

**PAPEL DE LOS ANTIOXIDANTES EN LA LESIÓN
POR ISQUEMIA-REPERFUSIÓN.
ESTUDIO EXPERIMENTAL DE TRASPLANTE
RENAL CON DONANTE A CORAZÓN PARADO**

ANTONIO AGUILAR RUIZ

AGRADECIMIENTOS

A los directores de esta tesis, Dr. Antonio Alcaraz, el espejo donde cualquier "aprendiz" de urología quisiera verse reflejado, ejemplo de profesionalidad, y al Dr. Alvarez-Vijande la elegancia quirúrgica por excelencia.

A los Dres. Alcover, Franco, Gutiérrez, Mallafré, Romero, Talbot y al Prof. Carretero por sus enseñanzas.

A la Dra. Calatrava, de anestesiología, por su espíritu infatigable.

Mención especial para el Dr. Alcoberro, una ayuda imprescindible, al Dr Navarro, mi "residente grande", y no sólo grande de edad sino grande de corazón, pionero del trabajo experimental. A los Dres. Capdevila y Rodríguez, , compañeros durante todo el proyecto.

Al Dr. Corral, compañero de promoción, de residencia, un gran amigo.

Al resto de residentes con los que compartimos una bella época irrepetible.(Dr Vendrell, Dr Barranco,Dr Llopis, Dra Luque, Dr Rodríguez, Dra Ribal, Dr Cetina,Dra Gibanel)

A la Dras. Montse Helena, Elena Casals e Imma Mercadé del servicio de Bioquímica.

A la Sra Cristina Coder, nunca una mala cara, .

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Historia del trasplante renal.....	1
1.1.1. Revisión histórica.....	1
1.1.2. Inmunología.....	3
1.1.3. Resultados.....	4
1.2. Legislación de los trasplantes de órganos.....	7
1.3. Vías de solución.....	8
1.3.1. Donante marginal.....	8
1.3.2. Donante a corazón parado.....	9
1.3.2.1. Concepto de donante a corazón parado.....	9
1.3.2.2. Tipos de donante corazón parado.....	10
1.3.2.3. Criterios de selección.....	12
1.3.2.4. Procedimientos.....	12
1.3.2.5. Aspectos sociales y legales.....	17
1.3.2.6. Resultados.....	17
2. SÍNDROME DE ISQUEMIA REPERFUSIÓN.....	21
2.1. Fase isquemia: alteraciones celulares.....	22
2.2. Fase reperfusión: alteraciones celulares.....	26
2.3. Alteraciones endoteliovascular.....	27
2.3.1. Endotelina.....	28
2.3.2. Endotelinas y riñón.....	30
2.3.3. Óxido nítrico.....	33
2.3.4. Prostaciclina.....	37
2.3.5. Lesión tubular renal 2ª al daño por I-R.....	42
2.3.5.1. α -GST.....	42
2.3.5.2. β -N-acetilhexaminadasa.....	44

3. RADICALES LIBRES DE OXÍGENO.....	47
3.1.Toxicidad RLO.....	48
3.1.1.Toxicidad directa.....	48
3.1.2.Toxicidad indirecta.....	49
3.2.Efectos de los RLO en patología médica.....	49
4. ANTIOXIDANTES (SCAVENGERS).....	53
4.1.Superóxido dismutasa (SOD).....	54
4.2.Glutation peroxidasa.....	55
4.3.Glutation reductasa.....	57
5. HIPÓTESIS.....	61
6. OBJETIVOS.....	63
7. MATERIAL Y MÉTODOS.....	65
7.1.Infraestructura y aparataje del quirófano.....	66
7.2.Animales de experimentación y preparación preoperatoria.....	67
7.3.Diseño del estudio.....	68
7.4.Modelo de trasplante renal en el cerdo.....	69
7.4.1.Técnica anestésica.....	69
7.4.2.Técnica quirúrgica en el donante.....	71
7.4.3.Cirugía de banco.....	72
7.4.4.Técnica quirúrgica en el receptor.....	73
7.4.5.Cuidados postoperatorios.....	76
7.5.Determinaciones analíticas y biopsias.....	77
7.6.Tipo de muestra y marcadores.....	79
7.6.1.Marcadores de lesión celular renal.....	79
7.6.2.Estudio histológico.....	79
7.6.3.Estudio de antioxidantes.....	80

INDICE

7.7.Métodos analíticos y procesamiento de muestras.....	80
7.7.1.Pruebas de bioquímica general.....	80
7.7.2. Método analítico para la determinación de los antioxidantes.....	81
7.7.3. Método analítico para la determinación de nucleótidos de la adenina y derivados.....	82
7.7.3. Muestras histológicas.....	83
7.7.3.1. Procesamiento de las muestras.....	83
7.7.3.2.Valoración anatomopatológicas de las muestras.....	83
7.8. Método de análisis estadístico de los resultados.....	87
8. RESULTADOS.....	89
8.1.Supervivencia según el tiempo de isquemia.....	89
8.2.Análisis de la viabilidad según el tiempo de isquemia.....	90
8.3. Fases del modelo experimental.....	91
8.4.Evolución global de los antioxidantes según fase.....	93
8.4.1.Evolución de los antioxidantes global.....	94
8.4.1.1.SOD.....	94
8.4.1.2.Glutation Reductasa.....	95
8.4.1.3.Glutation Peroxidasa.....	96
8.4.2.Evolución de los antioxidantes en el grupo con isquemia caliente de 40 minutos.....	97
8.4.2.1.SOD.....	97
8.4.2.2.Glutation Reductasa.....	99
8.4.2.3.Glutation Peroxidasa.....	100

8.4.3.Evolución de los antioxidantes en el grupo con isquemia caliente 90 minutos.....	102
8.4.3.1.SOD.....	102
8.4.3.2.Glutation Reductasa.....	103
8.4.3.3.Glutation Peroxidasa.....	105
8.5. Evolución de los antioxidantes según viabilidad.....	106
8.5.1.SOD.....	106
8.5.2.Glutation Reductasa.....	108
8.5.3.Glutation Peroxidasa.....	109
8.6.Nivel de los antioxidantes y viabilidad analizada por grupos...	110
8.6.1.Grupo G0: Control (corazón latiente).....	110
8.6.1.1.S.O.D.....	110
8.6.1.2.Glutation Reductasa.....	111
8.6.1.3.Glutation Peroxidasa.....	112
8.6.2.Grupo G1:40 minutos isquemia caliente sin recirculación.....	113
8.6.2.1.S.O.D.....	113
8.6.2.2.Glutation Reductasa.....	115
8.6.2.3.Glutation Peroxidasa.....	116
8.6.3.Grupo G2: 40 minutos isquemia caliente con recirculación.....	117
8.6.3.1.S.O.D.....	117
8.6.3.2.Glutation Reductasa.....	118
8.6.3.3.Glutation Peroxidasa.....	119

8.6.4.Grupo G3: 90 minutos isquemia caliente	
con recirculación.....	121
8.6.4.1.S.O.D.....	121
8.6.4.2.Glutation Reductasa.....	123
8.6.4.3.Glutation Peroxidasa.....	124
8.7.Evolución de los antioxidantes en cada fase	
según viabilidad.....	125
8.7.1.Grupo G2: Isquemia caliente 40 minutos.....	125
8.7.1.1.SOD.....	125
8.7.1.2.Glutation Reductasa.....	126
8.7.1.3.Glutation Peroxidasa.....	127
8.7.2.Grupo G1: 40 minutos isquemia caliente sin	
recirculación.....	128
8.7.2.1.SOD.....	128
8.7.2.2.Glutation Reductasa.....	130
8.7.2.3.Glutation Peroxidasa.....	131
8.7.3. Grupo G3: 90 minutos de isquemia caliente con	
recirculación.....	133
8.7.3.1. SOD.....	133
8.7.3.2. Glutation Reductasa.....	134
8.7.3.3. Glutation Peroxidasa.....	136
8.8. Evolución de los antioxidantes según	
el tiempo de isquemia aplicado.....	137
8.8.1. SOD.....	137
8.8.2. Glutation Reductasa.....	138
8.8.3. Glutation Peroxidasa.....	140

INDICE

8.9.Efecto de la recirculación extracorpórea sobre los riñones sometidos a 40 minutos de isquemia caliente.....	142
8.9.1. SOD.....	142
8.9.2. Glutation reductasa.....	143
8.9.3. Glutation peroxidasa.....	144
8.10.Carga energética según viabilidad.....	146
8.11.Nivel ATP según viabilidad.....	148
8.12.Nivel de Hipoxantina y Xantina según viabilidad.....	149
8.12.1.Hipoxantina.....	149
8.12.2.Xantina.....	150
8.13.Estudio histológico.....	152
8.13.1.Muestras intraoperatorias.....	152
8.13.2.Muestras al 5º día postoperatorio.....	154
8.13.2.1.Grupo control.....	154
8.13.2.2.Grupo 1.....	154
8.13.2.3.Grupo 2.....	154
8.13.2.4.Grupo 3.....	155
9. DISCUSIÓN.....	157
10. CONCLUSIÓN.....	171
11. BIBLIOGRAFÍA.....	177

1.INTRODUCCIÓN

1.1 .HISTORIA DEL TRASPLANTE RENAL ^{1,2,3}

1.1.1.REVISIÓN HISTÓRICA.

En **1902**, en la ciudad de Viena, Emerich Ullmann autotrasplantó con éxito el riñón de un perro, de la fosa lumbar al cuello del animal. Se prosiguió con trasplantes entre animales y humanos y en **1906**, en Lyon se realizó el primer xenotrasplante heterotópico de cabra y cerdo a muslo y brazo de pacientes en estado de insuficiencia renal crónica terminal, sin resultados positivos.

En **1909**, en la ciudad de Berlín se lleva a cabo un trasplante renal de un perro *fox terrier* a un *boxer* consiguiendo una correcta función renal durante 14 días. Al no obtenerse éxito con los xenotrasplantes, se introdujo el concepto de “barrera bioquímica” que impedía los trasplantes heterólogos.

El punto de inflexión se produjo al depurar la técnica vascular de anastomosis a través de dos hechos: utilización de “*patch*” y la *triangulación*, llevado a cabo por Alexis Carrel, discípulo de Jaboulay. Comprobó que cuando el riñón se trasplantaba a otro perro se producían fenómenos de autodestrucción.

Posteriormente en **1933**, en la U.R.S.S. se realizó el primer trasplante renal humano con riñón de cadáver realizado por Yu Yu Voronoy.

En el Reino Unido Sir P. Medawar, cirujano plástico , descubre las leyes básicas de la inmunología del trasplante (concepto de histocompatibilidad y tolerancia).

En Holanda sincrónicamente , Willem Kolff inicia las primeras hemodiálisis lo que posteriormente supondrá asegurar la supervivencia del paciente trasplantado a pesar del fracaso del injerto.

En la ciudad norteamericana de Chicago en **1950**, Lawler coloca el primer injerto renal en la cavidad abdominal. En 1951 diferentes equipos quirúrgicos (Dubost y Oeconomos, Servelle y Rougeulle, Küss, Teinturier y Milliez) implantaron el riñón en la fosa ilíaca derecha y se plantearon diferentes causas de los fracasos: incompatibilidad biológica, condiciones difíciles en la extracción de órganos, infección, etc.

En **1952**, en Paris, Vaysse y Oeconoms realizan el primer trasplante de donante vivo emparentado. Pero no es hasta 1954 cuando Murray, en Boston, consigue una larga supervivencia al realizar un trasplante entre hermanos gemelos univitelinos.

Nuevos avances marcarán la evolución de los trasplantes. El concepto de “**muerte cerebral**” establecido en 1968 por el *Comité de Haward Medical School* y aceptado posteriormente por el resto de los países permitirá la extracción de órganos de cadáver en situación hemodinámica que permita el mínimo sufrimiento del parénquima renal.

El empleo de transfusiones pretrasplante en el receptor, Opelz 1973, con el objetivo de mejorar la tolerancia al nuevo órgano y una supervivencia más larga, no fueron aceptadas en un primer momento. Sus efecto beneficiosos fueron demostrados por Opelz y Terasaki en el *Congreso de la Sociedad Internacional de Trasplantes* celebrado en 1978 en Roma.

En nuestro país los primeros intentos de trasplante son realizados por Martínez Piñeiro en **1960**, entre dos hermanos, y por Younger en **1961** de padre a hijo, pero sin conseguir resultados aceptables.

Gil-Vernet en **1965** en el Hospital Clínico y Provincial de Barcelona y Alférez en la Fundación Jiménez Díaz unas semanas después realizan con éxito los primeros trasplantes renales procedentes de donante cadáver.

Esta fecha supone el inicio del programa de trasplantes renales en nuestro país, incorporándose al resto de hospitales hasta componer el actual mapa de centros trasplantadores.

1.1.2. INMUNOLOGÍA DEL TRASPLANTE

Jean Dausset describe por primera vez en 1958 un antígeno leucocitario. Posteriormente se descubren nuevos antígenos leucocitarios que darán lugar al sistema **HLA** (Antígeno Leucocitario Humano) en 1967. Las pruebas cruzadas (“cross-match”) entre el suero del receptor y células del donante predecirá la posibilidad de un rechazo hiperagudo (1966).

Los primeros intentos para prevenir el rechazo del injerto se llevan a cabo por Hamburger en París, entre 1959 y 1962, mediante la irradiación total del donante pretrasplante.

Küss y Legrain aplica la descapsulación renal como tratamiento del edema por el rechazo agudo.

Se practicarán posteriormente timectomías, esplenectomías y nefrectomía bilateral sin resultados positivos para conseguir similares fines.

En 1959 Zukosky y Collaway demuestran el efecto inmunosupresor de la 6-mercaptopurina. En 1961, Calne y Murray observan la eficacia de la Azatioprina en trasplantes de perros y en 1962 la utilizan por primera vez en el trasplante de humano con buenos resultados.

En 1963, Goodwin y Kaufman utilizan los esteroides como agente inmunosupresor único en el tratamiento del rechazo y son utilizados desde entonces de forma habitual. Más tarde, será empleado el suero antilinfocitario por Woodruff y Starzl. Pero es a partir de los años 1976-1978 cuando, Borel y Calne, empiezan a utilizar la ciclosporina con el éxito que hoy conocemos. En la década de los 80 su empleo ha conseguido aumentar en un 20% la supervivencia del injerto.

Cosini en 1981 utiliza por primera vez los anticuerpos monoclonales. Son útiles para el tratamiento del rechazo corticorresistente de predominio celular.

1.1.3. RESULTADOS

Según la última actualización de la *Organización Nacional de Trasplante*⁴ (ONT) realizada el 24-01-2001 que comprende el periodo de 1989-2000 observamos:

-Donantes cadáver año 2000 un total de 1.345 con tasa de 33.9 p.m.p.(1989 fueron 569 y tasa de 14 p.m.p)

-Porcentaje de donantes multiorgánicos: 81,3% año 2000 respecto al 30% en 1989

-Trasplantes renales de cadáver 1.919 con tasa 48,4 p.m.p. en el 2000 y 1021 y 26,5 p.m.p. en 1989

-Trasplantes renales de vivo 19 en el 2000 y 18 en 1989

-La edad media en donantes de menos de 15 años fue de 6,5 años y en los adultos de 48,8 años en el año 2000.

-Las causas de muerte cerebral han sido en el año 2000 el 56,3% hemorragia cerebral seguido de TCE tráfico en un 20,7% respecto al 39% de hemorragias y 43% de TCE de tráfico en el año 1992.

-Las negativas familiares a la donación (total negativas familiares/total de familias entrevistadas) fue del 22% a nivel del estado. En Cataluña se obtuvo un 17,3%, muy por debajo de la media estatal.

-El número de trasplantes, por comunidad autonómica, en el año 2000 está encabezado por Cataluña con 366 seguido de cerca por Madrid con 348. La menos activa fue Navarra con 23 trasplantes en un año.

-Los pacientes incluidos en lista de espera es de 3.986 en el 2000 respecto a 5.593 en el año 1991.

-Respecto al tratamiento que reciben los pacientes en IRC en el año 2000 podemos concluir con la existencia de 14.292 trasplantes funcionantes, 18.978 pacientes en diálisis, con 3.986 pacientes en lista de espera y con 284 hiperinmunizados.

Se puede observar que existe un decalaje importante entre la oferta y la demanda, existiendo un déficit de órganos.

INTRODUCCIÓN

Figura con los datos extraídos de la ONT respecto a la evolución del número de trasplantes renales realizados en España, en el periodo comprendido entre 1986-2000

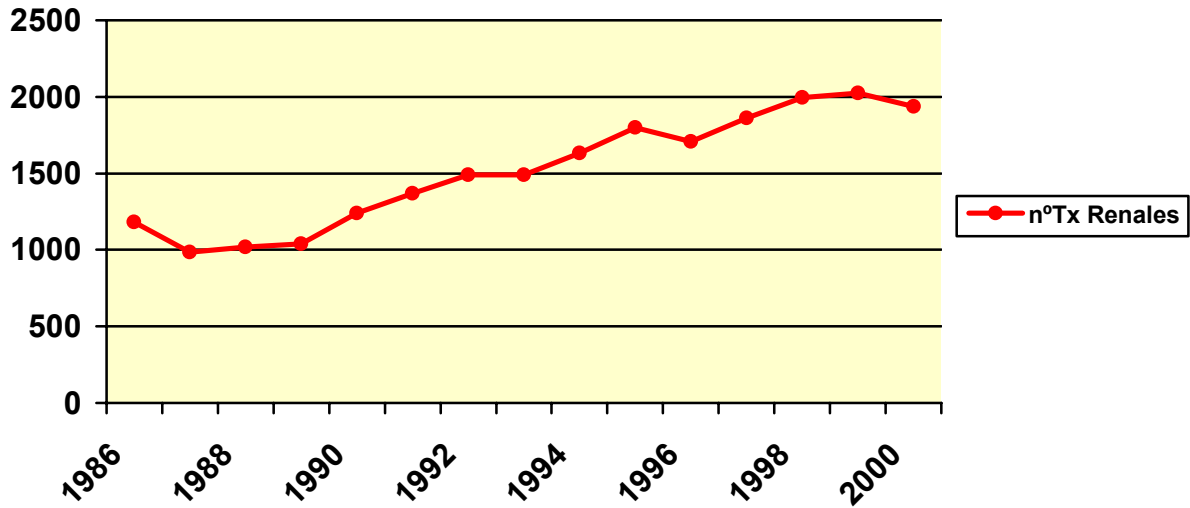
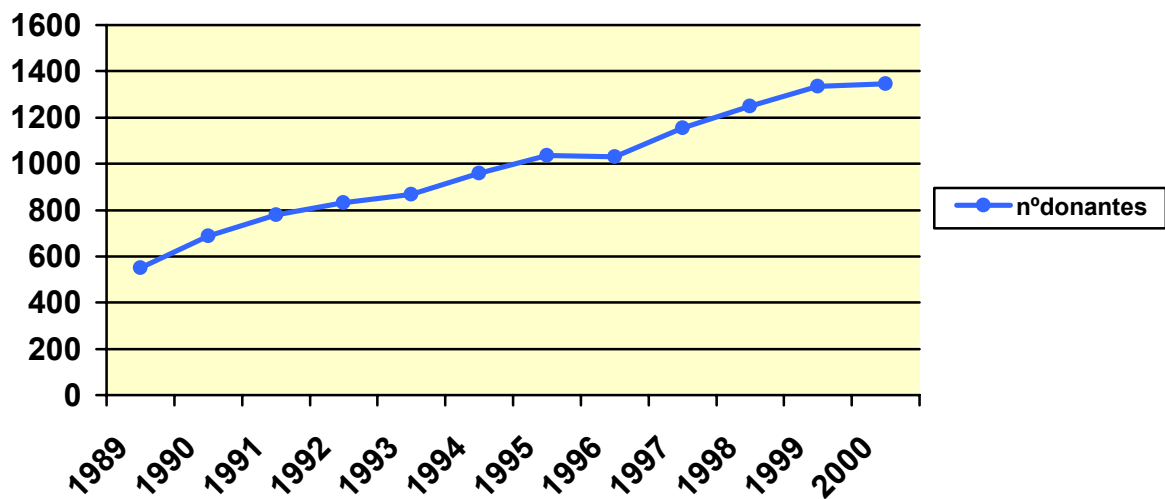


Figura que refleja el número de donantes en España durante el periodo 1989-2000.

Datos procedentes de la ONT.



1.2. LEGISLACIÓN DE LOS DONANTES DE ÓRGANOS

El interés de obtener órganos a partir de donantes a corazón parado no es nuevo. En la década comprendida entre 1960 -1970, antes de que el concepto de muerte cerebral fuera establecido, la principal fuente de obtención de órganos eran los individuos en los que ya había ocurrido la parada cardíaca. Con el desarrollo de las técnicas de reanimación y de la ventilación artificial, nace el diagnóstico de muerte encefálica en 1970: muerte del individuo previa a la parada cardiorrespiratoria por el cese de las funciones encefálicas.

En España, se promulgó la Ley Española de Trasplantes en el año 1979 desarrollada en el Real decreto 1980, que derogaba la antigua ley de 1950. Esta ley permitía regular todo el procedimiento de la donación, extracción y trasplante, de donante vivo y de cadáver, indicando los criterios médicos para el diagnóstico clínico de la muerte cerebral. A partir de aceptar el concepto de muerte cerebral, el interés en los donantes a corazón parado declinó. Los órganos obtenidos de donantes en muerte encefálica fueron de indiscutible mejor calidad demostrándose que los resultados obtenidos podían igualarse a los de donantes vivos. Todo ello derivó en el abandono casi total de la extracción de cadáver. En países como Japón, donde legalmente no se acepta el concepto de muerte cerebral, la principal fuente de donantes son a corazón parado.

1.3. VÍAS DE SOLUCIÓN

La falta persistente de órganos aptos para trasplante obliga a la utilización de todos los medios humanos y técnicos en la investigación de soluciones alternativas.

1.3.1. DONANTE MARGINAL

Como consecuencia de esta escasez se ha ido ampliando cada vez más los criterios de selección de cadáveres donantes de órganos^{5,6} con el fin de aumentar al máximo el número de órganos disponibles. Ello ha significado aceptar donantes de edad más avanzada (mayores de 60 años) al observar que esto no influía en la supervivencia posterior del paciente. También cambió la primera causa de muerte en los donantes⁷, de ser el TCE pasó a ser la hemorragia intracraneal espontánea, desplazándose el grupo de edad (20-30 años a 50-69 años). Se trata de donantes marginales, pues tienen, previo a la extracción, una estancia prolongada en UCI, con drogas vasoactivas, patologías asociadas a la edad como hipertensión arterial, diabetes mellitus, etc. Sin embargo se están utilizando de forma creciente, llegando a convertirse en los donantes más habituales.

1.3.2. DONANTE A CORAZÓN PARADO

La discrepancia actual que existe entre la oferta y la demanda de órganos ha obligado recientemente a explorar otras fuentes de donantes que permiten aumentar el número, reavivando el interés por los donantes a corazón parado. El programa de donación de donantes a corazón parado se inicio en 1980 en el Hospital Universitario de Maastrich ⁸ calculando que el número de donantes potenciales podría aumentar en un 20%.⁹

1.3.2.1. Concepto de donante a corazón parado

Se define donante a corazón parado como aquel individuo en situación de parada cardiorrespiratoria irrecuperable, fallecido con un tiempo de isquemia caliente (tiempo entre la parada cardíaca y el inicio de la perfusión fría) lo suficientemente corto que permita la extracción de órganos viables para ser utilizados para trasplante. Se considera parada cardíaca irreversible, según la Sociedad Española de Medicina Intensiva y Unidades Coronarias, cuando el paciente presenta ausencia de actividad eléctrica cardíaca efectiva tras al menos 30 minutos de reanimación cardiopulmonar en ausencia de drogas depresoras o hipotermia inducida.

1.3.2.2. Tipos de donante a corazón parado

Así como la donación de órganos basada en la muerte cerebral está regulada por ley, la basada en la parada cardiorrespiratoria del paciente no dispone de normativa.

En marzo de 1995, en el First International Workshop on Non Heart-Beating donors, celebrado en Maastrich se realizó un documento de consenso¹⁰ estableciéndose una serie de recomendaciones, definiciones y características de lo que debían ser los donantes a corazón parado. Se propuso una clasificación en 4 categorías (**Clasificación de Maastrich**).¹¹

En España este documento se ha adaptado a nuestro ambiente, quedando las conclusiones plasmadas en un Documento de Consenso Español emitido por la Organización Nacional de Trasplantes en Noviembre de 1995¹²

Categoría I : Ingreso en parada cardíaca.

El individuo sufre parada cardíaca y se traslada al hospital sin haber practicado maniobras de reanimación cardiopulmonar. No se conoce el tiempo de parada cardíaca, es decir, el tiempo de isquemia caliente. Se trata de un donante muy poco frecuente en nuestro medio.

Categoría II: Parada cardíaca con maniobras de reanimación inefectivas.

El paciente se encuentra ingresado en el hospital y sufre parada cardíaca que no se revierte con las maniobras de reanimación. La información sobre este donante sí se conoce. El objetivo es disminuir al máximo el tiempo de isquemia caliente. Hay poca experiencia publicada al respecto. Es el segundo tipo más frecuente.

Categoría III: A la espera de la parada cardíaca.

Paciente en muerte cerebral o con lesión neurológica irreversible secundaria a traumatismo o a tumor cerebral, al que, de acuerdo con la familia, se le retira la ventilación mecánica y/o el soporte terapéutico, casi siempre en el quirófano. Este tipo de donantes son denominados “controlados”; el tiempo de isquemia es muy corto y permite la extracción de varios órganos. Se dan en países como Holanda y U.S.A.^{13,14,15}. En España existe algún caso esporádico.

Categoría IV: Donante en muerte cerebral que sufre parada cardíaca.

Es el tipo de donante más frecuente en nuestro medio. Aproximadamente un 9% de donantes presentan una parada cardiorrespiratoria antes de la extracción. Debido a la inestabilidad hemodinámica previa del donante se puede prever la parada con antelación.

1.3.2.3. Criterios de selección^{16,17,18,19}

Los criterios de selección para considerar a un paciente fallecido como donante potencial de órganos a corazón parado incluyen, generalmente;

- Edad inferior a 65 años.
- Tiempo de isquemia caliente inferior a 30 minutos sin contabilizar el tiempo transcurrido durante las maniobras de resucitación cardiopulmonar efectivas, pudiendo ser el tiempo total antes de la perfusión fría de hasta 2 horas.
- El resto de criterios de selección habituales para los donantes en muerte cerebral (NO: historia de enfermedad renal, HTA no controlada, enfermedad maligna excepto el tumor cerebral primario, signos de adición a drogas vía parenteral, infección sistémica o sepsis).

1.3.2.4. Procedimientos

Al inicio:

El procedimiento de extracción de órgano a corazón parado se inicia tras el diagnóstico de muerte por parte del equipo médico que ha atendido al paciente, siendo entonces considerado el cadáver como donante potencial. Es preciso valorar con exactitud el tiempo de isquemia caliente y el tiempo transcurrido desde el inicio de las maniobras de reanimación hasta el comienzo de la recirculación fría. Inicialmente se continua la RCP mediante ventilación artificial y masaje cardíaco, con la finalidad de mantener la mejor perfusión posible de los órganos y se procede a la heparinización del donante. Algunos autores¹⁶ recomiendan el uso de fentolamina (0,125mg/KG) para provocar vasodilatación de

los vasos renales previamente a la perfusión y facilitar así el descenso rápido de temperatura. Posteriormente, se cateterizan la arteria y vena femoral por disección quirúrgica y se inicia la perfusión fría de los órganos.

“Perfusión in situ”

Al principio, la perfusión renal se conseguía mediante la perfusión por gravedad de líquido de Collins frío, a través de la arteria femoral¹⁹ (perfusión in situ), con modificaciones posteriores^{19,21,22,23,24}.

La utilización de Banowsky y col. en 1971²⁵ y García Rinaldi¹⁹ y col en 1975 de un catéter de doble balón y triple luz colocado en la aorta por vía femoral, de forma que aislara la circulación renal, permitió la perfusión fría de estos órganos y su posterior viabilidad para trasplante. Posteriormente Garvin²⁰ y Schweizer²¹ y, más recientemente Fujita²², Kootstra, Booster, Ruers y col^{16,23,24,26-29}, así como otros equipos^{17,18,30-44}, han puesto en práctica estos métodos, mediante el uso de diversos tipos de catéteres (doble y triple luz^{19,22,23,45,46}, catéter de Foley¹⁹, catéter de Anaise^{47,48}, catéter de cuatro luces⁴⁹) obteniendo buenos resultados y aconsejando la inclusión de este grupo de donantes en el programa de obtención de órganos.

Se ha sugerido que el enfriamiento renal de superficie, mediante “perfusión peritoneal hipotérmica continua”⁵⁰ podría reducir la temperatura renal y proteger la microvascularización en caso de perfusión fría no suficientemente efectiva y

especialmente en casos de perfusión de larga duración^{47,48}. Paprocki⁵¹ ha utilizado esta técnica de forma aislada en 4 donantes con buen resultado.

Otro factor que ha sido relacionado con una mejoría en la función renal postrasplante ha sido la presión de perfusión del líquido de preservación. Anaise^{47,48,50} demuestra que cuando ésta es de 70mm de Hg el descenso de la temperatura es más rápido y efectivo (hasta 15°C en 5 minutos). Elevadas presiones en el líquido de preservación mejoran la función renal postrasplante⁵¹. Una presión de perfusión baja aumentaría la liberación de renina-angiotensina, lo que ocasionaría un aumento de las resistencias vasculares renales condicionando una disminución del flujo renal y una mala hipotermia^{47,48}.

Se han ensayado diferentes líquidos de perfusión (HTK¹⁶, Wisconsin³⁴, Ringer lactato²², Euro-Collins). La solución de Wisconsin contiene adenosina, que es necesaria en la síntesis de ATP, mejora la microcirculación, inhibe la agregación plaquetar y protege las células endoteliales. La HTK es una excelente solución de perfusión debido a su baja viscosidad. La solución Euro-Collins tiene la desventaja que causa aumento de las resistencias vasculares pues tiene una concentración elevada de potasio (115mmol/L) que causa vasoconstricción de los capilares glomerulares dando lugar a una mala perfusión. Además, antes de su uso debe ser mezclada con glucosa(70mL de glucosa al 50% con 930mL de E-C).

Recientemente varios estudios están devolviendo protagonismo a la preservación de los órganos mediante la utilización de “máquinas de perfusión pulsátil” hasta el implante. Estos estudios han demostrado una mejoría en el

funcionalismo renal postrasplante en aquellos riñones afectados por daño isquémico. Reduce la incidencia de retraso inicial en la función del injerto^{53,54} y regenera el ATP⁵⁷ en riñones sometidos a isquemia caliente. Este tipo de preservación, en oposición a la preservación fría simple, podría reducir las resistencias vasculares inducidas por la isquemia y facilitar la eliminación de los restos de hematíes de la microcirculación permitiendo una mejor reperusión post-implante⁵⁶.

Otras técnicas como el “enfriamiento corporal total” han sido ensayadas en estudios experimentales con animales⁵⁸ como alternativas a la perfusión in situ, obteniendo resultados favorables. Tras los buenos resultados obtenidos con la perfusión corporal total mediante circulación extracorpórea para la preservación de corazón y pulmón, así como en los casos de la extracción multiorgánica⁵⁹, Koyama^{52,60} y otros autores han utilizado la técnica del “enfriamiento corporal total” mediante “by pass cardiopulmonar” en donantes renales humanos a corazón parado con buenos resultados. Hoshino⁶³ en sus estudios experimentales plantea la obtención de hígados y riñones en este tipo de donantes mediante la técnica citada. Esta, con la alta presión de perfusión del líquido de preservación, permite la perfusión correcta del cadáver, su oxigenación y enfriamiento, por lo que se prevé que en un futuro próximo sea el método de elección para la obtención de órganos en este grupo de donantes. Presenta, no obstante, problemas en su utilización en los donantes politraumáticos con ruptura del árbol vascular (hemotórax, ruptura de grandes vasos, hemoperitoneo,...)

Recientemente, se ha descrito, a nivel experimental, la “recirculación normotérmica”. Consiste en la perfusión de los órganos a 37°C con sangre hiperoxigenada mediante by pass cardiopulmonar, previo al “enfriamiento corporal total”. Disminuye de forma importante el retraso en la función inicial de estos injertos. Ello se podría explicar, en primer lugar, porque la sangre se ha demostrado que es mejor solución de preservación que los cristaloides para recuperar el tejido dañado^{63,64}. Van der Wijk⁶⁵ y col ya lo observaron en riñones preservados ex vivo de esta manera y Gaber y col.⁶⁶ lo demostraron con un modelo experimental en ratas.

Mayfieldy col.⁶⁵ demostraron la mejoría de los riñones perfundidos con sangre en el control del edema tisular y la actividad de la bomba de iones. Maessen y col.⁶⁴ evidenciaron la mejora de la viabilidad de riñones dañados por la isquemia y almacenamiento en hielo durante 48 h cuando eran sometidos a una inmediata perfusión normotérmica. Otros autores^{67,68} concluyen, a nivel experimental, que la utilización de recirculación normotérmica permite recuperar los niveles de adenin-nucleótidos, con la consecuente importancia para la viabilidad del órgano. En este sentido, Rijkmans y col.⁶⁹ expone que es posible prevenir el daño irreversible mediante la perfusión sanguínea. Se ha visto que mejora la supervivencia del trasplante hepático y que permite trasplantar hígado con un tiempo de parada cardíaca entre 20 y 40 minutos. El daño que estos hígados sufren debido a la isquemia es reversible^{67,69}. Algunos grupos han usado esta técnica obteniendo buenos resultados tanto en hígado^{67,70,71} como en riñón⁶⁷.

1.3.2.5. Aspectos sociales y legales

Una vez el cadáver, en parada cardiorrespiratoria irreversible, se ha perfundido, y durante la fase de enfriamiento de los órganos se procede a solicitar el consentimiento familiar y judicial, si fuera preciso, para la donación. Una vez obtenidos éstos, el cadáver es conducido a quirófano donde se practica la extracción de los órganos. El consentimiento familiar adquiere en este grupo de donantes una mayor dificultad por el mayor dramatismo del momento dada la agudeza del proceso. Los aspectos legales también tienen unas características especiales que lo diferencian de los procedimientos habituales de los donantes por muerte cerebral. Destaca el hecho de que el cadáver está diagnosticado como éxitus por el equipo médico que lo atendió, debiéndose, a partir de este punto, diferenciar dos posibilidades: a) el caso de la muerte natural, donde el certificado médico de defunción y el consentimiento familiar son suficientes para autorizar la extracción de órganos y, b) el caso de la muerte violenta, en el que, antes de la extracción de órganos, es preciso la presencia del médico forense, que permitirá la extracción durante la autopsia (autopsia-extracción), que se realizará, en este caso, en condiciones de asepsia en quirófano y de inmediato tras los procedimientos previos antes detallados.

1.3.2.6. Resultados

La inclusión de donantes a corazón parado en el grupo de donantes aptos para trasplante ha supuesto un incremento en el número total de donantes (entre un 7 y un 20% según las series).

El trasplante renal acumula la mayor parte de órganos con donantes a corazón parado. Aunque en estos momentos sea relativamente corta la casuística ha dado lugar a un gran número de publicaciones. Todas ellas coinciden en que los riñones así obtenidos son útiles para trasplante. A pesar de tener una mayor incidencia de fracaso de la función inicial, su supervivencia a largo plazo se aproxima a la obtenida con aquellos riñones provenientes de donantes a corazón latiendo.

El *Hospital Clínico y Provincial de Barcelona* inició el programa de identificación y obtención de riñones a partir de donantes a corazón parado en 1986. Expondremos a continuación la experiencia en este centro y sus resultados⁷².

Desde octubre de 1986 hasta marzo de 1999 se han obtenido 57 potenciales donantes a corazón parado. La edad de los donantes fue de 39.5 ± 15.6 años y la distribución por sexos 43 varones y 12 mujeres. 51 donantes fueron de la categoría II de Maastrich y 6 donantes fueron de la categoría IV. Las causas de muerte fue de enfermedad cardíaca (40,4%) o politraumatismo (36,8%). El tiempo medio de isquemia caliente fue de 68.9 ± 35.6 minutos.

En 9 casos (15,3%) el proceso fue abortado debido a la negativa familiar y en 2 casos debido a negativa judicial (3,4%). 16 donantes (27,2%) fueron rechazados debido a contraindicación clínica: técnica de perfusión deficiente en el donante en 9 casos (15,8%), órganos mal perfundidos en 2 casos (3,5%), y factores de riesgo o serología vírica positiva en 5 casos (8,7%).

INTRODUCCIÓN

En el Hospital Clínico se han empleado tres tipos diferentes de perfusión de órganos. Desde 1986 hasta 1989 se usó la “perfusión in situ”, de 1990 a 1996 “el enfriamiento total corporal” con by-pass cardiopulmonar y últimamente desde 1997 hasta la fecha se utiliza la recirculación normotérmica. El tipo de perfusión de los órganos fue la siguiente: 29 casos (50.9%) perfundidos con técnica de perfusión in situ con solución fría de Collins por gravedad, y en 8 casos (14%) perfusión in situ mediante bomba no pulsátil. 11 casos (17%) fueron perfundidos mediante enfriamiento corporal total pero en 3, debido al retorno venoso limitado, se suspendió este tipo de perfusión y se inició la perfusión in situ por gravedad. En los restantes 6 donantes(10.52%) se usó la técnica de recirculación normotérmica.

En resumen: se obtuvieron 30 donantes efectivos. 44 riñones se consiguieron con perfusión in situ, 8 riñones de donantes perfundidos con enfriamiento corporal total y 8 con recirculación normotérmica, Dos riñones no fueron trasplantados debido a problemas intraoperatorios de los receptores, siendo trasplantados finalmente 58 riñones, 2 de ellos en otro centro.

Los receptores tenían una edad media de 44.2 ± 16.5 años. 36 eran hombres y 20 mujeres, en 18 casos(32.1%) los riñones funcionaron inmediatamente. Se observó retraso en la función del injerto en 29 receptores (51.8%). La duración media del retraso de la función del injerto fue de 20 días. 9 riñones nunca llegaron a funcionar (16.1%). La curva de supervivencia actuarial del riñón fue de 76.4% al año y 56% a los 5 años. La supervivencia del paciente fue de 89.3 % a los cinco años.

INTRODUCCIÓN

Después de más de 14 años de experiencia en nuestro hospital, el programa de extracción de riñones a partir de donantes a corazón parado ha demostrado que esta fuente de obtención de órganos puede contribuir a la expansión del número potencial de donantes. Los resultados obtenidos son muy similares al resto de series publicadas.

El handicap principal de este tipo de riñones es la elevada incidencia de retraso en la función inicial del injerto que según las series oscila entre el 47 al 78.4% (H.Clínico: 51.8%) y el elevado porcentaje de riñones que nunca llegaron a funcionar entre 4-19% (H.Clínico: 16.1%).

Es importante conocer en profundidad lo que ocurre en un riñón después de un periodo de isquemia caliente (durante la parada cardíaca) y su posterior reperfusión con el objeto de poder actuar sobre el potencial injerto.

2. SÍNDROME DE ISQUEMIA-REPERFUSIÓN

Se define como el proceso que sufre un órgano sometido temporalmente a la falta de flujo sanguíneo y que posteriormente es reperfundido con sangre oxigenada.

Existen tres fases bien definidas:

1. Isquemia caliente
2. Isquemia fría
3. Reperfusion

El resultado es una agresión tisular secundaria a la anoxia, a la privación de metabolitos y el acúmulo de sustancias de deshecho del metabolismo que conduce a la muerte celular.

En los donantes a corazón parado la lesión por isquemia –reperfusion es más importante, dado que se añade un tiempo de isquemia caliente, más o menos prolongado, a la habitual isquemia fría, de manera que existe un mayor riesgo para su viabilidad a corto y largo plazo.

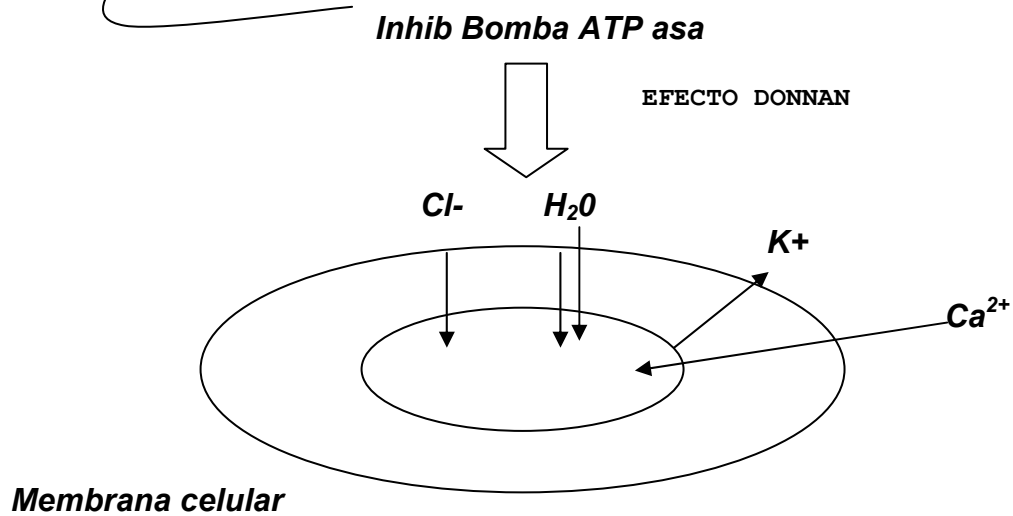
El empeoramiento de la función renal debido a este síndrome es un problema importante en el trasplante. La isquemia produce *per se* un daño celular y se continua con un posterior deterioro debido a la reperfusion. Por tanto la entrada de sangre oxigenada puede ser más perjudicial para el órgano que la falta de la misma.

El síndrome de isquemia-reperfusion es una secuencia compleja de sucesos trascendentales: la alteración metabólica a nivel celular que aparece durante el periodo de isquemia y la lesión producida por los radicales libres

derivados del oxígeno y otros factores que involucran el endotelio vascular y los polimorfonucleares durante la reperfusión⁷³.

2.1. FASE DE ISQUEMIA. ALTERACIONES CELULARES.

Isquemia-



1. **EDEMA CELULAR**
2. **ACTIVACIÓN ENZIMÁTICA.DESTRUCCIÓN MEMBRANAS**

La membrana plasmática se altera al inhibirse la actividad de la bomba ATPasa Na-K (transporta el Na⁺ hacia el exterior celular y el K⁺ hacia el interior). Con la inhibición de esta bomba se produce la alteraciones de los iones sodio, potasio y calcio alterando el potencial de membrana que queda abolido. Debido a la elevada concentración de cloro extracelular y la presencia de elevada concentración protéica intracelular el cloro penetra dentro de la célula con un catión (sodio y calcio) arrastrando agua y el potasio sale fuera para mantener el equilibrio iónico con el espacio intersticial. Todo ello conduce al edema celular y activación de enzimas por el calcio como las fosfolipasas (producirá la lesión de las diferentes membranas: citoplasmática, mitocondrial, lisosomal), proteasas, ATPasas (deplección de ATP) y endonucleasas (fragmentación de cromatina) conllevando a la muerte por citolisis. (*Efecto Donnan*: se crea una presión oncótica coloidal intracelular alta).

La isquemia produce también la **inhibición de la fosforilación oxidativa** a nivel de la mitocondria, con escasa formación de ATP, quedando paralizadas todas las funciones celulares que requieran energía y se estimula la *glicolisis anaerobia* formándose ácido láctico e hidrogeniones dando lugar a la *acidosis intracelular*⁷⁴⁻⁷⁶. Esta provoca la activación de los enzimas de los lisosomas conduciendo a la autólisis y muerte celular.

Mecanismo molecular (Fig 1 pág. 25) : En 1981 Granger, Rutili y McCord⁷⁷ fueron los primeros en proponer este mecanismo para explicar la producción de lesiones en el síndrome de isquemia-reperfusión: durante el periodo de isquemia

se produce consumo de ATP por parte de las células para mantener la homeostasis. El ATP es catabolizado a ADP y AMP. El AMP, a su vez, se cataboliza a hipoxantina, produciéndose un acúmulo de ésta. La carga energética de las células cae y estas no son capaces de mantener el gradiente iónico entre sus membranas, redistribuyéndose el calcio hacia el interior de la célula aumentando la concentración del mismo en el espacio intracelular. Los acúmulos de xantinaoxidasa y de sus sustratos: hipoxantina y xantina durante el período de isquemia parecen ser los acontecimientos necesarios para producir la lesión en las células durante la posterior reoxigenación, puesto que llegará el oxígeno necesario para la enzima con la consecuente producción de radicales libres de oxígeno.

