

Trabajo de tesis como requisito para optar al título de DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS.



TESISTA: M.V. LEANDRO VECCHIO DEZILLIO

DIRECTORA: Dra NATALIA LAUSADA

CO-DIRECTORA: Dra. MARIANA MACHUCA

Lugar de trabajo: Instituto de Estudios Inmunológicos y Fisiopatológicos (IIFP-CONICET); Cátedra de Trasplante de Órganos y Tejidos, Facultad de Ciencias Médicas, UNLP



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
AÑO 2022



IMPACTO DE LA MUERTE ENCEFÁLICA EN LA INJURIA POR ISQUEMIA-REPERFUSIÓN Y RECHAZO CELULAR AGUDO EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE TRASPLANTE DE INTESTINO EN RATAS

Trabajo de tesis como requisito para optar al título de DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS.

TESISTA: M.V. LEANDRO VECCHIO DEZILLIO

DIRECTORA: Dra NATALIA LAUSADA

CO-DIRECTORA: Dra. MARIANA MACHUCA

Lugar de trabajo: Instituto de Estudios Inmunológicos y Fisiopatológicos (IIFP-CONICET); Cátedra de Trasplante de Órganos y Tejidos, Facultad de Ciencias Médicas, UNLP

Miembros del Jurado:

Dra. Carolina Zanuzzi – Dr. Diego Guerrieri – Dr- Sung Ho Hyon



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS



**A mis dos hermosas hijas, ANTONIA y ALBA, nada en la vida tiene sentido sin sus
sonrisas.**

**A la compañera mas fiel y guerrera que la vida puso en mi camino, te amo MELISA,
gracias por apuntalarme en éste largo camino (y perdón por lo mismo).**

**A la eterna memoria de: CARMEN, quien seguro está presumiendo a su nieto “el do-
tor” con otras señoras en los palieres del cielo, y MARCELA ALEJANDRA TERESA,
te extrañamos enormemente.**

**“La felicidad son momentos, uno trabaja muy duro para esos momentos, pero hay
que estar atento para disfrutarlos, sino se pasan sin que lo notes”
E.L.V. Octubre de 2018.**

AGRADECIMIENTOS

- En primer lugar quiero mencionar que durante toda mi educación (desde jardín de infantes hasta posgrado) nunca pagué un centavo por educación, por eso el agradecimiento mas grande es para la EDUCACIÓN PÚBLICA, con todos los defectos que el sistema acarrea desde hace muchos años, pero que, con el esfuerzo de sus docentes y alumnos aún sigue con vida.
- A la Universidad Nacional de La Plata y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por haberme becado durante mi doctorado y permitirme desarrollarme en tan prestigiosas instituciones.
- A la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP, particularmente al curso de Cirugía General I y el Servicio Central de Cirugía, al Dr Hugo Baschar y la MV Miriam Allende por confiar en mí y darme la oportunidad de formarme como cirujano y desarrollar mi actividad docente, la cual amo y hago con pasión todos los días.
- A la Facultad de Ciencias Médicas de la UNLP, a la Cátedra de Trasplante de Órganos, por abrirme las puertas al apasionante mundo de los trasplantes y la microcirugía y por permitir que desarrolle mi trabajo en sus instalaciones.
- A mis directoras, Natalia Lausada y Mariana Machuca por su entrega y dedicación para que éste trabajo pueda llevarse a cabo.
- A Martín Rumbo, por guiar, enseñar y ayudar en el arduo camino de la ciencia
- Al Dr Pablo Stringa, por enseñarme todo lo que sabe y ser mi mentor científico y microquirúrgico. Y a Pablito Stringa, por ser mi amigo, bancarme y escuchar mis catarsis desde cualquier parte del mundo. Gracias hermano.
- Al Dr. David Romanin (Dave) por brindarme todo su apoyo científico y moral, por sus críticas constructivas y la enorme cantidad de horas respondiendo las mismas preguntas sobre estadística una y otra vez. Te quiero bro (F2)
- Al Sr. Claudio Ledesma, por recibirme de la mejor manera ni bien llegué al LTO, por abrirme las puertas de su familia y haber compartido conmigo incontables horas mientras hacía

el protocolo de muerte encefálica, sufriendo a la par mía. Un verdadero compañero y amigo. A Juan Cruz Abate y Josefina Saves por su compañerismo y predisposición en el LTO.

- A Andrea Crivaro, Agustina Errea, Juan Marcos Mucci, Maximiliano Ormazábal, Paola Smaldini, Constanza Bondar, Matías Zapiola y todo el Box V (de vendetta), por regalarme su entrañable amistad y compañía desde el primer minuto que pise el IIFP.
- A Ivi, Juli, Juani, Male, Maia, Gri, Marina y Carro por ser el mejor equipo Rumbo de la historia. Si, vengan de a uno.
- A los Dres Verónica Milesi, Pedro Martín y Nicolás Enrique, por incluirme en sus protocolos en mis inicios, lo que hizo que pudiera mejorar mis habilidades microquirúrgicas, pero especialmente por facilitarme de manera honesta y desinteresada la bomba de infusión, sin la cual no podría haber hecho muchos experimentos.
- A todo el personal del IIFP (becarios, investigadores, CPA's y personal administrativo) por facilitar la enorme cantidad de cosas que para mi eran un chino.
- Al Dr Gabriel Gondolesi, las Dras Virginia Gentillini y Constanza Arriola, y el MV Jeremías Moreira por los invalorable intercambios en todos los Journal Club tanto presenciales como virtuales (incluso el que se hizo el 1º de mayo)
- Al Dr Guido Trentadue, por su amistad, compañerismo y ayuda invalorable durante mi estadía en Groningen. A Henri Leuvenink y Petra Ottens por haberme brindado una formación de altísimo nivel en el modelo de muerte encefálica.
- Al Dr. Francisco Hernández Oliveros y la Dra Ane Andrés por la colaboración forjada a través del Dr Stringa y su incalculable ayuda y aporte en todo lo relativo al modelo de asistolia.
- A los MV's Fernando Leone, Oscar Robledo, María José De Andrea, Ana Blasco, Néstor Julián, Daniela Bidal, Belén Álvarez Amalfi, Matías Russo, Martina Von Wernich y Rodrigo Fernández Hamer, por ayudarme día a día a ser mejor profesional y brindarme su amistad y apoyo detrás de cada "Y? Como venis con la tesis?"
- A mis padres, Edgardo, Elizabeth y Carlos, por inculcarme la importancia del trabajo desde chico y a no darme por vencido nunca. Por apoyarme a lo largo de toda mi carrera, de manera económica, pero por sobre todas las cosas por brindarme contención y preguntarme todos los días por "mi laburo" aunque no entienda una palabra de lo que digo.

- A mis hermanos, fuente de toda inspiración y admiración, mis primeros superhéroes y los únicos que se mantienen hasta el día de hoy. Especialmente a Nico, quien incluso me facilitó el respirador con el que se hicieron la mayoría de los experimentos. Gracias eternas.
- A la tía Lili, por adoptarme y amarme como a uno mas de sus hijos y ser “la abu lili” de mis hijas. No me va a alcanzar la vida para devolverte tanto amor. Al tío Guille dueño de una mentalidad ganadora que admiro y trato de copiar día a día, un tíopadre increíble. A Mauro y Micky (y a través de ellos Mati, Contu, Emma, Ame y Tinito) por ser unos primos-hermanos con todas las letras y en toda lo literal de la expresión. Y a “los Pala” (Mirta, Fabri, Cami y Bruno) por todos los domingos en familia que son una bocanada de aire fresco. Y Leo, no tengo un solo recuerdo tuyo que no me haga reír.
- A Agustín Gardinetti, por ser el amigo mas fiel y por hacerme hinchar del club mas hermoso del mundo, Gimnasia y Esgrima La Plata.
- Finalmente a Roberto García Jr., esto definitivamente no hubiera sido posible sin vos. Gracias de verdad.

Publicaciones Parciales del presente trabajo

Artículos.

VECCHIO DEZILLIO, LEANDRO EMMANUEL; ROMANIN, DAVID EMMANUEL; IVANOFF MARINOFF, IVANA MARIEL; VERNENGO, JULIETA; ABATE ZÁRATE, JUAN CRUZ; MACHUCA, MARIANA ALEJANDRA; GONDOLESI, GABRIEL EDUARDO; LAUSADA, NATALIA RAQUEL; STRINGA, PABLO LUIS; RUMBO, MARTÍN. Experimental study to assess the impact of vasopressors administered during maintenance of the brain-dead donation in the quality of the intestinal graft. Journal of Trauma and Acute Care Surgery. Philadelphia: Wolters-Kluwer. 2021 vol.- PAoP n°. p - . issn 2163-0755

VECCHIO LE; STRINGA P; RAIMONDI JC; RUMBO M; LAUSADA N. ESTABLECIMIENTO DE UN MODELO DE MUERTE ENCEFÁLICA EN RATAS PARA INVESTIGACIÓN EN TRASPLANTE DE INTESTINO. Revista Argentina de Trasplantes. Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Sociedad Argentina de Trasplantes. 2019 vol.XI n°3. p184 - 188. issn 2408-4328.

Presentaciones en Reuniones Científicas.

TRENTADUE G; VECCHIO LE; KATS-UGURLU G; HAVEMAN JW,; FABER KN,; LEUVENINK H; RUMBO M; DIJKSTRA G. The small bowel is protected by the presence of luminal preservation solution during cold storage in a brain-dead rat model. Países Bajos (Holanda). Veldhoven. 2021. Congreso. Dutch Digestive Days 2021. Dutch Association for Gastroenterology

TRENTADUE G; VECCHIO LE; KATS-UGURLU G; HAVEMAN JW,; FABER KN,; LEUVENINK H; RUMBO M; DIJKSTRA G. The small bowel is protected by the presence of luminal preservation solution during cold storage in a brain-dead rat model. Países Bajos (Holanda). Nijmegen. 2021. Congreso. Bootcongres 2021 (Congress of the Dutch Transplantation Association). Dutch Transplantation Association

TRENTADUE G; VECCHIO LE; KATS-UGURLU G; IVANOFF MARINOFF, I; VERNENGO J; HAVEMAN JW,; FABER KN,; LEUVENINK H; RUMBO M; DIJKSTRA G. The small bowel is protected by the presence of luminal preservation solution during cold storage in a brain-dead rat model.. Nueva Zelanda. Auckland. 2021. Congreso. Congress of the Intestinal Rehabilitation and Transplantation Association.. Intestinal Rehabilitation and Transplantation Association.

VECCHIO LE; STRINGA P; MACHUCA M; PAPPÀ GOBBI R; PUCCI MOLINERIS M; SERRADILLA J; ANDRÉS MORENO AM; LAUSADA N; RUMBO M; HERNÁNDEZ OLIVEROS F. Experimental assessment of multivisceral graft damage in controlled donation after circulatory death.. Nueva Zelanda. Auckland. 2021. Congreso. 17th Congress of the Intestinal Rehabilitation and Transplantation Association.. Intestinal Rehabilitation and Transplantation Association.

VECCHIO LE; ROMANIN D; IVANOFF MARINOFF, I; VERNENGO J; ABATE, J; MACHUCA M; LAUSADA N; STRINGA P; RUMBO M. Intestinal graft quality after norepinephrine and dopamine management in an experimental brain dead model.. Nueva Zelanda. Auckland. 2021. Congreso. 17th Congress of the 17th Congress of the Intestinal Rehabilitation and Transplantation Association.. 17th Congress of the Intestinal Rehabilitation and Transplantation Association.

VECCHIO LE; STRINGA P; MACHUCA M; RAIMONDI JC; GONDOLESI G; LAUSADA N; RUMBO M. Experimental model of Brain death donors in rats: A match control study of cold ischemic injury and morphometrical changes between brain death and live donors for intestinal transplant. Francia. París. 2019. Congreso. 16th Congress of the Intestinal Rehabilitation and Transplant Association. Intestinal Rehabilitation and Transplant Association

VECCHIO LE; ROMANIN D; SAVES, J; STRINGA P; RAIMONDI JC; LAUSADA N; RUMBO M. Caracterización del daño del injerto intestinal en un modelo experimental de donante cadavérico en ratas. México. Mérida. 2019. Congreso. XXV Congreso Latinoamericano y del Caribe de Trasplante. Sociedad de Trasplante Latinoamericana y del Caribe

VECCHIO LE; STRINGA P; RAIMONDI JC; MACHUCA M; RUMBO M; LAUSADA N. ESTABLECIMIENTO DE UN MODELO EXPERIMENTAL DE MUERTE ENCEFÁLICA EN RATAS PARA INVESTIGACIÓN EN TRASPLANTE DE INTESTINO.. Argentina. Ciudad Autónoma de Buenos Aires. 2018. Congreso. XIV Congreso Argentino de Trasplantes. Sociedad Argentina de Trasplantes

VECCHIO LE; CARNEVALE M; STRINGA P; LAUSADA N; GUIBERT E; RUMBO, MARTIN; TIRIBELLI, CLAUDIO; GONDOLESI, GABRIEL; RODRIGUEZ J. EVALUACION DE UNA NUEVA SOLUCIÓN DE PRESERVACIÓN (BGP-HMP) DE DESARROLLO NACIONAL EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE TRASPLANTE DE INTESTINO.. Uruguay. Montevideo. 2017. Congreso. XXIV Congreso Latinoamericano y del Caribe de Trasplantes. Sociedad de Trasplantes de Latinoamérica y el Caribe STALYC

Premios Obtenidos.

- **Young Scientific Award**, Intestinal graft quality after norepinephrine and dopamine management in an experimental brain dead model.. Nueva Zelanda. Auckland. 2021. Congreso. 17th Congress of the 17th Congress of the Intestinal Rehabilitation and Transplantation Association.. 17th Congress of the Intestinal Rehabilitation and Transplantation Association.

Índice

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
ABREVIATURAS.....	5
GENERALIDADES.....	8
ANATOMÍA, HISTOLOGÍA Y FISIOLOGÍA DEL INTESTINO.....	8
TRASPLANTE DE INTESTINO. HISTORIA Y ACTUALIDAD.....	14
Reseña Histórica.....	14
Candidatos A Trasplante.....	16
Tipos De Trasplante Intestinal.....	17
MUERTE ENCEFÁLICA Y TRASPLANTE DE ÓRGANOS.....	20
Introducción.....	20
Fisiopatología de la Muerte Encefálica.....	21
Diagnóstico de ME.....	22
Mantenimiento del donante.....	24
PRESERVACIÓN DE ÓRGANOS PARA TRASPLANTES.....	29
Introducción.....	29
Historia.....	29
Daño Por Preservación.....	31
Fisiopatología y bases de la preservación de órganos.....	31
Métodos de preservación.....	33
Preservación estática en frío.....	33
Preservación en máquina de perfusión.....	34
Soluciones de preservación.....	34
Tiempos de preservación en los diferentes órganos.....	35
EL TRASPLANTE DE INTESTINO EXPERIMENTAL Y SU IMPORTANCIA TRASLACIONAL	
.....	38
HIPÓTESIS:.....	42
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	42
CAPITULO I.....	44
ESTABLECIMIENTO DE UN MODELO EXPERIMENTAL DE MUERTE ENCEFÁLICA EN	
RATAS PARA INVESTIGACIÓN EN TRASPLANTE DE INTESTINO.....	44
Introducción.....	44
Materiales y métodos.....	45
Resultados.....	47

Conclusiones.....	47
EVALUACIÓN EXPERIMENTAL DEL DAÑO HISTOPATOLÓGICO DEL INTESTINO EN LOS DIFERENTES ESCENARIOS DE DONACIÓN. DESARROLLO Y ANÁLISIS DE UN MODELO DE DONACIÓN EN ASISTOLIA MAASTRICHT III.....	50
Introducción.....	50
Material y métodos.....	51
Conclusión.....	59
CAPITULO II.....	63
ESTUDIO EXPERIMENTAL SOBRE EL IMPACTO DE LOS VASOPRESORES ADMINISTRADOS PARA EL MANTENIMIENTO DEL DONANTE EN MUERTE CEREBRAL EN LA CALIDAD DEL INJERTO INTESTINAL.....	63
Introducción.....	63
Materiales y métodos.....	64
Resultados.....	70
Conclusión.....	74
ANEXO I.....	77
TÉCNICA DE INMUNOHISTOQUÍMICA PARA ANTICUERPOS ANTI CD3 Y E-CADHERINA	77
MUERTE ENCEFÁLICA Y PRESERVACIÓN FRÍA. COMPORTAMIENTO DEL INJERTO INTESTINAL PROVENIENTE DE DIFERENTES ESCENARIOS DE DONACIÓN.....	79
Introducción.....	79
Materiales y métodos.....	80
Resultados.....	84
Conclusiones.....	95
ANEXO II.....	97
RESULTADOS DE MORFOMETRÍA DE LA MUCOSA INTESTINAL.....	97
CAPITULO III.....	100
IMPACTO DE LA MUERTE ENCEFÁLICA EN LA INJURIA POR ISQUEMIA-REPERFUSIÓN ANÁLISIS DE TIEMPOS CORTOS DE REPERFUSIÓN.....	100
Introducción.....	100
Materiales y métodos.....	101
Resultados.....	104
Conclusiones.....	107
CONCLUSIONES GENERALES.....	111
BIBLIOGRAFÍA.....	115

RESUMEN

Palabras clave: Muerte encefálica; Trasplante de Intestino; Preservación fría; Injurias por Isquemia Reperusión

Todo trasplante de órganos requiere de un donante, el cual, según el caso, puede ser vivo o fallecido. Pese a que los mejores resultados se observan cuando el órgano proviene de un donante vivo, el mayor porcentaje de órganos destinados a trasplante se obtienen de donantes con criterios neurológicos de muerte encefálica.

La muerte cerebral induce un aumento de la permeabilidad de membranas a nivel intestinal, produciendo una traslocación bacteriana, que conlleva a una producción de citoquinas pro-inflamatorias, generando éstas a su vez la auto-perpetuidad y amplificación del proceso inflamatorio e induciendo además el daño de órganos remotos.

El trasplante de intestino con donante vivo es una práctica casi nula mundialmente, por lo cual la enorme mayoría de los procedimientos se realizan con órganos procurados de donantes en muerte encefálica. Por tal motivo, el estudio de la fisiopatología de este proceso y la búsqueda de estrategias para mejorar la viabilidad de los órganos representa un área de sumo interés en el ámbito de los trasplantes de órganos.

Por lo mencionado anteriormente el presente trabajo pretende explorar el proceso de muerte encefálica desde el punto de vista experimental, haciendo un recorrido desde la reproducción y puesta a punto de un modelo fiable ligado al trasplante de intestino, la comparación del mismo frente al *gold standard* experimental (donante vivo) y su preservación, finalizando en un modelo de trasplante heterotópico para evaluar la injuria por isquemia reperusión.

El capítulo I se centra en la puesta a punto de un modelo de muerte encefálica que sea confiable para uso en trasplante de intestino, y se demuestra que con 2hs de ME el injerto está lo suficientemente dañado como para evidenciar el efecto de dicho proceso pero que, a su vez, es viable para un potencial trasplante. En la segunda parte del mismo capítulo, se desafía a esos injertos frente a los diferentes escenarios de donación utilizados y se desarrolla, además, un modelo de donación en asistolia Maastrich tipo III con el objetivo de ampliar el campo de comparación y sentar bases experimentales sobre las cuales hay escasa información en el área de los trasplantes de intestino, donde se concluye que un injerto luego de 5 minutos de asistolia, se encuentra en condiciones micro y macroscópicas de ser trasplantado.

Entendiendo al intestino como un órgano con mucha influencia en la homeostasis de los demás órganos, analizamos alternativas para obtener un injerto de mayor calidad desde el manejo del donante en muerte encefálica durante la procuración, donde se establecen diferencias en el uso los vasopresores Noradrenalina y Dopamina. Asimismo, en los procedimientos de trasplante de intestino es muy poco probable poder realizar un trasplante inmediato en el cual la injuria por preservación sea casi inexistente, por tal motivo, el capítulo II establece las bases de la calidad de los injertos utilizados para trasplante intestinal luego de diferentes tiempos de preservación fría, comparando la muerte encefálica con los diferentes escenarios de donación.

Finalmente, en el capítulo III se muestran los primeros resultados de trasplantes intestinales en ratas con intestinos procurados de ratas con muerte encefálica. En este caso se describe el comportamiento del injerto en tiempos cortos de reperfusión y su influencia en el daño por isquemia-reperfusión.

Considerando la enorme importancia que los modelos experimentales tienen en el desarrollo de ensayos prec-línicos, el presente trabajo pretende colaborar aportando conocimiento para el desarrollo de diferentes estudios que permitan ampliar el *pool* de órganos disponibles para trasplante, acortar los tiempos de permanencia de los pacientes en lista de espera y ofrecer a los pacientes trasplantados una mejor calidad de vida.

ABSTRACT

Keywords: Brain Death; Intestinal Transplantation; Cold Preservation; Ischemia Reperfusion Injury.

All organ transplantation requires a donor, which, depending on the case, can be living or deceased. Although the best results are observed when the organ comes from a living donor, the highest percentage of organs for transplantation are obtained from donors with neurological criteria of brain death.

Brain death induces an increase in membrane permeability at the intestinal level, generating bacterial translocation, which leads to proinflammatory cytokines production, which leads to self-perpetuation and amplification of the inflammatory process and also induce damage to distant organs.

Living donor intestinal transplantation is almost nonexistent worldwide, so the vast majority of procedures are performed with grafts procured from brain-dead donors. For this reason, the study of the pathophysiology of this process and the search for strategies to improve organ viability represents an area of great interest in the field of organ transplantation.

Therefore, this manuscript aims to explore the process of brain death from the experimental perspective, starting from the reproduction and development of a reliable model involving intestinal transplantation, comparing it with the experimental gold standard (living donor) and its preservation, concluding with a heterotopic transplantation model to evaluate ischemia reperfusion injury.

Chapter I focuses on the development of a reliable model of brain death for use in intestinal transplantation, showing that with 2hs of BD the graft is sufficiently damaged to demonstrate the effect of this process but, at the same time, it is viable for potential transplantation. In the second part, these grafts are tested against the different donation scenarios, and also developed a model of donation after cardiac death Maastrich type III, with the aim of broadening the field of comparison and to establish experimental bases on which there is scarce information in the area of intestinal transplantation, where it is concluded that a graft after 5 minutes of cardiac death has micro and macroscopic conditions to be transplanted.

Understanding the intestine as an organ with a key role on the homeostasis of the other organs, we analyze alternatives to obtain a higher quality graft through the management of

the brain-dead donor during procurement, establishing differences in the use of the vasopressors Noradrenaline and Dopamine. Furthermore, during intestinal transplantation procedures it is very unlikely to perform an immediate transplantation in which the preservation injury is almost nonexistent, for this reason, chapter II reports the basis of the graft quality for intestinal transplantation after different cold preservation times, comparing brain death with different donation scenarios.

Finally, chapter III shows the first results of intestinal transplants in rats with intestines procured from brain-dead rats. In this case, we describe the impact of short reperfusion times and its influence on ischemia-reperfusion of the graft.

Considering the importance of experimental models in the development of pre-clinical trials, the present manuscript intends to collaborate providing knowledge for the development of different studies that will expand the pool of organs available for transplantation, shortening the time on the waiting list and offering a better quality of life for transplanted patients.

ABREVIATURAS.

- mg/kg/min: microgramos por cada kilogramo por minuto
- %PC $\geq$ 4: porcentaje de valores iguales o mayores que 4 en la escala de Park-Chiu
- ADP: adenosin di fosfato
- AMS: arteria mesentérica superior
- ATP: adenosin tri fosfato
- C1: 1º vértebra cervical
- Ca $^{++}$: ión calcio
- Cd3+: linfocito T Cd3+
- CG: células Goblet (Caliciforme)
- CID: coagulación intravascular diseminada
- CO $_2$: dióxido de carbono
- CXCL10: ligando 10 de quimiocina con motivo C-X-C
- DA: dopamina
- DAB: 3,3-Diaminobencidina
- DEV: densidad efectiva de vellosidades
- DMC: diagnóstico de muerte circulatoria/cardíaca
- DME: donante en muerte encefálica
- DV: donante vivo
- ECMO: oxigenación por membrana extra-corpórea
- EEG: electroencefalograma
- EICH O GVHD: enfermedad injerto contra huésped
- EM: espesor de mucosa
- ETCO $_2$: concentración máxima de CO $_2$ espirado
- FC: frecuencia cardíaca
- FiO $_2$: fracción inspirada de oxígeno
- H&E: hematoxilina – eosina (tinción)
- H $_2$ O: agua
- H $_2$ O $_2$: peróxido de hidrógeno
- HIF-1 α : factor inducible por hipoxia 1 alfa
- HTK: solución de preservación Histidina-Triptofano-Ketoglutarato
- Hto: hematocrito
- IF γ : interferón Gamma
- IIR o IRI: injuria por isquemia-reperfusión

- IL1: interleuquina 1
- IL10: interleuquina 10
- IL22: interleuquina 22
- IL6: interleuquina 6
- IL8: interleuquina 8
- IV: intravenoso
- IVC: índice Velloso/Cripta
- K: ión Potasio
- LTSV: limitación de terapia de soporte vital
- MC: muerte circulatoria/cardíaca
- ME: muerte encefálica
- mg: miligramos
- mg/dL: miligramos por decilitro
- Mg⁺: ión Magnesio
- mL/h: mililitro por hora
- mmhg: milímetros de mercurio
- NA; noradrenalina
- Na: ión Sodio
- NPT: nutrición parenteral total
- O₂: oxígeno
- °C: grados celsius
- OH⁻: hidróxido
- PAMPs: patrones moleculares asociados a patógenos
- PBS: phosphate buffered saline (buffer salino fosfato)
- PC: park-chiu (Escala de)
- PCO₂: presión parcial de dióxido de carbono
- PEEP: presión positiva al final de expiración
- pH: potencial hidrógeno
- PIC: presión intracraneana
- PVC: presión venosa central
- RIC: rango intercuartil
- ROS: especies reactivas de oxígeno
- SpO₂: saturación de oxígeno
- STEP: serial transeverse enteroplasty – enteroplastía transversal seriada
- TAM: tensión arterial media
- TC: trasplante combinado

- $TGF\beta$: factor de crecimiento transformante beta
- TIA: trasplante de intestino aislado
- TLR4: receptor tipo toll 4
- TMV: trasplante multivisceral
- $TNF\alpha$: factor de necrosis tumoral alfa
- TV: trasplante visceral
- Txl: trasplante de intestino
- UCI: unidad de cuidados intensivos
- UFC: unidad formadora de colonia
- V/mm^2 : vellosidades por milímetro cuadrado
- VA: ventilación asistida
- VPM: ventilaciones por minuto
- VT: volumen tidal

GENERALIDADES

Anatomía, histología y fisiología del intestino

El intestino delgado es un órgano tubular que se ubica en la cavidad abdominal y se extiende desde el píloro gástrico hasta la válvula ileocecal, donde comienza el intestino grueso.

Macroscópicamente, el intestino delgado se divide en una porción corta y de ubicación retroperitoneal, el duodeno, y una porción más larga, con mayor capacidad de movimiento y envuelta por el mesenterio, denominada yeyuno-íleon. A su vez, éste se subdivide en yeyuno (representando las 2/5 partes) e íleon (3/5 partes restantes).

La transición entre duodeno, yeyuno e íleon es gradual, evidenciando leves cambios histológicos pero con capacidades funcionales distintas entre sí.

La arteria mesentérica superior es la arteria principal del intestino, da ramas yeyunales e ileales que se comunican entre sí formando arcos y desprenden arterias rectas que ingresan al intestino por el borde mesentérico sobre el cual van rodeando toda su pared hasta encontrarse en el borde antimesentérico. Dentro de la pared intestinal, las ramas arteriales serosas perforan la túnica muscular, profundizando aún más hasta llegar a formar un plexo vascular submucoso que le da irrigación a toda la vellosidad intestinal. Desde la punta de la vellosidad intestinal se forman capilares venosos, las cuales se van a fusionar en vénulas y luego en venas de mayor calibre hasta formar la red de venas mesentéricas que drenarán su contenido a la vena porta. (Figura 1)

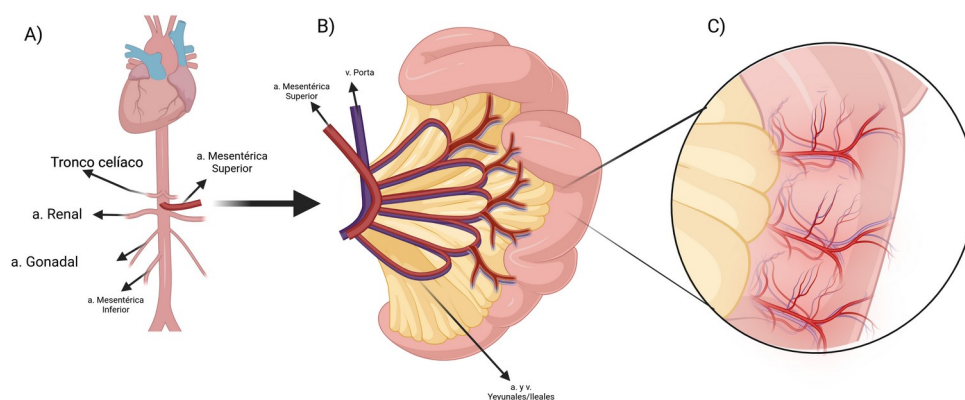


Figura 1: A) Anatomía vascular arterial de la cavidad abdominal, se destaca la irrigación principal del Intestino delgado, B) Irrigación mesentérica y C) irrigación de la pared intestinal. Imagen creada con Biorender.com

El intestino en estado de reposo recibe aproximadamente el 20-25% del gasto cardíaco, mientras que durante la fase posprandial, puede llegar al 35%. De todas maneras, el intestino tiene mecanismos locales que hacen que la circulación intestinal tenga capacidad autorregulatoria, pudiendo así mantener un flujo sanguíneo regular frente a cambios en la presión arterial sistémica.

Estructuralmente, el intestino está compuesto por cuatro túnicas: la mucosa, submucosa, muscular y serosa (Figura 2).

La capa mucosa se pliega en vellosidades que aumentan hasta un 300% la superficie intestinal. Estas vellosidades están compuestas por un núcleo de tejido conectivo laxo que pertenece a la lámina propia, recubierto por un epitelio superficial. Un aumento de superficie adicional se obtiene mediante la presencia de invaginaciones glandulares ubicadas entre las vellosidades, de unos 400µm de profundidad, denominadas criptas de Lieberkuhn, que se extienden a través de casi toda la lámina propia hasta la capa muscular de la túnica mucosa.

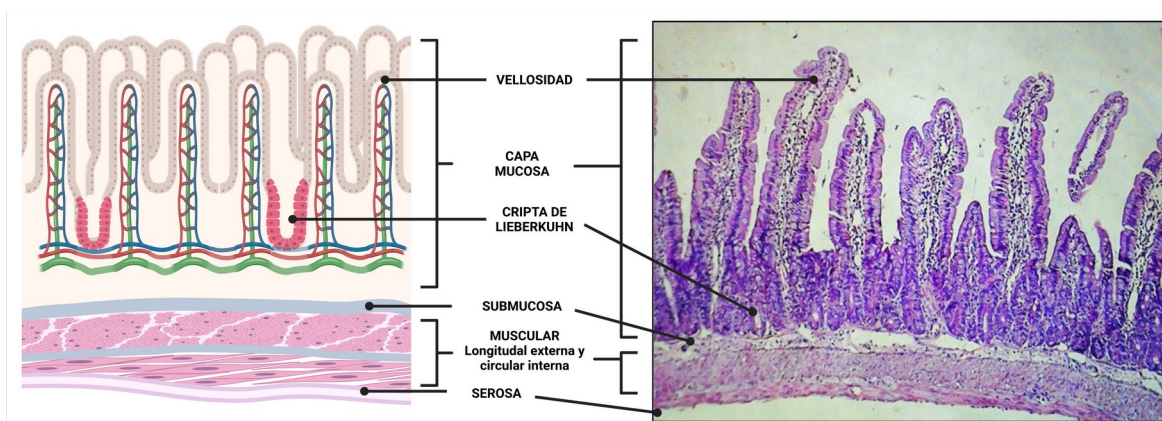


Figura 2: Histología del intestino delgado. A la izquierda se observa un esquema (creado con BioRender.com) y a la derecha un microfotografía 10x de un corte de intestino teñido con HyE.

Los tipos celulares que se pueden hallar en el tejido epitelial de la túnica mucosa son: Células absortivas o enterocitos, células caliciformes o Goblet, células de Paneth, células enteroendocrinas, células madre pluripotenciales y células M (Figura 3).

- Las **células absortivas o enterocitos** son cilíndricas altas, con núcleo en localización basal, que presenta pliegues en su superficie libre denominados microvellosidades de 1µm de alto y 0,1µm de espesor, que tienen por función aumentar la superficie de absorción unas 20veces. Se unen estrechamente entre sí a través de diversos medios de unión que regulan el pasaje de sustancias por la vía paracelular. La ruta transcelular es la vía para el

agua por difusión simple, y a través de bombas de transporte activo ingresan iones, ácidos grasos, aminoácidos y péptidos simples.

- Las **células caliciformes o Goblet** son células productoras de mucina que se adhiere a la membrana mucosa y forma una barrera de protección. Otra de sus funciones es lubricar para facilitar el pasaje de contenido intestinal.
- Las **células de Paneth** se encuentran en el fondo de las criptas de Lieberkhün, son piramidales con núcleo basal y gránulos de secreción eosinófilos. Tienen función fagocítica y bactericida, lo que le confiere una función defensiva frente a infecciones.
- Las células **enteroendocrinas** se encuentran dispersas entre las células absortivas y caliciformes, poseen gránulos de localización basal y su densidad es mayor en el duodeno, disminuyendo a medida que se avanza en el intestino, hasta casi desaparecer en el colon.
- Las **células madre pluripotenciales** se encuentran en las criptas de Lieberkhün y poseen un epitelio más bajo que las células absortivas, apareciendo indiferenciadas en su mayoría. El rol de éste tipo celular es el de diferenciarse y renovar a los diferentes tipos celulares entre ellos a los enterocitos y células Goblet, las cuales poseen una vida media de 3 a 5 días, y a las células de Paneth (30 días de vida media).
- Finalmente las **células M** se encuentran solamente en el epitelio asociado a folículos y placas de Peyer, siendo responsables de un transporte transepitelial que resulta funcional para el establecimiento de respuestas inmunes por parte del tejido linfoide asociado a mucosas.

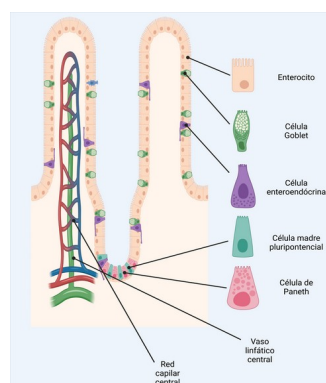


Figura 3: Tipos celulares de la mucosa intestinal (imagen creada con BioRender.com)

En íntimo contacto con la túnica mucosa se encuentra la túnica submucosa, compuesta de un tejido conectivo denso conteniendo vasos sanguíneos y vías linfáticas, además del plexo de Meissner. La lámina propia de la túnica submucosa, compuesta por tejido conectivo laxo que se extiende hasta la parte superior de la vellosidad, aportándole sostén a la barrera epitelial, donde también se encuentran células plasmáticas y linfocitos que participan en la defensa del organismo frente a microorganismos, toxinas, etc. En ésta capa, los linfocitos pueden estar agrupados formando folículos.

La túnica muscular está compuesta por dos capas de fibras musculares, una interna con disposición circular, y otra externa, longitudinal. En esta capa también se ubica el plexo mientérico de Auerbach. El rol fundamental de ésta estructura es el de favorecer la mezcla de los alimentos, así como también el peristaltismo para el transporte del contenido intestinal.

La túnica serosa es la capa más externa del intestino, está compuesta por una densa red de fibras elásticas que se ubican debajo de la capa mesotelial, la cual se ubica en contacto con el resto de la cavidad abdominal. (Figura 2).

Desde una aproximación global, el sistema digestivo tiene seis procesos fundamentales:

- ingestión
- secreción
- mezcla y propulsión
- digestión
- absorción
- excreción

El intestino delgado tiene un rol fundamental en cuatro de esos procesos, siendo éstos la secreción (liberación de enzimas y buffers a la luz intestinal), mezcla y propulsión (a través de los movimientos peristálticos), digestión (la conversión de alimentos a partículas más simples) y la absorción (el pasaje de moléculas simplificadas desde la luz al sistema circulatorio y linfático).

La **digestión** es una de las principales funciones del intestino delgado, y tiene como objetivo transformar los alimentos en partículas más simples para que puedan ser absorbidos por la mucosa intestinal.

Para que esta transformación sea posible es necesaria la intervención de la secreción pancreática, biliar e intestinal.

El jugo pancreático va a intervenir a través de las amilasas y carboxipeptidasas en la digestión del almidón y las proteínas, y de las grasas a través de las lipasas pancreáticas.

La **absorción** de las grasas va a estar favorecida por la acción de las secreciones biliares, aportándole liposolubilidad, como así también dichas secreciones serán importantes en la excreción de bilirrubina y metabolitos endógenos. Por otra parte, las peptidasas incluidas en el jugo intestinal serán responsables del desdoblamiento de péptidos en aminoácidos de fácil absorción, mientras que las hormonas sintetizadas en el intestino como la gastrina, el enteroglucagón, el polipéptido intestinal vasoactivo, entre otros, cumplen un rol preponderante en la facilitación de los procesos digestivos.

La absorción a nivel intestinal tiene dos rutas diferentes (transcelular y paracelular) y tres mecanismos (la absorción pasiva y la absorción activa) para llevar los nutrientes desde la luz intestinal hasta la circulación sanguínea y linfática.

La mayor parte del agua absorbida en el intestino delgado lo hace, esencialmente por difusión, pero también en gran cantidad es arrastrada con el sodio que ingresa a las células. Las vitaminas que se absorben en el intestino lo hacen de manera pasiva en el caso de la A, D y K2, mientras que la K1 y la Vitamina C se absorben por transporte activo.

Los hidratos de carbono ingresan al organismo como monosacáridos, siendo los más abundantes, la glucosa, fructosa y galactosa. En el caso de las grasas, luego de la actividad enzimática del páncreas y las sales biliares, entran al enterocito en forma de miscelas hidrosolubles por pinocitosis.

Los componentes proteicos son absorbidos en forma de aminoácidos, dipéptidos y tri-péptidos utilizando los tres mecanismos antes mencionados, para posteriormente pasar a la circulación por transportadores.

Fuentes: Stringa, 2013; Pucci Molineris, 2017; Geneser, 1999; Tobias, 2012

Trasplante de intestino. Historia y Actualidad.

Reseña histórica

Los primeros trabajos experimentales sobre TxI se remontan a principios del siglo pasado (1901) como parte de las experiencias realizadas por Alexis Carrel con anastomosis vasculares. Recién, más de medio siglo después, en 1959, Richard Lillehei en la Universidad de Minnesota desarrolló el primer modelo canino de auto-trasplante de intestino aislado (TIA), seguido al poco tiempo por Thomas Starzl (Foto 1), quien concibió el primer trasplante multivisceral (TMV) incluyendo como parte del injerto no sólo el intestino, sino también hígado, estómago, páncreas, duodeno y colon.



Foto 1: De izquierda a derecha: Dr. George Mazariegos, Dr. Thomas Starzl y el Dr. Gabriel Gondolesi durante la entrevista "Living Legends" para el International Small Bowel Transplantation Society Symposium, Buenos Aires, 2015

Si bien ambos lograron demostrar su factibilidad técnica, la supervivencia alejada se vio comprometida por la falta de inmunosupresión adecuada.

Simultáneamente, la NPT se encontraba en sus inicios y los pacientes con catástrofes intestinales eran tratados sólo con medidas de soporte hasta que se compensaban o morían de desnutrición en cuidados paliativos. A pesar de los resultados obtenidos, rápidamente se pasó del laboratorio a la clínica y en 1964 Ralph Deterling en Boston realiza el primer trasplante de intestino en humanos (caso no publicado), seguido nuevamente por Lillehei, quien en 1967 publica el pri-

mer TxI en humanos. A esta experiencia inicial le siguieron 7 casos más, los cuales tuvieron las mismas causas de fracaso observadas en el laboratorio: rechazo y sepsis. Estas vivencias fueron repetidas por Starzl en Pittsburgh con las mismas causas de fracaso. Es importante mencionar que en 1968 Okumura y col, realizaron en San Pablo, Brasil, las primeras dos experiencias clínicas en Latinoamérica en receptores adultos, quienes fallecieron en el pos-trasplante inmediato.

