

EFFECTOS DEL PRECONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO ABDOMINAL
MULTIORGÁNICO EN MODELOS EXPERIMENTALES DE ISQUEMIA-
REPERFUSIÓN

Juan Cruz Abate Zárate

Directora de Tesis: Dra. Natalia R. Lausada

Co Director de Tesis: Dr. Pablo L. Stringa

Carrera de Doctorado en Ciencias Médicas

Año 2022



ÍNDICE

	<u>Página</u>
1. Introducción.....	5
2. Injuria por isquemia-reperfusión (IIR).....	7
3. Experiencia clínica de la IIR en humanos.....	8
3.1 Hígado.....	8
3.2 Intestino delgado.....	11
3.3 Riñón.....	14
3.4 Útero.....	15
4. Estrategias de atenuación de la IIR.....	16
4.1 Hipotermia.....	16
4.2 Soluciones de preservación.....	16
4.3 Precondicionamiento isquémico (PCI).....	16
5. Objetivos de la Tesis/ Hipótesis.....	18
6. Procedimientos quirúrgicos.....	19
6.1 Precondicionamiento isquémico abdominal multiorgánico (PCIAM).....	19
6.2 Clampeo de pedículo en hígado.....	20
6.3 Clampeo de pedículo en intestino delgado.....	20
6.4 Clampeo de pedículo en riñones.....	21
6.5 Clampeo de pedículo en cuerno uterino derecho.....	21
6.6 Trasplante Renal.....	22
6.7 Técnica de Bishop Koop (BK).....	23
6.7.1 Aplicación del modelo de BK.....	29
6.7.1.1 BK para el estudio de la IIR intestinal.....	29
6.7.1.2 BK en un modelo de colitis inducido por TNBS.....	33
7. Diseños Experimentales con PCIAM.....	35
7.1 PCIAM.....	35
7.1.1 Introducción.....	35
7.1.2 Materiales y métodos.....	35
7.1.3 Resultados.....	35
7.1.4 Conclusión.....	35
7.2 PCIAM asociado a IIR en hígado, intestino delgado, riñón, y útero.....	36
7.2.1 Introducción.....	36
7.2.2 Materiales y métodos.....	36
7.2.3 Muestreo.....	38
7.2.4 Análisis histopatológico.....	39
7.2.5 Estrés oxidativo y nitrativo.....	40
7.2.6 Resultados.....	41
7.2.7 Conclusiones.....	44

7.3	PCIAM asociado a trasplante renal heterotópico aislado.....	45
7.3.1	Introducción.....	45
7.3.2	Objetivo.....	45
7.3.3	Materiales y métodos.....	45
7.3.4	Resultados.....	48
7.3.5	Conclusiones.....	50
8.	Discusión.....	51
9.	Abreviaturas.....	53
10.	Referencias bibliográficas.....	54

Introducción

La palabra investigación proviene de la voz latina vestigio, que significa “seguir las huellas”, siendo su sinónimo buscar algo, inquirir, indagar, rastrear. En el caso de la investigación científica se realiza una búsqueda planificada y sistemática de conocimientos, dentro del campo de la ciencia. Mientras el resultado de la investigación vulgar es una opinión que solo reviste importancia para quien la realizó, el resultado de la investigación científica, es de particular interés para todos quienes hacen o utilizan los resultados en cuyo campo se efectúa la citada investigación y puede contribuir a solucionar problemas en el campo del saber, esclarecer problemas o señalar nuevos campos de investigación sistemática.⁽¹⁾

El presente trabajo debe su desarrollo a la experiencia del equipo en el estudio de problemáticas asociadas a los trasplantes de órganos valiéndose de modelos preclínicos en roedores. Particularmente, centrado al conocimiento adquirido en relación a la injuria por isquemia reperfusión (IIR) y el preconditionamiento isquémico (PCI) como método terapéutico aplicado al trasplante heterotópico de intestino delgado. El origen de esta línea de investigación se relaciona con la problemática observada en la clínica del trasplante de órganos sólidos (TOS) en humanos. Desde el momento en que se inicia el procedimiento quirúrgico de extracción del órgano en el donante, la isquemia se asocia a un conjunto de mecanismos plausibles de lesionar al órgano a implantar, y surge entonces el PCI como una posible herramienta de atenuación a la injuria en cuestión. El PCI consiste en someter al tejido a uno o más periodos de isquemia breve seguido de periodos de reperfusión previamente a un periodo de isquemia prolongado, con el fin de generar una respuesta adaptativa que enlentezca la tasa de muerte celular, y de este modo proteja al órgano en cuestión. Una forma de realizar PCI es por medio del clampeo de la vasculatura nutricia del órgano implicado.

El tipo de investigación que se intenta implementar por parte del equipo de trabajo en el Laboratorio de Trasplante es la denominada investigación básica traslacional, la cual se asocia con el concepto de la investigación que va “de la mesada del laboratorio a la cama del paciente” e intenta generar conocimientos en ciencias básicas para producir nuevas opciones de diagnósticos o tratamientos en la clínica. Requiere del trabajo multidisciplinario y participación de diversos actores. Pudiendo ser su inicio la observación en el paciente de un problema clínico a partir del cual se genera una hipótesis a la que se intenta dar respuesta desde el ámbito de la investigación básica. Así se obtiene un nuevo conocimiento que luego será traducido en un método de aplicación clínica para ser utilizado en pacientes similares a aquellos que generaron la pregunta de investigación.⁽²⁾

El PCI fue ampliamente estudiado asociado al trasplante de los distintos órganos abdominales en forma aislada en roedores, obteniéndose resultados alentadores tanto en intestino delgado^(3,4), como en hígado^(5,6) y riñón^(7,8).

Es de notar que, en la práctica clínica, el momento de la extracción implica el accionar de un grupo quirúrgico de ablacionistas para cada órgano que luego se va a implantar, a excepción de la extracción renal, la cual en ocasiones es realizada por el equipo de ablación hepática o intestinal. Sumando a esto el escaso tiempo con que se cuenta para la procuración de órganos, debido a que la celeridad en la procuración se objetiva en una mejor funcionalidad del injerto en el paciente, se requiere entonces de una coordinación óptima tanto en el seno de cada grupo quirúrgico como así también en la articulación entre cada uno de ellos. Esto conlleva que de incorporarse el preconditionamiento como procedimiento quirúrgico en la práctica clínica, sea necesario para su implementación, que cumpla ciertos criterios. Entre los que se incluyen: que

el método sea sencillo, fácilmente reproducible, que genere un beneficio al conjunto de órganos o al menos no genere daño o perjuicio en ninguno de ellos, y que no prolongue innecesariamente el proceso de procuración.

De este modo, se planteó en el presente trabajo la posibilidad de aplicación del acondicionamiento, pero en forma multiorgánica. Realizando el clamping de la arteria aorta abdominal en su origen (procedimiento que se describirá en detalle durante el transcurso del presente manuscrito), a fin de acondicionar en un tiempo todos los órganos abdominales, simplificando así el método.

Injuria por isquemia-reperfusión (IIR)

Todo trasplante de órgano sólido conlleva una etapa de isquemia que atraviesa al procedimiento quirúrgico completo desde la extracción del órgano en el donante hasta su reperfusión al momento del implante. Este proceso de isquemia y reperfusión que comienza con el clampeo de la vasculatura del órgano a implantar y finaliza con la reperfusión del mismo órgano en el receptor tiene aparejado el denominado daño o IIR. Este es un fenómeno de acentuación del daño celular en un órgano isquémico después del restablecimiento del flujo de oxígeno.⁽⁹⁾ La fase de reperfusión se caracteriza por el aumento en la producción de radicales libres de oxígeno y nitrógeno por activación del sistema xantino-oxidasa, contribuyendo y magnificando el daño iniciado por la isquemia. Por tal motivo, pese a que el suministro de sangre es primordial para la supervivencia de un órgano, la reperfusión tiene su efecto paradójico, ya que por un lado resulta esencial restituir la funcionalidad celular y tisular de un organismo afectado por un evento isquémico, pero por otro, exacerba el daño comprometiendo la vitalidad del mismo.^(10,11)

La isquemia, o interrupción transitoria o permanente de la irrigación sanguínea de un órgano o tejido, implica la disminución o ausencia de adenosin trifosfato (ATP) modificándose el metabolismo celular de tipo aerobio a anaerobio y generándose, ante la ausencia de fosfatos de alta energía, el acúmulo de productos ácidos; especialmente el ácido láctico. La disminución de la fosforilación oxidativa y la pérdida en la función de las bombas dependientes de ATP, como es el caso de la bomba de Na^+/K^+ sumado a alteraciones en la permeabilidad de la membrana, genera cambios en el gradiente transmembrana produciendo una pérdida del balance iónico. El K^+ sale de la célula y el Na^+ ingresa junto con el H_2O produciendo edema celular. A su vez, aumenta la permeabilidad celular al Ca^{+2} acrecentándose su concentración intracelular, pudiendo activar la proteasa dependiente de calcio que convierte xantina-deshidrogenasa en xantina-oxidasa.

Los productos de degradación del ATP (hipoxantina) se metabolizan por medio de la xantina-deshidrogenasa para convertirse en urea. El medio ácido favorece que esta enzima se convierta en xantina-oxidasa. La cual con el aporte de O_2 durante la reperfusión, convierte los productos de desecho extracelulares acumulados en xantina más un anión superóxido (O^{2-} : radical libre de oxígeno) Este reacciona consigo mismo formando peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el cual forma una cascada de radicales libres de oxígeno que incrementa la potencia oxidante, lesionando la célula por oxidación de las membranas lipídicas y de las proteínas celulares.^(12,13)

A nivel de la microcirculación se producen cambios durante la isquemia y reperfusión inicial que llevan a que ciertas áreas de tejido no se perfundan, produciéndose el fenómeno de no-reflujo. Esto ocurre en parte debido al aumento del volumen celular por vacuolización del citoplasma generando protrusión celular hacia el lumen vascular, la activación del sistema del complemento que estimula la producción de citoquinas proinflamatorias, la migración y adhesión de leucocitos al endotelio, la agregación plaquetaria y el desbalance entre moléculas vasodilatadoras (NO: óxido nítrico) y vasoconstrictoras. El rol del NO es variable, en niveles fisiológicos tiene efecto protector contra la lesión inhibiéndose la apoptosis, mientras que en niveles elevados el NO induce la apoptosis además de participar en la adhesión de los neutrófilos al endotelio y en la agregación plaquetaria.⁽⁹⁾

Experiencia clínica de la IIR en humanos

Hígado

La isquemia con la subsecuente falta en el aporte de oxígeno y nutrientes es un fenómeno inherente a la realización de varios tipos de procedimientos quirúrgicos que incluyen al hígado. Existen cirugías de hígado como las hepatectomías, la remoción de tumores hepáticos, el trauma, la reconstrucción vascular, y el trasplante donde se producen situaciones clínicas en las que el período de isquemia puede ser particularmente prolongado.

La maniobra de Pringle es la más utilizada en estos casos para clampearse el pedículo hepático. Descripta inicialmente como una interrupción del flujo sanguíneo a la vena porta y la arteria hepática por medio de la compresión digital del pedículo hepático en el ligamento hepatoduodenal, presenta como beneficio principal el control de las hemorragias y del número requerido de transfusiones. A partir del uso de esta maniobra, se observó que es factible mantener la isquemia durante 60 minutos en hígados sanos, incluso durante tiempos más prolongados en el caso del uso intermitente de la misma. La obstrucción del flujo sanguíneo puede ser extendido en forma segura por 120 minutos y tiene como límite los 300 minutos en casos extremos. Permaneciendo seguros los 120 minutos para el caso de hígados grasos con un tiempo límite de 200 minutos en estos últimos. Los peores resultados se obtuvieron en los casos de hígado con esteatosis microvesicular moderada y severa.⁽¹⁴⁾

Los resultados del uso del PCI han demostrado una reducción en los niveles enzimáticos de transaminasa glutámico oxalacética (TGO) y transaminasa glutámico pirúvica (TGP)⁽⁵⁾, junto a un incremento en las variables de control respiratorio lo cual refleja la preservación de la función mitocondrial. En hígados grasos se observó una disminución del daño histológico, de los niveles de TGO y TGP, mejor preservación de la función hepática y mejor supervivencia; adjudicándoles cierto grado de protección.⁽¹⁴⁾

Hepatectomías: Existen trabajos clínicos y experimentales que han demostrado que el clampeo intermitente empleando la maniobra de Pringle es mejor tolerado que prolongados períodos de isquemia continuos.⁽¹⁵⁻¹⁷⁾ Se realizó un estudio en el que se empleó el PCI (10 minutos de isquemia seguidos de 10 minutos de reperfusión) por medio de la maniobra de Pringle comparado con el grupo control, en pacientes a quienes se les realizó una hemihepatectomía derecha o izquierda por diversas causas (lesiones benignas y/o malignas). Estos procedimientos fueron realizados por medio de la oclusión continua del flujo sanguíneo, durante 30 minutos, tiempo a partir del cual la injuria por isquemia se vuelve detectable en el hígado humano.⁽¹⁵⁾ Por medio de este estudio, se demostró por primera vez el efecto protector del PCI en el hígado humano, evidenciándose un descenso en los niveles de TGO y TGP medidos a las 24 horas luego de la cirugía. Vale destacar que estas enzimas se consideran los marcadores más sensibles de injuria por isquemia hepática.^(5,18)

Un defecto importante del clampeo intermitente es el riesgo de sangrado durante cada período de reperfusión al momento de seccionar el hígado. Se ha documentado el doble de sangrado durante la sección hepática en pacientes a quienes se les practicó clampeo intermitente en comparación con el clampeo continuo.⁽¹⁷⁾ En el caso estudiado de PCI previo a la hemihepatectomía, el sangrado fue mínimo, con muy pocos casos que requirieron transfusiones y solo en el grupo control. Por lo que el PCI no solo protege contra la isquemia, sino que también minimiza la pérdida hemática.

El hígado enfermo es particularmente susceptible a la isquemia, obteniéndose peores resultados en pacientes con hígado graso que se someten a hepatectomías mayores bajo un período prolongado de oclusión del flujo vascular. Es por esto que en el subgrupo de pacientes con esteatosis leve a moderada (>20%), se alcanzó un nivel mayor de injuria al primer día postoperatorio, determinada por los niveles de TGO y TGP, en los hígados grasos versus los hígados no grasos. El PCI en estos hígados grasos parece ser particularmente protector, con niveles de transaminasas en suero menores a 260 UI/L al primer día postoperatorio en cada paciente.⁽⁵⁾

Trasplante hepático: Relacionado al trasplante hepático existen distintos tipos de donantes, entre ellos los donantes con criterios neurológicos de muerte, donantes en asistolia y el donante vivo. El donante en asistolia es aquel cuyo fallecimiento ha sido diagnosticado por criterios circulatorios y respiratorios. Los injertos hepáticos procedentes de donantes en asistolia sufren un período de hipoperfusión e isquemia caliente antes de su extracción, lo cual limita su viabilidad para el trasplante y determina su baja utilización. El interés en dichos donantes viene determinado por su gran potencial como fuente adicional de órganos para trasplante dada la escasez de los mismos. La donación en asistolia consta de dos grupos, la donación en asistolia no controlada y la donación en asistolia controlada. Estos grupos se incluyen en la clasificación tradicional de Maastricht de los donantes en asistolia que describe cuatro categorías de las que se destacan: 1. aquellos que sufren una parada cardíaca inesperada habitualmente fuera del hospital (categoría de Maastricht II), y 2. aquellos que presentan una lesión neurológica grave e irreversible en los que la parada cardíaca se produce por la retirada del soporte ventilatorio (categoría de Maastricht III). Debido a la experiencia de los grupos de trasplante que utilizan injertos provenientes de donantes en asistolia y a una mejora en los criterios de selección, las tasas de fallo primario del injerto se han reducido de forma importante. Sin embargo, la aparición de estenosis biliares no anastomóticas, o colangiopatía isquémica, representa una importante limitación de esta modalidad de trasplante. La lesión isquémica del epitelio biliar determina la presentación subaguda de una clínica caracterizada por episodios repetidos de colestasis, colangitis y abscesos hepáticos, que requieren hospitalizaciones repetidas, procedimientos intervencionistas y, con frecuencia, acaban en la necesidad de un retrasplante. Esta lesión provoca que, si bien la supervivencia de los pacientes trasplantados es similar, la supervivencia del injerto es inferior a la obtenida si se trasplantan injertos procedentes de donantes convencionales. Para evitar esta lesión, es necesario cumplir con unos tiempos estrictos de isquemia en el donante.