SÍNDROME DE ISQUEMIA-REPERFUSIÓN

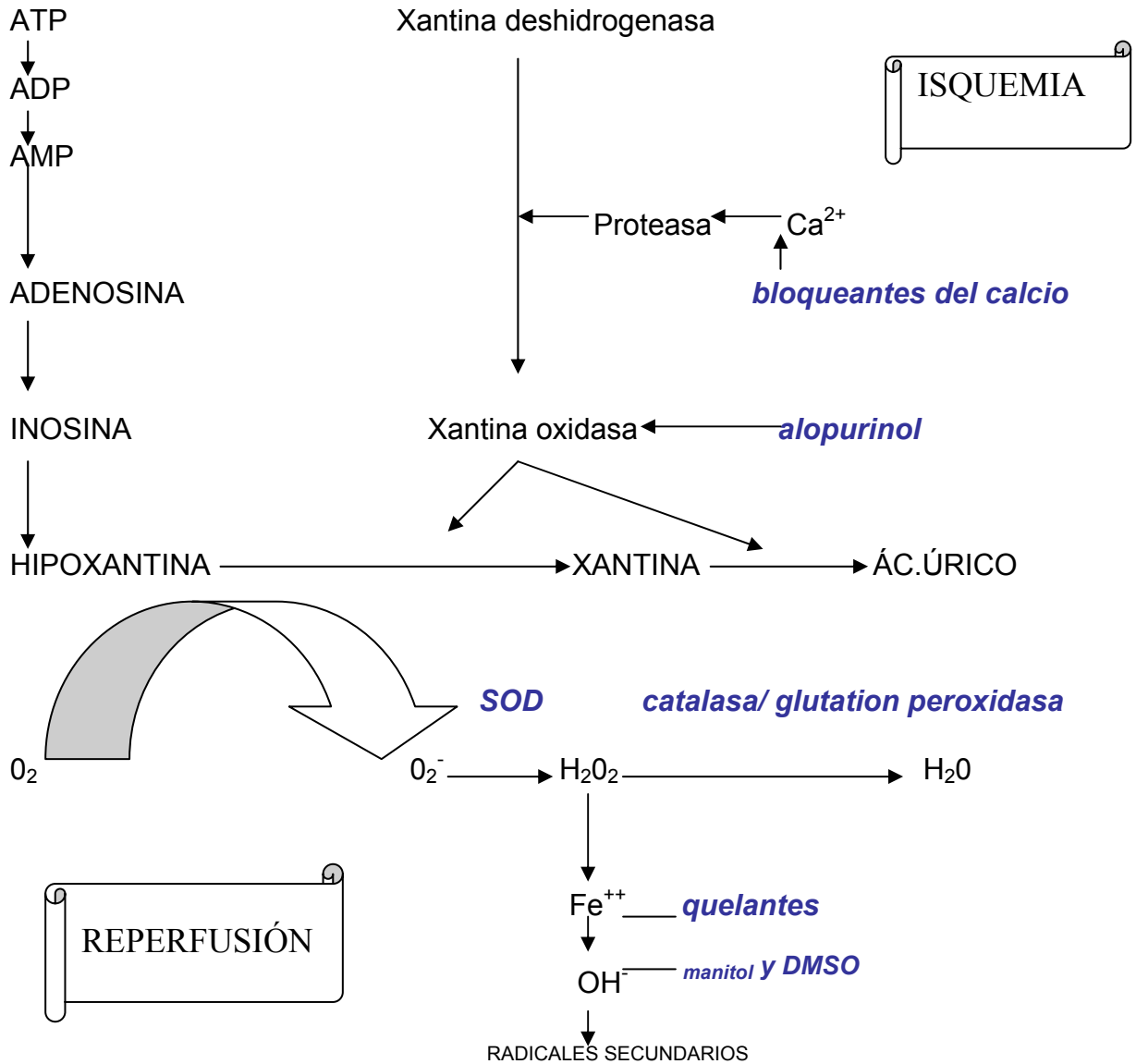


Fig 1. Mecanismo de producción del síndrome isquemia-reperfusión.

Los nucleótidos de alta energía se hidrolizan progresivamente durante el periodo de isquemia, con la consecuente acumulación de hipoxantina. Además, existe una rápida conversión de xantina deshidrogenasa en xantina oxidasa. En consecuencia, tanto ésta como la hipoxantina están presentes en exceso. Durante la reperfusión se produce la entrada masiva de O_2 , a partir del cual se producen los RLO, que son los que provocaran la lesión del tejido. Se muestran asimismo (en azul y cursiva) las sustancias capaces de proteger frente a esta lesión (Modificado de Granger, Rutili y McCord)⁷⁷.

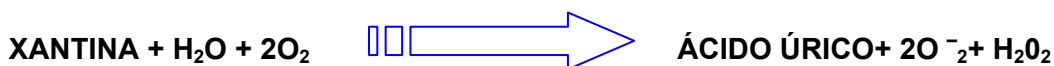
2.2. FASE DE REPERFUSIÓN.ALTERACIONES CELULARES.

Reentrada masiva de oxígeno al tejido: el flujo sanguíneo se reinstaura llegando de nuevo oxígeno de forma importante a las células.

El exceso de Ca^{2+} intracitoplasmático activa la enzima proteasa que activa el paso de Xantina-D (deshidrogenasa) a Xantina-O (oxigenasa) en presencia de NADPH^{78-80} . La Xantinaoxidasa es la mayor fuente biológica de producción de superóxidos en tejidos postisquémicos^{74,81}, siendo la primera fuente documentada de producción de dicho radical. En los tejidos normóxicos la forma sintetizada es la xantinadeshidrogenasa. La xantinadeshidrogenasa no puede transferir electrones al oxígeno molecular para formar peróxido de hidrógeno o superóxido, pero puede reducir el NAD^+ (nicotinamida adeninnucleotido).



En condiciones de baja concentración de oxígeno como ocurre en la fase de isquemia sucede la transformación de Xantino-D en Xantino-O y ésta utiliza el oxígeno molecular en lugar del NAD^+ produciendo superóxido y peróxido de hidrógeno:



De esta forma se han sintetizado los **RADICALES LIBRES DE OXÍGENO**

2.3.ALTERACIONES ENDOTELIO VASCULAR.

Durante los últimos 20 años se han producido grandes avances en el estudio del papel que desarrolla el endotelio en la dinámica vascular. El endotelio, se creía previamente, que sólo era una barrera permeable a los iones, moléculas orgánicas y también una zona de efectos metabólicos , sobretodo en la microvasculatura pulmonar (por ej. Convirtiendo la angiotensina I en angiotensina-II y eliminando las prostaglandinas de la circulación). A pesar de que estos descubrimientos eran de importancia considerable, no preveían el importantísimo papel del endotelio vascular como un órgano regulador del tono vascular sintetizando y liberando sustancias vasoactivas, jugando un papel crítico en la regulación hemodinámica de la microcirculación.

Para mantener la permeabilidad de los vasos sanguíneos y la fluidez de la sangre, las células endoteliales sintetizan algunas sustancias activas, incluyendo grandes moléculas como fibronectina y sulfato de heparina, interleukina-1, activador de plasminógeno tisular, varios factores de crecimiento y pequeñas moléculas como prostaciclina, factor relajante derivado del endotelio (EDRF), hoy conocido como óxido nítrico, factor activador de las plaquetas y endotelina-1

La producción de estas sustancias es modulada por cambios en la concentración de mensajeros intracelulares como el AMP_c - GMP_c - Ca²⁺ y por interacciones entre el endotelio y sus células, plaquetas o constituyentes del plasma.

Es importante conocer la importancia fisiológica de las *sustancias vasoactivas* (**ENDOTELINA-1, ÓXIDO NÍTRICO Y PROSTACICLINA**) su relación en

las funciones del endotelio y el papel desempeñado en el daño por isquemia-reperfusión.

2.3.1.ENDOTELINA

En 1988, Yagagisawa y col ⁸³ , aislaron, a partir de un medio de cultivo de células endoteliales de aorta porcina, un péptido de 20 aminoácidos llamado *endotelina*, el cual se ha mostrado como el más potente vasoconstrictor endógeno “in vivo” e “in vitro” conocido hasta ahora. Es 10 veces más potente que la Angiotensina-II, vasopresina y neuropéptido Y.

El término endotelinas ⁸⁴ , sin embargo, se refiere a la familia de isopéptidos definida como ET-1, ET-2 y ET-3, que contienen dos puentes disulfuro (Cis1-Cis 15 y Cis3-Cis11) que les confieren una estructura tridimensional con forma de espiral cónica y aunque muestran propiedades similares, bioquímica y biológicamente están codificados por tres genes diferentes localizados en los cromosomas 6, 1 y 20 respectivamente y su expresión está regulada de forma diferente según los órganos y tejidos. Tienen una estructura parecida al veneno de serpiente *Actractspic Engaddensis*, llamado sarafotoxina.

La síntesis de endotelina está primariamente regulada a nivel transcripcional (mRNA). La transcripción de endotelinas puede estar influenciada por sustancias vasoactivas como angiotensina-II, vasopresina, noradrenalina y trombina, pero también por factores de crecimiento, citoquinas, estrés e hipoxia⁸⁵. La naturaleza de estos péptidos deriva de sus grandes precursores, denominados preproendotelinas (203 a 212 aminoácidos), los cuales serán transformados

posteriormente en grandes endotelinas (38 a 41 aminoácidos). La proteólisis de las grandes endotelinas a pequeñas endotelinas, por el enzima convertidor de la endotelina (ECE), es un paso necesario para que estos péptidos se transformen en moléculas biológicamente activas de 21 aminoácidos.

Las endotelinas tienen diferentes “orígenes celulares”. En el territorio vascular la ET-1. Es detectada sólo en las células endoteliales; ello explica, probablemente, que sea la principal isoforma circulante. También se ha detectado en células no vasculares como cerebro, riñón y pulmón. La ET-2 (humana) es prevalente en el tracto gastrointestinal, riñón, y en pequeñas cantidades en miocardio, placenta y útero. ET-3 (rata) puede encontrarse en el torrente sanguíneo pero a muy bajos niveles. Altas concentraciones de este péptido se describen sobre todo en cerebro, riñón, suprarrenal, pulmón e intestino.

En mamíferos, se han identificado dos subtipos de “receptores” de las endotelinas denominados tipo A (ET_A) y tipo B (ET_B). El ET_A es altamente específico para la ET-1 y está ampliamente distribuido en las células del músculo liso vascular. La unión de ET-1 al receptor ET_A produce la mayoría de los efectos vasoconstrictores de este péptido. A diferencia del receptor ET_A , el ET_B responde de forma igual a todas las isoformas de endotelinas, está presente en las células e inicialmente se pensó que estaba implicado en la vasodilatación. Recientemente, datos *in vitro* e *in vivo*, demuestran que media en vasoconstricción de vasos arteriales de humanos sanos.

Las diversas “acciones vasculares” de las endotelinas incluyen: vasoconstricción potente, aumento de las resistencias vasculares, efectos presores, acciones inotrópicas y cronotópicas positivas, regulan el tono de los vasos linfáticos, aumentan la permeabilidad vascular produciendo edema intersticial al inducir la liberación de TxA_2 ^{86,87}. Están implicadas, también, en un aumento del hematocrito ya que al producir vasoconstricción se produce una disminución del volumen plasmático y una hemoconcentración (Goetz et col. 1988, Millez et col. 1989, López-Farre et col. 1989). Entre las “acciones no vasculares” destacan:

- Promueven la mitogénesis de células musculares lisas vasculares, fibroblastos, melanocitos, capilares cerebrales, células estrelladas hepáticas.
- Son potentes constrictores de la vejiga de mamíferos.
- Inductores de contracciones uterinas.
- Estimulan la producción de testosterona por las células de Leydig.
- Implicadas en la glicogenolisis hepática.

2.3.2. ENDOTELINAS Y RIÑÓN

En el riñón, en concreto, las endotelinas juegan un papel importante en la regulación de la función renal. Prueba de ello es que se han identificado mRNA para ET-1, ET-2 y ET-3 en la médula, córtex y vasos de riñones humanos. Péptidos activos de ET se ha localizado principalmente en las células endoteliales de los vasos sanguíneos intrarrenales, incluyendo las arterias arcuatas e interlobares, arteriolas, venas arcuatas vecinas y células endoteliales de los

glomérulos. El riñón es rico en receptores para las endotelinas. El receptor ET_A está localizado principalmente en los vasos renales mientras que el ET_B predomina en los túbulos colectores; también está presente en las células mesangiales, glomerulares y el resto del epitelio tubular^{88,89}.

El riñón es cerca de 10 veces más sensible que otras regiones vasculares a los efectos constrictores de la ET-1. La ET-1 puede aumentar o inhibir la liberación de renina, participar en la regulación de la excreción de sodio y agua y liberar aldosterona actuando sobre los túbulos colectores. A nivel renal, la ET-1 puede estimular la proliferación de células mesangiales y su contracción y también puede aumentar las resistencias vasculares conllevando una disminución del flujo sanguíneo renal, de la filtración glomerular y del volumen urinario⁹⁰.

Están implicadas en los mecanismos de la HTA: primero producen vasodilatación transitoria con la consecuente hipotensión ya que pueden inducir la liberación de óxido nítrico y prostaciclina (De Nucci et col. 1988 y Hermán et col. 1989), para finalmente producir una sustancial vasoconstricción: HTA por liberación de TxA₂ (De Nucci et col. 1988) y/o aumento del Ca²⁺ (Yanagisawa et col. 1988). Por otra parte, Sirosis contradice que los productos de la ciclooxigenasa estén implicados en el efecto de la ET-1 sobre la tensión arterial⁸⁷. También participan en la nefrotoxicidad por ciclosporina⁹¹ y el rechazo agudo del trasplante^{92,93} observado en humanos y a nivel experimental.

Jugarían un papel importante en el fallo renal agudo inducido por la isquemia-reperfusión^{91,94-96}. Wilhelm et col⁹⁷ demuestran, al observar en su modelo experimental en rata, que es sobretodo tras la isquemia, cuando se activa

el preproET-1 mRNA y aumenta la actividad ET-1 en los capilares peritubulares renales. También, se han observado aumentos del nivel de ET-1 tras la isquemia-reperfusión en cerdos trasplantados de hígado⁹⁸ y en ratas al clampar el pedículo renal y que estos aumentos estaban correlacionados con elevaciones en la creatinina y el BUN^{99,100}. En un estudio de Kon et col. Se observó que, al inyectar un bolus de ET-1 de forma selectiva en la circulación renal o provocar un aumento de ET-1 (tras inducir isquemia-reperfusión en ratas al clampar el pedículo vascular) se producía un descenso del flujo plasmático renal y de la filtración glomerular secundario al aumento de las resistencias vasculares glomerulares¹⁰¹. Espinosa et col. Demuestran en su trabajo experimental en conejos, que también la ET-1, tras isquemia-reperfusión, contribuye al acúmulo de polimorfonucleares (PMN)¹⁰² al estimular la expresión de las moléculas de adhesión de superficie CD18 (integrinas) de estas células.

En estudios experimentales de trasplante renal en ratas¹⁰³, trasplante hepático en cerdos con donante a corazón parado e isquemia caliente de 90 min.¹⁰⁴ e isquemia-reperfusión hepática en ratas¹⁰⁵ y perros¹⁰⁶ clampando-desclampando el pedículo vascular durante 120 min, se han observado niveles elevados de ET-1 tras la isquemia-reperfusión. Al administrar un antagonista inespecífico de los receptores ET_A y ET_B (TAK-044 en hígado y BQ-123 en riñón) se atenua el deterioro de la microcirculación y de la función del órgano y se reduce el grado de infiltración por PMN. Estos antagonistas podrían ser un tratamiento potencial para su uso en clínica¹⁰⁷.

2.3.3. ÓXIDO NÍTRICO (NO)

En 1980 Furchgott y Zawdzki usando tiras de aorta en un baño de órganos descubrieron que el endotelio de los vasos era esencial para el efecto vasodilatador de la acetil-colina. Evidenciaron que este efecto era debido a una sustancia a la que denominaron *factor relajante derivado del endotelio* (EDRF)¹⁰⁸. En 1987 Palmer y Moncada¹⁰⁹ demostraron que este factor era el *Óxido Nítrico*. El óxido nítrico es un gas incoloro, escasamente soluble en agua y fácilmente oxidable¹¹⁰. La molécula de NO tiene un peso molecular de 30 daltons. Contiene un electrón no pareado en su capa exterior y debido a ello posee las características de un radical, lo cual explica su elevada reactividad y su tendencia a la unión con hemoproteínas reducidas. El óxido nítrico es un radical libre debido a su electrón no pareado, es inestable en presencia de oxígeno y agua, se oxida a nitrito y nitrato que son sus metabolitos estables. Su vida media es de 3-6 segundos, siendo el nitrito (NO₂) el producto más abundante de su catabolismo. El NO actúa activando la forma soluble de la guanilciclase e incrementa el GMP_C a nivel de la célula del músculo liso vascular. Para ello se requiere la reducción del hierro (Fe⁺⁺ del hemo). El GMP_C activa una proteinquinasa que fosforila las cadenas de la miosina produciéndose relajación del músculo liso vascular¹¹⁰. El sustrato para la síntesis del NO es la L-arginina. El enzima que cataliza la formación del NO a partir de L-arginina es la óxido nítrico sintasa (NOS); una dioxigenasa que existe en varias isoformas. La NOS cataliza la oxidación del átomo de nitrógeno de uno de los terminales guanidino de la L-arginina generando citrulina y eliminando NO y anión superóxido. Todas las isoformas

enzimáticas requieren L-arginina, oxígeno, NADPH como sustratos y flavinadeninnucleótido, flavinmononucleótido, grupo hemo y tetrahidrobiopterina (BH_4) como cofactores ¹¹¹ (FIG. 3)

La familia de isoformas de la NOS se divide principalmente en isoforma constitutiva (cNOS) e isoforma inducible (iNOS). La cNOS requiere el cofactor Ca^{2+} para unirse a la calmodulina y así activarse (Ca^{2+} dependiente) ^{84, 110,112,113}. Se conocen dos subtipos de ésta: neuronal-NOS I/ nNOS y endotelial-NOS III/ eNOS. Recientemente se ha aislado una cuarta isoforma a partir de hepatocitos humanos: iNOS hepática. La diferencia en la estructura bioquímica de estas enzimas radica en el terminal NH_2 , mientras que el terminal $COOH^-$ confiere la similitud entre ellas y la citocromo P_{450} reductasa.

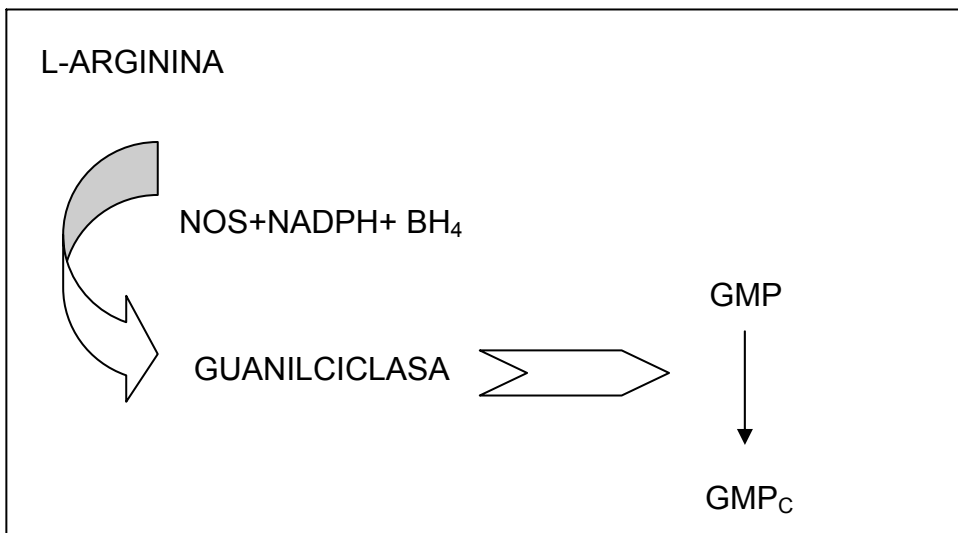


FIG. 3. Formación del NO a partir de L-arginina.

El terminal nitrógeno guanidino de la L-arginina es transformado a NO por una oxidación. Se requieren cofactores: NADPH, BH₄. El NO estimula la guanilciclasa de la célula transformándose el GMP en GMP_C.

La localización ¹¹⁰ en el riñón de estas enzimas es la siguiente: cNOS en mácula densa, vasos preglomerulares, túbulos precolectores, proximales y distales, y asa de Henle .

Entre los factores activadores de cNOS¹¹⁰ se encuentran: acetilcolina, bradikinina, leucotrienos, FAP, aminoácidos, ione de Ca²⁺, estímulo eléctrico, mastocitos, PMN y algunas neuronas. Como factores inhibidores de cNOS se han descrito al FNT α . Factores activadores de iNOS: endotoxinas (lipopolisacáridos de las membranas celulares bacterianas) y citoquinas (IF γ , FNT α , FNT β , IL-1). Los inhibidores de iNOS: glucocorticoides, citoquinas (TGF β , IL-4, IL-10, etc.) El L-NAME, L-NNMA tienen efector inhibidor inespecífico sobre NOS ^{114,115}.

El NO presenta *actividades biológicas* ^{116,117} . Es un potente vasodilatador, inhibe la adherencia leucocitaria y la interacción de las plaquetas con el endotelio vascular, inhibe la mitogénesis y la proliferación de las células musculares lisas vasculares. En el riñón el NO juega un papel crucial en la regulación de las funciones hemodinámicas y excretoras^{110,116,117} Es un importante regulador del tono vascular glomerular y del coeficiente de ultrafiltración de los capilares glomerulares. También juega un papel en la regulación de la reabsorción tubular de sodio y agua. La reducción de su síntesis provoca un aumento de reabsorción tubular de sodio y agua al parecer mediado por la angiotensina II endógena. El

descenso de NO provoca un aumento de la actividad plasmática de renina y de los niveles intrarrenales de A II. El flujo sanguíneo es más sensible en la médula que en la corteza a la disminución de NO y la actividad de la cNOS es mucho mayor en la médula que en la corteza. La disminución de su síntesis provocaría una disminución en el flujo medular que llevaría a un mayor gradiente osmótico en la médula y a un aumento en la reabsorción de sodio y agua ^{110,116,117}.

Al tener un electrón no apareado es su estructura química, puede aceptar electrones y de ese modo ser *scavenger* del anión superóxido. Incluso puede llegar a inhibir la producción del mismo por los neutrófilos. Pero, por otra parte, puede tener efecto citotóxico directo y ha sido implicado en el daño de los tejidos ¹¹⁸. Los macrófagos son una fuente importante de producción de NO a partir de iNOS ejerciendo acción patógena.

Luego existe mucha controversia sobre el papel del NO. Numerosos trabajos han intentado esclarecer el papel del NO en el daño por isquemia-reperfusión. Unos apoyan la hipótesis que durante este fenómeno se produce un aumento de actividad de cNOS ^{119,120-122}; otros de iNOS ¹¹⁴ y otros de ambos ¹²³.

La mayoría concluye afirmando el efecto protector del NO ^{117,124-127, 120-122,128}. Este jugaría un papel importante en el mantenimiento del flujo sanguíneo renal durante la recuperación del daño isquémico ^{121,122}. Al parecer, según Cristol ¹²², sería el isoenzima eNOS el que predominaría durante la I/R sin llegar a detectarse iNOS. No obstante, Noiri ¹¹⁴ opina lo contrario. Sin embargo, otros apoyan el efecto citotóxico del NO ⁹². Weight ¹²⁸ sugiere que la temprana liberación de NO durante la isquemia caliente-reperfusión es citotóxica pero que en general

ejercería un papel citoprotector. En hígado existe la misma controversia: a favor del NO¹²⁹⁻¹³² y en contra¹³³⁻¹³⁴.

2.3.4. PROSTACICLINA (PGI₂)

La prostaciclina fue descubierta en 1976¹³⁵ por Moncada y col a la que llamaron en un principio PGX. Es el mayor miembro de la familia de las prostaglandinas producidas por las células endoteliales. Tiene un fuerte poder vasodilatador e inhibe la agregación plaquetar activando la adenilciclase e incrementando el AMP_C intracelular. Se transforma rápidamente en el plasma a 6-Keto-prostaglandina F_{1α} que es el metabolito estable¹³⁶.

Las prostaglandinas, derivados del ácido araquidónico, son transformados a diferentes metabolitos siguiendo la vía de la ciclooxigenasa. La COX sigue los mismos caminos que la NOS⁸⁴. Los antiinflamatorios no esteroideos (AINES) pueden inhibir este enzima bloqueando la síntesis de prostaglandinas. Se han descrito dos isoenzimas de ciclooxigenasa, COX-1 y COX-2. Tienen un 60% de similitud y presentan diferentes propiedades biológicas y farmacológicas. COX-1 es constitutivamente expresada en la mayoría de los tejidos y está involucrada en la producción fisiológica de las prostaglandinas.

La forma inducible, COX-2, está presente en las células expuestas a agentes proinflamatorios, incluyendo citoquinas, y es expresada en procesos inflamatorios. La inhibición de la CoX-2 por AINES puede utilizarse como medida terapéutica, mientras que la COX-1 nos podría explicar los efectos no deseados a nivel de estómago y riñón.

La síntesis de la prostaciclina se inicia a partir del enzima fosfolipasa A₂ el cual libera ácido araquidónico a partir de los fosfolípidos de membrana. Este enzima puede estar inhibido por los glucocorticoides, inhibiéndose así la síntesis de prostaciclina. El ácido araquidónico, a través del enzima ciclooxigenasa (COX) será transformado a endoperóxidos de prostaglandinas: PGG₂, un inestable compuesto que será ciclado y oxigenado por una peroxidasa a PGH₂. Dependiendo del tejido y tipo de célula, la PGH₂ es transformada a PGE₂, o, mayoritariamente, a PGI₂ por la prostaciclinsintasa en las células endoteliales y musculares lisas. A nivel de macrófagos y plaquetas la PGH₂ es transformada a tromboxano A₂ a través de la tromboxanosintasa ¹³⁷. Estos dos eicosanoides representan biológicamente polos opuestos en el mecanismo que regula la interacción de las plaquetas con el endotelio. El TXA₂ contrae el músculo liso, induce la agregación plaquetar, sin embargo la PGI₂ posee un potente efecto vasodilatador y antiagregante plaquetar.

El TXA₂ y la PGI₂ rápidamente son hidrolizados de forma no enzimática a metabolitos estables pero no activos: TXB₂ y 6-Keto-PGF_{1α} medibles en plasma y orina.

La producción de protaciclina, al igual que el resto de PGs puede estar activada por perturbaciones químicas o mecánicas de las membranas celulares ¹³⁸. Fármacos, presión pulsátil y numerosos mediadores endógenos pueden inducir la formación de prostaciclina a partir de células endoteliales. Algunas sustancias endógenas derivadas del plasma como bradiquinina, trombina y otras liberadas por las plaquetas, como serotonina, PDGF, IL-1 y adeninnucleótidos

pueden estimular su síntesis. “Inhiben” la síntesis de prostaciclina: Antagonistas del Ca^{2+} , captopril, dipiridamol, diuréticos, nitratos, estreptoquinasa, AINES, glucocorticoides, lipoperóxidos (estos inactivan a la prostaciclinsintasa).

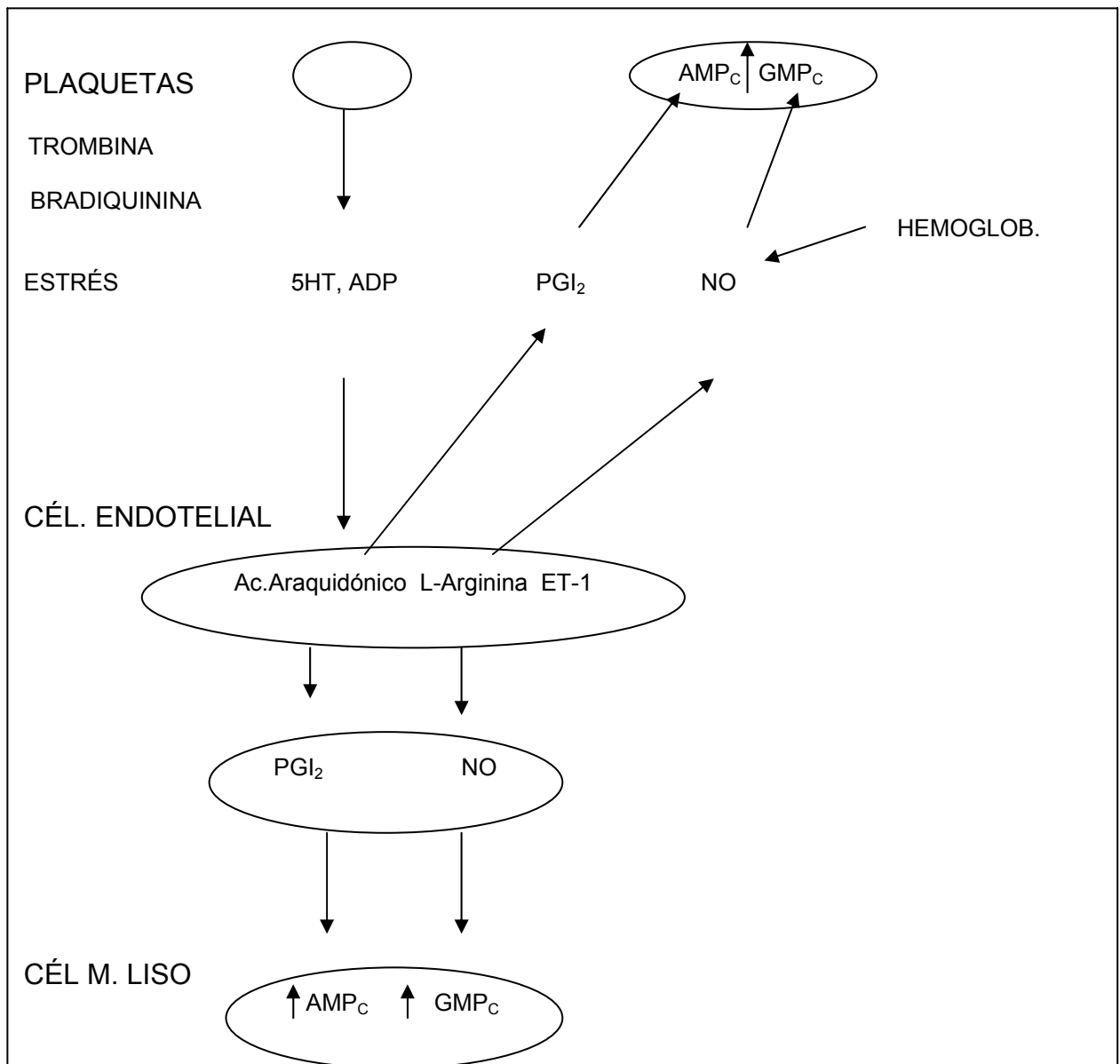
Entre las propiedades biológicas de la prostaciclina, se encuentran, además de las ya citadas: vasodilatación y antiagregación plaquetaria. A nivel renal, mantenimiento del flujo sanguíneo renal (más importante en la médula que en el córtex) y filtración glomerular, regulan la eliminación de Na^+ y agua debido a su efecto tubular directo, más evidente en la porción gruesa del asa ascendente de Henle. Existe una importante interacción entre el NO y las PGS en la regulación aguda y a largo plazo de la función renal: las prostaglandinas contribuyen a mantener la hemodinámica y la función excretora renal cuando se reduce la producción de NO ¹³⁹.

El balance entre prostaciclina y tromboxano es un factor importante respecto a la modulación del daño producido por la isquemia-reperfusión. Inhibidores de la tromboxanosintasa pero no de la ciclooxigenasa previenen de la NTA tras la isquemia renal. Se cree que es debido a la estimulación de la producción endógena de prostaglandinas vasodilatadoras (PGE_1 , PG_2) ¹⁴⁰.

Son numerosos los trabajos que indican que la administración de inhibidores de la síntesis del TXA_2 tienen un efecto citoprotector en el daño por isquemia-reperfusión no sólo en el riñón ¹⁴²⁻¹⁴⁴ sino también en el hígado ¹⁴⁵⁻¹⁴⁷ y en páncreas ^{143,148}. También, la administración de análogos de la prostaciclina atenúan el daño por isquemia-reperfusión mejorando el flujo renal y la filtración

glomerular, facilitando la recuperación de las células tubulares dañadas a nivel renal ¹⁴⁹⁻¹⁵¹, mejorando la microcirculación hepática y atenuando la deplección energética y la lipoperoxidación ^{152,153}.

Endotelina, óxido nítrico, prostaciclina y tromboxano actúan conjuntamente interactuando entre sí y modulando el daño por isquemia-reperfusión.



La estimulación de los receptores de las células endoteliales por serotonina (5HT) o adenosindifosfato (ADP) liberados de las plaquetas, trombina y bradiquinina, o sustancias liberadas por situaciones de estrés, activan la célula que, a partir del ácido araquidónico, genera prostaciclina (PGI_2). Esta, relaja el músculo liso vascular e inhibe la agregación plaquetar incrementando los niveles de AMP_C .

El óxido nítrico (NO) formado a partir de L-arginina también relaja el músculo liso e inhibe la adhesión y agregación plaquetar pero incrementando los niveles de GMP_C . El aumento simultáneo de AMP_C y GMP_C , por parte de NO y de PGI_2 , hace que de forma sinérgica, estos inhiban la agregación plaquetaria¹⁵⁴. La hemoglobina inactiva al NO.

La endotelina-1 (ET-1) se une por medio de su receptor a las células endoteliales causando la fosforilación de la mioglobulina al incrementar el calcio en las células del músculo liso produciendo su constricción. El mecanismo de liberación de la endotelina a partir de las células endoteliales no se conoce con exactitud.

2.3.5. LESIÓN TUBULAR RENAL SECUNDARIA AL DAÑO POR ISQUEMIA-REPERFUSIÓN

Como consecuencia del daño por isquemia-reperfusión, se produce una alteración del riñón a transplantar provocando una necrosis tubular aguda en mayor o menor grado que puede afectar la función y viabilidad del órgano, incluso llegar a necrosis cortical con la pérdida definitiva de éste.

La NTA, como su nombre indica, consiste en la muerte de las células de los túbulos renales. Estas liberan sus enzimas al exterior pudiendo ser marcadores de dicha lesión y de la viabilidad el órgano. La idea de estudiar la viabilidad de riñones sometidos a daño por isquemia antes del trasplante determinando enzimas de lesión renal como marcadores no es nueva. En la década de los setenta la LDH era medida en el flujo venoso de riñones perfundidos. Sin embargo, debido a la distribución heterógena de este enzima en el tejido renal, no es un marcador específico del daño por isquemia.

2.3.5.1. α -GST

A finales de los 70'y principios de los 80', Feinfeld y Cho investigaron el uso de una ligandina en estudios de viabilidad de riñones a transplantar. La Ligandina actualmente es conocida como Glutation-S-Transferasa (GST). Más tarde se descubrieron más subgrupos de GST denominándose GST básica, ácida y neutra. Tras la introducción de técnicas inmunohistoquímicas las diferentes isoformas fueron divididas en α -GST, π -GST y μ -GST.

La función mejor establecida de este enzima ¹⁵⁵ es la conjugación del glutathione reducido con sustancias electrofílicas. Otra de las funciones incluyen transporte y captación de aniones orgánicos y participación en la síntesis del leucotrieno C. También tiene actividad peroxidasa orgánica convirtiendo peróxidos tóxicos en alcoholes inactivos.

Este enzima es un componente abundante de las células. Por ejemplo, 2-5% de las proteínas citoplasmáticas de los hepatocitos y de las células epiteliales tubulares renales está constituidas por glutathione transferasas. La α -GST está formada por dos subunidades distintas, codificadas por dos genes diferentes, mientras que la μ -GST sólo por uno. Tiene un peso molecular aproximado de 50 Kd.

Estudios bioquímicos han demostrado una distribución heterogénea de la α y de la μ -GST en varios tejidos ¹⁵⁵. En riñón, en concreto, la α -GST se ha localizado a nivel del túbulo proximal y la π -GST en túbulos distales y colector, estando ausente en el proximal.

Las células del túbulo proximal son más vulnerables a la isquemia debido a que son oxígeno-dependientes y requieren mucha energía. Al ser lesionadas, liberan sus enzimas hacia el exterior. El enzima α -GST será liberado de forma temprana durante la isquemia mientras que π -GST necesitará de mayor tiempo de isquemia para poder ser detectado ya que, los túbulos colectores resisten mucho

mejor tiempos de isquemia prolongados. Como marcador de viabilidad renal es más sensible el enzima α -GST que no el π . Si llegamos a detectar π , implicaría

tiempos de isquemia muy prolongado y seguramente ya estaría afectada la viabilidad del órgano. Podría ser un factor determinante en la exclusión de injertos.

Numerosos estudios demuestran la relación entre niveles elevados de α -GST en orina y daño tubular renal poniendo de manifiesto su importancia como marcador para predecir la viabilidad del riñón a transplantar ¹⁵⁶ y como monitorización de complicaciones tubulares renales secundarias a : nefrotoxicidad por CsA y antibióticos, NTA, infarto renal en pacientes transplantados y rechazo ¹⁵⁷⁻¹⁶¹.

En riñones procedentes de donantes a corazón parado se está utilizando la determinación de α -GST en la máquina de perfusión pulsátil como marcador de viabilidad del injerto ¹⁶²⁻¹⁶⁴. También, en trasplante hepático, el nivel en plasma de α -GST es un marcador sensible del daño hepatocelular ¹⁶⁵.

2.3.5.2. β -N-Acetilhexaminidasa

Al igual que la α -GST, la β -N-Acetilhexosaminidasa, conocida por N-acetil- β -glucosaminidasa, también es un marcador de lesión renal. Se trata de una enzima de estructura dimérica caracterizada por Srivastava y Beutler. Está compuesta por dos subunidades no idénticas, una ácida tipo α y otra básica tipo β . Las dos subunidades son codificadas por dos genes distintos, localizados en los

cromosomas 15 y 5 respectivamente, a los que se les denomina HEXA y HEXB.

Las dos cadenas presentan un elevado grado de homología en su secuencia de

aminoácidos, con un 57 % de identidad. Igual ocurre con los genes. Las subunidades α y β tienen distintos centros activos y deben actuar conjuntamente ya que los monómeros no son activos catalíticamente. La isoenzima A ($\alpha\beta$) tiene una amplia especificidad de sustrato pudiendo hidrolizar todas las glicoproteínas, glicolípidos y glicoaminoglicanos que existen en las células humanas. La isoenzima B ($\beta\beta$) tiene una especificidad similar, excepto el gangliósido G_{M2} .

Las dos subunidades polipeptídicas se sintetizan en el retículo endoplasmático rugoso y son translocadas hasta los lisosomas de las células tubulares proximales renales. Los polipéptidos precursores, de masa molecular elevada, (70.000 para la subunidad α , 67.000 para la β), sufren procesos de transformación dando origen a las formas maduras (55.000 para ambas subunidades).

La primera aplicación clínica de la enzima se hizo en el diagnóstico de las gangliosidosis GM_2 como la enfermedad de Tay-Sachs y enfermedad de Sandhoff. También en distintas situaciones fisiopatológicas como cirrosis, colestasis, enfermedades hepáticas crónicas, diabetes mellitus en la que es un indicador precoz de la disfunción tubular renal de la nefropatía diabética y diabetes gestacional.

SÍNDROME DE ISQUEMIA-REPERFUSIÓN

Debe señalarse la gran sensibilidad y especificidad diagnóstica de la concentración urinaria de la enzima como marcador de daño tubular de distinta etiología ¹⁶⁷⁻¹⁶⁹ : tubulopatías en trabajadores industriales del cadmio y cromo ¹⁷⁰,

nefrotoxicidad por fármacos, cáncer (vesical, leucemias agudas, mieloma ¹⁷¹), NTA y rechazo en el trasplante renal ¹⁷².

3. RADICALES LIBRES DE OXÍGENO

Una molécula normal consiste en un par de electrones opuestos en giro (spin) y circulando en una misma órbita.

El radical libre (RL) contiene un número impar de electrones. Si dos RL reaccionan entre sí ambos son eliminados, pero si reacciona con una molécula normal se produce un nuevo radical.

Los radicales libres de oxígeno son metabolitos tóxicos que presentan estados intermedios de reducción electroquímica del oxígeno al agua^{82, 173}. Por ello participan en múltiples reacciones, pueden servir como oxidantes y como reductores.

SUPERÓXIDO	$O_2 + e^-$	O_2^-
PERÓXIDO DE HIDROGENO	$O_2^- + O_2^-$	$H_2O_2 + O_2$
RADICAL HIDRÓXILO	H_2O	$H^+ + OH^+$
OXÍGENO SINGULAR	$O_2^+ + H_2O_2$	$^1O_2 + OH^+ + OH$

Los RLO se producen durante la fase de reperfusión por lo que la entrada de oxígeno en el tejido es más nocivo que la producida por la propia isquemia¹⁷⁴.

El organismo normalmente elimina el 95% del oxígeno transformándolo en agua en una reacción catalizada por la citocromo oxidasa mitocondrial. No obstante un 5% del oxígeno se elimina a través de la denominada reducción univalente del oxígeno, es decir el oxígeno pierde un electrón cada vez dando lugar a los denominados radicales libres de oxígeno, sustancias con un número impar de electrones.

3.1.TOXICIDAD RADICALES LIBRES.

Desde el punto de vista química, el anión superóxido es un buen agente reductor pero tan solo un moderado agente oxidante. Desde el punto de vista biológico, existen numerosas evidencias de la citotoxicidad del superóxido en múltiples circunstancias. El hecho de que una sustancia con moderada reactividad desde el punto de vista químico se le atribuya una considerable toxicidad biológica puede sorprender a un químico, pero no a un biólogo. Existen numerosos ejemplos de compuestos de baja reactividad química (ej. Cloruro potásico, cianuro sódico o la toxina del veneno de cobra) que producen reacciones letales cuando son inyectados en un animal. Por tanto, la citotoxicidad no siempre es sinónimo de reactividad orgánica.

La toxicidad del superóxido es el resultado del ataque directo o indirecto a nivel molecular por parte del superóxido o bien por radicales generados secundariamente ¹⁷⁵.

3.1.1.TOXICIDAD DIRECTA.

- Mediante modificaciones de los ácidos nucleicos y rupturas del ADN ^{176,177}.
- Mediante despolimeración de mucopolisacáridos y del ácido hialurónico, así como degradación del colágeno ¹⁷⁸.
- Mediante inactivaciones enzimáticas ¹⁷⁹, en particular por oxidación de grupos sulfhidrilo, lo cual puede igualmente alterar la integridad de las membranas.

3.1.2.TOXICIDAD INDIRECTA.

Se manifiesta mediante el proceso de lipoperoxidación, que constituye la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados contenidos en los fosfolípidos de las membranas celulares. De ello resulta una reacción en cadena con formación de radicales libres intermedios que son altamente reactivos y, por tanto, extremadamente tóxicos ^{180,181}. Esta reacción en cadena finaliza con la formación de aldehidos o por la unión de dos radicales lipídicos o bien por la formación de un compuesto cíclico. Los productos más conocidos son los eicosanoides, ácidos grasos de 20 átomos de carbono, que pueden ser de dos tipos: prostanoides (prostaglandinas, tromboxano, prostaciclina) y leucotrienos, que derivan del ácido araquidónico por las vías de la ciclooxigenasa o de la lipooxigenasa. El ácido araquidónico se sintetiza gracias a la acción de la fosfolipasa A₂ sobre los fosfolípidos de la membrana celular ^{182,183}.

La riqueza en ácidos grasos insaturados de las membranas celulares e intracelulares sugiere la gravedad de las lesiones de membrana que pueden llevar a la apoptosis ¹⁸⁴.