La carrera por el desarrollo de este trasplante se detuvo hasta la década del `80 en la que el progreso y los éxitos observados en otros trasplantes (renal y hepático) con la aparición de la ciclosporina llevaron a reiniciar la experiencia clínica, la cual fue entonces necesaria no sólo por el hecho de mostrar la factibilidad del procedimiento, sino porque se empezaron a observar, con frecuencia progresiva, las complicaciones asociadas a la NPT: la pérdida de accesos vasculares, la sepsis recurrente del catéter y la colestasis asociada a la NPT; y esto generó la incógnita de qué ofrecerles después. Estos pacientes eran derivados para trasplante, en condiciones extremadamente críticas y en general como candidatos a doble trasplante (hepato-intestinal).

En esta década Delta y Kiel en Alemania, David Grant en Canadá y nuevamente el grupo de Thomas Starzl publicaron los primeros casos y series de TIA, trasplante combinado (TC) en bloque y TMV con sobrevida alejada (57% y 50% a 1 y 3 años, respectivamente). En la década del `90 la aparición del FK-506 o tacrolimus, el desarrollo de diferentes innovaciones técnicas y la experiencia alcanzada por centros dedicados hicieron que el TxI sea aceptado como una opción terapéutica válida para pacientes con insuficiencia intestinal e imposibilidad de continuar en soporte parenteral, estimulándose además la derivación precoz que llevaría finalmente a la mejoría de los resultados.

Finalmente, en octubre del año 2000 el TxI dejó de ser una práctica experimental para ser considerado una práctica clínica estándar y aprobada para su financiamiento por el Health Care Financial Administration en Estados Unidos, sólo en centros con una experiencia mayor a 10 trasplantes y sobrevida mínima del paciente de 65% al año.

De acuerdo al informe de la *Intestinal Rehabilitation & Transplant Association* del año 2019 (Figura 4) el número de centros de TxI registrados era de 97. Entre 1985 y 2019 se realizaron un total de 4103 TxI, siendo el 44,9% TxI aislados, 30,5% hepato-intestinal y un 24,6% entre multivisceral y multivisceral modificado, registrándose un total de 2060 (50% de supervivencia) pacientes trasplantados activos. La indicación más común fue intestino corto en casi el 70% de los casos, seguido de tumores y desórdenes de la motilidad cercano al 10%.

La experiencia pediátrica desde el año 1985 a la actualidad marca que se realizaron 2096 TxI, siendo un 46,42% hepato-intestinal, 34,73% TxI aislados y un 18,8% entre multivisceral

y multivisceral modificado, con una tasa de supervivencia actual del 46% (972 pacientes pediátricos activos).

Global Pediatric Clinical Experience		Global Clinical Experience: Intestinal Tx	
(All recipients < age 18 years transplanted between Jan 1985 – June 2019)		(All recipients transplanted between Jan 1985-June 2019)	
<u>Number of Transplants:</u>	2096	<u>Number of Transplants:</u>	4103
SB Alone	728	SB Alone	1842
SB+Liver	973	SB+Liver	1251
MVT	348	MVT	810
Modified MVT	47	Modified MVT	200
Current Survivors	972/2096 (46%)	Current Survivors	2060/4130 (50%)
Intestinal Transplant Registry Report © 2019		Intestinal Transplant Registry Report © 2019	

Figura 4: Datos de la actividad de TxI adultos y pediátricos desde enero de 1985 a junio de 2019. (imagen cedida gentilmente por Intestinal and Rehabilitation and Transplant Association. Dr Gabriel Gondolesi.

Candidatos a trasplante

Los pacientes con una función intestinal deficiente que no pueden ser mantenidos con alimentación intravenosa son candidatos potenciales para el trasplante. El "síndrome del intestino corto", es la causa más común de insuficiencia intestinal. En ocasiones suele darse por haber extirpado quirúrgicamente la mayor parte del intestino para tratar una enfermedad intrínseca o bien, todo el intestino está presente, pero es incapaz de absorber suficientes líquidos y nutrientes.

La rehabilitación intestinal es el primer paso para garantizar que se han probado todos los tratamientos posibles. Esto incluye un enfoque multidisciplinario para el manejo del paciente que involucra la experiencia de nutricionistas, farmacéuticos, gastroenterólogos, pediatras.

Las indicaciones comunes para el trasplante intestinal incluyen:

- Síndrome de intestino corto causado por vólvulo, gastrosquisis, traumatismo, enterocolitis necrotizante, isquemia, enfermedad de Crohn, enteritis por radiación.

- Mala absorción causada por la enfermedad de inclusión microvellositaria, diarrea secretora, enteritis autoinmune.

- Mala motilidad causada por pseudobstrucción, aglionirosis (enfermedad de Hirschprung), neuropatía visceral.

- Tumor como el desmoide, poliposis familiar (enfermedad de Gardner)

La mayoría de los niños y adultos evolucionan bien con la nutrición parenteral total (NPT), y el trasplante puede no estar indicado para estos pacientes. En algunos de estos pacientes, los tratamientos adecuados y las operaciones de salvamento intestinal, como la exploración y la adhesiolisis y los procedimientos de STEP (Enteroplastía Transversal Seriada), pueden restablecer la integridad intestinal y permitir una buena absorción. El trasplante, sin embargo, es una opción que puede salvar la vida de los pacientes con insuficiencia intestinal en los que ha fracasado la cirugía de rescate o que no toleran la NPT. Dado que las tasas de supervivencia de los pacientes son mejores tras los trasplantes intestinales aislados, éste es el tipo de trasplante de elección. Los trasplantes combinados de intestino e hígado o los trasplantes multiviscerales son opciones para los pacientes que desarrollaron una insuficiencia hepática con la NPT o para los pacientes que tienen tumores grandes y locales que sólo pueden erradicarse extirpando varios órganos.

Tipos de trasplante intestinal

Existen cuatro tipos principales de trasplante intestinal (Figura 5):

- trasplante intestinal aislado
- trasplante de hígado e intestino
- trasplante multivisceral
- trasplante multivisceral modificado

Tipos de injertos: intestino, hígado-intestino y multivisceral. La inclusión del complejo pancreaticoduodenal es opcional con el injerto de hígado-intestino. Un injerto multivisceral debe incluir el estómago en bloque con los demás órganos viscerales sin (modificado) o con (completo) el hígado. El colon, el páncreas y el riñón también pueden añadirse en bloque al injerto, con la excepción del injerto sin hígado, cuando el riñón sólo puede trasplantarse por separado.

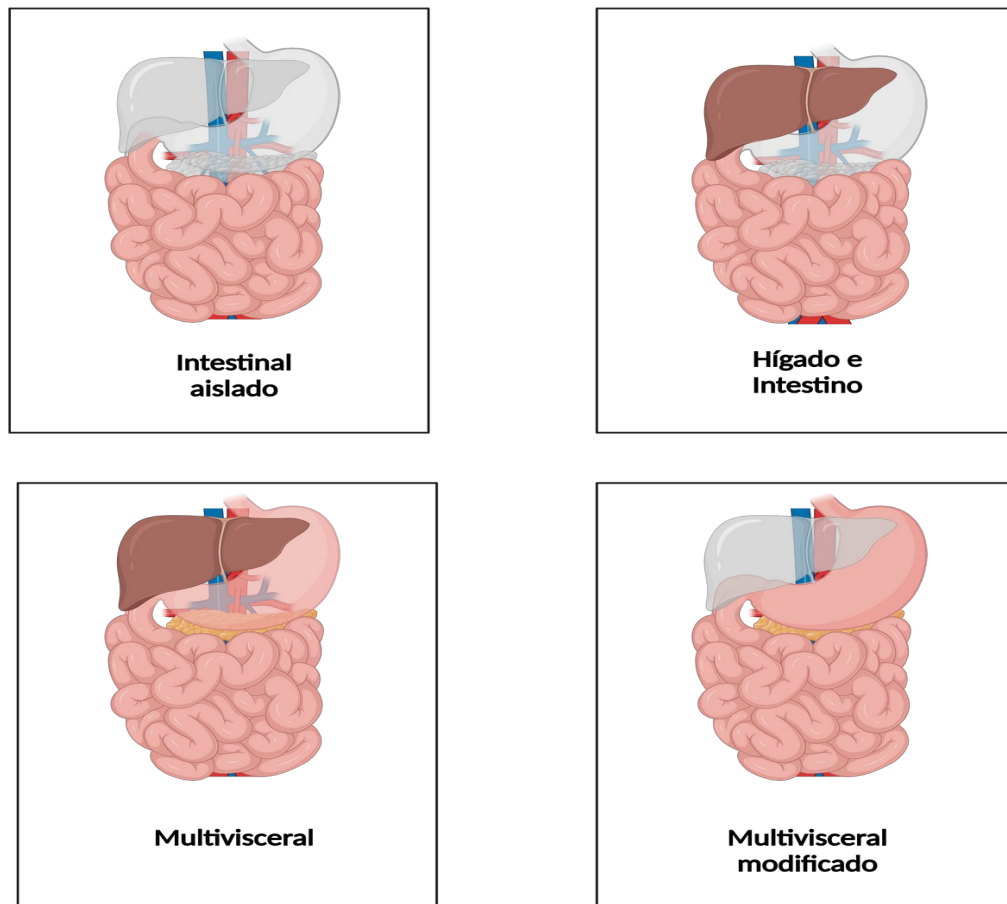


Figura 5: Tipos de injerto para TxI. Imagen creada con BioRender.com

FUENTE: Gondolesi, 2009; Stringa, 2013; Pucci Molineris 2017, <https://tts.org/irta-resources/irta-resources>)

Muerte encefálica y trasplante de órganos

Introducción

Según la Academia Americana de Neurología, la muerte encefálica se define como la pérdida irreversible de la función del cerebro y el tronco encefálico (Floerchinger, Oberhuber, y Tullius 2012). Si bien desde el punto de vista científico esta definición parece inobjetable, desde una mirada pragmática y sociológica, aún presenta ciertas controversias.

Hacia mediados del siglo 20, la definición de muerte aún se asociaba a la disfunción irreversible del corazón y los pulmones, pero con el advenimiento de la desfibrilación cardíaca (Claude Beck, 1947) y la ventilación mecánica a presión positiva (Bower y Bennett, 1950) se planteó el dilema de la “reversibilidad de la muerte”. Para 1955 la ventilación mecánica era una práctica difundida en la medicina del momento, generando la necesidad de buscar la claridad en aspectos diagnósticos, pronósticos y éticos para aquellos pacientes en coma con daño cerebral (De Georgia 2014). Las unidades de cuidados intensivos tenían pacientes con pulso, considerados vivos, pero que pasaban mucho tiempo en la misma situación y nunca recuperaban la posibilidad de respirar espontáneamente, es por éste motivo que fue necesario crear un consenso sobre cuándo retirar el soporte vital en los pacientes que ya no tenían posibilidades de recuperarse.

Con la terapia del trasplante de órganos en franco desarrollo (1954 Murray, realiza el primer trasplante renal entre gemelos idénticos, en 1962, el primero con donante cadavérico y en 1963 Starlz el primer trasplante hepático, entre los más destacados) en 1968, un comité de la Universidad de Harvard, se reunió para generar un consenso que sirva de criterio para evaluar y decidir cuál era el momento en el que el coma era irreversible, y por consecuencia, poder iniciar la procuración de los órganos. Cabe mencionar que éste comité, se refería a un “coma irreversible”, y éste problema de definición hizo (y hace aún) que se relacione al coma con la muerte cerebral erróneamente. La muerte cerebral es una situación que se relaciona sólo con algunos tipos de coma. (De Georgia 2014; Casares 2003).

Los requisitos de Harvard mencionan que el paciente no debe tener hipotermia ni encontrarse bajo el efecto de drogas depresoras del sistema nervioso central. Los criterios que lo definen son: coma profundo sin respuesta a estímulos, ausencia de respiración espontánea y ausencia de reflejos del tronco encefálico. El diagnóstico es esencialmente clínico, pero al momento de la creación de éste consenso, debía confirmarse con electroencefalograma plano y repetir la exploración a las 24hs para considerar al cuadro irreversible.

Hacia 1971 Mohandas y Chou publican una serie de criterios, a la postre conocidos como “Criterios de Minnesota”, en los que tomaban como base a los criterios de Harvard, estableciendo el daño irreversible del tallo encefálico como criterio de muerte, relegando al electroencefalograma y acortando los tiempos de reevaluación a 12hs en lugar de 24hs. (Casares 2003).

Fisiopatología de la Muerte Encefálica

En su gran mayoría, la muerte cerebral se da en adultos por trauma craneano o por hemorragias subaracnoideas espontáneas (Accidentes Cerebro Vascular). De todas maneras, y a pesar de algún tipo de variabilidad, la fisiopatología de la muerte encefálica podría explicarse de un modo global que sirva de puntapié inicial para la comprensión de muchas de las consecuencias que ésta genera en la donación de órganos.

Cabe destacar que la enorme complejidad de éste proceso hace que aún siga siendo objeto de exhaustivos estudios que colaboren a mejorar la calidad de los órganos procurados.

Como en toda lesión isquémica, las zonas más alejadas de la irrigación principal son las que primero resultan afectadas, es decir que en el encéfalo esto ocurre desde rostral a caudal, y simultáneamente, se van produciendo los cambios a nivel sistémico.

Inicialmente, la lesión comienza en activación vagal con bradicardia e hipotensión. Posteriormente, la isquemia del puente encefálico resulta en estimulación simpática con modulación parasimpática, clínicamente se evidencia con el reflejo de Cushing (hipertensión marcada, con posterior descenso hasta la normotensión) y bradicardia (Drake y Bernard 2018). Con la isquemia del núcleo vagal cardiomotor, se suprime la modulación parasimpática, y con esto sobreviene una liberación descontrolada de catecolaminas miocárdicas y sistémicas, dando como resultado una vasoconstricción con aumento de la resistencia vascular periférica y la de la presión arterial. Lo que parecería ser “el último esfuerzo” para reestablecer la perfusión cerebral. Ésta descarga masiva de catecolaminas, supone una caída en la presión de perfusión de los órganos, generando daño en los potenciales órganos trasplantables (Chudoba et al. 2017).

Finalmente, el aumento de la presión Intracraneana y la isquemia, afectan a la amígdala cerebelar y la médula espinal a nivel de C1, disminuye la estimulación simpática, lo que a nivel clínico se observa como disminución en la presión arterial, frecuencia y gasto cardíaco, e hipoperfusión esplácnica.

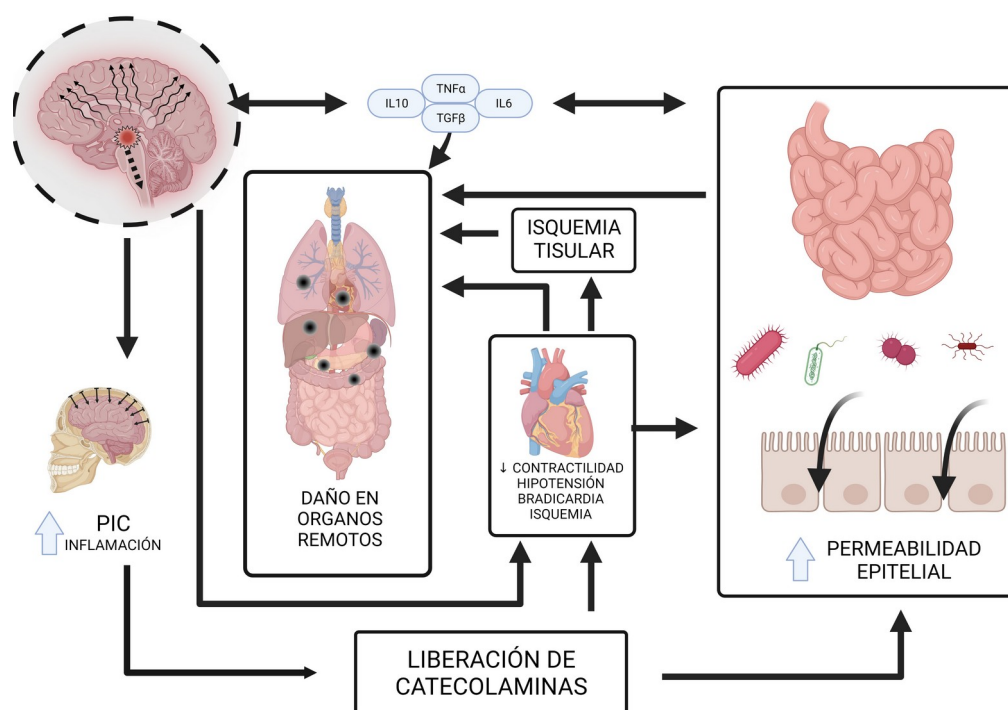


Figura 6: Esquema del impacto de la ME y el rol del intestino en el daño en órganos remotos.
(Imagen creada con BioRender.com)

El impacto visceral de la muerte encefálica comienza desde la aparición del primer evento injuriante al encéfalo (Choi et al. 2021). A medida que la injuria se mantiene en el tiempo el daño encefálico tiende a hacerse irreversible, de ésta manera la presión intracraneana (PIC) aumenta, generando inflamación del encéfalo lo cual va a exacerbar la tormenta de catecolaminas que se inició con la injuria al encéfalo, evento que dará paso a la mencionada disfunción cardíaca que dará como resultado isquemia tisular. Por otra parte, el aumento desmedido de catecolaminas circulantes promoverá un daño a nivel de la barrera intestinal (Takenaka, Guerreschi, y Basso 2017; You et al. 2021), permitiendo la traslocación bacteriana y auto-perpetuando la liberación de citoquinas pro-inflamatorias, junto con el daño cerebral inicial. Consecuentemente, el daño a los órganos trasplantables va a estar dado, inicialmente, por la isquemia tisular general, el aumento de citoquinas pro-inflamatorias y la traslocación bacteriana a partir del daño de la mucosa intestinal. (Figura 6)

Diagnóstico de muerte encefálica.

Basados en los criterios de Harvard de 1969, con la modificación de Minnesota en 1971, el diagnóstico de muerte encefálica, aunque con variaciones prácticas a nivel mundial, es clínico, y sigue 3 pilares fundamentales: Coma, reflejos troncales y test de apnea.

- Coma: como requisito de inclusión, es necesario que los pacientes no se encuentran en hipotermia, ni bajo los efectos de drogas depresoras del sistema nervioso central. Se evalúa la respuesta al dolor profundo (por presión del nervio trigémino), a la luz intensa y sonidos de alto volumen. La ausencia de respuesta indica una lesión en los nervios craneales.
- Reflejos troncales: éstos incluyen el reflejo pupilar (ausencia de miosis indica lesión de los pares craneales I y III a nivel del mesencéfalo), reflejo orofaríngeo y traqueal (pares IX y X a nivel del bulbo), reflejo corneal (V y VII en protuberancia), reflejos oculocefálicos (pares craneales VIII, III y VI, a nivel de los núcleos del tronco encefálico). El reflejo oculovestibular, se evalúa instilando solución fría en el canal auditivo con la cabeza girada 30°, la ausencia de movimiento ocular indica que hay lesión a diferentes niveles del tronco encefálico.
- Test de apnea: habiendo cumplido los requisitos anteriores se procede al test de apnea. La base de ésta prueba es llevar la presión de CO₂ hasta unos 60mmhg, presión en la cual se produce la máxima estimulación del centro respiratorio.

Para esto se realiza una ventilación previa con oxígeno al 100% para evitar la hipoxemia y se corta la ventilación asistida durante 10 minutos. La confirmación de ésta prueba indica una lesión irreversible a nivel del centro respiratorio (Shutter 2014).

Para confirmar la muerte por criterios neurológicos, es necesario observar las alteraciones antes mencionadas por un período de tiempo, para lo cual la ley Argentina, a través del Ministerio de Salud en su Resolución 716/2009 artículos 36 y 37 Ley Nacional 27447.

- Entre los 7 y los 60 días de edad, el período mínimo será de 48hs
- Entre los 2 meses y el año de edad será de 24hs
- Desde el año hasta los 6 años de edad, el período de observación será de 12hs.
- A partir de los 6 años el período de observación será de al menos 6hs.

Hay determinadas circunstancias en las cuales las pruebas diagnósticas no pueden llevarse a cabo, tal es el caso de un trauma facial severo, posibilidad de que haya altos niveles de depresores del SNC, o el hecho de no poder concluir el test de apnea debido a hipoxemia o hipotensión.

Para aquellos casos como los antes mencionados, existen las llamadas pruebas auxiliares (o instrumentales) que se dividen en dos grandes grupos: Métodos electrofisiológicos y métodos que estudian el flujo sanguíneo cerebral (Protocolo Nacional para Certificar el diagnóstico de Muerte Bajo Criterios Neurológicos, Ministerio de Salud de La Nación, año 2010).

- Métodos Electrofisiológicos:
 - o Electroencefalograma (EEG)
 - o Potenciales Evocados Multimodales.
- Métodos que estudian el flujo sanguíneo:
 - o Arteriografía de los cuatro vasos cerebrales.
 - o Ecodoppler transcraneal.
 - o Angiografía cerebral radiosotópica.

Mantenimiento del donante

Fuente: Comisión de Selección y Mantenimiento del Donante de Órganos, versión preliminar, INCUCAI, año 2005.

Es tarea del coordinador hospitalario de trasplante, tanto la detección del potencial donante como la coordinación conjunta con el médico de guardia del mantenimiento del donante hasta la extracción de los órganos.

El objetivo principal es alcanzar valores considerados normales.

Manejo Hemodinámico:

La HIPOTENSIÓN es el hallazgo más frecuente en el potencial donante, siendo cercano al 80%, esto puede darse por pérdida del tono vasomotor, por disminución de la actividad miocárdica o por hipovolemia.

Inicialmente deben controlarse todas las potenciales hemorragias, mantener un hematocrito superior a 30% y evaluar que la PVC sea mayor a 8cm de H2O.

El primer paso en la corrección de la hipotensión es la administración de soluciones cristaloides (Ringer Lactato/ Solución Salina 0.9%) o coloides (Albúmina al 5% o Gelatinas).

El objetivo principal es mantener la TAM por encima de 65mmhg y una PVC de entre 10/15cmh2o.

Si bien en la mayoría de los potenciales donantes deberían poder manejarse exitosamente con resucitación con líquidos y bajas dosis de vasopresores, el uso de éstas drogas está ampliamente distribuida en todo el mundo sin que exista un consenso sobre el uso óptimo de cada droga y su impacto en los diferentes órganos trasplantables (Vecchio Dezillio et al. 2021; Frenette, Williamson, Weiss, Rochweg, Ball, Brindamour, and Charbonney 2020).

La HIPERTENSIÓN no es frecuente en el mantenimiento del potencial donante, pero sí puede serlo durante la instauración de la muerte encefálica dada la liberación masiva de catecolaminas.

Su tratamiento es importante para evitar lesiones hemorrágicas y/o microinfartos en órganos como el corazón y el pulmón.

El objetivo es mantener la TAM en valores menores a 90mmhg cuando el donante es hipertenso, pero siempre por encima de 65mmhg. El tratamiento se instaura cuando la TAM se mantiene por encima de 95mmhg durante 30 minutos, en ese momento se reduce (o discontinúa) la medicación vasopresora y se inicia tratamiento con beta bloqueantes.

Glucemia:

El paciente se considerará hipoglucémico cuando la glucemia sea inferior a 75mg/dL y su tratamiento es con dextrosa al 25%.

Es frecuente hallar hiperglucemia en los potenciales donantes, en general suele estar asociado al uso de corticoides, soluciones glucosadas, menor secreción de insulina por el páncreas y resistencia periférica a la insulina. Su tratamiento consiste en retirar el aporte de soluciones glucosadas y la administración de insulina endovenosa.

Temperatura:

La muerte encefálica causa pérdida de la regulación térmica del donante. El objetivo principal es mantener la temperatura corporal entre 36 y 37.5°C. La temperatura debe monitorearse de manera central (catéter pulmonar, temperatura esofágica, vesical o rectal).

Además de la adecuación de la temperatura ambiente y de minimizar la exposición del cuerpo del donante, es ideal para el tratamiento de la hipotermia el uso de mantas térmicas y líquidos IV atemperados.

Si bien es menos frecuente, hay casos en los que la HIPERTERMIA puede presentarse en forma de picos febriles, lo que suele coincidir con la fase final de la lesión del centro termorregulador. Para su tratamiento se deben retirar los métodos de calentamiento y si persiste utilizar paracetamol 500mg vía nasogástrica cada 4hs.

Anemia:

Como se mencionó antes el hto debe mantenerse no menor a 30%, en caso de que ese valor descienda se transfunden Glóbulos Rojos Sedimentados.

Coagulación:

Se busca mantener valores normales de tiempo de protrombina (menor a 14.5 segs), recuento de plaquetas (mayor a 150mil/mm³), tiempo parcial de tromboplastina (35.6 segs) y fibrinógeno (150-350 mg/dl), su tratamiento se basa en el uso de plaquetas o plasma fresco congelado.

Ventilación mecánica:

En el potencial donante, el manejo respiratorio se suele complicar por la existencia de injuria pulmonar primaria o por la presencia de edema pulmonar de origen neurogénico.

Luego del diagnóstico de muerte encefálica, el objetivo de la ventilación mecánica será alcanzar una saturación de O₂ mayor al 95% con la menor FiO₂ posible (idealmente menor al 40%).

Lo recomendable es:

- Ventilación controlada por Volumen (VCV)
- PCO₂ entre 35-40 mmHg
- Ph arterial 7.35 – 7.45

- Volumen Corriente (Tidal) 8-10 ml/kg peso ideal
- PEEP (presión positiva de fin de espiración) > 5 cm H₂O
- Presión Plateau (meseta) < 30 cm H₂O
- Patrón de flujo desacelerado
- Ventilación por minuto 8-10 l/min
- Flujo pico 60 l/min.

Electrolitos:

El monitoreo del balance electrolítico tiene un rol importante en el mantenimiento del potencial donante. Algunos de los electrolitos que se monitorean y deben mantenerse en niveles lo más cercano a lo normal posible son: Sodio, Potasio, Magnesio, Fósforo y Calcio.

Alteraciones del estado ácido-base:

El Ph sanguíneo debe mantenerse entre 7.35 y 7.45.

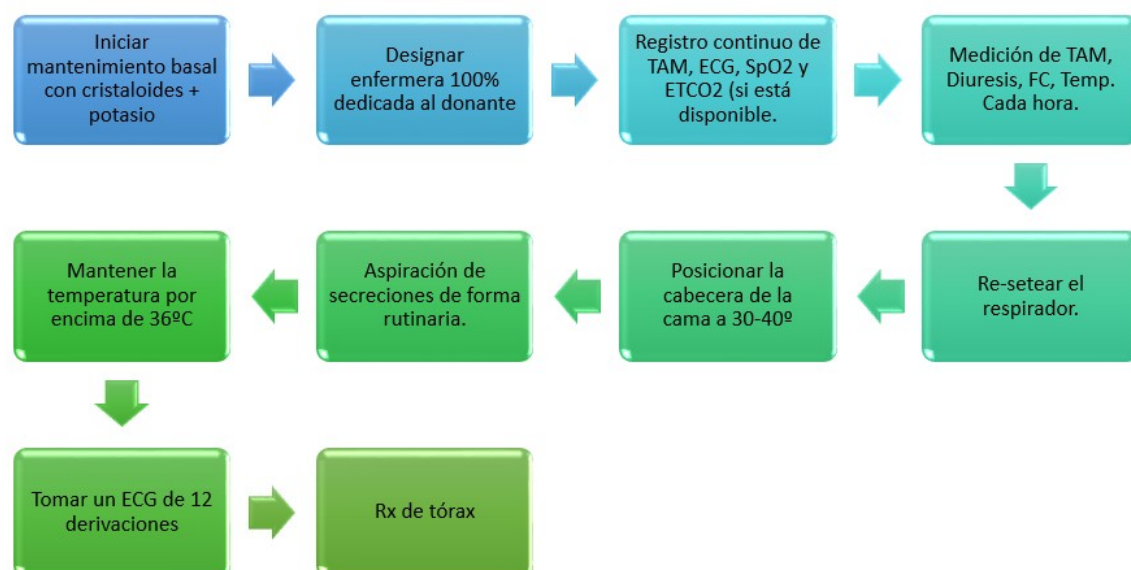


Figura 7: Algoritmo para el manejo del potencial donante.

PRESERVACIÓN DE ÓRGANOS PARA TRASPLANTES.

Introducción.

A lo largo de la segunda mitad del siglo XX, el trasplante de órganos sólidos pasó de ser esencialmente un foco de investigación quirúrgica a ser un tratamiento establecido para la insuficiencia orgánica terminal.

Aunque la donación de órganos ha aumentado gracias a la educación pública y a las campañas publicitarias, las indicaciones para el trasplante también se han ampliado, lo que ha agravado la escasez de donantes.

La innovación en la preservación de órganos se considera una parte importante de una estrategia coordinada para ampliar el conjunto de donantes. La preservación de órganos es el proceso por el cual los órganos se mantienen viables fuera del organismo del que fueron extraídos, es esencial para evitar el deterioro de los órganos del donante desde el momento en que se extraen del mismo, su posterior transporte y almacenamiento, hasta su implantación en el receptor. (Abbas y Friend 2020).

Historia.

(NdA: el texto referente a la historia de la preservación de órganos es un resumen traducido del review: Jing L, Yao L, Zhao M, Peng LP, Liu M. Organ preservation: from the past to the future. Acta Pharmacol Sin. 2018 May;39(5):845-857. doi: 10.1038/aps.2017.182. Epub 2018 Mar 22. PMID: 29565040; PMCID: PMC5943901. El nivel de detalle y la organización encontrada en el mencionado artículo me motivo a resumirlo y compartirlo en este breve segmento del trabajo, espero lo disfruten)

“...La perfusión de órganos como técnica primitiva.

La conservación de órganos se desarrolló a partir del concepto primitivo de circulación extracorpórea, que surgió por primera vez en 1812 en la monografía de Cesar Julien Jean Le Gallois. Éste especuló que "si se pudiera suplir el lugar del corazón por medio de una inyección -y si, para la continuidad regular de esta inyección, se pudiera suministrar una cantidad de sangre arterial, ya sea natural o formada artificialmente, suponiendo que tal formación fuera posible-, entonces se podría mantener indefinidamente la vida en cualquier porción". En 1849, el científico alemán Carl Eduard Loebell describió en su Disertación Inaugural los primeros experimentos de perfusión en riñones aislados de cerdo. Observó que la sangre arterial de color rojo brillante perfundida a través de riñones porcinos se volvía oscura y viscosa en su recorrido por las venas renales.

En 1885, Max von Frey y Max Gruber construyeron el primer sistema cerrado de circulación artificial, que comparte muchas similitudes con los sistemas actuales de perfusión de órganos. En 1895, Jacoby creó un aparato de doble circulación, que utilizaba un pulmón aislado como oxigenador y permitía la perfusión de órganos durante varias horas.

Estos primeros estudios condujeron al desarrollo de la oxigenación por membrana extracorpórea (ECMO) y al posterior desarrollo de sistemas de perfusión para la preservación de órganos.

De sangre a una solución químicamente definida.

En 1937, Alexis Carrel perfundió tiroides de gato aisladas en el aparato de Lindbergh con una solución de Tyrode compuesta por glucosa, iones y un 40%-50% de suero homólogo. Comprobó que los órganos eran viables durante 3-21 días. Sin embargo, el cultivo de más de 6 días mostró una tendencia a la hiperplasia.

En 1968, Hou et al cultivaron placentas humanas normales en un medio de cultivo químicamente definido. Las placentas se mantuvieron viables durante al menos 14 días, pero el estroma sufrió una gran modificación en 3 días. Estos estudios demostraron que los órganos o tejidos eran capaces de sobrevivir fuera del cuerpo durante varios días en condiciones normotérmicas en un medio de cultivo. Sin embargo, el mantenimiento de la morfología histológica normal de los órganos cultivados planteó problemas que frenaron la investigación sobre el cultivo de órganos durante varias décadas.

Temperatura: de normotérmica a hipotérmica.

Originalmente, los órganos se perfundían a temperatura ambiente. En 1876, Bunge y Schmiedeberg añadieron un baño de agua al circuito para mantener la sangre perfundida a temperaturas fisiológicas. Más tarde, los científicos empezaron a especular que el uso de temperaturas más bajas podría atenuar el daño a los órganos durante la perfusión al disminuir el metabolismo celular.

En la década de 1960, se realizaron varios experimentos con suero diluido enfriado o suero diluido enfriado o sangre heparinizada, y la perfusión renal se prolongó de horas a días. Sin embargo, el uso de sangre fría también planteó problemas, como el espasmo vascular en los injertos renales.

De la modalidad dinámica a la estática

En la década de 1960, los riñones se conservaron con éxito durante 3-5 días mediante la perfusión continua con sangre o plasma oxigenados y refrigerados. Sin embargo, este método requería un equipo complejo y costoso, lo que limitaba su disponibilidad y dificultaba enormemente el transporte de los órganos. En 1969, Collins consiguió conservar con éxito riñones caninos durante 12 horas sumergiéndolos en una solución salina helada, y posteriormente prolongó el tiempo de conservación en frío hasta 30 horas con la solución de Collins. Este sencillo método de conservación de órganos era más rentable y conveniente para el transporte de órganos que sus predecesores. El nacimiento de la preservación estática en frío sustituyó a los métodos de perfusión dinámica y se convirtió en el método estándar de preservación de órganos.”

Daño por preservación.

Fisiopatología y bases de la preservación de órganos

La extracción, el almacenamiento y el trasplante de un órgano sólido de un donante alteran significativamente la homeostasis del medio interno del órgano y sus efectos se manifestarán en el grado en que recupere o no su función tras el trasplante. La lesión del órgano ocurre principalmente como resultado de la isquemia, y las diferentes técnicas de preservación de órganos sirven para minimizar este daño y mejorar la función y la supervivencia del injerto. (Cobo y del Río Gallegos 2009)

Existen 3 mecanismos principales de lesión tisular: Isquemia, reperfusión e hipotermia.

ISQUEMIA: La ausencia de flujo durante el período de isquemia precipita la aparición del ineficiente metabolismo anaerobio, que conduce a la deprivación de fosfatos de alta energía y a la acumulación de productos ácidos (incluido el ácido láctico). La bomba sodio-potasio (dependiente de ATP) queda inoperante y se pierden los gradientes iónicos transmembrana, lo que lleva a la disfunción de las mismas y la aparición de edema celular, pérdida del balance iónico (Na, K, Ca++) y shock osmótico.

REPERFUSION: Aunque la reperfusión de los órganos es fundamental para la recuperación del injerto y su correcta función, también acarrea consigo el vertido de los metabolitos tóxicos que se generaron durante la isquemia hacia la circulación sistémica, generando de esa manera daño local y remoto, lo cual puede estar íntimamente relacionado con el rechazo agudo del injerto.

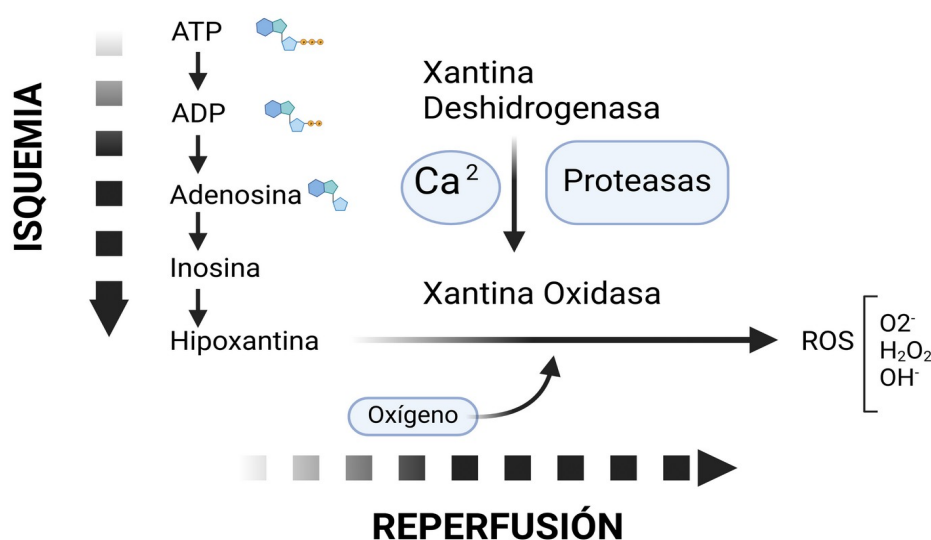


Figura 8: Esquema del mecanismo del daño por Isquemia-Reperfusión. Modificado a partir de Stringa y cols 2013

Durante la fase de isquemia, el metabolismo del ATP sufre cambios debido al medio ácido en el que se encuentra, esto tiene como consecuencia la formación de radicales libres de oxígeno durante el período de reperfusión, lo cual desencadenará una serie de daños a la respiración lipídica y mitocondrial con consecuente destrucción celular. (Figura 8). El oxígeno molecular es captado por la enzima xantino oxidasa (modificación de la xantino deshidrogenasa durante la isquemia) dando por resultado moléculas con electrones no apareados altamente reactivos tales como anión superóxido: O_2^- , hidroxilos: OH^- y peróxido de hidrógeno: H_2O_2 que reaccionan con los ácidos grasos polinsaturados tanto de la membrana plasmática como del sistema de endomembranas generando poros que exacerban el edema celular. Esta acción en particular sobre la membrana mitocondrial provoca la presencia en el citosol de moléculas apoptóticas y proapoptóticas que conducen a la muerte celular programada. Además la isquemia genera la expresión de la enzima óxido nítrico sintasa inducible, con el concomitante aumento del óxido nítrico (NO) en un afán por generar vasodilatación y el mismo al combinarse con O_2^- genera peroxinitritos ($ONOO^-$), compuesto altamente reactivo en medio ácido afectando significativamente la homeostasis celular. (St. Peter, Moss, y Mulligan 2003)

Asimismo, la producción de radicales libres de oxígeno activa la producción de prostaglandinas, incluidos el leucotrieno b_4 y el factor activador de trombocitos, produciendo adherencia leucocitaria, contribuyendo a la lesión local por taponamiento de la microcirculación.

La isquemia-reperfusión se asocia a la liberación marcada de $TNF\alpha$, $IFN\gamma$, $IL1$ e $IL8$. Estas citoquinas producen adherencia leucocitaria y tapones plaquetarios tras la revasculariza-

ción, aportando considerablemente al fallo del injerto y posterior rechazo.(Cobo y del Río Gallegos 2009; Petrenko et al. 2019; Rauen y de Groot 2004).

HIPOTERMIA: si bien el fundamento de la preservación hipotérmica es la supresión o enlentecimiento del metabolismo y de las enzimas catabólicas a 4°C, no le resulta completamente inocua al órgano. La hipotermia afecta la actividad de la bomba Na/K ATPasa lo que favorece el edema celular por el ingreso de H₂O junto con el Na al citosol, además el ingreso de Ca actúa como un potente activador enzimático. También se generan desbalances en la homeostasis iónica, aumentando la permeabilidad mitocondrial e induciendo apoptosis.(Cobo y del Río Gallegos 2009; Lautenschläger et al. 2018; Rauen y de Groot 2004).

Métodos de preservación.

Desde la década del '60 el gold standard para la preservación de órganos es la preservación estática en frío (Roskott et al. 2011), el uso de máquinas de preservación dinámica ha tenido un extenso desarrollo a lo largo de la historia en el campo de los trasplantes de órganos, y aunque aún en la actualidad son procedimientos costosos y no están totalmente estandarizados, hay una alta tendencia a ser utilizadas en órganos como riñón e hígado (Treckmann et al. 2011; Maathuis, Leuvenink, y Ploeg 2007)

Preservación estática en frío.

El objetivo de ésta técnica radica en disminuir la temperatura del órgano con el fin de ralentizar el metabolismo celular para dilatar al máximo posible el deterioro del tejido.(Cobo y del Río Gallegos 2009).

Es el método mas habitual y también el menos costoso. Consiste en perfundir al órgano por la vía vascular con solución de preservación a 4°C antes de su extracción completa y posteriormente colocarlo en un baño de la misma solución de lavado también a 4°C (Cobo y del Río Gallegos 2009; Maathuis, Leuvenink, y Ploeg 2007; Abbas y Friend 2020).Con éste método, además de conseguir un enfriamiento homogéneo del órgano, la perfusión vascular permite el arrastre de elementos formes, isoaglutininas y factores de la coagulación que dificultarán la microcirculación.