El principal problema con estos donantes es la rápida degradación de los órganos tras la parada cardiorrespiratoria, lo que implica el empleo de métodos de preservación para minimizar la isquemia caliente. Una vez certificado el fallecimiento del donante y hasta la obtención del consentimiento familiar y judicial, se realizan una serie de técnicas para el mantenimiento del donante. Inicialmente, los pacientes precisan del mantenimiento de la ventilación mecánica y masaje cardíaco externo, manual o mecánico, intentando mantener una presión arterial por encima de 70 mm Hg, un pH > 7 y una PO₂ > 100 mm Hg, se emplearía este método cuando el tiempo estimado desde el diagnóstico de muerte y la cirugía es menor a 30 minutos.

En un intento de recuperar el daño provocado por la isquemia caliente que sufren los donantes en asistolia, se puede utilizar la perfusión regional abdominal en normotermia para restaurar el flujo de sangre oxigenada a los riñones, hígado y páncreas, después de que se ha declarado la muerte en dichos donantes con base en criterios cardiocirculatorios. Para realizar dicha técnica

se ha de aislar el territorio vascular de la región abdominal mediante la oclusión de la aorta supra-diafragmática y utilizar un bypass cardiopulmonar (oxigenación por membrana extracorpórea) que permita oxigenar la sangre combinada con distintos sustratos y soluciones en un reservorio y retomarla mediante el uso de una bomba de perfusión. El período de recirculación normo-térmica en la región abdominal, tras un período de isquemia caliente, permite restaurar los sustratos de energía intracelular, reducir los productos de degradación de nucleótidos y mejorar las concentraciones de antioxidantes endógenos en los hígados procedentes de donantes en asistolia.

Durante el procedimiento quirúrgico llevado a cabo en el receptor, en la fase anhepática, se debe estar pendiente de los cambios hemodinámicos tras el pinzamiento vascular a nivel de las venas suprahepáticas, la acidosis metabólica, el descenso del Ca^{+2} , y la oligoanuria. Al reperfundir el órgano se puede producir el síndrome post-reperusión con caída de las presiones arteriales y de las resistencias vasculares sistémicas y pulmonares superiores a un 30% durante más de cinco minutos, con el consiguiente aumento de la presión venosa central, patrones moleculares asociados a patógenos, presión de enclavamiento pulmonar (PCP) e índice cardíaco, activación de coagulación con aumento del índice internacional normalizado, disminución del número de plaquetas y agravamiento de la fibrinólisis, trastornos del ritmo cardíaco por aumento brusco del K^+ plasmático, disminución de la temperatura corporal (de 1-2°C), acidosis metabólica, y un posible riesgo de embolismo aéreo y/o trombótico debido al desclampeo, todo ello provocado por la consiguiente llegada de restos de las soluciones de preservación y metabolitos hepáticos acumulados durante las fases de isquemia fría y caliente. Como consecuencia de todo ello, en la fase neo-hepática aumenta el riesgo hemorrágico, fundamentalmente por la combinación del incremento de presiones venosas y el empeoramiento de la coagulación. A medida que el paciente recupera la estabilidad hemodinámica, los trastornos metabólicos desencadenados por la reperusión del injerto se normalizan sin necesidad de corrección farmacológica (no se recomienda corregir a no ser que la inestabilidad persista). Las presiones endocavitarias permanecen no obstante elevadas, al igual que el gasto cardíaco.

No existe en la literatura una definición estandarizada que permita el diagnóstico temprano de la disfunción precoz del injerto hepático, aunque algunos autores proponen diferentes parámetros con el fin de identificar dicha disfunción. Se han propuesto cuatro grados de la función inicial del injerto durante los primeros cinco días postrasplante: 1° buena función, TGO máxima 1.000 UI/L y el tiempo de protrombina espontánea > 50%; 2° función justa, TGO 1.000 a 2.500 UI/L, y necesidad de apoyo de factor de la coagulación < 2 días; 3° disfunción severa precoz, TGO > 2.500 UI/L, y necesidad de apoyo de factor de la coagulación > 2 días; y 4° falla primaria del injerto, requiere retrasplante en un plazo de siete días. Esta última se trata de una de las complicaciones más graves del trasplante hepático y se puede considerar como la forma más severa de la disfunción primaria del injerto. Se desconoce la etiopatogenia del fallo primario del injerto, pero se asume una IIR en su forma más extrema. La IIR que provoca el fallo primario del injerto se produce por una suma de varios factores de riesgo entre los que destacan: donante añoso (pérdida de capacidad de regeneración), macroesteatosis mayor del 30% (probable exacerbación del daño de reperusión por la interferencia del metabolismo lipídico), la isquemia fría prolongada (se asume un 6% de aumento de disfunción primaria del injerto por cada hora de isquemia fría), y donante de muerte circulatoria.⁽¹⁹⁾

La insuficiencia renal en pacientes trasplantados hepáticos es una complicación frecuente e importante que condiciona la recuperación postoperatoria y la supervivencia a corto y largo plazo. La insuficiencia renal aguda aparece en las primeras semanas postrasplante con una incidencia entre el 17-95%. Si bien los factores de riesgo que condicionan su aparición son múltiples, aquellos relacionados al período intraoperatorio juegan un rol importante. El clampeo de la vena porta, arteria hepática y vana cava inferior interrumpe el retorno venoso de las extremidades inferiores y del lecho esplácnico, con descenso del gasto cardíaco, presión arterial, elevación de las resistencias vasculares sistémicas y reducción de la perfusión renal, con el riesgo posterior de desarrollo de insuficiencia renal aguda. Es por esto que durante el trasplante se debe evitar la hipotensión, mantener el retorno venoso y manejar correctamente el aporte de hemoderivados.⁽²⁰⁾

El PCI en donantes con criterios neurológicos de trasplante hepático ha dado como resultado una reducción de la lesión hepática aguda indicada por un descenso en los niveles de TGO al tercer día del trasplante así como una mejoría en la tasa de mortalidad al año del posoperatorio no estadísticamente significativa y una reducción en la incidencia de la falla primaria del injerto.^(21,22) Los niveles de TGO al tercer día del procedimiento quirúrgico se correlacionan con la tasa de mortalidad y la incidencia de pérdida del injerto, el requerimiento de soporte de órganos y la incidencia de infecciones y complicaciones postoperatorias.⁽²³⁾

Intestino delgado

La IIR intestinal se la encuentra en la clínica médica en casos como la cirugía de aneurisma de aorta abdominal, el bypass cardiopulmonar, el abdomen agudo obstructivo por hernias estranguladas, la isquemia mesentérica aguda, la enterocolitis necrotizante neonatal, y el trasplante de intestino delgado, entre otros. De no ser prevenida en lo posible o tratada como tal, esta puede conllevar un aumento en la tasa de morbimortalidad del paciente. Entre los órganos intraabdominales, el intestino es probablemente el más susceptible a la IIR, ya que está compuesto de células que son muy lábiles a la isquemia.⁽²⁴⁾ Se ha demostrado que los enterocitos que se encuentran en la punta de las vellosidades son las células más sensibles a los episodios de isquemia, quizás debido a su localización distal y terminal con respecto a la arteriola central, con menor aporte de oxígeno en la región apical de las vellosidades en relación a las criptas. Esta característica anatómica se evidencia con la aparición del espacio subepitelial a los 15 minutos aproximadamente del inicio de la isquemia y siendo más pronunciado el mismo a los 30 minutos, lo cual sucede como consecuencia del desprendimiento de las células epiteliales apicales dañadas junto con la contracción simultánea de las fibras musculares provenientes de la membrana basal que se extiende hasta las puntas de las vellosidades.⁽²⁵⁾ A su vez, las características pro apoptóticas de los enterocitos aumentan a medida que se acercan a la punta de la vellosidad, donde además de sufrir apoptosis, son liberados a la luz intestinal. Hay evidencia en que el desprendimiento de células epiteliales no necesariamente resulta en la disrupción del revestimiento epitelial. De hecho, luego de la reperusión temprana la capa epitelial con algunas células sueltas puede volver a unirse. Se ha establecido en ciertos estudios que esto puede deberse a la acumulación de fibras de miosina de tipo no muscular (pMLC) en la región basal de las células epiteliales sueltas que conducen a la constricción activa de las células dañadas por la isquemia en las puntas de las vellosidades, lo que resulta en una reducción drástica del tamaño de la herida. La combinación de los mecanismos de velocidad de retracción, constricción de las células dañadas y el cierre del defecto epitelial mediado por pMLC resulta en

la restauración morfológica del revestimiento epitelial a los 120 minutos de la reperfusión. Mecanismo que a su vez podría estar involucrado en limitar el proceso inflamatorio y la traslocación bacteriana.⁽²⁶⁾

A diferencia de los períodos cortos de isquemia seguidos de reperfusión, la isquemia prolongada con reperfusión del tejido genera que el revestimiento epitelial comience a desintegrarse pasados los 45 minutos de isquemia intestinal. La lesión en las puntas de las vellosidades continúa durante la reperfusión, y la apoptosis de estos enterocitos se vuelve particularmente aparente a los 30 minutos del restablecimiento de la circulación. Con el aumento en la duración de los períodos isquémicos la muerte celular ocurre en forma progresiva desde las vellosidades hacia las criptas. No lográndose recomponer el daño ocasionado tras 120 minutos de reperfusión en tejido expuesto a más de 45 minutos de isquemia. La IIR puede generar entonces un déficit en la capacidad de absorción de nutrientes.⁽²⁷⁾

Cirugía de aorta abdominal: La disfunción gastrointestinal no suele ser clínicamente aparente en la fase del posoperatorio inmediato, sin embargo, puede contribuir a un incremento en la morbilidad de estos pacientes a largo plazo. Tanto el clampeo aórtico como el déficit de perfusión producidos por la disección aórtica pueden desencadenar isquemia mesentérica con la subsecuente IIR, traslocación bacteriana y respuesta inflamatoria sistémica. Períodos prolongados de isquemia seguidos de eventos tromboembólicos con oclusión completa de las ramas mesentéricas de la circulación esplácnica a menudo conducen a una isquemia intestinal irreversible. La hipoperfusión esplácnica prolongada con una tolerancia reducida a la isquemia puede ocurrir secundario a reparaciones endovasculares y revascularización incompleta posterior a la reparación de disecciones. Y puede ser la causante de enlentecimiento intestinal asociado a reflujo, absorción nutricional incompleta, episodios frecuentes de estado metabólico anaeróbico con aumento del valor de lactato junto con distensión abdominal, y más raramente hemorragia intestinal. Usualmente se alcanza el diagnóstico por una combinación entre la presentación clínica y el uso de imágenes. La tomografía abdominal con contraste puede demostrar la distensión de asas intestinales, el déficit de perfusión, y la presencia de depósitos de aire a nivel portal e intramural.⁽²⁸⁾

Isquemia mesentérica aguda (IMA): Al igual que en otras causas de IIR intestinal la integridad de la mucosa del intestino comienza a alterarse y a ser permeable a la flora residente a partir de la interrupción del flujo sanguíneo. La interrupción prolongada del mismo puede generar la acumulación del ácido láctico, la pérdida de la homeostasis celular, necrosis, y desencadenar una respuesta inflamatoria. La IIR secundaria a la interacción entre la sangre rica en oxígeno y la presencia de radicales libres producidos localmente por la inflamación, puede potenciar la muerte celular. El infarto intestinal generalizado puede causar una respuesta inflamatoria que desencadene la acción de una tormenta de citoquinas y se manifieste como un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica.⁽²⁹⁾ De no ser tratada a tiempo, esta condición puede producir hipotensión severa, causar injuria remota afectando órganos como el hígado o los pulmones o producir falla multiorgánica, pudiendo llevar incluso a la muerte. Las complicaciones posteriores al tratamiento de la IMA, como la falla respiratoria, la falla multiorgánica, la sepsis, y el síndrome de intestino corto afectan entre el 35-79% de los pacientes y se asocian a un incremento en la mortalidad.^(30,31)

Trasplante intestinal: En el trasplante de intestino en humanos se ha demostrado que la IIR es prácticamente inevitable durante el proceso de procuración y reperfusión. Las especies reactivas de oxígeno producidas por la xantino-oxidasa pueden dañar la barrera mucosa intestinal en forma directa o indirecta por medio de la activación de polimorfonucleares y de la

producción de citoquinas por parte de las células endoteliales. Este daño en la barrera mucosa da lugar a la traslocación bacteriana, de endotoxinas, de fluidos, y cambios en la concentración de electrolitos transmembrana. De esta manera moléculas proinflamatorias alcanzan los ganglios linfáticos mesentéricos y a partir de allí la circulación general, pudiendo producir daño a otros órganos.⁽³²⁾

Además de la barrera física, el intestino presenta también una función de barrera inmunológica para prevenir la traslocación bacteriana, presentando un rol importante las células de Paneth localizadas en las criptas de Lieberkühn. Estas células son sensibles a la microbiota y capaces de responder a las amenazas bacterianas produciendo y liberando agentes proteicos antimicrobianos al lumen, y por ende cruciales en limitar la traslocación bacteriana. Las bacterias al diseminarse pueden producir sepsis, shock o falla orgánica múltiple.⁽²⁴⁾ La naturaleza secretora de estas células las hace particularmente susceptibles al estrés del retículo endoplasmático, producido, por ejemplo, por situaciones de hipoxia y estrés oxidativo que dan como resultado la acumulación de proteínas malformadas y la alteración de la homeostasis del retículo. Durante los períodos prolongados de isquemia seguidos de reperfusión se observó un evidente incremento en el estrés del retículo y las células de Paneth en humanos, que fue acompañado por apoptosis de estas células siendo liberadas al lumen de la cripta. La pérdida de las células de Paneth es considerado un fenómeno que contribuye a las complicaciones inflamatorias e incluso a la morbilidad relacionada a la IIR. Estas células han demostrado también ser cruciales en brindar factores de crecimiento esenciales para la supervivencia de las células madre, siendo estas últimas de importancia significativa en la regeneración del epitelio intestinal sometido a isquemia-reperfusión.^(24,33)

La traslocación bacteriana fue reportada en el 44% de los pacientes pediátricos que fueron sometidos a un trasplante intestinal. Es frecuente la afectación del aparato respiratorio pudiendo producirse la infiltración pulmonar por neutrófilos lo que contribuye al desarrollo del síndrome de distrés respiratorio agudo.⁽³⁴⁾

En un procedimiento de trasplante intestinal, la lesión localizada en el intestino se puede dividir en dos etapas, un tercio de la misma ocurre durante la isquemia y la mayor parte durante la reperfusión. A las primeras 4 horas de la muerte encefálica se producen los primeros cambios estructurales mencionados como son el desprendimiento de la membrana apical de las vellosidades y la infiltración del tejido por polimorfonucleares. De no emplearse medios de preservación como la hipotermia o las soluciones de preservación, este daño progresaría hasta producirse lesiones de tipo irreversibles en el intestino delgado pudiendo comprometer la viabilidad del injerto en el período pos-trasplante inmediato.⁽³⁵⁾

Por lo general, casi todos los donantes con muerte cerebral son considerados aptos para la realización de una extracción multiorgánica, sin embargo, los injertos intestinales suelen provenir de donantes muy seleccionados, ya que este es extremadamente sensible a la isquemia, así como a muchos de los sucesos que ocurren alrededor de los donantes de muerte encefálica, por lo que se reduce notablemente el número de donantes óptimos para receptores de intestino delgado. Los criterios de aceptación y exclusión son los siguientes: donantes jóvenes por lo general menores de 45 años (los mayores de 45 años suelen fallecer por enfermedad cerebrovascular, lo que implica una afectación aterosclerótica generalizada), hemodinámicamente estables, sin episodios de parada cardiorrespiratoria, sin episodios prolongados de hipotensión arterial (TAS < 80 mm Hg), y si la hubo que no fuera duradera (< 10 minutos), bien oxigenados (PaO₂ > 95 mm Hg), y sin grandes aportes de drogas vasoactivas. Por

último, asegurar un tiempo de isquemia fría lo más corto posible, preferentemente inferior a las 7 horas, y nunca superior a las 9 horas.⁽¹⁹⁾

El injerto intestinal trasplantado se monitoriza por medio de biopsias endoscópicas a través de la ileostomía que se confecciona específicamente para tal fin. De este modo, el diagnóstico histopatológico permite identificar y graduar las principales patologías. Por protocolo, suelen tomarse 2-3 fragmentos de la mucosa del íleon a 20 cm y a 10 cm de la ileostomía. También se toman biopsias de todas las lesiones focales que se observen. Las muestras se tiñen con hematoxilina-eosina (H-E) y su resultado se lo correlaciona con la clínica del paciente.⁽¹⁹⁾ En el caso de la lesión por preservación-reperusión se observan signos de isquemia aguda en la mucosa que pueden variar en grado, desde solo edema y congestión a destrucción de las vellosidades o, en su máximo grado, a hemorragia con necrosis coagulativa y destrucción total de las glándulas. Existen escalas semi-cuantitativas (las cuales serán comentadas con detalle en secciones siguientes del presente trabajo) que permiten determinar el grado de lesión intestinal ante la IIR, lo que permite al equipo médico conocer el estado del injerto trasplantado.^(36,37)

Riñón

Los riñones se ven afectados por la IIR en seres humanos debido a diversas patologías, los principales ejemplos son la cirugía cardiovascular, el trauma, el paro cardíaco con reanimación, y el trasplante renal.