3.2.EFECTOS DE LOS RADICALES LIBRES DE OXÍGENO EN PATOLOGIA MÉDICA.

Existen diversas circunstancias clínicas en las que los RLO han sido implicados, bien directa, bien indirectamente, en su patogenia.

Una situación clínica en que se hace evidente la acción de los RLO es durante el proceso inflamatorio. Toda lesión celular atrae las llamadas células proinflamatorias: neutrófilos polimorfonucleares, monocitos, macrófagos y

plaquetas. Su respiración celular y por ello su consumo de oxígeno aumenta¹⁸⁵. En los fagocitos el O_2^- se produce gracias a la enzima NADPH oxidasa ligada a la membrana. La producción de O_2^- y de H_2O_2 y también de OH^+ y la de oxígeno singular (por la interacción de una mieloperoxidasa en presencia de cloro) y su liberación en el sector extracelular, estimula las vías de la ciclo y lipoxigenasa. De esto resulta la producción de prostanoides y leucotrienos que agravan el trastorno de permeabilidad de la membrana y también de un factor quimiotáctico . Se crea así un círculo vicioso donde el **calcio** juega un papel esencial. La alteración de la permeabilidad de la membrana conlleva un aumento masivo del flujo de calcio al interior de las células lesionadas; se sabe además que el calcio es un potente activador de las fosfolipasas¹⁸⁶ y que igualmente, puede desencadenar la producción de RLO por parte de los neutrófilos polimorfonucleares¹⁸⁷. La inactivación de la ATP-asa Na-K situada en la membrana hace que el sodio sea retenido en el interior de las células lo cual provoca una entrada de agua en la célula creando un edema citotóxico. Este es uno de los mecanismos fundamentales del organismo para lisar bacterias.

Existen varios cuadros patológicos en los que existen trastornos de este mecanismo, a saber:

- *Granulomatosis séptica crónica* : se producen infecciones de repetición que llevan a la muerte, los leucocitos muestran un gran déficit en el consumo de oxígeno y son incapaces de producir O_2^- ^{188,189}.
- *Déficit de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa* : existe una gran sensibilidad a las infecciones si su tasa es inferior al 5 % de la normalidad^{190,191}.

- *Déficit de mieloperoxidasa* : se producen sobre todo infecciones por levaduras¹⁹².

4. ANTIOXIDANTES

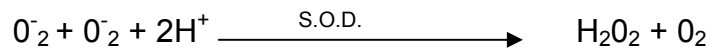
El riñón es un órgano donde se ha puesto más de manifiesto el daño producido por el fenómeno de isquemia-reperfusión. En el animal de experimentación se ha comprobado que durante la preservación hay una disminución del ATP que se acompaña de la aparición de sus productos de degradación y la producción de hipoxantina e ionosina que en la fase de perfusión del injerto contribuyen al daño celular a partir de la xantino-oxidasa y la consiguiente producción de los RLO. Por ello, en unas primeras investigaciones se pensó que el mantenimiento de los niveles energéticos de las células con la administración de ATP en los injertos renales preservados, se acompañaría de una disminución del daño celular postrasplante. Sin embargo, ha sido el empleo de los fármacos bloqueadores de los RLO (antioxidantes o “scavengers”) los que han demostrado un efecto beneficioso en la función del injerto trasplantado.

Antioxidantes: son una serie de sustancias enzimáticas que posee el organismo para reducir los RLO:

- **S.O.D. (Superóxido dismutasa)**
- **CATALASA**
- **GLUTATION PEROXIDASA**
- **GLUTATION REDUCTASA**

4.1. S.O.D.

Descubierta en 1969 por McCord y Fridovich¹⁹³. Cataliza la reacción de dos aniones superóxido (O_2^-) para formar peróxido de hidrógeno (H_2O_2), es decir:



Las superóxidos dismutasas forman un conjunto de enzimas que están presentes en casi todas las células. Sólo los organismos anaerobios y escasas bacterias aerobias carecen de SOD, ya que su función fisiológica consiste en la eliminación de los radicales superóxido producidos en las reacciones del metabolismo aerobio¹⁹⁴.

Se conocen 3 formas de SODs según el metal que utilizan como cofactor. Estas a su vez pueden dividirse en dos familias filogenéticas diferentes: CuZn-SODs y Fe/Mn-SODs.

Como las concentraciones del radical superóxido son normalmente bajas, la reacción depende de su difusión. Sin embargo, la asociación del enzima con su sustrato no es una simple cuestión de difusión y colisión. La estructura submolecular de la enzima, la distribución de carga electrostática, y las interacciones hidrodinámicas, pueden afectar tanto la difusión del radical superóxido como su asociación con la enzima. Se ha encontrado que el campo eléctrico de la SOD favorece 30 veces la velocidad de asociación del anión²⁰¹.

En los eucariotas existen tres tipos de SODs de diferente localización: Mn-SOD mitocondrial, CuZn-SOD citosólica y CuZn-SOD extracelular.

En el citoplasma, la eficiencia de la protección que la CuZn-SOD puede proporcionar a las proteínas citosólicas depende de:

- El ritmo de producción del radical superóxido.
- La distribución de la enzima en relación con las proteínas.
- La velocidad de reacción relativa del radical superóxido con dichas proteínas y con la CuZn-SOD.

El gen que codifica este enzima se encuentra ubicado en el cromosoma 21 y específicamente en el segmento extra (21q22) que aparece en el síndrome de Down, de ahí que los niveles de SOD se encuentren elevados en la generalidad de estos casos.

4.2.GLUTATION PEROXIDASA

La forma clásica o citosólica de la glutathion peroxidasa (cGPx) fue la primera selenoproteína identificada¹⁹⁵. Posteriormente se describieron otras formas. Glutathion peroxidasa fosfolípido hidroperóxido fue descrita en 1982 PHGPx¹⁹⁶. Existiendo dos formas, una en el plasma (pGPx) y la intestinal (GI-GPx). Esta última sólo se ha detectado en el tejido intestinal de la rata, en el ser humano existe pero a nivel hepático. Estas tres formas, cGPx- pGPx-GI-GPx, son homotetrámeros y la PHGPx es un monómero, lo que le proporciona un tamaño muy inferior, que junto a su superficie hidrofóbica le habilita para implicarse en procesos reactivos a nivel de membranas celulares.

-Funciones de la GPx¹⁹⁹:

- Antioxidante: es la función más importante y conocida, descubierta hace más de 40 años ¹⁹⁵.
- Señal de las citokinas: está basado en estudios de TNF activador del NF-KB (nuclear factor) en líneas celulares derivadas de linfocitos¹⁹⁷. Las evidencias son: se ha demostrado que los inhibidores de la ciclo-oxigenasa y de la lipo-oxigenasa inhiben la actividad del NF-kB¹⁹⁸ ; la actividad de la ciclo-oxigenasa depende del tono de hidroperoxidación, que a su vez es regulado por la GPX.
- Apoptosis: la mayoría de estudios se han realizado con líneas celulares linfocitarias se cree que esta capacidad es generalizada a cualquier estirpe celular.
- Infección por HIV: las células T infectadas por HIV presenta una disminución de su actividad de GPx induciendo a la apoptosis de estas células, observando la disminución de la población de T-helper tan típica de los pacientes con SIDA.
- Barrera intestinal: la isoenzima GIGPx es una barrera a nivel absorción intestinal contra hidroperóxidos derivados de la dieta.

- Espermatogénesis: en estudios experimentales en ratas se ha objetivado la presencia de dicha sustancia a nivel de la membrana mitocondrial del espermatozoides (representando más de un 50% de los componentes de la membrana), a parte de su actividad antioxidativa a nivel del citosol.

4.3. GLUTATION REDUCTASA ²⁰²

Pertenece al sistema glutacion peroxidasa/glutacion reductasa. La glutacion reductasa es una flavoenzima dependiente del nicotinamin adenín dinucleótido fosfato reducido (NADPH) que cataliza la reducción del glutacion oxidado (GSSG) a glutacion reducido (GSH) el cual será utilizado por la glutacion peroxidasa (GPx) para la reducción del peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y de los lipoperóxidos. Es decir, que tiene una *función de pivoteo* en el estrés oxidativo. La glutacion reductasa se encuentra en todos los organismos aeróbicos así como como en algunas plantas superiores por lo que aparenta ser una enzima cuasi universal ^{203,204}.

El sistema antioxidante GPx/GRd está relacionado con otros sistemas antioxidantes como el superóxido dismutasa/catalasa (SOD/CAT). Se ha observado que ambos sistemas no actúan a la par, la CAT actúa en presencia de altas concentraciones de H₂O₂ y a bajas concentraciones actúa la GPx. La actividad de la CAT y de la GPx está inversamente correlacionada, mientras que la CAT y la GRd presentan correlación positiva ²⁰⁴.

-Funciones:

LA GRd permite mantener concentraciones de GSH en la célula no sólo para ser utilizado por la GPx en la eliminación del H₂O₂; este GSH es de utilidad en la recuperación de las vitaminas C (ácido ascórbico) y E (alfa-tocoferol) luego de participar en la eliminación de radicales libres generados in situ o a distancia. El GSH intervienen además en la detoxificación de compuestos xenobióticos, el almacenamiento y transporte de cisteína, la regulación del balance redox de la célula, el metabolismo de los leucotrienos y de las prostaglandinas, la síntesis de los desoxirribonucleótidos, la función inmunológica y la proliferación celular²⁰³⁻²¹⁰.

Por tanto la alteración de la actividad de la GRd provocará disminución en las concentraciones de GSH dando lugar a un aumento en los niveles de especies reactivas del oxígeno²¹¹.

-**Cáncer**: el tratamiento de células tumorales con hidroxiurea y otros agentes que dañan el DNA ha incrementado, experimentalmente, el potencial de metástasis de estas células. Parece ser que esta droga induce la resistencia al daño oxidativo.

En estas células la actividad de GRd y GPx y los niveles de GSH fueron mayores.

El papel de los antioxidantes en las células tumorales incrementa su capacidad metastásica y la respuesta celular a la quimioterapia²¹².

-**Diabetes mellitus**: la unión no enzimática de azúcares a proteínas (glicación) es un fenómeno biológico común que está incrementado en la diabetes. La

GRd es susceptible a ser glicosilada y desarrollar una actividad alterada ya que la glucosa, la glucosa-6-fosfato y la fructosa provocan una inhibición dependiente del tiempo de la actividad de la enzima, lo que provoca la catarata en pacientes diabéticos. La enzima puede ser protegida de la glicosilación por algunos medicamentos como la aspirina, que pueden ser usado para prevenir las cataratas en el diabético ²¹³.

Respecto a la etiología se ha planteado la destrucción de las células β por el efecto tóxico de las especies reactivas del oxígeno como resultado del flujo de células inflamatorias en el páncreas, por lo que la deficiencia de enzimas antioxidantes podría ser la base de la susceptibilidad a la diabetes ²¹⁴.

-Obesidad: la ingestión de dietas ricas en grasas favorece la disminución de la actividad GRd así como de la GPx en el corazón y otros órganos ²¹⁵.

-Úlcera péptica: estudios en úlceras experimentales se encontró en la mucosa gástrica una depresión del sistema GPx/GRd. Además se realizaron estas determinaciones en ratas tratadas con tabletas de proteínas y se observó una alta eficiencia terapéutica de éstas y un efecto importante en la normalización del sistema glutation ²¹⁶.

-Enfermedad de Parkinson: existe una disminución de las concentraciones de GSH en la sustancia nigra del cerebro y esto ha sido atribuido a un aumento del recambio de la dopamina y a la desaminación oxidativa que provoca la formación de H_2O_2 ²¹⁷.

-Ejercicio físico y envejecimiento: se ha demostrado que durante el ejercicio físico y el envejecimiento este sistema antioxidante sufre una importante alteración. Las enzimas antioxidantes SOD y CAT del hígado y el miocardio muestran una disminución general a edades mayores, mientras que las enzimas relacionadas con el GSH (GRd y GPx) en el hígado y en el corazón aumentan significativamente. Las enzimas antioxidantes del músculo esquelético están uniformemente elevadas durante el envejecimiento²¹⁸⁻²²¹.

5. HIPÓTESIS

La utilización de riñones procedentes de donantes a corazón parado para trasplante ha demostrado su interés y es una realidad en la práctica clínica.

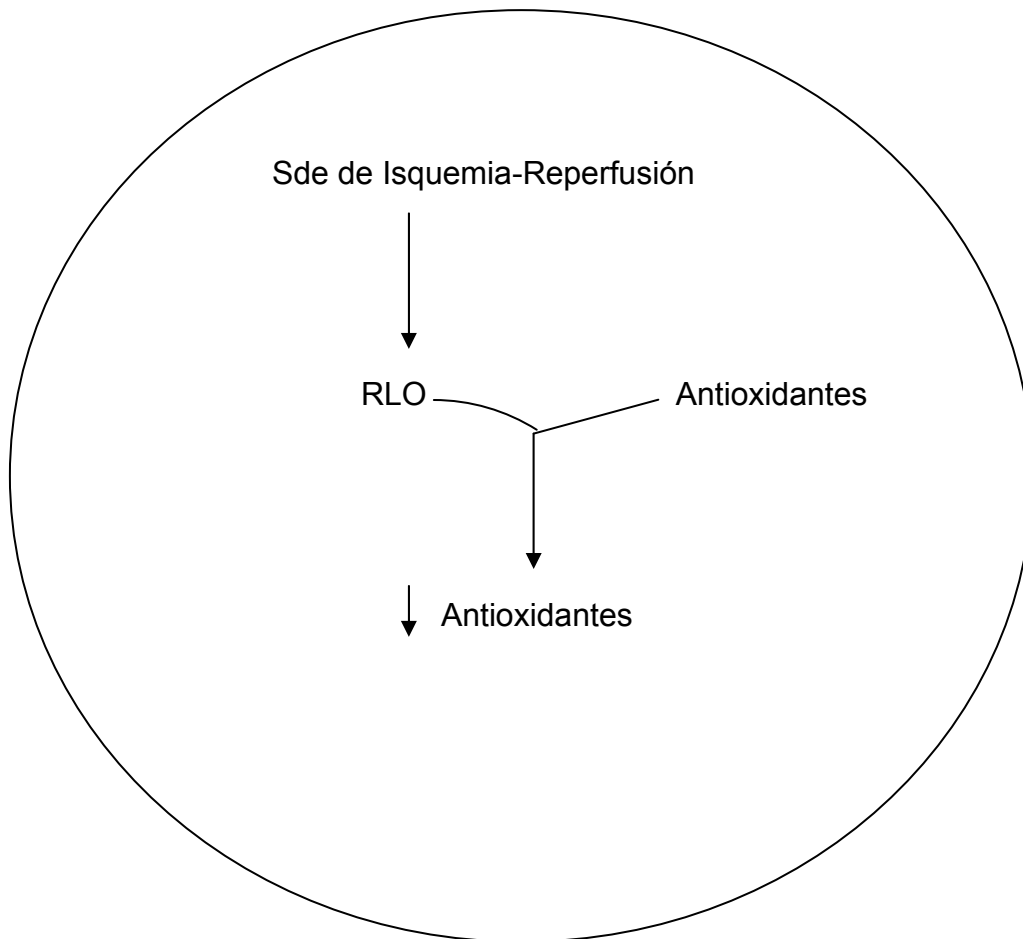
El hecho que caracteriza más a estos donantes es el fenómeno del síndrome de isquemia-reperfusión. En el donante a corazón parado existen 3 periodos bien distintos: a)Parada cardíaca: isquemia caliente ; b)Recirculación: reoxigenación celular y c)Conservación: isquemia fría.

Lo más notable del Síndrome de isquemia-reperfusión es la producción de radicales libres de oxígeno (RLO), responsables del daño celular que marcará la viabilidad el injerto. Los antioxidantes son sustancias naturales que el organismo ha desarrollado para neutralizar a los radicales libres.

La producción de RLO es proporcional al grado de lesión isquémica, por lo que mayores tiempos de isquemia caliente darán lugar a mayores concentraciones de RLO, lo que se traducirá en un mayor consumo de antioxidantes durante la recirculación y la perfusión.

Sin embargo no existe una descripción en la literatura del comportamiento de los principales antioxidantes en un modelo con lesión isquémica grave, medidos tanto en la fase de isquemia como en la de perfusión.

Correlacionando el nivel de antioxidantes con el grado de necrosis cortical renal podría ser posible reconocer aquellos riñones viables para trasplante y establecer el tiempo máximo de isquemia a partir del cual los riñones no serían aptos, y poder así aumentar de forma efectiva el número de órganos a trasplantar, sin asumir el riesgo de fallo primario del injerto.



El nivel tisular de antioxidantes nos indicará el consumo o recuperación de estas sustancias y por tanto indirectamente la presencia o no de RLO. De forma secuencial, analizando los niveles de antioxidantes en las diferentes fases del experimento (trasplante experimental con riñón procedente de donantes a corazón parado), podremos predecir la viabilidad de los injertos.

6. OBJETIVOS

La presente tesis ha sido planteada atendiendo a dos objetivos mayores y una serie de objetivos menores derivados de los primeros:

1-Caracterizar la evolución de los antioxidantes (SOD, glutathion reductasa y glutathion peroxidasa) en un modelo de trasplante renal con lesión isquémica grave.

Dentro de esta caracterización pretendemos conocer:

- a) La influencia de la recirculación con bomba de by-pass cardiopulmonar en los niveles de antioxidantes.
- b) La influencia de los tiempos de isquemia progresivos en los niveles de antioxidantes y
- c) La evolución de los antioxidantes en el grupo de riñones que se van a comportar como viables respecto a los que no serán viables.

2- Determinar si los niveles de antioxidantes en los momentos predeterminados (basal, final isquemia caliente, final de bomba de recirculación, final de isquemia fría y tras una hora de reperfundido el injerto) o las variaciones de los mismos en las diferentes fases (isquemia caliente, recirculación, isquemia fría y fase de reperfusión) pueden ser utilizados como marcadores de viabilidad.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

Los animales del estudio son cuarenta pares de cerdos de un peso aproximado entre 20 y 30 Kg.

De acuerdo con los objetivos establecidos previamente se estudiarán cuatro grupos, cada uno de ellos con diez pares de cerdos.

Grupo 0 (n= 10 pares). Control. Donante a corazón latiente.

Grupo 1 (n= 10 pares). 40 minutos de isquemia caliente sin bomba.

Grupo 2 (n=10 pares). 40 minutos de isquemia caliente y recirculación durante 30 minutos a 37°C.

Grupo 3 (n=10 pares). 90 minutos de isquemia caliente y recirculación 30 minutos a 37°C.

El estudio experimental realizado se basa en el siguiente diseño:

- 1-Premedicación y anestesia del animal donante.
- 2-Incisión de laparotomía media xifopubiana.
- 3-Disección de aorta y cava a nivel caudal, canulando ambas.
- 4-Heparinización del animal donante.
- 5-Provocación de la parada cardíaca: 40 y 90 minutos de isquemia caliente.
- 6-Recirculación en bomba durante 30 minutos a 37°C
- 7-Preservación a 4°C durante 6 horas.
- 8-Preparación del animal receptor.

9-Nefrectomía bilateral en el receptor.

10-Implante del injerto renal. Fin del periodo de isquemia fría.

11-Control y seguimiento durante 5 días postoperatorios

12-Sacrificio del animal al quinto día.

7.1.-INFRAESTRUCTURA Y APARATAJE DEL QUIRÓFANO

La actividad quirúrgica experimental de nuestro Servicio se inició en **enero de 1996** en las instalaciones de Cirugía de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Autónoma de Bellaterra. A partir de septiembre de 1996 el Departamento de Cirugía Experimental de la Facultad de Medicina de la Universidad de Barcelona poseía las instalaciones necesarias para llevar a cabo la extracción e implantación renal al animal de experimentación, motivo por el cual nos trasladamos a estas instalaciones.

Para poder realizar esta labor, fue necesario desarrollar y poner a punto por primera vez todo el modelo experimental de trasplante renal en el cerdo. Durante los meses de Enero a Marzo de 1996 se procedió al montaje e instalación del utillaje preciso para realizar el trasplante.

La realización de un trasplante renal necesita la utilización de monitorización tanto en el acto anestésico como en el acto quirúrgico.

Material mínimo a nivel de quirófono para proceder:

- Ventilación mecánica (respirador Temel®).
- Monitorización de presiones y electrocardiograma (Hewlett-Packard ®).
- Analizador de gases (Ciba-Coming®).
- Oxigenador pediátrico (William Harvey-H-300- Bard pediátrico ®)

- Bomba de by-pass de rodete Stöckent-Shiley.
- Bisturí eléctrico (Magari 1, Cuatro S.A.)
- Aspirador de campo quirúrgico (Ordisi S.A.)
- Calentador de sueros.

7.2.-ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN Y SU PREPARACIÓN PREOPERATORIA

Los animales de estudio son 40 pares de cerdos de raza ibérica, de peso entre los 20 y 30 Kg, divididos en donantes y receptores. Todos los animales han sido suministrados por la misma granja especializada.

El cerdo utilizado como animal de experimentación en el campo del trasplante renal es ideal ya que posee una anatomía y fisiología muy similar al humano. Además, es un animal domesticable, de crecimiento rápido y procreación elevada. Sin embargo hay que tener en cuenta que es de naturaleza muy lábil y sensible a las situaciones de estrés por lo que su manejo debe ser cuidadoso para evitar la muerte del animal durante su preparación para la intervención.

Todos los animales se han mantenido en las mismas condiciones ambientales, donde se les proporciona agua y pienso ecológico sin aditivos. Tanto los donantes como los receptores son sometidos a un periodo de ayunas de 24 h previo a la cirugía, pero se le permite hidratación libre.

Se realiza en todos ellos una premedicación con Azaperona intramuscular a dosis de 10mg/Kg de peso. Quince minutos después, se trasladan al

quirófano donde se canaliza la vena del pabellón auditivo y se realiza la inducción anestésica con Tiopental sódico endovenoso a dosis de 15 mg/Kg y se procede a la intubación orotraqueal y ventilación controlada del animal.

Una vez anestesiado, colocación en decúbito supino sobre la mesa quirúrgica. Se realiza un lavado de todo el abdomen, tórax y cuello con agua-jabón y yodo-povidona. Se rasuran zonas donde colocaremos electrodos de monitorización electrocardiográfica.

7.3.-DISEÑO DEL ESTUDIO

Establecer un modelo experimental aceptable de parada cardíaca o isquemia caliente resulta difícil ya que clínicamente existen varios tipos de donantes inestables y muchas formas de llegar a la parada cardíaca. En nuestro modelo, se ha optado por la provocación de la parada cardíaca mediante inyección intravenosa de 20-30 mEq de KCl. Se trata de un método sencillo y rápidamente eficaz para lograr un periodo de isquemia caliente homogéneo y bien controlado, esto permite su reproducibilidad en todos los grupos del estudio.

Los pares de animales son divididos en 4 grupos. Se detallan a continuación las características de cada grupo:

GRUPO 0 (n= 10 pares). Control. Extracción a corazón latiente del riñón donante posterior a la reperfusión renal con un litro de solución fría de UW y almacenaje en nevera a 4°C durante 6 horas, tras las cuales se realiza el trasplante.

GRUPO 1 (n= 10 pares). Periodo de parada cardíaca de 40 minutos seguido de perfusión renal con un litro de solución fría de UW.

GRUPO 2 (n= 10 pares). Periodo de 40 minutos de parada cardíaca y recirculación durante 30 minutos a 37°C.

GRUPO 3 (n=10 pares). Periodo de 90 minutos de parada cardíaca, seguido de 30 minutos de recirculación con bomba a 37 °C.

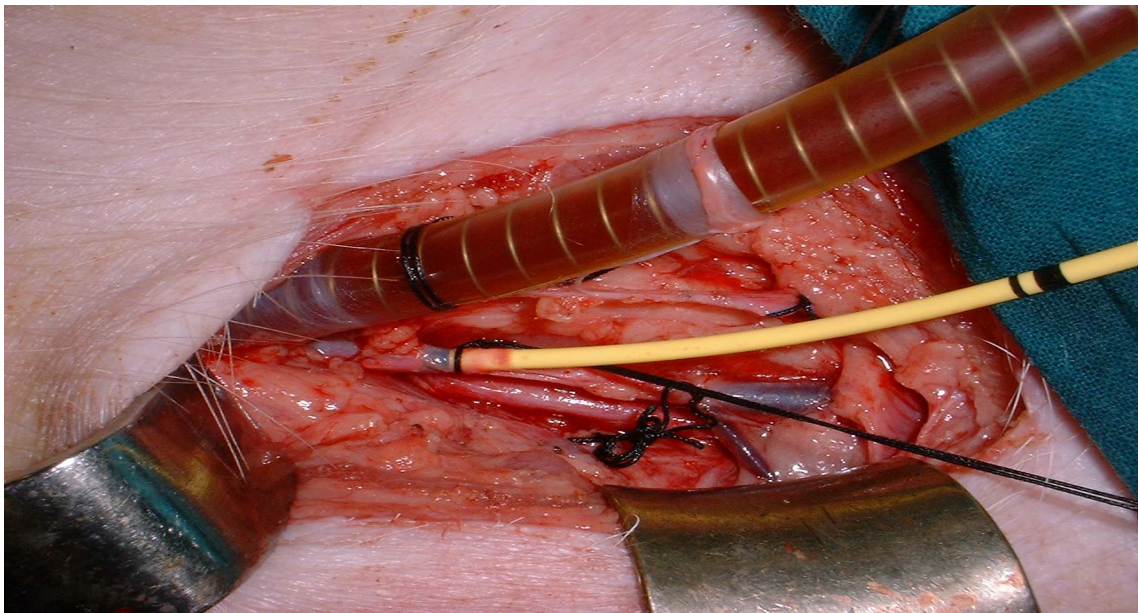
7.4.- MODELO DE TRASPLANTE RENAL EN EL CERDO.

7.4.1.-TÉCNICA ANESTÉSICA

Después de la preparación preoperatoria (premedicación con Azaperona a dosis de 10mg/Kg/peso e inducción con Pentotal a dosis de 15mg/Kg) e intubación de la vía aérea del animal, se procede a la ventilación mecánica (Engstrom) con oxígeno al 100%, empleando un volumen total necesario para mantener la fracción espirada de CO₂ ("ETCO") entre 30 y 40 mmHg. La anestesia se mantiene con isoflurane al 0,7- 1% y el bloqueo neuromuscular con Besilato de Atracurio (10mg/hora). La analgesia intraoperatoria se realiza con fentanilo a dosis de 50 microgramos/hora.

La monitorización hemodinámica de los animales se inicia mediante la disección de la región cervical derecha y la colocación de un catéter arterial (16

G, Arrow) a nivel de la arteria carótida derecha. En el receptor se coloca además el mismo tipo de catéter en la vena yugular externa derecha, previamente tunelizado a la región dorsal por el plano subcutáneo. Así se monitorizan de forma continua la presión arterial y la presión venosa central. La monitorización electrocardiográfica también se lleva a cabo de forma continua mediante las derivaciones II y V.



Incisión cervical: Vía central en art.carotídea y cánula de la bomba cardiopulmonar en vena yugular externa.

Durante el trasplante en el receptor, los controles hemodinámicos y analíticos rutinarios se hacen en las siguientes fases bien definidas: en el momento de la inducción anestésica, previamente al desclampaje de los vasos renales antes de la reperfusión, y por último a la hora de la reperfusión.

La hidratación del animal durante el trasplante se realiza de la siguiente manera: en la fase de nefrectomía bilateral se administra 500 mL de suero Ringer-Lactato. Antes del clampaje vascular, se inicia una perfusión continua de

500 mL de Hemoce que se mantiene durante toda la fase anéfrica. Tras la reperusión, se inicia una perfusión de suero glucosado al 5% hasta un total de 300 a 500 mL que se mantiene hasta la finalización del trasplante.

7.4.2.-TÉCNICA QUIRÚRGICA EN EL DONANTE

Tras la práctica de una laparotomía xifopubiana se explorarán los riñones para verificar que no existan contraindicaciones para su utilización como donantes (coloración rosada, ausencia de tumoraciones, etc)

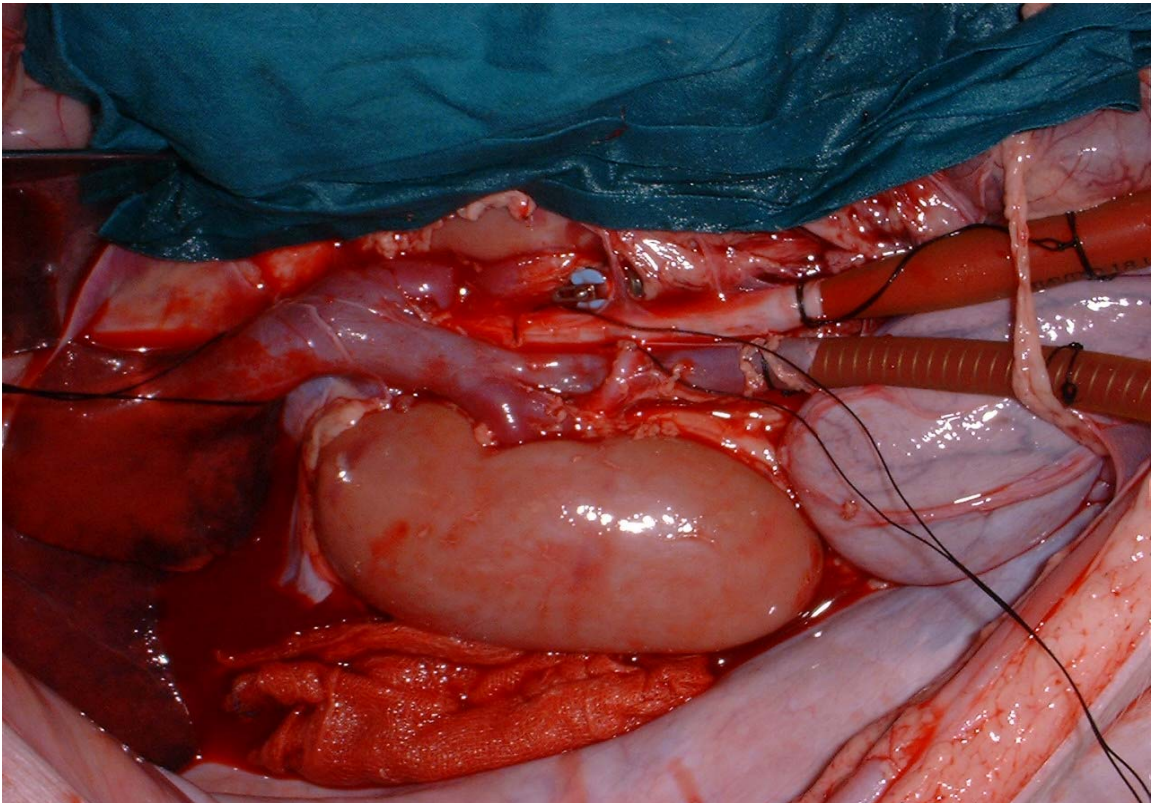
Se disecan la arteria aorta y la vena cava en su extremo más distal para la canulación (fotografía página 66) y previa a la heparinización del animal a dosis de 3 mg/Kg peso, se provoca entonces la parada cardíaca mediante la inyección intravenosa de 20-30 mEq de KCl. En el grupo control del estudio se extraen los riñones a corazón latiente, una vez perfundidos con UW, sin periodo de isquemia caliente.

En el Grupo 1 tras los 40 minutos de isquemia se procedió a la perfusión "in situ " de los riñones a través de la arteria aorta con un litro de solución de Wisconsin ,previamente se había ocluido la aorta por debajo del tronco celíaco y se había ligado la arteria mesentérica superior. Se liga la vena cava inferior por debajo de las venas renales.

El grupo 2 y 3 fueron sometidos a 40 minutos y 90 minutos de isquemia caliente respectivamente. Tras la isquemia se procedió a recirculación con su propia sangre a 37 °C durante 30 minutos. La recirculación se realiza mediante drenaje venoso a nivel cervical (vena yugular externa) y la vía arterial se realiza canulando la arteria ilíaca primitiva en lugar de la arteria aorta. Se liga la arteria

ilíaca contralateral. Finalizada la fase de recirculación se procede a perfundir con un litro de solución de Wisconsin por vía femoral.

Una vez se estima finalizado el periodo de perfusión , se procede a la extracción de los riñones seccionando la vena cava infrahepática y la aorta por encima de las venas y arterias renales. Posteriormente, realizamos una nefrectomía radical en bloque bilateral simultánea seccionando la vena cava inferior y la aorta distalmente, sobreelevando las cánulas, y seccionando ambos uréteres a nivel del cruce con los vasos ilíacos.



canulada a.aorta y v.cava para realización de circulación extracorpórea

7.4.3.-CIRUGÍA DE BANCO

Se realizan las siguientes maniobras que no difieren de las realizadas a nivel clínico:

Los riñones se separan dividiendo la aorta en primer término por su cara posterior, luego en su cara anterior y por último mediante la división de la vena renal izquierda a nivel de su desembocadura en la vena cava inferior. La arteria renal tendrá un "patch" de aorta y la vena renal de cava. Se realiza exéresis de los ganglios linfáticos hiliares.

Los riñones ya preparados se coloca en una bolsa de órganos estéril con suero Ringer-Lactato "pilé" a 4 °C y se introducen en una nevera portátil con abundante hielo que lo rodeará. Permanecerán durante 6-8 horas hasta su colocación en el receptor.



Bomba de rodete by-pass cardiopulmonar, imagen general.

7.4.4.-TÉCNICA QUIRÚRGICA EN EL RECEPTOR

Nefrectomía bilateral en el receptor.

Se práctica inicialmente una pequeña incisión de lumbotomía izquierda extraperitoneal hasta llegar al riñón izquierdo, realizando nefrectomía.

Seguidamente se practica una incisión pararrectal derecha extraperitoneal disecando el riñón derecho y el hilio y la pelvis renal, ligando el pedículo renal en bloque y seccionando la vía renal de pelvis preservando el uréter propio,

Implante de un riñón

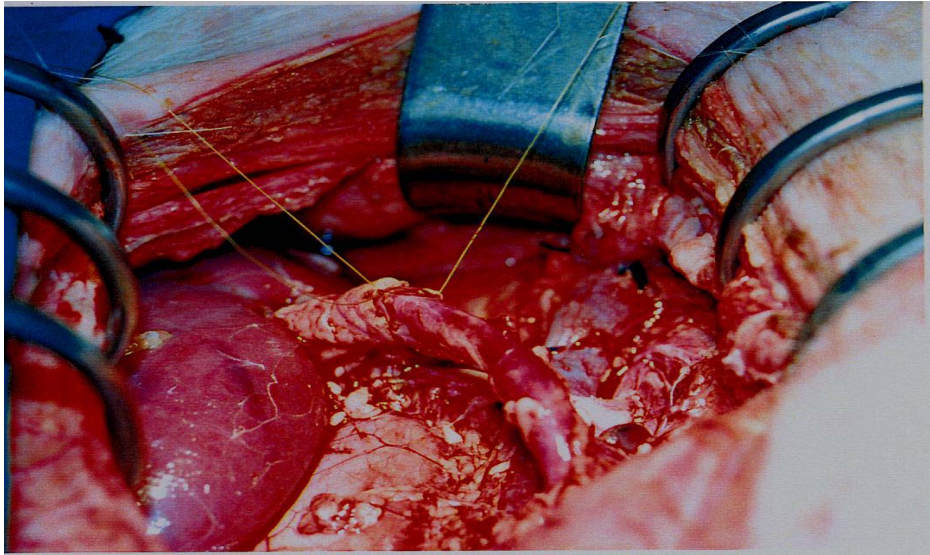
Se coloca el riñón derecho donante a nivel del retroperitoneo del cerdo receptor. Se realiza disección de la vena cava inferior y de la aorta ligando los vasos linfáticos a nivel de la zona donde realizaremos las anastomosis: generalmente en el territorio comprendido entre bifurcación de los vasos renales y bifurcación de los vasos ilíacos.

Se realizan anastomosis vasculares siguiendo un orden: primero anastomosis término-lateral entre vena renal con patch de cava clampando la vena renal con un bulldog; en segundo lugar la anastomosis término-lateral entre arteria renal con patch de aorta y aorta. Ambas anastomosis se realizan con sutura continua de 180° con monofilamento irreabsorbible Prolene® 6/0; la cara posterior por dentro y la anterior por fuera. procederemos al desclampaje por el siguiente orden: primero vena renal y posteriormente la arteria renal. de esta manera ya se reperfunde el riñón .

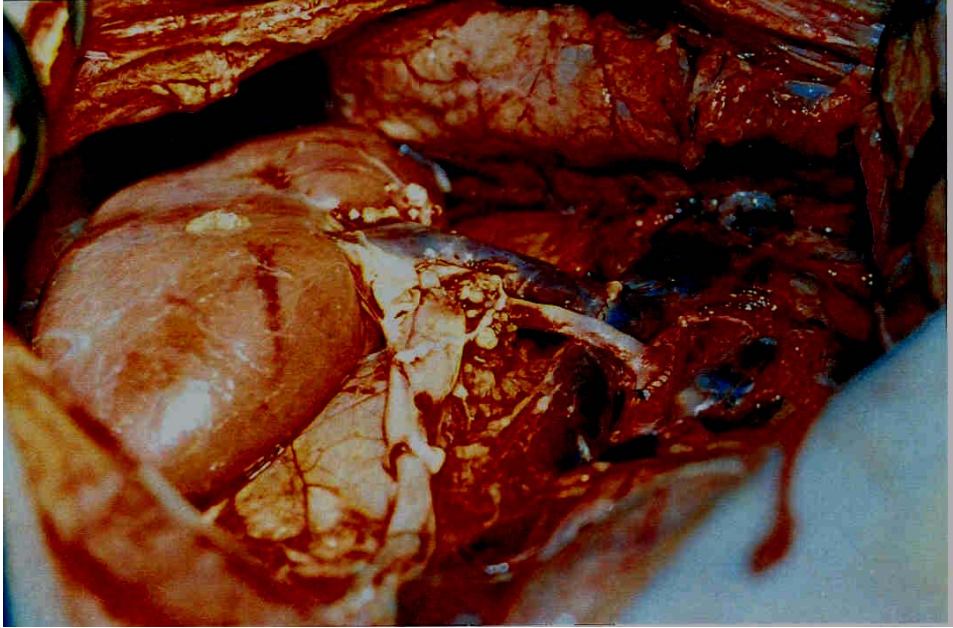
La reconstrucción del tracto urinario se realiza con sutura continua de catgut ® 4/0 mediante pieloureterostomía o ureteroureterostomía dejando tutorizada esta con un pig-tail .

Tras finalizar las anastomosis vasculares y habiendo desclampado los vasos se toman los flujos arteriales y venosos renales a tiempo: 0, 5 y 10 minutos tras desclampaje.

La incisión pararrectal derecha y la lumbotomía izquierda se cierran por planos con vicryl del cero y la piel con sutura continua de seda triangular del cero.



Anastomosis vía urinaria utilizando sutura reabsorbible, previa colocación de catéter ureteral tipo “pig-tail”



Injerto tras desclampaje, observando anastomosis vena y arteria sobre vena cava y aorta.

7.4.5.-CUIDADOS POSTOPERATORIOS

Una vez finalizada la intervención quirúrgica, el animal permanece intubado con respiración espontánea hasta que el tono neuromuscular y las constantes biológicas se normalicen. A continuación, se procede a la extubación del mismo y se transporta a la corralina. Las muestras de sangre se toman a través del catéter central colocado en la vena yugular externa y tunelizado hasta el dorso. Se controlarán los gases sanguíneos en el postoperatorio inmediato. Se toman análisis en los días sucesivos del trasplante

La analgesia se realiza con meperidina intramuscular (50-100mg) durante la fase del despertar.

El tratamiento inmunosupresor se inicia después de la inducción anestésica con una dosis de 250mg de metilprednisolona y 1,5mg/Kg de azatioprina. Antes de la reperfusión renal, se administran 250mg de metilprednisolona de nuevo. A partir de las 24h, se administra ciclosporina oral a dosis de 20mg/Kg/día hasta el día del sacrificio.

La alimentación se inicia a partir de las 24h con agua y dieta blanda (yogures mezclados con un poco de pienso) .A partir del tercer día realiza dieta normal.

El sacrificio del animal se realiza con tiopental sódico y cloruro potásico (20-30 mEq) por vía endovenosa el quinto día del trasplante. En la necropsia, nos fijaremos fundamentalmente en el aspecto macroscópico del riñón, la integridad de las anastomosis vasculares, la presencia de trombosis vascular y de líquido libre retroperitoneal (linfa, orina, sangre, etc.....).

7.5.-DETERMINACIÓN ANALÍTICAS Y BIOPSIAS

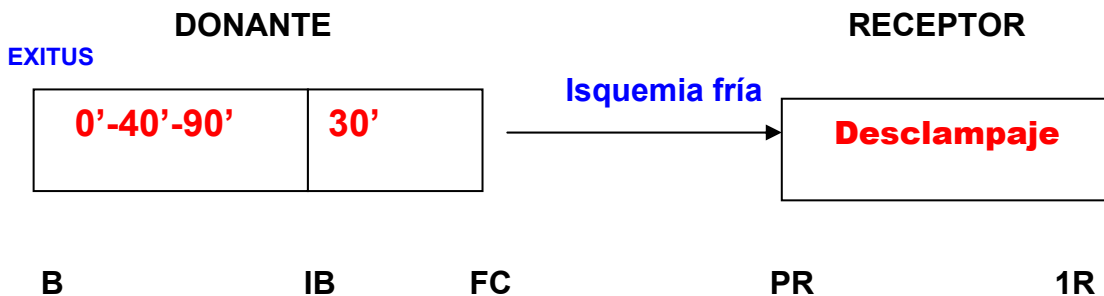
Momentos de la recogida de muestras.

Las muestras de sangre y de tejido renal se obtienen en los siguientes momentos definidos .

1. Animal donante, una vez colocados los catéteres, antes de iniciar la parada cardíaca. Sirve como muestra basal (B) del propio animal (sangre, orina y biopsias).
2. Final del periodo de parada cardíaca (IB). Traduce la lesión aparecida durante todo el periodo de isquemia caliente (sangre y biopsias).
3. Al final de la recirculación con la bomba de by-pass cardiopulmonar (grupo 2 y 3), (FC)

4. Inmediatamente antes de la reperfusión vascular en el animal receptor, durante la realización del trasplante (PR). Traduce la lesión después del periodo total de isquemia caliente y fría (sangre y biopsias).
5. Una hora después de la reperfusión vascular (1R). Traduce la lesión por isquemia-reperfusión (sangre y biopsia).
6. Al primer día (1D) muestra de sangre (bioquímica) para control evolutivo.
7. Al tercer día (3D) también únicamente se obtiene muestra de sangre con el mismo fin.
8. Al quinto día (5D), en el animal superviviente (sangre, orina y biopsia). Indica la viabilidad del órgano y el resultado final del trasplante.

Esquema de las diferentes fases del estudio y momentos de toma de muestras



B= basal, **IB**=inicio de recirculación tras diferentes periodos de isquemia caliente (ninguno, 40 y 90 minutos).**FC**=final de circulación extracorpórea colocando el órgano en Wisconsin. **PR**= final de la isquemia fría; **1R**= 1 hora de reperfusión

7.6. TIPOS DE MUESTRA Y MARCADORES

Se obtienen muestras de tejido y sangre en los momentos predeterminados tanto en el animal donante como en el receptor. Detallaremos a continuación la forma de extracción, tratamiento y parámetros que se estudian en cada una de ellas una vez procesadas.

7.6.1..MARCADORES DE LA LESIÓN RENAL CELULAR.

Desde el punto de vista biológico, la lesión renal se manifiesta como un aumento de la *creatinina sérica* que se traduce clínicamente en una insuficiencia renal postoperatoria de diferente grado. Para cuantificar el nivel de creatinina a lo largo del estudio, se obtienen en cada momento 6 mL de sangre que se depositan en un tubo al vacío (Vacutainer) y se deja a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifuga a 4000 rpm durante 10 minutos y el plasma se almacena en alícuotas de 1mL en microtubos Eppendorf y se congela a -20°C

7.6.2. ESTUDIO HISTOLÓGICO

La lesión renal, histológicamente, se presenta como degeneración y/o necrosis. Las biopsias en cuña se obtienen del riñón a lo largo del proceso experimental. Se guardan en un tubo de Eppendorf que contiene formol al 10% para su examen histológico al microscopio óptico.