Preservación en máquina de perfusión.

Con el objetivo de ampliar la disponibilidad y mejorar la calidad de órganos para trasplantes, se ha trabajado mucho en el uso de máquinas de perfusión para la preservación de órganos. (Cameron y Cornejo 2015; Petrenko et al. 2019)

El objetivo es permitir a través de un flujo controlado, que puede ser constante o pulsátil, la completa perfusión del órgano, la eliminación de microtrombos y facilitar la eliminación de metabolitos de desecho. De la misma manera permite al equipo de trasplante evaluar macroscópicamente al órgano de forma constante en cuanto a su viabilidad, proporcionar soporte de oxígeno e intervenir farmacológicamente.

El uso de máquinas de perfusión (tanto hipotérmicas como normotérmicas) está asociado con una menor incidencia de disfunción retardada del injerto en riñones procurados de donantes con muerte cardíaca, así como también de riñones provenientes de donantes con criterios expandidos. (Abbas y Friend 2020; Treckmann et al. 2011; Petrenko et al. 2019).

Soluciones de preservación

Las soluciones de preservación se formulan con el objetivo final de mantener los diferentes órganos en las mejores condiciones durante el mayor tiempo posible. Para eso, se abordan diferentes situaciones a las que los tejidos estarán expuestos:

- edema celular.
- acidosis intracelular.
- entrada de Ca^{++} a la célula.
- expansión del espacio intersticial.
- daño por radicales libres del O_2
- falta de ATP

Las soluciones de preservación cuentan con sustancias osmóticamente activas para evitar o retrasar la aparición de edema celular tal es el caso de la Glucosa, Manitol, Rafinosa, Citrato, entre otros. Para controlar la acidosis intracelular se utilizan electrolitos con efecto *buffer*, buscando regular la concentración de H^+ intracelular y coloides inhibidores metabólicos para evi-

tar la degradación de los componentes celulares y de esa manera prevenir la expansión intersticial. Como se mencionó anteriormente, la preservación fría tiene un efecto deletéreo en la bomba sodio-potasio, para regenerar lo mas rápido posible ésta función, las soluciones de preservación cuentan con precursores de ATP (Inosina, Adenosina, Glutación,). También la adición de metabolitos antioxidantes como la Vit E y la desferroxamina, y el alopurinol contribuyen a controlar el daño realizado por los radicales libres del O₂ a través de un efecto *scavenger* o barrendero. Finalmente para minimizar la entrada de calcio al interior celular pueden utilizarse diferentes fármacos como el verapamilo o diltiazem, o bien el uso de Mg⁺ entre otras alternativas. (Tabla 1) (Jing et al. 2018; Cobo y del Río Gallegos 2009; Roskott et al. 2011).

COMPONENTE	HTK	EUROCOLLINS	WISCONSIN	CELSIOR	ACTIVIDAD
Sodio	15	10	30	100	Electrolito
Potasio	10	115	120	15	Electrolito
Magnesio	4	—	5	13	Electrolito
Cloro	50	15	—	—	Electrolito
Calcio	15	—	—	0,25	Electrolito
Fosfato	—	50	25	—	Buffer
Sulfato	—	—	5	—	Buffer
Bicarbonato	—	10	—	—	Buffer
Histidina	180	—	—	30	Buffer
Histidina ClH	18	—	—	—	Buffer
Glucosa	—	195	—	—	Impermeabilizante
Manitol	30	—	—	60	Impermeabilizante
Rafinosa	—	—	30	—	Impermeabilizante
Lactobionato	—	—	100	80	Impermeabilizante
Adenosina	—	—	5	—	Energía
Ketoglutarato	1	—	—	—	Energía
Glutamato	—	—	—	20	Energía
Glutación	—	—	3	3, reducción	Scavenger
Alopurinol	—	—	1	—	Scavenger
Triptófano	2	—	—	—	Fármaco
Dexametasona	—	—	8	—	Fármaco
Insulina	—	—	100 U/l	—	Fármaco
HES	—	—	50 g/l	—	Coloide
pH	7,2	7	7,4	7,3	
Osmolalidad (mOsm/l)	310	355	320	340	
Viscosidad	Baja	Baja	Alta	Baja	

Tabla 1: Composición de las diferentes soluciones de preservación.

Tiempos de preservación en los diferentes órganos.

Los diferentes órganos destinados a trasplante son capaces de tolerar diferentes tiempos de preservación los cuales pueden verse modificados por el uso de diferentes estrategias como es el caso de las máquinas de perfusión, el uso de soluciones cardioplégicas o la utilización

de soluciones de preservación específicas. Los órganos mas resistentes a la injuria por preservación fría son el riñón, el páncreas y el hígado, siendo entre 12 y 24hs, mientras que el corazón y el pulmón (3hs) junto con el intestino (6hs) son los órganos que menos tiempo de isquemia toleran. (Tabla 2)(Guibert et al. 2011; Tas et al. 2021; Cobo y del Río Gallegos 2009).

Órgano	Tiempo tolerado (hs)	Máximo alcanzado (hs)
Riñón	24	50
Hígado	12	37
Páncreas	17	30
Corazón	3	8
Pulmón	3	8
Intestino	6	12

Tabla 2: Tiempo de tolerancia a la isquemia de los diferentes órganos.

El trasplante de intestino experimental y su importancia traslacional.

Como se mencionó en secciones anteriores, el TxI es una práctica clínica aún muy joven, con lo cual, la investigación básica-traslacional tiene un rol fundamental para acortar la brecha que hay entre el laboratorio y la clínica. Existe una necesidad importante en profundizar en conocimientos básicos que recae en el uso de modelos animales para el estudio de mecanismos de falla intestinal, fisiopatología de la injuria por isquemia-reperfusión (IIR), preservación de órganos, etc. (Foell et al. 2017)

Las especies animales mas difundidas para la investigación en TxI son el cerdo, por su semejanza anatómica y funcional al humano; y la rata y el ratón por su amplia disponibilidad, coste bajo y un amplio rango de herramientas de medición que ya se encuentran estandarizadas (Foell et al. 2017; Oltean 2021). Independientemente de la especie utilizada, el TxI experimental es un procedimiento avanzado y difícil que implica una compleja procuración del injerto y una no menos dificultosa implantación del mismo, para lo cual se requieren habilidades microquirúrgicas avanzadas. En el caso del cerdo, se necesita una compleja y costosa cirugía gastrointestinal y vascular.

Desde 1971, cuando Monchik y colaboradores, publicaron el primer trasplante de intestino en ratas, se han reportado numerosas modificaciones técnicas y se han desarrollado diferentes modelos tanto ortotópicos como heterotópico.

El TxI ortotópico (Figura 9), consiste en remover el intestino nativo del receptor e implantar el intestino del donante a través de anastomosis vasculares y enteroanastomosis termino-terminales o termino-laterales. Éste modelo tiene la gran ventaja de simular exactamente lo que le sucede al paciente en la clínica y lo hace muy representativo, pero, por otra parte y desde el punto de vista experimental, tiene mas puntos críticos en los cuales la cirugía puede fallar (caso enteroanastomosis) y solamente permite un seguimiento clínico del injerto y muestreo sólo en el punto final. En el TxI heterotópico (Figura 10), el intestino del donante se implanta a través de anastomosis vasculares en el receptor, conservando el intestino nativo (y todo el tracto gastrointestinal) perfectamente funcional, finalizando la cirugía con dos enterostomías, una distal y otra proximal. Éste modelo permite una mejor recuperación de la rata receptora y a su vez un muestreo seriado del injerto a través de las enterostomías. (Nakao et al. 2002; P. L. Stringa et al. 2016; Pablo Stringa, Romanin, Lausada, Gobbi, et al. 2017; Pablo Stringa et al. 2018; Lausada et al. 2011)

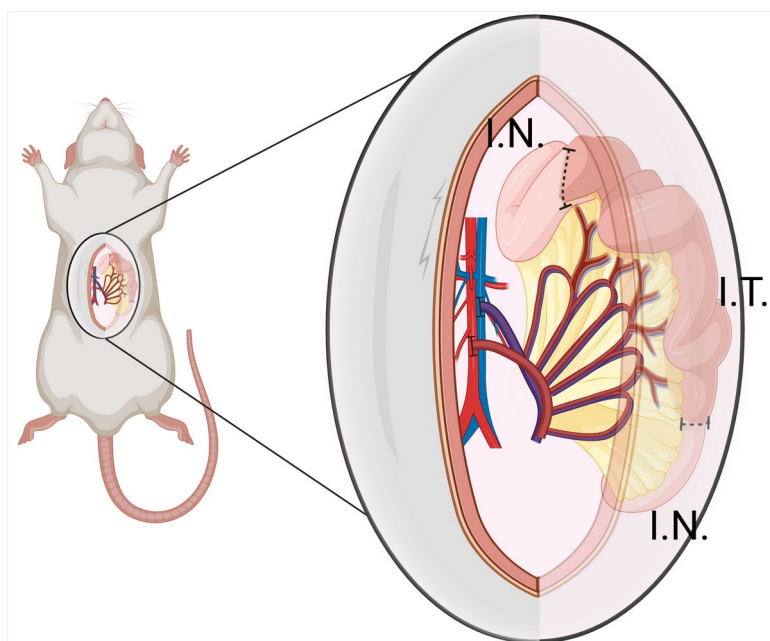


Figura 9: TxI ortotópico en ratas. I.N.: Intestino nativo; I.T.: Intestino trasplantado. (imagen creada con BioRender.com)

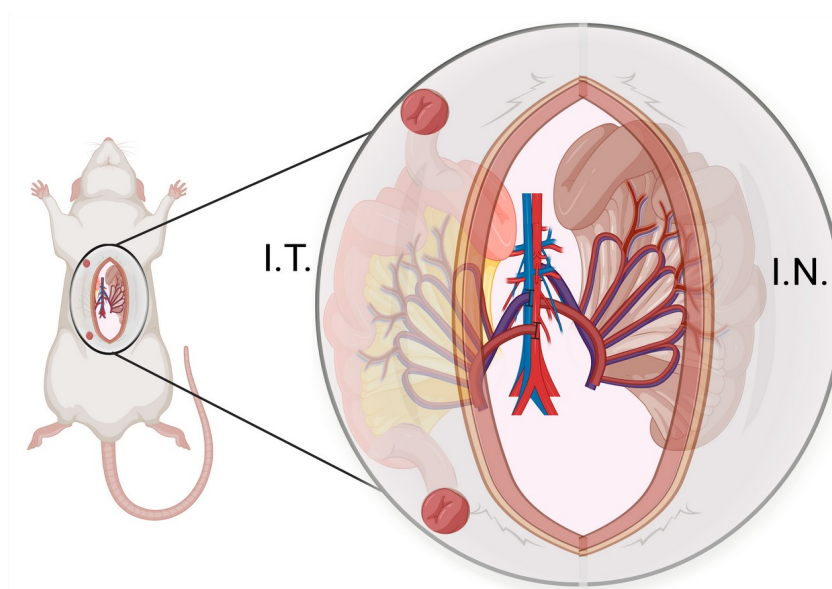


Figura 10: TxI heterotópico en ratas. I.N.: Intestino nativo; I.T.: Intestino trasplantado. (imagen creada con BioRender.com)

Para dar una idea de la necesidad de seguir profundizando y refinando modelos experimentales para la investigación en trasplante de intestino, se realizó una búsqueda en la base de datos de la Biblioteca Nacional de Medicina de los Estados Unidos *pubmed/MEDLINE* para analizar el material científico disponible relacionado al trasplante intestinal en ratas utilizando los siguientes términos:

- Rats AND “intestinal transplantation”: 286 resultados (entre 1950 y 2021).

- Rats AND “intestinal transplantation” AND technique: 164 resultados (entre 1978 y 2021)
- Rats AND “intestinal transplantation” AND microsurgery: 24 resultados (entre 1971 y 2021)
- Rats AND Intestinal transplantation AND brain death: 13 resultados (entre 1994 y 2021), de los cuales 7 tienen relevancia en investigación para trasplante de intestino, 2 sólo lo mencionan asociado a la ME, 1 no incluye modelos experimentales con ratas, sólo las menciona y el restante no incluye ME.(Tabla 3)
- Rats AND Intestinal transplantation AND microsurgery AND brain death: 0 resultados.

Nota: El término Intestinal transplantation, se busco entre comillas inicialmente para reducir los resultados evitando que el motor de búsqueda considere las palabras por separado, el efecto inverso se buscó en las dos últimas búsquedas ya que de otra manera se perdían algunos artículos.

TITULO	AUTORES	REVISTA	AÑO
17β-Estradiol as a New Therapy to Preserve Microcirculatory Perfusion in Small Bowel Donors	Vieira RF, Breithaupt-Faloppa AC, Sannomiya P.	Transplantation	2020
Direct peritoneal resuscitation reduces intestinal permeability after brain death	Weaver JL, Matheson PJ, Smith JW.	Journal of Trauma and Acute Care Surgery	2018
Evaluation of histological damage of solid organs after donor preconditioning with thymoglobulin in an experimental rat model.	Cicora F, Stringa P., Raimondi C	Transplant Immunology	2013
Modulation of brain dead induced inflammation by vagus nerve stimulation.	Hoeger S, Bergstraesser Yard BA.	American Journal of Transplantation	2010
Increased intestinal permeability in deceased brain dead rats.	Koudstaal LG, Ottens PJ, Leuvenink HG.	Transplantation	2009
Brain death induces inflammation in the donor intestine.	Koudstaal LG, 't Hart NA, Leuvenink HG.	Transplantation	2008
Brain death causes structural and inflammatory changes in donor intestine.	Koudstaal LG, 't Hart NA, Leuvenink HG.	Transplantation Proceedings	2005

Tabla 3: Resultados de la búsqueda en Pubmed/MEDLINE para Rats AND Intestinal transplantation AND brain death

El presente trabajo de tesis, tiene la particularidad de introducir al TxI en los modelos experimentales de muerte encefálica previamente descriptos en la bibliografía (Kolkert et al. 2007; Pomper et al. 2010; Zhang et al. 2014). Si bien se han implantado hígados, riñones y corazones provenientes de estos modelos, el trasplante de intestino en roedores con donantes en ME sigue siendo un desafío sin evidencia de supervivencia en la literatura científica. No obstante, antes de presentar estos resultados en el Capítulo III fue imprescindible dilucidar con el desarrollo de otros

experimentos, múltiples interrogantes tales como: la estandarización quirúrgica del modelo, esclarecer aspectos claves del mantenimientos adaptados a la especie como los vasopresores utilizados extrapolados de la clínica: noradrenalina vs dopamina, comparar el escenario de ME con otros escenarios como el donante vivo (DV) y el donante en muerte cardíaca (MC), sin ignorar los efectos de la ventilación asistida (VA) que acompaña ambos procedimientos, conocer cómo impacta la ME en la preservación y así a modo de *screening* escoger el tiempo de preservación del intestino. Con estos antecedentes finalmente, pudimos adentrarnos en la evaluación de la IRI inmediata y su impacto en la supervivencia del animal.

Por tal motivo estandarizamos un modelo de ME aplicable, fidedigno y reproducible, y que permite profundizar el conocimiento sobre aspectos funcionales y fisiopatológicos del TxI, que a su vez, contribuye en la búsqueda de alternativas para aumentar el número de órganos disponibles para trasplante, reducir los tiempos en lista de espera y promover una mejor calidad de vida en los pacientes trasplantados.

Hipótesis y Objetivos

Hipótesis:

La muerte encefálica impacta directa y significativamente exacerbando los fenómenos de injuria por isquemia reperusión y rechazo celular agudo.

Objetivos generales

Evaluar el impacto de la muerte encefálica sobre la supervivencia del injerto intestinal y los fenómenos de injuria por isquemia-reperusión (IIR) y rechazo en un modelo experimental de trasplante intestinal heterotópico en ratas.

Objetivos específicos

1. Optimizar un modelo experimental de donante con criterios neurológicos de muerte encefálica en ratas, para evaluar el impacto de la muerte encefálica sobre fenómenos de IIR y rechazo en el trasplante intestinal experimental
2. Realizar trasplantes intestinales en ratas con intestinos provenientes de donante con muerte encefálica y donantes vivos, con el objetivo comparar los resultados de supervivencia del injerto en ambos casos.
3. Comparar mediante análisis bioquímicos e histológicos el impacto de la muerte encefálica en la magnitud del daño tisular debido a la IIR empleando un modelo de trasplante isogénico y distintas condiciones de preservación del injerto.
4. Analizar el impacto de la muerte encefálica del donante sobre la magnitud y aspectos mecanísticos del rechazo en un modelo de trasplante alogénico.

CAPÍTULO I

ESTABLECIMIENTO DE UN MODELO EXPERIMENTAL DE MUERTE ENCEFÁLICA EN RATAS PARA INVESTIGACIÓN EN TRASPLANTE DE INTESTINO.

Introducción.

Todo trasplante de órganos requiere de un donante, el cual, según el caso, puede ser vivo o fallecido. Pese a que los mejores resultados se observan cuando el órgano proviene de un donante vivo, el mayor porcentaje de órganos destinados a trasplante se obtienen de donantes con criterios neurológicos de muerte encefálica (Schuurs et al. 2004). La muerte encefálica impacta de manera negativa en la calidad de todos los órganos potencialmente trasplantables, por tal motivo, el estudio de la fisiopatología de este proceso y la búsqueda de estrategias para mejorar la viabilidad de los órganos representa un área de sumo interés en el ámbito de los trasplantes de órganos (Kutsogiannis et al. 2006; Morariu et al. 2008) .

La muerte cerebral induce un aumento de la permeabilidad de membranas a nivel intestinal, produciendo traslocación bacteriana, que conlleva a una producción de citoquinas pro-inflamatorias, generando éstas a su vez la auto-perpetuidad y amplificación del proceso inflamatorio e induciendo además el daño de órganos remotos, como es el caso del aumento de citoquinas pro-inflamatorias en corazón, hígado, pulmón y riñón, sumado a la disminución de la actividad miocárdica en corazón y una mayor tasa de función retardada del injerto en riñón (Diethelm et al. 1988; Domínguez-Roldán et al. 2009; Zaroni et al. 2009).

Diferentes aspectos propios han hecho que el intestino fuese el último órgano en ser exitosamente trasplantado en humanos; por un lado la anatomía, irrigación e inervación del órgano impone una complejidad a la técnica quirúrgica per se; a su vez, el intestino es el órgano que alberga la mayor población linfocitaria del organismo, multiplicando las posibilidades de advenimiento de fenómenos inmunológicos asociados al trasplante; a esto se asocia el hecho de estar poblado por una elevada carga bacteriana determinada por la propia flora intestinal, la cual afectaría al receptor de alterarse la barrera mucosa. Si bien la aplicación de protocolos de inmunosupresión agresivos ha permitido mejorar los resultados e incrementar la aplicabilidad del trasplante intestinal (TI), la incidencia de rechazo sigue siendo mayor que en otros órganos, y continúa siendo

causa temprana y alejada de pérdida del injerto y necesidad de re-trasplante. El desarrollo de rechazo severo en el TI es causa no sólo de pérdida del injerto, sino de mortalidad para el receptor y su manejo requiere de experiencia, ya que la pérdida de la barrera mucosa lleva a desarrollar traslocación bacteriana y sepsis, que sólo mejorará en la medida que se recupere dicha barrera (Soeters et al. 2007).

Como se ha mencionado anteriormente, la amplia mayoría de los trabajos de investigación para TxI se llevan a cabo en modelos experimentales con donantes vivos, por tal motivo, nuestro principal objetivo es evaluar el impacto de la muerte encefálica sobre la calidad del injerto intestinal en donantes con criterios neurológicos de muerte y su contraste con el donante vivo, y de ésa manera, introducir un modelo experimental con escaso precedentes científicos en el área de los trasplantes intestinales.

Materiales y métodos.

Se utilizaron ratas Wistar de entre 280 y 330g divididas en dos grupos: Muerte Encefálica (ME n=5) y control con ventilación asistida sin ME (VA n=4). La inducción fue con isoflurano al 5% en cámara saturada y el mantenimiento se realizó inicialmente con máscara y luego vía endotraqueal al 2% con ventilación asistida a 50 VPM y 2,5 de VT.

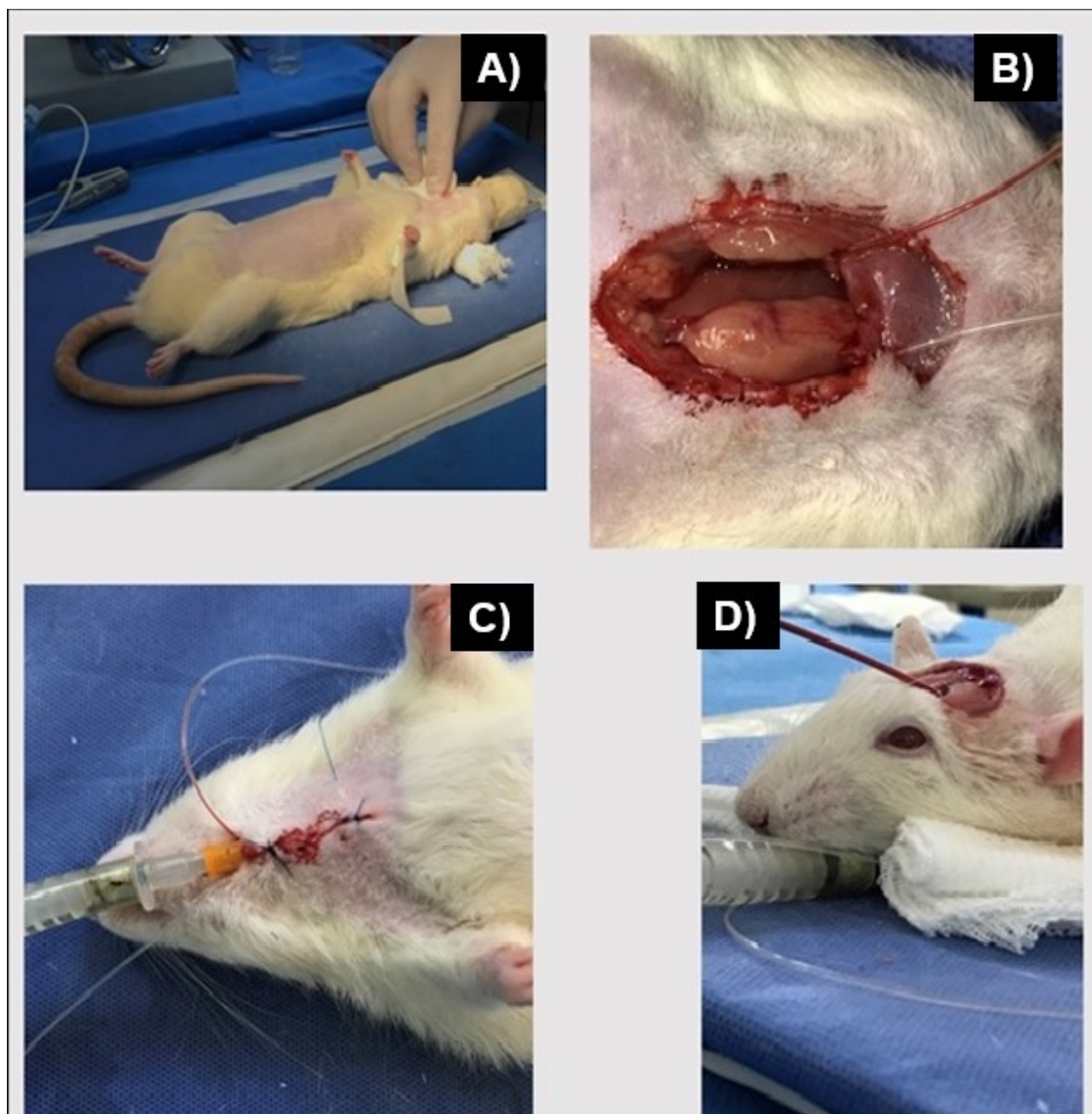
Bajo microscopio quirúrgico se colocan vías en la arteria carótida y en la vena yugular contra-lateral con el fin de controlar la presión arterial y facilitar el manejo de la fluidoterapia y el uso de inotrópicos.

Mediante una trepanación realizada en el cráneo, frontolateral al bregma, se introduce un catéter de embolectomía arterial (Fogarty Arterial Embolectomy Catheter: 4F, Edwards Lifesciences Corporation, Irvine, USA). Se insufla el balón utilizando una bomba de infusión con un caudal de 1ml/h. Cuando se está alcanzando la ME, se observa el reflejo de Cushing, una vez concluido se realiza el test de apnea necesario para el diagnóstico de la ME (Kolkert et al. 2007). (Figura 11)

Ya con el individuo bajo ME, se mantiene durante 2hs, manejando la TAM entre 70 y 140 mmhg. Para corregir la hipotensión, se utilizan soluciones coloidales (LORIHESSE EB, Rivero Laboratorios) hasta 1ml total. En caso de no ser efectivo se utiliza Dopamina en infusión continua (1 a 5 µg/kg/min) (Fontana et al. 2014).

Pasadas las 2hs de Muerte Encefálica, la rata se posiciona en decúbito dorsal y se realiza la laparotomía por línea media para exponer el intestino y lavar el órgano vía arterial con

solución salina a 4°C, posteriormente se tomaron muestras para estudios histopatológicos mediante tinciones con H&E y Alcian Blue.



El daño histológico por isquemia intestinal se puntuó según la clasificación de Park-Chiu descrita anteriormente (Park et al. 1990; Chiu Chu-Jeng Chiu, MD; Alice H. McArdle, PhD; Rea Brown, MD; Henry J. Scott, MD; y Fraser N. Gurd, MD 1970) (0, mucosa normal; 1, espacio subepitelial en la punta de la vellosidad; 2, espacio subepitelial más extendido; 3, levantamiento epitelial a lo largo del lado de la vellosidad; 4, vellosidad desnuda; 5, pérdida de tejido de la vellosidad; 6, infarto de la capa de la cripta; 7, infarto de la mucosa; 8, infarto transmural), utilizando el

software FIJI (Schneider, Rasband y Eliceiri 2012; Abràmoff, Magalhães y Ram 2004) se midió la altura de las vellosidades intestinales y la profundidad de las criptas para calcular el índice Vellosidad/Cripta (IVC). Se midieron al menos 20 vellosidades y criptas individuales en cada rata para determinar este parámetro para evaluar el daño estructural.

El recuento de células Goblet se realizó con tinción Alcian Blue/rojo neutro (Casselbrant et al. 2018) contando 25 vellosidades seleccionadas al azar por animal.

Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante la prueba t de Student o la prueba de Mann-Whitney según la distribución de los datos sea normal o no, utilizando el software GraphPad 5.0. Los resultados se expresan en media y desvío estándar a excepción del daño histológico donde se muestran como mediana y rango intercuartil (RIC). Las diferencias entre las medias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$.

Resultados

Al grado de injuria histológica se le asignó un valor global, consignado por la lesión predominante y un valor focal, dado por el foco de mayor lesión. El grupo VA no evidenció daño en la mucosa pasadas 2hs en esa condición, mientras que el grupo ME arrojó un daño leve en la mucosa (0,5;0-1). Diferencias mas marcadas se notaron respecto del daño focal, hallándose casi un punto de diferencia en la escala de Park-Chiu (VA= 0.5;0-1 y ME= 2;1-2).

El IVC se vio disminuido en el grupo ME con respecto al grupo VA, 2.64 ± 0.65 vs 3.06 ± 0.75 respectivamente. Mientras que el conteo de células Goblet por cada vellosidad fue de $30,55 \pm 4,8$ para VA y de $21,24 \pm 4,1$ para ME. (Figura 12).

Conclusiones.

La ME produce cambios estructurales evidenciados en los parámetros histológicos analizados. Estos cambios se observaron en la lesión global y más marcadamente en el daño focal.

Respecto al IVC en el grupo ME muestra una disminución en este índice respecto del grupo VA. Siendo el IVC un indicador de la integridad estructural de la mucosa intestinal desde la unidad funcional (vellosidad y cripta). Valores bajos de IVC podrían indicar un compromiso en la funcionalidad de la mucosa intestinal, que posteriormente podría verse agravada por los fenómenos de injuria por isquemia-reperfusión.

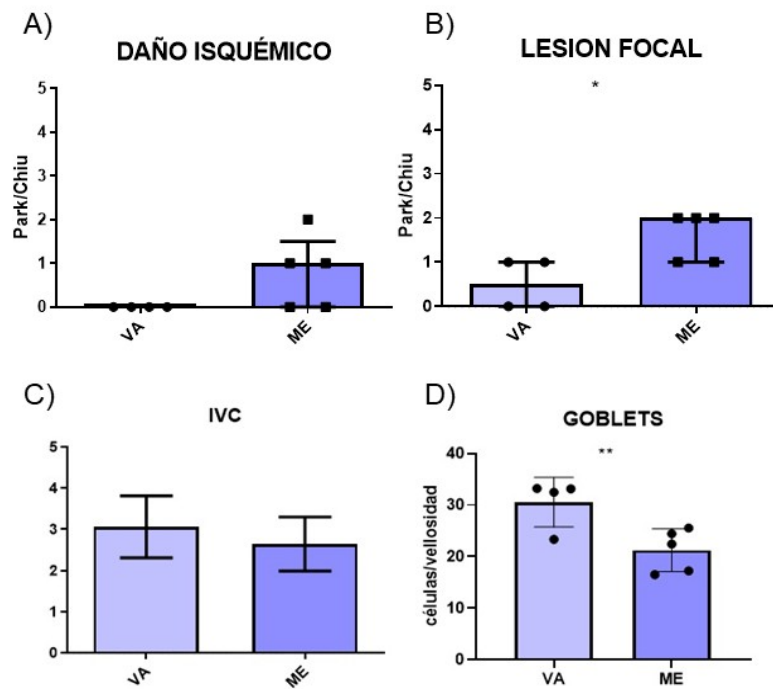


Figura 12: A) y B) Grado de daño histológico representado por la escala de Park-Chiu. El daño focal se evidencia significativo pasadas 2hs de ME. los resultados se expresan como Mediana y RIC; C) Índice Vellosidad/Cripta y D) Conteo de células Goblet, donde se observa el impacto de 2hs de ME en esta población celular. expresado en número de células por vellosidad. (*: $p > 0,05$; **: $p < 0,01$)

La disminución del número de células Goblet expresa un detrimento en las primeras barreras de defensa de la mucosa intestinal, lo que sugiere una mayor vulnerabilidad frente a patógenos externos.

Éstos resultados muestran que pasadas las 2hs de ME, se puede obtener un injerto viable para el trasplante con un claro compromiso estructural y funcional, lo que hace a este modelo indicado para estudios de injuria por isquemia reperusión y rechazo, entendiendo a la ME como el primer evento injuriante con un claro impacto sobre la calidad del órgano a trasplantar.

En vista de las importantes diferencias observadas entre el donante vivo y el donante con ME, decidimos profundizar éste estudio y comparar el estado inicial de los injertos provenientes de diferentes escenarios de donación experimentales, agregando un modelo de muerte cardíaca Maastrich tipo III, el cual asoma en diferentes centros de trasplante de Europa como una alternativa a la falta de órganos disponibles para trasplante, pero que nunca se ha probado experimentalmente en TxI.

EVALUACIÓN EXPERIMENTAL DEL DAÑO HISTOPATOLÓGICO DEL INTESTINO EN LOS DIFERENTES ESCENARIOS DE DONACIÓN. DESARROLLO Y ANÁLISIS DE UN MODELO DE DONACIÓN EN ASISTOLIA MAASTRICHT III.

Introducción

La escasez universal de órganos ha impulsado el uso creciente de las donaciones tras la muerte circulatoria (MC), que se espera que siga aumentando (Smith et al. 2019). Varios órganos, como riñones, hígado, pulmones, páncreas y corazón, procedentes de donantes de MC se han empleado con éxito para el trasplante en diversos centros de todo el mundo. La mayor parte de los escollos y las preocupaciones relacionadas con el uso de donantes de MC se han abordado mediante una estricta selección del donante (Gozzini et al. 2010), mejoras en la perfusión regional normotérmica (Miñambres et al. 2017) y dispositivos de perfusión mecánica *ex vivo* (Treckmann et al. 2011). Aunque es difícil evaluar el verdadero impacto del uso rutinario de la MC, se ha estimado que la donación de órganos ha aumentado en un 42% (Angelico et al. 2018; Roskott et al. 2014). De acuerdo con reportes del observatorio de trasplantes para el año 2020 de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (<http://www.transplant-observatory.org>), se registraron 129.681 trasplantes de órganos sólidos (información de 93 estados miembros, representando el 80,4% de la población global) de los cuales 36.125 correspondieron a donantes cadavéricos (27.946 ME y 8.179 MC), el resto corresponden a donantes vivos de hígado y riñón. Algunos aspectos interesantes a tener en cuenta: solamente en América Latina (desde México hasta Argentina), el número de pacientes en lista de espera fue de 58427, y se registraron 3954 pacientes muertos en lista de espera. Asimismo, en toda América Latina no se registraron trasplantes con órganos provenientes de MC, en la mayoría de los casos, por no existir legislación al respecto.

El valioso recurso de la MC se ha negado para los injertos intestinales debido a la preocupación por la susceptibilidad isquémica de este órgano. En particular, los estudios experimentales que apoyan este veto son limitados y metodológicamente heterogéneos (Cobianchi et al. 2009; Guo et al. 2016). Por el contrario, las pruebas clínicas apoyan el uso de estos injertos en entornos clínicos. Además, existe una necesidad urgente de injertos para hacer frente al desbalance entre la lista de espera para el trasplante intestinal y la escasez de órganos disponibles. Los candidatos a trasplante intestinal son predominantemente los que tienen períodos de espera más largos y tasas de mortalidad más altas en comparación con otros pacientes que esperan un trasplante de órgano sólido (Lao et al. 2010). Por lo tanto, se justifica una evaluación exhaustiva del uso potencial de injertos intestinales de donantes con MC. Asimismo, resaltamos la importancia de

ampliar el espectro de protocolos experimentales para investigación en trasplante de intestino para proveer a la clínica de nuevas evidencias específicas en el estudio del trasplante de intestino.

Por lo tanto, los objetivos de este estudio son: (1) comparar el daño isquémico en los injertos intestinales de MC con el de los donantes con muerte encefálica (ME) y los donantes vivos en los modelos animales correspondientes; y (2) describir en detalle un modelo experimental de MC Maastricht III para el trasplante de órganos sólidos en roedores. Dada esta problemática y con la experiencia acumulada en el desarrollo del modelo de muerte encefálica, decidimos realizar un estudio comparativo con otro de los sistemas de donación que viene aumentando en el mundo y que no está estandarizado para intestino, a fin de comprender los mecanismos diferenciales que operan en cada situación. Enfatizando en el hecho de que ambos modelos están nula o escasamente explotados en el área de TxI, y buscando generar evidencia e impulso desde lo científico para su potencial aplicación en la clínica.

Material y métodos

ANIMALES

En este estudio se utilizaron ratas Sprague-Dawley macho adultas (8-10 semanas). Los animales fueron alojados en grupo en una sala de clima controlado con un ciclo de luz y oscuridad de 12 horas en las instalaciones de la cátedra de Trasplante de Órganos de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de La Plata. Los protocolos experimentales se realizaron siguiendo estrictamente las recomendaciones de los Criterios de la Unión Europea para el Uso de Animales en la Experimentación Científica (63/2010 UE) y la legislación española relacionada (RD 53/2013). Los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité Ético de Bienestar Animal local (PROEX 58.7/20).

PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

Para simular un MC Maastricht III, se anestesió a las ratas con anestesia inhalatoria de isoflurano (5% y 2-3% para la inducción y el mantenimiento, respectivamente). Los animales se colocaron en posición de decúbito dorsal sobre una manta térmica para permitir la inserción de una cánula en la arteria carótida derecha conectada a un monitor multiparamétrico DYNE MCO-300-07 para el control de la presión arterial (valores normales: 70-140 mmHg). Posteriormente, se realizó una traqueotomía y se ventiló a los animales durante 2 horas (2,5, 55/70 RPM, PEEP 0; Ventilador para roedores Harvard Apparatus modelo 683). Se midió la oximetría de pulso (CMS-VESD, estetoscopio visual multifuncional, CONTEC) en la pierna del donante (normalmente entre el 95-100%) y la frecuencia del pulso (normalmente > 250 lpm). Se registró la temperatura rectal (37,5-38°C). Todos los parámetros se registraron cada 10 minutos durante todo el procedimiento.

Después de 2 horas de ventilación, se indujo un neumotórax mediante una incisión diafragmática, tal como se informó previamente (Zhong et al. 2019). La ventilación mecánica se mantuvo durante 5 minutos luego de perder la presión negativa intratorácica, con el objetivo de asegurarnos que la ventilación asistida sea efectiva. Una vez concluido ése tiempo, se retiró el soporte ventilatorio y térmico. Basándose en los parámetros de la donación pediátrica, se diagnosticó MC cuando la presión arterial cayó por debajo de 30 mmHg. Se evaluaron diferentes tiempos de (MC) según el grupo.

Con el fin de comparar la calidad de los injertos procedentes de diferentes tipos de donantes, se incluyó un grupo de muerte cerebral (ME) basado en un modelo previamente comunicado (Kolkert et al. 2007; Cicora et al. 2013; Vecchio Dezillio et al. 2021) como así también se incluyó un grupo con ventilación asistida (VA) para considerar el daño remoto producido por la ventilación asistida (Quílez, López-Aguilar, y Blanch 2012; Hepokoski et al. 2017; Villar et al. 2011). Brevemente, se colocó una cánula de balón de 4F por vía subdural a través una trepanación craneana previa y se insufló a un flujo de 1 mL/h. Cuando se observó el reflejo de Cushing, se realizó un test de apnea para confirmar la ME. El procedimiento para el grupo VA fue igual que el ME con la diferencia de que se omite la trepanación del cráneo y la inducción de ME.

Los animales del grupo ME y VA fueron anestesiados y monitorizados como se ha descrito anteriormente para los grupos MC. En todos los grupos experimentales, los órganos se lavaron al final del protocolo (Fig. 1) con 40 mL de solución fría de Ringer lactato perfundida durante 3 min a través de la cánula arterial utilizando una bomba de perfusión (PC11-UBT, APEMA).

DISEÑO EXPERIMENTAL Y MUESTREO

Veinticinco animales donantes se dividieron en cinco grupos experimentales (cinco ratas por grupo), como se indica a continuación (Figura 13):

1. Donante vivo convencional (DV): i. v. perfusión de órganos y toma de muestras;
2. Donante vivo ventilado (VA): ventilación mecánica durante 2 horas, perfusión de órganos i.v. y toma de muestras;
3. Donante con muerte cerebral (ME): ME y ventilación durante 2h, perfusión de órganos i.v. y toma de muestras;
4. Donación después de 5 min de muerte circulatoria (MC5): ventilación mecánica durante 2 h, 5 min de MC, perfusión de órganos i. v. y toma de muestras;

5. Donación después de 20 minutos de muerte circulatoria (MC20): ventilación mecánica durante 2 h, 20 min de MC, perfusión de órganos i. v. y toma de muestras.

En todos los grupos, las muestras de los diferentes órganos que componen el injerto multivisceral (estómago, páncreas, intestino delgado, colon e hígado) se fijaron con formalina y se incluyeron en parafina para su análisis histológico.