Cirugía cardiovascular: Hasta el 30% de los pacientes sometidos a cirugía cardiovascular desarrollan injuria renal aguda (IRA). Las guías KDIGO (del inglés, Kidney Disease Improving Global Outcome) definen a la injuria renal aguda como un aumento en el valor de creatinina sérica $\geq 0,3$ mg/dl ($\geq 26,5$ $\mu\text{mol/L}$) en las primeras 48 horas, o un incremento en la creatinina sérica $\geq 1,5$ veces el valor basal, el cual se produce en los primeros siete días, o un volumen urinario $< 0,5$ mL/Kg/hora durante seis horas. Uno de los motivos que lo explica es que estos pacientes suelen compartir factores de riesgo en común para el desarrollo de la misma.

Existen factores de riesgo no modificables como la edad avanzada, la hipertensión arterial, la hiperlipidemia, y la enfermedad vascular periférica. Así como factores de riesgo modificables relacionados con el tipo de anestesia, el procedimiento quirúrgico y el mantenimiento en la unidad de cuidados intensivos. Las características inherentes a la cirugía cardiovascular, como es el by-pass cardiopulmonar, el clampeo aórtico, el requerimiento de transfusiones, y el uso de altas dosis de vasopresores aumentan el riesgo de IRA. Estos factores alteran la perfusión renal, inducen ciclos de isquemia y reperusión, aumentan el daño oxidativo e incrementan la inflamación renal y sistémica.

Los mecanismos que asocian la IRA a la cirugía cardiovascular incluyen la isquemia renal perioperatoria, la injuria por reperusión, el estrés oxidativo y la inflamación consecuente. La canulación de la aorta y el clampeo de la misma favorecen la liberación de émbolos hacia los riñones, pudiendo en tal caso exacerbar la isquemia e inflamación. La inflamación renal y sistémica elevan las concentraciones de citoquinas proinflamatoria en el posoperatorio, lo cual se asocia al diagnóstico de IRA e incrementa la mortalidad de estos pacientes.⁽³⁸⁾

Trasplante Renal: El trasplante renal es el método de elección para el tratamiento de pacientes con enfermedad renal en etapa terminal. La IIR puede generar función retardada del injerto y respuesta aloinmune específica, lo que eventualmente conlleva al rechazo agudo y nefropatía

crónica del injerto.⁽³⁹⁾ Existe un aumento en la incidencia de IRA, que puede ser en parte debido a un incremento en el uso de donantes marginales con descenso en la tasa de filtrado glomerular. El desarrollo de IRA posterior al trasplante renal conlleva un deterioro progresivo en la función de las nefronas. Esta patología es inducida por la IIR y exacerbada por el uso de drogas potencialmente nefrotóxicas como son los inmunosupresores inhibidores de la calcineurina. Puede desarrollarse en cualquier momento posterior al trasplante, aunque más comúnmente lo hace durante los primeros días posteriores a la intervención quirúrgica. La función retardada del injerto es una forma de expresión de injuria renal aguda que se caracteriza por presentar síntomas como oliguria y se la puede definir como el requerimiento de diálisis durante los primeros siete días posteriores al trasplante. La incidencia de ésta en donantes con criterios neurológicos de muerte ha aumentado a lo largo del tiempo a pesar del progreso en el tratamiento del rechazo y se la relaciona a un riesgo incrementado de episodios de rechazo agudo y a un descenso en la supervivencia a largo plazo del injerto.⁽⁴⁰⁻⁴²⁾ La capacidad del riñón de resistencia y reparación ante la injuria isquémica es altamente dependiente del número de nefronas disponibles, y del grado de glomeruloesclerosis y ateroesclerosis preexistentes, características típicamente asociadas con el incremento en la edad del donante. Es así como se ha sugerido una interacción significativa entre el tiempo total de isquemia, la edad del donante, y la función del injerto, con mayor índice de retraso en la función del mismo en receptores que recibieron riñones provenientes de donantes añosos.^(43,44)

Útero

Trasplante de útero: El trasplante de útero en humanos actualmente es considerado un procedimiento experimental. Se han realizado algunos programas y ensayos clínicos de trasplantes tanto con donantes vivos como cadavéricos.^(45,46) No sólo han resultado exitosos en lo relacionado al procedimiento quirúrgico, sino que también algunos receptores han sido capaces de generar descendencia a partir de los úteros trasplantados.⁽⁴⁷⁾ Convirtiéndose este en la única opción terapéutica para madres con infertilidad o ausencia uterina que desean gestar a su propio hijo. En estos casos la IIR es un problema a tener en cuenta tanto en los donantes vivos como en los donantes con criterios neurológicos de muerte, y no se han determinado aún los tiempos óptimos de isquemia fría e isquemia tibia, aunque se ha demostrado por medio de algunos estudios la resistencia de células de miometrio a la isquemia fría,⁽⁴⁷⁻⁵⁰⁾ por lo cual la consideración inicial es la de limitar los tiempos de isquemia, siendo este uno de los escasos beneficios del empleo del donante vivo. La proximidad y el momento oportuno de implantación del órgano proveniente de un donante vivo resulta en una disminución del tiempo de isquemia fría, lo que reduce el riesgo de IIR. Y, por ende, de rechazo agudo y crónico.⁽⁵¹⁾

Estrategias de atenuación de la IIR

Hipotermia

La hipotermia enlentece la actividad enzimática disminuyendo los requerimientos tisulares de oxígeno. Es de gran utilidad en la preservación de órganos ya que disminuye el nivel de degradación enzimática intracelular de componentes celulares esenciales para la viabilidad del órgano. La hipotermia no detiene el metabolismo, sin embargo, enlentece el número de reacciones enzimáticas y la muerte celular, hasta que finalmente el órgano deja de funcionar y pierde viabilidad.⁽⁵²⁾ No solo se ha demostrado que enfriando el órgano de 37°C a 2-4°C se puede prolongar el tiempo de preservación,⁽⁵³⁾ sino que además es posible alargar aún más los tiempos si a esto se le suma una solución de preservación. En contrapartida, la congelación no es útil para la preservación de órganos porque favorece la producción de cristales de hielo que lesionan la célula.

Soluciones de preservación

Con el fin de alcanzar la hipotermia tisular se utilizan soluciones de preservación frías las cuales se infunden por vía arterial previo a finalizar la extracción orgánica. De este modo es posible lograr un enfriamiento homogéneo del órgano, realizar un lavado con arrastre de elementos formes, isoaglutininas y factores de coagulación que afectan el flujo normal de la microcirculación al momento de la reperfusión.

La composición de las soluciones de preservación facilita el control de los cambios bioquímicos desarrollados durante la preservación en frío y el período de isquemia, manteniendo la viabilidad del órgano.⁽⁵⁴⁾

Las funciones que debe cumplir una solución de preservación son:

- Prevenir el desequilibrio electrolítico y la acidosis intracelular.
- Prevenir el edema celular e intersticial.
- Proporcionar sustratos para el metabolismo energético celular.
- Reducir el daño oxidativo por radicales libres.

Precondicionamiento isquémico (PCI)

El PCI surge inicialmente en protocolos diseñados para el estudio de la isquemia en el miocardio. Murry y col. llevaron a cabo un experimento que demostró que la inducción de isquemias breves separadas por períodos de reperfusión reducía el tamaño de la necrosis ocasionada por una isquemia posterior sostenida a nivel cardíaco. A partir de este momento Murry acuñó el término precondicionamiento isquémico definiéndolo como un respuesta rápida y adaptativa a una isquemia breve, que enlentece la tasa de muerte celular durante un período de isquemia prolongada.⁽⁵⁵⁾

Es importante la duración de las fases del ciclo de PCI para el gatillamiento de los mecanismos que median la protección. En hígado, por ejemplo, los períodos de isquemia de 5 a 10 minutos son efectivos mientras que períodos de 2, 15, 20 y 30 minutos no lo son. Siendo un período único de isquemia y reperfusión suficiente para inducir hepatoprotección. El PCI, de esta manera,

mejora la función del hígado disminuyendo los niveles de enzimas hepáticas, incrementando el flujo biliar y reduciendo los niveles séricos de TNF α . A su vez contribuye a una disminución significativa de la necrosis hepática.^(6,9,56-58)

El intestino delgado es quizás el órgano más sensible a la IIR. Sin embargo, a nivel experimental, el PCI del mismo ha demostrado mejorar la perfusión y oxigenación microvascular, logrando disminuir la IIR. El aumento de los valores séricos de LDH, empleado como marcador de daño intestinal, ha demostrado ser reducido por medio del PCI, así como la escala de daño histopatológico del intestino delgado donde se evidenció una mejoría en los valores con dicho tratamiento. El tiempo de PCI de 10 minutos de isquemia seguidos de 10 minutos de reperfusión demostró ser efectivo generando efectos protectores contra la IIR intestinal en modelos experimentales. A su vez, el PCI intestinal contribuye a la preservación de la función de barrera, disminuyendo los efectos nocivos que conlleva la traslocación bacteriana, y aplicado al trasplante de intestinos tratados con PCI se obtiene una menor respuesta inflamatoria y lesión de órgano remoto demostrado en ratas.⁽⁵⁹⁻⁶⁴⁾

En riñón se ha comprobado que un período único de PCI de 15 minutos de isquemia seguidos de 10 minutos de reperfusión protege tanto contra la isquemia caliente como contra la isquemia fría a nivel histológico y funcional.⁽⁶⁴⁾ El PCI renal ha demostrado tener un efecto protector en el riñón, ya que genera una disminución en los valores séricos de urea y creatinina, así como también en el daño demostrado a nivel histopatológico luego de la IIR.⁽⁸⁾

No existen prácticamente trabajos de investigación que estudien los efectos del PCI en útero, aunque es posible citar un protocolo en el cual se aplicó PCI por medio de clampeo de la arteria uterina durante tres ciclos de 10 minutos de isquemia y 10 minutos de reperfusión obteniéndose muestras de endometrio previo y posterior al acondicionamiento. Este tejido fue fragmentado para luego implantarse en la membrana corioalantoidea de embrión de pollo, habiéndose observado un aumento en la expresión de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), favoreciendo también la angiogénesis en el grupo PCI y disminuyendo la apoptosis de los implantes.⁽⁶⁵⁾

Los antecedentes descritos anteriormente permiten dilucidar que la IIR ha sido y es actualmente, un tema de relevancia para la medicina y, sobre todo, en el área de los TOS. La experiencia acumulada, tanto a nivel experimental como clínico, muestra efectos beneficiosos del PCI cuando se aplica a un órgano en cuestión. Sin embargo, no se ha considerado hasta el momento, un tratamiento de PCI que abarque la totalidad de, al menos, los órganos abdominales para trasplante. Habiendo considerado la necesidad de acondicionar los órganos abdominales en conjunto a los fines prácticos para los procedimientos de ablación en los operativos de procuración de órganos sólidos para trasplante en humanos y teniendo en cuenta los antecedentes bibliográficos, donde se obtuvo como resultado protector un tiempo similar, aplicando el PCI en forma particular a cada órgano, se estableció como tiempo adecuado para el acondicionamiento isquémico abdominal multiorgánico (PCIAM) en la presente tesis unos 10 minutos de isquemia sumados a 10 minutos de reperfusión.

Capítulo 5

Objetivos de la Tesis

General:

- Evaluar los efectos del preconditionamiento isquémico abdominal multiorgánico (PCIAM), como estrategia para reducir el daño por isquemia-reperusión en roedores.

Específicos:

- Determinar la factibilidad de un protocolo de PCIAM en ratas.
- Establecer si el PCIAM atenúa el daño ocasionado por la injuria por isquemia-reperusión en hígado, intestino delgado, riñón y útero en diferentes modelos experimentales en ratas.
- Desarrollar la técnica de Bishop Koop (BK) en ratas.
- Evaluar la aplicación de la técnica de BK al estudio de patologías de intestino delgado y grueso en ratas.

Hipótesis:

1. El PCIAM disminuye la IIR ante episodios de isquemia prolongada en el tejido hepático, intestinal, renal y uterino en ratas.
2. La técnica de BK es aplicable a las ratas.
3. La técnica de BK es útil para el estudio de patologías intestinales en ratas.
4. La técnica de BK permite reducir el número de ratas necesarias para la investigación de patologías intestinales.

Procedimientos quirúrgicos

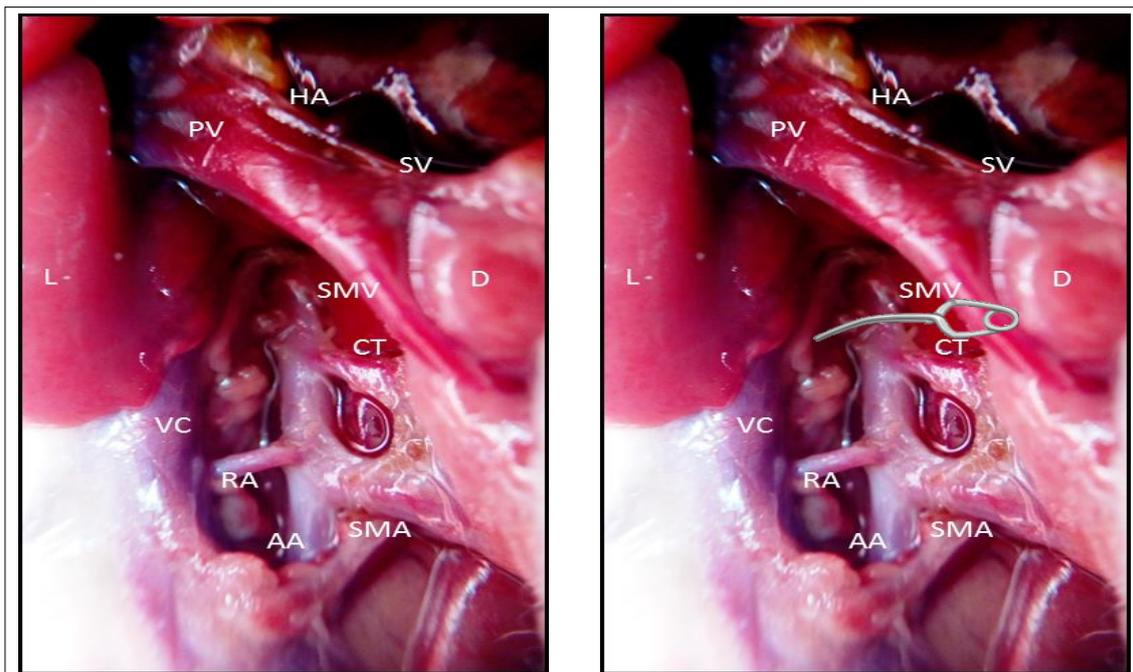
En el transcurso de esta sección del manuscrito se describirán en detalle los procedimientos quirúrgicos experimentales de IIR en diferentes órganos, PCIAM, trasplante renal y BK utilizados para el desarrollo de la presente tesis doctoral.

Todos los procedimientos quirúrgicos se realizaron utilizando anestesia inhalatoria (Isoflurano al 5% para su inducción y al 2% para su mantenimiento). Como analgésico se administró Lidocaína y Tramadol (10 mg/Kg) este último cada 12 horas, Ceftriaxona (65 mg/Kg) como profilaxis y antibioticoterapia cada 24 horas. También se aplicaron 5 ml de solución fisiológica por vía subcutánea. Y previo al clampeo vascular se administró Heparina 50 UI intraperitoneal. Se empleó una manta térmica durante todo el procedimiento, a fin de controlar la temperatura corporal del animal.

Los protocolos de estudio fueron aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de La Plata (Números de Protocolo: T05-02-2016; P01-03-2021). Ajustándose los mismos a las normas éticas de tratamiento humanitario locales e internacionales que deben aplicarse a los animales vertebrados que se utilizan en investigación biomédica.