7.6.3. ESTUDIO DE LOS ANTIOXIDANTES

Determinaremos a nivel tisular la concentración de superóxido dismutasa (SOD), glutathion reductasa y glutathion peroxidasa, analizando las muestras de tejido renal obtenidas en los diferentes momentos del proceso, en los que se obtuvieron muestra sanguínea y biopsia para estudio histológico. La muestra se guarda en un tubo de Nunc y se congela inmediatamente en nitrógeno líquido a -170°C en una nevera portátil para su posterior traslado al container general del servicio de Bioquímica y poder proceder a su estudio.

7.7. MÉTODOS ANALÍTICOS Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

Todas las muestras de plasma y tejido renal se remitieron a los laboratorios de Bioquímica y Anatomía Patológica del Hospital Clínic de Barcelona para ser procesadas.

7.7.1. PRUEBAS DE BIOQUÍMICA GENERAL.

La determinación de bioquímica sérica y en orina se realizó mediante la reacción cinética tamponada de Jaffé sin desproteinización en un analizador Cobas Mira S (Roche)

El principio de este método se basa en que, en medio alcalino, la creatinina forma el ácido pícrico, un complejo de color amarillo rojizo. La intensidad del color es directamente proporcional a la concentración de creatinina y se determina fotométricamente a 500 nm. La imprecisión del método para la creatinina sérica se determinó en dos sueros control comercial (Precinorm y precipath, Roche) a

dos niveles de concentración. La imprecisión fue del 1% y la interserie del 1,7% a los dos niveles.

7.7.2. MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE LOS ANTIOXIDANTES.

Se ha determinado la concentración de SOD (superóxido dismutasa), GR (glutathion reductasa) y GP (glutathion peroxidasa) en tejido renal por técnicas espetofotométricas (Oxis ®) adaptadas al autoanalizador Cobas Mira (Roche®)

- a) Pesar la muestra de tejido renal en balanza de alta precisión
- b) Añadir al tubo de ensaño, con la muestra ya pesada, 1 ml de solución de “buffer”

Buffer: solución de pH 7,4 obtenida de la mezcla de $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ (básico) y $K_2H_2PO_4$ (ácido). El básico se utiliza a una concentración de 11,4 g/L y el ácido 6,8 g/L.

- c) Se homogeniza el tejido + buffer con el sistema Polytron® 10ST durante 3 ciclos de 10 segundos manteniendo el medio a 4 °C mediante inmersión de las muestras en baño de hielo
- d) Se centrifuga a 15000 rpm durante 5 minutos.
- e) Se aspira el sobrenadante que se coloca en tubo de Nunc y se congela inmediatamente.

7.7.3. MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE NUCLEÓTIDOS DE LA ADENINA Y DERIVADOS.

La determinación de las cantidades de los nucleótidos y sus derivados se llevó a cabo mediante HPLC, en columna de fase de reserva de 20 cm de longitud y 0,4 cm de diámetro interno, empaquetadas con Nucleosil C.18, de 5 micras de diámetro de partícula. Para la fase móvil se utilizó un tampón dihidrogenofosfato de amonio 0,1M preparado a partir de 6,7 mL de ácido fosfórico al 85% y amoníaco al 25% hasta alcanzar un pH= 6. El flujo se mantuvo constante a 1 ml/min. Una vez obtenidos los cromatogramas, se identificaron los metabolitos de las muestras de estudio, mediante la comparación de los tiempos de retención en la columna, con los tiempos obtenidos de una mezcla de estándares de ATP, ADP, AMP, hipoxantina y xantina de concentraciones conocidas. Las concentraciones de las sustancias en estudio se obtuvieron por extrapolación de las áreas del cromatograma sobre rectas de calibración construidas a partir de cinco concentraciones distintas de estándares.

A partir del valor obtenido de cada sustancia en estudio mediante la HPLC, calculamos el porcentaje de cada uno de los nucleótidos y derivados respecto del total, así, el porcentaje de ATP de una muestra de tejido, se obtiene el siguiente cociente: **Porcentaje de ATP= ATP / (ATP+ ADP+AMP+ Xantina+ Hipoxantina).**

7.7.4.MUESTRAS HISTOLÓGICAS.

7.7.4.1. Procesamiento de las muestras:

Se obtuvieron muestras en varias etapas del proceso de donación e implante: Basal (**B**), inicio recirculación (**IB**), final recirculación (**FC**), final de isquemia fría (**PR**), y la hora de haberse iniciado la reperfusión (**1R**).

El examen anatomopatológico se realizó en el microscopio óptico. El material para microscopía óptica fue fijado en una solución de formol al 10% e incluido en parafina. La inclusión se realizó con un procesador de tejido Citadel 2000 de Shandon. El punto de fusión de la parafina utilizada fue de 58-60°C.

Los bloques de tejido parafinado fueron cortados con un microtomo de rotación de Reichert-Jung 2035 hasta obtener cortes de tejido con un espesor aproximado de 3 micras. Estos cortes fueron desparafinados y teñidos con hematoxilina-eosina.

7.7.4.2. Valoración anatomopatológica de las muestras

Para clasificar los riñones en viables y no viables se siguió el criterio anatomopatológico en la muestra histológica tomada al quinto día. Se definió como **riñón no viable** aquel que presentaba **necrosis cortical**. Esto se comparó con la evolución clínica del animal y la existencia o no de diuresis (habíamos observado orinar al cerdo y/o presentaba orina al 5º día en pelvis renal).

A continuación se exponen los criterios anatomopatológicos teóricos que se han seguido para clasificar el grado de las lesiones a nivel de las diferentes células de la nefrona y los vasos, detectadas en las muestras de biopsias renales obtenidas en los diferentes tiempos evolutivos.

“Valoración de la necrosis”: se realizó de modo cualitativo. La **necrosis cortical** fue valorada como presente o ausente y en los casos en que se observó necrosis cortical parcial se describió el porcentaje de área afectada respecto al total de la muestra estudiada. Los cambios típicos de necrosis consisten, básicamente, en una marcada eosinofilia celular global con preservación de los límites celulares.

La **necrosis tubular aguda** fue valorada en **4 grados (0. ausente; 1: leve; 2: moderada; 3: severa)** en función de la extensión y severidad de las lesiones observadas en el examen histológico de las muestras. Resultó difícil evaluar en los casos en que se observó algún signo de rechazo. Se manifiesta característicamente por edema en la región intersticial acompañado de un escaso infiltrado inflamatorio que no afecta a las células tubulares. Frecuentemente, los túbulos muestran lesiones leves y focales que consisten en dilatación de la luz tubular y adelgazamiento del citoplasma de las células epiteliales tubulares. El borde luminal “en cepillo” de las células tubulares se halla alterado, estando parcial o totalmente ausente. También puede observarse ruptura de la membrana basal y fenómenos de apoptosis en múltiples puntos de la nefrona. A diferencia de la necrosis cortical, no se observa afectación de los glomérulos y vasos, aunque ocasionalmente se evidencian trombos de fibrina en los vasos

intraglomerulares. En ocasiones, se pueden apreciar fenómenos de regeneración tubular con aumento del tamaño nuclear y presencia de nucleolo evidente.

“*Valoración del rechazo*” se realizó según los criterios de Banff correspondientes a la revisión de 1997²⁰⁰.

Criterios cuantitativos para:

Tubulitis (“T”)	
T0	No células mononucleares en los túbulos
T1	Focos con 1-4 cél/ sección tubular ó 10 cél. Tubulares
T2	Focos con 5-10
T3	Focos con +10 cél/sección tubular, o presencia de al menos 2 Áreas de membrana basal destruida, acompañada de inflamación i2/i3 y T2 en otra parte de la biopsia.

<u>Inflamación intersticial por morfonucleares (“i”)</u> : indica la presencia de un número remarcable de eosinófilos, polimorfonucleares y/o cél. Plasmáticas	
-i0	inflamación inexistente o trivial (menos del 10% del parénq.afecto)
-i1	10-25% de cél inflamatorias en el parénquima.
-i2	26-50% del parénquima afectado
-i3	más del 50% del parénquima inflamado

Glomerulitis temprana del injerto (“g”)	
G0	no glomerulitis
G1	glomerulitis en la minoría de glomérulos
G2	glomerulitis segmental o global (25-75% de glomérulos)
G3	glomerulitis global en todos o casi todos los glomérulos

Valoración de otras lesiones observadas: en algunas muestras se observaron evidentes lesiones de pielonefritis aguda . Esto dificultó la evaluación de las lesiones propias del daño por isquemia-reperfusión. En los casos en que la muestra se tomó en el animal muerto, se observó autólisis.

Arteritis intimal ("V")	
V0	no arteritis
V1	arteritis intimal media-moderada en mínimo una sección arterial
V2	arteritis intimal severa con pérdida, como mínimo, del 25% del área luminal de, al menos una sección arterial transversa
V3	cambio fibrinoide arterial y/o arteritis trasnmural con necrosis del músculo liso de la media

7.8. MÉTODO DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS.

Base de datos informatizada **EPI-INFO 5. V.01 oct 1990**

Autores J.Dean, A.Dean, A.Burton y R.Dicker) .

Centers for disease control. Epidemiology program office. Georgia.(USA).

Para determinar el test estadístico adecuado para cada variable, se aplicó previamente el test de homogeneidad de la varianza de Bartlett.

En el contraste de variables cualitativas con cuantitativas, se empleó el test de la T de Student (ya que sólo se comparan 2 muestras) o su equivalente no paramétrico (test de Mann-Whitney), o el test de Kruskal-Wallis (equivalente no paramétrico del ANOVA) si eran más de 2 muestras.

Se ha tomado como significación estadística $p < 0,05$.

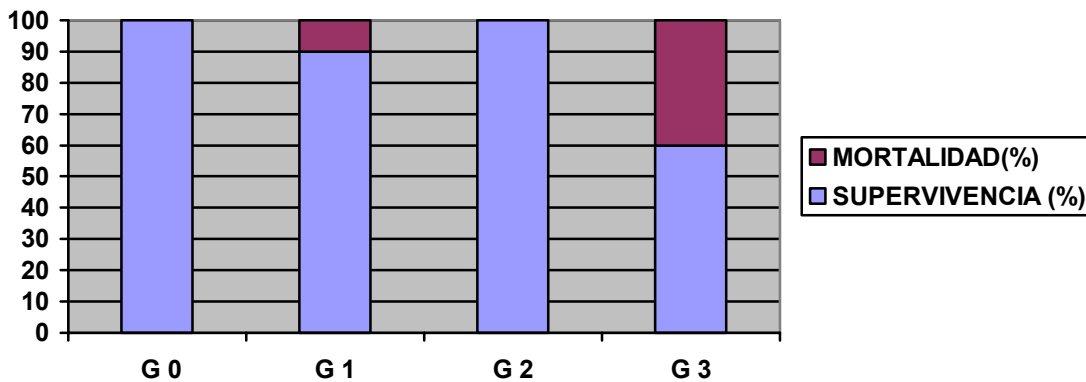
8. RESULTADOS

8.1. SUPERVIVENCIA SEGÚN TIEMPO DE ISQUEMIA

Reflejamos en el siguiente tabla y gráfico la supervivencia obtenida a los 5 días en los diferentes grupos y en función del tiempo de parada cardíaca.

G0: Corazón latiendo,G1: 40 minutos de isquemia caliente,G2: 40 minutos de isquemia caliente y recirculación,G3: 90 minutos de isquemia caliente y recirculación

GRUPOS	SUPERVIVENCIA SÍ	SUPERVIVENCIA NO	SUPERVIVENCIA
G 0 n=10	10	0	100 %
G 1 n=10	9	1	90 %
G 2 n=10	10	0	100 %
G 3 n=10	6	4	60 %



Los animales que sobrevivieron estuvieron sometidos a un tiempo medio de isquemia caliente de **52 minutos**, mientras que en los animales que no sobrevivieron la isquemia caliente media fue de **80 minutos**.

8.2. ANÁLISIS DE LA VIABILIDAD SEGÚN EL TIEMPO DE ISQUEMIA

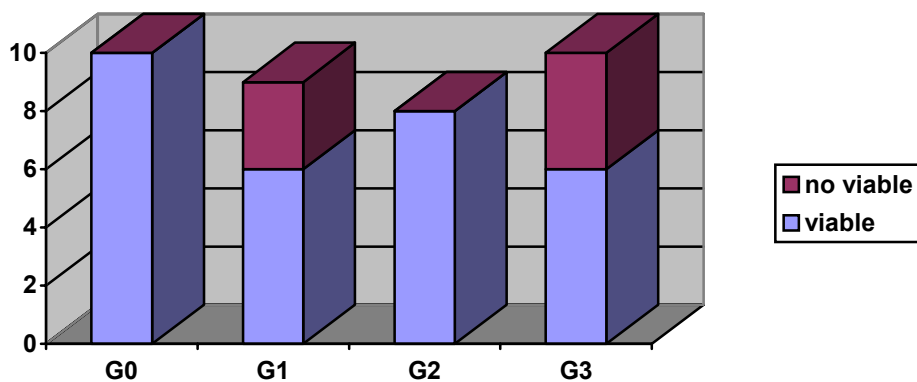
Reflejamos en el siguiente gráfico y tabla la viabilidad del trasplante a los 5 días según el tiempo de isquemia sufrido.

G0: Corazón latiendo

G1: 40 minutos de isquemia caliente

G2: 40 minutos de isquemia caliente y recirculación

G3: 90 minutos de isquemia caliente y recirculación

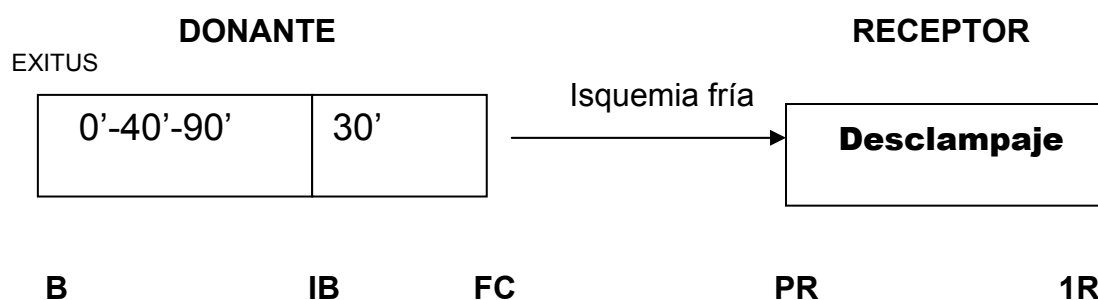


GRUPOS	VIABLE	NO-VIABLE	TOTAL	VIABILIDAD
GO	10	0	10	100%
G1	6	3	9	66%
G2	8	0	8	100%
G3	6	4	10	60%

Los órganos **viabiles** estuvieron sometidos a un tiempo de isquemia medio de **36,29** minutos, mientras que en los **no viabiles** fue de **68,57 minutos**.

8.3. FASES DEL MODELO EXPERIMENTAL.

Tal y como hemos reflejado en los objetivos, vamos a determinar el nivel tisular de **antioxidantes**. Para ello nos ayudaremos también de los cambios que sufre la **carga energética celular** y sus metabolitos , **xantina e hipoxantina**.



La evolución de dichas sustancias las observaremos en diferentes fases:

1-Fase isquemia caliente (IC)

Es la fase de parada cardíaca, comprendida entre la toma de muestras del momento basal (B) y el inicio bomba (IB). Se observarán los cambios sufridos dependiendo del tiempo de isquemia caliente (0,40 y 90 minutos)

2-Fase de recirculación (RECIRCU)

Es la fase comprendida entre el inicio de la bomba (IB) y el final de la recirculación (FC) .Observaremos si existen cambios durante el periodo en que el animal va a ser reperfundido con su propia sangre con la ayuda de una bomba de recirculación.

3-Fase de isquemia fría (IF)

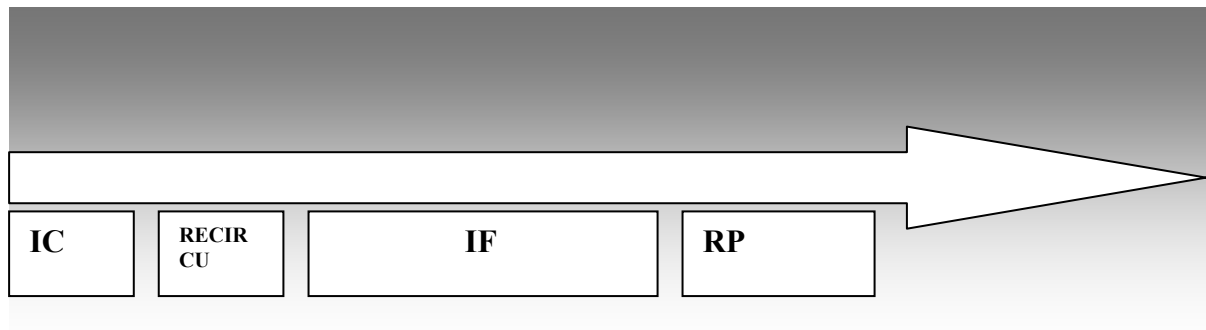
Periodo de tiempo que hemos fijado en el presente estudio en 6 h a temperatura de 4°C previo a la colocación del órgano. Es la fase comprendida entre el final de la recirculación en el donante (FC) y la colocación del injerto en el receptor (PR).

4-Fase de reperfusión (RP)

Periodo que se inicia con la revascularización del riñón (PR) y finaliza a la hora de haber reperfundido el injerto (1R).

8.4. EVOLUCIÓN GLOBAL DE LOS ANTIOXIDANTES SEGÚN FASE.

Con el objetivo de determinar la evolución global de los diferentes antioxidantes hemos analizado los incrementos y decrementos ocurridos en cada fase del proceso experimental. Han sido incluidos todos los animales independientemente del estatus de viabilidad del injerto. Esto nos permitirá conocer, de cada antioxidante, su evolución durante las diferentes etapas de isquemia-reperusión.



1- IC (al valor medio de IB restamos el valor medio de B): diferencia que se produce durante el periodo de isquemia caliente (un valor negativo expresa consumo y un valor positivo acúmulo)

2- RECIRCUCU (al valor de la media FC restamos la media IB) diferencia que se produce durante le periodo de recirculación (un valor negativo expresa consumo y valor positivo acúmulo)

3- IF (al valor de la media RP restamos la media FC) diferencia observada durante el periodo de isquemia fría (valor negativo expresa consumo y un valor positivo acúmulo)

4-RP (a la media 1R restamos la media PR) diferencia que se produce durante la reperusión (un valor negativo expresa consumo y un valor positivo acúmulo).

Los valores de SOD se expresan en U/L; la glutatión peroxidasa y la glutatión reductasa en miliU/L

8.4.1. Evolución de los antioxidantes global.

Los siguientes gráficos expondremos la evolución de cada antioxidante utilizando todos los casos independientemente de su viabilidad y de la isquemia caliente aplicada. Determinamos los incrementos o decrementos de cada fase. El estudio estadístico se realiza comparando dichos cambios respecto a la línea basal cero.

8.4.1.1. SOD

La SOD (superóxido dismutasa) es un enzima citosólico que actúa catalizando la reacción de dos aniones O_2^- en una molécula de peróxido de hidrógeno. En la siguiente gráfica y tabla exponemos la evolución de la SOD tisular en cada fase del experimento. Hallamos cambios estadísticamente significativos en la fase de isquemia fría (IF), donde se consume, y en la fase de reperfusión, acumulándose.

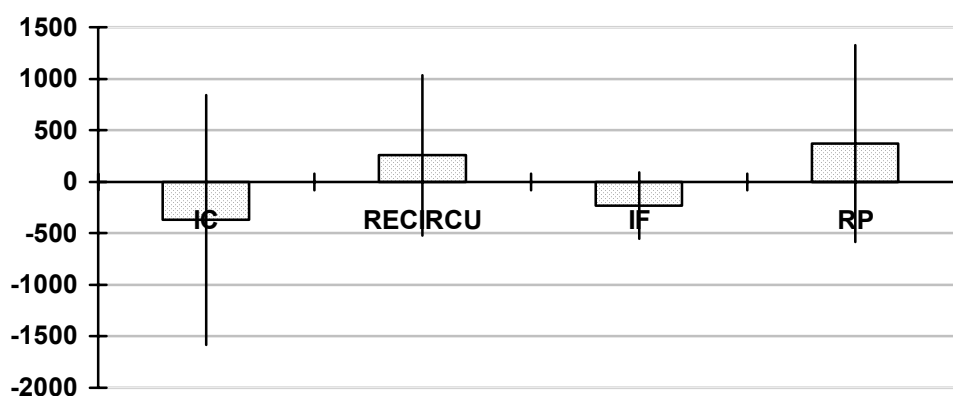


Figura: Evolución de la SOD (U/L) durante las diferentes fases del experimento. IC (fase de isquemia caliente); RECIRCU (fase de recirculación extracorpórea); IF (fase de isquemia fría); RP (fase de reperfusión).

RESULTADOS

Tabla que refleja valor medio, desviación estándar y grado significación

IC	-369 +/- 1213	0.08
RECIRCU	+256 +/- 776	0.09
IF	-231 +/- 325	0.009
RP	+372 +/- 957	0.02

8.4.1.2. Glutation Reductasa.

La glutatión reductasa reduce el glutatión, que una vez reducido podrá ser utilizado por la glutatión peroxidasa para metabolizar el peróxido de hidrógeno. Hallamos cambios estadísticamente significativos en la fase de isquemia fría (IF), donde se consume, y en la fase de reperfusión en la que se acumula.

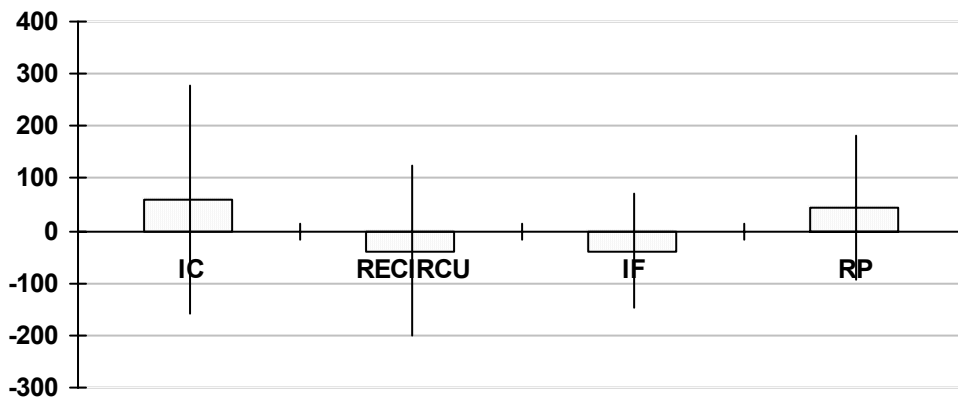


Figura: Evolución de la glutatión reductasa (miliU/L) durante las diferentes fases del experimento. IC (fase de isquemia caliente); RECIRCU (fase de recirculación extracorpórea); IF (fase de isquemia fría); RP (fase de reperfusión).

Tabla que refleja valor medio, desviación estándar y grado significación

IC	+ 60 +/- 217	0.1
RECIRCU	- 39 +/- 162	0.1
IF	- 38 +/- 109	0.09
RP	+ 44 +/- 138	0.04

8.4.1.3. Glutation Peroxidasa.

La glutacion peroxidasa actúa sobre el peróxido de hidrógeno formado a nivel celular. Para dicha acción precisa de glutacion reducido obtenido gracias a la glutacion reductasa. Hallamos cambios estadísticamente significativos en la fase de recirculación extracorpórea (consumo).

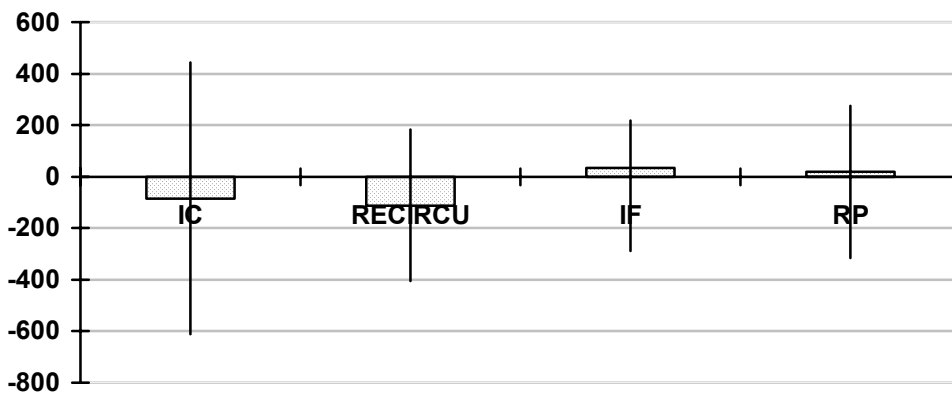


Figura: Evolución de la glutacion peroxidasa (miliU/L) durante las diferentes fases del experimento. IC (fase de isquemia caliente); RECIRCU (fase de recirculación extracorpórea); IF (fase de isquemia fría); RP (fase de reperfusión).

Tabla con el valor medio, desviación estándar y grado significación

IC	- 84 +/- 528	0.2
RECIRCU	- 112 +/- 294	0.06
IF	+35 +/- 253	0.3
RP	+20 +/- 296	0.3

8.4.2.1. Evolución de los antioxidantes en el grupo con isquemia caliente 40 minutos.

A continuación reflejaremos los cambios (incrementos o decrementos) de cada antioxidante en las diferentes fases del estudio diferenciando entre el grupo de 40 minutos de isquemia caliente y el grupo de 90 minutos.

8.4.2.1.S.O.D.

En el siguiente gráfico y tabla podemos apreciar los cambios de la SOD en las diferentes fases. El tiempo de isquemia caliente aplicado es de 40 minutos.

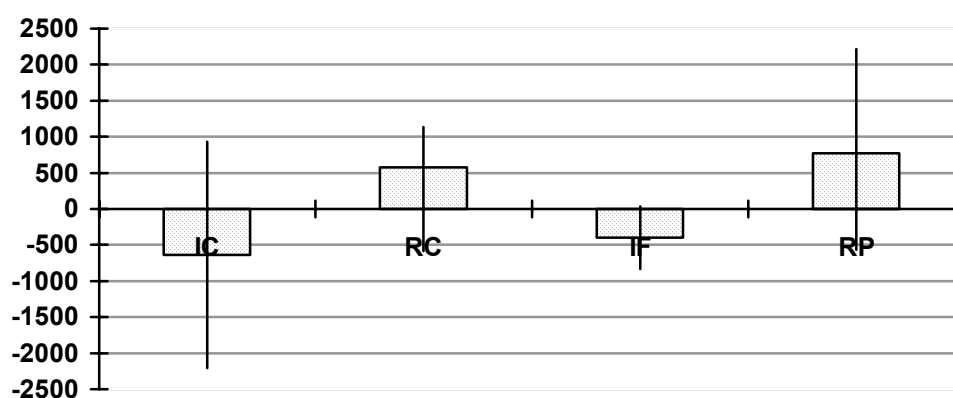


Figura: Evolución de la SOD (U/L) durante las diferentes fases del experimento. IC (fase de isquemia caliente); RECIRCU (fase de recirculación extracorpórea); IF (fase de isquemia fría); RP (fase de reperfusión).

RESULTADOS

Tabla con el valor medio, desviación y grado significación

IC	- 638 +/- 1571	0.09
RC	+ 575 +/- 1160	0.11
IF	- 400 +/- 436	0.05
RP	+ 773 +/- 1342	0.03

En el análisis de los valores encontramos consumo de SOD durante la fase isquemia caliente y recuperación de sus valores durante la fase de recirculación, para posteriormente proseguir su consumo durante la isquemia fría y regenerarse tras el periodo de reperfusión de una hora.

El incremento o decremento de cada fase se ha comparado con un valor basal de cero.

8.4.2.2. Glutation Reductasa.

La siguiente figura y tabla refleja la evolución de la glutatión reductasa, a nivel tisular, en las diferentes fases del experimento. Sólo incluye el grupo de 40 minutos de isquemia caliente.

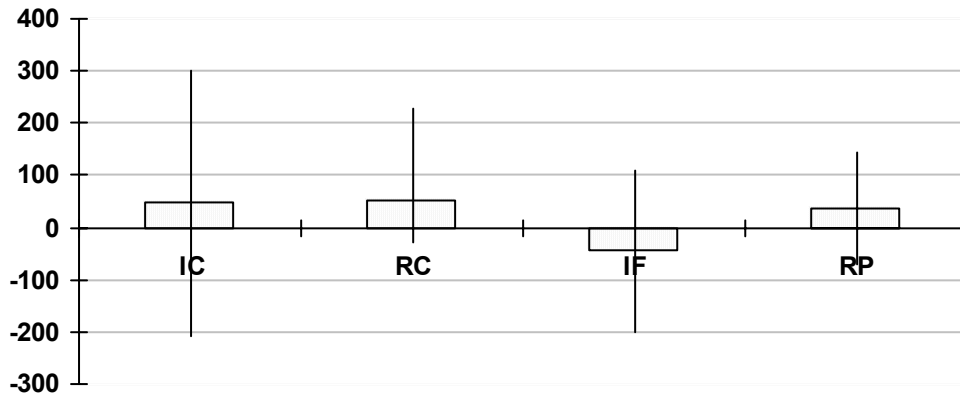


Figura: Evolución de la glutatión reductasa (miliU/L) durante las diferentes fases del experimento. IC (fase de isquemia caliente); RECIRCU (fase de recirculación extracorpórea); IF (fase de isquemia fría); RP (fase de reperfusión).

Tabla con el valor medio, desviación y valor de p en las diferentes fases

IC	+ 47 +/- 254	0.2
RC	+ 50 +/- 178	0.2
IF	- 45 +/- 155	0.2
RP	+ 37 +/- 108	0.1

No hemos encontrado grado significación estadístico en el análisis de los cambios que sufre la glutatión reductasa en cada fase, habiéndose aplicado 40 minutos de isquemia caliente. No obstante, si observamos una tendencia a

acumularse durante la IC y durante la recirculación para consumirse en la isquemia fría y recuperarse con la reperfusión.

8.4.2.3. Glutation Peroxidasa.

La siguiente figura y tabla exponen la evolución de la glutacion peroxidasa tisular en las diferentes fases. No hallamos cambios estadísticamente significativos.

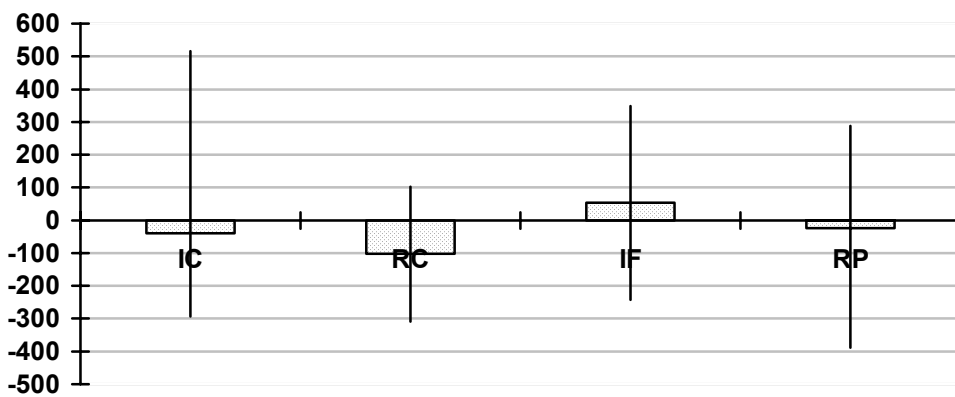


Figura: Evolución de la glutacion peroxidasa (miliU/L) durante las diferentes fases del experimento. IC (fase de isquemia caliente); RECIRCU (fase de recirculación extracorpórea); IF (fase de isquemia fría); RP (fase de reperfusión).

Tabla con el valor medio, desviación y grado significación

IC	- 39 +/- 555	0.4
RC	-103 +/- 305	0.2
IF	+ 53 +/- 296	0.3
RP	- 25 +/- 313	0.3

No obstante, durante la fase de isquemia caliente y recirculación existe una tendencia al consumo, regenerándose durante la fase de isquemia fría y de nuevo tendencia al consumo durante la reperfusión.

8.4.3. Evolución de los antioxidantes en el grupo con isquemia caliente

90 minutos.

A continuación expondremos los cambios (incrementos o decrementos) que sufren cada antioxidante, en las diferentes fases del experimento sólo en los riñones expuestos a 90 minutos de isquemia caliente. Se compara con un valor basal de cero.

8.4.3.1.SOD

La siguiente figura y tabla representa los cambios que sufre la SOD en las diferentes fases del experimento.

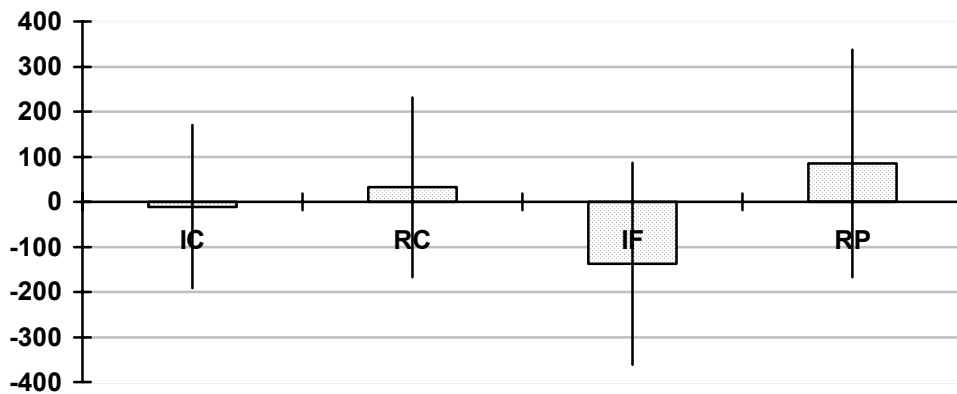


Figura: Evolución de la SOD (U/L) durante las diferentes fases del experimento. IC (fase de isquemia caliente); RECIRCU (fase de recirculación extracorpórea); IF (fase de isquemia fría); RP (fase de reperfusión).

Tabla con el valor medio, desviación y grado significación

IC	- 11 +/- 181	0.4
RC	+ 32 +/- 199	0.3
IF	-137 +/- 224	0.04
RP	+ 85 +/- 252	0.17

Existe una tendencia al consumo durante la fase de isquemia caliente, con una discreta recuperación durante la recirculación. El consumo durante la isquemia fría es notable mostrando regeneración durante la reperfusión.

Durante la isquemia fría se produce una disminución de los valores de SOD que alcanzan la significación estadística.

8.4.3.2. Glutation Reductasa.

La siguiente figura y tabla reflejan la evolución de los cambios que sufre la glutatión reductasa en las diferentes fases del estudio.

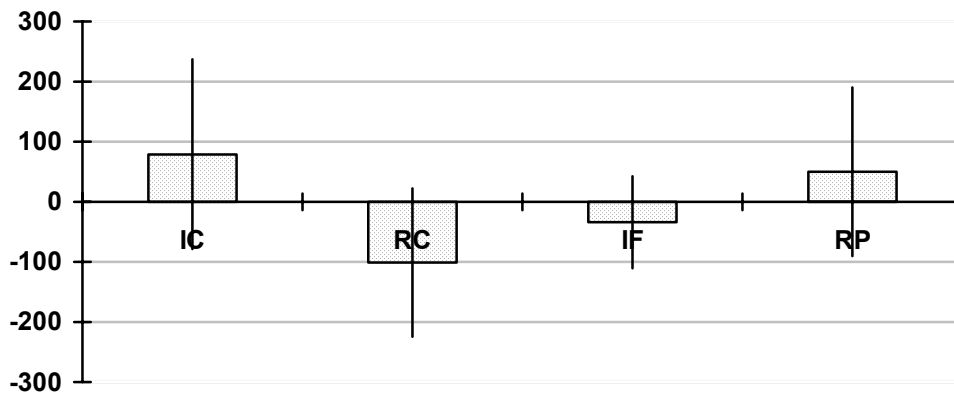


Figura: Evolución de la glutatión reductasa (miliU/L) durante las diferentes fases del experimento. IC (fase de isquemia caliente); RECIRCU (fase de recirculación extracorpórea); IF (fase de isquemia fría); RP (fase de reperfusión).

Tabla con el valor media, desviación y grado significación

IC	+ 79 +/- 158	0.09
RC	- 101 +/- 123	0.01
IF	- 34 +/- 77	0.11
RP	+ 50 +/- 140	0.15

Existe una tendencia elevada de incremento de la glutathion reductasa durante la fase de isquemia caliente y con consumo durante la recirculación y, que continúa, con una tendencia al consumo durante la fase de isquemia fría, para por último tender a aumentar su concentración con la reperfusión.

El consumo producido durante la fase de recirculación alcanza diferencias estadísticamente significativas.

8.4.3.3. Glutation Peroxidasa.

La siguiente figura y tabla exponen los cambios sufridos por la glutatión peroxidasa en las diferentes fases del experimento. No hallamos cambios estadísticamente significativos.

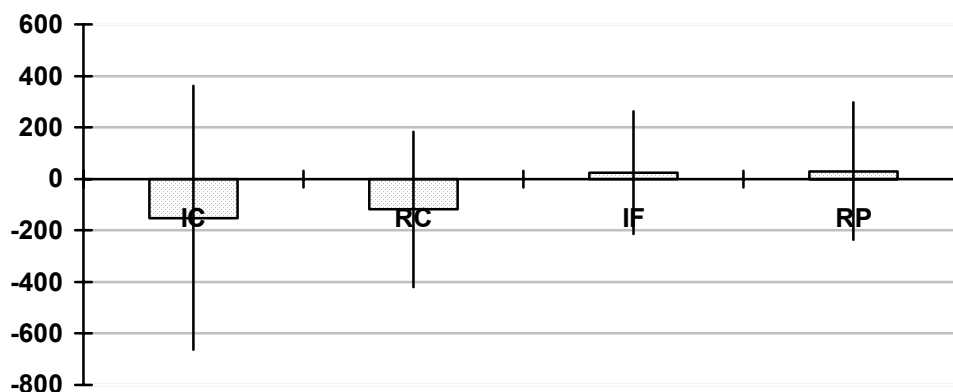


Figura: Evolución de la glutatión peroxidasa (miliU/L) durante las diferentes fases del experimento. IC (fase de isquemia caliente); RECIRCU (fase de recirculación extracorpórea); IF (fase de isquemia fría); RP (fase de reperfusión).

Tabla con el valor medio, desviación y grado de significación

IC	- 151 +/- 513	0.21
RC	- 118 +/- 302	0.12
IF	+ 24 +/- 238	0.3
RP	+ 30 +/- 266	0.3

Del análisis de las variaciones en los valores de glutatión peroxidasa podemos observar una tendencia al consumo durante la fase de isquemia caliente y durante la recirculación, con posterior recuperación durante la fase de isquemia fría y la de reperfusión .

8.5. EVOLUCIÓN DE LOS ANTIOXIDANTES SEGÚN LA VIABILIDAD DEL RIÑÓN.

A continuación se expondrán, de cada antioxidante, los valores medios obtenidos en los momentos predeterminados. Agrupamos los órganos según la viabilidad, independientemente del tiempo de isquemia caliente y de si reciben circulación extracorpórea.

Compararemos los valores obtenidos entre injerto viable y los no viables.

8.5.1. S.O.D

En la siguiente figura y tabla reflejamos los valores obtenidos, en los diferentes momentos del experimento, de SOD tisular. Al comparar los riñones viables y los no viables no obtenemos diferencias estadísticamente significativas en los valores absolutos de la SOD.

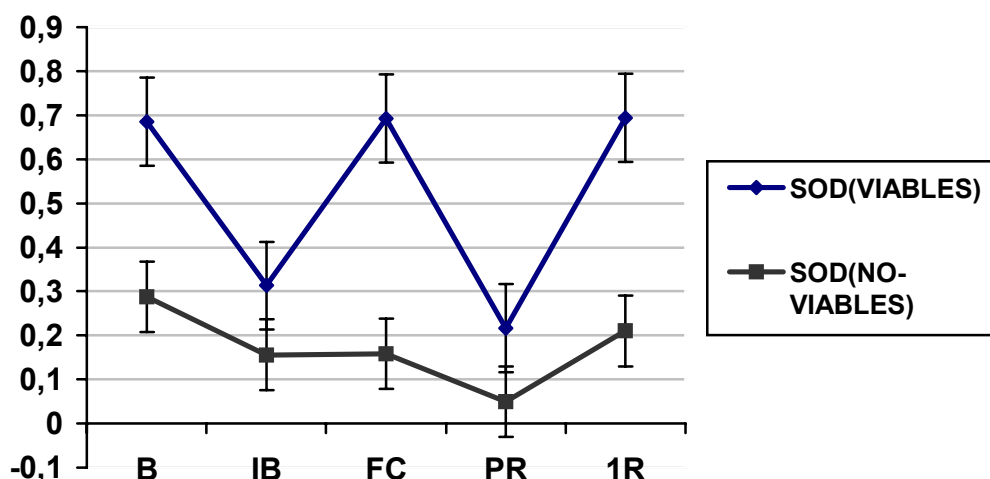


Figura: Valor SOD U/mL. Momento basal (B), inicio recirculación (IB), final recirculación (FC), previo a la revascularización del injerto (PR) y tras una hora de haberse perfundido el riñón (1R).

RESULTADOS

Tabla con el valor medio, desviación y grado de significación estadística

	SOD VIABLE	SOD NO-VIAB.	P
B	0.685 +/- 1.10	0.288 +/- 0.18	0.6
IB	0.313 +/- 0.59	0.156 +/- 0.12	0.5
FC	0.693 +/- 1,05	0.158 +/- 0,12	0.6
PR	0.216 +/- 0.47	0.05 +/- 0.019	0.6
1R	0.694 +/- 1.12	0.21 +/- 0.25	0.6

8.5.2. Glutation Reductasa.

La siguiente figura y tabla reflejan los niveles de glutatión reductasa en los diferentes momentos del estudio, agrupando los órganos según la viabilidad, independientemente del tiempo de isquemia caliente y de si reciben recirculación extracorpórea.

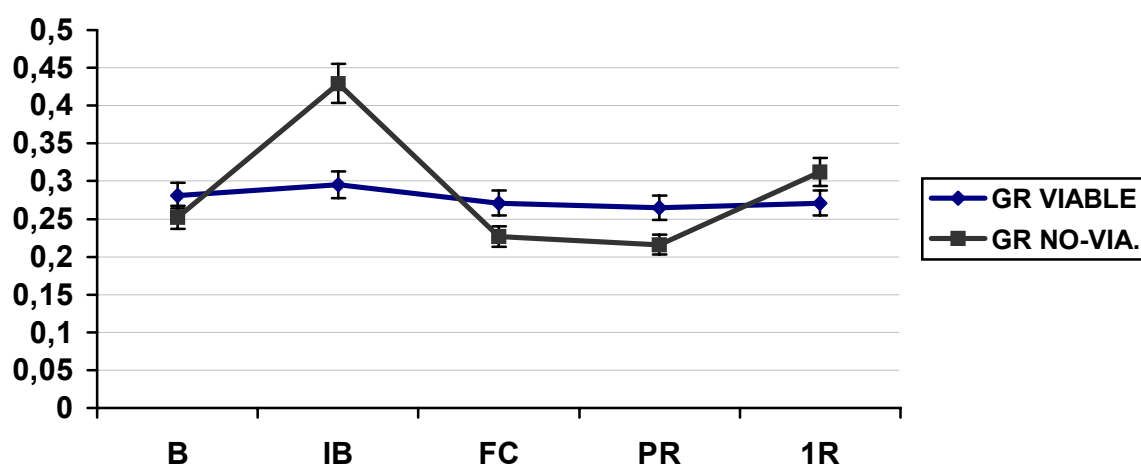


Figura: Valor GR U/L. Momento basal (B), inicio recirculación (IB), final recirculación (FC), previo a la revascularización del injerto (PR) y tras una hora de haberse perfundido el riñón (1R).