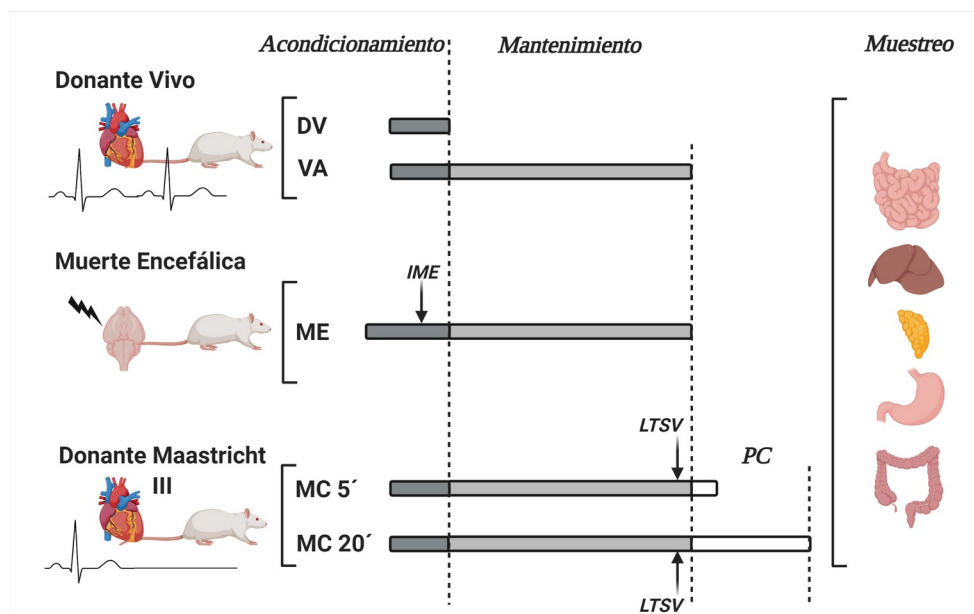


Figura 13: Esquema del diseño experimental. El estudio abarcó varios tipos de donantes de órganos en ratas, que representaban las diferentes etapas y órganos componentes de los injertos intestinales y multiviscerales. DV: donantes vivos convencionales, VA: donantes vivos ventilados, ME: donantes en muerte encefálica, IME: inducción de muerte encefálica, MC: donación tras MC con dos tiempos diferentes de isquemia caliente (5 y 20 minutos), LTSV: limitación de la terapia de soporte vital; PC: parada cardíaca. Imagen creada con BioRender.com)

ANÁLISIS HISTOLÓGICO Y MORFOMÉTRICO

Se utilizaron puntuaciones específicas validadas para el intestino delgado, el estómago, el páncreas, el hígado y el colon para cuantificar los daños relacionados con la MC y la ME. Las muestras intestinales teñidas con hematoxilina-eosina se evaluaron utilizando la escala de Park/Chiu: 0, mucosa normal; 1, espacio subepitelial en la punta de la vellosidad; 2, espacio subepitelial más extendido; 3, levantamiento epitelial a lo largo del lado de la vellosidad; 4, vellosidades denudadas; 5, pérdida de tejido de la vellosidad; 6, infarto de la capa de la cripta; 7, infarto transmucoso; y 8, infarto transmural (Hartog et al. 2016). La altura de las vellosidades intestinales, la profundidad de las criptas y el grosor de las criptas se evaluaron con el software FIJI®. Se midieron al menos 20 unidades vellosidad/cripta por rata. Para la evaluación de las células Goblet (CG), se realizó una tinción con Alcian Blue con contraste rojo neutro, y se cuantificaron 25 vellosidades por sujeto (Søfteland et al. 2020; Johansson y Hansson 2013). Las células de Paneth se cuantifi-

caron en 20 criptas longitudinales por muestra en campos microscópicos representativos (40x), como se informó previamente (Kip et al. 2020).

Se consideraron siete parámetros para cada muestra de hígado analizada: necrosis celular, cambios eosinófilos en los hepatocitos, hepatocitos discohesivos, vacuolización citoplasmática y dilatación sinusoidal. Cada parámetro se puntuó de la siguiente manera: 0, normal; 1, cambio leve; 2, cambio moderado; y 3, cambio grave. A cada muestra se le designó una puntuación general basada en la suma de cada parámetro evaluado (Suzuki et al. 1993).

La evaluación gástrica se basó en la descamación epitelial, la hemorragia de la mucosa, el daño glandular y la infiltración eosinofílica, y se puntuó utilizando una escala de 0 a 3 (0, nada; 1, leve; 2, moderado; y 3, grave) para cada criterio (Jahovic et al. 2007). El edema, la necrosis grasa y la necrosis acinar se consideraron indicadores de daño isquémico para el análisis del páncreas. Se utilizaron seis grados de gravedad para cuantificar cada parámetro, como se informó anteriormente (Schmidt et al. 1992). Para la lesión del colon en ratas se utilizó una clasificación informada por Bresler et al. Brevemente, la escala incluía edema, número de células Goblet y alteraciones de la mucosa. El daño se puntuó de 0 (sin daño. Células caliciformes agotadas y mucosa en contacto con la capa muscular) a 4 (lesión avanzada de la mucosa (disolución de la mucosa, rotura del epitelio)(Bresler, Ionac, y Oltean 2016).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizaron métodos no paramétricos para las comparaciones estadísticas. Las diferencias estadísticas entre grupos se evaluaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis corregida para comparaciones múltiples utilizando prueba de Dunn. Los análisis estadísticos se realizaron con el software GraphPad (versión 8.00; San Diego, CA, EE.UU.). La significación estadística se fijó en $p < 0,05$.

Se realizó un análisis de componentes principales biplot para investigar las relaciones entre la puntuación de Chiu/Park, el espesor de la mucosa, el número de células de Paneth y Goblet, y el índice vellosidad/cripta, así como sus asociaciones en diferentes grupos experimentales.

Resultados.

El modelo experimental desarrollado en este estudio permitió replicar las fases cruciales del MC de Maastricht III (mantenimiento del paciente, limitación de la terapia de soporte vital del donante (LTSV), diagnóstico de la muerte cardíaca, tiempo de asistolia, lavado y recuperación del injerto multivisceral). El éxito del modelo Maastricht III en ratas para el trasplante visceral (TV) fue del 83,3%. Dos animales presentaron complicaciones durante el procedimiento y fueron excluidos del estudio (un caso de hipotensión prolongada y otro de hemorragia masiva a través de la cánula de la arteria carótida).

En todos los grupos experimentales se consiguió una monitorización satisfactoria del donante basada en la estabilidad de la temperatura corporal, la saturación de O₂ y la presión arterial media, que se establecieron como parámetros de inclusión tal y como se describe en la sección de Materiales y Métodos. El ME mostró un ligero aumento de la TAM a los 30 y 40 minutos después de la inducción de la ME, que se atribuyó a la infusión de fármacos vasoactivos que se administró simultáneamente a este grupo (Figura 14-A).

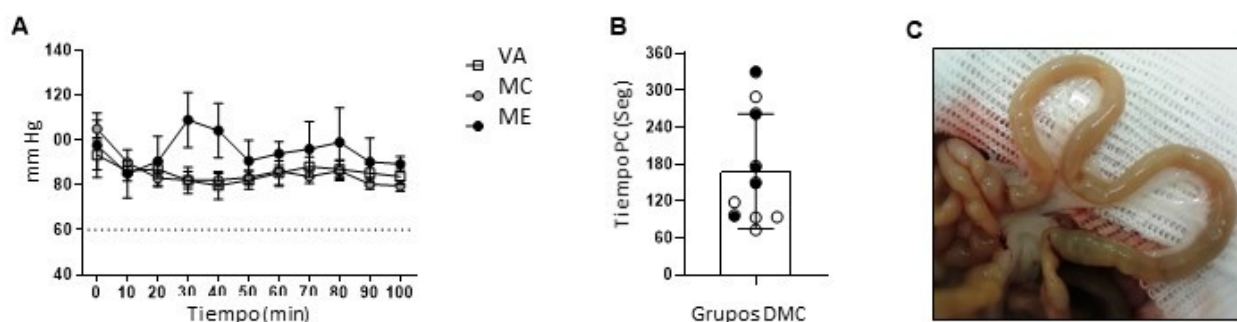


Figura 14: Monitorización del donante y del injerto durante la MC. (A) La TAM en los grupos de donante vivo ventilado (VA), muerte encefálica (ME) y donación tras muerte circulatoria (MC) mostró valores normales durante todo el procedimiento experimental. No se observaron diferencias significativas entre los grupos en ningún momento. (B) Periodo transcurrido (segundos) entre la limitación de la terapia de soporte vital (LTSV) y el diagnóstico de muerte circulatoria (MC) en los grupos de MC (los círculos negros y blancos corresponden a los grupos de donación tras 5 min de muerte circulatoria [MC-5] y donación tras 20 min de muerte circulatoria [MC-20], respectivamente). (C) Imagen macroscópica de un intestino de un donante MC-20 al final del procedimiento experimental. El aspecto pálido denota un lavado correcto del injerto.

El tiempo transcurrido entre el LTSV y el diagnóstico de MC (TAM < 30 mmHg) fue de 168 ± 88 segs. No se observaron diferencias significativas entre MC5 y MC20 (Figura 14-B). La heterogeneidad temporal de la MC no se correlacionó con la TAM en el momento del LTSV (datos no mostrados). En el momento de la toma de muestras, el aspecto macroscópico de los injertos intestinales presentaba una apariencia pálida en los cinco grupos experimentales, sin rastros de

sangre en la vasculatura mesentérica ni en la pared del intestino delgado, lo que indicaba un correcto lavado del injerto incluso en la MC20 (Figura 14-C).

CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LOS INJERTOS MULTIVISCERALES CON PERÍODOS DE ISQUEMIA CORTOS

El grupo de MC mostró un daño histológico en el intestino delgado dependiente del tiempo. La MC prolongada generó una lesión sustancial de la mucosa intestinal (3-5 según la puntuación de Park-Chiu). Se observaron diferencias significativas entre los grupos MC20 versus DV y MC5 ($p < 0,05$, Figura 15-A).

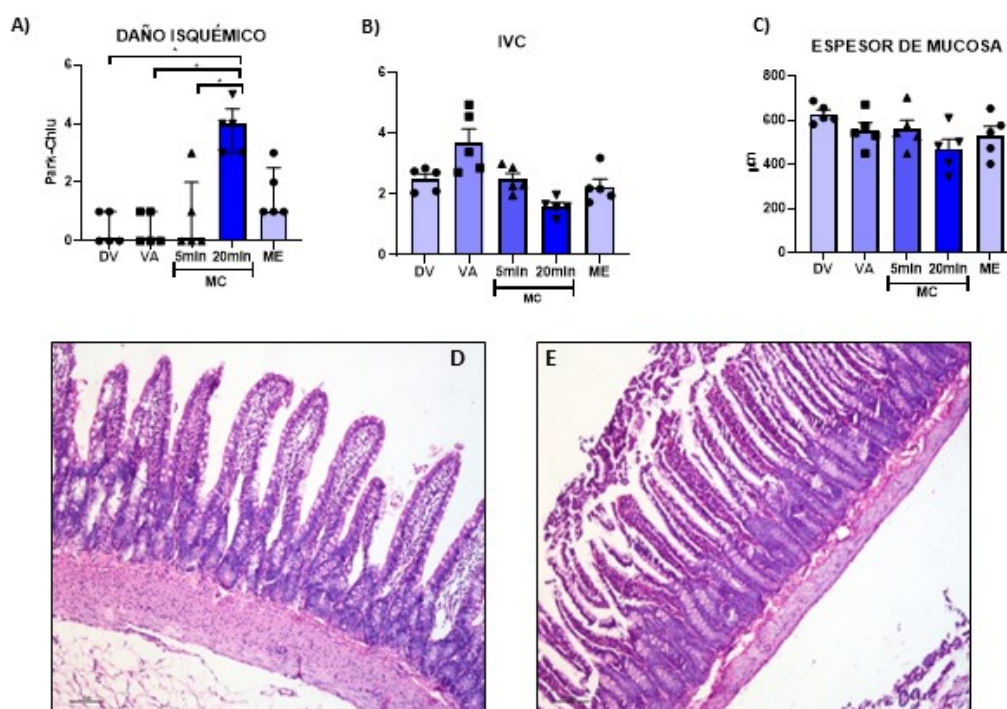


Figura 15: El tiempo de ischemia caliente influye en la histología del injerto intestinal en la donación tras MC. (A) La arquitectura del intestino delgado de MC5 fue similar a la de los injertos vivos. Los grupos con mayor tiempo de ischemia presentaban un daño más grave según las puntuaciones de Park-Chiu en comparación con los demás donantes, con diferencias significativas frente a los grupos DV y MC5 ($p < 0,05$). (B y C) A pesar de una tendencia al empeoramiento del IVC y del EM intestinal en el grupo MC (MC20), no se observaron diferencias entre los grupos en estos estudios morfométricos. Microfotografías 10X representativas del grupo MC5 (D) y MC20 (E).

Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en el índice de vellosidad/cripta y en el espesor de la mucosa entre los grupos experimentales (Figura 15-B y C). Se observaron resultados similares en todos los grupos, a excepción de las muestras de intestino delgado de MC20, en las que el recuento de CG fue considerablemente inferior. Se observó una diferencia significativa en el análisis del CG entre los grupos MC20 y DV ($p < 0,05$, Figura 16-A). Por el con-

trario, no se observaron diferencias en el recuento de células Paneth por cripta, con una media de aproximadamente cinco células Paneth en todos los grupos de estudio (Figura 16-C).

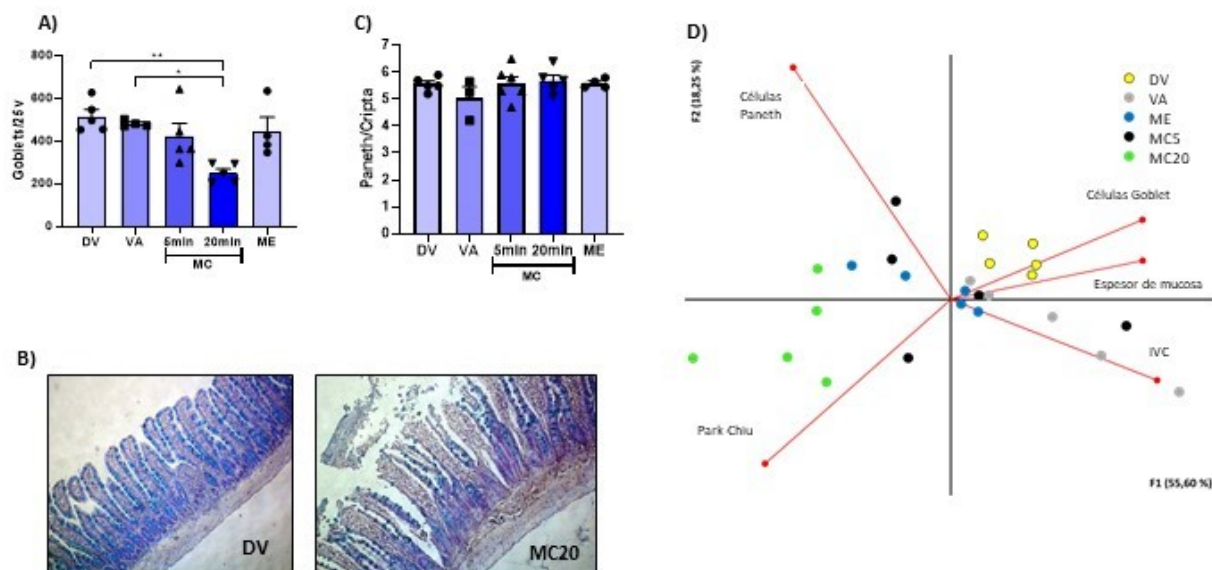


Figura 16: Estudio de la población celular y análisis de componentes principales del injerto intestinal.

(A) Recuento de células Goblet mediante tinción con Alcian Blue. Se observaron diferencias significativas entre los grupos de donación tras 20 minutos de MC (MC20) y de donante vivo convencional (DV) (* $p<0,05$; ** $p<0,01$). (B) Ejemplos de números altos y bajos de células caliciformes en muestras intestinales correspondientes a los grupos DV y MC20, respectivamente. (C) Todos los grupos experimentales mostraron un número similar de células de Paneth. (D) Biplot que visualiza las correlaciones entre las variables. El grupo MC5 se asemejó mucho a los donantes de muerte encefálica (ME) (injertos utilizados en entornos humanos). Las muestras del grupo MC20 fueron las más distintas en comparación con los otros grupos experimentales y se asociaron con las variables de daño histológico basadas en las puntuaciones de Park-Chiu.

La variabilidad media explicada por el análisis de componentes principales fue del 73% (componente principal 1, 55%; componente principal 2, 18%) (Figura 16-D). El número de células Goblet, el espesor de la mucosa y el índice vellosidad-cripta se correlacionaron positivamente con los grupos DV y VA, lo que sugiere que un mayor número de células Goblet, una mucosa más gruesa y un mayor índice cripta-vellosidad son indicativos de la integridad del intestino delgado. La puntuación de Chiu/Park no se correlacionó con estas variables, pero sí con el grupo MC20. Cabe destacar que, a pesar de la dispersión de los datos, los grupos ME y MC5 se agruparon más cerca de los grupos DV y VA que del grupo MC20.

De acuerdo con la tendencia observada para los injertos intestinales, los hígados MC20 revelaron una morfología significativamente más pobre en comparación con los grupos de donantes vivos (Figura 17-A), con congestión de leve a moderada, vacuolización citoplasmática y necrosis de hepatocitos como las alteraciones microscópicas más destacadas (grupo MC20 vs. DV, $p<0,05$).

El grupo MC20 presentó una lesión gástrica más grave, acompañada de daño glandular, descamación epitelial e infiltrado celular de grado leve a moderado ($p<0,05$ frente al grupo DV). Se observaron lesiones similares pero más leves en los donantes con 5 min de MC. La infiltración celular inflamatoria fue el hallazgo más característico en el grupo ME (Figura 17-B). El edema moderado fue la observación más común en el páncreas de los grupos ME y MC20 (Figura 17-C). Se observó edema entre los lóbulos del páncreas y entre los acinos y el espacio intercelular. No se observaron signos de necrosis en ninguna de las muestras estudiadas. Se observó una diferencia significativa entre MC20 y DV en el daño histológico del páncreas ($p<0,05$).

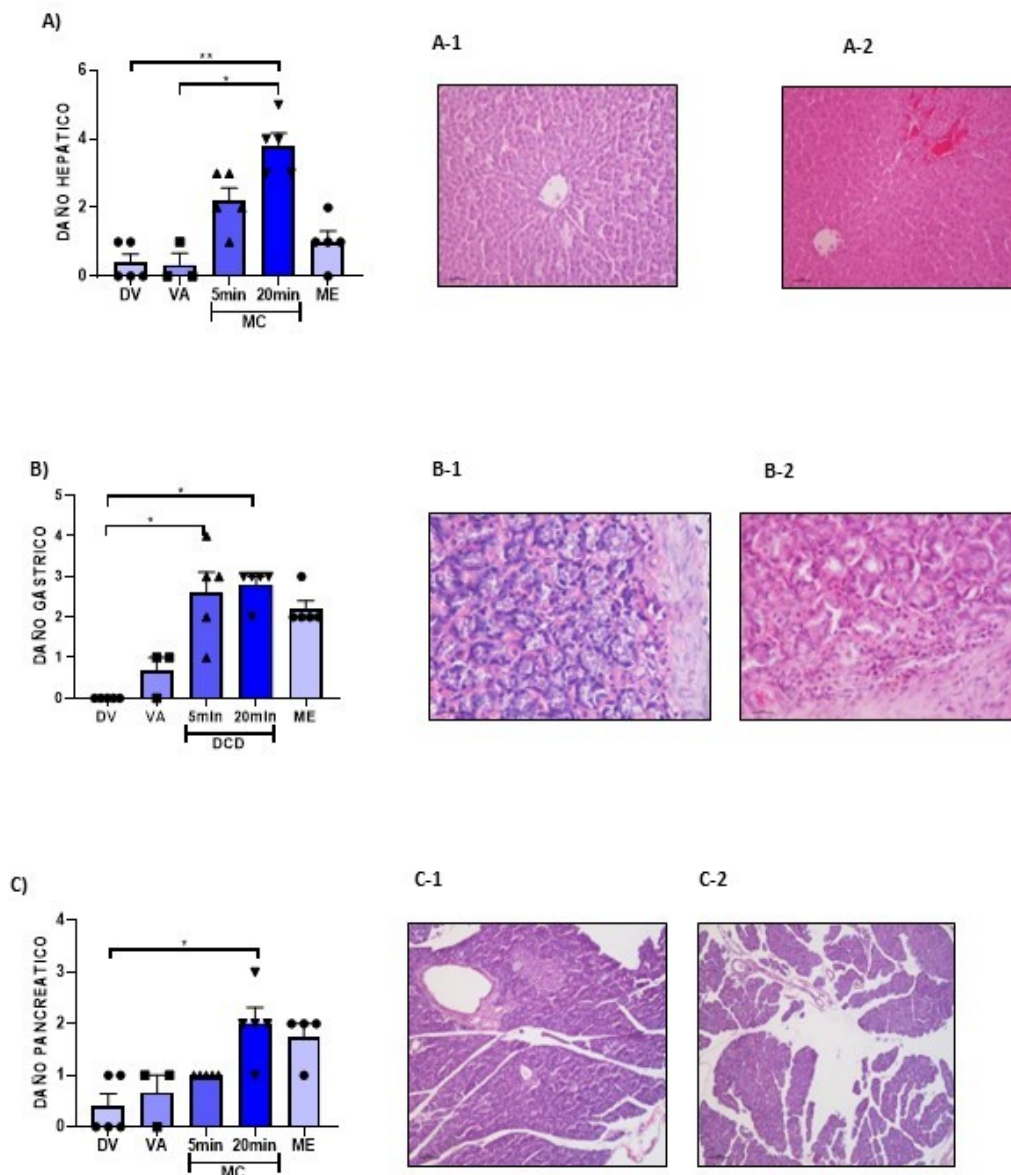


Figura 17: Análisis histológico del resto de órganos que componen los injertos multiviscerales. Se presentan los análisis de hígado (A), estómago (B) y páncreas (C). En todos los casos, se observaron diferencias significativas entre los grupos de donación tras 20 min de MC (MC20) y DV (* $p<0,05$; ** $p<0,01$). Se presentan imágenes microscópicas representativas del daño bajo (1) y alto (2) de los tres órganos.

Conclusión.

Los pacientes en lista de espera para trasplantes de órganos sólidos en todo el mundo superan el número de procedimientos de trasplante anuales. La escasez de donantes es uno de los principales factores que contribuyen a ello, y se espera que la situación se deteriore a menos que se identifiquen alternativas clínicas (Angelico et al. 2018; Andrés, Ramos, and Hernández 2020). La MC contribuye significativamente a la reserva de donantes en los países con legislación para su empleo. En algunos casos, la MC representa hasta el 40% de los injertos trasplantados. La actividad de ME sigue estando poco desarrollada en varios países, y la MC es una valiosa alternativa práctica para las donaciones de órganos de fallecidos (Smith et al. 2019; Gardiner et al. 2020).

El trasplante visceral constituye un reto notable para la MC, ya que la sensibilidad de la barrera intestinal a la isquemia y los resultados desalentadores de los modelos animales han impedido su aplicación en la práctica clínica (Cobianchi et al. 2009). La disponibilidad de modelos experimentales que recapitulen las principales características de la MC facilitará el desarrollo de nuevas intervenciones con resultados prometedores en entornos preclínicos, como la ECMO (Guo et al. 2020). Por consiguiente, nuestro objetivo inicial era desarrollar un modelo de MC en roedores que recapitulara las principales características de los criterios de Maastricht III, Para posteriormente contrastarlo con el resto de los escenarios de donación posibles experimentalmente.

El procedimiento experimental de MC controlada desarrollado reproduce con exactitud las diferentes fases de un donante tipo Maastricht III utilizado en la práctica clínica. Este modelo permite replicar las distintas características relacionadas con la MC y proporciona una valiosa herramienta para evaluar diferentes estrategias traslacionales para mejorar la calidad de los injertos viscerales. El periodo de mantenimiento con ventilación mecánica y la monitorización de parámetros vitales como la temperatura y la TAM en el modelo de MC constituyen los puntos fuertes del presente capítulo. Además, el diagnóstico preciso de la MC ($TAM < 30 \text{ mm/Hg}$) se basó en la práctica clínica de los donantes pediátricos de Maastricht III, lo que pone de manifiesto la relevancia traslacional de este modelo.

Nuestros resultados demostraron que las características histopatológicas del intestino delgado procedente de la MC con un tiempo de isquemia caliente corto (5 min) eran similares a las de los injertos procedentes de la ME en cuanto a la puntuación de Park-Chiu, el índice vellosidad-cripta y el espesor de la mucosa intestinal. Destacamos la buena calidad de la arquitectura de los intestinos de donantes con MC, dado el periodo relativamente corto de isquemia antes del lavado y la extracción del órgano. Roskott et al. informaron de que se produce una elevada expresión de proteínas de choque térmico en el intestino humano tras la MC y los injertos de ME mos-

traron mayores niveles de expresión de interleuquina-6 en comparación con los de MC (Roskott et al. 2014). Ésto podría explicarse a partir del hecho de que los injertos provenientes de donantes con ME tienen un patrón de daño de origen mas inflamatorio, mientras que los injertos de MC parecen acumular mayor daño por hipoxia, de todas maneras, marcamos como limitante dentro de este apartado que para poder diferenciar el predominio del daño inflamatorio o bien del daño por hipoxia, sería importante poder trasplantar órganos con ambos escenarios de donación. Estos datos sugieren que los injertos para trasplante visceral justifican diferentes tratamientos previos de acuerdo con sus perfiles inmunológicos. En este sentido, nuestro modelo abre un abanico de posibilidades para su evaluación en entornos preclínicos y clínicos.

Observamos un mayor daño histológico en el intestino delgado que en las muestras de colon, lo que confirma la importancia de estudiar la barrera del intestino delgado como parámetro más sensible del daño isquémico. Este hallazgo concuerda con un estudio anterior de Bresler et al. que describió diferencias similares en el daño isquémico entre el intestino delgado y el colon en un modelo experimental (Bresler, Ionac, y Oltean 2016).

Con respecto a las poblaciones celulares específicas, el número de células Goblet fue significativamente menor en el grupo experimental con un daño histopatológico más grave (MC20), pero fue similar entre MC5 y ME. Estos resultados son coherentes con informes anteriores sobre el impacto del daño isquémico en las células caliciformes (Søfteland et al. 2020; 2019a). Aunque las células de Paneth muestran una sensibilidad diferencial a la IIR, observamos que la isquemia caliente en ambos grupos de MC provocó cambios menores en la población de células de Paneth, que mostraron recuentos celulares similares a los de la ME (Kip et al. 2020; Grootjans et al. 2011).

El análisis de componentes principales reveló que los intestinos de los grupos MC5 y ME eran similares, mientras que el intestino delgado del grupo MC20 difería del de los demás grupos experimentales, lo que constituye resultados alentadores en cuanto a la calidad del injerto intestinal. Además del intestino, los injertos viscerales pueden estar compuestos por otros órganos, como ya se ha dicho. En nuestro trabajo, evaluamos el impacto de diferentes tipos de donaciones en el estómago, el páncreas y el hígado. Como se muestra en la figura 16, el tiempo de isquemia afectó negativamente a los donantes con MC que experimentaron un tiempo de isquemia caliente prolongado. En particular, se observaron similitudes en el daño histológico en el intestino delgado entre los grupos MC5 y ME.

La práctica clínica actual se ha orientado hacia la perfusión normotérmica en donantes de MC con resultados superiores a los obtenidos con la perfusión fría tradicional, que es similar a

la perfusión empleada en el presente trabajo. Por lo tanto, los trabajos futuros deberán implementar los dispositivos necesarios para establecer la perfusión normotérmica en este modelo.

En resumen, el presente capítulo proporciona una descripción detallada del estado histopatológico del injerto multivisceral en diferentes escenarios de donación desarrollando un nuevo modelo experimental de MC Maastricht III que puede contribuir a la evaluación de la viabilidad de la MC para la trasplante visceral. Nuestros resultados sugieren que la calidad de los injertos viscerales de la MC y los tiempos de isquemia cortos comparados con el *gold standard* (ME) se asemejan mucho. Lo que pone de relieve que la MC es una posible solución al desequilibrio clínico entre la demanda de donación de órganos y los procedimientos de trasplante. Es en éste sentido también donde cobra mayor importancia la necesidad de protocolos experimentales más específicos que abarquen escenarios clínicos mas cercanos a la realidad.

Durante éste primer capítulo se logró establecer un modelo de ME fiable que fue utilizado en dos experimentos con resultados consecuentes y se estandarizó como control al donante vivo ventilado (VA), dado que es una constante en todo tipo de donación. Además, se puso a punto un modelo de MC Maastricht tipo III, evaluando el estado inicial de los injertos en cada escenario de donación, para evaluar en los siguientes capítulos el comportamiento de los diferentes modelos tanto en procuración como en preservación.

CAPITULO II

ESTUDIO EXPERIMENTAL SOBRE EL IMPACTO DE LOS VASOPRESORES ADMINISTRADOS PARA EL MANTENIMIENTO DEL DONANTE EN MUERTE CEREBRAL EN LA CALIDAD DEL INJERTO INTESTINAL

Introducción.

El trasplante intestinal sigue siendo la principal alternativa terapéutica para los pacientes con insuficiencia intestinal terminal y complicaciones asociadas a la nutrición parenteral total (Solar, Ortega y Gondolesi 2021) (Jansson-Knodell, Mangus y Gilmore 2021). El trasplante intestinal con un donante vivo es factible, sin embargo, debido al riesgo potencial para el donante, muy pocos programas utilizan esta alternativa, lo que da lugar a que la gran mayoría de los intestinos destinados al trasplante se obtengan para la donación tras la ME (Tzvetanov et al. 2018). Los órganos procedentes de ME son conocidos por ser de calidad inferior a los de los donantes vivos (Floerchinger, Oberhuber y Tullius 2012; L. G. Koudstaal et al. 2005) debido a los eventos hormonales, metabólicos y circulatorios relacionados con la muerte encefálica que también son concomitantes a los eventos inflamatorios que resultan en cambios a nivel tisular y celular que pueden requerir intervenciones específicas para obtener resultados óptimos (Meyfroidt et al. 2019).

La ME desencadena diferentes procesos biológicos relacionados con la desregulación de los circuitos homeostáticos. Entre ellos, se observa la liberación de catecolaminas que puede originar una subida transitoria de la presión arterial que suele ir seguida de hipotensión debido a cambios en los niveles hormonales relacionados con el balance de líquidos y electrolitos y a la caída de los niveles de catecolaminas endógenas (Lopau et al. 2000; Al-Khafaji et al. 2015). Normalmente, en esta fase la mayoría de los pacientes necesitan recibir diferentes agentes vasopresores para mantener la tensión arterial media (TAM) dentro de los límites fisiológicos. El manejo de la inestabilidad hemodinámica de los donantes con ME condiciona la calidad de los diferentes órganos para el trasplante, incluido el futuro injerto intestinal.

Se ha demostrado que el intestino es uno de los órganos más sensibles a las lesiones por isquemia-reperfusión (Grootjans et al. 2013). Se han realizado importantes esfuerzos para mejorar la calidad de la preservación de los órganos durante su obtención (Oltean 2015). Sin embargo, la mejora de la calidad de los órganos mediante la gestión del donante también contribuirá a mejorar el rendimiento de las distintas intervenciones realizadas a lo largo del procedimiento, siendo el mantenimiento del donante en la unidad de cuidados intensivos (UCI) una parte fundamental de todo el procedimiento.

Existen diferentes reportes sobre el uso tanto de la Noradrenalina como de la Dopamina para la corrección de la TAM. sin embargo, las unidades de cuidados intensivos (UCI) no adoptan en su mayoría un protocolo general para el uso de esta clase de fármacos durante la procura- ción de órganos (van Erp et al. 2018; Frenette et al. 2020). Aunque hay algunos estudios controla- dos y aleatorios que indican que la administración de dosis bajas de dopamina puede ser útil en el trasplante de corazón y riñón, no existe un consenso generalizado en la selección del fármaco va- soactivo para el manejo del donante en ME (Benck et al. 2011; Schnuelle et al. 2009).

La complejidad del proceso de muerte encefálica puede abordarse en modelos anima- les, entre los que se ha utilizado ampliamente el modelo en ratas de muerte cerebral oclusiva ge- nerado por el inflado de un balón intracraneal a velocidad controlada. Se han propuesto diferentes refinamientos, como la regulación de la velocidad de inflado para simular diferentes tipos de situa- ciones, como la causa de muerte traumática frente a la cerebrovascular (Rebolledo et al. 2016). En la mayoría de los protocolos experimentales de muerte cerebral en ratas el manejo de la ines- tabilidad hemodinámica se logra mediante el uso alternativo de Noradrenalina como fármaco va- sopresor, sin embargo los efectos diferenciales de estos fármacos en el intestino, que se ha mos- trado como uno de los órganos más reactivos después de la muerte cerebral (Lyan G. Koudstaal et al. 2008) (Lyan G Koudstaal et al. 2009), no se ha evaluado todavía. Dado que se ha informado de un mayor daño en la mucosa intestinal asociado a la activación de los receptores adrenérgicos (Takenaka, Guerreschi, y Basso 2017; You et al. 2021), nuestra hipótesis es que el uso de NE pue- de inducir un efecto diferencial en comparación con el uso de DA para mantener la TAM.

Con el objetivo de analizar el efecto diferencial del manejo de la Dopamina frente a la Noradrenalina en el donante con ME sobre la calidad del injerto intestinal, utilizamos un protocolo experimental más cercano a la práctica clínica real. Estudiamos los efectos de la muerte cerebral en aspectos morfológicos, fisiológicos y mecánicos del injerto intestinal comparando los anima- les tratados con Noradrenalina frente a los tratados con Dopamina.

Materiales y métodos.

USO Y CUIDADO DE LOS ANIMALES

Se utilizaron ratas Wistar macho, adultos de entre 280 y 320 gramos de peso, alojadas en una sala de clima controlado ($21 \pm 2^\circ\text{C}$ y humedad relativa del $45\% \pm 15\%$) en un ciclo de luz- oscuridad de 12h en las instalaciones de nuestra institución. El protocolo fue aprobado por el Co- mité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Cien- cias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata, Argentina (54-1-15T)

MODELO DE MUERTE ENCEFÁLICA

El modelo de muerte encefálica se basó en el modelo de inducción gradual de la muerte encefálica descrito por Pratschke et al (*Pratschke et al. 2000*). A través de una trepanación fronto-lateral del bregma, se introdujo un catéter Fogarty ®4F (Edwards LifeSciences Co, Irvine, Ca, USA) en el espacio subdural. La ME se indujo gradualmente inflando el balón con 500µl de solución salina utilizando una bomba de infusión de jeringa (PC11UBT, APEMA SRL, Buenos Aires, Argentina), con una tasa de 1ml/h. Después de 30±5 minutos, la ME se confirmó por test de apnea, reflejo de cushing y dilatación pupilar máxima.

PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO.

Todos los animales fueron anestesiados con isoflurano, inicialmente en una cámara saturada para la inducción, luego con una máscara, y finalmente y durante todo el procedimiento por vía endotraqueal.

Bajo el microscopio quirúrgico, se colocaron vías en la arteria carótida y en la vena yugular para controlar la TAM y manejar la fluidoterapia. Utilizando el mismo abordaje quirúrgico, se realizó una traqueotomía y se colocó un tubo endotraqueal para iniciar la ventilación asistida.

Todos los animales se mantuvieron bajo ventilación mecánica con 70 RPM, 2,5 ml/kg y PEEP 1-4 cmH₂O. (Harvard Apparatus 683 Small Animal Ventilator, Holliston, MA, USA), controlando la TAM (70-120 mmhg) la SpO₂, la FC y la temperatura (37-38°C). Los animales con una TAM inferior a 60 mmhg durante más de 10 minutos fueron descartados.

Tras dos horas de mantenimiento, se realizó un abordaje abdominal por línea media y se diseccionó el intestino delgado según la técnica descrita previamente (Stringa et al. 2017), se clampeó la aorta proximal a la arteria Mesentérica Superior y se lavó con 5 ml de solución de Ringer Lactato fría. A continuación se tomaron muestras de intestino delgado e hígado.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Se establecieron tres grupos. (Figura 18)

Grupo de ventilación asistida (VA) (N=6): utilizado como grupo de control: rata sometida a ventilación asistida durante dos horas, bajo anestesia sin procedimiento de ME ni uso de fármaco vasopresor.

Grupo de muerte encefálica con noradrenalina (MEN) (N=6): se utilizaron dos horas de soporte ventilatorio después de la muerte cerebral combinado con el uso de NA como agente vasopresor con una dosis máxima de $1\mu\text{g/kg/min}$, para mantener la TAM entre 70 y 120 mmHg, una dosis superior a la propuesta, se consideró como criterio de exclusión.

Grupo de muerte encefálica con dopamina (MED) (N=5): dos horas de soporte ventilatorio después de la Muerte Cerebral combinado con el uso de DA como agente vasopresor, $5\mu\text{g/kg/h}$ fue considerado como límite para los criterios de exclusión (Figura 19) (De Backer et al. 2003; Goradia et al. 2021)

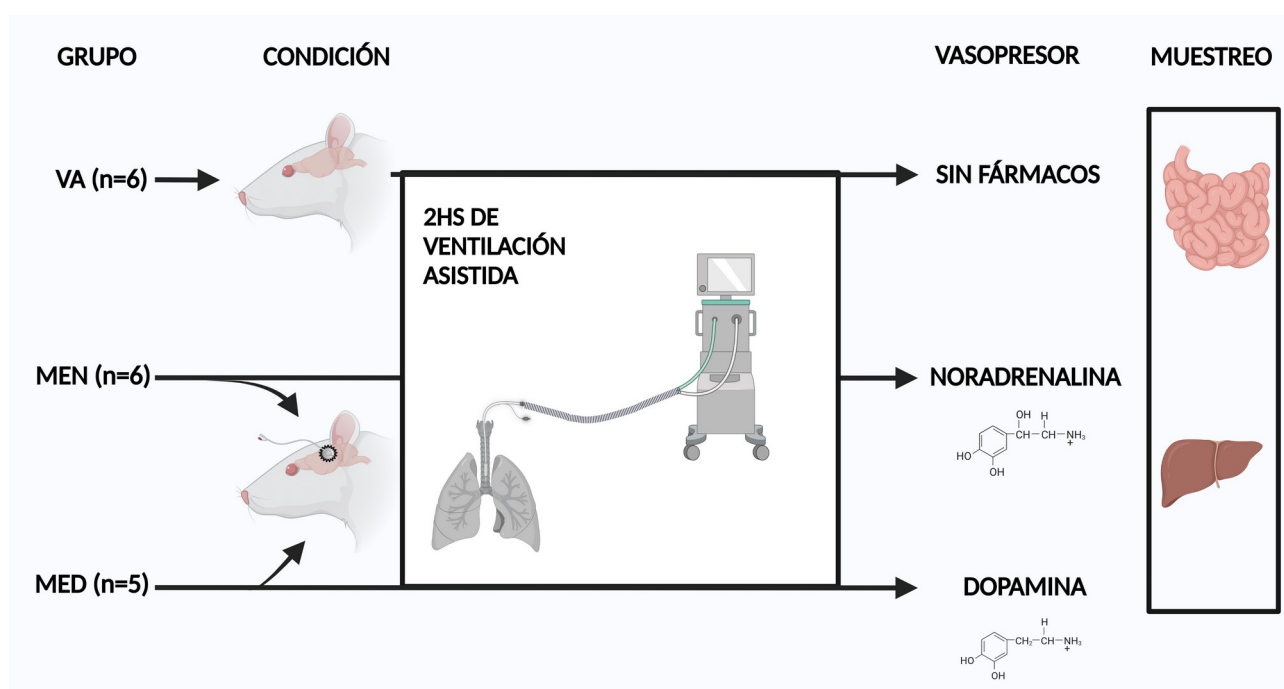


Figura 18: Representación esquemática del diseño experimental. Se utilizaron 3 grupos, dos de ellos con ME durante 2hs, en cada uno de éstos grupos la corrección de la TAM se realizó con Noradrenalina (NA) o Dopamina (DA). el grupo control (VA) sólo recibió ventilación asistida durante 2hs.

Un total de 6 ratas adicionales fueron descartadas durante los procedimientos quirúrgicos. Tres de ellas por hipotensión durante el mantenimiento que no pudo controlarse con vasopresores, dos por hemorragia en el lugar de la canulación arterial y una por edema pulmonar agudo.

MUESTREO

Se tomaron muestras intestinales del yeyuno para evaluar las lesiones histopatológicas y analizar la expresión génica, así como también se obtuvieron asépticamente muestras de hígado de la parte distal del lóbulo lateral izquierdo para analizar la traslocación bacteriana.