Precondicionamiento isquémico abdominal multiorgánico (PCIAM)

Se realiza una incisión mediana xifopubiana a través de la piel y la línea alba, se colocan separadores a ambos lados de la pared abdominal y se lateraliza el intestino delgado. Con maniobras romas, utilizando hisopos, se disecciona la aorta abdominal en su porción más proximal identificando a este nivel el origen del tronco celíaco. Localizado el mismo, se disecciona por encima de este la cara posterior de la aorta abdominal, empleando una pinza delicada. Espacio en el cual se progresa luego el clamp vascular.

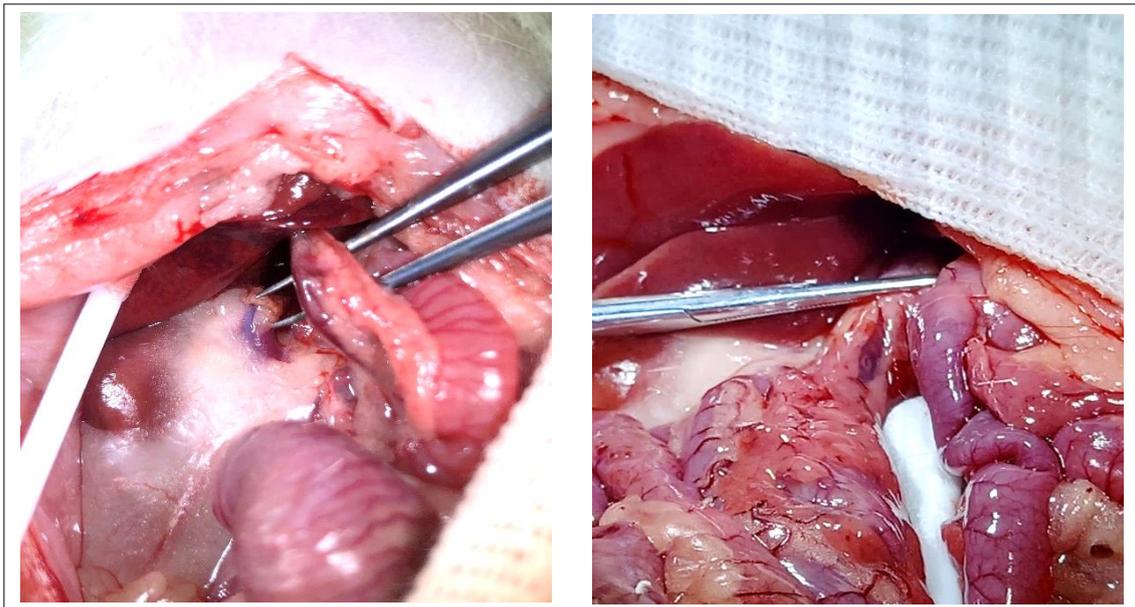


Imágenes 1 y 2: Anatomía vascular abdominal en ratas y procedimiento de PCIAM. 1. Origen del tronco celíaco (CT) en arteria aorta abdominal (AA). 2. Clampado de AA por encima del CT. PV: vena porta, SV:

vena esplénica, RA: arteria renal, VC: vena cava, D: duodeno, SMV: vena mesentérica superior, SMA: arteria mesentérica superior, L: hígado, HA: arteria hepática.

Clampeo de pedículo en hígado

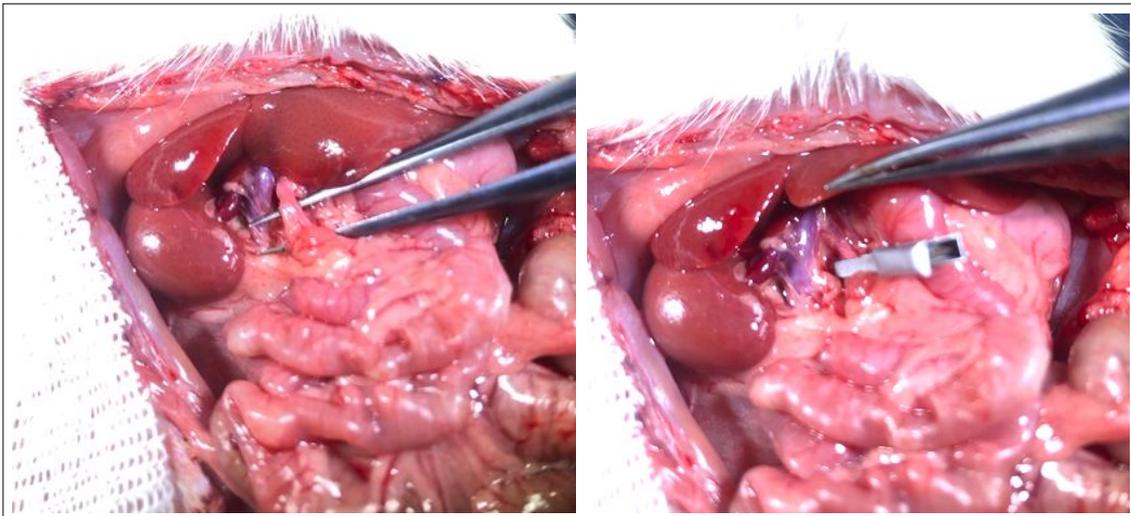
Se realiza una incisión xifopubiana y se colocan separadores a ambos lados de la pared abdominal. Se separan las asas de intestino delgado y se disecciona con maniobras romas con el uso de hisopos la vena porta y arteria hepática. Esta última se localiza paralela a la arteria aorta abdominal próxima al nacimiento del tronco celíaco. Se emplean dos clamps vasculares para el clampeo de la vena porta y arteria hepática en simultáneo.



Imágenes 3 y 4: 3. Disección del pedículo hepático. 4. Clampeo del pedículo hepático.

Clampeo de pedículo en intestino delgado

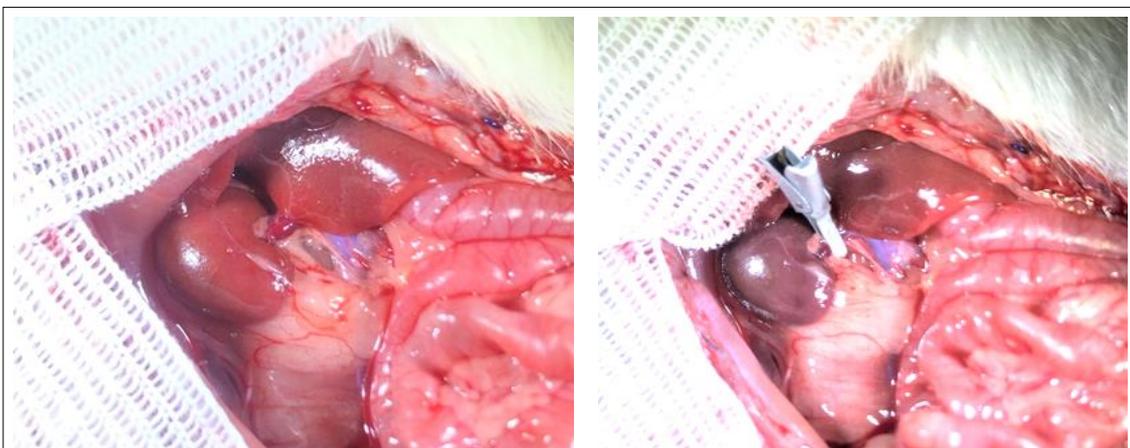
Abierta la cavidad abdominal, se lateraliza el intestino delgado hacia la izquierda del animal y se disecciona con maniobras romas la aorta abdominal en el origen de dicho pedículo, localizando la arteria mesentérica superior (AMS). Por lo general esta no requiere gran disección. Se clampea la misma con un clamp vascular.



Imágenes 5 y 6: 5. Disección de arteria mesentérica superior. 6. Clampeo de arteria mesentérica superior.

Clampeo de pedículo en riñones

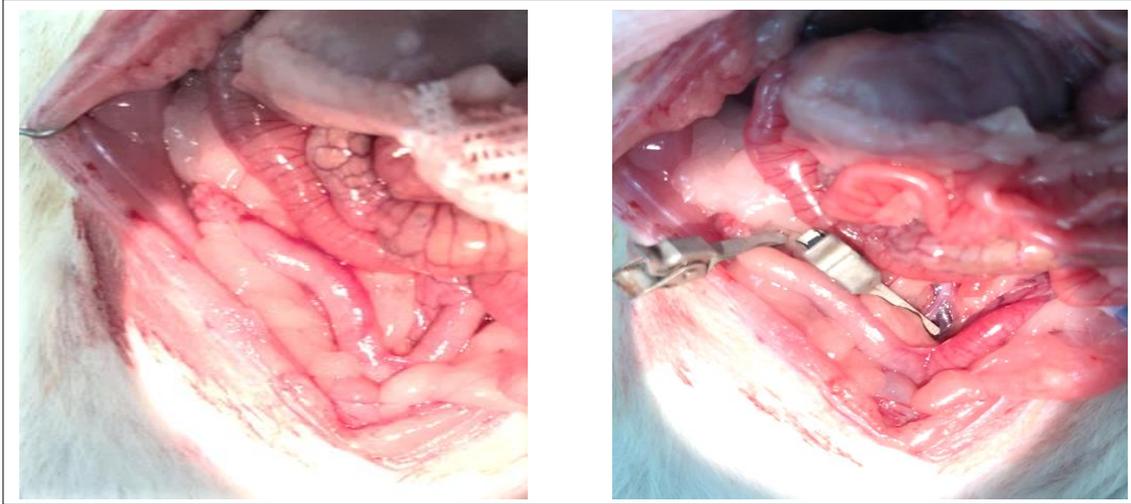
Se aborda la cavidad abdominal, y se movilizan las asas de intestino delgado hacia la izquierda del animal. Con hisopos se emplean maniobras romas para identificar y diseccionar el pedículo renal derecho. Se completa la disección de la cara posterior de la arteria con una pinza delicada. Una vez completo, se llevan las asas delgadas hacia la derecha y se repite el procedimiento para el pedículo renal izquierdo. Se emplean dos clamps vasculares para el clampeo de las arterias renales izquierda y derecha en simultáneo.



Imágenes 7 y 8: 7. Disección de pedículo renal derecho. 8. Clampeo de pedículo renal derecho.

Clampeo de pedículo en cuerno uterino derecho

Una vez abordada la cavidad abdominal por una incisión mediana, se desplazan las asas intestinales hacia la izquierda del animal. Se identifica el cuerno uterino derecho en su unión con el ovario homolateral. A su vez se disecciona la arteria ilíaca derecha inmediatamente proximal a su nacimiento y se colocan clamps en dichos sitios en forma simultánea.

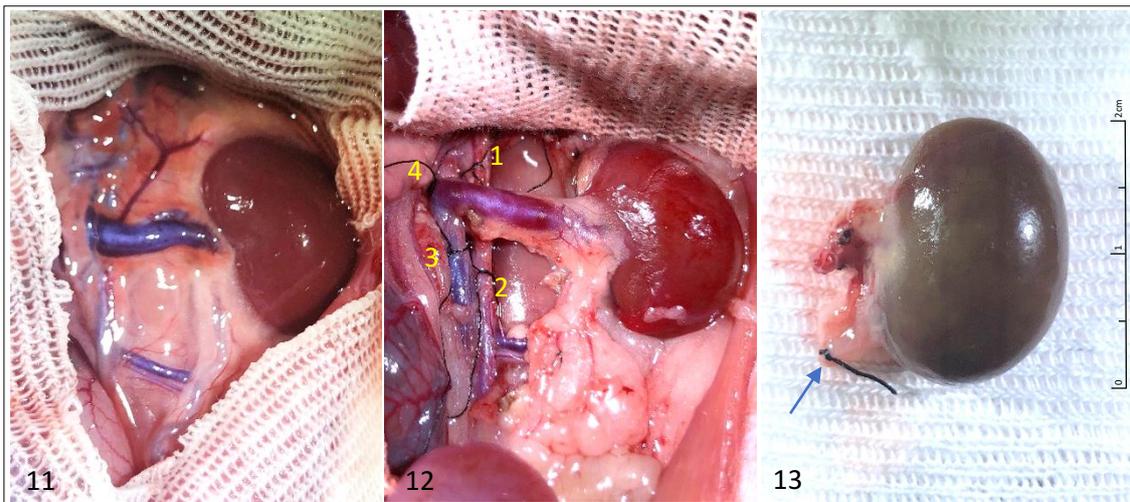


Imágenes 9 y 10: 9. Cuerno uterino derecho. 10. Clampeo simultáneo de la unión del cuerno uterino derecho con el ovario, y de la artería ilíaca homolateral.

Trasplante Renal

Cirugía del donante - Extracción renal

Se inicia con una laparotomía mediana con extensión hacia el flanco izquierdo (Imagen 11). Se diseña la AA hacia proximal y distal del pedículo renal izquierdo. Se identifican vasos adrenales y se coagulan, luego se realiza una disección digital del reborde renal levantándose el mismo. Se diseña y repara el uréter con una ligadura (Imagen 13). Se identifican y coagulan los vasos gonadales homolaterales y los vasos lumbares. Se separan AO y vena cava (VC) entre sí, ligando y seccionando entre ambas los vasos gonadales contralaterales. Posteriormente se colocan cuatro reparos en AO y VC tanto hacia proximal como distal al pedículo renal (Imagen 12). Se administran 50 UI de heparina intraperitoneal y se ligan AO proximal, AO distal y VC distal en dicho orden. Se realiza el lavado del órgano con solución de Ringer Lactato a 4°C por arterio-punción hasta que el órgano se torne de tono pálido homogéneo. Se anuda la cuarta ligadura en VC proximal, se secciona la vena renal y se completa el lavado. Por último, se seccionan AO proximal, AO distal, y uréter.⁽⁶⁶⁻⁷¹⁾

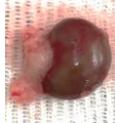
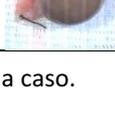


Imágenes 11; 12; y 13: 11. Anatomía renal izquierda posterior a laparotomía inmediata. 12. Reparos con ligaduras de AO y VC. 13. Riñón izquierdo al momento de la extracción con ligadura de reparo en uréter.

Para la curva de aprendizaje se realizó el procedimiento en 5 ratas Sprague Dawley machos. Se registró el tiempo quirúrgico desde su inició hasta la finalización del mismo, y se asignó un valor de 1 a 10 para el estado macroscópico del órgano posterior al lavado (Tabla 1).

Resultados: En los 5 casos se completó la extracción del riñón luego del lavado con solución fría. La principal complicación fue el lavado insuficiente de la corteza renal, este debido a la falta de coagulación de algún vaso lumbar. El valor asignado al aspecto macroscópico presentó una \bar{X} $7,6 \pm 1,14$, con una moda de 8.

Tabla 1: Curva de aprendizaje en 5 casos de extracción renal identificando el tiempo quirúrgico y el valor del aspecto macroscópico del riñón extraído en cada caso.

Riñón	Tiempo	Fotos		Valor
1	50'			7/10
2	45'			8/10
3	43'			8/10
4	39'			6/10
5	35'			9/10

Cirugía del receptor – Trasplante renal heterotópico aislado

Inicia con una laparotomía mediana y la extracción de ambos riñones nativos. El injerto se implanta por medio de una anastomosis termino lateral con nylon monofilamento 9-0 entre la vena renal del injerto y la VC del receptor, así como entre la AO del injerto y la AO del receptor. Al liberar los clamps se evalúa la calidad de la sutura por medio de la coloración del injerto y una correcta hemostasia. Se finaliza con una anastomosis término lateral uretero-ureteral con nylon monofilamento 10-0.⁽⁶⁶⁻⁷¹⁾

Técnica de Bishop Koop (BK)

Introducción: Considerado de vital importancia en el plano científico experimental el término de “las tres R’s de la técnica humana” formulado por los ingleses Russell y Burch en The Principle of Humane Experimental Technique. Este hace referencia a la idea de reemplazar, reducir y refinar. Donde reemplazar se refiere a la sustitución de animales conscientemente superiores por el uso de materiales insensibles, reducir implica la disminución en el número de animales empleados para obtener información de cierta cantidad y precisión, y el refinamiento consistente en la disminución de la incidencia o gravedad de los procedimientos inhumanos aplicados a los animales que aún deban utilizarse.⁽⁷²⁾ Se decidió llevar adelante un protocolo experimental en ratas a partir del cual por medio del empleo de una técnica quirúrgica probada en humanos⁽⁷³⁻⁸¹⁾ fuese posible obtener como resultado el uso de un menor número de animales, a fin de recabar los datos suficientes que respondan a la investigación en cuestión y

que por medio de la maximización de la información obtenida en un animal se pudiese entonces disminuir o limitar potencialmente el uso de estos, sin comprometer su bienestar.