Tabla con el valor medio, desviación y grado de significación estadística

	GR VIABLE	GR NO-VIABL	P
B	0.28+/-0.16	0.25+/-0.15	0.7
IB	0.29+/-0.13	0.42+/-0.24	0.19
FC	0.27+/-0.15	0.22+/-0.12	0.42
PR	0.26+/-0.13	0.21+/-0.11	0.39
1R	0.27+/-0.16	0.31+/-0.15	0.30

8.5.3. Glutation Peroxidasa.

La siguiente figura y tabla reflejan la evolución del valor de glutatión peroxidasa tisular en los diferentes momentos. No se obtienen diferencias estadísticamente significativas entre los riñones viables y los no viables.

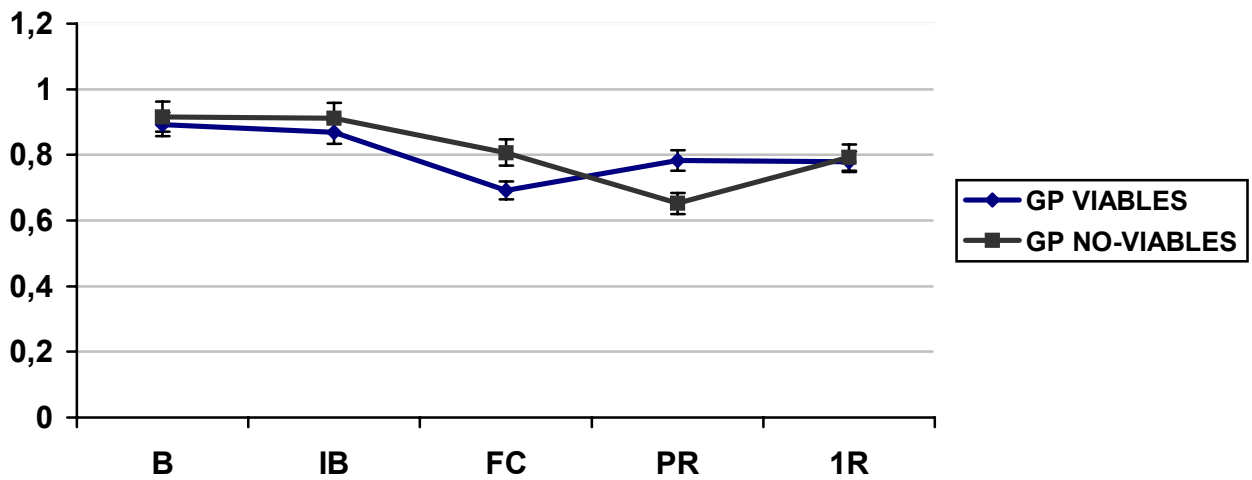


Figura: Valor GP U/L. Momento basal (B), inicio recirculación (IB), final recirculación (FC), previo a la revascularización del injerto (PR) y tras una hora de haberse perfundido el riñón (1R).

Tabla con el valor medio, desviación y grado de significación estadística

	GP VIABLE	GP NO-VIAB.	P
B	0.893 +/- 0.29	0.916 +/- 0.37	0.97
IB	0.869 +/- 0.24	0.912 +/- 0.37	0.54
FC	0.692 +/- 0.26	0.807 +/- 0.08	0.21
PR	0.783 +/- 0.22	0.652 +/- 0.27	0.41
1R	0.779 +/- 0.24	0.792 +/- 0.27	0.44

8.6. NIVEL DE LOS ANTIOXIDANTES Y VIABILIDAD ANALIZADA POR GRUPOS .

Analizaremos los valores tisulares de cada antioxidante en los diferentes momentos predeterminados, según la viabilidad. Individualizaremos cada grupo.

G0: Corazón latiendo

G1: 40 minutos de isquemia caliente

G2: 40 minutos de isquemia caliente y recirculación

G3: 90 minutos de isquemia caliente y recirculación

8.6.1. GRUPO 0: Control (corazón latiente).

En el grupo control el riñón se extrae a corazón latiente por lo que no existe periodo de isquemia caliente como tal. Todos los riñones fueron viables.

8.6.1.1. S.O.D.

La siguiente figura y tabla reflejan los valores de SOD tisular en tres momentos.

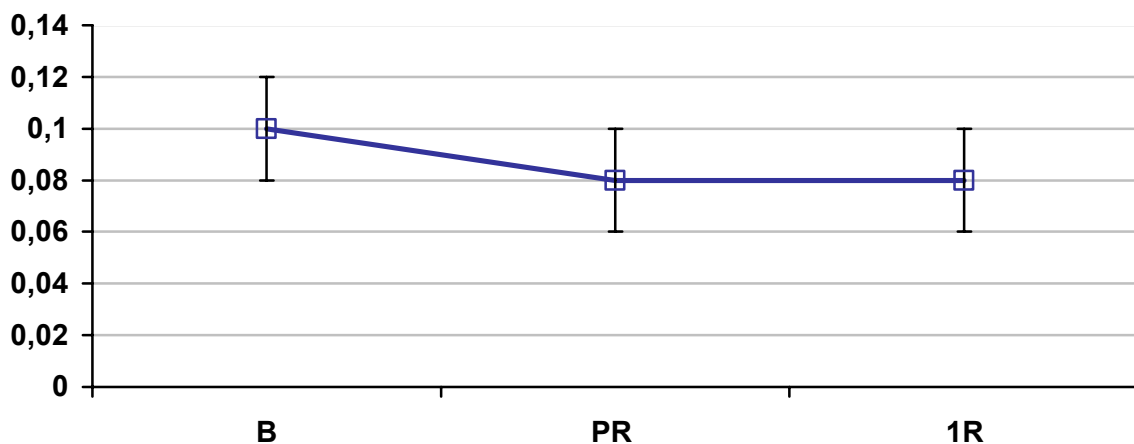


Figura: Valor SOD U/mL. Momento basal (B), previo a la revascularización del injerto (PR) y tras una hora de haberse perfundido el riñón (1R).

Tabla con el valor medio, desviación

B	0.1 +/- 0.09
PR	0.08 +/- 0.06
1R	0.08 +/- 0.06

Tras la extracción se conserva el riñón en isquemia fría produciéndose consumo de SOD. Realizado el implante y transcurrida una hora no varía el nivel tisular de SOD.

8.6.1.2. Glutation Reductasa

La siguiente figura y tabla exponen los valores de glutacion reductasa obtenidos.

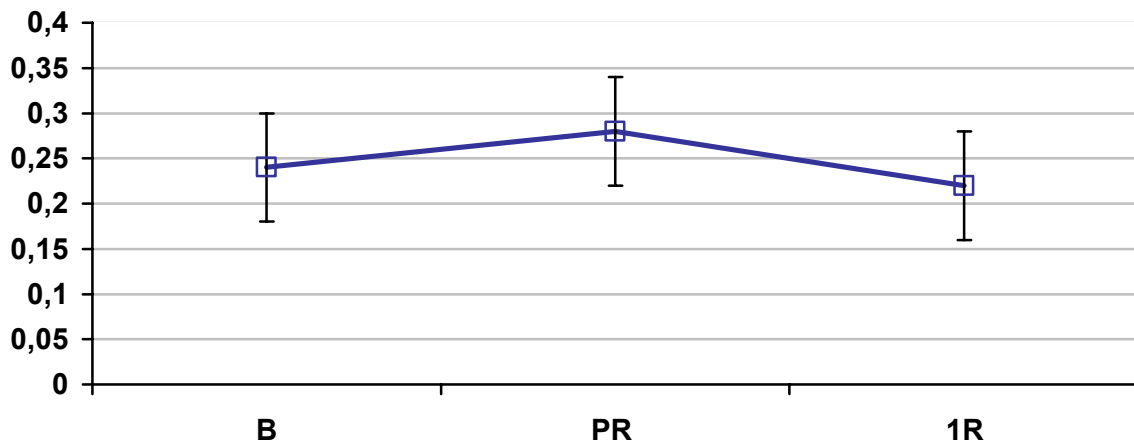


Figura: Valor GR U/L. Momento basal (B), previo a la revascularización del injerto (PR) y tras una hora de haberse perfundido el riñón (1R).

Tabla con el valor medio, desviación

B	0.24 +/- 0.16
PR	0.28 +/- 0.16
1R	0.22 +/- 0.18

Durante la isquemia fría se acumula glutatión reductasa para consumirse tras una hora de reperfusión.

8.6.1.3. Glutathion Peroxidasa.

La siguiente figura y tabla reflejan los valores obtenidos de glutathion peroxidasa en el grupo control (corazón latiente).

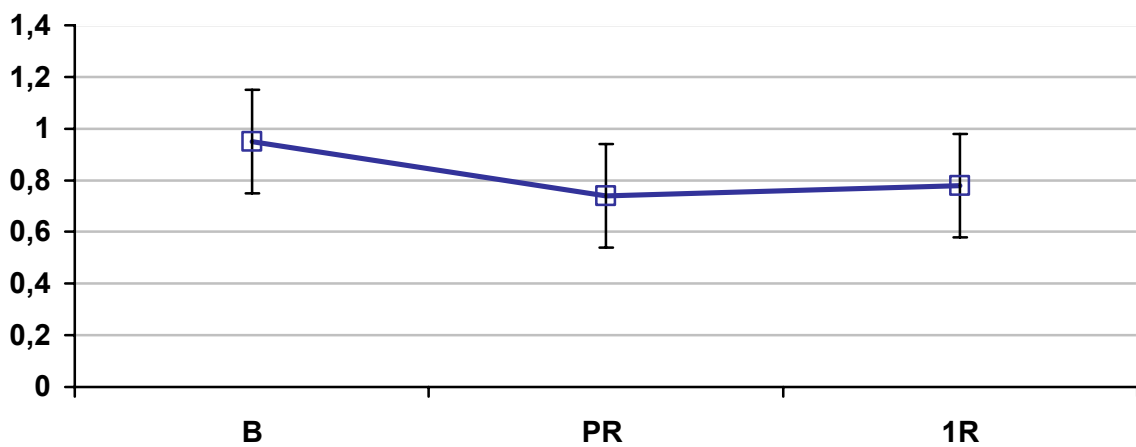


Figura: Valor GP U/L. Momento basal (B), previo a la revascularización del injerto (PR) y tras una hora de haberse perfundido el riñón (1R).

Tabla con el valor medio, desviación

B	0.95+/-0.24
PR	0.74+/-0.17
1R	0.78+/-0.29

Se consume durante la isquemia fría y se recupera tras un hora de reperfusión (al contrario que la glutathion reductasa, siguiendo el patrón lógico dada la relación que existe entre ambos antioxidantes “efecto pivote”).

8.6.2. GRUPO G1: 40 minutos de isquemia caliente sin recirculación.

Analizamos el Grupo 1 de riñones sometidos a 40 minutos de isquemia caliente sin recirculación extracorpórea. Determinamos los valores tisulares de cada antioxidante en los diferentes momentos del estudio. Se comparan estadísticamente los valores obtenidos entre injertos viables y no viables.

8.6.2.1. S.O.D.

La siguiente figura y tabla reflejan el nivel tisular de SOD en los diferentes momentos del grupo de riñones sometidos a 40 minutos de isquemia caliente sin recirculación extracorpórea. No existen diferencias estadísticamente significativas entre órganos viables y no.

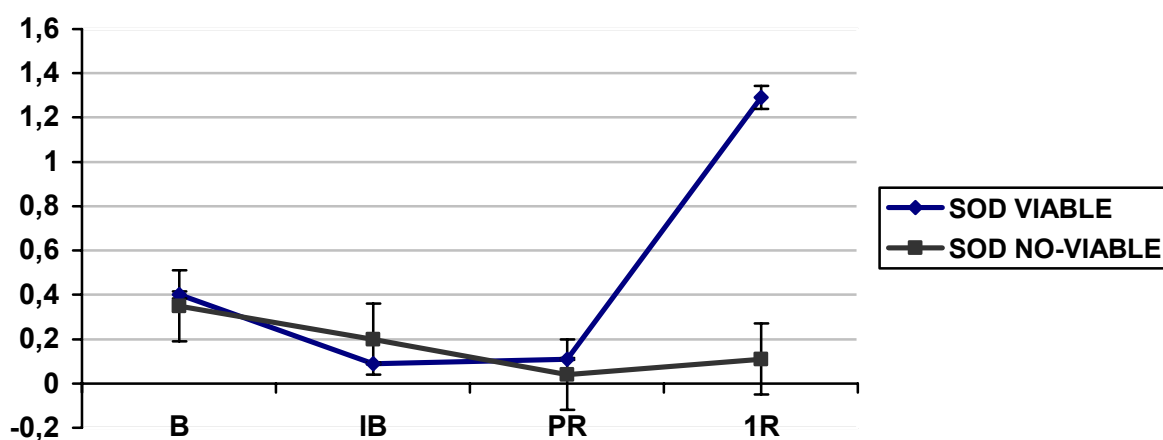


Figura: Valor SOD U/mL. Momento basal (B), inicio recirculación (IB), final recirculación (FC), previo a la revascularización del injerto (PR) y tras una hora de haberse perfundido el riñón (1R).

RESULTADOS

Tabla con el valor medio , desviación y grado significación estadística

	SOD VIABLE	SOD NO-VIAB	P
B	0.4 +/- 0,33	0.35 +/- 0,22	1
IB	0.09 +/- 0,03	0.20 +/- 0,18	0,27
PR	0.11 +/- 0,1	0.04 +/- 0,01	0,29
1R	1.29 +/- 1,01	0.11 +/- 0,09	0,11

8.6.2.2. Glutation Reductasa.

La siguiente figura y tabla reflejan el nivel tisular de glutatión reductasa en los riñones sometidos a 40 minutos de isquemia caliente sin recirculación extracorpórea.

En el momento de finalizar la isquemia caliente (IB) hallamos diferencias estadísticamente significativas entre viables y no viables.

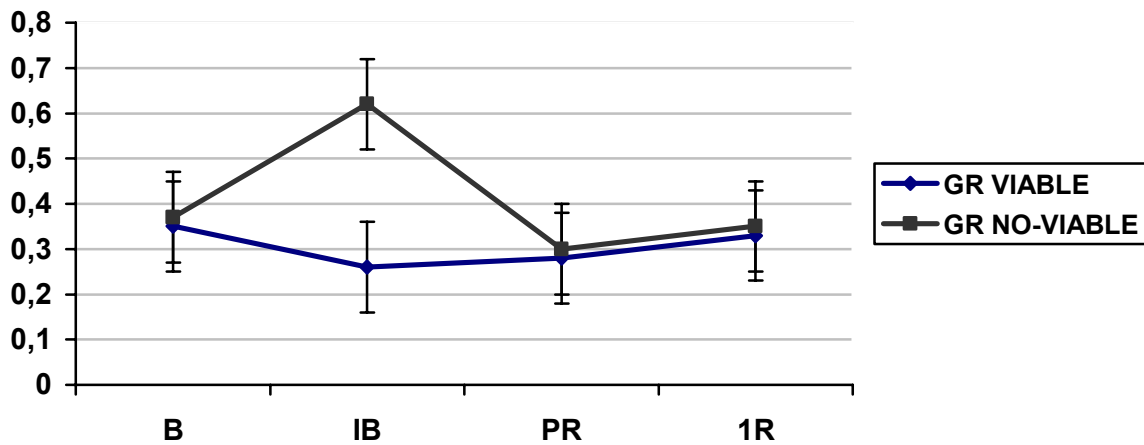


Figura: Valor GR U/L. Momento basal (B), inicio recirculación (IB), final recirculación (FC), previo a la revascularización del injerto (PR) y tras una hora de haberse perfundido el riñón (1R).

Tabla con el valor medio ,desviación y grado significación estadística.

	GR VIABLE	GR NO-VIAB.	P
B	0.35 +/- 0,14	0.37 +/- 0,11	1
IB	0.26 +/- 0,07	0.62 +/- 0,15	0,03
PR	0.28 +/- 0,09	0.3 +/- 0,05	0,88
1R	0.33 +/- 0,11	0.35 +/- 0,11	0,82

8.6.2.3. Glutation Peroxidasa.

La siguiente figura y tabla reflejan el valor tisular de la glutatión reductasa en los riñones sometidos a 40 minutos de isquemia sin posterior recirculación. No hallamos diferencias estadísticamente significativas entre riñones viables y no-viables.

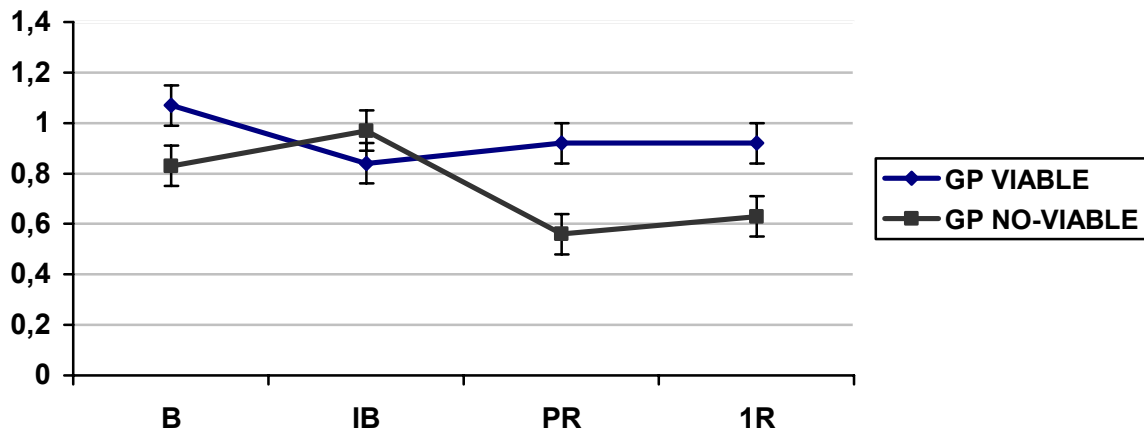


Figura: Valor GP U/L. Momento basal (B), inicio recirculación (IB), final recirculación (FC), previo a la revascularización del injerto (PR) y tras una hora de haberse perfundido el riñón (1R).

Tabla con el valor medio, desviación y grado significación estadística.

	GP VIABLE	GP NO-VIAB	P
B	1.07 +/- 0,29	0.83 +/- 0,41	0,47
IB	0.84 +/- 0,18	0.97 +/- 0,52	0,72
PR	0.92 +/- 0,27	0.56 +/- 0,39	0,1
1R	0.92 +/- 0,35	0.63 +/- 0,37	0,51

8.6.3. GRUPO G2: 40 minutos de isquemia caliente con recirculación.

En los siguientes gráficos y tablas reflejaremos el nivel de cada antioxidante en los diferentes momentos. El riñón ha sido sometido a 40 minutos de isquemia caliente, recirculando, con la bomba de by-pass cardiopulmonar, durante 29 minutos. Como todos los injertos fueron viables observaremos un único valor para cada momento.

8.6.3.1. S.O.D.

Los niveles tisulares de la SOD, en los riñones sometidos a 40 minutos de isquemia caliente con circulación extracorpórea, en los diferentes momentos del estudio son reflejados en la siguiente figura y tabla.

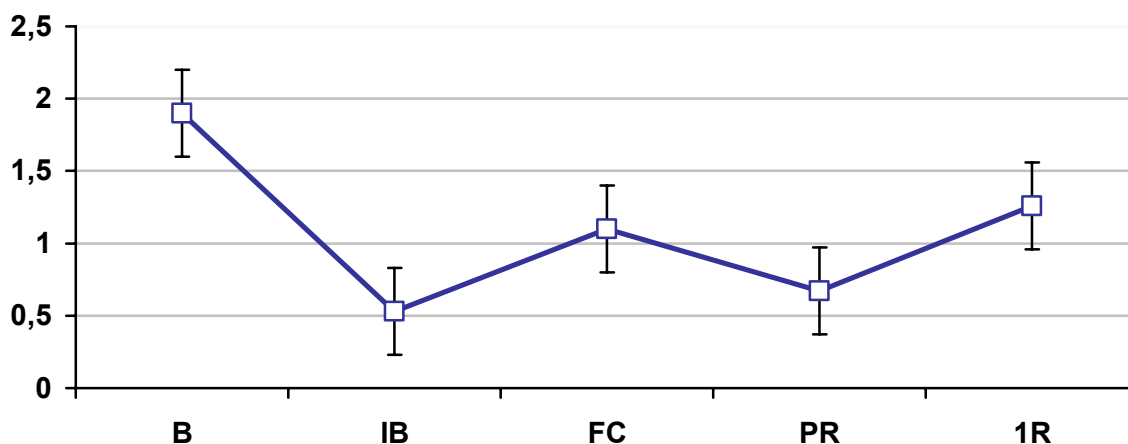


Figura: Valor SOD U/mL. Momento basal (B), inicio recirculación (IB), final recirculación (FC), previo a la revascularización del injerto (PR) y tras una hora de haberse perfundido el riñón (1R).

Durante la isquemia caliente y fría se consume, recuperándose con la recirculación extracorpórea y tras la reperfusión.

Tabla con el valor medio y desviación

	SOD
B	1,9 +/-1,47
IB	0.53 +/- 0,90
FC	1.1 +/- 1,31
PR	0.67 +/- 0,91
1R	1.26 +/- 1,58

8.6.3.2. Glutation Reductasa

La siguiente gráfica y tabla reflejan los valores obtenidos de glutatión reductasa, en los diferentes momentos, en el grupo de 40 minutos de isquemia caliente y recirculación extracorpórea.

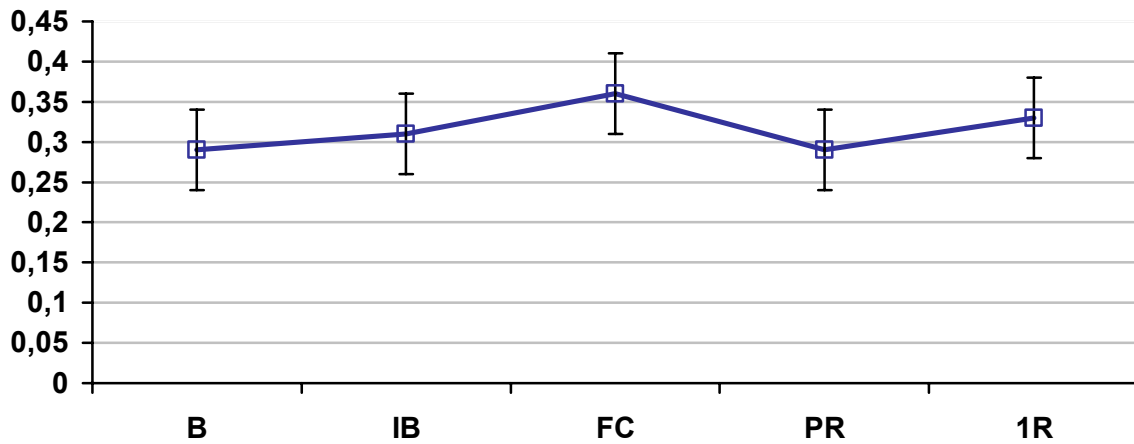


Figura: Valor GR U/L. Momento basal (B), inicio recirculación (IB), final recirculación (FC), previo a la revascularización del injerto (PR) y tras una hora de haberse perfundido el riñón (1R).

Tabla con el valor medio y desviación

	GR
B	0.29 +/- 0,19
IB	0.31 +/- 0,11
FC	0.36 +/- 0,13
PR	0.29 +/- 0,14
1R	0.33 +/- 0,18

El nivel tisular de glutatión reductasa aumenta durante la isquemia caliente y con la recirculación extracorpórea para consumirse durante la isquemia fría y volver a aumentar su concentración tras una hora de reperfusión.

8.6.3.3. Glutathion Peroxidasa

La siguiente figura y tabla reflejan en nivel tisular de glutathion peroxidasa en los diferentes momentos en el grupo de 40 minutos con recirculación extracorpórea.

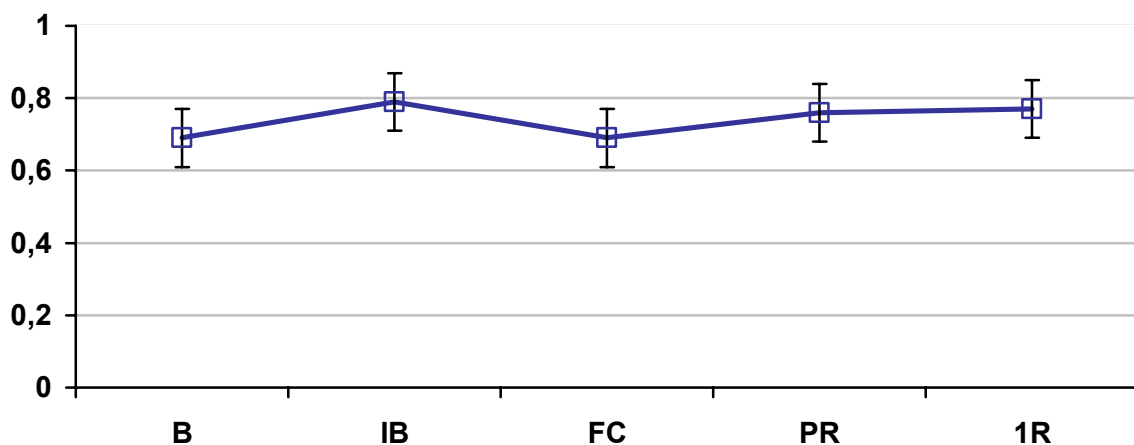


Figura: Valor GP U/L. Momento basal (B), inicio recirculación (IB), final recirculación (FC), previo a la revascularización del injerto (PR) y tras una hora de haberse perfundido el riñón (1R).

RESULTADOS

Tabla con el valor medio y desviación

	GP
B	0.69 +/- 0,35
IB	0.79 +/- 0,2
FC	0.69 +/- 0,28
PR	0.76 +/- 0,3
1R	0.77 +/- 0,22

La glutatión peroxidasa se acumula durante la isquemia fría e inicia su consumo durante la recirculación. Recupera durante la isquemia fría para mantenerse una vez realizado el implante y habiendo transcurrido una hora.

8.6.4. GRUPO 3: 90 minutos de isquemia caliente con recirculación.

En este apartado analizaremos el valor de cada antioxidante en los diferentes momentos del estudio. Los riñones fueron sometidos a 90 minutos de isquemia con posterior recirculación extracorpórea. Se compararán los valores obtenidos entre viables y no viables.

8.6.4.1.S.O.D.

La siguiente figura y tabla reflejan los valores de SOD obtenidos en cada momento. No se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre los riñones viables y los no viables.

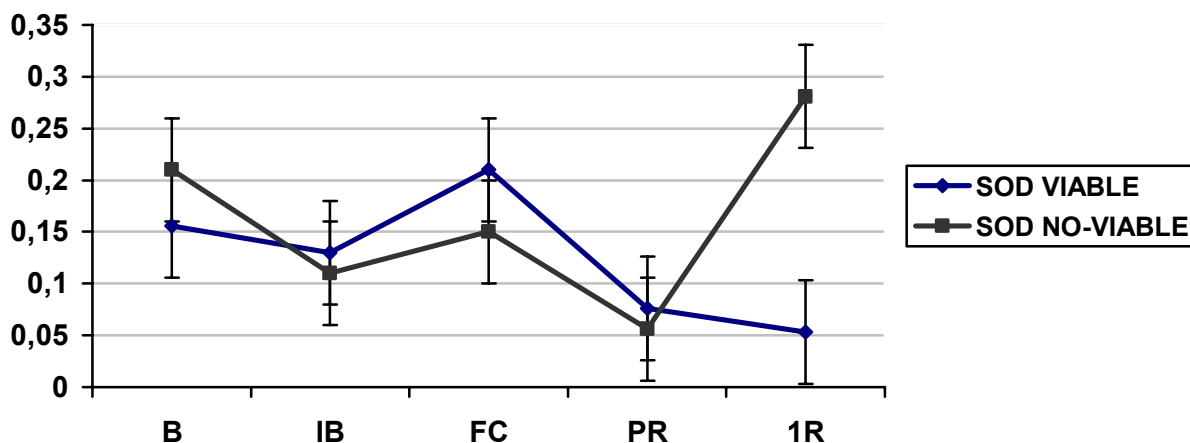


Figura: Valor SOD U/mL. Momento basal (B), inicio recirculación (IB), final recirculación (FC), previo a la revascularización del injerto (PR) y tras una hora de haberse perfundido el riñón (1R).

RESULTADOS

Tabla con el valor medio, desviación y grado significación estadística.

	SOD VIABLE	SOD NO-VIAB	P
B	0.15 +/- 0,073	0.21 +/- 0,001	0,28
IB	0.13 +/- 0,11	0.11 +/- 0,069	1
FC	0.27 +/- 0,339	0.15 +/- 0,125	0,66
PR	0.07 +/- 0,08	0.05 +/- 0,023	1
1R	0.05 +/- 0,048	0.28 +/- 1	0,12

8.6.4.2. Glutation Reductasa.

La siguiente figura y tabla reflejan los valores de glutatión reductasa obtenidos en diferentes momentos. Se analiza en los riñones sometidos a 90 minutos de isquemia caliente y recirculación extracorpórea. Entre los viables y no viables no se encuentran diferencias estadísticamente significativas.

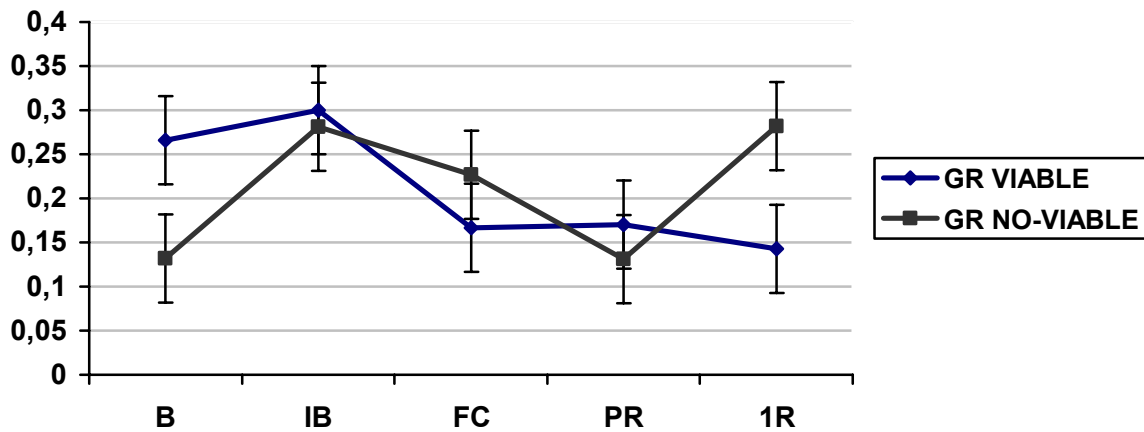


Figura: Valor GR U/L. Momento basal (B), inicio recirculación (IB), final recirculación (FC), previo a la revascularización del injerto (PR) y tras una hora de haberse perfundido el riñón (1R).

Tabla con el valor medio, desviación y grado significación estadística.

	GR VIABLE	GR NO-VIAB	P
B	0.26 +/- 0,176	0.13 +/- 0,076	0,29
IB	0.30 +/- 0,21	0.28 +/- 0,193	0,83
FC	0.16 +/- 0,121	0.22 +/- 0,121	0,66
PR	0.17 +/- 0,131	0.13 +/- 0,074	0,43
1R	0.14 +/- 0,07	0.28 +/- 0,196	0,13

8.6.4.3. Glutation Peroxidasa.

La siguiente figura y tabla reflejan los valores obtenidos de glutatión peroxidasa en los riñones sometidos a 90 minutos de isquemia caliente y posterior recirculación extracorpórea. Se obtienen diferencias significativas entre riñones viables y no viables transcurrida una hora de reperfusión del injerto.

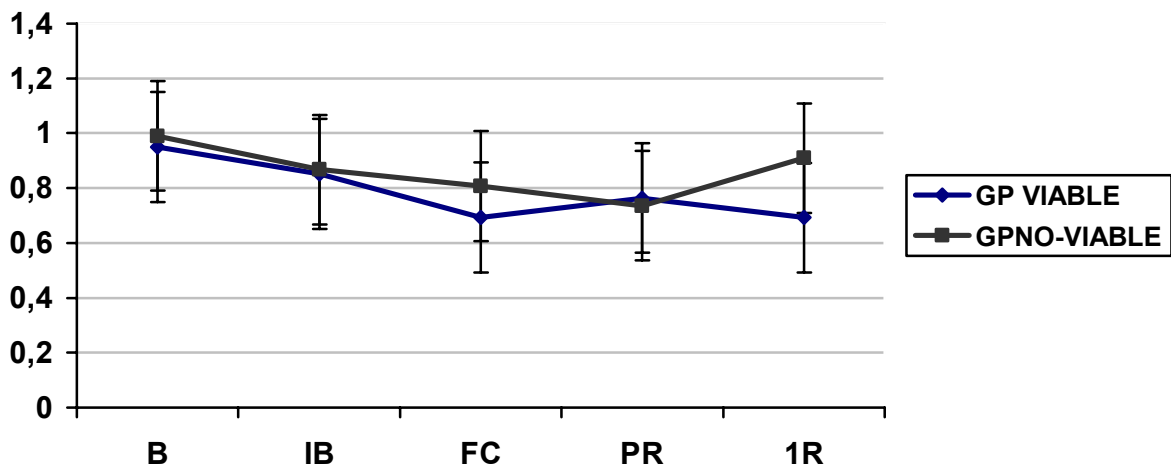


Figura: Valor GP U/L. Momento basal (B), inicio recirculación (IB), final recirculación (FC), previo a la revascularización del injerto (PR) y tras una hora de haberse perfundido el riñón (1R).

Tabla con el valor medio, desviación y grado significación estadística.

	GP VIABLE	GP NO-VIAB	P
B	0.95 +/- 0,179	0.99 +/- 0,397	0,88
IB	0.85 +/- 0,348	0.86 +/- 0,293	0,83
FC	0.69 +/- 0,279	0.80 +/- 0,086	0,53
PR	0.76 +/- 0,173	0.73 +/- 0,095	0,79
1R	0.69 +/- 0,204	0.90 +/- 0,131	0,03

8.7. EVOLUCIÓN DE LOS ANTIOXIDANTES EN CADA FASE SEGÚN VIABILIDAD .

Describiremos los incrementos o decrementos que sufre cada antioxidante en las distintas fases del estudio. Compararemos los injertos viables y no viables para ver si existen diferencias estadísticamente significativas.

8.7.1. GRUPO G2: 40 minutos de isquemia caliente con recirculación.

Analizaremos los cambios en la concentración de cada antioxidante durante cada fase, en órganos sometidos a 40 minutos de isquemia caliente y posterior recirculación extracorpórea. Todos los órganos fueron viables.

8.7.1.1. SOD.

La siguiente figura y tabla reflejan los cambios de la SOD a nivel tisular en las diferentes fases.

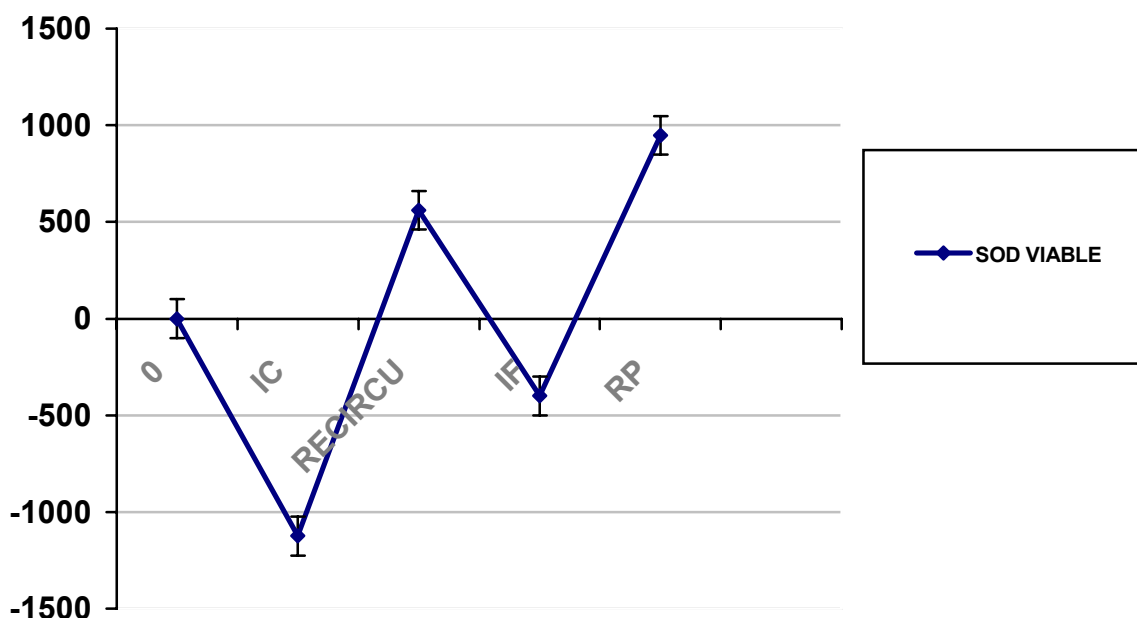


Figura: SOD, U/L; fase de isquemia caliente (IC), fase de recirculación extracorpórea (RECIRCU), fase de isquemia fría (IF) y fase de reperfusión (RP).

Tabla con el valor medio, desviación

IC	- 1124 +/- 2193
RECIRCU	+ 576 +/- 1160
IF	- 400 +/- 436
RP	+ 947 +/- 1782

Observamos un consumo durante la isquemia caliente y fría y recuperación durante la recirculación y la reperfusión.

8.7.1.2. Glutation Reductasa.

La siguiente figura y tabla se exponen las variaciones que sufre la glutacion reductasa en cada fase, en órganos sometidos a 40 minutos de isquemia caliente con recirculación.

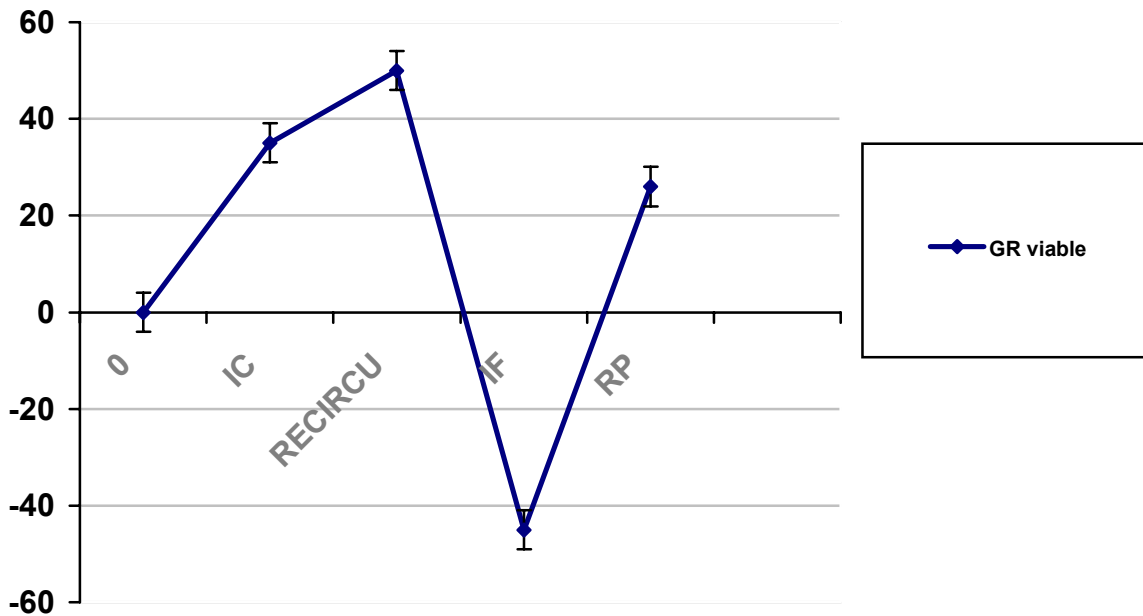


Figura: GR, miliU/L; fase de isquemia caliente (IC), fase de recirculación extracorpórea (RECIRCU), fase de isquemia fría (IF) y fase de reperfusión (RP).

Tabla con el valor medio, desviación

IC	+ 35 +/- 268
RECIRCU	+ 50 +/- 178
IF	- 45 +/- 155
RP	+ 26 +/- 129

La glutatión reductasa sólo se consume durante la isquemia fría, aumentando su concentración en las demás fases.

8.7.1.3. Glutathion Peroxidasa.

La siguiente figura y tabla refleja los cambios en la concentración tisular de glutathion peroxidasa en los órganos sometidos a 40 minutos de isquemia caliente con recirculación extracorpórea durante 30 minutos.

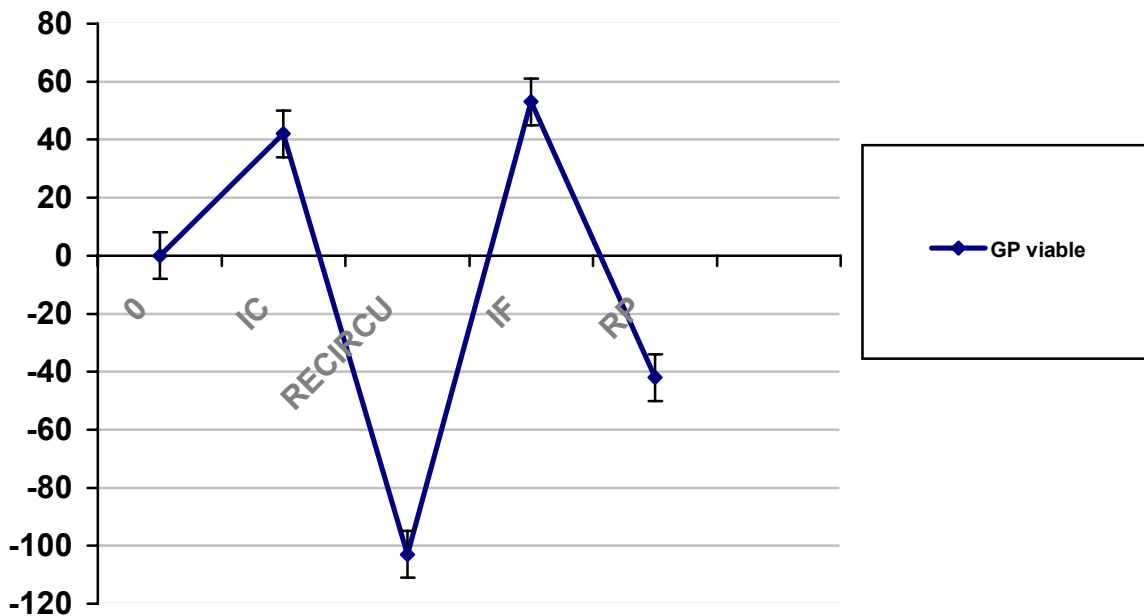


Figura: GP, miliU/L; fase de isquemia caliente (IC), fase de recirculación extracorpórea (RECIRCU), fase de isquemia fría (IF) y fase de reperusión (RP).

Tabla con el valor medio, desviación

IC	+ 42 +/- 418
RECIRCU	- 103 +/- 305
IF	+ 53 +/- 296
RP	- 43 +/- 360

Aumenta durante la isquemia caliente, e inicia su consumo durante la recirculación, recuperando su nivel durante la isquemia fría, mientras, recordemos, la glutatión reductasa se consume para reducir el glutatión. De nuevo se consume con la reperusión.

8.7.2. GRUPO G1: 40 minutos de isquemia caliente sin recirculación.

Analizaremos los incrementos y decrementos que sufre cada antioxidante en las diferentes fases del estudio, en órganos sometidos a 40 minutos de isquemia caliente sin recirculación extracorpórea. Compararemos, estadísticamente los viables y los no-viables.

8.7.2.1. SOD.

La siguiente figura y tabla exponen las variaciones sufridas por la SOD , a nivel tisular, en las diferentes fases, tras ser sometidos a los órganos a 40 minutos de isquemia caliente sin recirculación.