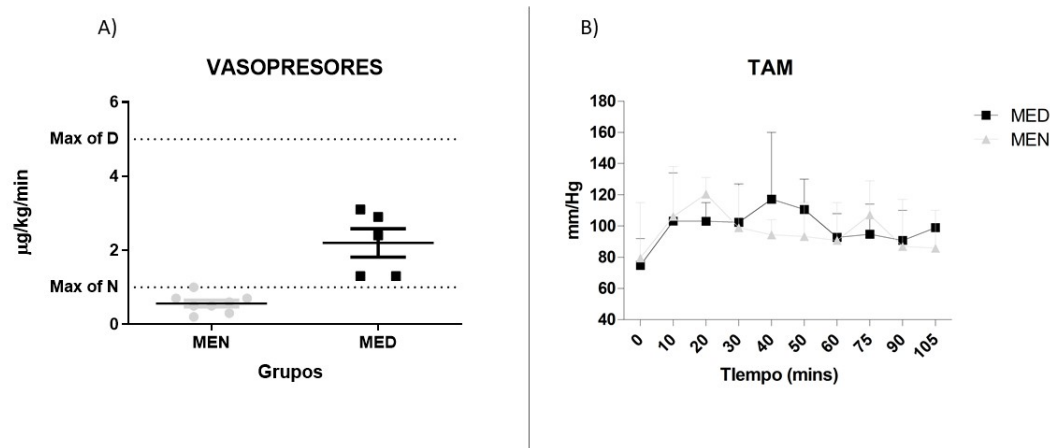


Figura 19: TAM y uso de vasopresores durante las 2hs de mantenimiento. A) Uso de DA y NA durante los experimentos. B) variación de la TAM durante el mantenimiento de la ME, no se detectaron diferencias significativas

EVALUACIÓN HISTOLÓGICA INTESTINAL

Se fijaron secciones del intestino delgado de los animales en formol al 10%, se incluyeron en parafina y se tiñeron con hematoxilina y eosina para su evaluación histológica.

El daño histológico por isquemia intestinal se puntuó según la clasificación de Park-Chiu descrita anteriormente (Park et al. 1990; Chiu Chu-Jeng Chiu, MD; Alice H. McArdle, PhD; Rea Brown, MD; Henry J. Scott, MD; y Fraser N. Gurd, MD 1970) (0, mucosa normal; 1, espacio subepitelial en la punta de la vellosidad; 2, espacio subepitelial más extendido; 3, levantamiento epitelial a lo largo del lado de la vellosidad; 4, vellosidad denudada; 5, pérdida de tejido de la vellosidad; 6, infarto de la capa de la cripta; 7, infarto de la mucosa; 8, infarto transmural). Para realizar un análisis más descriptivo que incluya tanto la lesión global como la focal, se analizó el daño isquémico en 9 campos aleatorios a 10 aumentos para cada muestra, a los que se asignó una puntuación dentro de la escala de PC. Para cada individuo, se tomó como representativa la mediana de los 9 campos aleatorios y los resultados se muestran como mediana y rango intercuartil dentro de cada grupo, representando el daño global. En el caso del análisis del daño focal, se cuentan los campos con valores mayores o iguales a 4 en la escala de PC y se les asigna un valor porcentual para cada individuo, luego los resultados se muestran como media y desviación estándar dentro de cada grupo.

Utilizando el software FIJI (Schneider, Rasband y Eliceiri 2012; Abràmoff, Magalhães y Ram 2004) se midió la altura de las vellosidad intestinal y la profundidad de la cripta para calcular

el índice Vellosidad/Cripta (IVC) y el espesor de la mucosa (EM). Se midieron al menos 20 vellosidades y criptas individuales en cada rata para determinar este parámetro. También se cuantificó el área total de la mucosa y se contó el número de vellosidades consideradas funcionales por poseer la capa de enterocitos sin solución de continuidad (≤ 3 en la escala de Park-Chiu) con el fin de calcular la densidad efectiva de vellosidades (DEV).

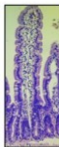
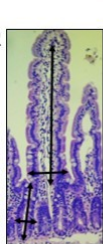
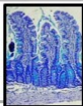
		
Parámetro	Tinción	Metodología de análisis
Daño isquémico Morfometría	Tinción H&E/ Escala Park-Chiu Tinción H&E. - IVC - EM - DEV	9 imágenes aleatorias 10x por individuo, analizadas de forma independiente. - Al menos 10 (máx. 20) Unidades de vellosidades/criptas por rata . (IVC y EM) - Se midió el área de la mucosa y sólo se contaron las vellosidades intactas. (DV) 1  2  3 
Función Secretoria/ Defensa primaria	Alcian Blue	Las células Goblet se contaron en 25 vellosidades aleatorias por muestra. 
Infiltrado Inflamatorio	IHQ anti Cd3+	Se contaron Cd3+ en 150 campos de 40x por cada muestra. 

Figura 20: Metodología de análisis histológico del tejido intestinal.

El recuento de células Goblet se realizó con tinción Alcian Blue/rojo neutro (Casselbrant et al. 2018) contando 25 vellosidades seleccionadas al azar por animal.

La técnica de inmunohistoquímica se realizó utilizando un anticuerpo anti CD3 (DakoCytomation, California, EE.UU.) y el kit LSAB2® (DakoCytomation, California, EE.UU.) como método de detección utilizando DAB como sustrato. La recuperación del antígeno se realizó con el método de vapor (Mason et al. 1989). Se utilizó hematoxilina como colorante de contraste y bál-samo sintético como medio de montaje (detalle del protocolo en ANEXO I).

Se contaron los linfocitos T CD3+ en 150 campos seleccionados al azar con un au-mento de 40x por individuo. (Figura 20)

CULTIVO DE BACTERIAS

Se tomó asépticamente una porción de hígado de aproximadamente 1g y se colocó en tubos estériles que contenían 3ml de PBS estéril. El órgano se homogeneizó y la suspensión se diluyó en series 1:10 y 1:100 y luego se sembraron 100µl de esa suspensión en una placa de LB-agar. El crecimiento bacteriano se evaluó por recuento de colonias tras 48 h de crecimiento a 37°C. Los resultados se expresaron como UFC por gramo de tejido. (Figura 21)

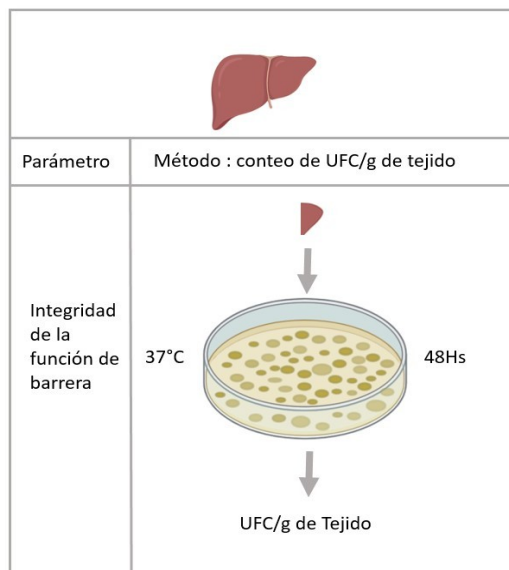


Figura 21: Esquema del método de cultivo de tejido hepático para la evaluación de traslocación bacteriana.

Para validar el muestreo aséptico, en este caso, añadimos un grupo SHAM (N=4), donde los individuos fueron anestesiados, acondicionados asépticamente y muestreados a través de una laparotomía en la línea media (no mostrado).

AISLAMIENTO Y CUANTIFICACIÓN DEL ARN

La extracción del ARN total del injerto intestinal se realizó con el kit NucleoSpin RNA II (GE Healthcare, EE.UU.). La transcripción inversa se realizó utilizando primers aleatorios y MMLV-Transcriptasa inversa (Invitrogen, EE.UU.) según las instrucciones del fabricante. La PCR cuantitativa en tiempo real se realizó siguiendo el protocolo del fabricante utilizando el termociclador iCycler iQ5 (BioRad, EE.UU.). Los primers para IL6, IL22, CXCL10 y Actin-b de rata fueron diseñados por nuestro grupo o adaptados de la literatura: qRat-actB-forward ACAACCTTCTTGCAGCTCCTC 1; qRat-actB-reverse ACAACCTTCTTGCAGCTCCTC 1; qRat-IL6-forward CTGATTTGAACAGCGATG 1; qRat-IL6-reverse GAACTCCAGAACCAGAG 1; qRat-CXCL10-forward CTGCACCTGCATCGACTTCC; qRat-CXCL10-reverse TTCTTTGGCTCACCGCTTTC; qRat-IL22-forward

TGGTGCCTTTCCTGACCAA self design; qRat-IL22-reverse GTTCTGGTCATCACGCTGAT self design. El cálculo de la diferencia relativa mediante el método $\Delta\Delta C_t$ se describió previamente (Anderle et al. 2005; Ramos, Rumbo y Sirard 2004).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante un análisis de la varianza o Kruskal Wallis, seguido de la prueba de Dunn para comparaciones múltiples o la prueba t de Student o la prueba de Mann-Whitney para datos con distribución normal o no, según el caso, utilizando el software GraphPad 5.0. Los resultados se expresaron como media $\pm$ error estándar de la media. En el caso de la escala de PC, dado que es una variable de naturaleza cualitativa ordinal se utiliza para su análisis estadístico la prueba de Mann Whitney o Kruskal Wallis los resultados se expresan como mediana y RIC. Las diferencias entre las medias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$.

Resultados.

LOS DONANTES TRATADOS CON NORADRENALINA PRESENTARON UNA MAYOR LESIÓN ISQUÉMICA FOCAL EN LA MUCOSA INTESTINAL SIN UNA MODIFICACIÓN SUSTANCIAL DE LOS PARÁMETROS MORFOMÉTRICOS EN COMPARACIÓN CON LOS DONANTES TRATADOS CON DOPAMINA.

La ME tiene un impacto negativo en la mucosa intestinal. Ambos grupos bajo la condición de ME mostraron una mayor puntuación en la escala PC en comparación con el VA. El grupo MEN fue el más dañado (1;1-2 en la escala PC) seguido del grupo MED (1;0-2 en la escala PC) y finalmente el VA fue el que presentó el menor grado de lesión (0,5;0-1) (Figura 22-A). Para determinar la extensión del daño focal, se calculó el porcentaje de tejido que mostraba valores superiores a 4 en la escala de Park-Chiu para cada condición. El grupo MEN mostró el mayor daño focal incluyendo un 22% de valores ≥ 4 . El MED presentó un 13,20% de valores ≥ 4 en la escala PC, mientras que en el grupo VA el 9,16% (Figura 22-B). Estos resultados indican que la selección del vasopresor tiene un impacto en la integridad de la mucosa.

Además, el IVC fue ligeramente superior en MEN ($3,31 \pm 1,03$) en comparación con VA ($2,94 \pm 0,96$) y MED ($2,75 \pm 0,88$) (Figura 23-A). La mucosa intestinal se encontró más gruesa en los grupos tratados. MED mostró el mayor valor ($546,1 \pm 70,95$) seguido de MEN ($488,1 \pm 136,5$) y VA ($472,4 \pm 153,3$) respectivamente (Figura 23-B). Por otro lado, la densidad efectiva de las vellosidades no se vio sustancialmente afectada con el uso de vasopresores (VA= $10,08 \pm 5,52$; MEN= $11,12 \pm 6,17$ y MED= $9,051 \pm 2,93$) (Figura 23-C).

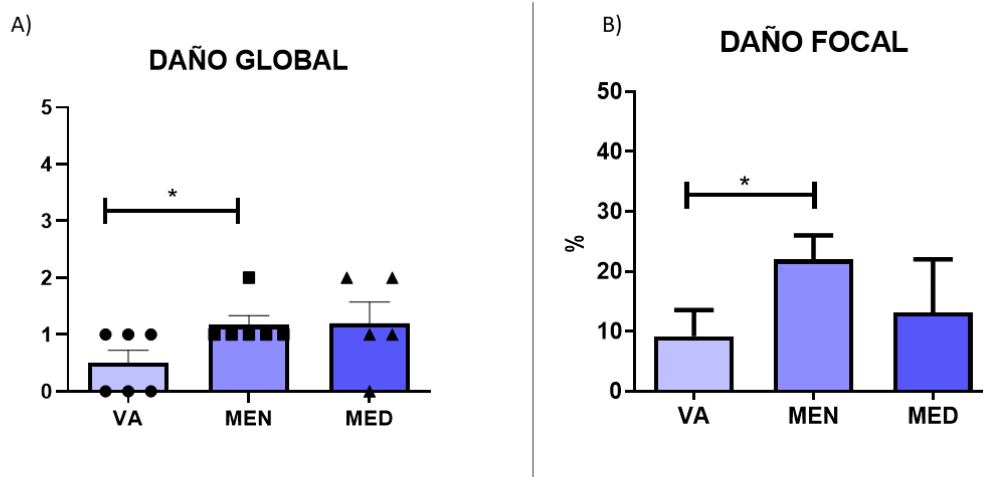


Figura 22: Resultados de daño histológico. A) Daño global y B) Daño focal. El grupo MEN evidenció un mayor daño tanto a nivel focal como global (* : $p = <0.05$)

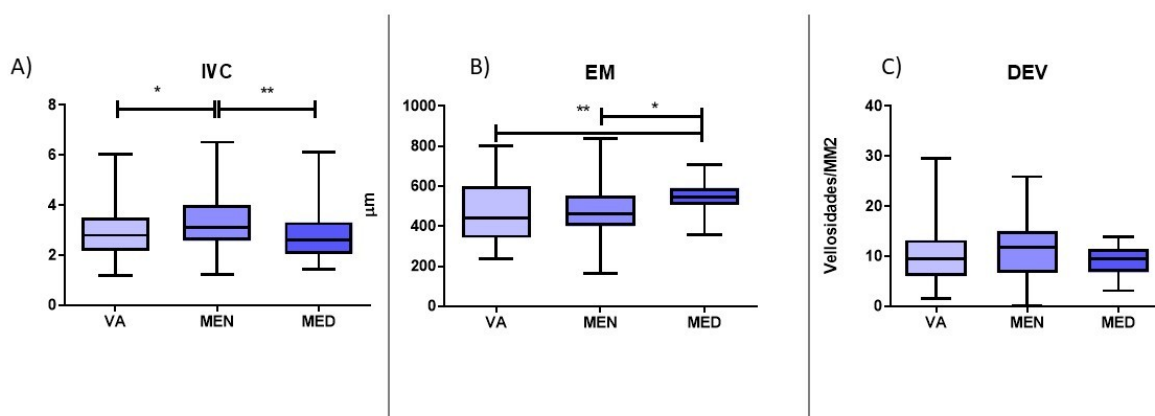


Figura 23: Resultados de morfometría de la mucosa intestinal. A) Índice Vellosidad/Cripta, B) Espesor de mucosa y C) Densidad efectiva de vellosidades. Los parámetros morfométricos analizados evidencian cambios con los procedimientos y con el uso de los diferentes vasopresores destacándose el mayor EM en el grupo MED(*: $p = <0.05$; **: $p = <0.01$)

LA MUERTE ENCEFÁLICA AFECTA A LA POBLACIÓN DE CÉLULAS GOBLET EN LAS VELLOSIDADES.

Las células Goblet representan una importante barrera de defensa contra las injurias de origen luminal y evitan el contacto directo de las bacterias con los enterocitos mediante la secreción de mucina. La muerte encefálica disminuye significativamente el número de células Goblet a lo largo de las vellosidades (Figura 24-A, $P = <0.01$). El grupo de control mostró una media de

28,45 ($\pm 7,18$) células Goblet por vellosidades, mientras que el promedio de células Goblet por vellosidades en los grupos MED y MEN era de 17,54 ($\pm 3,01$) y 17,07 ($\pm 2,8$) respectivamente, lo cual demuestra que, independientemente del fármaco vasopresor utilizado, se produce una marcada disminución del recuento de células Goblet. Esta disminución del GC es más pronunciada en el grupo NE con respecto al GC (P: 0,0025 prueba t realizada) y un poco menos notable pero aún significativa entre el GC y el DA (P: 0,0059 prueba t realizada).

EL NÚMERO LINFOCITOS T CD3+ EN LA MUCOSA ES MAYOR EN LOS INTESTINOS PROCEDENTES DE DONANTES CON ME TRATADOS CON NORADRENALINA.

Como se ha mencionado anteriormente, los órganos procedentes de donantes con ME son de menor calidad en comparación con los donantes vivos, uno de los aspectos que impactan en el estado del tejido es la actividad inflamatoria en la lámina propia. Analizamos la población de linfocitos en la lámina propia intestinal en diferentes situaciones. Se observan 4,4 ($\pm 1,45$) linfocitos CD3+ por campo de 40x en el grupo VA, estos valores se duplicaron en el caso de los donantes tratados con Dopamina (MED = 8,8 $\pm$ 2,94) y fueron aún mayores en los donantes tratados con Noradrenalina (MEN = 12,95 $\pm$ 1,07) (Figura 24-B; p<0,0001). Estos resultados confirman en el intestino lo que ya se había descrito para otros tejidos (Habes et al. 2018; Gosain et al. 2006), y muestran que el tratamiento con Noradrenalina se asocia con los niveles más altos de infiltración de linfocitos en la lámina propia.

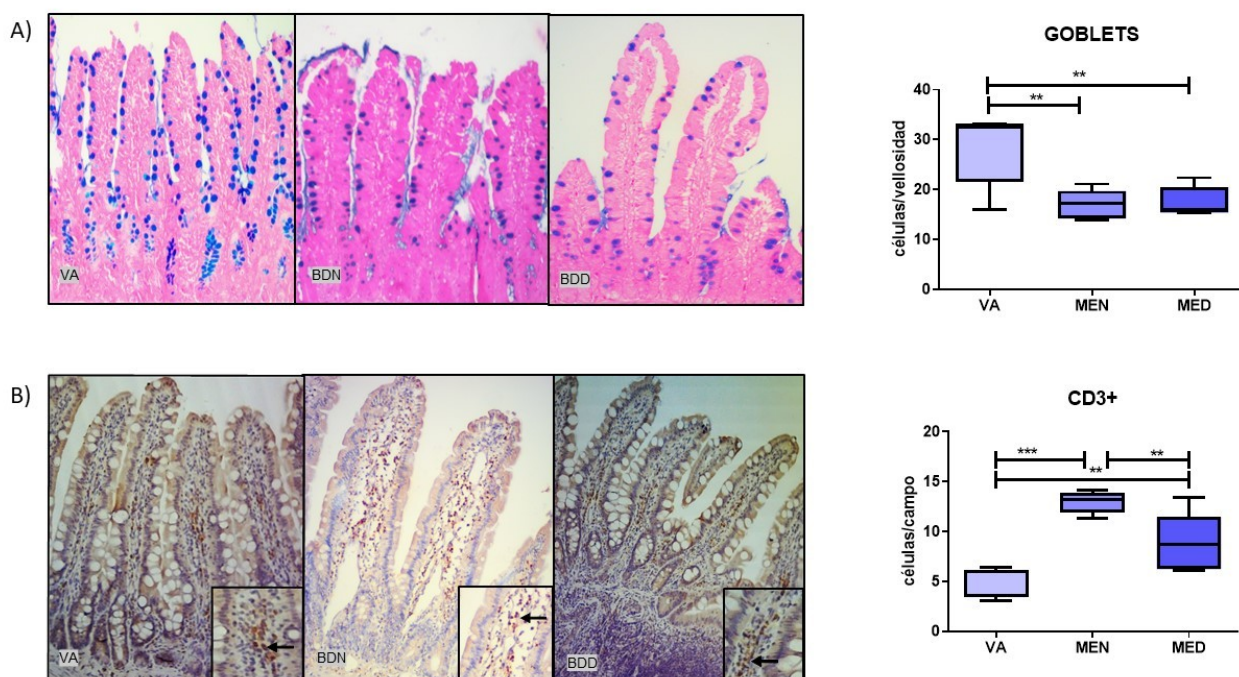


Figura 24: Conteo diferencial de poblaciones celulares. A) Microfotografías representativas de la tinción con Alcian Blue para el conteo de células Goblet y sus resultados. B) Marcación inmunohistoquímica para detección de linfocitos T CD3+, microfotografías representativas en 10x y 40x. las flechas negras indican células positivas. (: p= <0.01; ***: p= <0.001)**

Para investigar la expresión genética inflamatoria del injerto intestinal, se evaluaron los niveles de expresión de IL6, IL22 y CXCL10 en los diferentes grupos. La IL22 mostró una tendencia a una menor expresión en los grupos MED y MEN en comparación con el control ventilado, mientras que en el caso de la CXCL10 el grupo VA mostró una menor actividad de esta citoquina en comparación con los otros grupos en estudio. En el caso de la IL6, el MEN fue el grupo con mayor expresión de esta citoquina mientras que el MED y el VA mostraron resultados similares (Figura 25- A, B y C).

EL USO DE NORADRENALINA AFECTA A LA PERMEABILIDAD DE LA BARRERA INTESTINAL AMPLIFICANDO LA TRASLOCACIÓN BACTERIANA.

La ME tiene un efecto deletéreo sobre la barrera intestinal, promoviendo la migración bacteriana desde el lumen al torrente sanguíneo colonizando diferentes órganos abdominales (Weaver et al. 2018)(Stanley et al. 2016). Al utilizar NE, pudimos observar un aumento significativo de la translocación bacteriana al hígado, en comparación con el GC (GC vs NE $p=0,044$ prueba t realizada); mientras que el uso de DA mostró resultados intermedios (Figura 25-D).

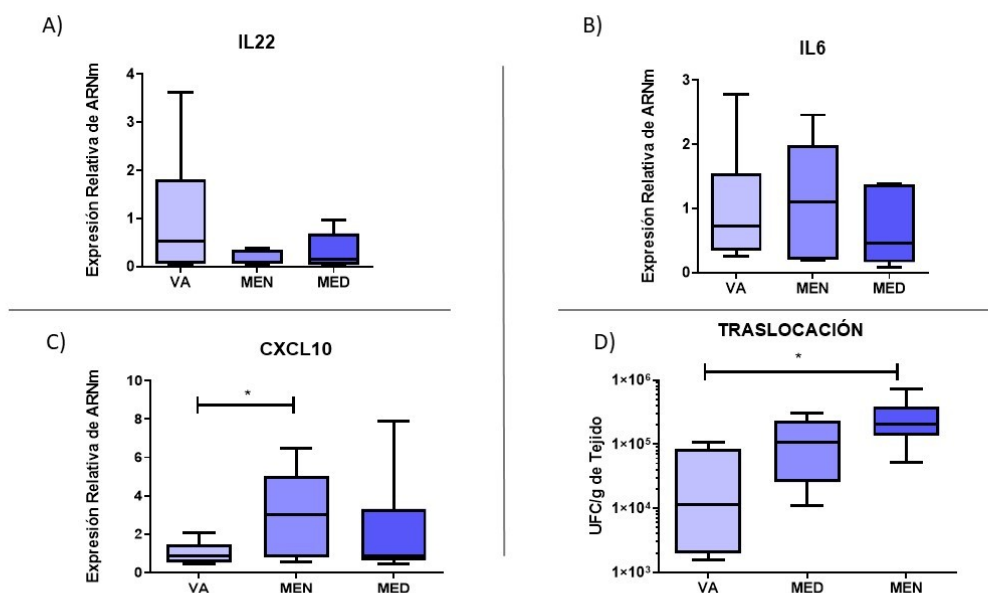


Figura 25: Evaluación de la expresión genética y traslocación bacteriana. A), B) y C) Expresión genética en muestras de intestino, A) IL22, B) IL6 y C) CXCL10. D) Evaluación de la función barrera del intestino mediante cultivo de muestras de hígado tomadas asépticamente. El grupo MEN arrojó valores de dos órdenes de magnitud respecto al grupo VA (*: $p<0.05$)

Conclusión.

Estudios previos (L. G. Koudstaal et al. 2005) describieron el efecto negativo directo de la ME y el mantenimiento en los injertos obtenidos, pero se ha escrito poco sobre el efecto en la mucosa intestinal y el injerto intestinal.

Nuestros resultados, mostraron que las alteraciones en los parámetros hemodinámicos pueden producir alteraciones de la arquitectura de la mucosa; observando que los cambios fueron mas negativos en los animales bajo NA como vasopresor, en comparación con los que recibieron DA. Estas observaciones podrían basarse en el hecho de que la DA aumenta el flujo sanguíneo de la AMS y es capaz de mantener una oxigenación adecuada del intestino delgado, como se demostró en un modelo de cerdo con ME (Martikainen et al. 2010). Por otro lado, la NA utilizada en pacientes críticos se ha asociado con el daño de los enterocitos, lo que coincide con nuestras observaciones, apoyando nuestros hallazgos en un modelo de investigación traslacional con roedores (Habes et al. 2018).

Más allá de la inestabilidad hemodinámica, los efectos de la ME en los órganos obtenidos podrían estar relacionados con la liberación de mediadores proinflamatorios al compartimento circulatorio, lo que se ha relacionado con cambios en las moléculas de adhesión endotelial (Lyan G. Koudstaal et al. 2008). Este proceso provoca un efecto secundario al aumentar la infiltración de células inmunitarias (Lyan G. Koudstaal et al. 2008). En concordancia, encontramos un marcado aumento de linfocitos T CD3+ en los intestinos de los grupos ME. Sorprendentemente, los animales tratados con DA mostraron infiltrados CD3 significativamente menores en comparación con los animales tratados con NA. Se ha informado de que en condiciones clínicas estresantes, como el estrés térmico, el uso de NA produce una expresión deficiente de las proteínas de unión estrecha (Luo et al. 2021), lo cual aumenta la permeabilidad epitelial e induce la translocación bacteriana y la migración de células inmunitarias hacia la mucosa intestinal, como se observó en nuestro entorno experimental; en nuestros experimentos, el aumento del contenido bacteriano en el hígado puede atribuirse a los cambios descritos en la permeabilidad de la mucosa, lo que provoca una lesión significativa de la función de barrera intestinal. Notablemente, observamos que la ME por sí misma produce un aumento de la traslocación bacteriana, que también están en concordancia con informes anteriores de aumento de endotoxina sistémica en el modelo animal de ME sin usar vasopresores (Lyan G Koudstaal et al. 2009; Luo et al. 2021). Curiosamente, también observamos un aumento de la expresión de genes proinflamatorios en el animal de ME. El hecho de encontrar una expresión reducida de IL-22, en los animales con ME en comparación con los controles, añade que la ME también podría tener un deterioro asociado de la vía de regeneración del epitelio intestinal (Keir et al. 2020).

Existen varias revisiones sobre la superioridad de la NA frente a la DA en cuanto a eventos de shock en UCI (De Backer et al. 2003; Sakr et al. 2006), aun así, la mayoría de los parámetros analizados se centran en el paciente en tratamiento y su supervivencia. En la procuración de órganos, la importancia del uso de uno u otro vasopresor podría tener un impacto en la supervivencia de los órganos trasplantados (Martikainen et al. 2010; Korte et al. 2016). Aunque hay estudios que reportaron que el efecto del uso de altas dosis de vasopresores no ha mostrado diferencias en la supervivencia a 1 año (Pahari et al. 2017), no se evaluaron los efectos a corto plazo que pueden ser clínicamente relevantes como el retraso en la función del injerto, la estancia en la UCI, la duración de la dependencia de la asistencia ventilatoria, el tiempo hasta el alta, entre otros. Además, también falta información sobre el número de donantes que no son aceptados para ser utilizados debido a las altas dosis de NE utilizadas para sostener el shock como resultado de la tormenta de catecolaminas por la muerte cerebral, que también requiere la necesidad de un aumento progresivo de la reanimación con fluidos, lo que también tiene un efecto deletéreo para los órganos abdominales al producir edema y reducir la motilidad intestinal; como se observa en la recuperación. Un problema adicional en la mayoría de los países está relacionado con la falta de información registrada; ya que en general esos problemas se registran como "mala calidad del órgano/donante" sin información adicional; siendo el páncreas y el intestino los órganos más comprometidos (Wiseman et al. 2010)

Aunque se carece de estudios controlados que puedan contribuir a la selección del agente vasopresor, los conocimientos producidos en este estudio podrían contribuir a producir un estudio clínico con el objetivo de mantener a los donantes con la comprensión del uso del vasopresor que beneficiará a la preservación de la integridad del órgano u órganos que se utilizarán.

Nuestro estudio experimental tiene las limitaciones inherentes al uso de modelos de roedores que hacen que las extrapolaciones a situaciones clínicas no sean directas. Hemos seleccionado un único periodo de tiempo para analizar los efectos de la muerte cerebral, condición que puede tener una evolución dinámica. También hemos medido los infiltrados celulares sin evaluar la muerte/migración celular, lo que puede explicar parte de las diferencias observadas. A pesar de estas limitaciones, nuestros resultados ponen de manifiesto el impacto de la ME y el apoyo necesario en la calidad del injerto intestinal, generando evidencias para nuevos estudios experimentales sobre la lesión por isquemia-reperfusión, el rechazo del injerto y la EICH. Una mejor comprensión de la fisiopatología subyacente permitirá mejorar el manejo del donante en la UCI, así como estrategias alternativas de pre o post acondicionamiento para mejorar la calidad y la disponibilidad de órganos adecuados para realizar procedimientos de trasplante eficaces (Malinoski et al. 2011; Salim et al. 2006).

En general, y en consonancia con los estudios que sugieren un efecto beneficioso del uso de dosis bajas de Dopamina para mantener a los donantes (Schnuelle, Benck, y Yard 2018), nuestros resultados indican que el uso de la Dopamina como principal fármaco vasoactivo para manejar la inestabilidad hemodinámica asociada a la ME puede contribuir a mejorar la calidad del injerto intestinal, incluyendo la preservación de la función de barrera y la menor translocación bacteriana.

ANEXO I

Técnica de Inmunohistoquímica para Anticuerpos anti CD3 y E-Cadherina

1. Desparafinar: 2 pasajes en xilol de 10 minutos cada uno (observar que el xilol no esté turbio, con burbujas o hidratado).
2. Hidratar: 2 pasajes en alcohol 100° de 5 minutos cada uno, 2 pasajes en alcohol 96° de 3 minutos cada uno, 1 pasaje en alcohol 80° de 3 minutos, 1 pasaje en alcohol 70° de 3 minutos y pasar a agua destilada o PBS.
3. Lavar con PBS durante 10 minutos.
4. Realizar la recuperación antigénica con citrato a pH 6 en (olla a presión durante 7 minutos) (vaporiera 40 minutos) y dejar enfriar en forma paulatina 15 a 20 minutos.
5. Lavar con PBS durante 10 minutos.
6. Inactivar la peroxidasa endógena durante 30 minutos en solución de PBS con 3% H₂O₂ (3ml de H₂O₂ en 100 ml de PBS).
7. Lavar con PBS durante 10 minutos.
8. Bloqueo de uniones inespecíficas: incubar con leche descremada durante 40 minutos en cámara húmeda (0,5 g de leche descremada en polvo en 20 ml de PBS) (BSA al 1%)
9. Volcar el exceso de leche y secar los bordes del portaobjetos.
10. Cubrir con el anticuerpo primario durante toda la noche (overnight) a 4° C en cámara húmeda (en heladera en posición horizontal para evitar que se seque). Anticuerpo primario anti CD3 o E-Cadherina listo para usar.
11. Realizar 3 lavados con PBS durante 10 minutos cada uno.
12. Incubar con el anticuerpo secundario (AMARILLO) durante 20 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda (DAKO LSAB2).
13. Lavar con PBS durante 10 minutos.
14. Incubar con la solución de estreptavidina-biotina-peroxidasa (ROJO) durante 20 minutos en cámara húmeda (DAKO LSAB2).
15. Lavar con PBS durante 10 minutos.
16. Revelado: incubar con DAB 3 a 5 minutos (1 gota en 1ml) (DAKO).
17. Interrumpir la reacción sumergiendo los cortes en PBS o H₂O destilada.
18. Realizar la coloración de contraste sumergiendo los cortes en hematoxilina de Gill durante 10 a 30 segundos (ajustar el tiempo en función de los resultados) y luego lavar con agua corriente de 10 a 15 minutos. Luego colocar en H₂O destilada.
19. Deshidratar: 1 pasaje en alcohol 70° de 3 minutos, 1 pasaje en alcohol 80° de 3 minutos, 2 pasajes en alcohol 96° de 3 minutos cada uno, 2 pasajes en alcohol 100° de 5 minutos cada uno, y 2 pasajes en xilol de 5 minutos cada uno.

20. Montar con bálsamo de Canadá y cubreobjetos.

MUERTE ENCEFÁLICA Y PRESERVACIÓN FRÍA. COMPORTAMIENTO DEL INJERTO INTESTINAL PROVENIENTE DE DIFERENTES ESCENARIOS DE DONACIÓN.

Introducción.

El intestino delgado es particularmente sensible al daño por preservación ya que las células epiteliales intestinales son extremadamente sensibles a la isquemia. Éste daño producido al enterocito en la interrupción del suministro de oxígeno durante la procuración lleva al daño de la barrera epitelial y subsecuentemente traslocación bacteriana.

Todo órgano destinado a trasplante necesita indefectiblemente de un tiempo de isquemia fría que va desde el lavado del órgano in situ, hasta la reperusión en el receptor. La preservación fría en el injerto intestinal se basa, inicialmente en la perfusión vascular seguido de un tiempo de preservación fría en una solución específica. Dicho tiempo, es bajo al compararlo con el riñón. Clínicamente hablando, la preservación fría se encuentra por debajo de las 10hs, dado que por encima de éste tiempo la ruptura de la barrera epitelial conlleva un riesgo superior. (Oltean 2015). Éste método es el de elección desde hace más de 30 años en los diferentes programas de trasplante de intestino (Roskott et al. 2011).

Conjuntamente con el daño producido por la ME, la manipulación quirúrgica y la IIR, el daño por preservación fría es un factor crucial en la calidad del injerto para trasplante. Si bien el uso de la hipotermia tiene como objetivo disminuir el gasto metabólico celular y retrasar procesos injuriosos, el frío genera en las células desbalances en la homeostasis iónica, aumento de la permeabilidad mitocondrial y apoptosis inducida por hipotermia, ya descrita en el capítulo I. (Lautenschläger et al. 2018; Rauen y de Groot 2004)

El uso de animales de laboratorio, particularmente la rata, es muy común cuando se estudia el daño por preservación en órganos destinados a trasplante, aunque para una mejor traslación clínica, es ideal el uso de un modelo en cerdos o bien muestras de tejido humano (Søfteland et al. 2019b). Otro aspecto traslacional interesante es el uso de modelos experimentales que incluyan situaciones más cercanas a la clínica, es decir, agregar el impacto que tiene la VA, al que los donantes de cualquier órgano sólido irremediablemente se someten, y más aún en el caso de los donantes de intestino resulta menester contemplar en los modelos experimentales en roedores el agregado de la muerte encefálica, ya que, si bien existen algunos casos en los que se han utilizado donantes vivos, la inmensa mayoría de los injertos intestinales para trasplante se procuran de donantes con muerte encefálica (Vecchio Dezillio et al. 2021).

Por último, es muy interesante incluir en los estudios experimentales nuevas alternativas de donación que contribuyan a aumentar el *pool* de intestinos disponibles para trasplantes y de algún modo, contribuir a la reducción de los pacientes en lista de espera para trasplante (Gondolesi, Doeyo, y Solar-Muñiz 2020). En éste aspecto, hemos incluido un grupo de donación en parada cardíaca Maastricht tipo III, muy difundido mundialmente para trasplante de hígado, riñón y páncreas, pero que aún no se ha utilizado en trasplante intestinal, en parte dada la escasa evidencia experimental de la que se dispone y también por que esa evidencia fue negativa a pesar de que el estudio tiene múltiples limitaciones experimentales y metodológicas (Cobianchi et al. 2009).

Todo lo expuesto anteriormente motiva este capítulo, en el cual se analizan diferentes aspectos de la integridad morfológica y funcional del intestino procurado en diferentes escenarios de donación recreados experimentalmente y, a su vez, su comportamiento en tiempos cortos, intermedios y prolongados de preservación.

Materiales y métodos.

ANIMALES.

En este estudio se utilizaron ratas Wistar macho adultas (8-10 semanas). Los animales fueron alojados en grupo en una sala de clima controlado con un ciclo de luz y oscuridad de 12 horas en las instalaciones de la cátedra de Trasplante de Órganos de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de La Plata. Los protocolos experimentales se realizaron siguiendo estrictamente las recomendaciones del Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata.

PROCEDIMIENTOS QUIRÚRGICOS.

Para realizar una comparación con los modelos experimentales mas utilizados en la literatura, tomamos como grupo control al Donante Vivo (DV), en ésta caso, la rata se anestesió con isofluorano, inicialmente en cámara saturada y posteriormente durante su mantenimiento con máscara. Con el animal colocado en decúbito dorsal, se abordó la cavidad abdominal por línea media, y se tomaron muestras de yeyuno para su preservación.

El grupo de muerte cerebral (ME) se basó en un modelo previamente comunicado (Kolkert et al. 2007; Cicora et al. 2013; Leandro; Vecchio et al. 2021) , Brevemente, Los animales se colocaron en posición de decúbito dorsal sobre una manta térmica para permitir la inserción de

una cánula en la arteria carótida derecha conectada a un monitor multiparamétrico (DYNE MCO-300-07) para el control de la presión arterial. Otra cánula se colocó en la vena yugular izquierda con el objeto de manejar la fluidoterapia y suministrar drogas vasopresoras en caso de ser necesario. Posteriormente, se realizó una traqueotomía iniciando la ventilación asistida (Ventilador para roedores Harvard Apparatus modelo 683), se posicionó en decúbito esternal al animal para colocar una cánula de balón de 4F por vía subdural a través una trepanación craneana previa y se insufló a un flujo de 1 mL/h (Bomba de infusión a jeringa PC11-UBT, APEMA SRL). Cuando se observó el reflejo de Cushing, se realizó un test de apnea para confirmar la ME, pasadas 2hs bajo esta condición se tomaron las muestras de yeyuno para su preservación.

Para considerar el daño remoto producido por la VA (Quílez, López-Aguilar, y Blanch 2012; Villar et al. 2011; Hepokoski et al. 2017) se incluyó un grupo bajo esta condición. El procedimiento para el grupo VA fue igual que el ME con la diferencia de que se omite la trepanación del cráneo y la inducción de ME.

El modelo de DMC Maastricht III es idéntico al realizado para la VA hasta llegadas las 2hs de ventilación, posteriormente se indujo un neumotórax mediante una incisión diafragmática, tal como se informó previamente (Zhong et al. 2019). La ventilación mecánica se mantuvo durante 5 minutos luego de perder la presión negativa intratorácica, con el objetivo de asegurarnos que la VA sea efectiva. Una vez concluido ése tiempo, se retiró el soporte ventilatorio y térmico. Basándose en los parámetros de la donación pediátrica, se diagnosticó MC cuando la presión arterial cayó por debajo de 30 mmHg. Una vez transcurridos 5 minutos de MC, se tomaron las muestras de yeyuno para preservación. (Figura 26)

LAVADO Y PRESERVACIÓN.

Finalizados los procedimientos quirúrgicos mencionados previamente, se realizó un lavado con solución de Ringer Lactato heparinizada a 4°C por vía arterial. Una vez que el intestino está adecuadamente lavado se tomó un segmento de yeyuno de unos 10-12cms y a su vez se lo dividió en segmentos mas pequeños de unos 2 – 3 cms cada uno, los cuales se colocaron en 3 tubos con 15 ml de solución de preservación HTK (Histidina-Triptofano-Ketoglutarato, Custodiol®) y se almacenaron a 4°C durante 4, 8 y 12hs. También se tomó una muestra inmediatamente post cirugía siendo ésa muestra nuestro tiempo cero. (Figura 26)

DISEÑO EXPERIMENTAL.

Veinte animales donantes se dividieron en cinco grupos experimentales (cinco ratas por grupo), como se indica a continuación. (Figura 26)

1. Donante vivo convencional (DV): perfusión de órganos y toma de muestras;
2. Donante vivo ventilado (VA): ventilación mecánica durante 2 horas, perfusión de órganos y toma de muestras;
3. Donante con muerte encefálica (ME): ME y ventilación durante 2h, perfusión de órganos y toma de muestras;
4. Donación con muerte circulatoria (MC): ventilación mecánica durante 2 h, 5 min de MC, perfusión de órganos y toma de muestras.