La técnica quirúrgica de BK⁽⁸²⁾ se trata de una derivación intestinal empleada actualmente en la actividad clínico-quirúrgica especialmente en pacientes pediátricos con antecedente de íleo meconial^(78,83,84) y síndrome de intestino corto.^(74,76) Esta técnica consiste en la confección de un ostoma a nivel del intestino delgado manteniendo funcional el tránsito intestinal.

Objetivo: Aplicar la técnica quirúrgica de derivación intestinal descrita por Bishop y Koop empleando un protocolo de modelo experimental con el fin de evaluar su aplicabilidad en ratas. Teniendo presente la utilidad de este método para el estudio de los efectos de la IIR en intestino delgado y de otras patologías.

Materiales y Métodos: Se emplearon 10 ratas Sprague-Dawley (peso $379,3 \pm 37$ gr). Los animales fueron divididos en dos grupos, en el primero se empleó la técnica aplicada a intestino delgado (ID) n=5 y en el segundo sobre intestino grueso (IG) n=5.

Se llevó a cabo un monitoreo clínico diario posterior al acto quirúrgico que incluyó pesaje de cada animal y evaluación de signos de dolor o discomfort. Entre los signos que se tuvieron en cuenta en cada evaluación se incluyeron la presencia o ausencia de piloerección, el cambio en la coloración de mucosas, la presencia de deshidratación, secreción ocular, presencia de diuresis y catarsis, corroborando en esta última las características de la misma. Se exploró a su vez la vitalidad de la ostomía y cicatriz, como así también el estado del abdomen por medio de la palpación. De este modo se adjudicó un valor a cada ítem estableciendo un score.

El procedimiento comparte las mismas características en lo relacionado al tipo de anestesia, analgesia y tratamiento antibiótico utilizados en los protocolos quirúrgicos previos. Se proporcionó agua y alimento a demanda previo al acto quirúrgico. En el posoperatorio inmediato, dieta blanda (gelatina), la cual se continuó durante 48 horas, y a partir del segundo día se retomó la dieta habitual.

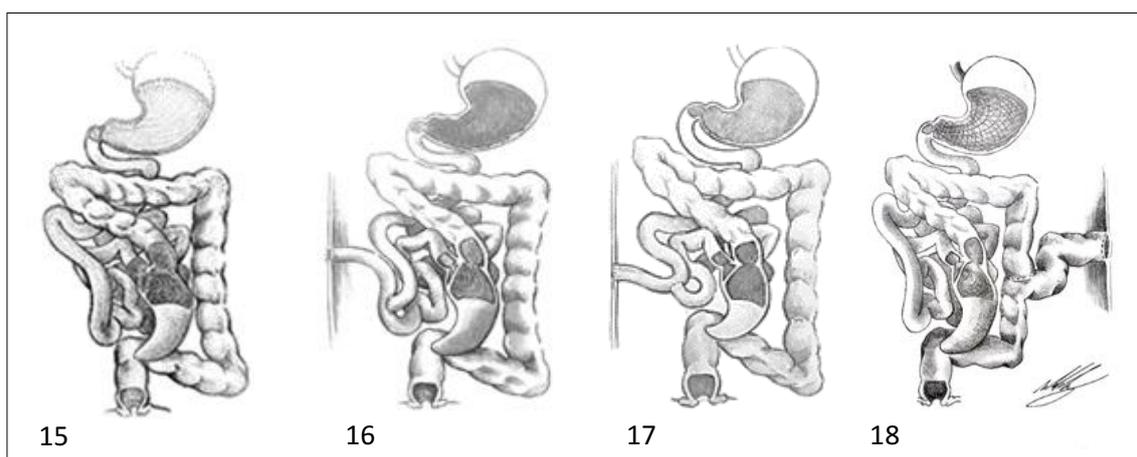
Técnica quirúrgica: Luego de logrado el plano anestésico se aborda el abdomen por medio de una incisión xifopubiana para lo cual se emplea tijera, incidiendo piel y línea alba por separado. Se realiza una rápida semiología de la cavidad abdominal y se identifican las asas de intestino delgado. Luego de coagular los vasos mesentéricos del área en cuestión, se realiza una sección completa del asa delgada a unos 15 cm de la válvula íleo-cecal. El asa proximal se anastomosa a la distal por medio de una anastomosis termino-lateral. Mientras que el cabo distal es abocado a la pared abdominal por medio de la confección de una ostomía. La enteroanastomosis se realiza con una sutura transparietal continua de polipropileno 7-0 (Imagen 16, y Gráfico 1C). La ileostomía (Imagen 14) se confecciona con puntos cardinales simples del mismo tipo de sutura que incluyen piel, aponeurosis y todas las capas de la pared intestinal.



Imagen 14: Ileostomía

El procedimiento en intestino grueso comparte los mismos pasos iniciales. Se movilizan las asas delgadas hacia la derecha del animal y se localiza el colon descendente. Se incide sobre la fascia del mismo en todo su trayecto desde el recto hasta unos centímetros sobrepasando el ángulo esplénico a fin de lograr una mejor movilización. Próximo a este ángulo se realiza la transección del intestino previa coagulación del meso en dicho sitio con bipolar. De estar presente, se vacía el contenido intestinal proximal a la incisión por compresión con un hisopo con cuidado especial de no verter el mismo en la cavidad. Se miden unos 5 cm aproximadamente desde el sitio de transección hacia distal para realizar a continuación la anastomosis colo-colónica término lateral con la misma técnica empleada para intestino delgado (Imagen 18, y Gráfico 1C). Para finalizar se cierra la pared y se confecciona la colostomía con la misma técnica y material de sutura empleado en intestino delgado.

A su vez, a un grupo de animales (n=3) se les realizó la técnica de Santulli. Este procedimiento es similar al de BK, con la diferencia que luego de seccionar el intestino delgado el cabo proximal se ostomiza, y se realiza la anastomosis entero-enteral latero-terminal con el cabo distal (Imagen 17, y Gráfico 1C).⁽⁸⁵⁾



Imágenes 15; 16; 17; y 18: 15. Sistema digestivo normal de la rata. 16. Técnica de BK aplicada a intestino delgado. 17. Técnica de Santulli. 18. Técnica de BK aplicada a intestino grueso con colostomía izquierda.

Toma de muestras: Se obtuvieron muestras de intestino de aproximadamente 1 cm de tejido circular desde el ostoma (asa derivada). Los tiempos de muestreo fueron primero a los 7 días del posoperatorio y un segundo muestreo al momento del sacrificio a los 14 días del mismo.

Las muestras de intestino delgado se analizaron con el índice vellosidad/cripta mediante el software FIJI⁽⁸⁶⁾ y el score de Park/Chiu^(36,37) (score: 0, mucosa normal; 1, espacio subepitelial en la punta de la vellosidad; 2, espacio subepitelial extendido a toda la vellosidad; 3, erosión de eritrocitos; 4, vellosidades desnudas; 5, pérdida de vellosidades; 6, infarto de criptas; 7, infarto mucoso; y 8, infarto transmural). Mientras que el daño histopatológico de las muestras de colon se determinó a través del Índice de Actividad Histopatológica (HAI).⁽⁸⁷⁻⁸⁹⁾ El cual registra dos sistemas por separado, evaluando daño epitelial e inflamación. Al daño epitelial se le asignó un valor de 0 para ninguno, 1 para pérdida mínima de células caliciformes, 2 para pérdida extensa de células caliciformes, 3 para pérdida extensa de células caliciformes y mínima pérdida de criptas, y 4 puntos para pérdida extensa de criptas; el infiltrado obtuvo un score igual a 0 para

ausencia de infiltrado celular, 1 para infiltrado alrededor de la base de las criptas, 2 para infiltrado en la muscular de la mucosa, 3 para infiltrado extenso en la muscular de la mucosa con edema, y 4 puntos para el infiltrado en submucosa. Las muestras fueron evaluadas a doble ciego y el HAI se calculó como la suma del score de daño epitelial y el de infiltrado, se obtiene de este modo un rango entre 0 y 8 puntos para muestras sin afectación hasta una colitis severa.

Análisis estadístico

El estudio comparativo entre los grupos se realizó utilizando métodos no paramétricos. Un análisis estadístico de varianza utilizando el Test de Kruskal-Wallis corregido por el Test de Dunn de comparación múltiple; o Test de Student seguido por Test de Mann-Whitney, como en el caso del análisis del score de Park/Chiu. Los resultados se expresaron como media o mediana según correspondiese y su respectivo desvío standard. Las diferencias entre las mismas fueron consideradas estadísticamente significativas cuando $P < 0.05$. Estos datos fueron evaluados empleando el software de GraphPad (versión 8.0; San Diego, CA, USA).

Resultados: El porcentaje de supervivencia fue del 100%. El máximo descenso de peso se observó aproximadamente a los diez días del posoperatorio (\bar{x} 10,6% \pm 3,9 para el grupo ID; \bar{x} 11,17% \pm 1,47 para el grupo IG). Luego de lo cual comienzan a ganar peso, produciéndose un ascenso en la curva al momento del sacrificio. Los animales sujetos a la técnica de Santulli presentaron un descenso considerable del peso corporal, valores suficientes para aplicar el criterio de endpoint (Gráfico 1A). No se observaron complicaciones asociadas al método, habiéndose obtenido un score clínico igual a cero en todos los casos de BK (n=10) en los primeros días posoperatorios (POP). Se observó moderada piloerección durante las primeras 48 horas luego de la cirugía de BK con una excelente recuperación hacia el tercer día POP. No así, en el caso de Santulli, ya que dicho score empeora considerablemente los primeros días del POP (Gráfico 1B). Estas ratas presentaron moderada piloerección, moderada secreción ocular, moderada letargia, postura antálgica, y excesiva pérdida de contenido intestinal por la ostomía; lo cual sumado al descenso del 20% del peso nos instó a considerar el criterio de endpoint humanitario como fue mencionado. El análisis histopatológico de intestino delgado no demostró cambios en la relación vellosidad/cripta⁽⁹⁰⁾ (Gráfico 2B) lo cual sugiere la ausencia de alteraciones mayores en cuanto a la morfología. Lo mismo se evidencia al analizar el score de Park/Chiu, el cual presentó un valor promedio igual a 1 con un valor máximo de 3 en su escala tanto en la porción del asa derivada, como también en la proximal y distal a la anastomosis (Gráfico 2C). Grados compatibles con lesiones de tipo reversibles. Las muestras de intestino grueso demostraron alteraciones del epitelio y un aumento en la infiltración linfocitaria, esto puede estar relacionado al cambio en las condiciones aeróbicas en el lumen colónico, pudiendo potencialmente modificar la microbiota (Gráfico 3).

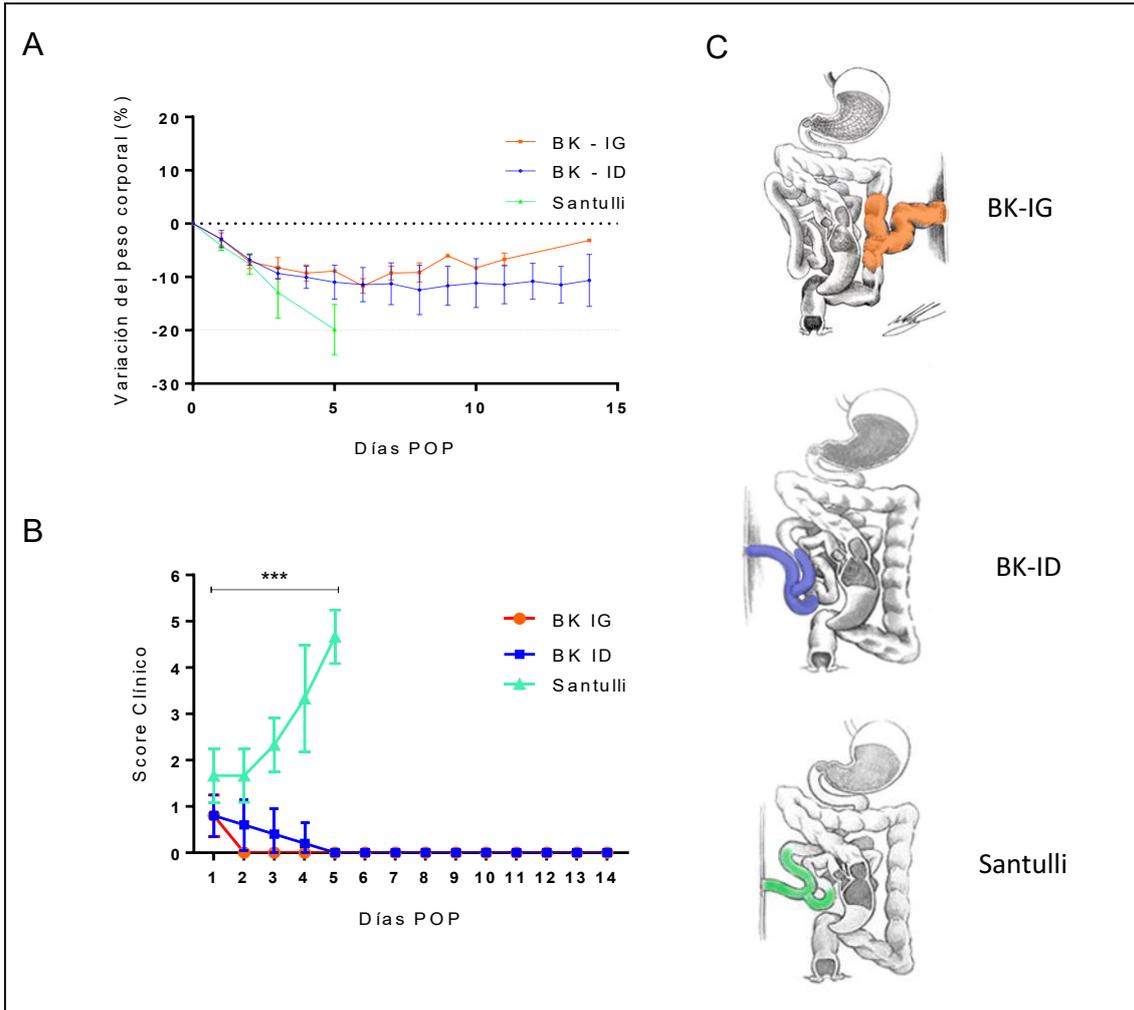


Gráfico 1: A. Porcentaje de variación del peso corporal durante los días del posoperatorio (POP) en los grupos de BK en intestino grueso (IG) e intestino delgado (ID), así como en Santulli. B. Score clínico en los tres grupos de estudio durante el POP. C. Representación esquemática de BK-IG (naranja), BK-ID (azul), y Santulli (verde).

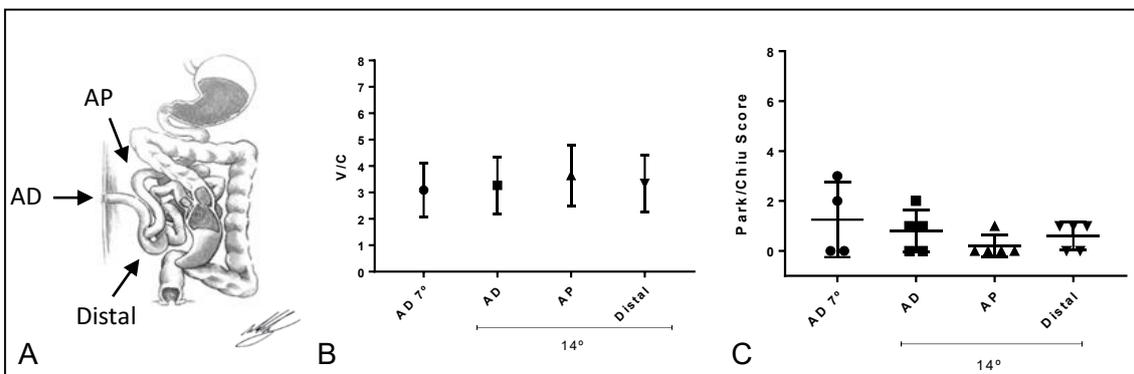


Gráfico 2: A. Zonas de muestreo en intestino delgado en BK, incluye asa proximal (AP), asa derivada (AD), y asa distal (Distal) en relación a la entero-anastomosis. B. Relación vellosidad/cripta (V/C) en AD al 7º día y al 14º día posoperatorio en AD, AP y Distal. C. Score de Park/Chiu en mismas muestras.