RESULTADOS

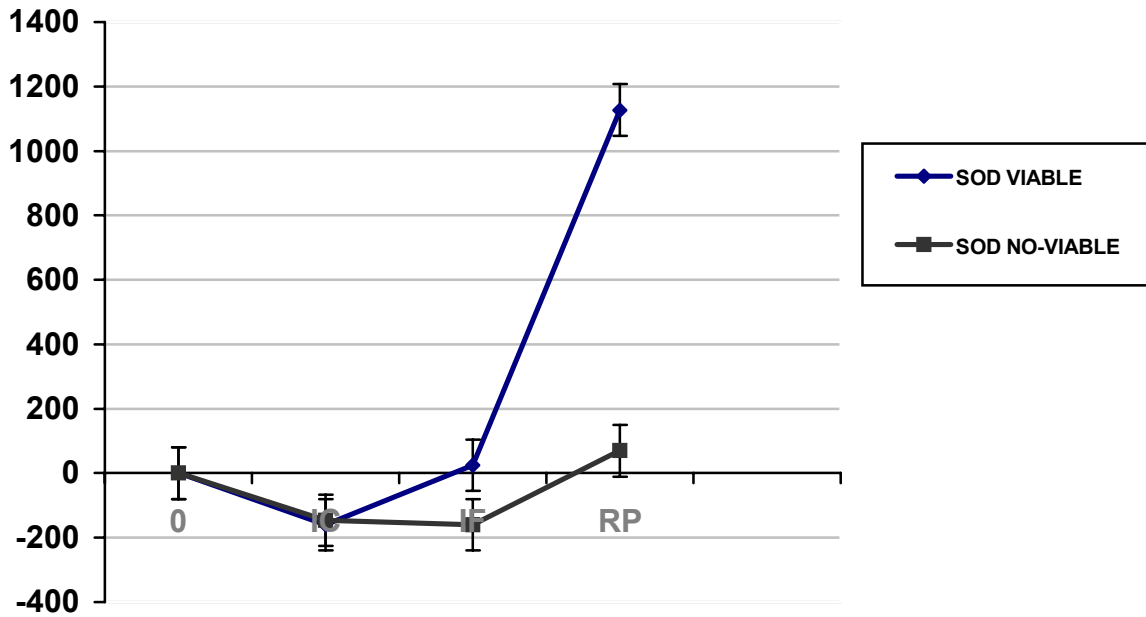


Figura: SOD, U/L; fase de isquemia caliente (IC), fase de isquemia fría (IF) y fase de reperfusión (RP).

Tabla con el valor medio, desviación y grado de significación estadística

	SOD VIABLE	SOD NO-VIABLE	P
IC	-160 +/- 47	- 146 +/- 366	0.5
IF	+ 25 +/- 115	-160 +/- 164	0.1
RP	+ 1127 +/- 966	+ 70 +/- 103	0.2

Las diferencias aparecen en la fase de isquemia fría, donde el órgano viable tiende a recuperar y el no-viable tiende a consumir. Durante la reperfusión todos los riñones tienden a recuperar, pero en mayor grado los viables. No hallamos diferencias significativas.

8.7.2.2. Glutation Reductasa.

La siguiente figura y tabla refleja los cambios de concentración tisular de la glutatión reductasa en las diferentes fases. Tanto en la fase de isquemia caliente como en la de isquemia fría hallamos diferencias estadísticamente significativas entre viables y no viables. El riñón viable inicia su consumo ya en la fase de isquemia caliente al contrario que el no-viable que aumenta su concentración. Con la isquemia grifa el viable recupera y el no-viable presenta un importante consumo, recuperando la concentración tras una hora de reperfusión.

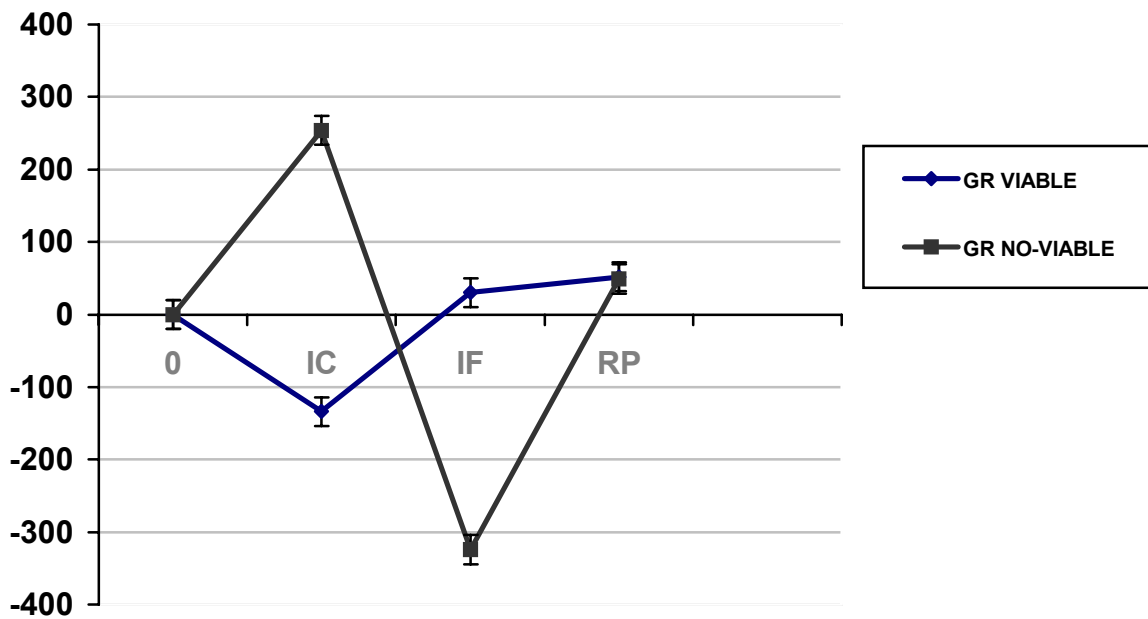


Fig.: GR, miliU/L; fase de isquemia caliente (IC), fase de isquemia fría (IF) y fase de reperfusión(RP).

RESULTADOS

Tabla con el valor medio, desviación y grado de significación estadística

	GR VIABLE	GR NO-VIABLE	P
IC	-134 +/- 48	+ 254 +/- 246	0.05
IF	+ 30 +/- 80	- 324 +/- 144	0.009
RP	+ 52 +/- 56	+ 49 +/- 129	0.9

8.7.2.3. Glutation Peroxidasa.

La figura y tabla siguientes exponen las variaciones que sufre la glutatión peroxidasa a nivel tisular tras sufrir 40 minutos de isquemia sin recirculación posterior. No existen diferencias estadísticamente significativas entre riñones viables y no-viables.

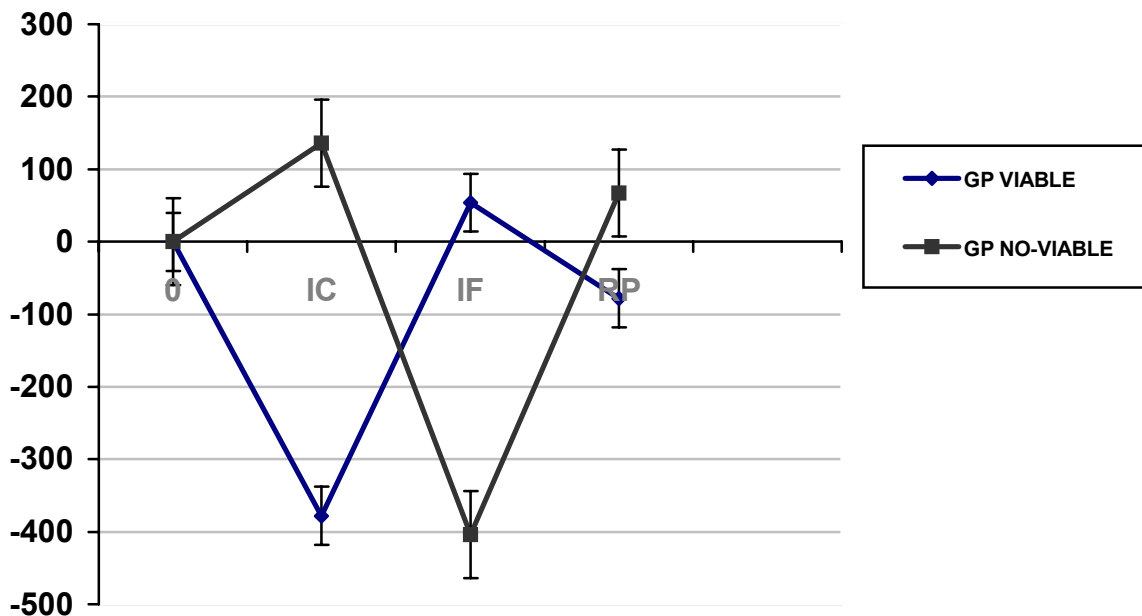


Figura: GP, miliU/L; fase de isquemia caliente (IC), fase de isquemia fría (IF) y fase de reperusión (RP).

RESULTADOS

Tabla con el valor medio, desviación y p estadística

	GP VIABLE	GP NO-VIABLE	P
IC	- 378 +/- 371	+ 136 +/- 939	0.5
IF	+ 54 +/- 371	- 404 +/- 862	0.6
RP	- 78 +/- 311	+ 67 +/- 290	0.5

8.7.3. GRUPO G3: 90 minutos de isquemia caliente con recirculación.

Analizaremos los incrementos y decrementos que sufre cada antioxidante en las diferentes fases del estudio, en órganos sometidos a 90 minutos de isquemia caliente y posterior recirculación extracorpórea durante 30 minutos. Compararemos estadísticamente los viables y los no-viables.

8.7.3.1. SOD.

La siguiente tabla y figura reflejan los cambios que sufre la SOD a nivel tisular en los órganos sometidos a 90 minutos de isquemia caliente y posterior recirculación extracorpórea. No existen diferencias estadísticas significativas al comparar riñones viables con no viables, a pesar de que el incremento de SOD durante la reperfusión en los riñones no viables se aproximó a la significación estadística.

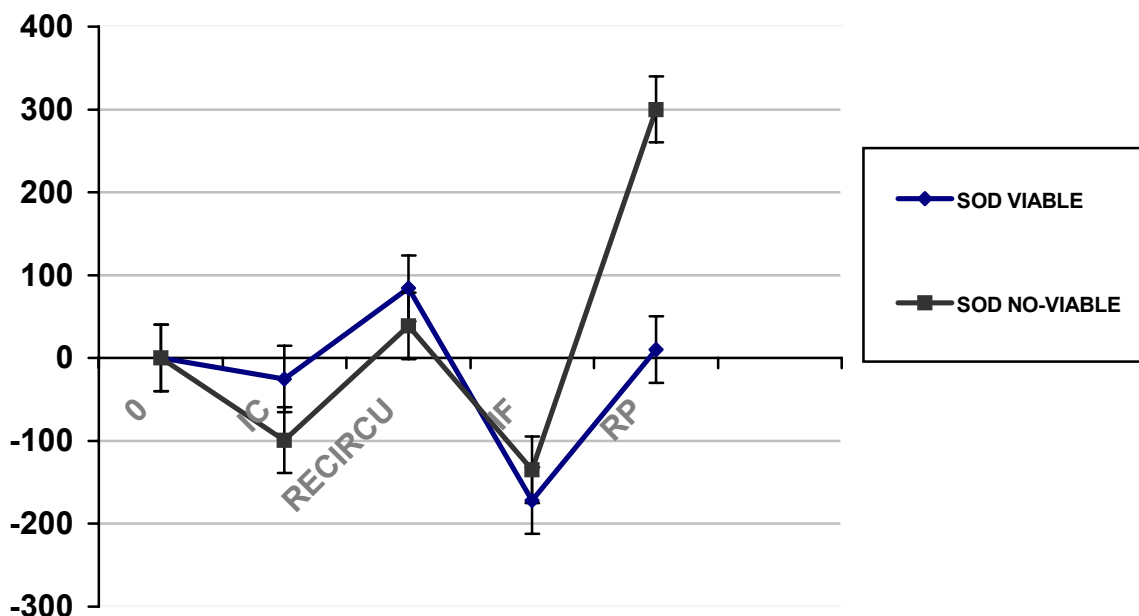


Figura: SOD, U/L; fase de isquemia caliente (IC), fase de recirculación extracorpórea (RECIRCU), fase de isquemia fría (IF) y fase de reperfusión (RP).

RESULTADOS

Tabla con el valor medio, desviación y grado significación estadística

	SOD VIABLE	SOD NO-VIABLE	P
IC	- 25 +/- 142	- 99 +/- 103	0.5
RECIRCU	+ 84 +/- 389	+39 +/- 71	0.2
IF	-172 +/- 342	- 135 +/- 153	0.8
RP	+ 10 +/- 58	+ 300 +/- 381	0.09

8.7.3.2. Glutation Reductasa.

La siguiente figura y tabla exponen los cambios a nivel de la glutatión reductasa tisular, tras someter al órgano a 90 minutos de isquemia con recirculación extracorpórea. En la fase de isquemia fría y en la de reperfusión hallamos diferencias estadísticamente significativas. Existe un punto de cruce a nivel de la fase de isquemia fría, donde recuperar el riñón viable y persiste el consumo del no-viable. Vuelven a cruzarse en la fase de reperfusión donde el viable consume y el no viable aumenta considerablemente su concentración.

RESULTADOS

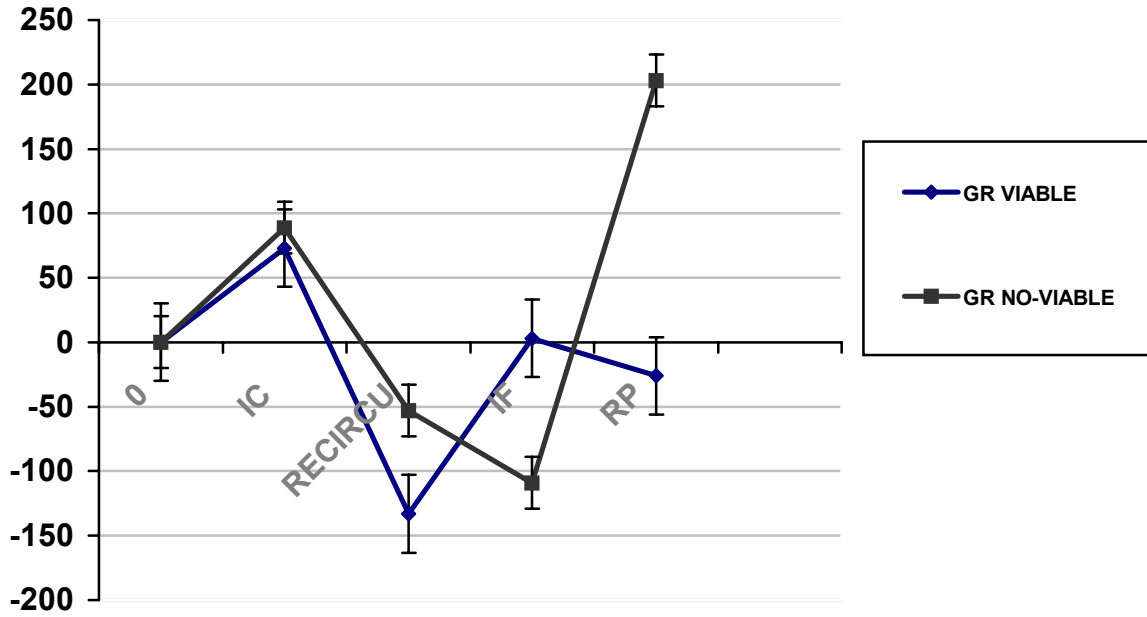


Figura: GR, miliU/L; fase de isquemia caliente (IC), fase de recirculación extracorpórea (RECIRCU), fase de isquemia fría (IF) y fase de reperusión (RP).

Tabla con el valor medio, desviación y grado significación estadística

	GR VIABLE	GR NO-VIABLE	P
IC	+ 73 +/- 191	+ 89 +/- 119	0.8
RECIRCU	- 133 +/- 135	- 53 +/- 99	0.3
IF	+ 3 +/- 31	- 109 +/- 94	0.03
RP	- 29 +/- 53	+ 203 +/- 138	0.007

8.7.3.3. Glutation Peroxidasa.

La siguiente figura y tabla reflejan los cambios a nivel tisular de la glutacion peroxidasa en las diferentes fases, en órganos sometidos a 90 minutos de ischemia caliente con recirculación extracorpórea. En la fase de reperfusión encontramos diferencias significativas, el riñón viable consume y el no viable aumenta de forma importante su concentración.

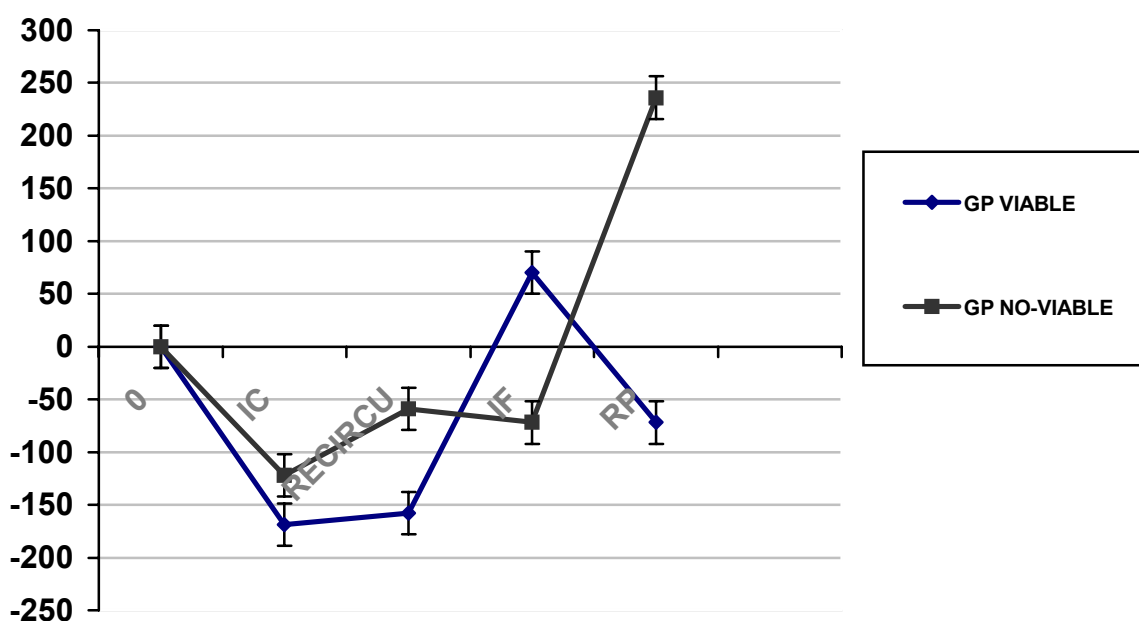


Figura: GP, miliU/L; fase de ischemia caliente (IC), fase de recirculación extracorpórea (RECIRCU), fase de ischemia fría (IF) y fase de reperfusión (RP).

Tabla con el valor medio, desviación y grado significación

	GP VIABLE	GP NO-VIABLE	P
IC	-169 +/- 422	- 122 +/- 750	0.9
RECIRCU	- 158 +/- 273	- 59 +/- 377	0.8
IF	+ 70 +/- 273	- 72 +/- 141	0.1
RP	- 72 +/- 268	+ 236 +/- 115	0.03

8.8. EVOLUCIÓN DE LOS ANTIOXIDANTES SEGÚN EL TIEMPO DE ISQUEMIA APLICADO.

En este apartado describiremos los cambios, incrementos o decrementos, que sufre cada antioxidante en las diferentes fases, pero lo realizaremos agrupando los órganos según el tiempo de isquemia aplicado. Por tanto compararemos los riñones sometidos a 40 minutos de isquemia caliente con los sometidos a 90 minutos. Analizamos el grupo 2 y 3, es decir 40 y 90 minutos de isquemia con circulación extracorpórea.

8.8.1. SOD.

En la siguiente figura y tabla reflejamos los cambios tisulares en la concentración de SOD en las diferentes fases del estudio. No existen diferencias estadísticamente significativas.

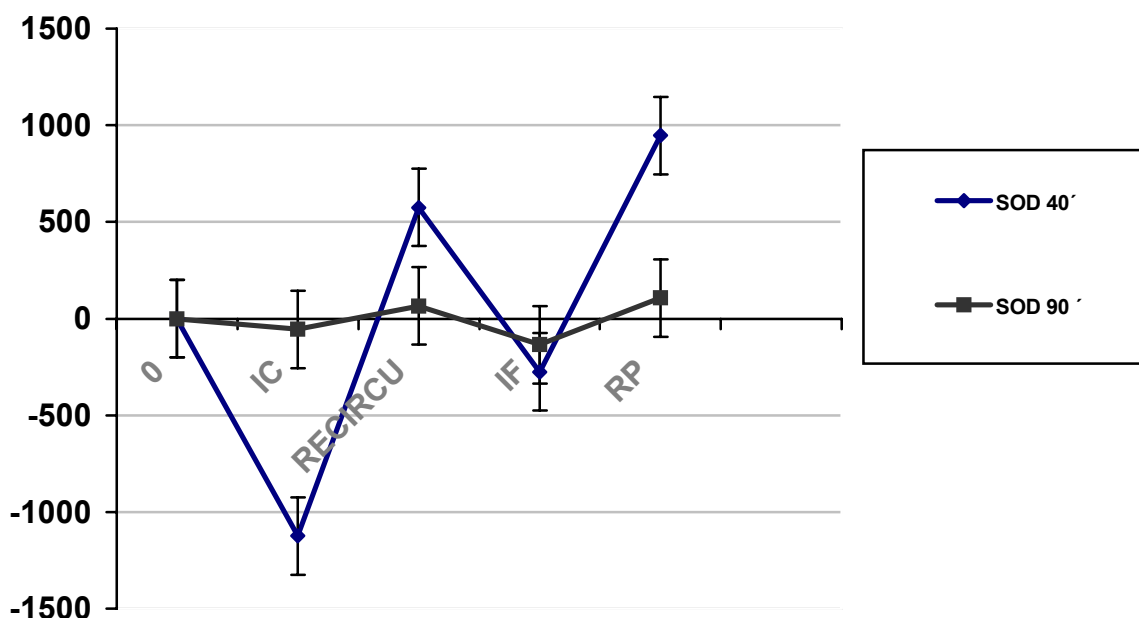


Figura: SOD, U/L; fase de isquemia caliente (IC), fase de recirculación extracorpórea (RECIRCU), fase de isquemia fría (IF) y fase de reperusión (RP).

RESULTADOS

Tabla con el valor medio, desviación y grado de significación estadística

	SOD 40 MIN.	SOD 90 MIN.	P
IC	-1124 +/- 2193	- 55 +/- 127	0.1
RECIRCU	+ 575 +/- 1160	+ 66 +/- 294	0.1
IF	- 276 +/- 386	- 135 +/- 153	0.5
RP	+ 947 +/- 1782	+ 107 +/- 245	0.4

8.8.2. Glutation Reductasa.

La siguiente figura y tabla reflejan los valores tisulares de la glutacion reductasa según el tiempo de isquemia, 40 ó 90 minutos. Se compara estadísticamente ambos grupos. Hallamos diferencias en la fase de recirculación.

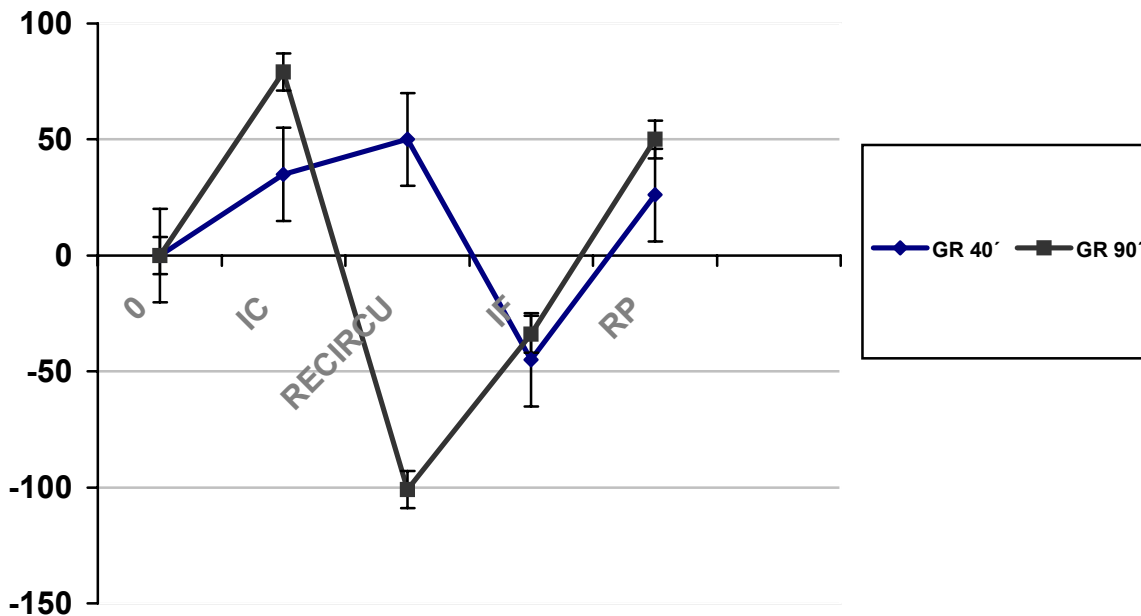


Figura: GR, miliU/L; fase de isquemia caliente (IC), fase de recirculación extracorpórea (RECIRCU), fase de isquemia fría (IF) y fase de reperusión (RP).

RESULTADOS

Tabla con el valor medio, desviación y grado significación estadística

	GR 40 MIN.	GR 90 MIN.	P
IC	+ 35 +/- 268	+ 79 +/- 158	0.7
RECIRCU	+ 50 +/- 178	- 101 +/- 123	0.05
IF	- 45 +/- 155	- 34 +/- 77	0.8
RP	+ 26 +/- 129	+ 50 +/- 140	0.7

Durante la recirculación extracorpórea el riñón que ha sufrido 40 minutos de isquemia caliente recupera glutatión reductasa, mientras que el de 90 minutos consume.

8.8.3. Glutation Peroxidasa.

La siguiente figura y tabla reflejan los cambios que sufre la glutatión peroxidasa a nivel tisular, según el tiempo de isquemia caliente aplicado. No existen diferencias significativas, pero si un punto de interés durante la isquemia fría y la recirculación. El riñón de 40 minutos de isquemia caliente tiende a aumentar la concentración durante la isquemia caliente y tiende a consumir durante la recirculación, al contrario que el riñón de 90 minutos de isquemia caliente. Con la reperusión el de 40 minutos tiende a consumir y el de 90 tiende a recuperar.

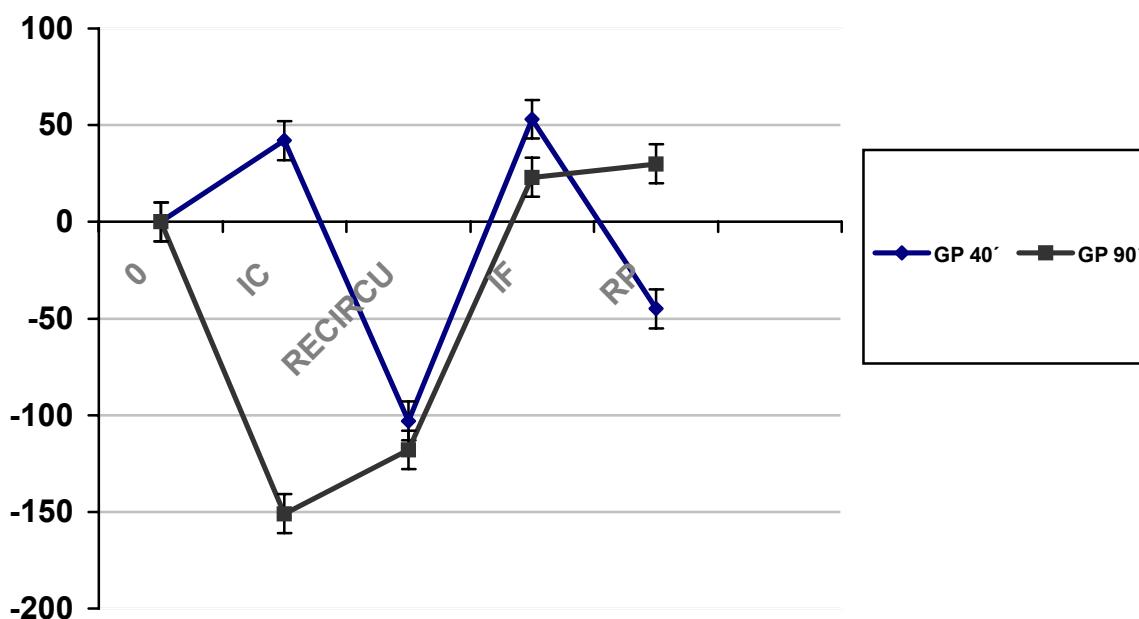


Figura: GP, miliU/L; fase de isquemia caliente (IC), fase de recirculación extracorpórea (RECIRCU), fase de isquemia fría (IF) y fase de reperusión (RP).

RESULTADOS

Tabla con el valor medio, desviación y p estadística

	GP 40 MIN.	GP 90 MIN.	P
IC	+ 42 +/- 418	- 151 +/- 513	0.5
RECIRCU	- 103 +/- 305	- 118 +/- 302	0.9
IF	+ 53 +/- 296	+ 23 +/- 238	0.8
RP	- 45 +/- 360	+ 30 +/- 266	0.6

8.9. EFECTO RECIRCULACIÓN EXTRACORPÓREA SOBRE RIÑONES SOMETIDOS A 40 MINUTOS DE ISQUEMIA CALIENTE.

Compararemos los niveles tisulares de cada antioxidante entre el grupo 2 (40 minutos de isquemia caliente con recirculación) y el grupo 1 (40 minutos de isquemia caliente sin circulación extracorpórea).

8.9.1. SOD.

En la siguiente figura y gráfica reflejamos los valores tisulares de SOD en los diferentes momentos del experimento comparando los dos grupos.

Observamos el efecto beneficioso de la circulación mejorando la concentración de SOD en el momento que finaliza el periodo de isquemia fría: en el grupo con recirculación la concentración tisular media de SOD es de 0,6 U/mL y en el grupo sin recirculación es de 0,091 U/mL, con un grado de significación estadística de $p \leq 0.05$.

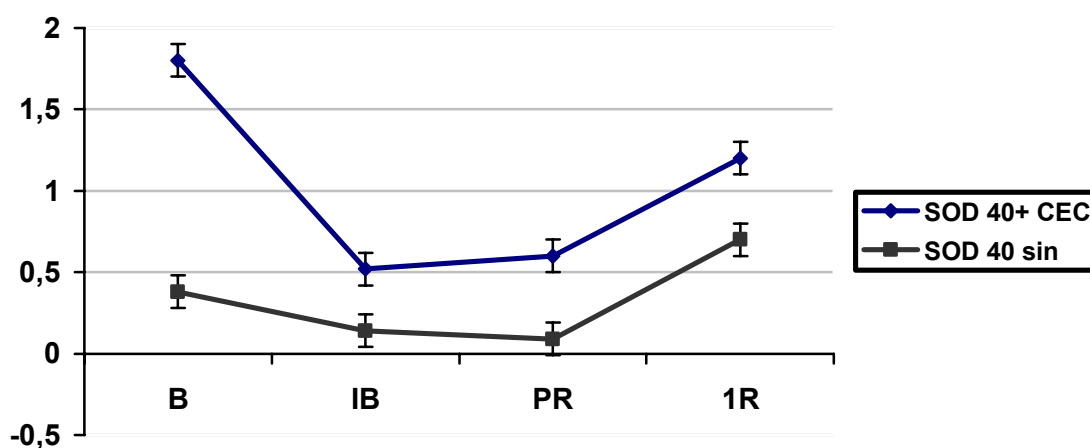


Figura: SOD U/mL; B basal, IB final isquemia caliente, PR previo revascularización del injerto; 1R tras una hora de haberse reperfundido el riñón.

RESULTADOS

	40 con CEC	40 sin	grado significación
B	1.8 +/- 1.4	0.38 +/- 0.07	0.1
IB	0.52 +/- 0.9	0.14 +/- 0.12	0.6
PR	0.6 +/- 0.9	0.091 +/- 0.06	0.05
1R	1.2 +/- 1.5	0.7 +/- 0.9	0.5

8.9.2. Glutation Reductasa.

La siguiente figura y tabla reflejan los valores tisulares de glutatión reductasa en los diferentes momentos comparando ambos grupos. No hallamos diferencias estadísticamente significativas entre los riñones con circulación extracorpórea y sin recirculación, con el mismo tiempo de isquemia caliente de 40 minutos.

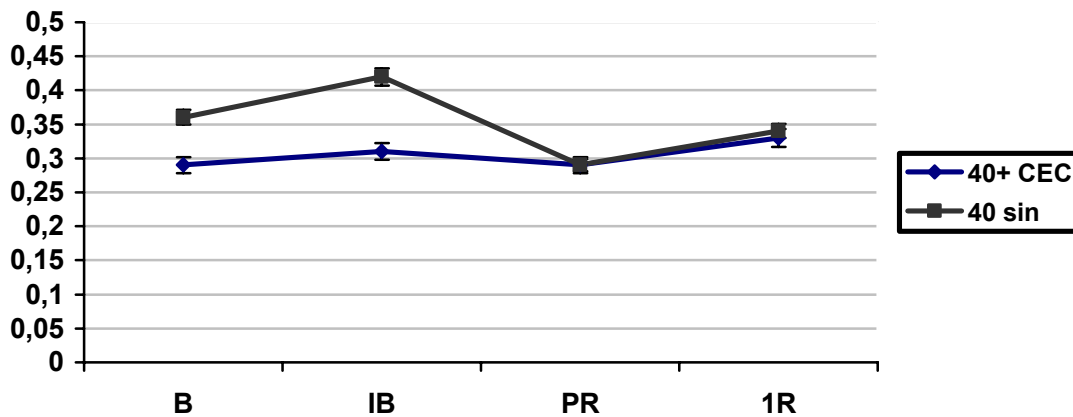


Figura: glutatión reductasa U/L; B basal, IB final isquemia caliente, PR previo revascularización del injerto; 1R tras una hora de haberse reperfundido el riñón.

RESULTADOS

	40 con CEC	40 sin	grado significación
B	0.29 +/- 0.19	0.36 +/- 0.12	0.5
IB	0.31 +/- 0.1	0.42 +/- 0.21	0.2
PR	0.29 +/- 0.13	0.29 +/- 0.08	0.9
1R	0.33 +/- 0.17	0.34 +/- 0.1	0.9

El nivel de glutatión reductasa tiende a disminuir desde el final de la isquemia caliente (IB) hasta el momento de revascularizar (PR) en el grupo sin recirculación, mientras que el grupo con circulación tiende a mantener el mismo nivel. Tras la reperfusión alcanzan la misma concentración.

8.9.3. Glutación Peroxidasa.

La siguiente figura y tabla reflejan los valores tisulares de glutatión peroxidasa en los diferentes momentos comparando ambos grupos. No hallamos diferencias estadísticamente significativas entre los riñones con circulación extracorpórea y sin recirculación, con el mismo tiempo de isquemia caliente de 40 minutos.

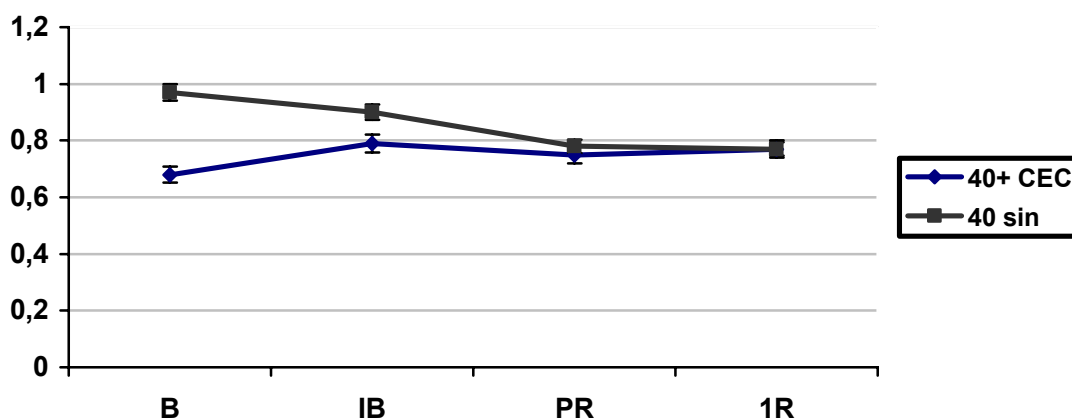


Figura: glutatión peroxidasa U/L; B basal, IB final isquemia caliente, PR previo revascularización del injerto; 1R tras una hora de haberse reperfundido el riñón.

RESULTADOS

	40 con CEC	40 sin	grado
B	0.68 +/- 0.39	0.97 +/- 0.34	0.1
IB	0.79 +/- 0.19	0.9 +/- 0.33	0.5
PR	0.75 +/- 0.29	0.78 +/- 0.34	0.8
1R	0.77 +/- 0.21	0.77 +/- 0.36	0.9

Durante la isquemia caliente evolucionan con diferente patrón, pero desde el final de la misma hasta el momento previo a la revascularización del riñón en ambos grupos tienden a consumir igualando las concentraciones.

8.10. CARGA ENERGÉTICA SEGÚN VIABILIDAD.

En 1981 Granger, Rutili y Mc Cord ⁷⁷ describen el « mecanismo molecular » que se produce durante el fenómeno de isquemia-reperusión. Durante el periodo de isquemia se consume ATP, catabolizándose a ADP y AMP. Este último se cataboliza a xantina e hipoxantina. Esto provoca la incapacidad para mantener el gradiente de membrana y fracasa la homeostasis intracelular.

Para obtener la carga energética se ha aplicado la **fórmula de Atkinson**

$$\text{C.E.} = \text{ATP} + \frac{1}{2} \text{ATP} / \text{ATP} + \text{ADP} + \text{AMP}$$

A partir del valor obtenido de cada sustancia en el estudio mediante la HPLC, calculamos el porcentaje de cada uno de los nucleótidos y derivados respecto del total, así, el porcentaje de ATP de una muestra de tejido, se obtiene del siguiente cociente: **PORCENT. ATP = ATP / (ATP + ADP + AMP + Xantina + Hipoxantina)**

En la siguiente figura y tabla se representan los valores medios de carga energética en los diferentes momentos del estudio, comparándose estadísticamente los valores de los viables y los de los no-viables.

Hallamos diferencias significativas entre riñones viables y no-viables respecto a la carga energética al finalizar la recirculación extracorpórea (FC) y tras una hora de reperusión (1R). Al finalizar la circulación el riñón no viable recupera más carga energética que el viable, para consumirla durante la isquemia fría. Con la reperusión el viable recupera la carga energética, mientras que el no-viable no la modifica.

RESULTADOS

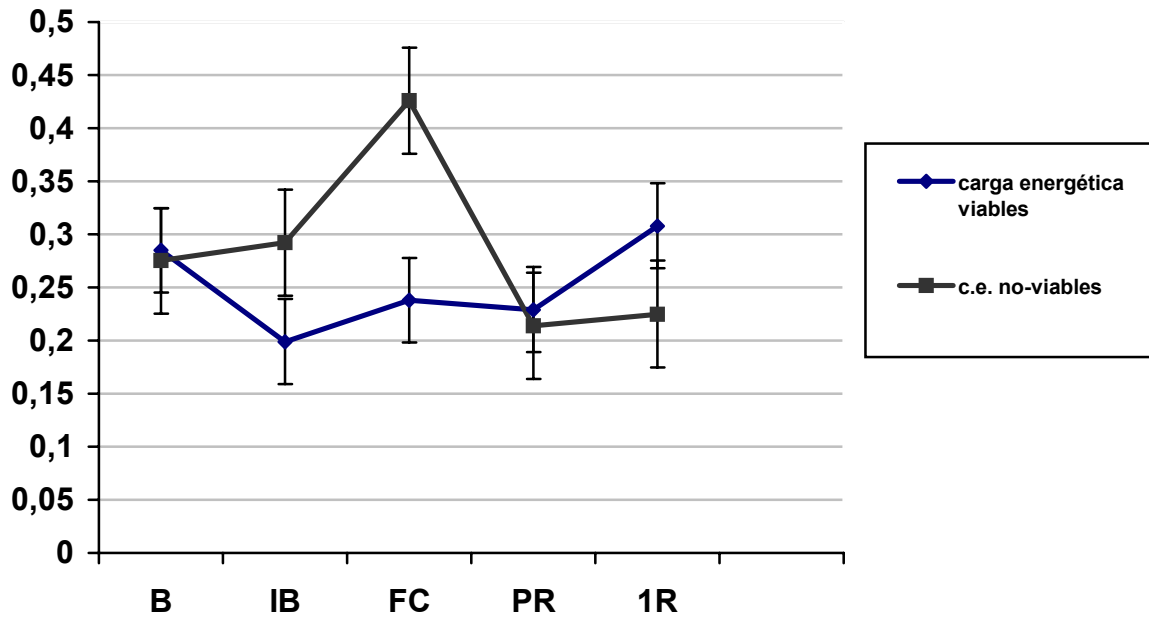


Figura: nivel de carga energética ; B (momento basal); IB(inicio de recirculación); FC (final de la recirculación); PR (final de la isquemia fría); 1R (transcurrida una hora de reperfundido el órgano)

Tabla con el valor medio, desviación y grado significación estadística.

	VIABLES	NO-VIABLES	p
B	0.28+/-0.09	0.27+/- 0.08	0.7
IB	0.19+/- 0.05	0.29+/- 0.23	0.3
FC	0.23+/- 0.04	0.42+/- 0.21	0.06
PR	0.22+/- 0.1	0.21+/- 0.05	0.7
1R	0.31+/- 0.1	0.22+/- 0.06	0.03

8.11. NIVEL DE ATP SEGÚN VIABILIDAD.

En la siguiente figura y tabla reflejamos los valores de ATP en cada momento del trasplante, según la viabilidad. No existen diferencias estadísticamente significativas al comparar riñones viables y no viables.

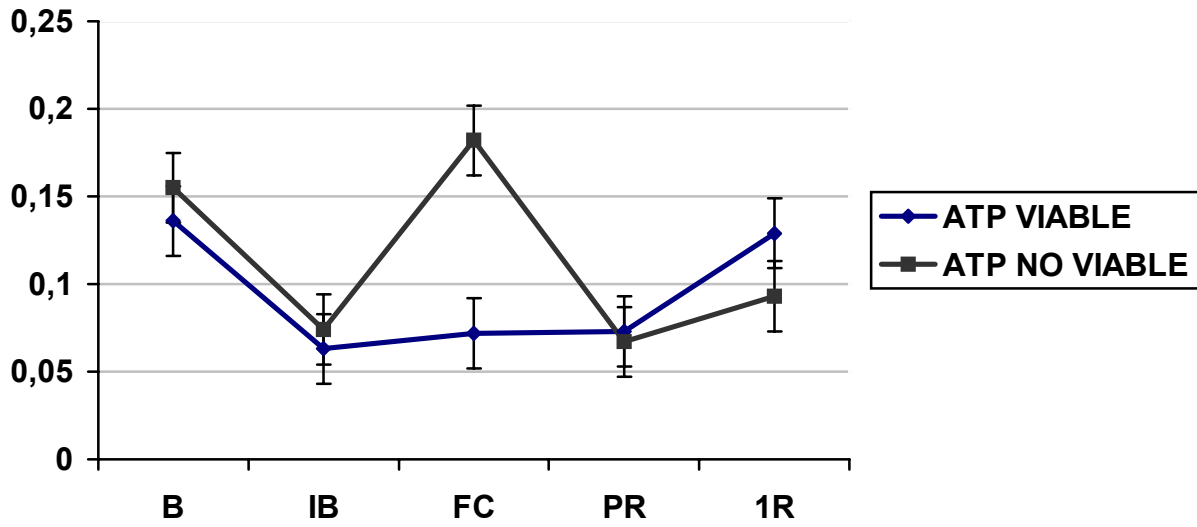


Figura: nivel de ATP ; B (momento basal); IB(inicio de recirculación); FC (final de la recirculación); PR (final de la isquemia fría); 1R (transcurrida una hora de reperfundido el órgano)

Tabla con el valor medio, desviación y grado significación estadística.