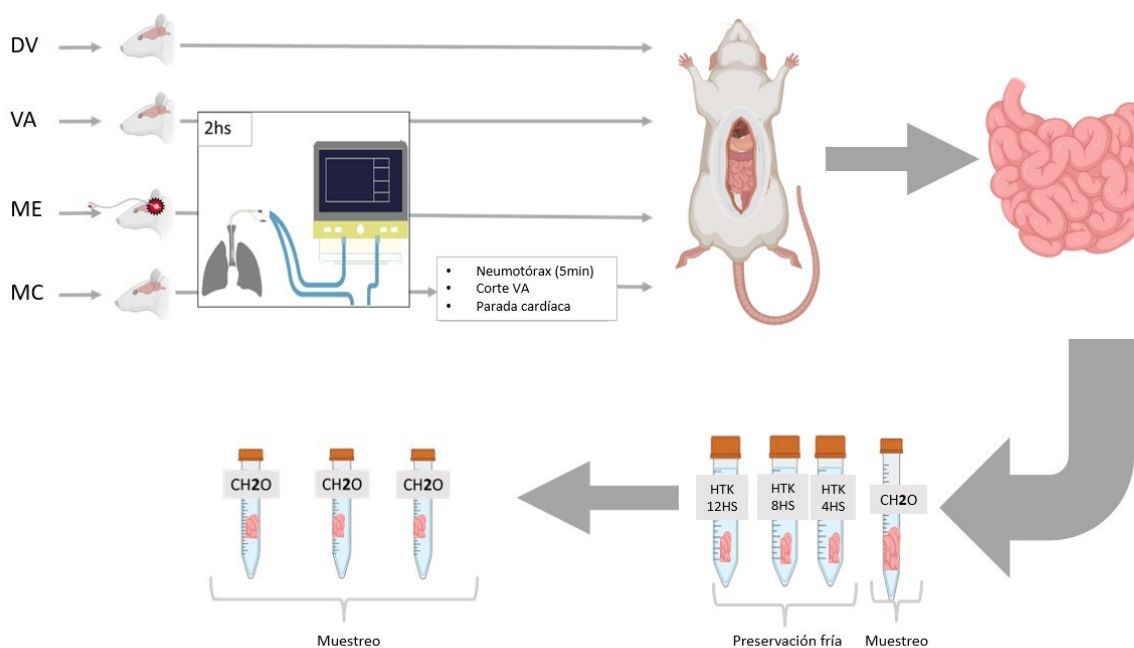


Figura 26: Esquema del modelo empleado. El grupo DV fue anestesiado, preparado quirúrgicamente y se tomó la muestra; El grupo VA fue anestesiado, se colocó una vía arterial y se mantuvo con ventilación asistida durante 2hs; Al grupo ME se lo preparó de igual manera que al VA, se le indujo la ME y una vez diagnosticada se mantuvo durante 2hs en esta condición; El grupo MC se preparó igual al VA pero una vez pasadas las 2hs de ventilación asistida se realizó una incisión en el diafragma, se apagó el respirador y se lo dejó 5min en muerte cardíaca. En todos los casos una vez concluido el procedimiento se lavó el intestino y se tomaron 4 muestras, una directamente a formol y las 3 restantes para preservación en HTK. Una vez pasado el tiempo estipulado de preservación fría las muestras se colocaron en formol.

Se fijaron secciones del intestino delgado de los animales en formol al 10%, se incluyeron en parafina y se tiñeron con hematoxilina y eosina para su evaluación histológica.

El daño histológico por isquemia intestinal se puntuó según la clasificación de Park-Chiu descrita anteriormente (Park et al. 1990; Chiu Chu-Jeng Chiu, MD; Alice H. McArdle, PhD; Rea Brown, MD; Henry J. Scott, MD; y Fraser N. Gurd, MD 1970) (0, mucosa normal; 1, espacio subepitelial en la punta de la vellosidad; 2, espacio subepitelial más extendido; 3, levantamiento epitelial a lo largo del lado de la vellosidad; 4, vellosidad denudada; 5, pérdida de tejido de la vellosidad; 6, infarto de la capa de la cripta; 7, infarto de la mucosa; 8, infarto transmural). Para realizar un análisis más descriptivo que incluya tanto la lesión global como la focal, se analizó el daño isquémico en 9 campos aleatorios a 10 aumentos para cada muestra, a los que se asignó una puntuación dentro de la escala de PC. Para cada individuo, se tomó como representativa la mediana de los 9 campos aleatorios y los resultados se muestran como mediana y RIC dentro de cada grupo, representando el daño global. En el caso del análisis del daño focal, se cuentan los campos con valores mayores o iguales a 4 en la escala de PC y se les asigna un valor porcentual para cada individuo, luego los resultados se muestran como media y desviación estándar dentro de cada grupo.

Utilizando el software FIJI (Schneider, Rasband y Eliceiri 2012; Abràmoff, Magalhães y Ram 2004) se midió la altura de las vellosidades intestinales y la profundidad de la cripta para calcular el índice Vellosidad/Cripta (IVC) y el espesor de la mucosa (EM). Se midieron al menos 20 vellosidades y criptas individuales en cada rata para determinar este parámetro. También se cuantificó el área total de la mucosa y se contó el número de vellosidades completamente funcionales (≤ 3 en la escala de Park-Chiu) con el fin de calcular la densidad efectiva de vellosidades (DEV).

El recuento de células Goblet se realizó con tinción Alcian Blue/rojo neutro (Casselbrant et al. 2018) contando 25 vellosidades seleccionadas al azar por animal.

La técnica de inmunohistoquímica se realizó utilizando un anticuerpo anti CD3 (DakoCytomation, California, EE.UU.) o anti E-Cadherina (R&D Systems, Wiesbaden, Germany) y el kit LSAB2® (DakoCytomation, California, EE.UU.) como método de detección utilizando DAB como sustrato. La recuperación del antígeno se realizó con el método de vapor (Mason et al. 1989). Se utilizó hematoxilina como colorante de contraste y bálsamo sintético como medio de montaje (detalle del protocolo en ANEXO I). Se contaron los linfocitos T CD3+ en 150 campos seleccionados al azar con un aumento de 40x por individuo.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante un análisis de varianza o Kruskal Wallis, seguido de la prueba de Bonferroni o Dunn para comparaciones múltiples, según el caso. Los resultados se expresaron como media $\pm$ error estándar de la media o mediana y rango intercuartil. En el caso de la escala de PC, dado que es una variable de naturaleza cualitativa ordinal se utiliza para su análisis estadístico la prueba de Mann Whitney o Kruskal Wallis. Las diferencias entre las medias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p = <0,05$.

Resultados.

Para un análisis más completo, los resultados obtenidos se evalúan de manera dual. La primera resaltando las diferencias de los distintos escenarios de donación en los tiempos de preservación estipulados, y la segunda, es el impacto del tiempo de preservación fría en el injerto intestinal en los diferentes escenarios de donación. (Figura 27)

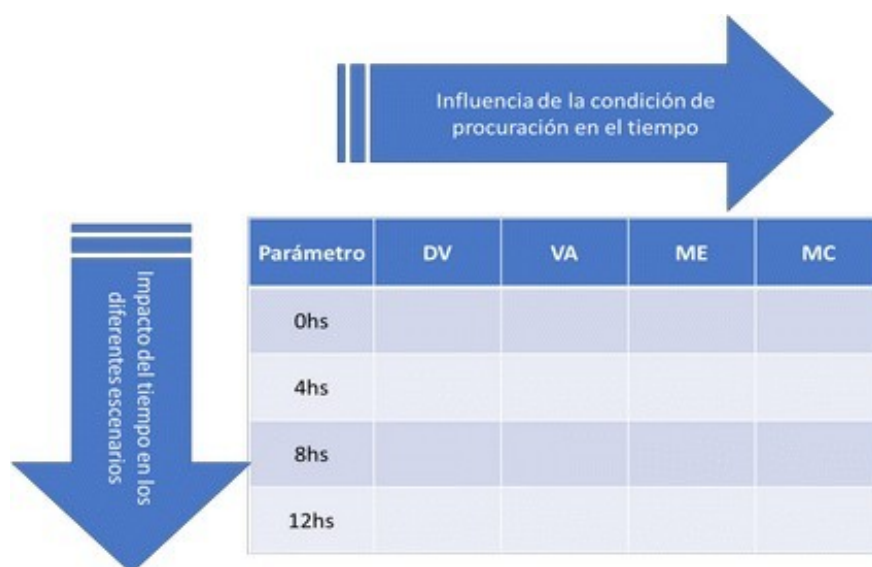


Figura 27: Esquema de interpretación de los resultados mostrados en las tablas. De izquierda a derecha se evalúan los diferentes modelos experimentales y de arriba hacia abajo se evidencia el comportamiento del injerto en los diferentes tiempos de preservación para cada modelo experimental

DAÑO HISTOLÓGICO.

El daño isquémico global (Tabla 4), que se encontró inmediato a la procuración (tiempo 0) fue ligeramente menor que el resto el grupo VA y sólo observándose diferencias significativas entre los grupos VA y ME.

Pasadas las 4hs de preservación los grupos se comportaron homogéneamente, con un PC score de entre 2 y 3. A las 8hs de preservación fría los grupo DV y MC fueron los mas dañados con PC de 4 (4-5) y 4 (3-4) respectivamente, mientras que el resto de los grupos se mantuvo 3 (RIC: VA: 3-4 y ME: 2-4). Finalmente, pasadas las 12hs, no se observaron diferencias significativas, siendo el grupo DV (5; 4-7) el que mostró un valor mayor en la escala de Park/Chiu. (Figura 28)

PC score (Mediana y RIC)	DV	VA	ME	MC
0hs	1 ; 0-1	0 ; 0-1	2 ; 1-2	1 ; 0-1
4hs	2 ; 2-4	3 ; 3-3	3 ; 2-4	3 ; 2-4
8hs	4 ; 4-5	3 ; 3-4	3 ; 2-4	4 ; 3-4
12hs	5 ; 4-7	4 ; 3-5	4 ; 3-4	4 ; 3-5

Tabla 4: Resultados del daño global en el intestino delgado expresado en la escala de Park-Chiu (promedio y desvío estándar)

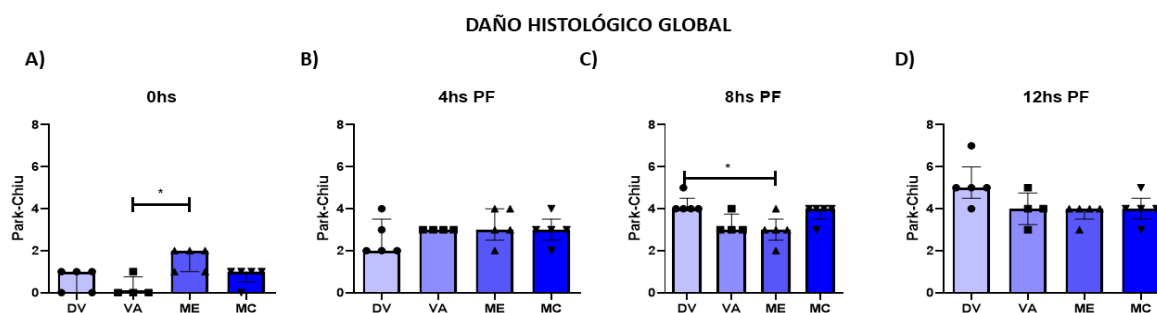


Figura 28: Resultados del comportamiento de los injertos provenientes de los diferentes escenarios de donación en los diferentes tiempos de preservación A) tiempo cero (inmediatamente despues de la cirugía); B), C) y D) 4, 8 y 12 hs de preservación fría con solución HTK respectivamente. Resultados expresados en mediana y RIC. (*: $p < 0,05$)

Con respecto a las variaciones halladas dentro de cada escenario de donación a lo largo del tiempo, se observa al grupo DV con una progresión de daño de casi dos puntos en escala de PC, siendo significativo a partir de las 8hs y 12hs. En el caso del grupo VA y ME, ambos mos-

traron una progresión de daño mas lenta en el tiempo hallándose diferencias marcadas a partir de las 12hs en ambos grupos. Finalmente en el grupo MC el daño mas marcado comienza a partir de las 8hs y se mantiene en un valor similar hasta las 12hs de preservación.(Figura 29)

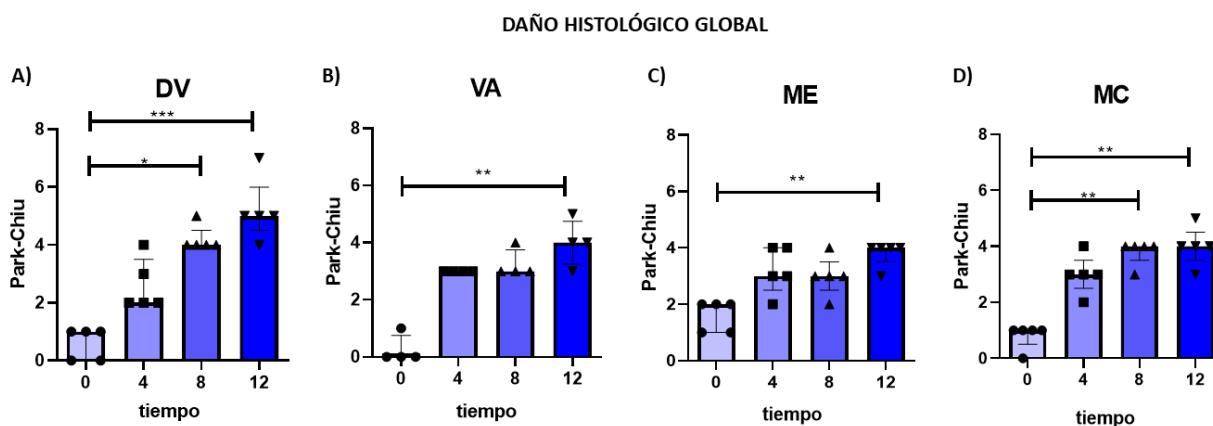


Figura 29: Análisis del daño histológico de la mucosa intestinal para cada uno de los diferentes escenarios de donacion. A) Donante Vivo; B) Donante Vivo con 2hs de ventilación asistida; C) Donante con 2hs de muerte encefálica y D) donante con muerte cardíaca luego de 5m de Asistolia. Resultados expresados en mediana y RIC. Se evidencia el marcado aumento en la lesión isquémica en el grupo DV. (*= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; *= $p < 0,001$)**

El daño focal (Tabla 5), expresado en como el porcentaje de valores iguales o mayores a 4 en la escala de Park/Chiu hallados para cada individuo, el grupo DV se mantuvo como el gold standard para trasplante inmediato, mostrando que en ninguno de los individuos de ése grupo se hallaron valores mayores a 3 en la escala de Park/Chiu DV= 0 ± 0 ; el grupo VA mostró un ligero daño, siendo el 11% ($\pm 8,9$) de $PC \geq 4$, ME fue el el mas dañado a tiempo cero con 15,4% ($\pm 14,76$) de $PC \geq 4$ y MC 8,8% ($\pm 9,2$). En tiempos preservación de corto plazo (4hs) aún sin observarse diferencias significativas, el grupo ME fue el mas dañado con un 42,2% ($\pm 21,6$) de valores $PC \geq 4$. Considerando tiempos prolongados de preservación (8hs) el grupo DV se mostró considerablemente mas dañado que el resto, con un 86,8% ($\pm 12,05$) mientras que los grupos VA y ME estuvieron entre un 25 y 30% de $PC \geq 4$ y el grupo MC en 69% ($\pm 24,2$).

Llegando a tiempos extremos (12hs) de preservación, el daño focal mantuvo al grupo DV como en el mas afectado mientras que el grupo ME llego al 73% ($\pm 33,92$), el grupo VA un 47,5%, mientras que el grupo MC se mantuvo casi invariable. (Figura 18)

Analizando los diferentes grupos, es importante mencionar el cambio abrupto que se observa en el grupo DV, que pasa de 0% a tiempo cero a un 86% a las 8hs de preservación. El

grupo MC parece ser el que le sigue en progresión de daño pasando de 8,8% a 69% en un lapso de 8hs, mientras que los grupos VA y ME mostraron valores de progresión de daño focal significativo a partir de las 12hs. (Figura 31)

% PC $\geq$ 4	DV	VA	ME	MC
0hs	0 $\pm$ 0	11 $\pm$ 8,9	15,4 $\pm$ 14,76	8,8 $\pm$ 9,2
4hs	27,5 $\pm$ 6,3	33,2 $\pm$ 37,75	42,2 $\pm$ 21,6	22,2 $\pm$ 23,69
8hs	86,8 $\pm$ 12,05	25 $\pm$ 21,3	31 $\pm$ 21,58	69 $\pm$ 24,22
12hs	95,6 $\pm$ 6,02	47,5 $\pm$ 17	73,4 $\pm$ 33,92	62,4 $\pm$ 18,8

Tabla 5: Resultados de daño focal en el intestino delgado expresado en porcentaje de valores hallados iguales o mayores a 4 en la escala de Park-Chiu (%PC $\geq$ 4).

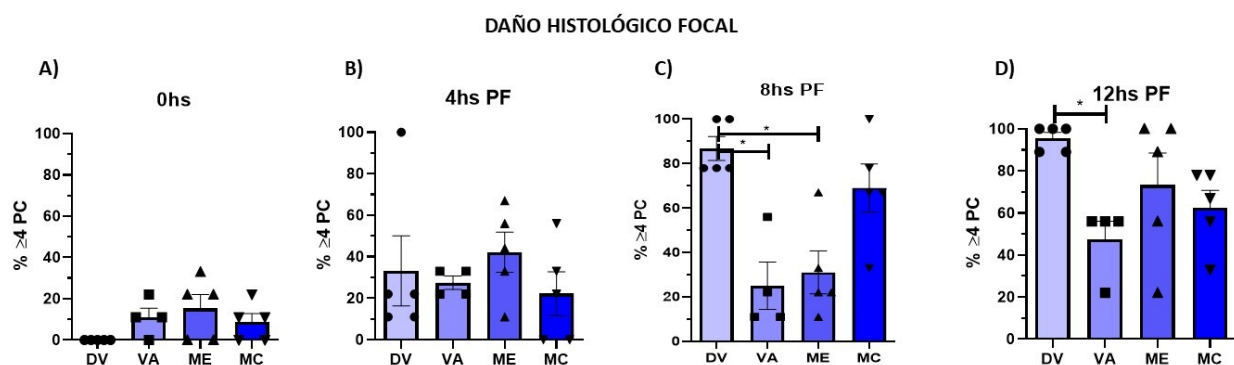


Figura 30: Daño histológico focal de la mucosa intestinal a lo largo de los diferentes tiempos de preservación. Éste resultado se obtiene cuantificando los valores $\geq$ 4 en la escala de Park-Chiu en las imágenes analizadas para cada individuo y obteniendo un promedio de las mismas. Resultados de A) tiempo cero, B), C) y D) 4, 8 y 12hs de preservación fría con HTK. (*: $p < 0,05$)

CAMBIOS MORFOMÉTRICOS DEL INTESTINO EN LOS DIFERENTES TIEMPOS DE PRESERVACIÓN

Como se explico en la sección de materiales y metodos, los parámetros morfométricos analizados fueron el Índice Vellosidad/Cripta (IVC), el espesor de la mucosa (EM) y la densidad efectiva de vellosidades (DEV). Los gráficos de los resultados de la morfometría de la mucosa intestinal se encuentran en el ANEXO II.

DAÑO HISTOLÓGICO FOCAL

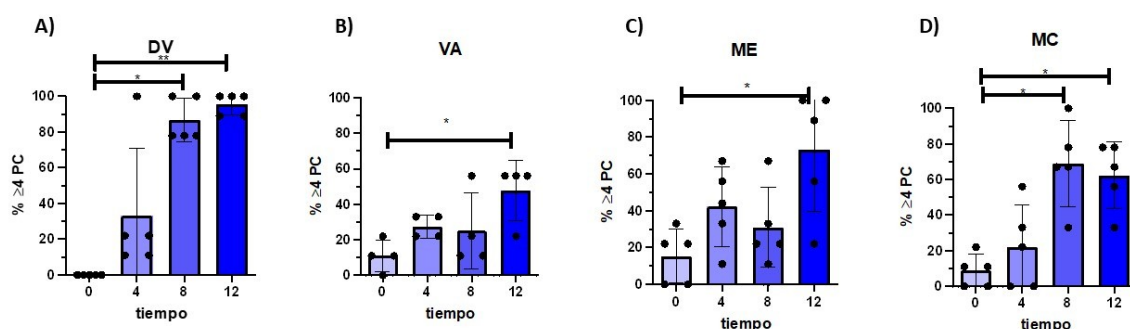


Figura 31: Análisis del daño histológico focal de la mucosa intestinal para cada uno de los diferentes escenarios de donación. A) Donante Vivo; B) Donante Vivo con 2hs de ventilación asistida; C) Donante con 2hs de muerte encefálica y D) donante con muerte cardíaca luego de 5m de Asistolia. (*= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$)

El IVC (Tabla 6) en los diferentes tiempos de preservación evidenció un descenso paulatino a medida que aumenta el tiempo de preservación siendo estadísticamente significativa las diferencias iniciales entre el grupo VA y el DV ($p < 0,01$), la cual también se observó a las 8hs. El grupo MC se mantuvo con IVC estable a lo largo de toda la preservación.

IVC	DV	VA	ME	MC
0hs	3,36±0,69	4,73±0,31	4,09±0,27	3,87±0,45
4hs	3,11±0,44	3,62±0,26	3,04±0,51	3,87±0,45
8hs	1,97±0,54	2,86±0,26	2,35±0,65	3,22±0,34
12hs	2,34±0,16	2,29±1,88	2,15±0,32	3,7±0,64

Tabla 6: Resultados de morfometría de la mucosa intestinal. Índice Vellosidad/Cripta obtenido a través de la relación entre la longitud de la vellosidad y la profundidad de la cripta.

El impacto de la preservación dentro de cada grupo de estudio evidenció diferencias notables solo en los grupos DV y ME, siendo en el primero un descenso marcado a partir de las 8hs de preservación ($p < 0,05$) pronunciándose a las 12hs ($p < 0,01$). En el caso del grupo ME,

la pérdida del IVC fue marcada a partir de las 4hs ($p = < 0,01$) y acentuándose al llegar a las 8hs de preservación ($p = < 0,01$) manteniéndose cerca de los mismo valores al llegar a las 12hs.

EM (μm)	DV	VA	ME	MC
0hs	527 $\pm$ 105,4	592,5 $\pm$ 175,9	456,9 $\pm$ 51,78	739,5 $\pm$ 51,78
4hs	427,4 $\pm$ 33,14	454,4 $\pm$ 128,1	388,3 $\pm$ 84,43	747,6 $\pm$ 44,51
8hs	302,6 $\pm$ 58,51	475,2 $\pm$ 113,7	368,1 $\pm$ 114,5	626,6 $\pm$ 76,4
12hs	321,3 $\pm$ 100,6	472,8 $\pm$ 171,2	467,9 $\pm$ 99,27	622,2 $\pm$ 21,3.

Tabla 7: Resultados de Morfometría de la mucosa intestinal. Espesor de mucosa, medido a partir de la sumatoria de la longitud de la vellosidad y la profundidad de la cripta, expresado en micras.

El grupo MC fue el de mayor espesor a lo largo de los tiempo de preservación (Tabla 7), diferenciándose marcadamente a tiempo cero del grupo ME ($p = < 0,01$) que fue el de menor espesor inicial, y del grupo DV ($p = < 0,05$). A las 4hs de preservación se observaron las mayores diferencias con respecto a los grupos DV y ME ($p = < 0,0001$) y al VA ($p = < 0,001$). Una vez alcanzadas las 8hs de preservación se mantuvieron las diferencias con el grupo DV ($p = < 0,001$) y con el ME ($p = < 0,01$), para llegar a las 12hs con valores de EM similares entre los grupos, manteniéndose el grupo DV como el de menor espesor.

El EM no se modifica sustancialmente a lo largo del tiempo dentro de los grupos VA y ME, mientras que en los grupos DV y MC, el EM disminuye notablemente pasadas las 8hs de preservación.

El conteo de las vellosidades intestinales que se encuentran con su capa de enterocitos integra (Tabla 8) nos muestra que el grupo DV comienza la preservación con una densidad de 10,96 vellosidades por mm^2 de mucosa, diferenciándose marcadamente solamente del grupo MC ($p = < 0,01$), posteriormente en los sucesivos tiempos de preservación los conteos de la DEV disminuyen entre todos los grupos sin evidenciarse diferencias significativas.

DEV(V/mm2)	DV	VA	ME	MC
0hs	10,96±2,43	8,83±2,6	8,81±2,1	5,48±1,37
4hs	6,78±1,31	6,8±3,12	8,02±1,23	4,06±1,26
8hs	2,3±1,09	5,62±3,37	4,23±2,67	1,97±1,4
12hs	1,12±1,37	3,69±2,32	1,55±0,84	1,84±1,08

Tabla 8: Resultados de Morfometría de la mucosa intestinal. La Densidad Efectiva de Vellosidades se obtiene a partir de la relación entre el promedio de la superficie de mucosa y el número de vellosidades con un índice de Park-Chiu igual o menor que 3 en todas las imágenes analizadas

En el análisis de los diferentes escenarios de donación, la disminución de la DEV se evidencia mas marcada en el grupo DV, encontrandose diferencias significativas desde las 4hs de preservación ($p < 0,01$) hasta las 8 y 12 hs ($p < 0,001$). El grupo MC le sigue en tendencia a la disminución de la DEV, iniciando la preservación con el nro mas bajo de DEV pero disminuyendo significativamente a partir de las 8hs ($p < 0,01$). El grupo ME evidencia diferencias estadísticas a partir de las 12hs de preservación, mientras que el grupo VA es el mas estable, sin observarse diferencias en la DEV durante las 12hs de preservación.

LA PÉRDIDA DE CÉLULAS GOBLET SE VE AFECTADA POR EL TIEMPO PERO NO ASÍ POR EL MODELO UTILIZADO

La pérdida de células Goblet mostró diferencias significativas entre los grupos de estudio solamente en tiempos cero (Tabla 9), siendo el grupo VA el que mejor las conservó. Si bien hubo una marcada pérdida de células en los diferentes tiempos de preservación, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes modelos.

El modelo de DV muestra una perdida de Goblets similar al modelo con ME a las 4hs ($p < 0,01$) y a las 8hs ($p < 0,001$). La pérdida de vellosidades en el grupo VA fue significativa pero menos abrupta que en los grupos mencionados anteriormente, mientras que el grupo MC no evidencio una perdida significativa en los diferentes tiempos de preservación analizados. (Figuras 32 y 33)

Goblet(C's/V)	DV	VA	ME	MC
0hs	19,14±1,59	30,55±4,8	21,24±4,14	18,56±5,17
4hs	11,42±1,72	15,10±6,65	11,4±3,35	17,24±5,42
8hs	6,96±3,31	15,25±7,3	9,6±3,86	11,98±5,59

Tabla 9: Resultados del conteo de células de Goblet expresado en cantidad de células por vellosidad. En éste caso se excluyó al tiempo mas largo de preservación (12hs) por prácticamente carecer de vellosidades sanas en las que se pudieran contabilizar un número de células que resultara fidedigno.

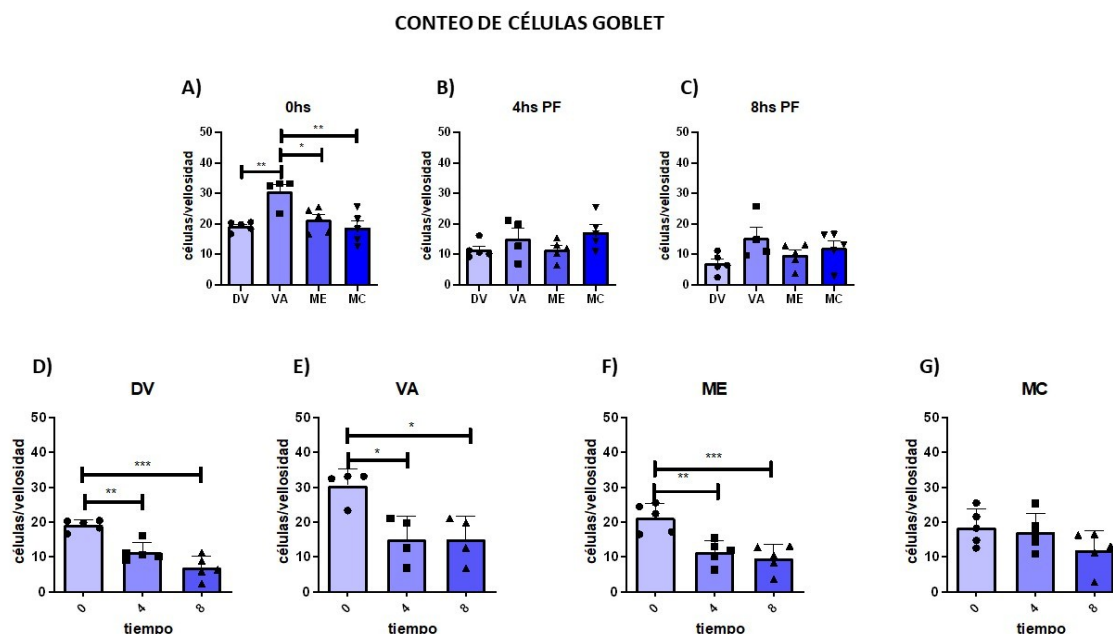


Figura 32: Resultados del conteo de células Goblet para los diferentes tiempos de preservación (A, B y C) y sus variaciones dentro de cada modelo experimental (D, E, F y G).(*= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; *= $p < 0,001$)**

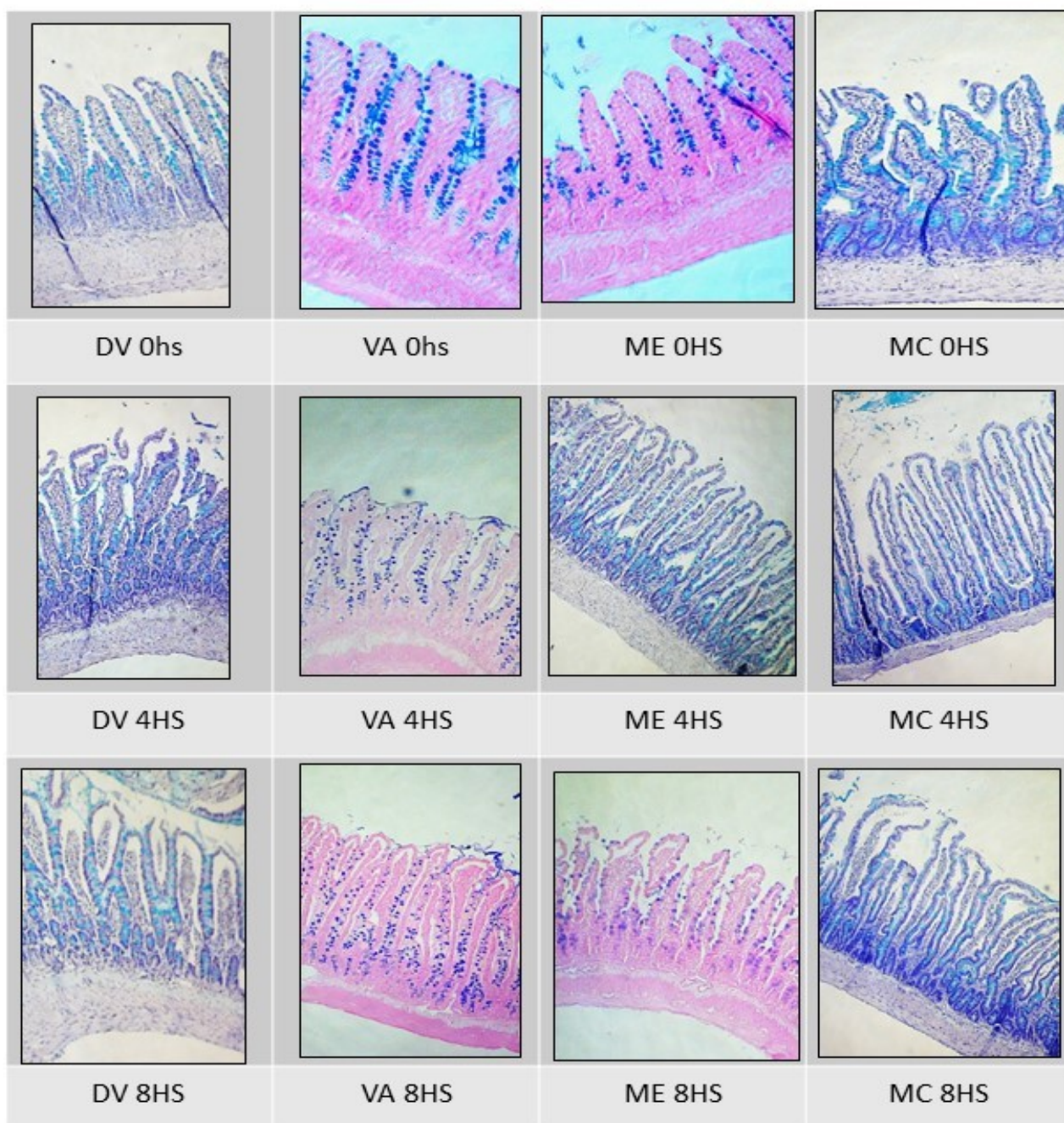


Figura 33: Microfotografías ilustrativas de la mucosa intestinal a 10x de cortes histológicos teñidos con Alcian Blue para evidenciar las células Goblet

EL INFILTRADO DE LINFOCITOS T CD3+ SE VE INCREMENTADO EN ME

El conteo de la población de linfocitos T CD3+ presentes en la submucosa se realizó sólo en los en tiempo cero, dada la falta de aporte sanguíneo durante la preservación no se espera que el número de éste tipo celular varíe.

Los resultados hallados para éste parámetro, confirman el daño predominantemente inflamatorio que induce la muerte encefálica (Roskott et al. 2014; Lyan G. Koudstaal et al. 2008). El grupo ME duplica a VA ($p < 0,05$) y casi cuadruplica los conteos encontrados en DV y DA ($p < 0,01$). (Figuras 34 y 35)

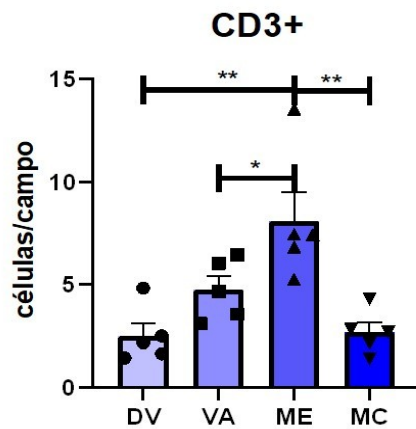


Figura 34: Resultados del conteo de CD3+ inmediatamente post lavado del intestino. (*= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$)

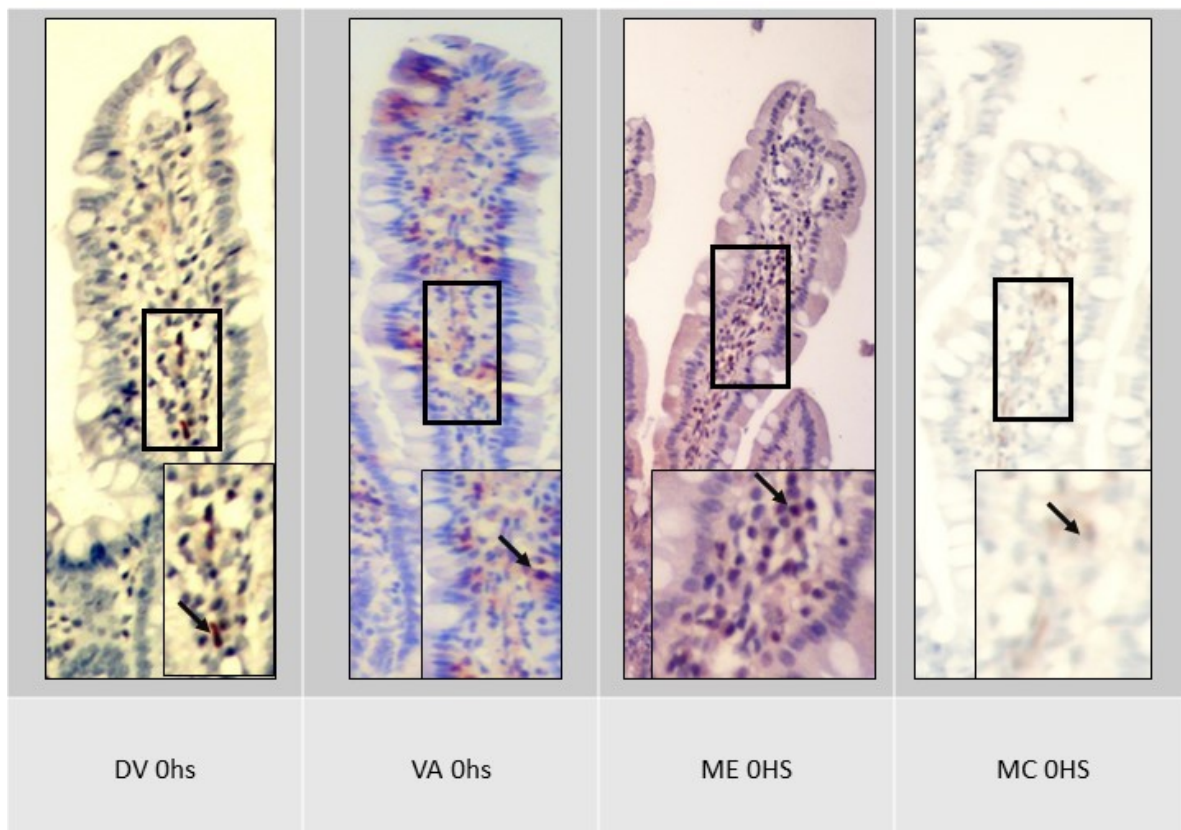


Figura 35: Microfotografías ilustrativas a 40x de cortes histológicos de Inmuhistoquímicas utilizadas para el conteo de linfocitos T CD3+ (flecha negra)

E-CADHERINA NO SE VE AFECTADA DIRECTAMENTE POR LA PRESERVACIÓN FRÍA.

E- Cadherina es un molécula de adhesión ceñuñar presente en la barrera epitelial intestinal siendo de gran importancia para el mantenimiento de su homeostasis (Schneider et al. 2010)

En un análisis cualitativo de microfotografías de intestino delgado, el grupo DV mostró una mayor intensidad de marcación para E-Cadherina, y aunque los grupos VA , ME y MC mostraron intensidades menores, en ningún caso se vio una intensidad de marcación significativamente menor a lo largo de los tiempos de preservación. (Figura 24)

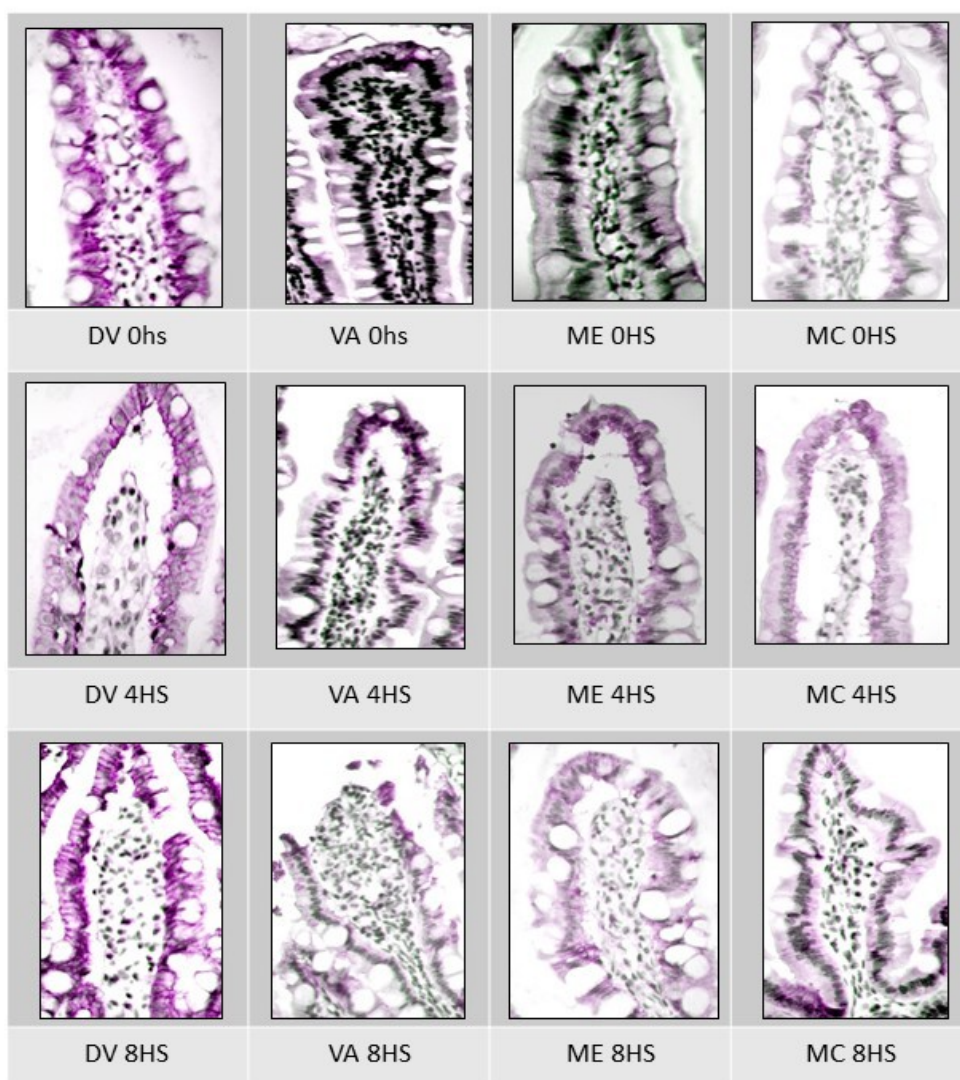


Figura 36: Microfotografías ilustrativas a 40x de la punta de la vellosidad intestinal en los diferentes grupos y tiempos de preservación con técnica inmunohistoquímica anti- E-cadherina. las imágenes fueron procesadas con el software Fiji® para resaltar las zonas marcadas en magenta y facilitar su diferenciación.

