades de las enzimas relacionadas con el glutatión (24-25).

Las actividades enzimáticas relacionadas con el glutatión se ven afectadas en nuestra serie. En todos los casos disminuyen durante la reperusión, manteniéndose este descenso de actividad, aunque con pequeñas diferencias en cuanto al comportamiento de las distintas enzimas, durante todos los periodos de tiempo incluidos en el estudio. Podemos aventurar que este comportamiento de las enzimas provoca una disminución del glutatión y una pobre respuesta defensiva del sistema antioxidante. Este hecho es extensivo a otros trasplantes, dado que la explicación al mismo se relaciona con el fenómeno etiopatogénico: el síndrome de isquemia-reperusión (26).

En definitiva, pensamos que la depleción de las concentraciones de glutatión y la baja capacidad antioxidante constituyen la pieza clave en el desbalance del estado oxidativo valorado en nuestro estudio.

BIBLIOGRAFÍA

- Baliga P, Merion RM, Turcotte J. Preoperative risk factor assessment in liver transplantation. *Surgery* 1992; 112:704-11.
- Satheesh N, Verma S and Thuluvath PJ. Pretransplant renal function predicts survival in patients undergoing orthotopic liver transplantation. *Hepatology* 2002; 35:1179-85.

3. Sieders E, Peeters PM, Tenvergert EM. Prognostic factors for long-term actual patient survival after orthotopic liver transplantation in children. *Transplantation* 2000; 70:1448-53.
4. Eckhoff DE, Pirsch JD, D'Alessandro A. Pretransplant status and patient survival following liver transplantation. *Transplantation* 1995; 60:920-5.
5. Singh N, Gayowsky T and Wagener M. Intensive care management in liver transplant recipients: beneficial effects on survival and preservation of quality of life. *Clin transplant* 1997; 11:113-20.
6. Gayowsky T, Marino I, Singh N. Orthotopic liver transplantation in high-risk patients: factors associated with mortality and infectious morbidity. *Transplantation* 1998; 65:499-504.
7. Briceño J, Marchal T, Padillo J, Solórzano G and Pera C. Influence of marginal donors on liver preservation injury. *Transplantation* 2002; 74:522-6.
8. García-Valdecasas JC, Rull R, Grande L. Prostacyclin, thromboxane, and oxygen free radicals and postoperative liver function in human liver transplantation. *Transplantation* 1995; 60:662-7.
9. Harvey PR, Ju S, McKeown CM, Petrunka CN, Ilson RG and Strasberg SM Adenine nucleotide tissue concentrations and liver allograft viability after cold preservation and warm ischemia. *Transplantation* 1988; 45:1016-20.
10. Biasi F, Poli G, Salizzoni E. Effect of perioperative infusion of antioxidants on neutrophil. Activation during liver transplantation in humans. *Transplant proc* 2002; 34: 755-8.
11. Ardite E, Ramos C, Rimola A, Grande L and Fernández-Checa JC. Hepatocellular oxidative stress and initial graft injury in human liver transplantation. *J Hepatol* 1999; 31:921-7.
12. Aydin A, Orhan H, Sayal A, Ozata M, Sahin G, and Isimer A. Oxidative stress and nitric oxide related parameters in type II diabetes mellitus: effects of glycemic control. *Clin Biochem* 2001; 34:65-70.
13. de la Cruz JP, Carrasco T, Ortega G and Sanchez de la Cuesta F. Inhibition of ferrous-induced lipid peroxidation by pyrimido-pyrimidine derivatives in human liver membranes. *Lipids* 1992; 27:192-4.
14. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-54.
15. Hissin PJ and Hill R. A fluorimetric method of determination of oxidized and reduced glutathione on tissues. *Anal Biochem* 1976; 74: 214-26.
16. Flohé L and Gunzler WA. Assays of glutathione peroxidase. *Meth Enzymol* 1985; 105:114-21.
17. Warholm M, Guthenberg C, Von Bahr and Mannervik B. Glutathione transferases from human liver. *Meth Enzymol* 1985; 113:449-503.
18. Stocker R, and Frei B. Endogenous Antioxidant Defences in Human Blood Plasma. En: *Oxidative Stress: Oxidants and antioxidants*. H. Sies (ed). Academic Press Limited. 1991, pp. 213-43.
19. Chávez-Cartaya RE, Ramírez P, and Jamieson NV. Haemoglobin saturation in the rat liver after ischemia and reperfusion: study using a laser photometry technique and correlation with changes in liver tissue blood flow. *Eur Surg Res* 1995;27:82-92.
20. Serrano E, Díaz J, Acosta F, Palenciano CG, Parrilla P and Carbonell LF. Oxidative stress during ischemia-reperfusion in liver transplantation. *Transplant Proc* 2000;32:2651.
21. Trevisani F, Caraceni P, Simoncini M. Evidence of oxidative imbalance in long-term liver transplant patients. *Dig Liver Dis* 2002;34:279-284.
22. Amersi F, Dulkanchainun T, Nelson SK. A novel iron chelator in combination with p-selecting antagonist prevents ischemia/reperfusion injury in a rat liver model. *Transplantation* 2001;71:112-118.
23. Giakoustidis D, Kontos N, Iliadis S. Severe total hepatic ischemia and reperfusion: relationship between very high alpha-tocopherol uptake and lipid peroxidation. *Free Raduc Res* 2001;35:103-9.
24. Coldiron AD, Sanders RA and Watkins JB. Effects of combined quercetin and coenzyme Q(10) treatment on oxidative stress in normal and diabetic rats. *J Biochem Mol Toxicol* 2002;16:197-202.
25. Sewerynek E, Reiter RJ, Melchiorri D, Ortiz GG and Lewinski A. Oxidative damage in the liver induced ischemia-reperfusion: protection by melatonin. *Hepatogastroenterology* 1996;43:898-905.
26. Pechan I, Danova K, Olejarova I, Halcak L, Rendekova V and Fabian J. Oxidative stress and antioxidant defense systems in patients after heart transplantation. *Wien Klin Wochenschr* 2003;115:648-51.

Correspondencia:

José Antonio González Correa
Departamento de Farmacología
Facultad de Medicina.
Campus Universitario de Teatinos, s/n.
29071 Málaga
correa@uma.es