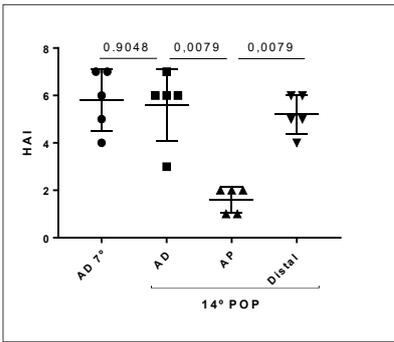


Gráfico 3: Índice de actividad histopatológica (HAI) en biopsias de colon de asa derivada (AD); asa proximal (AP), y asa distal (Distal) a la anastomosis colo-colónica al 7º y 14º día del posoperatorio (POP).

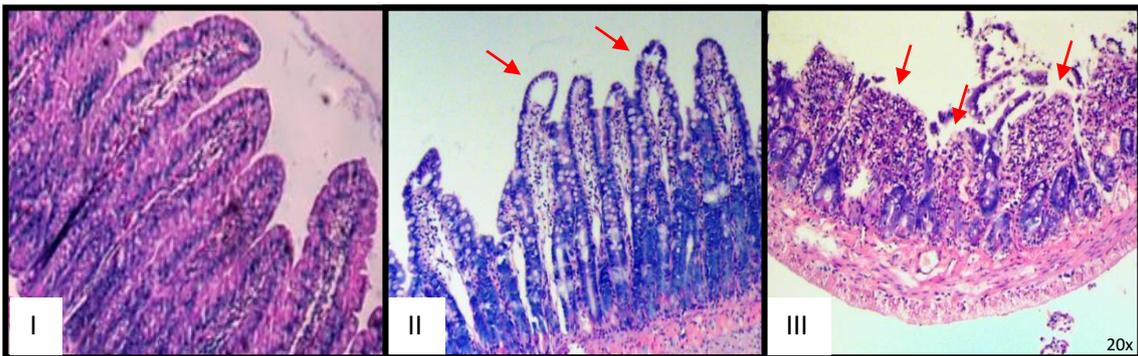


Imagen 19: Scores de Park/Chiu 0, 1 (edema subepitelial en punta de vellosidades), y 5 (pérdida de vellosidades) en muestras histopatológicas de intestino delgado en imágenes I, II, y III respectivamente. (H-E, Obj. 20x)

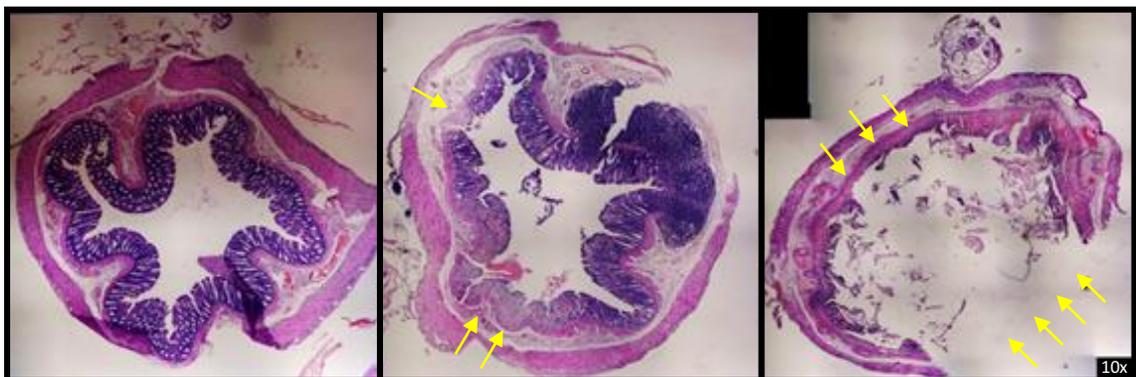


Imagen 20: Diferentes grados de HAI observados (pérdidas de criptas) en las muestras histopatológicas de colon. (H-E, Obj. 10x)

Conclusiones: La técnica quirúrgica de BK empleada ampliamente en la práctica clínica pediátrica como opción terapéutica en casos seleccionados, es factible de ser realizada en roedores tanto en intestino delgado, así como en intestino grueso. Mediante la misma se conserva el tránsito intestinal que hace posible la obtención seriada de múltiples biopsias del órgano en un mismo animal por medio de un procedimiento sencillo y con el franco beneficio de prolongar la supervivencia del roedor en estudio. El modelo desarrollado puede ser de utilidad para el estudio de patologías inflamatorias del tracto gastrointestinal con la ventaja de permitir la toma de muestras y/o administración, en forma directa, de tratamientos a nivel intraluminal. En relación a la técnica de Santulli, se debe considerar la excesiva pérdida de contenido entérico a

través de la ostomía lo cual repercute considerablemente en un deterioro clínico de los animales.

Aplicación del modelo de BK

BK para el estudio de la IIR intestinal

Objetivo: A partir de los resultados alentadores de la experiencia anterior y habiendo corroborado la aplicabilidad del empleo de la técnica de BK en ratas, se decide implementar un protocolo de IIR focalizado al asa intestinal delgada derivada. Teniendo en cuenta la utilidad del modelo para la obtención de biopsias seriadas intestinales del órgano sometido a isquemia para su análisis posterior, siendo esto imposible de llevarse a cabo en otros modelos de investigación, requiriendo sacrificar al animal al momento del muestreo y necesitando una mayor n para la obtención del mismo número de muestras a distintos tiempos. Se intenta de este modo reducir el número de animales necesarios a fin de obtener un muestreo seriado múltiple de biopsias intestinales en un mismo roedor. De los estudios experimentales focalizados en patología de intestino delgado la IIR es un modelo de interés en la actualidad.⁽⁹¹⁻¹⁰⁰⁾

Materiales y métodos: Se emplearon ratas Wistar hembras (peso 221 ± 13 gr). A las mismas se les proporcionó agua y alimento a demanda previo al acto quirúrgico. La anestesia inhalatoria y analgesia fueron las mismas aplicadas al modelo experimental previo. Todas las ratas recibieron heparina 50 UI intraperitoneal previo y posterior al clampeo vascular. La temperatura corporal fue controlada por medio de una manta térmica. Se estableció un grupo BK+IIR (n=5) al cual se le realizó la técnica de BK con clampeo selectivo del asa intestinal derivada, que consistió en unos 60 minutos de isquemia seguidos de reperusión. Un segundo grupo de BK+PCIAM (n=3) consistió en aplicarles el protocolo de PCIAM (10 minutos de isquemia y 10 minutos de reperusión) previo a la isquemia de 60 minutos selectiva del asa derivada intestinal. Se incluyeron como grupos control, el grupo BK (n=5) al cual se le realizó la técnica de BK sin isquemia ni preconditionamiento; y el grupo OAMS (n=20) que incluye solo isquemia por oclusión de la AMS durante 60 minutos y reperusión con muestreo posterior.

Se obtuvieron muestras seriadas del asa derivada en los grupos BK; BK+IIR; y BK+PCIAM de aproximadamente 1 cm de intestino: T0 (al inicio), T1 (30 minutos post-reperusión), T2 (a los 60 minutos), y T3 (a las 24 horas). (Gráfico 4) En el grupo OAMS las muestras se obtuvieron del íleon aproximadamente a unos 15 cm de la unión íleo-cecal. Se realizó un análisis histopatológico con el objetivo de establecer el grado de daño por isquemia reperusión a partir del score de Park/Chiu, siendo necesario un animal por tiempo de muestreo en este grupo. A fin de evaluar la capacidad absorbente del asa derivada, al cumplirse una semana del posoperatorio se realizó una prueba de absorción de glucosa. Para la misma se utilizó una solución concentrada de glucosa (2 gr/kg) diluida en solución salina la cual se administró por la ostomía del asa derivada (Imagen 21). El grupo OAMS recibió la solución de glucosa intraluminal. Se establecieron valores de glucemia empleando un medidor de glucemia Accu-Chek (Roche) inmediatamente previo a su administración (basal), a los 15 y a los 30 minutos posteriores. Las gotas de sangre se obtuvieron por medio de punción de la cola del animal.⁽¹⁰¹⁾

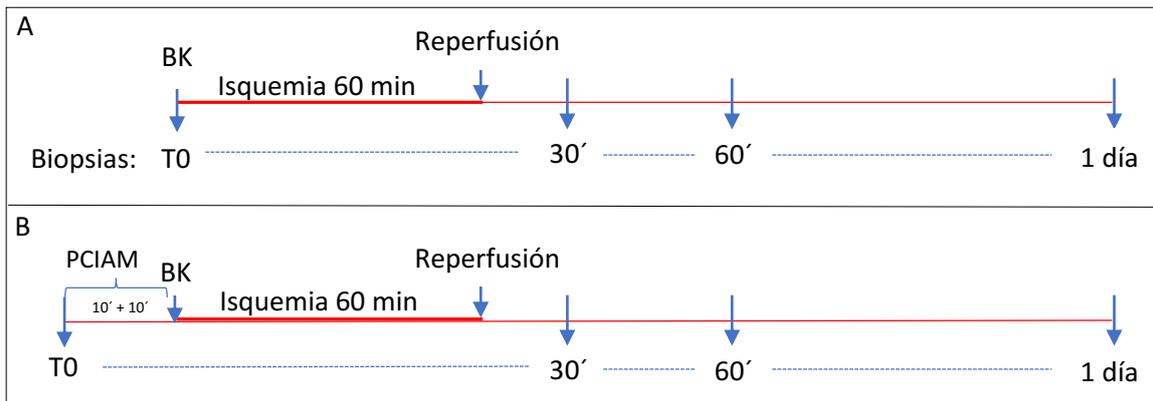


Gráfico 4: Tiempos de muestreo de biopsias intestinales, en grupos de BK+IIR (A) y BK+PCIAM (B).

Se estableció como tiempo de isquemia 60 minutos, ya que según la bibliografía es un tiempo suficiente para generar un daño por isquemia reperusión evidenciado por medio de la histopatología.^(102,103)

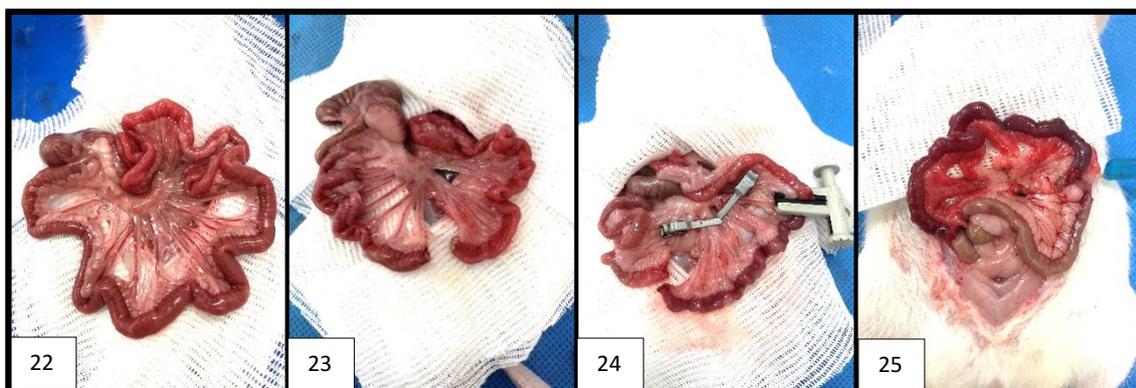
Los animales fueron evaluados con el mismo seguimiento clínico de la experiencia previa identificando posibles signos de malestar o disconfort, realizándose pesaje diario y valorando posibles complicaciones identificables en el posoperatorio inmediato y alejado.



Imagen 21: Administración de glucosa a través de ileostomía para realizar prueba de absorción.

Procedimiento quirúrgico de BK+IIR: Se inicia el abordaje abdominal del mismo modo descrito en la técnica quirúrgica previa. Se miden 25 cm hacia proximal desde la unión íleo-cecal y a dicho nivel se coagulan selectivamente los vasos del meso para luego realizarse una transección del asa intestinal (Imagen 23). Se vacía el contenido intestinal próximo al extremo del cabo proximal por medio de su desplazamiento por compresión externa con un hisopo y empleando una gasa para no contaminar la cavidad abdominal. Se mide desde el borde del cabo distal 15 cm con el fin de identificar el sitio donde se realizará la anastomosis íleo-ileal término-lateral a nivel del borde antimesentérico intestinal. De este modo se obtiene suficiente longitud de asa derivada necesaria para la obtención de múltiples muestras a futuro. Se realiza la anastomosis descrita con la misma técnica desarrollada en el modelo experimental de BK. Se localizan las arcadas vasculares que proporcionan irrigación a los 15 cm de asa derivada y previa administración de 50 UI de heparina intraperitoneal se clampea en forma selectiva dichos vasos por medio de un clamp vascular, también se clampea el asa intestinal a 15 cm del cabo distal, lugar donde comienza el asa derivada (Imagen 24). De este modo nos aseguramos la isquemia completa del asa derivada en forma uniforme corroborado mediante el cambio en la coloración de la misma de rosado a grisáceo. Se mantiene la isquemia durante 60 minutos luego de los cuales se procede al desclameo y se objetiva el restablecimiento del flujo por medio del retorno a la coloración

rosada del asa previamente isquémica. Al momento de la reperfusión (Imagen 25) se administra una segunda dosis de heparina intraperitoneal. Se confecciona la ostomía en hemiabdomen derecho y se cierra la pared de igual forma al modelo experimental anterior.



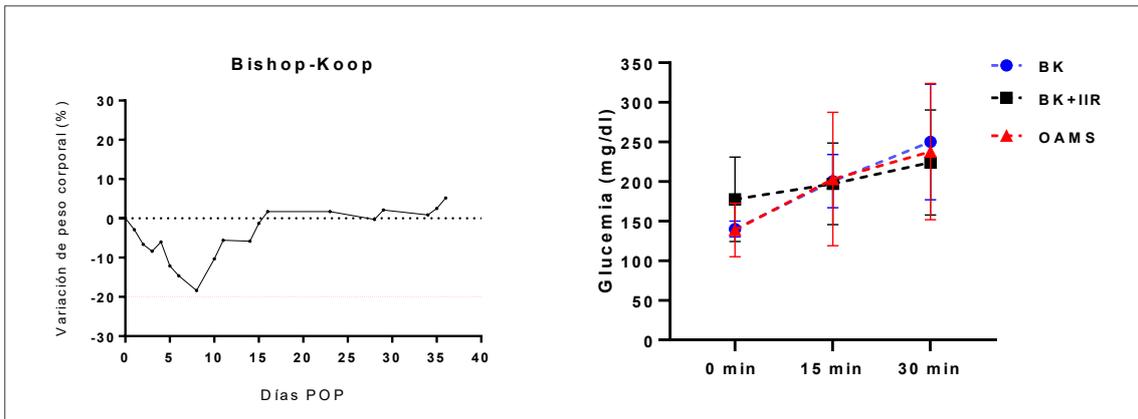
Imágenes 22; 23; 24; y 25: Paso a paso del procedimiento quirúrgico de IIR mediante clampeo del asa derivada de intestino delgado. 22. Aspecto macroscópico normal de asas de intestino delgado de la rata. 23. Sección intestinal aproximadamente a 25 cm de la válvula ileocecal para crear el asa derivada. 24. Clampado de asa derivada a nivel del mesenterio y la luz intestinal al inicio del asa derivada. 25. Reperfusión inmediata del asa derivada luego de 60 minutos de isquemia.

Biopsia intestinal: El ostoma es fijado a la pared a partir de ocho puntos cardinales transparietales de sutura de polipropileno 7-0. Al momento de realizarse el muestreo, una vez anestesiado el animal, se liberan los puntos de sujeción con tijera, se tracciona con maniobra delicada del cabo intestinal teniendo especial cuidado de evitar las lesiones del meso que pudiesen producir algún sangrado. Se descarta el borde suturado y se mide a partir de este aproximadamente 1 cm de intestino, luego se coagula a dicho nivel el meso para realizar la sección intestinal con tijera. La muestra es almacenada en un frasco con formol para su posterior análisis y se confecciona una nueva ostomía con la técnica ya descrita.

Análisis estadístico: El análisis estadístico fue realizado siguiendo la metodología descrita anteriormente.