Conclusiones.

El trasplante de un órgano vascularizado requiere la interrupción del suministro de sangre del órgano que, por definición, provoca daños debido a la IRI. El proceso de preservación y la lesión por reperfusión pueden aumentar la inmunogenicidad del injerto, contribuyendo así al desarrollo de eventos específicos tempranos y tardíos relacionados con el rechazo después del trasplante de órganos (Massberg y Messmer 1998).

Si bien la IIR no aparece entre las primeras causas de pérdida de injerto en el trasplante intestinal, se sabe que es el primer evento injuriante al que se somete todo órgano trasplantado y que, de algún modo, influirá en el bienestar de los primeros días post trasplante del paciente, dado que el compromiso de la función de barrera induce un incremento en la actividad inflamatoria y consecuente traslocación bacteriana, predisponiendo al receptor a complicaciones de índole infeccioso e incluso al rechazo (Vecchio Dezillio et al. 2021; Roskott et al. 2011). La escasez de estudios clínicos se compensa en parte con una relativa abundancia de estudios en roedores que comparan el desarrollo del IRI utilizando una o varias soluciones. El progreso de la lesión isquémica en ratas es más rápido respecto al ser humano con lo cual, el diseño experimental del presente estudio debe ser cuidadosamente extrapolado al ser humano (Søfteland et al. 2019b).

Aunque no se puede afirmar que sea la causa principal, es posible pensar que la lesión por isquemia fría dará como resultados órganos más susceptibles a la IIR y como consecuencia del desbalance en la función barrera y su traslocación bacteriana, va a contribuir con las infecciones asociadas (locales y remotas) durante los primeros días post trasplante (Clouse et al. 2018).

Como se mencionó anteriormente, la procuración de intestinos con DV en la práctica clínica es casi nula, aun así, cuando se utilizan, los donantes se encuentran bajo anestesia, intubados y con ventilación asistida (Korte et al. 2016), con lo cual, la variable de la VA debería resultar ineludible.

Durante las terapias de oxigenación, el uso de máscara es útil si se pretende que la fio_2 se mantenga entre un 40 y 60% siempre que el paciente mantenga un adecuado ritmo respiratorio espontáneo. En los casos de la anestesia con máscara en roedores resulta más complicado controlar la fio_2 , dado que el monitoreo anestésico es menos intenso que en modelos como ME y MC, sin embargo, en modelos experimentales que utilizan ventilación asistida, se asegura una presión y ritmo respiratorio adecuado y resulta más práctico de manejar a partir del respirador, asegurándose una fio_2 mayor al 90% cuando se usa ventilación (Hardavella et al. 2019). Esto podría explicar desde el punto de vista operativo las diferencias encontradas.

Nuestro experimento tiene ciertas limitaciones para explicar los mecanismos subyacentes responsables del deterioro mayor que sufren los intestinos procurados con DV en tiempos prolongados de preservación. Es posible que el condicionamiento de suministro de oxígeno generado con la VA en los otros grupos impacte sobre la actividad de marcadores como HIF-1 α modulando diferencialmente su acción sobre la mucosa intestinal (Konjar, Pavšič, y Veldhoen 2021).

Los resultados de éste capítulo muestran la importancia de adecuar modelos experimentales al tipo de estudio que se quiera llevar adelante. De acuerdo a lo observado, se puede analizar que el DV sigue siendo una excelente opción para llevar adelante protocolos en los que se utilice el trasplante de intestino sin preservación prolongada (P. L. Stringa et al. 2016; Pablo Stringa, Romanin, Lausada, Papa Gobbi, et al. 2017; Padma et al. 2019). En el caso de los protocolos de investigación destinados a preservación de intestino, resulta importante plantearse el uso de protocolos mas específicos de acuerdo al tipo de donante al que se quiera extrapolar, o al menos, utilizar protocolos con VA.

ANEXO II.

RESULTADOS DE MORFOMETRÍA DE LA MUCOSA INTESTINAL.

ÍNDICE VELLOSIDAD/CRIPTA

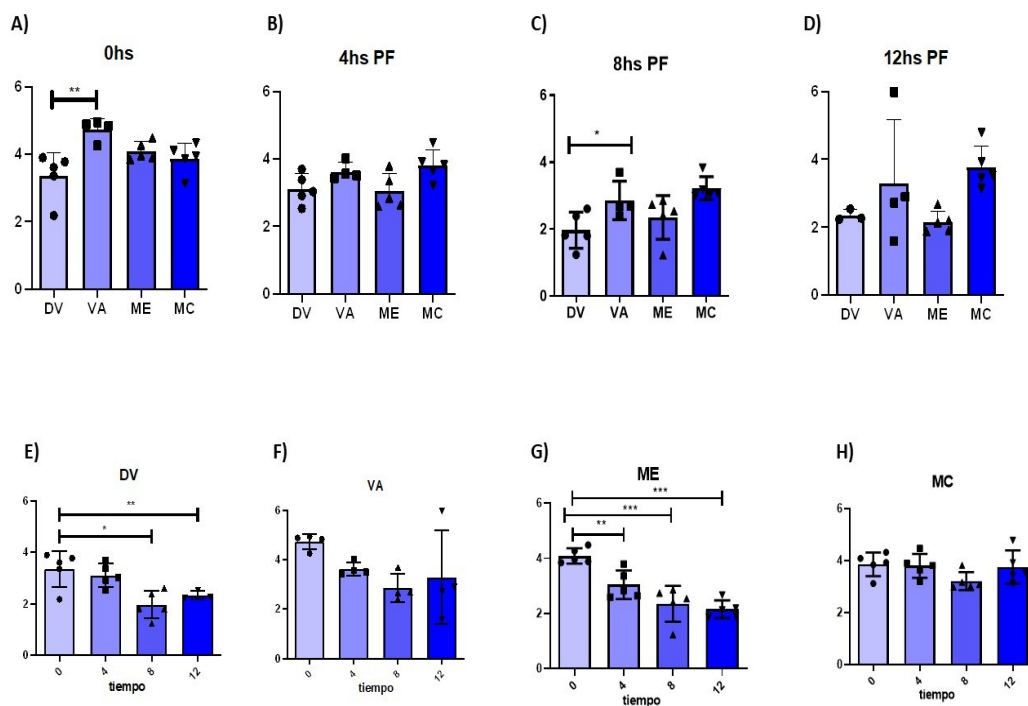


Figura 37: Índice Vellosidad/Cripta. Figuras A), B), C) y D) comportamiento de los injertos en diferentes tiempos de preservación. E), F) G) y H) variaciones intra grupos. (*= $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$)

ESPESOR DE MUCOSA

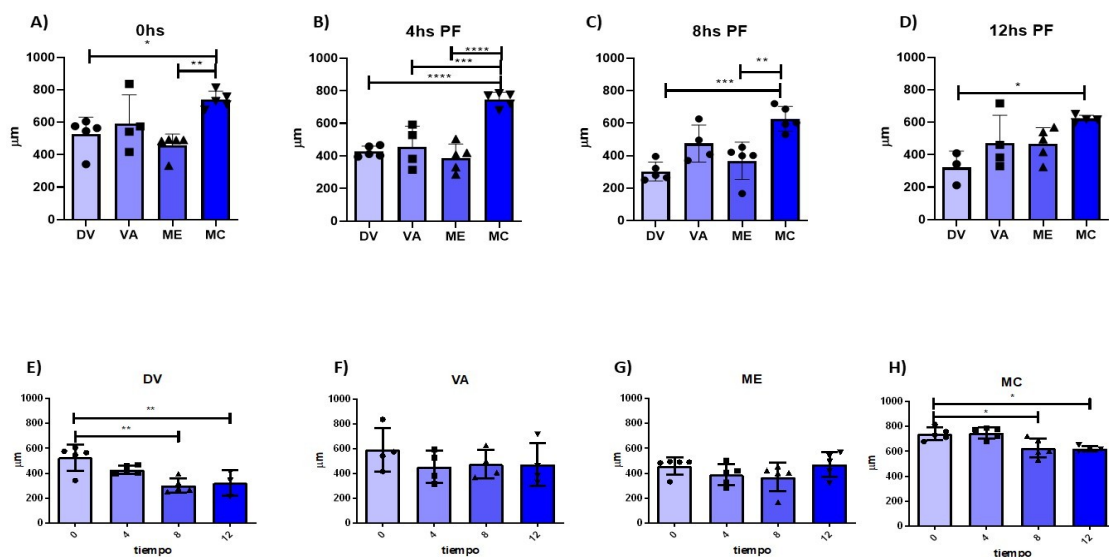


Figura 38: Espesor de mucosa. Figuras A), B), C) y D) comportamiento de los injertos en diferentes tiempos de preservación. E), F) G) y H) variaciones intra grupos. (*= $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$)

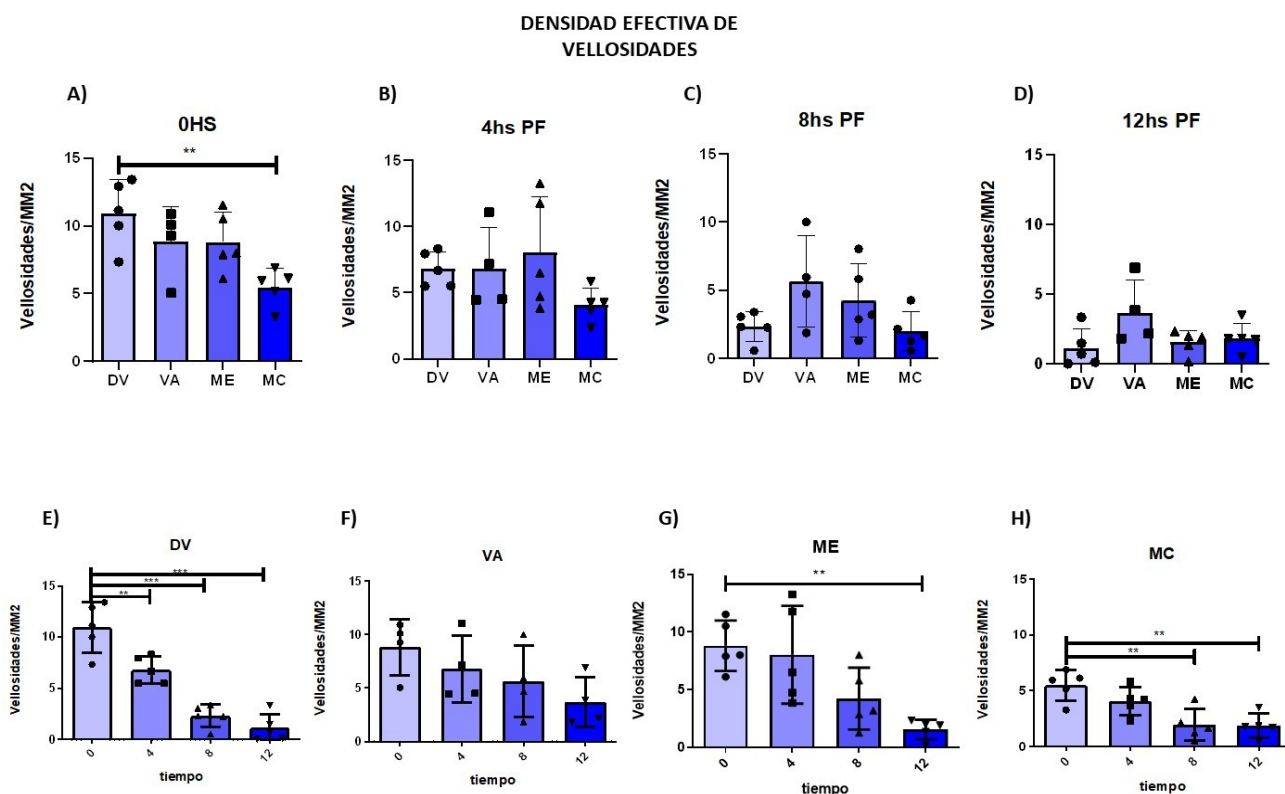


Figura 39: Densidad Efectiva de Vellosidades. Conteo de vellosidades con un valor de Park-Chiu ≤ 3 (consideradas funcionales) A), B), C) y D) comportamiento de los injertos en diferentes tiempos de preservación. E), F) G) y H) variaciones intra grupos. (*= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$)

CAPITULO III

IMPACTO DE LA MUERTE ENCEFÁLICA EN LA INJURIA POR ISQUEMIA-REPERFUSIÓN. ANÁLISIS DE TIEMPOS CORTOS DE REPERFUSIÓN

Introducción.

El trasplante de intestino es un opción terapéutica viable para diferentes patologías como es el caso de tumores mesentéricos irresecables, trombosis portomesentérica y fallas intestinales, que requieran el uso de nutrición parenteral total. A pesar de los constantes y progresivos avances en la terapéutica, los pacientes que requieren someterse a un trasplante de intestino están expuestos a una amplia variedad de complicaciones dada la dificultad del procedimiento tanto intra- como post-quirúrgico. (Clouse et al. 2018; Solar, Ortega, y Gondolesi 2021).

Todo trasplante de órganos requiere, inevitablemente, de la interrupción del flujo sanguíneo durante la extracción, y la consecuente y necesaria restitución de dicho flujo durante el implante en el receptor (Jones et al. 2015), haciendo de la IIR un evento deletéreo inevitable. De todos los órganos trasplantables, el intestino es uno de los mas sensibles a la IIR, no por la tolerancia del mismo a la isquemia sino por la magnitud de tamaño del órgano que, tal como se describe en el apartado generalidades se multiplica por la presencia de las vellosidades, sumado a la susceptibilidad dada por los daños inducidos por la ME, llevará a un deterioro en la barrera epitelial intestinal, motivando a un aumento en la traslocación bacteriana y cambios electrolíticos que llevan a complicaciones como SIRS (Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica) (Leandro Vecchio et al. 2019; Lysy et al. 2020). Por lo expuesto, la ME del donante es un factor de riesgo importante que influye en el resultado del injerto, potencia la inmunogenicidad del mismo y aumenta la alorrespuesta del huésped. Así, la ME, tal como se confirmó en los capítulos anteriores altera los resultados de preservación del injerto, dependen en parte estas lesiones de los vasopresores utilizados en el mantenimiento y nos resta evaluar que sucede a la reperfusión inmediata, pues la ME contribuye al cambio de un órgano inerte a un injerto inmunológicamente alterado. La ME inicia una cascada de eventos moleculares y celulares que incluyen la liberación de mediadores proinflamatorios que conducen a infiltrados celulares. Esos eventos pueden afectar la incidencia de cambios tanto agudos como crónicos, desarrollando y contribuyendo a reducir la supervivencia del injerto. (Roskott et al. 2014; Lyan G. Koudstaal et al. 2008). La IIR representa una cascada de eventos patofisiológicos complejos, a la ya mencionada disfunción de barrera y activación de

ROS, se le suma la activación de la respuesta inmune mediada por TLR4 y citoquinas pro inflamatorias asociadas a la activación de PAMPs (Wang, Zhang, y Wu 2021).

Los modelos experimentales en trasplante intestinal que utilizan roedores son ampliamente utilizados por la comunidad científica y en diferentes áreas de estudio como el rechazo, EICH e IRI, aún así, la amplísima mayoría de los modelos utilizados utilizan donantes vivos y no contemplan el impacto de la ME en los procesos estudiados (Oltean 2021). En un estudio multicéntrico (5 instituciones de Argentina y España) publicado en 2016 por Stringa y cols., se reportó una supervivencia de un 85% a 5 días post trasplante utilizando modelos de trasplante intestinal tanto ortotópico como heterotópico con donantes vivos isogénicos.

El manejo del donante con ME en la clínica es sumamente complejo, teniendo que abarcar diferentes complicaciones que se suscitan como es el caso de los desequilibrios hemodinámicos, la aparición de CID, hipotermia, terapia hormonal, nutrición enteral, entre otros aspectos (van Erp et al. 2018; Meyfroidt et al. 2019; Frenette, Williamson, Weiss, Rochweg, Ball, Brindamour, Serri, et al. 2020). La simulación de la ME *in vitro* es un proceso, si bien menos complejo que en la clínica, extremadamente dificultoso (Leandro; Vecchio et al. 2021; Vecchio LE Stringa PL 2019). Por lo expuesto, lograr supervivencia alejada resulta más complejo.

Teniendo en cuenta que ya se observan cambios morfológicos en la mucosa intestinal a tiempos cortos de reperusión (P. Stringa et al. 2012; Lausada et al. 2011), para el presente capítulo analizamos el impacto de la ME a los 30 minutos post reperusión.

Materiales y métodos.

ANIMALES.

En este estudio se utilizaron ratas Wistar macho adultas (8-10 semanas). Los animales fueron alojados en grupo en una sala de clima controlado con un ciclo de luz y oscuridad de 12 horas en las instalaciones de la cátedra de Trasplante de Órganos de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de La Plata. Los protocolos experimentales se realizaron siguiendo estrictamente las recomendaciones del Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata.

Grupos experimentales:

- Grupo VA (n=4): 2hs de ventilación asistida y ablación del órgano.
- Grupo ME (n=6): 2hs bajo muerte encefálica y ablación del órgano. (Figura 40)

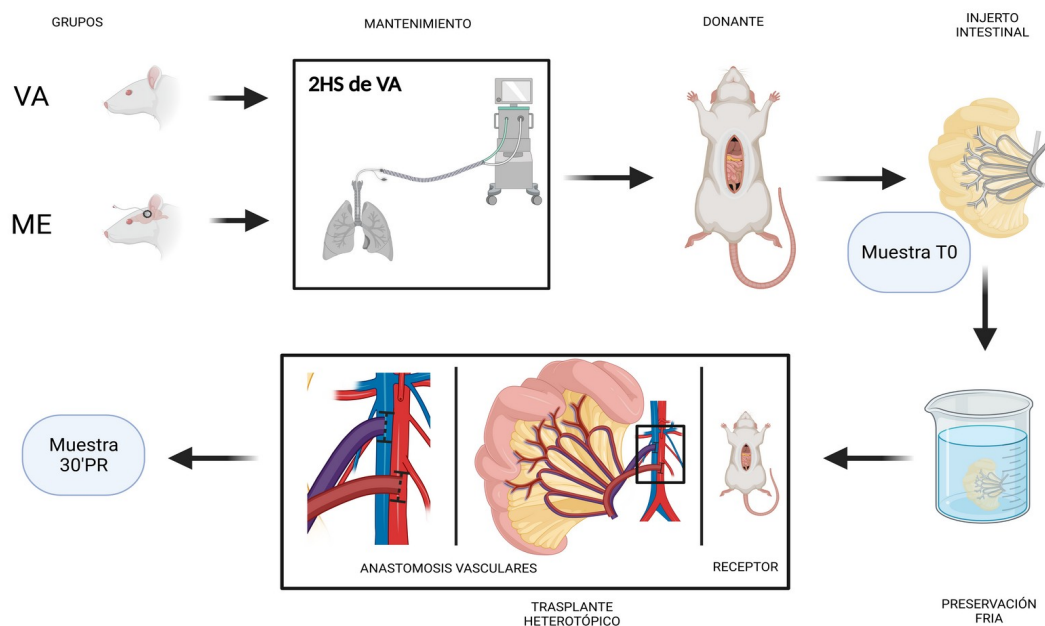


Figura 40: Esquematización del modelo experimental. Se realizaron TxI heterotópicos isogénicos. Se tomó una muestra a tiempo cero (inmediatamente después del lavado) y una muestra 30' post reperfundición. Imagen creada con BioRender.com

PROCEDIMIENTOS QUIRÚRGICOS.

El grupo de muerte cerebral (ME) se basó en un modelo previamente comunicado (Kolkert et al. 2007; Cicora et al. 2013; Vecchio Dezillio et al. 2021), Brevemente, los animales se colocaron en posición de decúbito dorsal sobre una manta térmica para permitir la inserción de una cánula en la arteria carótida derecha conectada a un monitor multiparamétrico (DYNE MCO-300-07) para el control de la presión arterial. Otra cánula se colocó en la vena yugular izquierda con el objeto de manejar la fluidoterapia y suministrar drogas vasopresoras en caso de ser necesario. Posteriormente, se realizó una traqueotomía iniciando la ventilación asistida (Ventilador para roedores Harvard Apparatus modelo 683), se posicionó en decúbito esternal al animal para colocar una cánula de balón de 4F por vía subdural a través una trepanación craneana previa y se insufló a un flujo de 1 mL/h (Bomba de infusión a jeringa PC11-UBT, APEMA SRL). Cuando se observó el re-

flejo de Cushing, se realizó un test de apnea para confirmar la ME. El procedimiento para el grupo VA fue igual que el ME con la diferencia de que se omite la trepanación del cráneo y la inducción de ME.

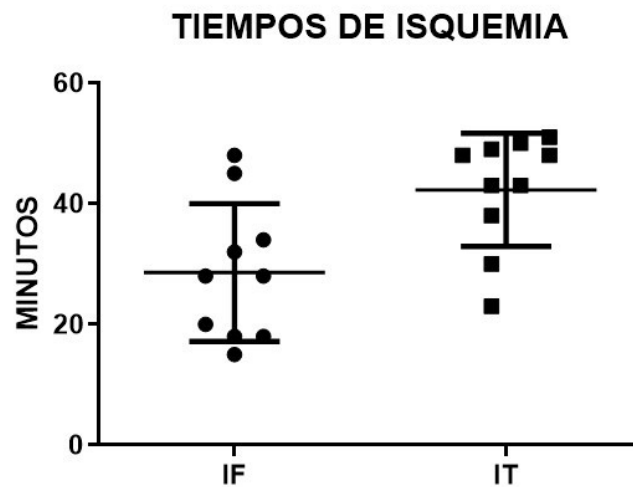


Figura 41: Tiempos de isquemia durante los TxI. IF: isquemia fría; IT: isquemia tibia.

En ambos grupos pasada 1h30m bajo la condición respectiva a cada grupo se inició la cirugía del donante con la técnica previamente descrita por nuestro grupo (Pablo Stringa et al. 2018; Pablo Stringa, Romanin, Lausada, Gobbi, et al. 2017). Una vez concluida la cirugía y cumplidas las 2hs de tratamiento se lavó el órgano con solución de Ringer Lactato a 4°C y se tomó una muestra para analizar el estado inicial del injerto destinado a trasplante. El tiempo medio de isquemia fría fue de 28,6 minutos, mientras que el de isquemia tibia fue de 42,3 minutos (Figura 41). Pasados los 30 minutos después de la reperusión del intestino se tomaron muestras. A un individuo de cada grupo se le tomaron muestras a las 24 y 48hs post reperusión.

EVALUACIÓN HISTOLÓGICA INTESTINAL

Se fijaron secciones del intestino delgado de los animales en formol al 10%, se incluyeron en parafina y se tiñeron con hematoxilina y eosina para su evaluación histológica.

El daño histológico por isquemia intestinal se puntuó según la clasificación de Park-Chiu descrita anteriormente (Park et al. 1990; Chiu Chu-Jeng Chiu, MD; Alice H. McArdle, PhD; Rea Brown, MD; Henry J. Scott, MD; y Fraser N. Gurd, MD 1970) (0, mucosa normal; 1, espacio subepitelial en la punta de la vellosidad; 2, espacio subepitelial más extendido; 3, levantamiento epitelial a lo largo del lado de la vellosidad; 4, vellosidad denudada; 5, pérdida de tejido de la vello-

sidad; 6, infarto de la capa de la cripta; 7, infarto de la mucosa; 8, infarto transmural). Para realizar un análisis más descriptivo que incluya tanto la lesión global como la focal, se analizó el daño isquémico en 9 campos aleatorios a 10 aumentos para cada muestra, a los que se asignó una puntuación dentro de la escala de PC. Para cada individuo, se tomó como representativa la mediana de los 9 campos aleatorios y los resultados se muestran como mediana y rango intercuartil dentro de cada grupo, representando el daño global. En el caso del análisis del daño focal, se cuentan los campos con valores mayores o iguales a 4 en la escala de PC y se les asigna un valor porcentual para cada individuo, luego los resultados se muestran como media y desviación estándar dentro de cada grupo.

Utilizando el software FIJI (Schneider, Rasband y Eliceiri 2012; Abràmoff, Magalhães y Ram 2004) se cuantificó el área total de la mucosa y se contó el número de vellosidades completamente funcionales (≤ 3 en la escala de Park-Chiu) con el fin de calcular la densidad efectiva de vellosidades (DEV).

El recuento de células Goblet se realizó con tinción Alcian Blue/rojo neutro (Casselbrant et al. 2018) contando 25 vellosidades seleccionadas al azar por animal.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante un análisis de varianza o Kruskal Wallis, seguido de la prueba de Bonferroni o Dunn para comparaciones múltiples, según el caso. Los resultados se expresaron como media $\pm$ error estándar de la media. Las diferencias entre las medias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p = < 0,05$.

Resultados.

PROCEDIMIENTOS QUIRÚRGICOS.

Para un total de 10 trasplantes se utilizaron 28 ratas, de las cuales 20 (10 donantes y 10 receptores) fueron trasplantes exitosos. De las 8 restantes, 3 se perdieron por complicaciones técnicas/mecánicas asociadas al respirador; otras 3 por paro cardíaco/respiratorio al momento de la canulación vascular; 1 por hipotensión durante la inducción de la ME y la restante por hipotensión durante el mantenimiento en ME.

Con respecto a las ratas receptoras, se realizaron 6 trasplantes con ME, 1 rata sobrevivió 48hs y luego se realizó la eutanasia siguiendo el diseño experimental; 1 más de 24hs sin encontrarse una causa asociada a la técnica quirúrgica en la necropsia y las 4 restantes no alcanza-

ron las 24hs de supervivencia, dos de las cuales mostraron en la necropsia un injerto color rojo oscuro y vasculatura mesentérica congestiva, y las dos restantes no arrojaron resultados concluyentes en la necropsia.

Para el grupo VA se realizaron 4 trasplantes, de los cuáles 1 rata sobrevivió más de 48hs y se realizó la eutanasia; 1 menos de 24hs y las 2 restantes se muestrearon 30 minutos post perfusión y se sacrificaron por cuestiones de diseño experimental.

DAÑO HISTOLÓGICO.

El daño histológico a tiempo cero se mantiene con la misma tendencia mostrada a lo largo del presente trabajo, es decir, a 2hs de ME hay evidencia estadísticamente significativa de un mayor daño estructural de éste grupo sobre los controles. En esta caso, el grupo ME arrojó un valor en la escala de Park de 1 (0-1) mientras que en el grupo VA fue de 0 (0-0,5) ($p < 0,05$) (Figura 42-A).

Pasados los 30 minutos post-reperfusión, el score de daño histológico fue severo para ambos, siendo en el grupo VA 4,75 (4-5) y para el grupo ME 4,5 (4-5) (Figura 42-B).

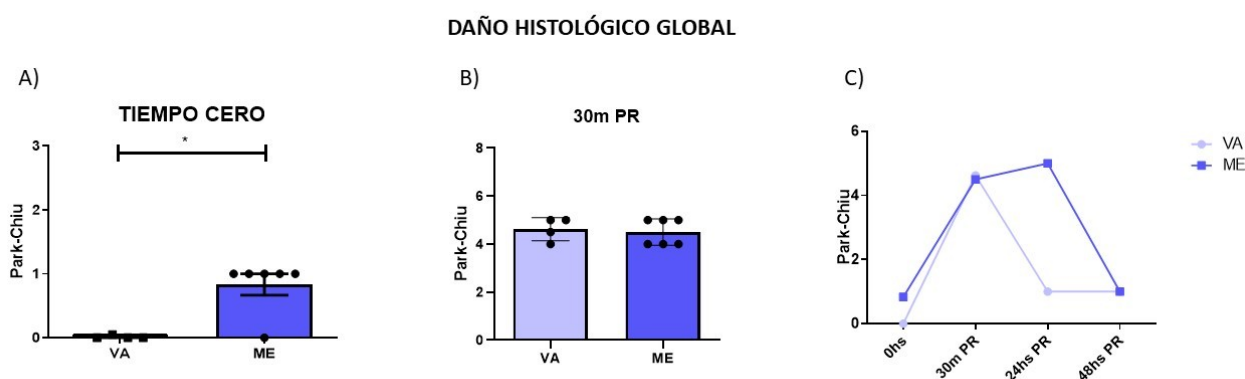


Figura 42: Resultados de daño focal en la escala de Park-Chiu. A) Tiempo cero (inmediatamente post lavado); B) 30 minutos post perfusión del intestino; C) Curva del daño histológico global, teniendo en cuenta que tanto a 24 como 48hs post perfusión $n=1$ en cada grupo). Resultados expresados como mediana y RIC (*: $< 0,05$)

En un individuo de cada grupo se tomaron muestras a las 24 y 48hs post perfusión, mostrando que a las 24hs el individuo del grupo VA recuperó su integridad intestinal y mientras que el individuo del grupo ME aun mostraba daño severo. A las 48hs ambos individuos recuperaron su integridad (Figura 42-C).

El daño focal fue consecuente con lo observado en el daño global, en tiempo cero de muestreo el grupo ME tuvo un porcentaje de valores ≥ 4 en la escala de Park de 9 ($\pm 11,57$) mientras que el grupo VA no mostró valores superiores a 3 en ninguna de las imágenes analizadas (Fi-

gura 43-A). Pasados los 30 minutos de reperusión, en el grupo ME el valor fue de 94,5 ($\pm 13,47$) y el grupo VA 91,5 ($\pm 5,68$) (Figura 43-B). A las 24hs el individuo del grupo ME aún estaba en 100 % de ≥ 4 en EPC mientras que el individuo VA no mostraba valores ≥ 4 en EPC. Llegadas las 48hs el individuo ME bajó a 22% de ≥ 4 en EPC (Figura 43-C).

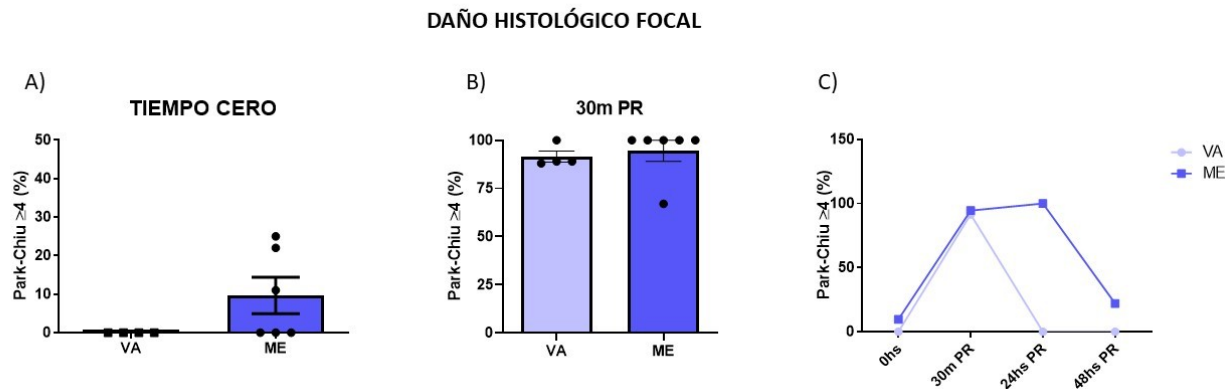


Figura 43: Resultados de daño focal expresado en % de valores ≥ 4 en la escala de Park-Chiu. A) Tiempo cero (inmediatamente post lavado); B) 30 minutos post reperusión del intestino; C) Curva del daño histológico focal, teniendo en cuenta que tanto a 24 como 48hs post reperusión $n=1$ en cada grupo) (*: < 0,05)

CAMBIOS MORFOMÉTRICOS.

A nivel morfométrico se evaluó la DEV donde inicialmente no se observaron diferencias entre los grupos (T0= ME $12,72 \pm 1,3$ y VA $12,99 \pm 2,5$ Vellosidades/mm²). En 30m post reperusión, debido al daño de las vellosidades, en el grupo ME solo se pudieron contabilizar en un solo individuo de los seis en estudio, mientras que en el grupo VA se pudo analizar en 2 de los 4 individuos del grupo siendo los resultados para ME $0,09 \pm 0,22$ V/mm² y para VA $1,43 \pm 1,69$ V/mm² ($p < 0,05$). A las 24hs no se pudieron aún contabilizar vellosidades sanas en el grupo ME mientras que en el VA el valor fue de $15,15$ V/mm², siendo a las 48 hs el grupo ME 12 y VA $11,68$ V/mm² (Figura 44).

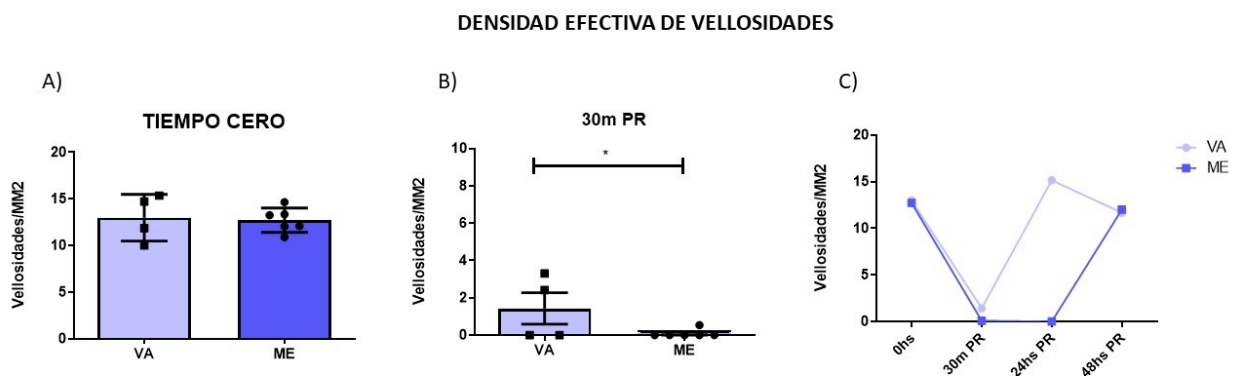


Figura 44: Resultados del conteo de la Densidad Efectiva de Vellosidades. A) tiempo cero; B) 30' post reperusión y C) curva de DEV en los diferentes tiempos de muestreo. 24 y 48hs $n=1$

CONTEO DE CÉLULAS GOBLET.

El número de células Goblet se vio afectado por la ME, siendo el conteo de $14,98 \pm 3,83$ Células/Vellosidad, mientras que en el grupo VA fue de $23,18 \pm 3,42$ ($p < 0,005$). Luego de realizado el trasplante, a los 30 minutos post reperusión, no se pudieron contabilizar células Goblets por no encontrarse vellosidades sanas en el grupo ME, mientras que en el grupo VA se pudo contabilizar en 2 de los 4 individuos en análisis, siendo el resultado de $6,9 \pm 8,07$ células/vellosidad.

En los dos individuos de cada grupo que se analizaron a las 24 y 48hs el grupo VA evidenció una recuperación de éste tipo celular a las 24hs, mientras que el grupo ME logro valores similares a VA a las 48hs. (Figura 45).

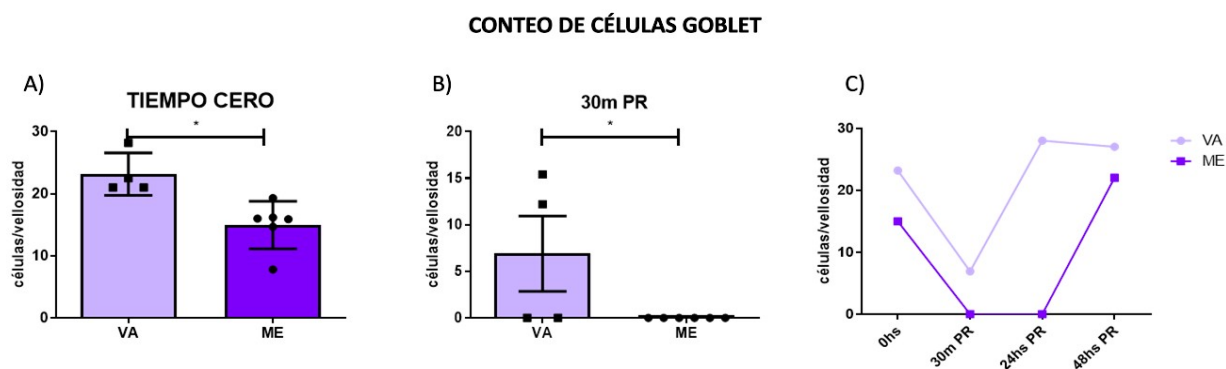


Figura 45: Resultados del conteo de células Goblet por vellosidad. A) tiempo cero; B) 30' post reperusión y C) curva de Goblets en los diferentes tiempos de muestreo. 24 y 48hs n=1

Conclusiones.

Desde hace muchos años se viene analizando el impacto de la muerte encefálica en los resultados a corto y largo plazo en los diferentes órganos y especies (Li et al. 2015; Schuur et al. 2004; Zhang et al. 2014). Sin embargo, en el trasplante de intestino se da una situación particular que hace difícil cualquier análisis que quiera comparar el impacto real que tiene la ME en los resultados a corto y largo plazo en esta práctica. Por un lado, en la clínica el uso de donante vivo es una práctica casi nula dado los riesgos que implica para el donante (Tzvetanov et al. 2018; Tzvetanov, Tulla, y Benedetti 2020) y por otro lado, desde la parte experimental los modelos más utilizados para trasplante de intestino son con donante vivo, no habiendo reportes científicos experimentales de trasplante de intestino con ME en ratas.

Como se ha desarrollado a lo largo del presente trabajo, la ME tiene un claro efecto deletéreo en los injertos destinados a trasplante (Vecchio Dezillio et al. 2021; Vecchio LE Stringa PL 2019). El uso de modelos experimentales estandarizados que incluyan a la muerte encefálica dentro de las variables de estudio supone un paso adelante en su traslación a la clínica. De todas maneras, incluirla, requiere una mayor inversión económica y formativa, lo cual explicaría, parcialmente, el hecho de que aún no haya resultados experimentales publicados.

De acuerdo a lo expuesto en la introducción, representar un escenario de donación con muerte encefálica *in vitro* supone una dificultad mucho mayor a la que se puede suscitar con el uso de donantes vivos, principalmente, debido a que el modelo de ME tiene una mayor cantidad de puntos críticos que se le suman a la ya compleja técnica microquirúrgica de trasplante intestinal en ratas. En líneas generales las complicaciones halladas en los modelos con donante vivo son de origen hemodinámico (hemorragias y estenosis vasculares), (P. L. Stringa et al. 2016) dado que la pérdida de un volumen escaso de sangre resulta grave en la homeostasis de la rata. En los modelos murinos de ME, a las complicaciones mencionadas y la dificultad del procedimiento, se le suman todas las complicaciones conocidas para el mantenimiento de los pacientes bajo ME (hipotensión, CID, arritmias y complicaciones asociadas a la ventilación mecánica entre otras) (Chudoba et al. 2017) y que en el caso de los roedores tienen un impacto mayor en el mantenimiento del individuo.