	VIABLES	NO-VIABLES	p
B	0.13+/- 0.05	0.15+/- 0.05	0.5
IB	0.06+7- 0.01	0.07+/- 0.03	0.1
FC	0.07+/- 0.02	0.18+/- 0.19	0.4
PR	0.07+/- 0.04	0.06+/- 0.03	0.6
1R	0.12+/- 0.06	0.09+/- 0.04	0.1

8.12. NIVEL DE HIPOXANTINA Y XANTINA SEGÚN VIABILIDAD.

Durante la isquemia se degrada el ATP dando como producto final hipoxantina que gracias a la acción de la enzima xantinoxidasa se transformará en xantina.

8.12.1. Hipoxantina.

En la siguiente figura y tabla reflejamos los valores de hipoxantina en cada momento del estudio. Estadísticamente no hallamos diferencias significativas entre riñones viables y no-viables. Todos los órganos aumentan la concentración de hipoxantina durante la isquemia caliente y fría, disminuyendo la producción con la recirculación y con la reperfusión.

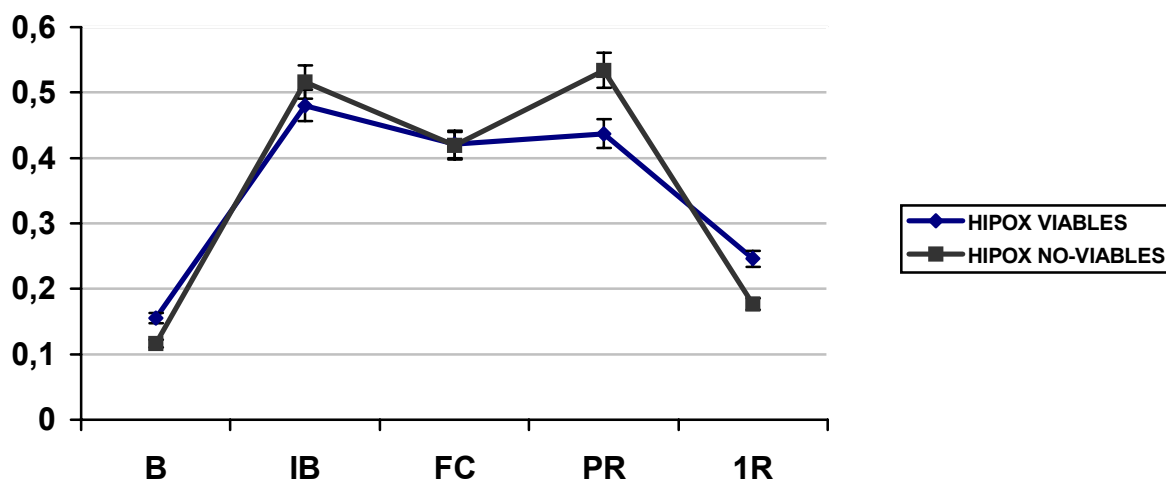


Figura: nivel de hipoxantina ; B (momento basal); IB(inicio de recirculación); FC (final de la recirculación); PR (final de la isquemia fría); 1R (transcurrida una hora de reperfundido el órgano)

Tabla con el valor medio, desviación y grado significación estadística.

	VIABLES	NO-VIABLES	p
B	0.13+/- 0.14	0.11+/- 0.09	0.6
IB	0.48+/- 0.13	0.51+/- 0.12	0.5
FC	0.42+/- 0.15	0.41+/- 0.19	0.9
PR	0.43+/- 0.15	0.53+/- 0.14	0.1
1R	0.24+/- 0.19	0.17+/- 0.12	0.6

8.12.2. Xantina.

La siguiente figura y tabla reflejan los niveles de xantina a nivel tisular en los diferentes momentos del estudio. No hallamos diferencias estadísticamente significativas entre riñones viables y no viables. Recordemos que la xantina se produce con la entrada de oxígeno. El órgano viable tiende a mantener la concentración durante la isquemia fría y con la recirculación, y por tanto entrada de oxígeno, tiende a aumentar la concentración que tiende a disminuir con la isquemia fría y tiende a aumentar con la entrada de oxígeno durante la reperfusión. El no-viable ya tiende a producir xantina en la isquemia caliente, que disminuirá con la isquemia fría y tenderá a producir xantina con la reperfusión.

RESULTADOS

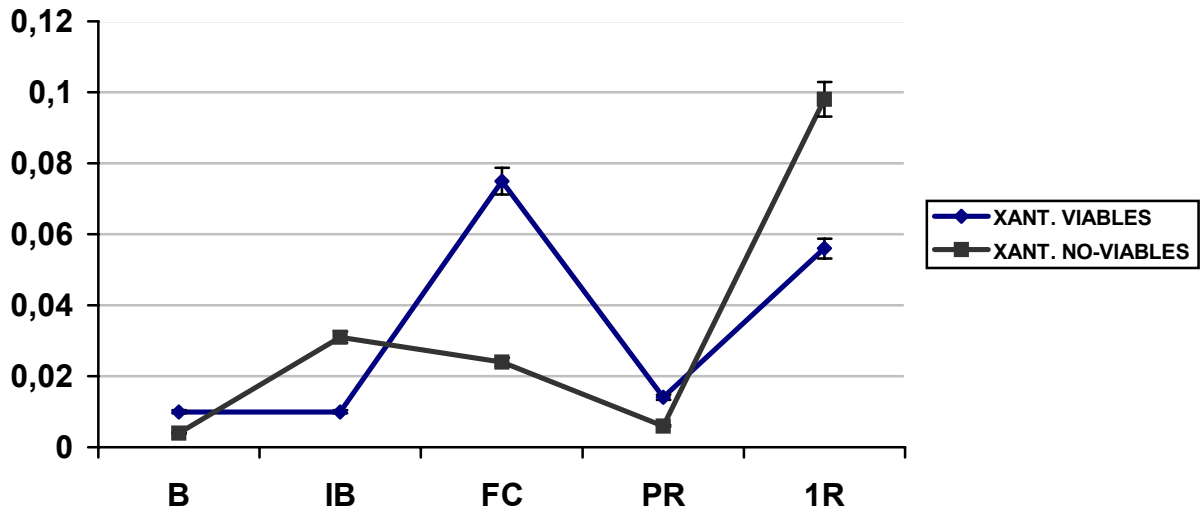


Figura: nivel de hipoxantina ; B (momento basal); IB(inicio de recirculación); FC (final de la recirculación); PR (final de la isquemia fría); 1R (transcurrida una hora de reperfundido el órgano)

Tabla con el valor medio, desviación y grado significación estadística

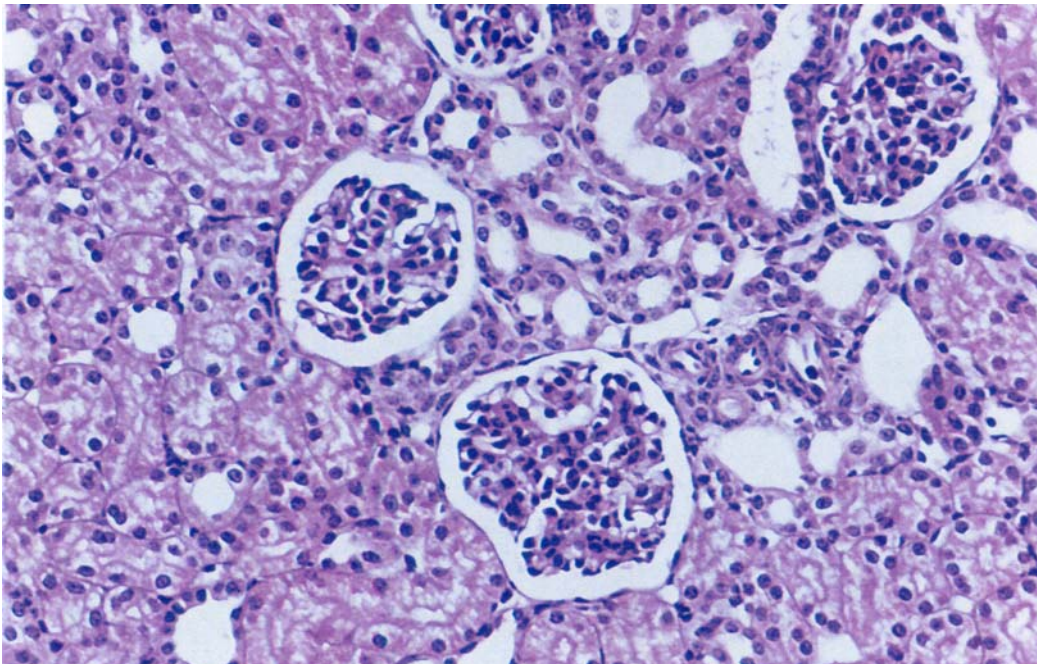
	VIABLES	NO-VIABLES	p
B	0.01+/- 0.03	0.004+/- 0.004	0.6
IB	0.01+/- 0.01	0.03+/-0.07	0.7
FC	0.07+/-0.08	0.02+/- 0.03	0.1
PR	0.07+/- 0.02	0.006+/-0.006	0.7
1R	0.05+/- 0.11	0.09+/-0.16	0.5

8.13. ESTUDIO HISTOLÓGICO

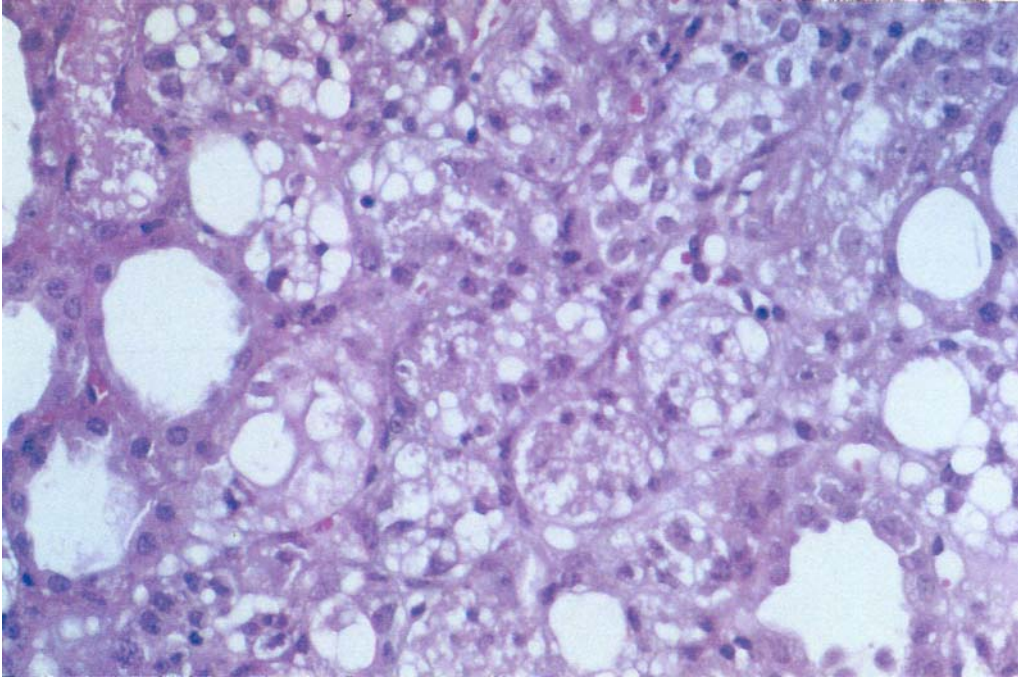
8.13.1. MUESTRAS INTRAOPERATORIAS.

Los cambios observados en las muestras intraoperatorias no fueron destacables. Tan sólo se objetivaron fenómenos de vacuolización en el citoplasma y edema celular en algunas muestras al final del periodo de isquemia fría que se consideran lesiones reversibles.

Se ha de realizar el diagnóstico diferencial entre la vacuolización secundaria a la isquemia, con la que se produce durante el procesamiento histológico habitual de las muestras.



A.P.Hematoxilina-eosina 200 x. Histología normal. Glomérulos y túbulos conservados.

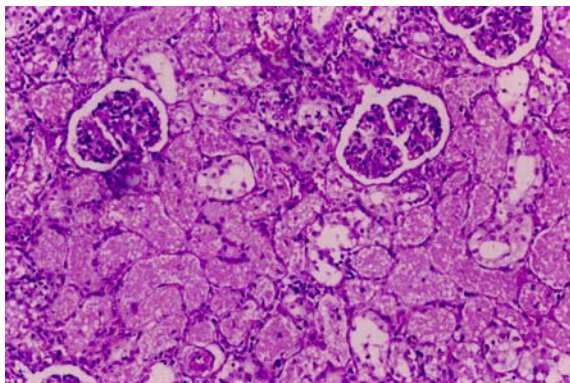


A.P. hematoxilina-eosina 400x. Vacuolización y edema tubular.

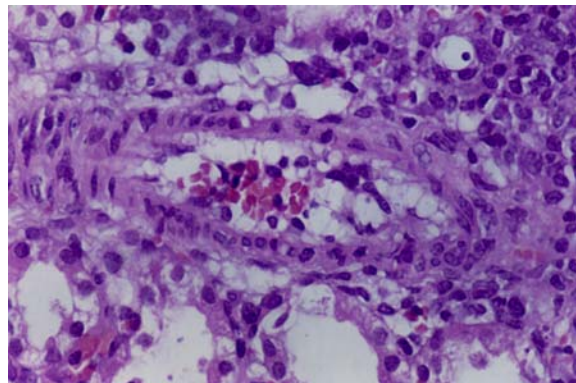
8.13.2. MUESTRAS AL 5º DÍA POSTOPERATORIO.

8.13.2.1. Grupo control.

No se observaron cambios de necrosis cortical en ninguno de los animales del grupo. El 50% presentó Necrosis Tubular Aguda leve y en 3 casos (30%) encontramos cambios característicos de rechazo vascular.



NTA. HE x 200



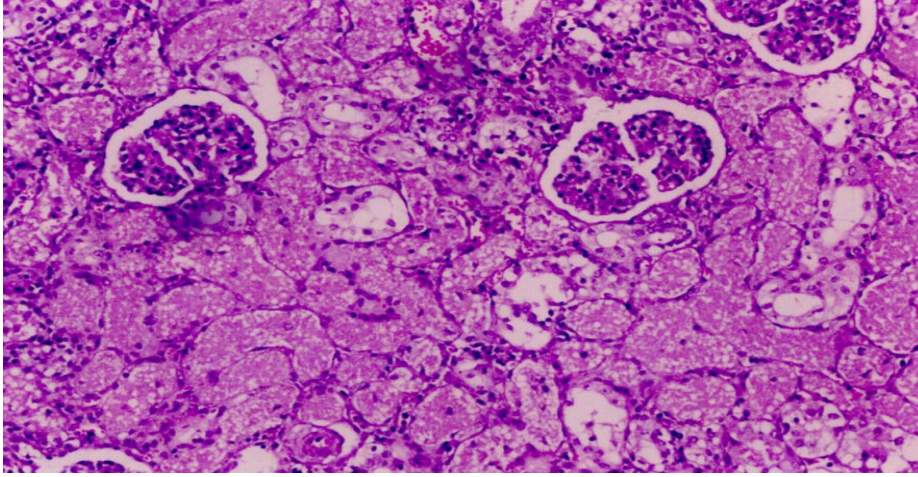
Rechazo vascular leve. HE x 200

8.13.2.2. Grupo 1

En el grupo 1 (riñones con 40 minutos de isquemia caliente sin recirculación extracorpórea) observamos 3 casos de Necrosis cortical, 3 de necrosis tubular aguda (NTA) leve y cuatro sin alteraciones.

8.13.2.3. Grupo 2

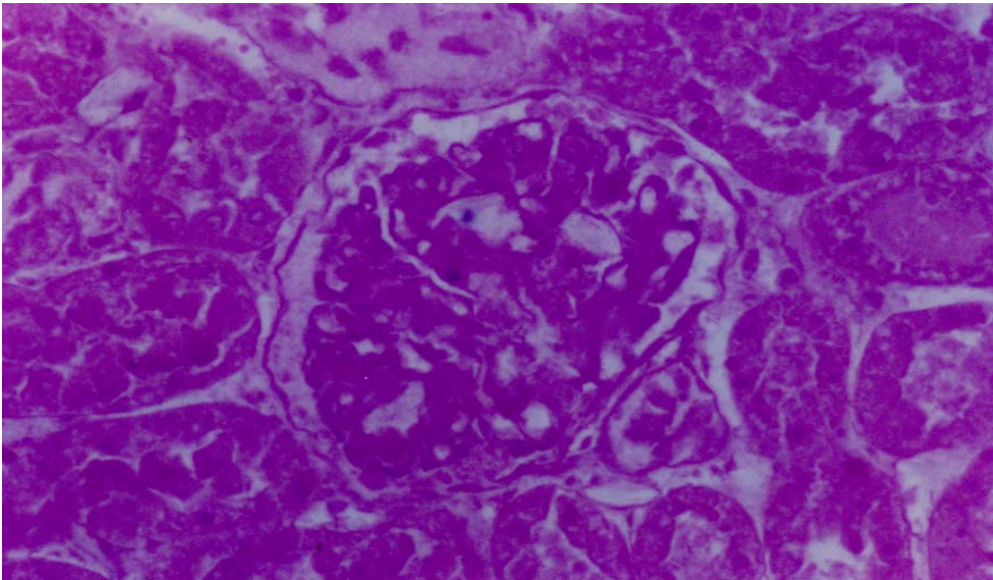
En el grupo 2 (riñones con 40 minutos de isquemia caliente sin recirculación extracorpórea) observamos 5 casos de necrosis tubular aguda (NTA) leve, sinningún caso de necrosis cortical, y el resto de biopsias sin alteraciones.



A.P. Hematoxilina-eosina 200x. NECROSIS TUBULAR AGUDA

8.13.2.4. Grupo 3

En el grupo 3 (riñones con 90 minutos de isquemia caliente y recirculación extracorpórea) observamos 4 casos de Necrosis cortical severa y 6 casos de necrosis tubular aguda leve-moderada.



A.P. Hematoxilina-eosina 400x. NECROSIS CORTICAL

RESUMEN HISTOLÓGICO

GRUPO	Histología normal	NTA	Necrosis cortical
GO	5	5	0
G1	4	3	3
G2	5	5	0
G3	0	6	4

8. DISCUSIÓN

La falta de órganos para trasplante ha hecho necesario buscar nuevas fuentes de riñones catalogados como subóptimos, entre ellos riñones procedentes de donantes a corazón parado. Se calcula que de esta forma podríamos aumentar un 20% el número de donantes potenciales.

Una de las mayores dificultades que observamos al trabajar con donantes a corazón parado (NHBD) es poder discernir entre órganos viables y no-viables.

La base fisiológica de este daño renal es el sufrimiento por parte del órgano del fenómeno conocido como síndrome de isquemia-reperfusión. El daño producido por la isquemia-reperfusión en los donantes a corazón parado es mayor al existir una fase de isquemia caliente. Esta lesión repercutirá en una mayor afectación de la viabilidad.

Hablar de síndrome de isquemia-reperfusión lleva implicado hablar de los radicales libres de oxígeno y de los antioxidantes. Estos son los *actores* que protagonizan a nivel celular los cambios de la isquemia-reperfusión. La entrada de oxígeno (O_2) trae consigo la formación de RLO. Una vez entren en escena, la célula utilizará sus antioxidantes para bloquearlos

El interés de este trabajo reside en detallar los cambios que se producen en los niveles de antioxidantes en el injerto renal desde su extracción hasta su perfusión en el receptor.

Solo conociendo el proceso desde su inicio podremos entender los resultados que obtengamos en estos órganos y de esta forma intentar predecir la viabilidad del mismo.

El conocimiento de los antioxidantes es de desarrollo reciente, con una serie de avances que enumeraremos a continuación.

En 1969 McCord¹⁹³ describe la SOD y en 1982 se descubre la glutathion peroxidasa en plasma e intestino. La forma clásica de GP fue descubierta en 1957. En 1981, Granger, Rutili y McCord⁷⁷ publican la hipótesis de la producción de RLO a través de la activación de la Xantina Oxidasa. En 1985, Baker²²² realiza la primera publicación sobre el daño producido por RLO. En 1987, Shoskes²²³ determina en hígado con isquemia fría de 8-12h y en riñones tras 15 minutos de isquemia caliente la actividad de SOD y de XOD. Realiza determinaciones puntuales, sin analizar cambios evolutivos. En 1992, Alcaraz y col.²²⁴ demuestran el efecto beneficioso de los antioxidantes exógenos al bloquear los RLO en el trasplante experimental con ratas. Encontramos múltiples estudios que aplicando el principio del síndrome de isquemia-reperfusión administran antioxidantes en la fase de reperfusión mejorando la viabilidad del injerto^{225,226,227,228,229,230,231}. , Hauet²³² publica en el 2000 la utilidad de administrar polietileno-glicol (PEG 20M) en las soluciones de preservación, es decir, en el periodo de isquemia fría, demostrando que esto disminuye la inflamación celular. En el 2002, Treska²³³ publica un trabajo en cerdos demostrando que la administración de selenio en la reperfusión mejora

la viabilidad del riñón (recordemos que la glutatión peroxidasa es una selenio-proteína).

Un año más tarde, en el 2003, de nuevo Treska²³⁴ actualiza su estudio experimental en cerdos administrando selenio en la solución de reperfusión, midiendo la concentración de malondialdehído a nivel vena renal en los tiempos 0 y 120 minutos una vez realizado el trasplante. El malondialdehído es un indicador de radicales libres de oxígeno, y con la administración de selenio se produce una disminución de su concentración. En el 2003 Sekhon²³⁵ realiza un experimento utilizando perros, sometiendo a uno de los dos riñones a isquemia caliente de 90 minutos, y entonces los divide en dos grupos, uno solo con isquemia y otro con isquemia y triple tratamiento con N-actil-cisteína (un potente antioxidante), sodio-nitropuside (SNP es un donante de óxido nítrico) y el enzima inhibidor del convertidor de endotelina-1, obteniendo mejoría de la bioquímica renal (creatinina, BUN) y menor inflamación histológica en los riñones tratados.

Consideramos que nuestra investigación es novedosa al realizar un seguimiento estricto de los antioxidantes en las diferentes fases del trasplante. Hemos podido demostrar el patrón de los antioxidantes en la fase de isquemia caliente, en la fase de recirculación, en la fase de isquemia fría y en la de reperfusión, y utilizando tiempos progresivos de isquemia caliente (40 y 90 minutos), y conocer la utilidad de la recirculación extracorpórea normotérmica durante 30 minutos previa a la extracción. Todos los trabajos recientes van directamente a la utilización de drogas exógenas para disminuir el daño.

Nosotros hemos creído necesario conocer con exactitud la evolución de los antioxidantes en cada fase, ya que dicho conocimiento es imprescindible para poder conocer en que momento es más apropiado administrar dichas drogas.

No existe en la literatura médica un solo trabajo que reproduzca totalmente las diferentes fases de un trasplante renal con donante a corazón parado, recogiendo muestras sanguínea e histológicas al inicio y final de cada una de las fases, y aplicando diferentes tiempos de isquemia caliente prologanda y añada el fenómeno de la recirculación para demostrar si esto mejora la viabilidad el órgano. No tan solo se realiza un trabajo observacional, analizando los niveles de antioxidantes en cada momento, sino que buscamos la utilidad de los antioxidantes como marcadores de viabilidad.

En la presente tesis se ha diseñado un modelo experimental y no clínico. De esta manera se tiene un control estricto de todas las variables que intervienen. Se ha escogido un animal grande de experimentación, como es el cerdo, con el fin de guardar la máxima similitud con el humano. Se ha reproducido el síndrome de isquemia-reperfusión realizando verdaderamente un trasplante renal heterotópico. Hemos elegido el modelo de trasplante con donante a corazón parado con el objetivo de acentuar el síndrome de isquemia-reperfusión. Hemos utilizado diferentes tiempos de isquemia caliente (parada cardíaca) predeterminados. Todo ello nos permitirá reproducir con la máxima similitud posible la situación clínica que se daría en el humano.

Se ha determinado en el injerto renal el nivel tisular de los siguientes antioxidantes, en las diferentes etapas de un trasplante, **Superóxido dismutasa (SOD) ,Glutation peroxidasa (GP) y Glutation reductasa (GR).**

El presente trabajo basa sus resultados en el estudio histológico que determinará la presencia de necrosis cortical, que vendrá dada por la presencia de glomérulos inviábiles en las muestras. La existencia de esta lesión hará que el órgano se considere como un trasplante no viable. También se analizaron las biopsias según el criterio de Banff²⁰⁰ para establecer grados menores de lesión renal.

Los riñones con 40 minutos de isquemia caliente presentaban necrosis cortical en un 17,6% (3/17) de los trasplantes, mientras que en los riñones con isquemia caliente de 90 minutos se detectó un 40% de necrosis cortical (4/10) en los trasplantes.

En el presente estudio hemos realizado una serie de observaciones que consideramos de interés.

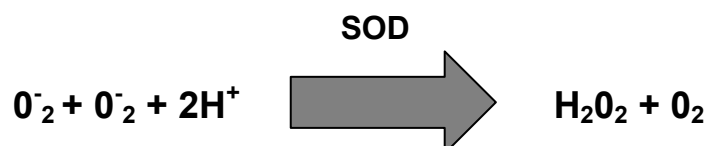
El tiempo de isquemia caliente influyó en la supervivencia del animal. Así los animales controles y los trasplantados con riñones con isquemia caliente de 40 minutos con recirculación sobrevivieron el 100%, y un 90% en los de 40 minutos sin recirculación . Los animales con riñones de 90 minutos de isquemia sobrevivieron un 60%.

Con respecto a la viabilidad del órgano se ha objetivado que los órganos viables habían estado sometidos a un tiempo de isquemia caliente medio de 36,29 minutos y los no-viables de 68,57 minutos. Por grupos: el grupo de 90 minutos de isquemia caliente un 60% viables; grupo de 40 minutos con

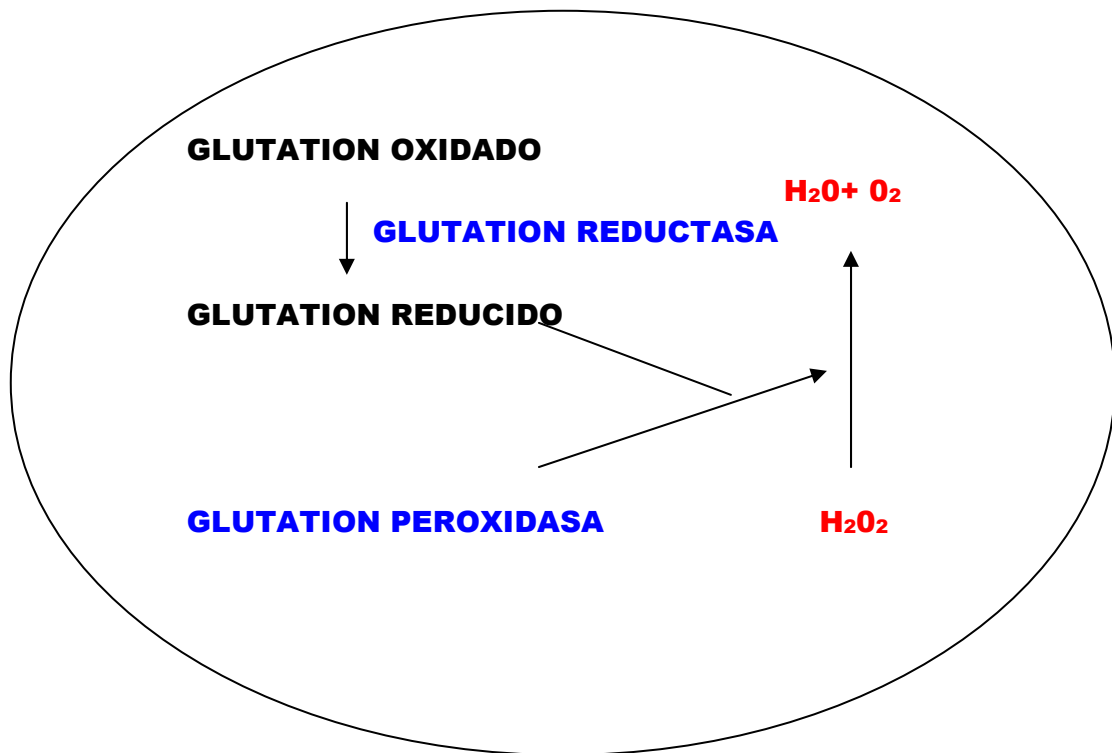
recirculación 100 % viables y en el grupo de 40 minutos sin recirculación 66,6% viables.

Antes de analizar los resultados obtenidos con los diferentes antioxidantes es importante recordar la acción sobre los radicales libres de cada uno de los antioxidantes analizados.

La SOD actúa directamente sobre dos aniones superóxido como indica la siguiente reacción,



La glutatión reductasa y la glutatión peroxidasa están interrelacionadas (efecto “pivote”). La glutatión reductasa reduce el glutatión, substrato necesario para que pueda actuar la glutatión peroxidasa y poder así metabolizar el peróxido de hidrógeno, según .



La primera observación que realizamos fue ver como se modifica la concentración tisular de cada antioxidante en los diferentes momentos de la preservación y trasplante, es decir seguir el papel que desarrollan los antioxidantes en las diferentes fases que comprende el síndrome de isquemia-reperfusión .

Al analizar la SOD, esta sigue el patrón esperado: con la isquemia caliente se consume, mientras que en la fase de recirculación se recupera. Globalmente se produce una recuperación tras la recirculación del órgano, debido al efecto positivo de la recirculación sobre la síntesis de SOD, que supera al consumo que se inducirá por la liberación de radicales libres durante esta fase.

Probablemente este fenómeno de lesión por isquemia-reperfusión y liberación de RLO es el que induce el consumo de SOD durante la siguiente fase de isquemia fría. Tras una hora de reperfundir el injerto la concentración de SOD vuelve a aumentar (recordemos que en esta fase tanto el injerto como el huésped pueden aportar la SOD). **El consumo de SOD que se produce durante la isquemia fría y el aumento durante la fase de reperfusión son cambios estadísticamente significativos respecto a una línea basal de cero .**

La glutathion reductasa, cuyo papel es reducir el glutathion, se acumula durante la isquemia caliente e inicia su consumo durante la fase de recirculación, que prosigue durante la isquemia fría para recuperarse tras una hora de reperfusión. La glutathion peroxidasa inicia ya su consumo en la isquemia caliente, consumiendo a su vez glutathion, prosigue su consumo en la fase de recirculación y en la isquemia fría la glutathion peroxidasa aumente levemente, En la fase de reperfusión ambas se recuperan.

La glutathion reductasa se consume durante la isquemia fría de forma significativa respecto a una línea basal cero, mientras que la glutathion peroxidasa tiende a consumirse de forma intensa durante la recirculación extracorpórea.

Analizado el patrón que sigue cada antioxidante, y que fases son las más interesantes, la siguiente pregunta que debíamos intentar responder era la actuación de cada antioxidante en relación a la intensidad de la lesión

isquémica, es decir, diferenciando según el tiempo de isquemia aplicado: 40 ó 90 minutos de isquemia caliente.

La SOD sigue un mismo patrón en ambos grupos, la única diferencia radica en que en el **grupo de 90 minutos los cambios no son tan homogéneos obteniendo sólo un dato estadísticamente significativo al analizar el consumo durante la isquemia fría .**

En cambio en el **grupo de 40 minutos obtenemos dos datos estadísticamente significativos, el consumo durante la isquemia fría y aumento durante la reperfusión, y un dato de elevada tendencia a la significación estadística como es el consumo durante la isquemia caliente.**

La glutathion reductasa durante la isquemia caliente se acumula. Al ser el tiempo de isquemia caliente mayor (de 40 a 90 minutos) sugiere que en el grupo de 90 minutos se consume más glutathion reducido. De ahí que la glutathion reductasa se empieza a consumir durante la recirculación, mientras que en el grupo de 40 minutos se sigue acumulando durante la recirculación. En el resto de fases siguen el mismo patrón. **De los datos obtenidos tan sólo alcanzó la significación estadística el consumo de Glutathion Reductasa durante la recirculación en el grupo de 90 minutos.**

Respecto a la glutathion peroxidasa sigue el mismo patrón en ambos grupos salvo en la fase de reperfusión. Existe consumo, más importante en el de 90 durante la isquemia caliente. Se consume durante la recirculación en ambos y leve recuperación durante la isquemia fría. En la fase de reperfusión en el grupo de 40 minutos de isquemia caliente aún se consume, mientras que

en el de 90 minutos aumenta (el riñón de 90 minutos de isquemia caliente se comporta como si fuera más lenta su capacidad de reacción).

En resumen, hemos seguido de forma experimental los cambios que sufren los antioxidantes en cada fase del síndrome isquemia-reperfusión, primero de forma global y posteriormente analizando el grupo de 40 minutos de isquemia caliente y el de 90 minutos, mostrando por primera vez los patrones de actuación de estas sustancias. Los antioxidantes siguen un patrón definido que nos permitirá utilizar dichas sustancias para predecir la viabilidad. Por tanto la siguiente cuestión que nos planteamos, siguiendo el guión establecido en nuestros objetivos, era ver si los antioxidantes podían predecir la viabilidad.

El primer análisis que realizamos fue determinar a nivel global (incluyendo todos los grupos) el nivel tisular puntual en los diferentes momentos del experimento comparando riñones viables y no viables, y el resultado fue que **la determinación en un momento puntual de SOD, glutathion reductasa y glutathion peroxidasa comparando los riñones viables y no-viables no permiten predecir la viabilidad.**

Sin embargo, al analizar los valores puntuales exclusivamente en los grupos que tenían riñones viables y no-viables, 40 minutos sin recirculación y 90 minutos con recirculación, sí que obtuvimos resultados de interés.

En los riñones de 40 minutos sin recirculación si determinamos la concentración de glutathion reductasa al finalizar el periodo de isquemia caliente (IB) podemos conocer la viabilidad del injerto. Este dato es de

especial interés práctico ya que la viabilidad la podríamos conocer en el momento de la extracción del órgano o previo al trasplante.

En el grupo de **90 minutos de isquemia caliente con recirculación extracorpórea, la determinación de la glutatión peroxidasa tras una hora de haberse reperfundido el injerto (1R) permitiría conocer la viabilidad.**

Por tanto, hemos analizado la concentración puntual de un antioxidante a nivel global (donde no hemos obtenido ningún dato significativo) y posteriormente analizamos la concentración puntual de antioxidantes conociendo el tiempo de isquemia caliente (40 ó 90 minutos).

El siguiente análisis debía ser analizar los incrementos o decrementos (consumos) en cada fase comparando órganos viables y no-viables. Analizamos los resultados en riñones con 40 minutos de isquemia caliente sin recirculación y 90 minutos con recirculación. No lo hicimos en el grupo control y el de 40 minutos de isquemia caliente con recirculación porque en estos grupos todos los riñones fueron viables.

En el grupo de 40 minutos sin recirculación a nivel de los cambios de SOD entre riñones viables y no-viables no hallamos diferencias significativas, pero si algún dato de interés. Durante la isquemia caliente ambos se consumen, pero durante la isquemia fría el riñón viable recupera niveles y el no viable tiende a consumirlos, de tal forma que llegarán a la hora del implante con menos nivel de SOD los riñones no-viables. Respecto a la glutatión reductasa sí que hallamos diferencias significativas, de tal forma **que la determinación del incremento o decremento de glutatión reductasa durante la isquemia caliente predice la viabilidad. El riñón viable consume y el no viable**

acumula; y durante la fase de isquemia fría, donde el riñón viable acumula y el no-viable consume de forma importante. La glutathion peroxidasa no presenta diferencias estadísticamente significativas, pero al igual que la glutathion reductasa, los riñones viables y no-viables presentan un patrón opuesto.

En el grupo de 90 minutos de isquemia caliente y recirculación extracorpórea, a nivel de los cambios de concentración de SOD detectamos una elevada tendencia al acúmulo de SOD tras un hora de reperfusión en el no viable ($p < 0,09$). Respecto a la **glutathion reductasa, puede predecir la viabilidad del riñón en la fase de isquemia fría donde el viable acumula y el no-viable consume y durante la fase de reperfusión donde el viable consume y el no-viable acumula.**

La glutathion peroxidasa presenta diferencias estadísticamente significativas en la fase de reperfusión donde el riñón viable consume y el no-viable acumula glutathion, por tanto podemos afirmar que la glutathion peroxidasa predice la viabilidad del riñón en la fase de reperfusión.

Creímos de interés analizar los cambios que sufre cada antioxidante según el tiempo de isquemia aplicado, diferenciando el riñón sometido a 40 minutos de isquemia respecto al de 90 minutos, en un intento de conocer el tiempo de isquemia caliente de un órgano a partir de los niveles de antioxidantes. Se ha determinado el incremento o decremento de cada antioxidante en las diferentes fases.

La SOD y la glutathion peroxidasa no muestran diferencias significativas, aunque el patrón de evaluación es diferente según el tiempo de isquemia caliente. La glutathion reductasa, en la fase de recirculación presenta diferencias estadísticamente significativas, entre el riñón de 40 minutos-que acumula glutathion- y el de 90 minutos-que consume-.

Por tanto, **la determinación de los cambios de glutathion reductasa durante la fase de recirculación están en relación a la intensidad de la lesión isquémica.**

Por último, nos interesó conocer el efecto de la recirculación extracorpórea en los niveles de los antioxidantes, dado que la recirculación ha demostrado aumentar la viabilidad del órgano con una lesión isquémica grave.

Teniendo un grupo de 40 minutos de isquemia caliente con recirculación y otro sin, podemos compararlos según la concentración de cada antioxidante en los diferentes momentos del experimento. La SOD en el momento de finalizar la isquemia fría presenta más concentración en el riñón que ha tenido recirculación, es decir llega al momento del implante con mejor capacidad antioxidante. Por tanto **la recirculación aumenta la concentración de SOD a final del periodo de isquemia fría** . La glutathion reductasa y peroxidasa no muestran diferencias significativas.

Por último y de forma complementaria analizamos, a nivel tisular la carga energética, el ATP, la xantina y la hipoxantina en los diferentes momentos del experimento, a igual que hemos hecho con los antioxidantes. Hemos comparado el nivel puntual en cada momento de estos cuatro parámetros, comparando riñón viable y no-viable. La concentración puntual de ATP, xantina

e hipoxantina no permite predecir la viabilidad, ya que no hallamos diferencias significativas entre riñones viables y no-viables.

La carga energética predice la viabilidad del riñón tras una hora de reperfusión (1R), teniendo mayor carga energética el órgano viable.

10. CONCLUSIONES

En este estudio experimental de trasplante renal de donante a corazón parado hemos hecho hincapié en:

- I- La supervivencia del animal trasplantado agrupados según el tiempo de isquemia caliente al que se había sometido el riñón. Se utiliza grupo control (donante a corazón latiente).
- II- La viabilidad del riñón al quinto día del trasplante en relación con el efecto de la isquemia.
- III- Efecto sobre los antioxidantes, en su valor absoluto y en sus variaciones, en las diferentes fases del trasplante: isquemia caliente, recirculación, isquemia fría y reperfusión. Se analizan también los cambios en la carga energética y el catabolismo del ATP, y los cambios histológicos.

A partir de los resultados obtenidos podemos concluir:

1- El tiempo de isquemia caliente influye en la supervivencia de los animales. Los animales controles y los de trasplante renal tras 40 minutos de isquemia caliente con recirculación sobrevivieron el 100%, y un 90% en los de 40 minutos de isquemia caliente sin recirculación. En el grupo de 90 minutos de isquemia caliente se objetivo un 60% de supervivencia.

2- La recirculación extracorpórea durante 30 minutos tiene influencias sobre la viabilidad del órgano. La viabilidad del grupo de 40 minutos de isquemia caliente con recirculación fue del 100%, mientras que la del grupo de 40 minutos sin recirculación fue de 66,6% .La viabilidad del grupo de 90 minutos con recirculación fue del 60%.

Hemos obtenido patrones de actuación de cada uno de los antioxidantes de forma global y por grupos (Conclusiones 3-4-5),

3- Hemos determinado patrones de actuación de los antioxidantes durante el síndrome de isquemia-reperfusión. La SOD se consume durante la fase de isquemia fría ($p < 0,09$) y aumenta durante la reperfusión ($p < 0,02$).

La glutathion reductasa se consume durante la fase de isquemia fría ($p < 0,04$).

4- La SOD se consume durante la fase de isquemia fría ($p < 0,04$) y aumenta con la reperfusión ($p < 0,03$) en los riñones sometidos a 40 minutos de isquemia caliente.

5- La SOD se consume durante la isquemia fría ($p < 0,04$) y la glutathion reductasa durante la recirculación extracorpórea ($p < 0,01$) en los riñones sometidos a 90 minutos de isquemia caliente.

La capacidad de los antioxidantes de predecir la viabilidad del riñón (conclusiones desde la 6-11),

6- Determinar el nivel tisular puntual de SOD, glutatión reductasa y glutatión reductasa no predice la viabilidad del riñón sin conocer el tiempo de isquemia caliente aplicado.

7- La determinación del incremento o decremento de glutatión reductasa durante el periodo de isquemia caliente ($p < 0,05$) y durante la fase de isquemia fría ($p < 0,009$) predice la viabilidad del injerto renal en riñones sometidos a 40 minutos de isquemia caliente.

8- La determinación de incremento o decremento de la glutatión reductasa en la fase de isquemia fría ($p < 0.03$) y en la fase de reperfusión ($p < 0.03$) predice la viabilidad en los riñones sometidos a 90 minutos de isquemia caliente y recirculación.

9- La determinación de incremento o decremento de la glutatión peroxidasa en la fase de reperfusión predice la viabilidad ($p < 0,03$) en riñones sometidos a 90 minutos de isquemia caliente y recirculación.

10-Determinar la concentración tisular de glutathion reductasa al finalizar el periodo de isquemia caliente predice la viabilidad ($p < 0.03$) en el grupo de riñones sometidos a 40 minutos de isquemia caliente sin recirculación.

11- Determinar la concentración tisular de glutathion reductasa al finalizar el periodo de reperfusión predice la viabilidad ($p < 0.03$) en el grupo de riñones sometidos a 90 minutos de isquemia caliente y recirculación.

12-La **carga energética**, según la fórmula de Atkinson, determinada tras una hora de reperfusión predice la viabilidad ($p < 0,03$). No ha resultado útil la medición de la concentración de ATP, xantina e hipoxantina para predecir la viabilidad.

Por tanto respecto a los Antioxidantes como marcadores de viabilidad podemos concluir:

I- Si no conocemos el tiempo de isquemia caliente no es útil determinar los niveles de antioxidantes, pero sí lo es determinar la carga energética tras una hora de haberse reperfundido el injerto renal.

II- En riñones con 40 minutos de isquemia caliente sí es de utilidad determinar los cambios de glutathion reductasa durante la fase de isquemia caliente y la de isquemia fría.

III- En riñones con 40 minutos de isquemia caliente la determinación puntual del nivel tisular de glutathion reductasa al finalizar la isquemia caliente predice la viabilidad del riñón.

IV- En riñones con 90 minutos de isquemia caliente la determinación puntual del nivel tisular de glutathion reductasa al finalizar el periodo de reperfusión predice la viabilidad del riñón

V- En riñones con 90 minutos de isquemia caliente determinar los cambios de glutathion reductasa en la fase de isquemia fría y en la de reperfusión, y determinar los cambios de glutathion peroxidasa en la fase de reperfusión renal es útil para predecir la viabilidad.

La capacidad de determinar el tiempo de isquemia caliente que ha sufrido el riñón (conclusión 13),

13- La determinación del incremento o decremento de la glutathion reductasa durante la fase de recirculación permite conocer si el tiempo de isquemia caliente fue de 40 ó de 90 minutos. ($p < 0,05$).

El efecto de la recirculación extracorpórea durante 30 minutos sobre el nivel de antioxidantes,

14- La recirculación tiene un efecto beneficioso sobre la concentración de SOD al final del periodo de isquemia fría, donde el nivel de SOD es más elevado en el riñón con recirculación ($p < 0,05$).