Resultados: La supervivencia, el score clínico y la variación del peso corporal se asemejan a la experiencia de BK sin IIR del asa derivada. Los animales con BK describen una curva de descenso de peso hasta el octavo día posoperatorio, a partir del cual comienzan a recuperar el mismo expresado en un ascenso en la curva; superando el peso inicial al mes del posoperatorio (Gráfico 5). Del análisis histopatológico se desprende un índice de Park/Chiu basal previo a la IIR del asa derivada ≤ 1 que alcanza un máximo $\bar{X} = 4 \pm 0,5$ a los 30 y 60 minutos post IIR, con una disminución del daño intestinal hacia el primer día posoperatorio, que alcanza un valor mínimo de Park $\bar{X} = 1,3 \pm 0,5$ a las 24 horas de la cirugía en el asa derivada. Los resultados del grupo BK+PCIAM describen una curva similar, con un acmé a los 30 y 60 min de score de Park $\bar{X} = 4,25 \pm 0,5$ con descenso a las 24 horas $\bar{X} = 0,6 \pm 1,1$, esta curva se repite en el grupo OAMS (Gráfico 7). La prueba de absorción de glucosa a través del ostoma, a la semana del posoperatorio, es positiva. Se produce una curva ascendente de valores de glucemia que alcanza un valor máximo $\bar{X} = 224 \pm 66$ mg/dl a los 30 minutos de su administración, partiendo de un basal $\bar{X} = 172,2 \pm 49$

mg/dl en el grupo BK+IIR. No se observan diferencias significativas entre los distintos grupos (Gráfico 6).



Gráficos 5 y 6: 5. Curva de porcentaje de variación del peso corporal durante el primer mes posoperatorio. 6. Prueba de absorción de glucosa en asa derivada a través de ostomía (BK; BK+IIR) e intraluminal (OAMS).

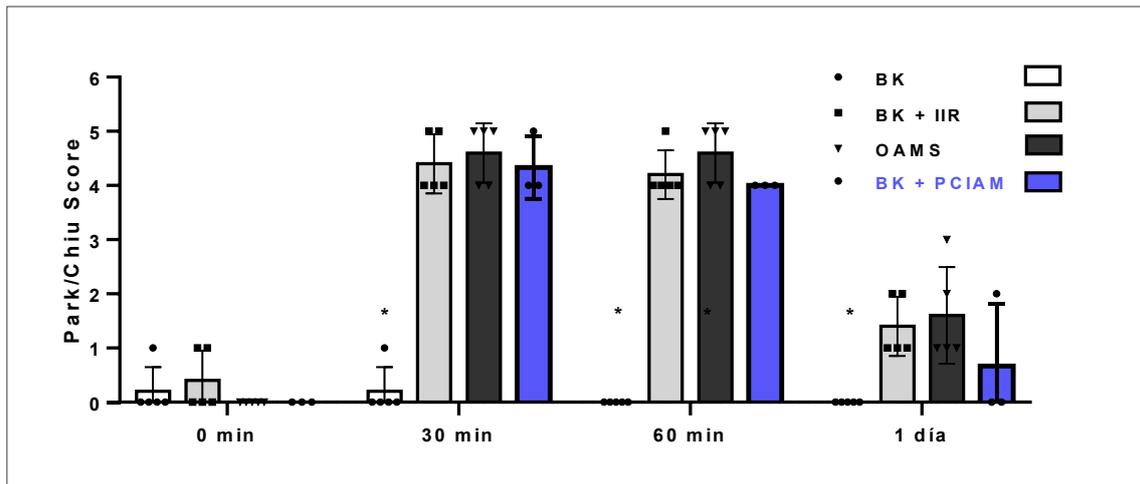


Gráfico 7: Diferentes grados de score de Park/Chiu en muestras de intestino delgado en los distintos grupos: BK, BK+IIR, BK+PCIAM, y OAMS (oclusión de AMS).

Conclusiones: El modelo de BK es útil para el estudio de la IIR en intestino delgado. Permite la reducción de un 75% en el uso de animales ya que es posible, como se demostró en este caso, tomar cuatro muestras de un solo animal a diferencia del modelo clásico (OAMS) en el que se requiere un animal por tiempo de muestreo (n=4 en este caso vs. 1) (Imagen 26). Es de utilidad no sólo en la toma de múltiples biopsias de intestino, sino también en la administración de tratamientos intraluminales a través de la ostomía. No se producen alteraciones significativas en el score clínico ni en la supervivencia del animal. A su vez, al incluir un grupo de BK sin IIR se pudo observar el impacto de la técnica en sí misma sobre el intestino delgado, dando resultados compatibles con una ausencia de cambios significativos a nivel del mismo. Se observó en relación con la absorción de glucosa al comparar la técnica de BK con el modelo clásico, administrando la misma por la ostomía, una absorción adecuada en ambos casos.

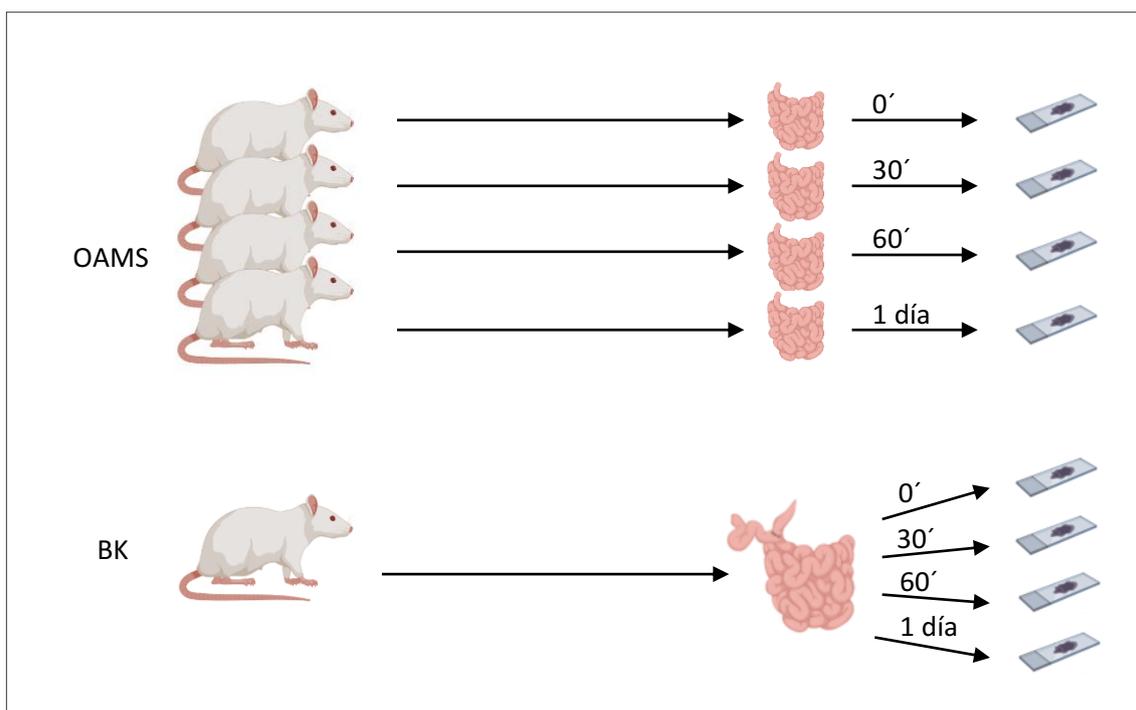


Imagen 26: Esquema que ejemplifica la reducción en el uso de animales mediante la aplicación de la técnica de BK al requerir múltiples muestras seriadas de intestino. Reducción del 75% al realizar 4 muestras seriadas en BK con IIR (n=1) en comparación con el mismo número de muestras en OAMS (n=4).

BK en un modelo de colitis inducido por TNBS

Objetivo: Se emplea la técnica de BK aplicada a intestino grueso para el estudio de un modelo de colitis inducida por TNBS (ácido sulfónico 2,4,6-trinitrobenceno). Este es un modelo experimental de interés de investigación en la actualidad entre las patologías de intestino grueso utilizado por múltiples autores y grupos de investigación.^(104–111)

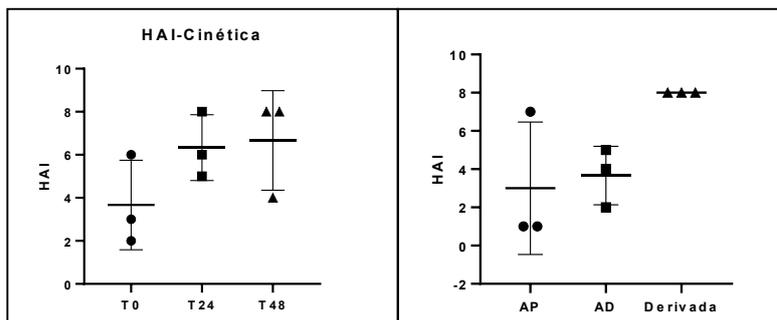
Materiales y métodos: Se constituyeron tres grupos compuestos por ratas Sprague-Dawley hembras (peso $190 \pm 2,6$ gr). A las cuales se les realizó la técnica de BK en la porción distal del intestino grueso. En el primer grupo (n=3) una vez confeccionada la ostomía se administró por la misma una solución de 200 μ l de TNBS al 2,5%, diluida en 50% de etanol, por medio de un Abbocath G24 de teflón. Como grupo control (n=3), luego de realizarse la misma técnica quirúrgica se administró por la ostomía 200 μ l de una solución de 50% de etanol (vehículo). El tercer grupo (Sham n=3) consistió en animales a los que se les administró solución de PBS a través de la ostomía confeccionada por técnica de BK.

La anestesia y analgesia empleadas comparten las características de los procedimientos previos. Así como la dieta y el monitoreo clínico, con especial interés en identificar la presencia de secreción anal u ostomal.

Se realizó un muestreo del asa derivada al momento de la confección de la anastomosis (T0), y luego a través de la ostomía a las 24 horas (T24), a las 48 horas (T48), y al sacrificar al animal (séptimo día POP) muestreando entonces tanto el asa derivada, así como el asa proximal y distal a la entero-anastomosis.

Las biopsias intestinales se tiñeron con H-E para su análisis histopatológico. Se estableció un score de las mismas por medio del HAI. El análisis estadístico fue realizado de la misma forma en que fue descrito anteriormente.

Resultados: Los animales que recibieron TNBS a través de la ostomía muestran un daño más significativo en el score de HAI que las muestras de los grupos vehículo y sham (sham $1,9 \pm 1,10$; vehículo $2,87 \pm 1,12$; TNBS $5,55 \pm 2,24$) indicando que este procedimiento quirúrgico puede ser utilizado para disminuir en al menos tres veces el número de animales necesario para el estudio de la colitis (Gráficos 8-10).



Gráficos 8 y 9: 8. HAI en asa derivada al momento de la anastomosis intestinal (T0), a las 24 horas (T24), y 48 horas (T48) posterior a la administración de TNBS a través del ostoma. 9. HAI en asa proximal (AP), y asa distal (AD) a la anastomosis intestinal, así como en el asa derivada (Derivada) al séptimo día del POP en mismo grupo de estudio.

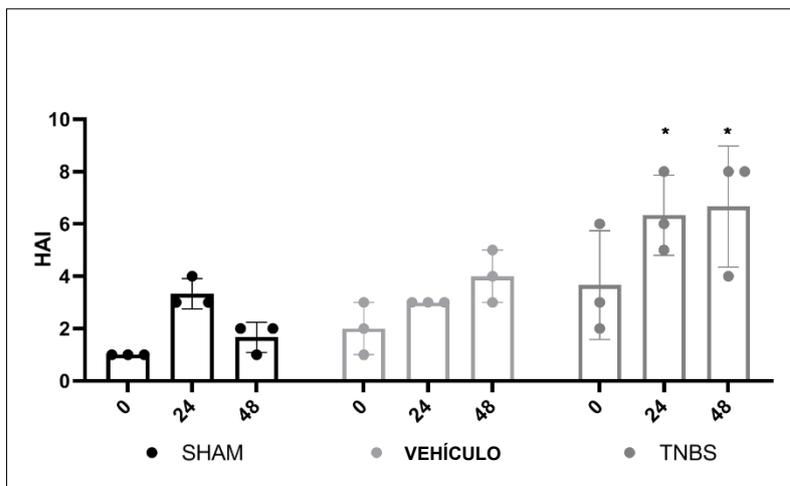


Gráfico 10 Diferentes grados de HAI en muestras histopatológicas de intestino grueso teñidas con H-E en animales tratados con PBS (Sham), 50% de etanol (vehículo) o 3% de TNBS en 50% de etanol (TNBS) con muestras obtenidas a través del ostoma en los tiempos indicados (0, 24, o 48 horas).

Conclusiones:

La técnica de BK es aplicable a intestino grueso para el estudio de protocolos con administración de fármacos intraluminales y su análisis histopatológico por medio de biopsias seriadas a través de la ostomía. De este modo, similar a intestino delgado, es posible la obtención de múltiples biopsias de intestino. Este modelo permite el estudio de patologías inflamatorias del colon en forma localizada, evitando un grado de afectación intestinal y sistémico mayor. Por lo tanto, la técnica de BK significa una reducción y refinamiento en el uso de animales de laboratorio. La reducción en el uso de animales en este caso fue de un 66,6%.

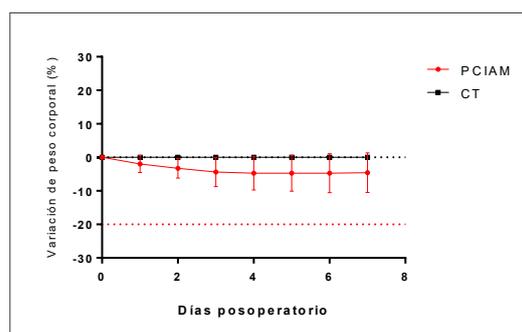
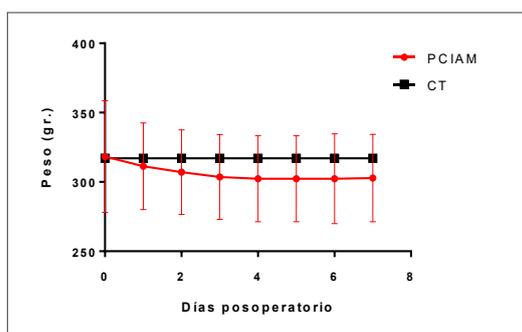
Diseños experimentales con PCIAM

PCIAM

Introducción: Con el objetivo de establecer la viabilidad del PCIAM se realiza en un primer momento un protocolo de isquemia multiorgánico durante un breve período de tiempo a fin de evaluar la supervivencia del animal de experimentación.

Materiales y métodos: Se emplearon para esta experiencia cinco ratas Sprague Dawley, de las cuales en cuatro de ellas se aplicó PCIAM, y una de ellas pertenece al grupo de control CT. Una vez anestesiadas se realizó protocolo de PCIAM, el cual consiste en 10 minutos de clampeo de la arteria aorta abdominal supracelíaca (tal como se indica en las imágenes 1 y 2) seguido de reperfusión multiorgánica por medio del desclampeo de la misma al completar el intervalo de tiempo estipulado, realizándose finalmente el cierre de la cavidad abdominal. Se evaluó la supervivencia de los roedores llevándose a cabo controles periódicos de variables clínicas, que incluyeron pesaje diario y valoración de signos de disconfort tales como piloerección, deshidratación, cambio en la coloración de las mucosas, presencia de secreción ocular, control de diuresis y catarsis. También se valoraron las características inherentes a la cicatriz y palpación abdominal^{.(101)}

Resultados: La supervivencia a los siete días fue del 100%. El peso promedio al inicio fue de 318 ± 34,94 gramos, habiendo presentado un descenso del mismo equivalente a \bar{x} 4,56 ± 5,9 % al sacrificio, séptimo día (Gráficos 11 y 12). En un solo animal se observó una complicación que consistió en un absceso de la pared abdominal, el cual se relaciona con la administración de medicación subcutánea.



Gráficos 11 y 12: Variación del peso corporal durante la primera semana del posoperatorio.

Conclusión: El protocolo de PCIAM es factible de aplicarse para el ensayo en ratas, afectando principalmente el peso corporal de las mismas con un leve descenso sólo durante los primeros días posoperatorios entre los distintos parámetros de seguimiento clínico evaluados, no generando un impacto negativo en la supervivencia del animal.

PCIAM asociado a IIR en hígado, intestino delgado, riñón, y útero

Introducción: A partir de la experiencia previa y la evidencia obtenida en lo referente a la viabilidad en el uso del PCIAM en ratas. Se desarrolla un diseño experimental de PCIAM que incluya un tiempo de isquemia prolongado de los órganos intraabdominales. Con el objetivo de valorar los efectos inherentes al PCIAM relacionado a la isquemia prolongada en hígado, intestino delgado, riñón, y útero.

Materiales y métodos: Para el desarrollo de esta experiencia se incluyeron 58 ratas Sprague Dawley y Wistar (peso promedio 320 gr). Se realizaron cuatro experiencias, una para cada órgano analizado: hígado, intestino delgado, riñón, y útero.