La principal limitación encontrada en el presente capítulo es la escasa supervivencia del grupo ME, una de las alternativas para aumentar la supervivencia de las receptoras sería la heparinización del donante durante el mantenimiento en ME para evitar la formación de microtrombos y posterior CID. De todas maneras, utilizar anticoagulantes en el donante, implica la potencialidad de perder mas donantes por hipotensión o hemorragias, lo cual implicaría agregar una variable más al experimento y consecuentemente la necesidad de profundizar incorporando nuevas medidas. Por tal motivo, entendimos la necesidad de concluir los experimentos de esta manera y plantear continuar el trabajo con la búsqueda de alternativas para mejorar la supervivencia y testear el rechazo.

Existen numerosas publicaciones que muestran el impacto negativo que tiene la ME en los organos destinados a trasplante (van Erp et al. 2018; De Vries et al. 2011; Floerchinger, Oberhuber, y Tullius 2012; Marasco et al. 2013; Simas et al. 2012), específicamente en el intestino (Lyan G. Koudstaal et al. 2008; Guo et al. 2020; Ferreira et al. 2018). Recientemente el grupo del Dr Oltean (Instituto de trasplante, Hospital Universitario Sahlgrenska, Gotemburgo, Suecia) presentaron en el 17mo Congreso de la Asociación internacional de Trasplante y Rehabilitación intestinal (CIRTA 2021) un trabajo en el que muestran el patrón de reparación de la mucosa intestinal

en ratas utilizando un modelo de trasplante intestinal (Padma et al. 2019), donde reportan que luego de 20 minutos post reperusión, la mucosa intestinal se ve desprovista de vellosidades (Park-Chiu 5), Pasadas las 24hs de la reperusión, la mucosa tiende a normalizarse. En nuestros resultados, podemos observar que los intestinos del grupo ME, luego de 2hs bajo esa condición tienen un compromiso leve, mientras que los del grupo VA se encuentran sin lesiones. Una vez transcurridos los 30 minutos luego de la reperusión intestinal ambos grupos se muestran con un score de Park-Chiu entre 4 y 5, consecuentemente con los resultados de Oltean y cols. En el caso del individuo del grupo ME que se pudo muestrear a las 24hs el intestino aún permanecía dañado como a los 30 minutos post-reperfusion, normalizandose a las 48hs aunque manteniendo un daño focal del 22% de 4PC, mientras tanto el individuo del grupo VA ya había reestablecido su mucosa normal a las 24hs. Mostrando una interesante tendencia hacia el retraso en la reparación intestinal de los individuos con ME.

La morfometría de los grupos resultó dificultosa dado el daño masivo que se observó a la reperusión, aún así, mientras que en los 6 individuos del grupo ME no se pudieron contabilizar vellosidades sanas ni células Goblet, en 2 de los 4 individuos del grupo VA se pudieron obtener conteos confiables. Consecuentemente con lo mencionado para el daño de la mucosa, el individuo del grupo ME que logró supervivencia evidenció un conteo, tanto de Goblets como DEV, similar al individuo VA recién a las 48hs post reperusión, mientras que el individuo control mostró normalidad a las 24hs.

Por todo lo expuesto anteriormente, y en consonancia con lo mostrado a lo largo del presente trabajo de tesis, entendemos que la introducción de modelos experimentales de trasplante de intestino que incluyan a la ME como una variable, resultarán en un acercamiento mucho más concreto y cuidadosamente extrapolable a la realidad clínica, siendo los resultados obtenidos aplicables con mayor rapidez.

Enfatizamos que resulta importante la necesidad de refinar los protocolos de ME para obtener una mayor supervivencia que permita estudiar los fenómenos de rechazo, como así también, incluir variables que se susciten en la clínica durante la procuración de órganos para trasplante, de manera que, además de ser una herramienta sólida en la investigación, pueda también serlo en modelos de entrenamiento para los diferentes profesionales involucrados en el campo de los trasplantes de órganos.

CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS

Conclusiones

CAPÍTULO 1

ESTABLECIMIENTO DE UN MODELO EXPERIMENTAL DE MUERTE ENCEFÁLICA EN RATAS PARA INVESTIGACIÓN EN TRASPLANTE DE INTESTINO

- La muerte encefálica tiene un efecto negativo en la mayoría de los parámetros analizados, destacándose su patrón de lesión focal y en el conteo de células Goblet.
- 2 hs de muerte encefálica en ratas, son suficientes para obtener una diferencia medible y analizable con respecto a los controles, a la vez que ofrece un injerto con excelentes posibilidades de ser trasplantado.

EVALUACIÓN EXPERIMENTAL DEL DAÑO HISTOPATOLÓGICO DEL INTESTINO EN LOS DIFERENTES ESCENARIOS DE DONACIÓN. DESARROLLO Y ANÁLISIS DE UN MODELO DE DONACIÓN EN ASISTOLIA MAASTRICHT III

- El modelo experimental de MC Maastricht tipo III desarrollado en este capítulo evidencia que los intestinos procurados luego de 5 minutos de MC muestran resultados similares a ME y a DV, *gold standard* en clínica e investigación respectivamente, mientras que luego de 20 minutos de MC los intestinos se deterioran significativamente en la mayoría de los parámetros analizados.
- El modelo experimental de donación en MC Maastricht III constituye una herramienta muy útil para la investigación en TxI.
- Promover y profundizar en modelos como el de ME y Maastricht III en la investigación en TxI resulta fundamental para la expansión del *pool* de órganos destinados a TX y el éxito terapéutico.

CAPÍTULO 2

ESTUDIO EXPERIMENTAL SOBRE EL IMPACTO DE LOS VASOPRESORES ADMINISTRADOS DURANTE EL MANTENIMIENTO DEL DONANTE CON MUERTE ENCEFÁLICA EN LA CALIDAD DEL INJERTO INTESTINAL

- El uso de DA ofrece una mejor calidad de injerto para TxI con respecto a NA en modelos experimentales.
- Si bien existen numerosos artículos que hablan de la superioridad de NA por sobre DA, la amplia mayoría son referidos a pacientes en UTI no así a escenarios de donación.
- A pesar de no haber un consenso global sobre el uso de vasopresores en procuración de órganos, estudios como éstos contribuyen a una mejor toma de decisiones

MUERTE ENCEFÁLICA Y PRESERVACIÓN FRÍA. COMPORTAMIENTO DEL INJERTO INTESTINAL PROVENIENTE DE DIFERENTES ESCENARIOS DE DONACIÓN

- Es presente estudio sienta bases comparativas de la preservación de intestinos en diferentes modelos experimentales.
- El DV es el modelo mas utilizado en investigación para TxI, sin embargo, en estudios que incluyan preservación prolongada debe considerarse el uso de, al menos, VA.
- Los resultados del presente capítulo muestran la importancia de adecuar los modelos experimentales al tipo de estudio que se quiera llevar adelante.

CAPÍTULO III

IMPACTO DE LA MUERTE ENCEFÁLICA EN LA INJURIA POR ISQUEMIA-REPERFUSIÓN. ANÁLISIS DE TIEMPOS CORTOS DE REPERFUSIÓN

- Es factible el uso de protocolos con ME para el TxI, aún así, la complejidad de éstos modelos requieren de una intervención mas exhaustiva en el donante para obtener una supervivencia adecuada.
- En los parámetros analizados se evidencia que los intestinos provenientes de donantes con ME tienden a retrasar el restablecimiento de la integridad de la mucosa.

La falta de órganos en el ámbito de los trasplantes de órganos sólidos en general, e intestinal en particular, continúa siendo un desafío médico-científico que debe subsanarse desde la procuración. Este hecho es de particular relevancia cuando el órgano con insuficiencia terminal no es factible de ser reemplazado por otro proveniente de un donante vivo.

En el transcurso del presente trabajo, se presentan estrategias para aumentar el *pool* de donantes y mejorar la calidad de los injertos para trasplante intestinal, aportando herramientas y resultados traslacionales al escenario clínico de los trasplantes de órganos sólidos. De esta manera, consideramos que se ofrecen respuestas a problemas médicos concretos, en pos de equiparar la oferta-demanda de intestinos procurados para este tipo de trasplante.

Perspectivas

El presente trabajo de tesis tuvo como objetivos introducir a la ME en los distintos aspectos experimentales relacionados al TxI. Inicialmente se pretendía analizar éste evento en modelos de TxI heterotópico en ratas relacionado solamente a los eventos de IIR y rechazo celular agudo, pero al recorrer el camino nos topamos con la escasa divulgación científica que relaciona a los modelos de ME y TxI, y la necesidad de estandarizar un modelo de ME que nos permita obtener un injerto que se encuentre lo suficientemente afectado por éste evento como para poder ana-

lizarlo de forma objetiva, pero que a su vez, esté lo suficientemente funcional como para tolerar el evento de reperfusión. Como bien se explica en la sección de *el trasplante de intestino experimental y su importancia traslacional*, la mencionada escasez de información que relaciona a los protocolos experimentales de ME con el TxI, dio lugar a explorar el impacto de la ME un paso antes del trasplante, entendiendo el rol fundamental que tienen la procuración y la preservación en la calidad del injerto intestinal destinado a trasplante.

Por otra parte, y aprovechando la experiencia que nuestro equipo tiene en microcirugía experimental, mas aún en TxI, nos pareció adecuado incluir a la MC en nuestros protocolos experimentales, de manera de aprovechar los trabajos en curso y contribuir científicamente con otro aspecto poco estudiado en el área de TxI. Si bien los trasplantes con donante en MC aún no están legislados en nuestro país (y nula o escasamente en toda América Latina), creemos que desarrollar un modelo fiable de donación en asistolia que esté al alcance en nuestro medio, puede ser un puntapié inicial para diferentes grupos de investigación de nuestro país interesados en profundizar sobre éste tipo de donación y contribuir, desde la ciencia, a la reducción en los tiempos de espera para trasplantes, y a mejorar la calidad de vida de los pacientes trasplantados.

Los resultados mostrados en el presente trabajo no pretenden, bajo ningún punto de vista, desterrar los modelos experimentales de TxI que utilizan donantes vivos, pero sí evidenciar que hay variables que merecen ser tenidas en cuenta cuando se diagrama un experimento, como es el caso de la VA, el uso de vasopresores o incluso anticoagulantes. En este sentido, los diferentes experimentos que se muestran en el presente trabajo cuentan con una detallada explicación de los modelos utilizados y una justificación bibliográfica completa que posibilitará repetir cualquiera de éstos protocolos en otros laboratorios.

Finalmente, el presente trabajo de tesis consiguió allanar el camino hacia las siguientes etapas: trasplantar intestinos con diferentes tiempos de preservación y diferentes escenarios de donación, mejorar la supervivencia de los TxI heterotópicos, para poder analizar el impacto de la ME y MC en los eventos de rechazo celular agudo, y su vez incluir protocolos de inmunosupresión.

BIBLIOGRAFÍA

Abbas, Syed Hussain, y Peter J. Friend. 2020. "Principles and current status of abdominal organ preservation for transplantation". *Surg Pract Sci* 3 (August): 100020.

Andres, Ane M, Esther Ramos, y Francisco Hernandez. 2020. "Current Status of Pediatric Intestinal Transplant in Europe." *Curr Opin Organ Transplant* 25 (2): 183–88.

Angelico, Roberta, M Thamara P R Perera, Tommaso Maria Manzia, Alessandro Parente, Chiara Grimaldi, y Marco Spada. 2018. "Donation after Circulatory Death in Paediatric Liver Transplantation: Current Status and Future Perspectives in the Machine Perfusion Era." *Biomed Res Int* 2018: 1756069.

Backer, Daniel De, Jacques Creteur, Eliézer Silva, y Jean Louis Vincent. 2003. "Effects of dopamine, norepinephrine, and epinephrine on the splanchnic circulation in septic shock: Which is best?" *Crit Care Med* 31 (6): 1659–67.

Bresler, A, M Ionac, y M Oltean. 2016. "A Grading Score for Colon Preservation Injury in the Rat." *Transplant Proc* 48 (2): 521–24.

Cameron, Andrew M., y Jose F. Barandiaran Cornejo. 2015. "Organ preservation review: History of organ preservation". *Curr Opin Organ Transplant* 20 (2): 146–51.

Casares, Miguel. 2003. "Diagnóstico de muerte: aspectos médicos y éticos de la muerte encefálica Diagnosis of death: medical and ethical aspects of brain death". En *Congr Conjunto Nefrol Hipertens y Traspl Chil Traspl*.

Choi, Yun Hwa, Collin Laaker, Martin Hsu, Peter Cismaru, Matyas Sandor, y Zsuzsanna Fabry. 2021. "Molecular Mechanisms of Neuroimmune Crosstalk in the Pathogenesis of Stroke." *Int J Mol Sci* 22 (17).

Chudoba, Paweł, Wojciech Krajewski, Joanna Wojciechowska, y Dorota Kamińska. 2017. "Brain death-associated pathological events and therapeutic options". *Adv Clin Exp Med* 26 (9): 1457–64.

Cicora, Federico, Pablo Stringa, Diego Guerrieri, Daniela Vásquez, Fernanda Toniolo, Javier Roberti, y Clemente Raimondi. 2013. "Evaluation of Histological Damage of Solid Organs after Donor Preconditioning with Thymoglobulin in an Experimental Rat Model." *Transpl Immunol* 28 (4): 203–5.

Clouse, Jared W., Chandrashekhar A. Kubal, Jonathan A. Fridell, y Richard S. Mangus. 2018. "Posttransplant complications in adult recipients of intestine grafts without bowel decontamination". *J Surg Res* 225: 125–30.

Cobianchi, L, S Zonta, J Vigano, T Dominioni, R Ciccocioppo, P Morbini, A Bottazzi, et al. 2009. "Experimental Small Bowel Transplantation from Non-Heart-Beating Donors: A Large-Animal Study." *Transplant Proc* 41 (1): 55–56.

Cobo, José Luis Escalante, y Francisco del Río Gallegos. 2009. "Preservación de órganos". *Med Intensiva* 33 (6): 282–92.

Drake, Mack, y Andrew Bernard. 2018. "Brain Death". *Surg Clin North Am* 97 (2017): 1255–73.

Erp, Anne C. van, Leon F.A. van Dulleman, Rutger J. Ploeg, y Henri G.D. Leuvenink. 2018. "Systematic review on the treatment of deceased organ donors". *Transplant Rev.* W.B. Saunders.

Ferreira, Sueli Gomes, Roberto Armstrong-Jr, Guilherme Konishi Kudo, Cristiano de Jesus Correia, Sabrina Thalita dos Reis, Paulina Sannomiya, Ana Cristina Breithaupt-Faloppa, y Luiz Felipe Pinho Moreira. 2018. "Differential Effects of Brain Death on Rat Microcirculation and Intestinal Inflammation: Female Versus Male". *Inflammation* 41 (4): 1488–97.

Floerchinger, Bernhard, Rupert Oberhuber, y Stefan G. Tullius. 2012. "Effects of brain death on organ quality and transplant outcome". *Transplant Rev.*

Foell, Daniel, Felix Becker, Rebecca Hadrian, Daniel Palmes, y Linus Kebschull. 2017. "A practical guide for small bowel transplantation in rats—review of techniques and models". *J Surg Res.* Academic Press Inc.

Frenette, Anne Julie, David Williamson, Matthew-john Weiss, Bram Rochweg, Frcpc Ian Ball, Dave Brindamour, y Emmanuel Charbonney. 2020. "Worldwide management of donors after neurological death : a systematic review and narrative synthesis of guidelines ` s un de ´ ce ` s neurologique dans le Prise en charge des donneurs apre ´ matique et synthe ` se narrative des lignes monde : revue syste". *Can J Anesth Can d'anesthésie* 67 (12): 1839–57.

Frenette, Anne Julie, David Williamson, Matthew John Weiss, Bram Rochweg, Ian Ball, Dave Brindamour, Karim Serri, Frederick D'Aragon, Maureen O. Meade, y Emmanuel Charbonney. 2020. "Worldwide management of donors after neurological death: a systematic review and narrative synthesis of guidelines". *Can J Anesth* 67 (12): 1839–57.

Gardiner, D, M Charlesworth, A Rubino, y S Madden. 2020. "The Rise of Organ Donation after Circulatory Death: A Narrative Review." *Anaesthesia* 75 (9): 1215–22.

Georgia, Michael A. De. 2014. "History of brain death as death: 1968 to the present". *J Crit Care* 29 (4): 673–78.

Gondolesi, Gabriel E, Mariana Doeyo, y Héctor Solar-Muñoz. 2020. "A Detailed Analysis of the Current Status of Intestinal Transplantation in Latin America." *Curr Opin Organ Transplant* 25 (2): 189–95.

Goradia, Shruti, Arwa Abu Sardaneh, Sujita W. Narayan, Jonathan Penm, y Asad E. Patanwala. 2021. "Vasopressor dose equivalence: A scoping review and suggested formula". *J Crit Care* 61: 233–40.

Gozzini, S, M T P R Perera, D A Mayer, D F Mirza, D A Kelly, P Muiesan, y K Sharif. 2010. "Liver Transplantation in Children Using Non-Heart-Beating Donors (NHBD)." *Pediatr Transplant* 14 (4): 554–57.

Grootjans, Joep, Caroline M Hodin, Jacco-Juri de Haan, Joep P M Derikx, Kasper M A Rouschop, Fons K Verheyen, Ronald M van Dam, Cornelis H C Dejong, Wim A Buurman, y Kaatje Lenaerts. 2011. "Level of Activation of the Unfolded Protein Response Correlates with Paneth Cell Apoptosis in Human Small Intestine Exposed to Ischemia/Reperfusion." *Gastroenterology* 140 (2): 529-539.e3.

Grootjans, Joep, Inca H.R. Hundscheid, Kaatje Lenaerts, Bas Boonen, Ingrid B. Renes, Fons K. Verheyen, Cornelis H. Dejong, Maarten F. Von Meyenfeldt, Geerard L. Beets, y Wim A. Buurman. 2013. "Ischaemia-induced mucus barrier loss and bacterial penetration are rapidly counteracted by increased goblet cell secretory activity in human and rat colon". *Gut* 62 (2): 250–58.

Guibert, Edgardo E., Alexander Y. Petrenko, Cecilia L. Balaban, Alexander Y. Somov, Joaquín V. Rodríguez, y Barry J. Fuller. 2011. "Organ preservation: Current concepts and new strategies for the next decade". *Transfus Med Hemotherapy* 38 (2): 125–42.

Guo, Mingxiao, Chunlei Lu, Linlin Li, Danhua Yao, y Yousheng Li. 2020. "Normothermic Extracorporeal Membrane Oxygenation Support: Improving the Function of Intestinal Grafts Obtained from Cardiac Death Donors." *Artif Organs* 44 (10): 1098–1106.

Guo, Mingxiao, Danhua Yao, Linlin Li, Chunlei Lu, Yousheng Li, y Jieshou Li. 2016. "Intestinal Conditioning After Cardiac Arrest: The Use of Normothermic Extracorporeal Membrane Oxygenation in the Non-Heart-Beating Animal Model." *Artif Organs* 40 (8): 738–45.

Habes, Quirine L M, Lisa van Ede, Jelle Gerretsen, Matthijs Kox, y Peter Pickkers. 2018. "Norepinephrine Contributes to Enterocyte Damage in Septic Shock Patients: A Prospective Cohort Study." *Shock* 49 (2): 137–43.

Hardavella, Georgia, Ioannis Karampinis, Armin Frille, Katherina Sreter, y Ilona Rousalova. 2019. "Oxygen devices and delivery systems". *Breathe* 15 (3): e108–16.

Hartog, Hermien, Rachel M Brown, Desley A H Neil, Khalid Sharif, Girish L Gupte, Darius F Mirza, Paolo Muiesan, y M Tamara P R Perera. 2016. "Characterization of Ischemic Changes in Small Bowel After Normothermic Regional Perfusion: Potential to Consider Small Bowel Grafts from DCD Donors?" *Transplantation*. United States.

Hepokoski, Mark, Joshua A Englert, Rebecca M Baron, Laura E Crotty-Alexander, Mark M Fuster, Jeremy R Beitler, Atul Malhotra, y Prabhleen Singh. 2017. "Ventilator-Induced Lung Injury Increases Expression of Endothelial Inflammatory Mediators in the Kidney." *Am J Physiol Renal Physiol* 312 (4): F654–60.

Jahovic, Nermina, Gözde Erkanli, Sevgin Işeri, Serap Arbak, y Inci Alican. 2007. "Gastric Protection by Alpha-Melanocyte-Stimulating Hormone against Ethanol in Rats: Involvement of Somatostatin." *Life Sci* 80 (11): 1040–45.

Jing, Lei, Leeann Yao, Michael Zhao, Li Ping Peng, y Mingyao Liu. 2018. "Organ preservation: From the past to the future". *Acta Pharmacol Sin* 39 (5): 845–57.

Johansson, Malin E V, y Gunnar C. Hansson. 2013. "The goblet cell: A key player in ischaemia-reperfusion injury". *Gut*.

Jonecova, Zuzana, Stefan Toth, Milan Mareta, Rachele Ciccocioppo, Jan Varga, Luis Rodrigo, y Peter Kruzliak. 2015. "Protective effect of ischemic preconditioning on the jejunal graft mucosa injury during cold preservation". *Exp Mol Pathol* 99 (2): 229–35.

Keir, Mary, Tangsheng Yi, Timothy Lu, y Nico Ghilardi. 2020. "The Role of IL-22 in Intestinal Health and Disease." *J Exp Med* 217 (3): e20192195.

Kip, Anna M, Laurens J Ceulemans, Inca H R Hundscheid, Emilio Canovai, Hermien Hartog, Rachel M Brown, Olivier Corcos, et al. 2020. "Paneth Cell Alterations During Ischemia-Reperfusion, Follow-up, and Graft Rejection After Intestinal Transplantation." *Transplantation* 104 (9): 1952–58.

Kolkert, Joe L P, Nils A 't Hart, Antony van Dijk, Petra J Ottens, Rutger J Ploeg, y Henri G D Leuvenink. 2007. "The Gradual Onset Brain Death Model: A Relevant Model to Study Organ Donation and Its Consequences on the Outcome after Transplantation." *Lab Anim* 41 (3): 363–71.

Konjar, Špela, Miha Pavšič, y Marc Veldhoen. 2021. "Regulation of oxygen homeostasis at the intestinal epithelial barrier site". *Int J Mol Sci* 22 (17).

Korte, Catherine, Jennifer L. Garber, Jillian L. Descourouez, Katelyn R. Richards, y Karen Hardinger. 2016. "Pharmacists' guide to the management of organ donors after brain death". *Am J Heal Pharm* 73 (22): 1829–39.

Koudstaal, L. G., N. A. 'T Hart, A. Van Den Berg, P. Olinga, H. Van Goor, R. J. Ploeg, y H. G.D. Leuvenink. 2005. "Brain death causes structural and inflammatory changes in donor intestine". En *Transplant Proc*, 37:448–49. Elsevier USA.

Koudstaal, Lyan G., Nils A. 'T Hart, Petra J. Ottens, Anke Van Den Berg, Rutger J. Ploeg, Harry Van Goor, y Henri G.D. Leuvenink. 2008. "Brain death induces inflammation in the donor intestine". *Transplantation* 86 (1): 148–54.

Koudstaal, Lyan G, Petra J Ottens, Donald R A Uges, Rutger J Ploeg, Harry van Goor, y Henri G D Leuvenink. 2009. "Increased Intestinal Permeability in Deceased Brain Dead Rats." *Transplantation*. United States.

Lao, Oliver B, Patrick J Healey, James D Perkins, Jorge D Reyes, y Adam B Goldin. 2010. "Outcomes in Children with Intestinal Failure Following Listing for Intestinal Transplant." *J Pediatr Surg* 45 (1): 100–107; discussion 107.

Lausada, Natalia, Pablo Stringa, Ana Cabanne, Diego Ramisch, Mariana Machuca, Flavio Galvao, Silvia Coronato, Jorge Clemente Raimondi, y Gabriel Gondolesi. 2011. "[Impact of ishemia-reperfusion injury on long survival rate in intestinal transplantation in rats]." *Acta Gastroenterol Latinoam* 41 (2): 129–36.

Lautenschläger, Ingmar, Gesine Pless-Petig, Peter Middel, Herbert De Groot, Ursula Rauen, y Tomislav Stojanovic. 2018. "Cold Storage Injury to Rat Small-bowel Transplants - Beneficial Effect of a Modified HTK Solution". *Transplantation* 102 (10): 1666–73.

Li, Shiliang, Sevil Korkmaz, Sivakkanan Loganathan, Tamás Radovits, Peter Hegedus, Matthias Karck, y Gábor Szabó. 2015. "Short- and long-term effects of brain death on post-transplant graft function in a rodent model". *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 20 (3): 379–86.

Luo, Yan, Huiming Ma, Shibo Niu, Xu Li, Lihong Nie, y Guanghua Li. 2021. "Effects of Norpinephrine on Colonic Tight Junction Protein Expression during Heat Stress." *Exp Ther Med* 21 (5): 421.

Lysy, Taras, Michele Finotti, Renee M. Maina, Raffaella Morotti, Armando Salim Munoz-Abraham, Alessandra Bertacco, Christopher Ibarra, et al. 2020. "Human Small Intestine Transplantation: Segmental Susceptibility to Ischemia Using Different Preservation Solutions and Conditions". *Transplant Proc* 52 (10): 2934–40.

Maathuis, Mark Hugo J., Henri G.D. Leuvenink, y Rutger J. Ploeg. 2007. "Perspectives in organ preservation". *Transplantation* 83 (10): 1289–98.

Malinoski, Darren J, Michael C Daly, Madhukar S Patel, Chrystal Oley-Graybill, Clarence E III Foster, y Ali Salim. 2011. "Achieving Donor Management Goals Before Deceased Donor Procurement Is Associated With More Organs Transplanted Per Donor". *J Trauma Acute Care Surg* 71 (4).

Marasco, S., A. Kras, E. Schulberg, M. Vale, P. Chan, G. A. Lee, y M. Bailey. 2013. "Donor brain death time and impact on outcomes in heart transplantation". *Transplant Proc* 45 (1): 33–37.

Martikainen, T. J., J. Kurola, V. Krj, I. Parviainen, y E. Ruokonen. 2010. "Vasopressor agents after experimental brain death: Effects of dopamine and vasopressin on vitality of the small gut". *Transplant Proc* 42 (7): 2449–56.

Mason, D Y, J Cordell, M Brown, G Pallesen, E Ralfkiaer, J Rothbard, M Crumpton, y K C Gatter. 1989. "Detection of T Cells in Paraffin Wax Embedded Tissue Using Antibodies against a Peptide Sequence from the CD3 Antigen." *J Clin Pathol* 42 (11): 1194–1200.

Massberg, S, y K Messmer. 1998. "The Nature of Ischemia/Reperfusion Injury." *Transplant Proc* 30 (8): 4217–23.

Meyfroidt, Geert, Jan Gunst, Ignacio Martin Loeches, Martin Smith, Chiara Robba, Fabio Silvio Taccone, y Giuseppe Citerio. 2019. "Management of the brain - dead donor in the ICU : general and specific therapy to improve transplantable organ quality". *Intensive Care Med* 45 (3): 343–53.

Miñambres, E, B Suberviola, B Dominguez-Gil, E Rodrigo, J C Ruiz-San Millan, J C Rodríguez-San Juan, y M A Ballesteros. 2017. "Improving the Outcomes of Organs Obtained From Controlled Donation After Circulatory Death Donors Using Abdominal Normothermic Regional Perfusion." *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg* 17 (8): 2165–72.

Nakao, Atsunori, Kazunori Tahara, Seichiro Inoue, Noriaki Tanaka, y Eiji Kobayashi. 2002. "Experimental Models of Small Intestinal Transplantation in Rats: Orthotopic versus Heterotopic Model." *Acta Med Okayama* 56 (2): 69–74.

Oltean, Mihai. 2015. "Intestinal Preservation for Transplantation: Current Status and Alternatives for the Future." *Curr Opin Organ Transplant* 20 (3): 308–13.

———. 2021. "Intestinal Transplantation: An Overview of the Recent Experimental Studies." *Curr Opin Organ Transplant* 26 (2): 240–44.

Padma, Arvind, Andreas Magnusson, Henrik Göransson, John Söfteland, Mats Hellström, y Mihai Oltean. 2019. "P1.10: Mucosal Repair After Small Bowel Transplantation In The Rat: be quick or be dead". *Transplantation* 103 (7S2).

Pahari, Hirak, Michael Rizzari, Mohamed Safwan, Hajra Khan, Syed-Mohammed Jafri, Yakir Muszkat, Kelly Collins, Atsushi Yoshida, Marwan Abouljoud, y Shunji Nagai. 2017. "Effect of Donor Vasopressor Requirements on Recipient Outcomes for Intestinal and Multi-Visceral Grafts - Is it overrated?" *Transplantation* 101 (6S2).

Peter, Shawn D St., Adyr A Moss, y David C Mulligan. 2003. "Effects of tacrolimus on ischemia-reperfusion injury". *Liver Transplant* 9 (2): 105–16.

Petrenko, Alexander, Matias Carnevale, Alexander Somov, Juliana Osorio, Joaquin Rodríguez, Edgardo Guibert, Barry Fuller, y Farid Froghi. 2019. "Organ Preservation into the 2020s: The Era of Dynamic Intervention". *Transfus Med Hemotherapy* 46 (3): 151–72.

Pomper, G., K. Trescher, D. Santer, M. Hasun, A. Baumgartner, K. Adelman, M. Inci, W. Dietl, A. O. Zuckermann, y B. K. Podesser. 2010. "Introducing a mouse model of brain death". *J Neurosci Methods* 192 (1): 70–74.

Quílez, Maria E, Josefina López-Aguilar, y Lluís Blanch. 2012. "Organ Crosstalk during Acute Lung Injury, Acute Respiratory Distress Syndrome, and Mechanical Ventilation." *Curr Opin Crit Care* 18 (1): 23–28.

Rauen, Ursula, y Herbert de Groot. 2004. "New Insights into the Cellular and Molecular Mechanisms of Cold Storage Injury." *J Investig Med Off Publ Am Fed Clin Res* 52 (5): 299–309.

Roskott, Anne Margot C., Vincent B. Nieuwenhuijs, Gerard Dijkstra, Lyan G. Koudstaal, Henri G.D. Leuvenink, y Rutger J. Ploeg. 2011. "Small bowel preservation for intestinal transplantation: A review". *Transpl Int*.

Roskott, Anne Margot C, Wouter T van Haaften, Henri G D Leuvenink, Rutger J Ploeg, Harry van Goor, Tjasso Blokzijl, Petra J Ottens, Gerard Dijkstra, y Vincent B Nieuwenhuijs. 2014. "Histopathologic and Molecular Evaluation of the Organ Procurement and Transplantation Network Selection Criteria for Intestinal Graft Donation." *J Surg Res* 189 (1): 143–51.

Sakr, Yasser, Konrad Reinhart, Jean-Louis Vincent, Charles L Sprung, Rui Moreno, V Marco Ranieri, Daniel De Backer, y Didier Payen. 2006. "Does dopamine administration in shock influence outcome? Results of the Sepsis Occurrence in Acutely Ill Patients (SOAP) Study*". *Crit Care Med* 34 (3).

Salim, Ali, Matthew Martin, Carlos Brown, Peter Rhee, Demetrios Demetriades, y Howard Belzberg. 2006. "The Effect of a Protocol of Aggressive Donor Management: Implications for the National Organ Donor Shortage". *J Trauma Acute Care Surg* 61 (2).

Schmidt, J, D W Rattner, K Lewandrowski, C C Compton, U Mandavilli, W T Knoefel, y A L Warshaw. 1992. "A Better Model of Acute Pancreatitis for Evaluating Therapy." *Ann Surg* 215 (1): 44–56.

Schneider, Marlon R., Maik Dahlhoff, David Horst, Benjamin Hirschi, Konrad Trülsch, Josef Müller-Höcker, Roger Vogelmann, et al. 2010. "A key role for E-cadherin in intestinal homeostasis and paneth cell maturation". *PLoS One* 5 (12).

Schuurs, Theo A, Frans Gerbens, Joost A B van der Hoeven, Petra J Ottens, Krista A Kooi, Henri G D Leuvenink, Robert M W Hofstra, y Rutger J Ploeg. 2004. "Distinct Transcriptional Changes in Donor Kidneys upon Brain Death Induction in Rats: Insights in the Processes of Brain Death." *Am J Transplant* 4 (12): 1972–81.

Simas, Rafael, Diogo Haruo Kogiso, Cristiano de Jesus Correia, Luiz Fernando Ferraz da Silva, Isaac Azevedo Silva, José Walber Miranda Costa Cruz, Paulina Sannomiya, y Luiz Felipe Pinho Moreira. 2012. "Influence of brain death and associated trauma on solid organ histological characteristics". *Acta Cir Bras* 27 (7): 465–70.

Smith, Martin, B Dominguez-Gil, D M Greer, A R Manara, y M J Souter. 2019. "Organ Donation after Circulatory Death: Current Status and Future Potential." *Intensive Care Med* 45 (3): 310–21.

Søfteland, John Mackay, Anna Casselbrant, Levent M Akyürek, Mats Hellström, y Mihai Oltean. 2020. "The Impact of Age and Luminal Preservation on the Development of Intestinal Preservation Injury in Rats." *Transplantation* 104 (1): e8–15.

Søfteland, John Mackay, Anna Casselbrant, Ali-reza Biglarnia, Johan Linders, Mats Hellström, Antonio Pesce, Arvind Manikantan Padma, et al. 2019a. "Intestinal Preservation Injury : A Comparison Between Rat , Porcine and Human Intestines".

Søfteland, John Mackay, Anna Casselbrant, Ali Reza Biglarnia, Johan Linders, Mats Hellström, Antonio Pesce, Arvind Manikantan Padma, et al. 2019b. "Intestinal preservation injury: A comparison between rat, porcine and human intestines". *Int J Mol Sci* 20 (13).

Solar, Héctor, Mariana Ortega, y Gabriel E Gondolesi. 2021. "Quality of Life after Intestinal Transplantation." *Curr Opin Organ Transplant* 26 (2): 200–206.

Stringa, P., N. Lausada, D. Romanin, M. Machuca, A. Cabanne, M. Rumbo, y G. Gondolesi. 2012. "Defining the nonreturn time for intestinal ischemia reperfusion injury in mice". *Transplant Proc* 44 (5): 1214–17.

Stringa, Pablo Luis, Ane M Andrés Moreno, Natalia Raquel Lausada, Cristina Pastor Oliver, Juan C Abate, Leandro Vecchio, Martin Rumbo, Marta Navarro Zorraquino, Francisco Hernández Oliveros, y Gabriel Eduardo Gondolesi. 2016. "Small bowel transplantation in rats, a multicenter experience summarizing the pitfalls to be overcome".

Stringa, Pablo, David Romanin, Natalia Lausada, Rodrigo Papa Gobbi, Carolina Zanuzzi, Pedro Martín, Juan Cruz Abate, et al. 2017. "Gut permeability and glucose absorption are affected at early stages of graft rejection in a small bowel transplant rat model". *Transplant direct* 3 (11).

Stringa, Pablo, David Romanin, Natalia Lausada, Rodrigo Papa Gobi, Leandro Vecchio, Gabriel Gondolesi, y Martin Rumbo. 2018. "Characterization of Acute Cellular Rejection in the Different Layers of Rat Transplanted Intestines". *Transplantation* 102: S49.

Stringa, Pablo, David Romanin, Natalia Lausada, Rodrigo Papa Gobbi, Carolina Zanuzzi, Pedro Martín, Juan Cruz Abate, et al. 2017. "Gut Permeability and Glucose Absorption Are Affected at Early Stages of Graft Rejection in a Small Bowel Transplant Rat Model". *Transplant Direct* 3 (11): e220.

Suzuki, S, L H Toledo-Pereyra, F J Rodriguez, y D Cejalvo. 1993. "Neutrophil Infiltration as an Important Factor in Liver Ischemia and Reperfusion Injury. Modulating Effects of FK506 and Cyclosporine." *Transplantation* 55 (6): 1265–72.

Takenaka, Maisa C., Marcia G. Guerreschi, y Alexandre S. Basso. 2017. "Neuroimmune interactions: dendritic cell modulation by the sympathetic nervous system". *Semin Immunopathol* 39 (2): 165–76.

Tas, Roderick P, Vasco Sampaio-Pinto, Tom Wennekes, Linda W Laake, y Ilja K Voets. 2021. "From the freezer to the clinic". *EMBO Rep* 22 (3): 1–7.

Treckmann, Jürgen, Cyril Moers, Jacqueline M. Smits, Anja Gallinat, Mark Hugo J. Maathuis, Margitta Van Kasterop-Kutz, Ina Jochmans, et al. 2011. "Machine perfusion versus cold storage for preservation of kidneys from expanded criteria donors after brain death". *Transpl Int* 24 (6): 548–54.

Tzvetanov, Ivo G., Kiara A. Tulla, Giuseppe D'Amico, y Enrico Benedetti. 2018. "Living Donor Intestinal Transplantation". *Gastroenterol Clin North Am* 47 (2): 369–80.

Tzvetanov, Ivo G, Kiara A Tulla, y Enrico Benedetti. 2020. "Living Donor Intestinal Transplantation". *Gastroenterol Clin NA* 47 (2): 369–80.

Vecchio Dezillio, Leandro Emmanuel, David Emmanuel Romanin, Ivana Mariel Ivanoff Marinoff, Julieta Vernengo, Juan Cruz Abate Zárate, Mariana Alejandra Machuca, Gabriel Eduardo Gondolesi, Natalia Raquel Lausada, Pablo Luis Stringa, y Martín Rumbo. 2021. "Experimental study to assess the impact of vasopressors administered during maintenance of the brain-dead donation in the quality of the intestinal graft". *J Trauma Acute Care Surg*.

Vecchio LE Stringa PL, Raimondi J C Rumbo M Lausada N. 2019. "Establecimiento de un modelo experimental de muerte encefálica en ratas para investigación en trasplante de intestino." *Rev Argentina Traspl* 11 (3): 184–88.

Vecchio, Leandro, D; Romanin, I; Ivanoff Marinoff, J; Vernengo, JC; Abate Zárate, J; Saves, M; Machuca, N; Lausada, P; Stringa, y M Rumbo. 2021. "Intestinal Graft Quality after Norepinephrine and Dopamine Management in an Experimental Brain Dead Model". *Transplantation* 105 (7S): s19.

Vecchio, Leandro, Pablo Stringa, Mariana Machuca, J Clemente Raimondi, Gabriel Gondolesi, Natalia Lausada, y Martín Rumbo. 2019. "Experimental model of Brain death donors in rats: A match control study of cold ischemic injury and morphometrical changes between brain death and live donors for intestinal transplant". *Transplantation* 103 (7S2): S151.

Villar, J, J Blanco, H Zhang, y A S Slutsky. 2011. "Ventilator-Induced Lung Injury and Sepsis: Two Sides of the Same Coin?" *Minerva Anestesiol* 77 (6): 647–53.

Vries, D. K. De, J. H N Lindeman, J. Ringers, M. E J Reinders, T. J. Rabelink, y A. F M Schaapherder. 2011. "Donor brain death predisposes human kidney grafts to a proinflammatory reaction after transplantation". *Am J Transplant* 11 (5): 1064–70.

Wang, Jun, Wentong Zhang, y Guosheng Wu. 2021. "Intestinal ischemic reperfusion injury: Recommended rats model and comprehensive review for protective strategies". *Biomed Pharmacother* 138 (December 2020): 111482.

Wiseman, Alexander C, Jennifer L Wainright, Elizabeth Sleeman, Maureen A McBride, Tim Baker, Ciara Samana, y Peter Stock. 2010. "An Analysis of the Lack of Donor Pancreas Utilization from Younger Adult Organ Donors." *Transplantation*. United States.

You, Xin Yu, Han Yu Zhang, Xu Han, Fang Wang, Peng Wei Zhuang, y Yan Jun Zhang. 2021. "Intestinal Mucosal Barrier Is Regulated by Intestinal Tract Neuro-Immune Interplay". *Front Pharmacol* 12 (May): 1–12.

Zhang, Shuijun, Shengli Cao, Tao Wang, Bing Yan, Yantao Lu, y Yongfu Zhao. 2014. "Modified brain death model for rats". *Exp Clin Transplant* 12 (5): 469–73.

Zhong, Xiang, Qi Xiao, Zhongzhong Liu, Wei Wang, Chin-Hui Lai, Wang Yang, Pengpeng Yue, Qifa Ye, y Jiansheng Xiao. 2019. "TAK242 Suppresses the TLR4 Signaling Pathway and Ameliorates DCD Liver IRI in Rats." *Mol Med Rep* 20 (3): 2101–10.