1. Talbot R, Carretero P. "Manual de cirugía del trasplante renal". 1995. Pág 1-17. Editorial médica Panamericana.
2. Küss R, Bourget P. "Una historia ilustrada del trasplante de órganos". La gran aventura del siglo. 1992. **Laboratorios Sandoz**
3. Montañes P, Sánchez E, Torrubia F.J. "Historia del trasplante renal". Tema monográfico del LVII Congreso Nacional de Urología". **Complicaciones quirúrgicas del Trasplante renal**. Capítulo 1, pág 25-27.
4. Organización Nacional de Trasplante. Actualización 24/1/2001. <http://www.ont.es>
5. Jaccobi L, McBride V, Etheredge e, et col. "The risk, benefits and costs of expanding donor criteria. A collaborative prospective three-years study". **Transplantation** 1995; 60: 1491-1496.
6. Alexander J, Vaughn W, Carey M. "The use of marginal donors for organ transplantation: the older and younger donors". **Transplant.Proc.** 1991; 23:905-909.
7. Grande L, González F, manlerola C, García- Valdecasas, et col. "Does donor age exclude liver grafting?". **Transplant. Proc** 1993; 25: 3153-3155.
8. Vroemen JPAM, Van der Vliet JA, and Kootstra G. "The emergence in-situ preservation of kidneys transplantation". **Neth J Surg** 1983; 35:50-60.
9. Kootstra G, Wijnen R, Van Hooff JP, and Van der Linden CJ: "Twenty percent more kidneys through a non-heart-beating program". **Transplant. Proc** 1991, 23:910-911
10. Statements and Recommendations on Non-Heart-Beating donors. **ETCO-Newsletter**. November, 1995; 13(2).

11. Kootstra G, Daemen JHC, and Oomen APA. "Categories of non-heart-beating donors" **Transplant Proc** 1995; 27:2893-2894.
12. Organización Nacional de Trasplantes. **Documento de Consenso Español**. Donación de órganos a corazón parado. Noviembre 1995.
13. Casavilla A, Ramírez R, Shapiro R, et col." Liver and kidney transplantation from non-heart-beating donors: The Pittsburgh experience". **Transplant Proc** 1995;27:710-712.
14. D'Alessandro A, Hoffmann R.M, Knechtle S.J, et col. "Successful extrarenal transplantation from non-heart-beating-donors" **Transplantation** 1995; 59: 977-982.
15. D'Alessandro A, Hoffmann R.M, Knechtle S.J, et col. "A controlled non-heart-beating-donors. A potencial source of extrarenal organs". **Transplant Proc** 1995; 27: 707-709.
16. Booster MH, Wijnen RMH, Ming Y, et col. "In situ perfusion of kidneys from non heart beating donors: The Maastrich Protocol". **Transplant Proc** 1993;25: 1503-1504.
17. Kozaki M, Matsuno N, Tamaki T, et col"Procurement of kidney grafts from non-heart-beating donors". **Transplant Proc** 1991; 23:2575-2578.
18. Rigotti P, Morpurgo E, Comandella MG, et col. "Non-heart-beating donors: an alternative organ source in kidney transpalntation". **Transplant Proc** 1991; 23: 2579-2580.
19. García-Rinaldi R, Lefrak EA, Defore WW, et col. "Insitu cold preservation of cadaver kidneys for transplantation: Laboratory observations and clinical aplication". **Ann Surg** 1975, 182(5):576-584.

20. Garvin PJ, Buttorff JD, Morgan R, et col. "in situ cold perfusion of kidneys for trasplantation". **Arch Surg** 1980, 115:180-182.
21. Schweizer RT, Sutphin BA, Bartus SA. "In situ cadaver kidney perfusion". **Transplantation** 1981, 32(6):482-484
22. Fujita T, Matsui M, Shinoda M, And Nadie Y. "Clinical application of in situ renal cooling: experience with 61 cardiac-arrest donors". **Transplant Proc** 1989, 21: 1215-1217.
23. Ruers TJM, Vroemen JPAM, Kootstra G. "Non-heart-beating donors. A successful contribution to organ procurement". **Transplant Proc** 1986; 408-410.
24. Kootstra G, Ruers TJM and Vroemen JPAM. "Non-heart-beating donors: contribution to the shortage". **Transplant Proc** 1986; 18(5):1410-1412.
25. Banowsky LH, Sullivan M, Moorehouse J, et col. "In mortuo renal perfusion for cadaver kidney preservation". **Investigate Urology** 1971; 9: 199-205.
26. Booster MH, Wijnen RMH, Vroemen JPAM, Van Hooff and Kootstra G. "In situ preservation of kidneys from non-heart-beating donors. A proposal for a standardized protocol". **Transplantation** 1993; 56: 613-617.
27. Vromen MAM, Leunissen KML, Persijn GG, and Kootstra G. "Short and long-term results with adult non-heart beating donors kidneys". **Transplant Proc** 1988; 20: 743-745.
28. Wijnen RMH, Booster MH, Stubenitsky BM, et col. "Outcome of transplantation of non-heart-beating donors kidneys". **Lancet** 1995; 345:1067-1070.

29. Kootstra G. "The asystolic, or non-heart-beating donors". **Transplantation** 1997; 63: 917-921.
30. Rowinski W, Walaszewski J, Jagiewska B, and Pacholczyk M. "Use of kidneys from marginal and non-heart-beating donors: warm ischemia per se is not the most detrimental factor". **Transplant proc** 1993; 25: 1511-1512.
31. Morpurgo E, Rigotti P and Ancona E. "Is warm ischemia the main limiting factor in the use of non-heart-beating donors in renal transplantation ". **Transplant Proc** 1993; 25:1509-1510.
32. Guillard G, Tat P, Hass O, et col." Renal harvesting after in situ cooling by intra aortic double-balloon catheter". **Transplant proc** 1993; 25: 1505-1506.
33. Rosental R, Stokan V, Bitsans J, et col. "Kidney harvesting from non-heart-beating donors: a surgical approach". **Transplant proc** 1991;23:2588.
34. Sakagami K, Takasu S, Kawamura T, et col. "A comparison of University of Wisconsin and Euro-collins' solutions for simple cold storage in non-heart-beating cadaveric kidney transplantation". **Transplantation** 1990; 49: 824-826.
35. Southard JH, Van Gulik TM, Amentani MS, et col. "Important components of the UW solution". **Transplantation** 1990; 49:251-257.
36. Alshaibani K, Nizamuddin N, Raza S, et col. "University of Wisconsin versus Euro.-Collins solution for kidney preservation: Analysis of clinical outcome". **Transplant Proc** 1998; 30:3681-3682.
37. Schlumpf R, Candinas D, Zollinger A, et col. "Kidney procurement from non-heart-beating donors: transplantation results". **Transplant Int** 1992, 5 (Suppl 1): 5424-5428.

38. Colpart JJ, Bret M, Tognet E, et col. "Viabilité à un des greffous rénaux prélevés après arrêt cardiaque irréversible". **ETCO Newsletter** 1991;9: 5-11.
39. Castelao AM, Griñó JM, González C, et col. "Update or our experience in long-term renal function of kidneys transplanted from non-heart-beating donors". **Transplant proc** 1993; 25: 1513-1515.
40. Alonso A, Buitron JG, Gómez M, et col. "Short and long term results with kidneys from non-heart-beating donors". **Transplant Proc** 1997; 29: 1378-1380.
41. Kinukawa T, Ohshima S, Fujita, et col. "Exploration of teh system for cadaver kidney transplantaion with the non-heart-beating donor: efficacy of in situ cooling and low-dose cyclosporine". **Transplant Proc** 1993; 25: 1524-1526.
42. Koffmann CG, Bewick M, Chang RWS, et col. "Comparative study of systolic and asystolic kidney donors between 1988 and 1991". **Transplant proc** 1993; 25: 1527-1529.
43. Valdés F, Pita S, Alonso A, et col " Comparative study of the use of sistolic and asystolic kidney donors between 1981-1995 in La Coruña, Spain". **Transplant proc** 1997; 29:3565-3566.
44. Hattori R, Kinukawa T, Ohshima S, et col. " Outcome of kidney transplantation from non-heart-beating donors: comparison with heart-beating donors". **Transplant Proc** 1992; 24:1455-1456.
45. Johnson HK, Skelley L, Warner H, et col. "Results following use of the Garcia-Lefrak double ballon catheter". **Transplant Proc** 1984; 16:122-125.
46. Heineman E, Daemen JHC, and Kootstra G. "Non-heart-beating donors. Methods and tecniques". **Transplant Proc** 1995; 27: 2895-2897.

47. Anaise D, Yland MJ, Waltzer WC, et col." A new perfusion tube for multiple organ procurement" **Transplant proc** 1987; 19: 4129-4136.
48. Anaise D, Yland MJ, Waltzer WC, et col. "Flush pressure requirements for optimal cadaveric donor kidney preservation". **Transplant Proc** 1988; 20: 891-894.
49. Lloveras J, Puig JM, Cerdà M, et col. "Newly developed four lumen catheter for in situ renal perfusion of non-heart-beating donors that provides perfusion pressure monitoring". **Transplant Proc** 1989; 21: 1211-1214.
50. Anaise D, Yland MJ, Ishimaru M, et col." Organ procurement from non-heart-beating cadaver donors". **Transplant proc** 1989, 21: 1211-1214.
51. Paprocki S, Kruk R, Erturk, et col. "A technique for successful transplantation of organs from non-heart-beating donors". **Transplantation** 1992; 54. 381-383.
52. Koyama I, Shinozuka N, Watanabe T, et col."Utilitation of kidneys from non-heart-beating donors by portable cardiopulmonary bypass". **Transplant Proc** 1997; 29. 3550-3551.
53. Henry ML."Pulsatile preservation in renal transplantation". **Transplant proc** 1997; 29: 3575-3576.
54. Matsuno N, Sakurai E, Uchiyama M, et col. "Use of in situ cooling and machine perfusion preservation for non-heart-beating donors". **Transplant proc** 1993; 25: 3095-3096.
55. Daemen JHC, De Vries B, Oomen APA, et col. "Effect of machine perfusion preservation on delayed graft function in non-heart-beating donors kidneys early results". **Transplant Int** 1997; 10: 317-322.

56. Booster MH, Wijnen RMH, Yin M, et col. "Enhanced resistance so the effects of normothermic ischemia in kidneys using pulsatile machine perfusion". **Transplant Proc** 1993; 25: 3006-3011.
57. Stubenitsky BM, Ametani M, Danielewicz R, et col. "Regeneration of ATP in kidney slices after warm ischemia and hypothermic preservation". **Transplant Int** 1995; 8: 293-297.
58. Maessen JG, Van der Vusse GJ; Vor M, and Kootstra G. "New approach to preservation of non-heart-beating donors: total body cooling". **Transplant Proc** 1987; 19: 4159-4161.
59. Baumgartner WA, Melville G, Fraser CD, et col. "Cardiopulmonary bypass with profound hypothermia". **Transplantation** 1989; 47: 123-127.
60. Koyama I, Taguchi Y, Watanabe T, et col. "Development of a reliable method for procurement of warm ischemic kidneys from non-heart- beating donors". **Transplant proc** 1992; 24: 1327-1328.
61. Alvarez J, Del Barrio R, Torrente J, et col. " Postransplant long-term outcome of kidneys obtained from asystolic donors maintained under extracorporeal cardiopulmonary bypass". **Transplant proc** 1995; 27: 2903-2905.
62. Valero R, Sánchez J, Cabrer C, et col. " Organ procurement from non-heart-beating donors throug in situ perfusion or total body cooling" . **Transplant Proc** 1995; 27: 2899-2900.
63. Hoshino T, Maley WR, Stump Kc, et col "Evaluation of core cooling tecnique for liver and kidney procurement". **Transplant proc** 1987; 19: 4123-4128.

64. Maessen JG, Van der Vusse GJ, Vork M, Kootstra G. "The beneficial effect of intermediate normothermic perfusion during cold storage of ischaemically injured kidneys". **Transplantation** 1989; 47: 409-414.
65. Mayfield KB, Ametani M, Southard JH, et col. "Mechanism of action of ex vivo blood reserve in six-day preserved kidney". *Transplant proc* 1987 ;19: 1367-1368.
66. Gaber o, Yang HC, Haag BW, et col: "Intermediate normothermic hemoperfusion doubles safe cold preservation of rat kidneys". **Transplant Proc** 1987: 19: 1369-1371.
67. Arias J, Alvarez J, Gómez M, et col. " Changes in adenine nucleotides and lipid hydroperoxides during normothermic cardiopulmonary bypass in a porcine model of tipe II NHBD". **Transplant Proc** 1997; 29: 3486-3487.
68. González X, García-Valdecasas JC, et col. "Adenin nucleotide liver tissue concentrations from Non-heart-beating donor pigs and organ viability after liver transplantation". **Transplant Proc** 1997; 29: 3480-3481.
69. Rijkmans BG, Buurman WA, and Kootstra G. "Six day canine kidney preservation". **Transplantation** 1984; 37:130-134.
70. García-Valdecasas JC, Tabet J, et col. " Liver conditioning after cardiac arrest: the use of normothermic recirculation in an experimental animal model". **Transplant Int** 1998: 11: 424-432.
71. Valero R, García-Valdecasas JC, Tabet J, et col. "Hepatic blood flow and oxygen extraction ratio during normothermic recirculation and total body cooling as viability predictors in non-heart-beating donor pig". **Transplantation** 1998; 66: 170-176.

72. Valero R, Cabrer C, Oppenheimer F, et col. "Normothermic recirculation reduces primary graft dysfunction of kidneys obtained from NHB donors" **Transplant Int** 2000; 13(4): 303-10.
73. Weight SC, Bell PR and Nicholson ML. "Renal ischemia-reperfusion injury". **Br J Sur** 1996; 83: 162-170.
74. Belzer F. "Principies of solid-organ preservation by cold storage". **Transplantation** 1988; 45:673-676.
75. Belzer F. "Principies of organ preservation". **Transplant Proc** 1988; 20: 925-927.
76. Mela L. "Mitochondrial function in shock, ischemia and hypoxia". **Pathophysiology of shock, anoxia and ischemia**. 1982: 84-94.
77. Granger DN, Rutili G, Mc Cord JM. "Superoxide radicals in feline intestinal ischemia" **Gastroenterology** 1981; 81: 22-29.
78. Nauta R, Tsimoyiannis E, Uribe M, et col. "The role of calcium ions and calcium channel entry blockers in experimental ischemia-reperfusion induced liver injury". **Ann Surg** 1991; 213: 137-142.
79. Mc Cord JM. "The superoxide free radical: its biochemistry and patophysiology". **Surgery** 1983; 94: 412-414.
80. Granger DN, Mc Cord JM, Parks DA, et col. "Xhantine oxidase inhibitors attenuate ischemia induced vascular permeability changes in the cat intestine". **Gastroenterology** 1986; 90: 80-84.
81. Parks D, Granger D. "Ischemia induced vascular changes: role of xhantine oxidase and hydroxyal radicals" **Am J Physiol** 1983; 245: 285-288.

82. Mc Cord JM. "Oxygen derived free radicals in postischemic tissue injury" *N Eng J Med* 1985; 17: 159-162.
83. Yanisawa M, Kurihara H, Kimura S, et col. "A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells". *Nature* 1988; 323: 411-15.
84. Jiménez W, Ros J, Morales-Ruiz M, Leivas A. "Nitric oxide synthases, nitric oxide, prostaglandins, and endothelins in chronic liver diseases: their contribution to portal hypertension and ascitis". **Therapy in Liver diseases. The Pathophysiological basis of therapy.** Ed Masson 1997: 27.
85. Jiménez W. Poo JL, and Leivas A. " Endothelin and systemic, renal and hepatic hemodynamic disturbances in cirrhosis". **Therapy in Liver diseases. The Pathophysiological basis of therapy.** Ed Masson 1997.
86. Zaugg Ch E, Homstein PS, Zhu P, et col. "Endothelin-1-induced release of thromboxane A₂ increases the vasoconstrictor effect of endothelin-1 in postischemic reperfused rat hearts". **Circulation** 1996; 24: 742-747.
87. Sirois MG, Filep JG, Rousseau A, et col. " Endothelin-1 enhances vascular permeability in conscious rats: role of thromboxane A₂". **Eur J Pharmacol** 1992; 214: 119-125.
88. Deng LY, Day R, Schiffrin EL. "Localization of sites of enhanced expression of endothelin-1 in the kidney of DOCA-salt hypertensive rats". **J Am Soc Nephrol** 1996, 7: 1158-1164. Abstract.
89. Yukimura T, Notoya M, Mizojiri K, et col. "High resolution localization of endothelin receptors in rat renal medulla". **Kidney Int** 1996; 50: 135-147. Abstract.

90. Kohan et col. "Endothelins in the normal and diseased kidney" **Am J Kid Dis** 1997, 29: 2-26.
91. Kumano K, Masui N, Soh S, et col. " Plasma endothelin level following kidney transplantation". **Transplant Proc** 1994; 26: 2114-2116.
92. Castillo J, Berrazueta JR, Herrera L, et col "Nitric oxide and endothelins are effector agents of hyperacute vascular rejection". **Transplant proc** 1996; 28: 635.
93. Fabrega E, Figols J, Duenas C, et col. " Value of endothelin in cellular rejection after liver transplantation" **Clinic Transplant** 1997; 11: 25-28. Abstract.
94. Xiao XR, Ao JH, Li YT, et col. "plasma endothelin levels in the early period after renal transplantation". **Transplant proc** 1996; 28: 1212-1214.
95. Tomita K, Kazutoma U, Nakanishi T, et col. "plasma endothelin levels in patients with acute renal failure". **N Eng J Med** 1989; 321: 1127.
96. Yamada K, Gunji Y, Kishisawa E, et col. "Possible involvement of endothelin in posttransplant acute tubular necrosis I: Studies in renal transplant patients". **Transplantation** 1994; 57: 1137-1138.
97. Wilhelm Sm, Simonson MS, Robinson AV, et col. "Endothelin up-regulation and localization following renal ischemia and reperfusion". **Kidney Int** 199; 55: 1011-1018.
98. Kraus TW, Mehrabi A, Klar E, et col. " Endothelin concentration in porcine hepatic tissue during ischemia and reperfusion ". **Transplant Proc** 1995; 27: 2752-2753.

99. Shibouta Y, Suzuki N, Shino A, et col. "Pathophysiological role of endothelin in acute renal failure". **Life Sciences** 1990; 46: 1611-1618.
100. Sakamoto K, Yokoyama T. "Possible involvement of endothelin in posttransplant acute tubular necrosis II. Studies in rats". **Transplantation** 1994; 57: 1140-1141.
101. Kon V, Yoshioka T, Fogo A, and Ichikawa I. "Glomerular actions of endothelin in vivo". *J. Clin Invest* 1989; 83: 1762-1767.
102. Espinosa G, López A, Cemadas MR, et col. "Role of endothelin in the pathophysiology of renal ischemia-reperfusion in normal rabbits". **Kidney Int** 1996; 50: 776-782.
103. Buyukgebizo, Aktan AO, Haklar G, et col. "BQ-123, a specific endothelin (ET_A) receptor antagonist, prevents ischemia-reperfusion injury in kidney transplantation". **Transplant Int** 1996; 9: 201-207. Abstract.
104. Fukunaga K, Takad Y, Taniguchi H, et col. "Endothelin antagonist treatment for successful liver transplantation from non-heart-beating donors". **Transplantation** 1999; 67: 514-520.
105. Mitsuoka H, Suzuki S, Sakaguchi T, et col. "Contribution of endothelin-1 to microcirculatory impairment in total hepatic ischemia and reperfusion injury". **Transplantation** 1999; 67: 514-520.
106. Jin MB, Zhu Y, Zhang S, et col. "Attenuation of ischemic liver injury by a non-selective endothelin receptor antagonist". **Transplant Proc** 1997; 29: 1335.
107. Hendry BM, James AF. "Endothelin antagonists in renal disease". **Lancet** 1997; 350: 381-382.

108. Furchgott RF and Zawadzki V. "The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine". **Nature** 1980; 288: 373-376.
109. Palmer RMJ, Ferrige AG, and moncada S. "Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor". **Nature** 1987; 327:524-526.
110. Bachmann S and Mundel P." Nitric oxide in the kidney: synthesis, localization, and function". **Am J Kid Dis** 1994; 24: 112-129.
111. Vane JR, Anggard EE, and Botting RM. "Regulatory functions of the vascular endothelium". **N Eng J Med** 1990; 323: 27-36.
112. Sessa WC." Endothelial-derived nitric oxide as a mediator of vascular function".**Therapy in liver diseases. The Pathophysiological basis of therapy**. Ed. Masson 1997:21-25.
113. Knowles RG and Moncada S. "Nitric oxide synthases in mammals". **Biochem. J** 1994; 298: 249-258.
114. Noiri E, Peresleni T, Miller F, et col. "In vivo targetin of inducible NO synthase with oligodeoxynucleotides protects rat kidney against ischemia". **J Clin Invest** 2377-2383.
115. Whittle BJR, López-Belmonte J and Ress DD. "Modulation of the vasodepressor actions of acetylcholine, bradykinin, substance P and endothelin in the rat by a specific inhibitor of nitric oxide formation". **Br J Pharmacol** 1989; 98: 646-652.

116. Ramwell P and Thomas G. "Nitric oxide and its role in transplantation". **Transplant Proc** 1995; 27: 2074-2076.
117. King AJ, and Brenner BM. "Endothelium-derived vasoactive factors and the renal vasculature". **Am J Physiol** 1991; 29: 653-662.
118. Radi R, Beckman JS, Bush KM et col. "Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide". **Arch Biochem Biophys** 1991; 288: 481-487.
119. Conger J, Robinette J, Villar A, et col. "Increased nitric oxide synthase activity despite lack of response to endothelium-dependent vasodilators in ptoischemic acute renal failure in rats". **J Clin Invest** 1995; 96: 631-638.
120. Shoskes DA, Xie Y, González-Cadavid NF. "Nitric oxide synthase activity in renal ischemia-reperfusion injury in the rat". **Transplantation** 1997; 63: 495-500.
121. Mashiach E, Sela S, Winaver J, et col. "Renal ischemia-reperfusion injury: contribution of nitric oxide and renal blood flow". **Nephron** 1998; 80: 458-467.
122. Cristol JP, Thiemermann C, Mitchell JA, et col. "Support of renal blood flow after ischaemic-reperfusion injury by endogenous formation of nitric oxide and of cyclo-oxygenase vasodilator metabolites" **Br J Pharmacol** 1993; 109: 188-194.
123. Correas MA, Martín B, Antolin F, et col." Estudio del papel del óxido nítrico en la isquemia caliente en el riñón trasplantado". **Arch Esp Urol** 1997; 50: 495-503.
124. Negita N, Ishii T, Kunikata S, et col. "Cytoprotective effect of nitric oxide on ischemia-reperfusion injury in rat kidneys" **Transplant Proc** 1996; 28: 1904-1905.

125. Satoh S, Stowe NT, Inman SR, et col. "Renal vascular response to vasodilators following warm ischemia and cold storage preservation in dog kidneys" **J Urol** 1993; 149: 186-189.
126. Kin S, Sasaki T, Gu K, et col. "The cytoprotective role of nitric oxide in ischemia-reperfusion injury in the rat kidney". **Transplant Proc** 1995; 27: 754-757.
127. Kin S, Sasaki T, Gu K, et col. "L-arginine can attenuate warm ischemia injury in the rat kidney and nitric oxide production in the preserved kidney". **Transplant proc** 1996; 28: 1889-1890.
128. Weight SC, Fumess PN and Nicholson ML." Nitric oxide generation is increased in experimental renal warm ischaemia-reperfusion injury". **Br J Surg** 1998; 85: 1663-1668.
129. Kobayashi H, Nonami T, Kurokawa T, et col. "Role of endogenous nitric oxide in ischemia-reperfusion injury in rat liver". **J Surg Res** 1995; 59: 772-779.
130. Oishi A, Inagaki M and Tanaka N. "Correlation between nitric oxide production and preservation of sinusoidal endothelial cells during cold ischemia". **Transplant Proc** 1997 ; 29: 1338-1339.
131. Shimamura T, Zhu Y, Zhang S, et col. "Protective role of nitric oxide in ischemia and reperfusion injury of the liver". **J Am Coll Surg** 1999; 188: 43-52.
Abstract.
132. Cottart Ch, Do L, Blanc MC, et col. "Hepatoprotective effect of endogenous nitric oxide during ischemia-reperfusion in the rat" **Hepatology** 1999, 29: 809-813.

133. Esteban F, Gómez-Jiménez J, Martín MC et col. "Nitric oxide and hepatic ischemic injury in human orthotopic liver transplantation". **Transplant Proc** 1995; 27: 2283-2285.
134. Isobe M, Katsuramaki Y, Kimura H, et col. "Correlation between nitric oxide and endothelin after prolonged warm ischemia-reperfusion injury in pig livers". **Transplant Proc** 1998; 30: 3750-3753.
135. Moncada S, Gryglewski R, Bunting S, et col. "An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation" **Nature** 1976; 263: 663-665.
136. Fitzgerald GA, Brash AR, Falardeu P, et col. "Estimated rate of prostacyclin secretion into circulation of normal man". **J Clin Invest** 1981; 68: 1272-1276.
137. Hamberg M, Svensson J and Samuelsson B. "Thromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides". **Proc Nat Acad Sci** 1975; 72: 2994-2998.
138. Bhagyalakshmi A and Frangos JA. "Mechanism of shear-induced prostacyclin production in endothelial cells". **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 1989; 158: 31-37.
139. Llinas MT, Gonzalez JD, Moreno C y Salazar FJ. "Interacción entre óxido nítrico y prostaglandinas en el control de la función renal". **Hipertension** 1998; 15: 140-142.
140. Kaufman RP, Anner H, Kobzik L, et col. "Vasodilator prostaglandins (PG) prevent renal damage after ischemia". **Ann Surg** 1987, 205: 195-198.

141. Lelcuk S, Alexander F, Kobzik L, et col. "Prostacyclin and thromboxane A₂ moderate postischemic renal failure" **Surgery** 1985, 98: 207-212.
142. Kuzu MA, Koksoy C, Alacayir I, et col. "Thromboxane synthase inhibitor, UK 384485, prevents renal injury in the rabbit isolated perfused kidney exposed to cold ischemia". **Transplantation** 1995; 59: 1096-1099.
143. Kin S, Stephanian E, Gores P, et col. "Effect of thromboxane A₂ synthesis inhibitor OKY-046 on canine pancreas and kidney preservation". **Transplant proc** 1993; 25: 1627-1628.
144. Garvin PJ, Niehoff ML, Robinson SM, et col "Beneficial effect of thromboxane A₂ synthetase inhibitor OKY-046 in a warm ischemia-reperfusion rat model" **Trasplantation** 1996; 61: 1429-1434.
145. Suehiro T, Yanaga K, Itasaka H, et col. "Beneficial effect of thromboxane A₂ synthetase inhibitor on cold-stored rat liver". **Transplantation** 1994; 58: 768-773.
146. Kobayashi T, Esato K, Morita N, et col."Effects of thromboxane A₂ synthesis inhibitor (OKY-046) on total liver ischemia in rats". **Int Surg** 1996; 81: 115-118. Abstract.
147. Isozaki H, Okajima K, Hara H, et col." The protective effect of thromboxane A₂ synthetase inhibitor against ischemic liver injury". **Surg Today** 1994; 24: 435-440. Abstract.
148. Kuroda T, Shiohara E, Haba Y, et col. "The efecct of a thromboxane A₂ receptor antagonist (ONO 3708) on ischemia-reperfusion injury of the dog pancreas". **Transplantation** 1994; 57: 187-194.

149. Kato A, Hishida A and Nakagima T. "Role of thromboxane A₂ and prostacyclin in uninephrectomy-induced attenuation of ischemic renal injury". **Kidney Int** 1995; 48: 1577-1583.
150. Paller MS and Manivel JC. "Prostaglandins protect kidneys against ischehmic and toxic injury by a cellular effect". **Kidney Int** 1992; 42: 1345-1354.
151. Xu N. "Effect of electroacupuntare of taixi point of plasma thromboxane A₂ and prostacyclin in the rabbit with renal ischemia". **Chen Tzu Yen Chiu** 1993; 18: 240-242. Abstract.
152. Garcia-Valdecasas JC, Rull R, Grande L, et col. "Prostacyclin, thromboxane , and oxygen free radicals and postoperative liver function in human liver transplantation ". **Transplantation** 1995; 60: 662-667.
153. Chen Hm, Chen MF, and Shyr MH. "Prostacyclin analogue (OP-2507) attenuates hepatic microcirculatory derangement, energy depletion, and lipid peroxidation in a rat model of reperfusion injury". **J Surg Res** 1998; 80: 333-338.
154. Radomsky MW, Palmer RMJ, and Moncada S. "The anti-aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide". **Br J Pharmacol** 1987; 92: 639-646.
155. Sundberg A, Nilsson R, Appelkvist EL; et col. "Immunohistochemical localization of $\alpha \pi$ class glutathione transferases in normal tissues". **Pharmacology & Toxicology** 1993; 72: 321-331.
156. Zalneraitis B, Arias IM, and Cho SI. " Prediction of cadaver kidney function by ligadin analysisi". **Transplant proc** 1981; 13: 697-698.

157. Backman L, Appelkvist EL, Ringden O, et col. "Appearance of basic glutathione transferase in the urine during tubular complications in renal transplant recipients". **Transplant Proc** 1988; 20: 427-430.
158. Backman L, Appelkvist EL, Ringden O. And Dallner G." Urinary levels of basic glutathione transferase as an indicator of proximal tubular damage in renal transplants recipients". **Transplant proc** 1989; 21: 1514-1516.
159. Backman L, Appelkvist EL, Rindgen O, and Dallner G. "Glutathione transferase in the urine: a marker for post-transplant tubular lesions". **Kidney Int** 1988; 33: 571-577.
160. Sundberg AG, Appelkvist EL, Backman L et col. " Urinary pi-class glutathione transferase as an indicator of tubular damage in the human kidney" **Nephron** 1994; 67: 308-316.
161. Kotanko P, Keiler R, Knabl L et col. "Urinary enzyme analysis in renal allograft transplantation" **Clin Chim Act** 1986; 160: 137-144.
162. Kievit JK, Oomen APA, Janssen MA et col. "Viability assessment of non-heart-beating donor kidneys by alpha glutathione S-transferase in the machine perfusate". **Transplant proc** 1997; 29: 1381-1383.
163. Kievit JK, Nederstigt AP, Oomen APA et col. "Release of alpha-glutathione s-transferase (α -GST) and pi-glutathione s-transferase (π -GST) from ischemic damage kidneys into the machine perfusate. Relevance to viability assessment". **Transplant Proc.** 1997; 29: 3591-3593.
164. Daemen JW, Oomen APA, Janssen Ma et col." Glutathione s-transferase as predictor of functional outcome in transplantation of machine preserved non-heart-beating donor kidneys". **Transplantation** 1997;63: 89-93.

165. Hugues VF, Trull AK, Gimson A, et col." Randomized trial to evaluate the clinical benefits of serum alpha-glutathine s-transferase concentration monitoring after liver transplantation". **Transplantation** 1997; 64: 1446-1452.
166. Perez LF y Tutor JC. " β -N-Acetilhexosaminidasa: heterogeneidad enzimatica e interes en bioquimica clinica". **Química clínica**.1997; 63: 89-93.
167. Price RG. "The role of NAG in the diagnosis of kidney disease including the monitoring of nephrotoxicity". **Clinical Nephrology** 1992; 38:14-19.
168. Scherberich JE. "Renal cell injury and enzyme release" **Wiener Klinische Wochenschrift (edicion inglesa)** 1991; 103 (supl 189): 5-9.
169. Hauser AC, Fabrizii M, Derfler K, and Balcke P. " β -N-acetylglucosaminidase as a parameter for the diagnosis and evaluation of primary glomerular and primary tubulointerstitial kidney disorders". **Wiener Klinische Wochenschrift (edición inglesa)**. 1991; 103(supl 189): 12-15.
170. Liu CS, Kuo HW, Lai JS, et col."Urinary N-acetyl-beta-glucosaminidase as an indicator of renal dysfunction in electroplating workers". **Int Arch Occup Environ Health** 1998; 71: 348-352. Abstract.
171. Nishimura K, Kawada M, Suehiro T, et col. "Urinary N-acetyl-beta-D-glucosaminidase and gamma-glutamyl-transpeptidase activities for evaluation of renal disturbance in patients with multiple myeloma" **Nippon Jinzo Gakkai Shi** 1992; 34: 1087-1094. Abstract.
172. Matteucci E, Carmellini M, Bertoni C, et col. "Urinary excretion rates of multiple renal indicators after kidney transplantation: clinical significance for early graft outcome" **Ren Fail**. 1998; 20: 325-330.

173. Bulkley GB. "The role of oxygen free radicals in human disease processes" **Surgery** 1983; 94:407-411.
174. Haglund U, Lungren O. "Intestinal ischemia and shock factors" **Fed Proc** 1978; 37: 2729-27933.
175. Mc Cord JM. " The superoxide free radical: its biochemistry and pathophysiology". **Surgery** 1983; 94: 407-411.
176. Brawn K, Fridovich I. "Superoxide radical and superoxide dismutases: threat and defense". **Acta Physiol. Scand** 1980; 492: 9-18.
177. Gilbert D, Gerschman R, Cohen J, Sherwood W. "The influence of high oxygen pressures on viscosity of solutions of sodium desoxyribonucleic acid and sodium alginate". **J. Am. Chem. Soc.** 1957; 79: 5677-5680.
178. Matsumara G, Herp A, Pigman W. "Depolimerisation of hyaluronic acid by autooxidants and radiations". **Radiat. Res.** 1966; 28: 735-752.
179. Allen J, Goodman D, Besarab A, Rasmussen H. "Studies on biochemical basis of oxygen toxicity". **Biochem. Biophys. Acta.** 1973; 320: 334-340.
180. Chen G. "Lipid peroxidation. Oxygen free radicals and tissue damage". **Ciba Foudation Symposium** 65,. Excerpta Medica 1979 Amsterdan ; 177-182.
181. Peters J, Foote C. "Chemistry of superoxide ion. Reaction with hydroperoxides". **J.Am.Chem. Soc.** 1976, 98: 873-875.
182. Hayaishi o, Shimizu T. " Metabolic and functional significance of prostaglandins in lipid peroxide researc". **Lipid peroxides biology and medicine** 1982; 41-43.

183. Petrone W, English D, Wong K, McCord JM. "Free radicals and inflammation superoxide dependent activation of a neutrophil chemotactic factor in plasma". **Proc Natl. Acad. Sci.** 1980; 77: 1159-1163
184. Dormandy TL. "An approach to free radicals" **Lancet** 1983; 2: 1010-1014.
185. Babior BM. "Oxygen dependant microbial killing by phagocytes". **New Engl J. Med.** 1978; 298: 659-668.
186. Borzeix MG. "Drugs effect in experimental stroke resulting from a transient cerebral oligemia" *Maladies et Medicaments*. **Drugs and diseases**; 1: 44-53.
187. Hallet M, Campbell A. "Is intracellular Ca the trigger for oxygen radicals production by polymorphonuclear leucocytes ". **Cell Calcium** 1984; 5: 1-19.
188. Johnston R, Newman S. "Chronic granulomatous disease". **Pediatr. Clin. North. Am.** 1977; 90: 213-217
189. Mc Phail L, De Chatelet L, Shirley D, et col. "Deficiency of NADPH oxidase activity in chronic granulomatous disease". **J. Pediatr.** 1977, 90: 213-217.
190. Rodey G, Jacobs H, Holmes B, et col. "Leukocytes G&PD levels and bactericidal activity". **Lancet** 1970; 1: 355-356.
191. Abu-Osba Y, Mallouh A, Hann R. "Incidence and causes of sepsis in glucose-6-phosphate deshydrogenase-deficient newborn infants". **J.Pediatr.** 1989; 114: 748-752.
192. Leher RI, Cline MJ. "Leukocyte myeloperoxidase deficiency and disseminated candidiasis: the role of myeloperoxidase in resistance to candida infection" **J. Cli. Invest.** 1969; 48: 1478-1488.
193. Mc Cord JM, Fridovich I. "Superoxide dismutase: an enzyme function for erythrocyte (hemocuprein)". **J.Biol.Chem.** 1969; 244: 6049-6055.

194. Mc Cord JM, Keele BB, Fridovich I "An enzyme base theory of obligate anaerobius: the physiological function of superoxide dismutase". **Proc. Natl. Acad. Sci.** 1974; 41: 35-97.
195. Mills GC. " Hemoglobin catabolism I. Glutathione peroxidase, and erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown". **J. Biol. Chem.** 1957; 229: 189-197.
196. Ursini F, Maiorino M, Valente M, et col. "Purification from pig liver of a protein which protects liposomes and biomembranes from peroxidative degradation and exhibits glutathione peroxidase activity on phosphatidylcholine hydroperoxides". **Biochim Biophys. Acta** 1982; 710: 197-211.
197. Baeuerle PA, Henkel T. "Function and inactivation of NF- κ B in the immune system". **Annu. Rev. Immunol.** 1994; 12: 141-179.
198. Kazmi SM, Plante RK, Visconti V, et col. "Suppression of NF kappa B activation and NF kappa B-dependent gene expression by tepoxalid, a dual inhibitor of cyclooxygenase and 5- lipoxygenase". **J. Cell. Biochem.** 1995; 57: 229-310.
199. Brigelius-Flohe R, "Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidase". **Free Rad. Biol. Med.** 1999; 27: 951-964.
200. Solez K, et al. "Report of the tirad Banff conference on allograft pathology (July 20-24, 1995) on classification and lesion scoring in renal allograft pathology". **Transplant. Proc.** 1996.; 28: 441-441.
201. García B, García O, Clapes S. Y col. "Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar los radicales libres: I.Superóxido dismutasas". **Rev Cubana Invest Biomed,** 1995; 14(1).

202. Cisneros E. "La glutathion reductasa y su importancia biomédica". **Rev. Cubana Invest. Biome.** 1995; 14(1).
203. Fulbert JC, Cals MJ. "Les radicaux libres en biologie clinique: origine, role pathogene et moyens de defense". **Pathol Biol.** 1992; 49(1): 66-77.
204. Godin DV, Garnett ME. "Species-related variations in tissue antioxidant status-I. Differences in antioxidant enzyme profiles". **Comp Biochem Physiol.** 1992; 103(3): 737-42.
205. Nordhoff A. Bücheler US; Werner D et col. "Folding of the four domains and dimerization are impaired by the Gly 446-OG1u exchange in human glutathione reductase. Implications for the design of antiparasitic drugs". **Biochemistry** 1993; 32(15): 4060-6
206. García-Alfonso C, Martínez-Galisteo E, Llobel A, et col. "Horse liver glutathione reductase: purification and characterization". **Int J Biochem** 1993; 25(1): 61-8.
207. Perez-Campo R, López-Torres M, Rojas C, et col."Lung glutathione reductase induction in aging catalase depleted frogs correlated with early survival throughout the life" **Mech Ageing Dev** 1993; 67(1-2):115-27.
208. Anderson B, Giubertu M, Perry G, et col. "Low red blood cell glutathione reductase and pyridoxine phosphatase activities not related to dietary riboflavin: selection by malaria". **Am J. Clin-Nutr** 1993; 57(5): 66-72.
209. Warthington D, Rosemeyer M. "Glutathione reductasa from human erythrocytes catalytic properties and aggregation" **Eur J Biochem** 1976;67(1):232.

210. Bray T, Taylor G."Tissue glutathione, nutrition, and oxidative stress". **Can J Physiol Pharmacol** 1993; 71: 746-51.
211. Feher J."Clinical implications of free radical reactions". **Acta Physiol Hung** 1986; 68: 33.
212. Lejeune F, Bauer J, Leyvraz, et col."Disseminated melaonma, prclinical therapeutic studies, clinical tries, and patient treatment". **Curr opin Oncol** 1993; 5 (2): 390-6.
213. Bode A, Yavarow C, Fry D, et col." Enzimatic basis for alterd ascorbic acid and dehydroascorbic acid levels in diabetes" **Biochem Biophys Res Commun** 1993; 191(3)1347-53.
214. Cornelius J, Luttge B, Peck A."Antioxidant enzyme activities in IDD-prone and IDD-resistant mice: a comparative study". **Free Radic Biol Med** 1993; 14(4):409-20.
215. Lopenna D, Del Boccio G, Porreca C, et col." Effects of high fat-cholesterol-enriched diet on the ntioxidant defense mechanisms in the rabbit Herat". **Free Radic Res Commun** 1992; 17(2): 87-96.
216. Eskenazi A, Pinkas J, Within J, et col. "Role of antioxidant enzymes in the induction of increased experimental metastasis by hidroxiurea". **J Natl Cancer Inst** 1993; 85(9): 711-21.
- 217.Jenner P, Dexter D, Sian J, et col." Oxidative stress as a cause of nigral cell death in Parkinson`s disease and incidental Lewy body disease". **Ann Neurol** 1992; 32(suppl): s82-s87.

218. Admson G, Billings R. "Citokine toxicity and induction of No synthase activity in cultured mouse hepatocytes". **Toxicol Appl Phannacol** 1993; 119(1): 100-7.
219. Vertechy M, Cooper M, Ghirardi O, et col." The effect of age on the activity of enzymes of peroxide metabolism in rat brain". **Exp Gerontol** 1993; 28(1): 77-85.
220. López M, Pérez R, Fernández A, et col. "Brain glutathione reductase induction increases early survival and decreases lipofuscin, accumulation in aging frogs". **J Neurosci Res** 1993; 74(2): 788-92.
221. Ji L, "Antioxidant enzyme response to exercise and aging". **Med Sci Sports Exerc** 1993; 25(2): 225-31.
222. Baker GL, Comy RJ."Oxygen free radicals induced damage in kidneys subjected to warm ischemia and reperfusion. Protective effect of superoxide dismutasa". **Ann. Surg** 1985; 202: 628-41.
223. Shoskes DA, Webster R, Shahed. "Oxidant stress in cadaveric and living kidney donors as markers of renal injury: utility ot total antioxidant capacity and isoprostane levels in urine". **Tansplant Proc** 2000; 32: 804-5.
224. Alcaraz A, López-Boado MA, Vicens A y col."Beneficial effect of oxygen radicals blockers in experimental kidney transplantation in rats" **Actas urológicas españolas** 1992; 16(1):83-7.
225. Robert T, Winchell A., Nicholas A. "Lack of effect of oxygen-radical scavenging systems in the preserved reperfused rabitt kidney". **Transplantation** 1989; 48:393-96.

226. Land W, Zweier JL."Prevention of reperfusion-induced, free radical-mediated acute endothelial injury by superoxide dismutase as an effective tool to delay/prevent chronic renal allograft failure: a review".**Transplant Proc.** 1997; 29:2567-2568.
- 227.Takanobu H., Arren R., Gregory B. y col."Ablation of free radical-mediated reperfusion injury for the salvage of kidneys taken from non-heartbeating donors". **Transplantation** 1988; 45:284-89.
- 228.Bosco PJ, Schweizer R."Use of oxygen radical scavengers on autografted pig kidneys after warm ischemia and 48-hour perfusion preservation" **Arch Surg** 1988; 123:601-04.
- 229.Schneeberger H., Illner W., Abendroth D., y col."First clinical experiences with superoxide dismutase in kidney transplantation-results of a double-blind randomized study ". **Transplant Proc** 1989; 21:1245-46
- 230.Bratell S.,Haraldsson G., Herlitz H. y col."Protective effects of pre-treatment with superoxide dismutasa, catalase and oxypurinol on tubular damage caused by transient ischaemia". **Acta Physiol Scand** 1990; 139:417-25.
- 231.Atalla S., Toledo-Pereyra L., MacKenzie G. y col."Influence of oxygen-derived free radical scavengers on ischemic livers".**Transplantation** 1985; 40(6):584-589.
232. Huet T., Baumert H., Amor IB. y col. "Protection of autotransplanted pig kidneys from ischemia-reperfusion injury by polyethylene glycol". **Transplantation** 2000; 70(11):1569-75.

233. Treska V., Kuntscher V., Hasman D. y col. "Importance of selenium for the influence of ischemia-reperfusion syndrome after kidney transplantation from a non-heart-beating donor in a pig model". **Transplant. Proc.** 2002 ;34(8):3057-9.
234. Treska V., Kuntscher V., Molacek J. y col."Can the ischemia-reperfuion syndrome in transplanted kidneys procured from non-heart-beating donors be influenced by adding selenium into the reperfusion solution?. An experimental study". **Transplant. Proc.** 2003;35(4): 1584-6.
235. Sekhon CS., Sekhon BK., Singh I., y col. "Attenuation of renal ischemia/reperfusion injury by a triple drug combination therapy". **J Nephrol.** 2003; 16(1): 63-74.