En cada etapa se establecen dos grupos para cada órgano, uno de CT (n=6) que incluye solo isquemia prolongada de un órgano sin preconditionamiento, y uno de PCIAM (n=6). El tiempo de PCIAM se mantuvo en 10 minutos de preconditionamiento asociado a 10 minutos posteriores de reperfusion multiorgánica. Se inició luego de esta el período de isquemia prolongada mediante el clampeo de la vasculatura que nutre a cada órgano. Arteria hepática y vena porta (hígado), arteria mesentérica superior (intestino delgado), ambas arterias renales (riñón), y arteria ilíaca homolateral junto con la unión entre cuerno uterino y ovario (cuerno uterino derecho) durante un período de 40 minutos de isquemia en cada caso seguido de 24 horas de reperfusion para hígado y riñón, y 1 hora de reperfusion para intestino delgado. En el caso del cuerno uterino (n=4 en cada grupo) la isquemia consistió en 30 minutos seguido de 1 hora de reperfusion, momento en que se lleva a cabo el muestreo. En relación al hígado, se evaluó además por medio de dos grupos CT (n=5) y PCIAM (n=5) los resultados con 1 hora de reperfusion del mismo, tomando muestras de ratas basales (n=4) para su comparación (Imágenes 27; 28; 29; y 30).

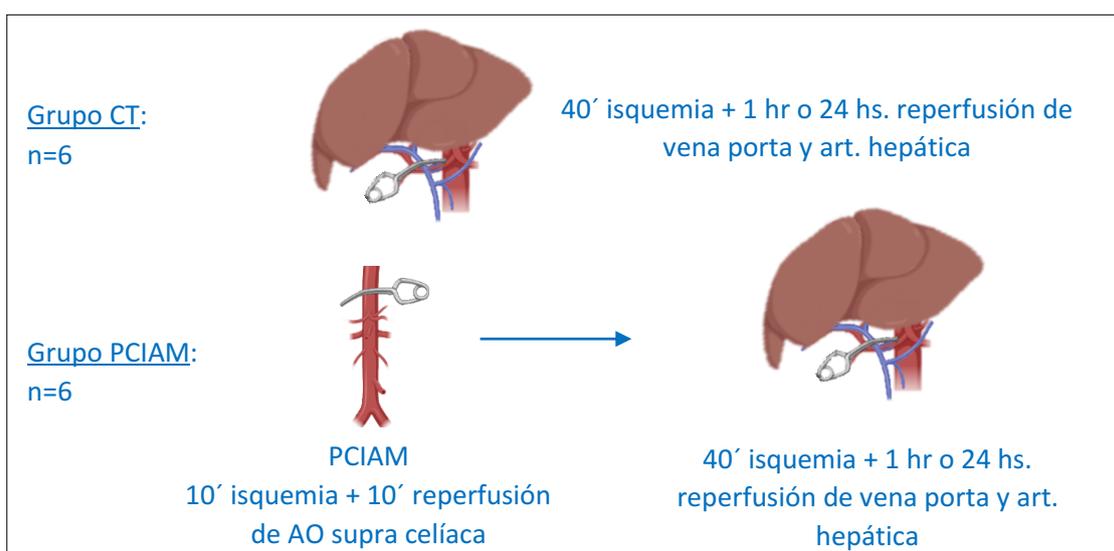


Imagen 27: Esquema de grupos CT y PCIAM en modelo de IIR de hígado.

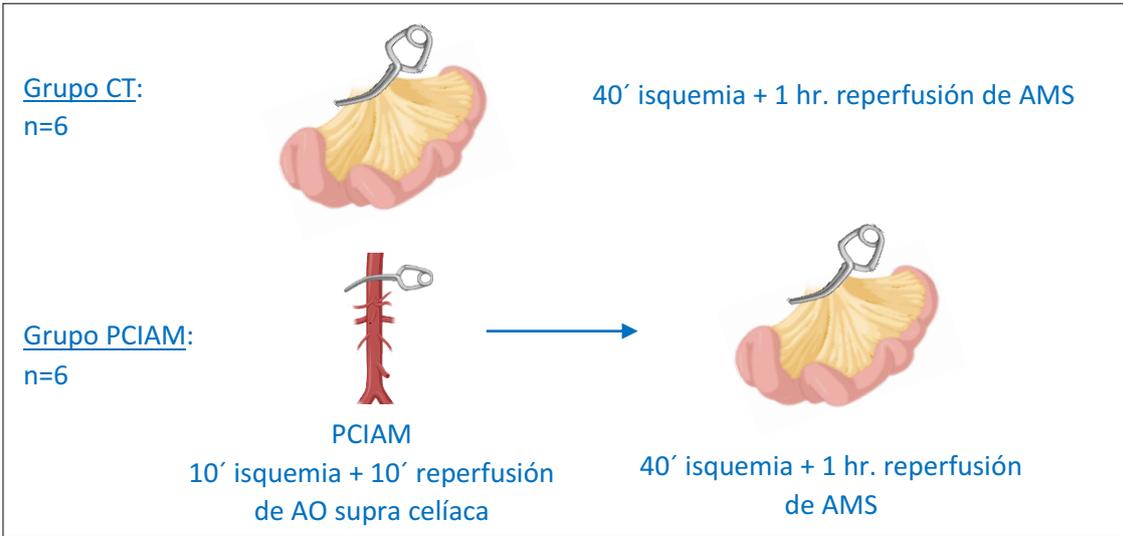


Imagen 28: Esquema de grupos CT y PCIAM en modelo de IIR de intestino delgado.

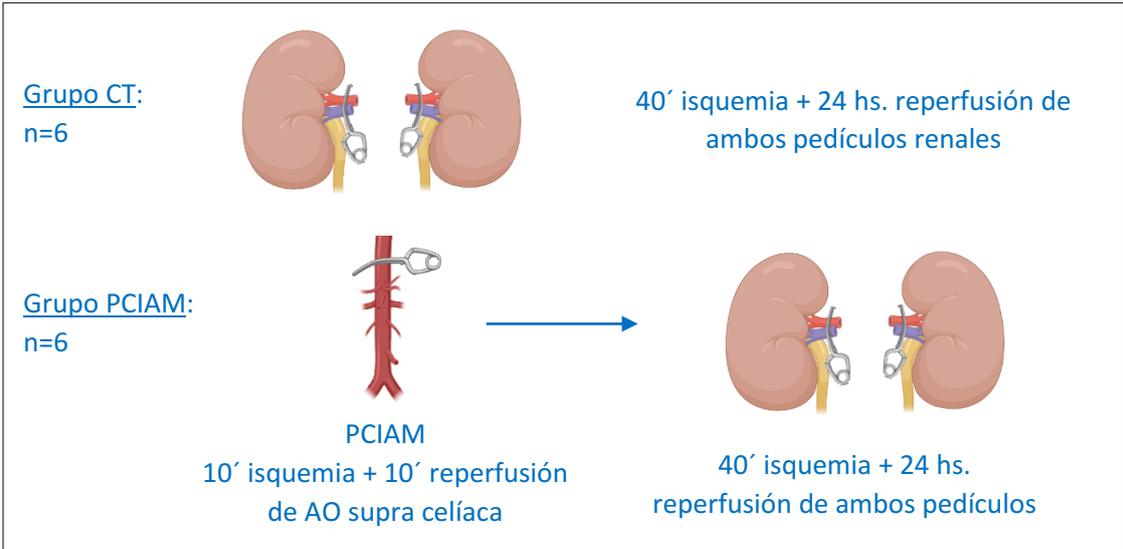


Imagen 29: Esquema de grupos CT y PCIAM en modelo de IIR renal.

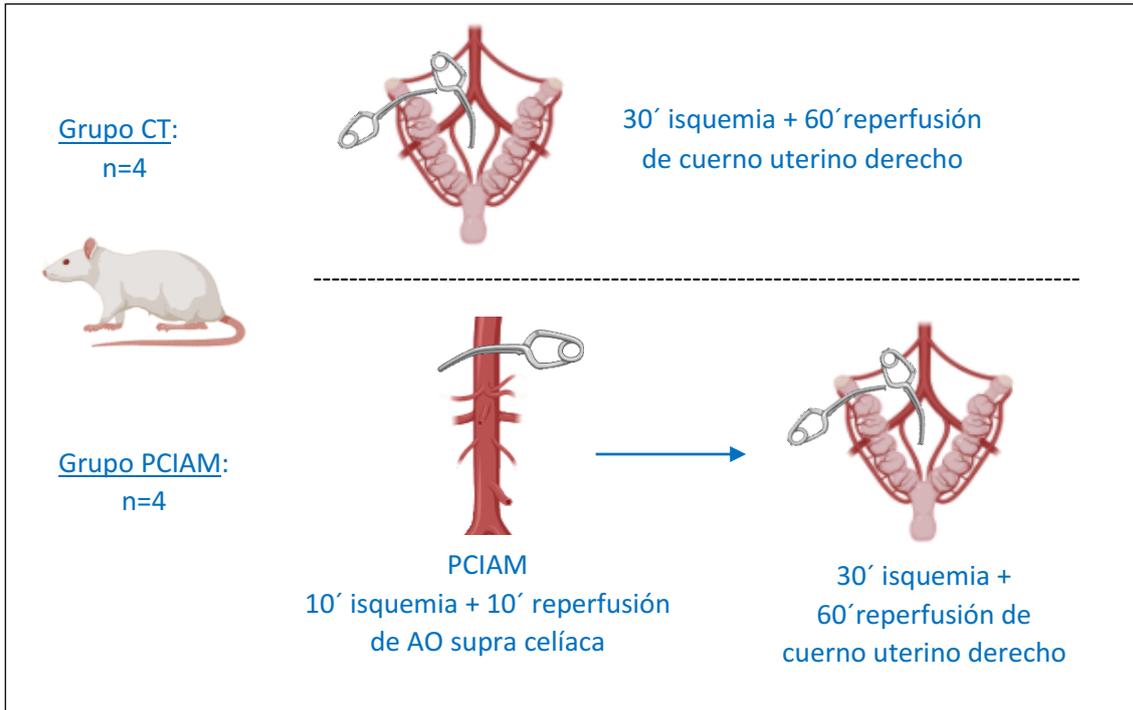


Imagen 30: Esquema de grupos CT y PCIAM en modelo de IIR de útero en rata.

Muestreo: El protocolo incluyó estudio del plasma para la determinación de fosfatasa alcalina (FAL) más transaminasas (TGO, TGP), lactato deshidrogenasa (LDH), y urea más creatinina para los grupos hepático, intestinal y renal respectivamente. Junto con muestras de tejido de cada órgano en cuestión. En el grupo hepático se obtuvieron muestras del lóbulo hepático derecho e intestino delgado (este último para evaluar daño remoto); en el grupo intestinal se tomaron biopsias de intestino delgado y pulmón (evaluación de daño remoto), en el grupo renal se realizó biopsia del riñón izquierdo en cada caso, y en el grupo de útero se tomaron muestras del cuerno uterino derecho. El daño ocasionado por la IR fue cuantificado mediante escala de Liu (hígado), score de Park/Chiu (intestino delgado), escala de Banff (riñón), y score de Sağsöz y col.⁽¹¹²⁾ (cuerno uterino). Las muestras de tejido se fijaron en formol al 10% durante aproximadamente 48 horas, luego se deshidrataron con alcohol al 70% y se tiñeron con H-E para su análisis morfológico. A su vez dentro de las muestras tisulares se incluyó la determinación bioquímica de daño por estrés oxidativo y nitrativo en hígado, intestino delgado, y riñón.

Análisis histopatológico hepático – Clasificación de Liu ⁽¹¹³⁾

Valor	Hemorragia	Infiltración neutrofilica	Necrosis celular	Cambios eosinofílicos en hepatocitos	Hepatocitos sin cohesión	Vacuolización citoplasmática	Dilatación sinusoidal
0	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
1	Leve	Leve	Con picnosis	Leve	Moderado	Leve	Leve
2	Frecuente perivenular	Dispersa en algunos lóbulos	-----	Dispersa en algunos lóbulos	Focal	Dispersa en algunos lóbulos	Frecuente perivenular
3	Frecuente perivenular (perizonal-mediozonal)	Dispersa en mayoría de lóbulos	Múltiples áreas confluentes de necrosis	Dispersa en la mayoría de los lóbulos	Multifocal	Dispersa en la mayoría de los lóbulos	Frecuente perivenular mediozonal
4	Panlobular	Extendida	Severa, parénquima viable nulo	Extendido	Extendido (severo)	Extendida (severa)	Panlobular

Análisis histopatológico intestinal – Score de Park/Chiu ^(36,37)

Park 0: Intestino normal

Park 1: Espacio subepitelial en la punta de la vellosidad

Park 2: Espacio subepitelial extendido a toda la vellosidad

Park 3: Erosión de eritrocitos

Park 4: Vellosidades denudadas

Park 5: Pérdida de vellosidades

Park 6: Infarto de criptas

Park 7: Infarto mucoso

Park 8: Infarto transmural

Análisis histopatológico renal – Clasificación de Banff ^(114–117)

- I. Ausencia de daño = 0 puntos
- II. NTA < 5% = 1 punto
- III. NTA 5-25% = 2 puntos
- IV. NTA > 25% = 3 puntos
- V. Degeneración hidrópica = 1 punto

Análisis histopatológico de cuerno uterino – Score de Sağsöz y col. ⁽¹¹²⁾

Se utilizó un score definido por Sağsöz y col. ⁽¹¹²⁾ adaptado al tejido uterino por Atalay, YO y Sahin, S. Estos evalúan: el epitelio endometrial glandular (leucocitosis, degeneración celular) y cambios en el estroma endometrial (congestión, edema) asignando un score entre 0 y 3 según la severidad de afectación (0 = sin hallazgos patológicos; 1 = hallazgos patológicos en < 33% del tejido uterino; 2 = hallazgos patológicos en 33-66% del tejido uterino; 3 = hallazgos patológicos > 66% del tejido uterino). ⁽¹¹⁸⁾

Sahin identifica dos parámetros de valoración: las características degenerativas del tejido, y su grado de afectación. ⁽¹¹⁹⁾

Características degenerativas:

- Picnosis de células glandulares
- Desprendimiento de células glandulares
- Degeneración del epitelio endometrial
- Leucocitosis estromal

Grados de afectación:

- + Presente pero trivial
- ++ Cambio mínimo
- +++ Cambio moderado
- ++++ Cambio severo

Tabla de análisis:

Muestra	Epitelio de superficie			Epitelio glandular			Estroma			Valor total
	Leucocitosis	Degeneración	Picnosis	Leucocitosis	Degeneración	Picnosis	Edema	Congestión	Infiltrado	
A	0 a 3	0 a 3	0 a 3	0 a 3	0 a 3	0 a 3	0 a 3	0 a 3	0 a 3	0 a 27
B	0 a 3	0 a 3	0 a 3	0 a 3	0 a 3	0 a 3	0 a 3	0 a 3	0 a 3	0 a 27
C	0 a 3	0 a 3	0 a 3	0 a 3	0 a 3	0 a 3	0 a 3	0 a 3	0 a 3	0 a 27
D	0 a 3	0 a 3	0 a 3	0 a 3	0 a 3	0 a 3	0 a 3	0 a 3	0 a 3	0 a 27

Estrés oxidativo y nitrativo

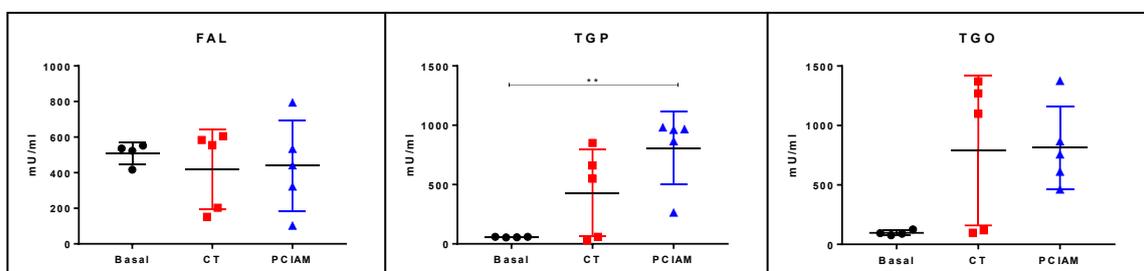
Para medir la acción oxidativa y nitrativa tisular en hígado, intestino delgado y riñón se procedió a la homogeneización de las muestras de tejido y luego este mismo se centrifugó para eliminar posibles gránulos, empleándose el sobrenadante que fue dividido en alícuotas para su posterior medición.

La determinación que se llevó a cabo fue la de proteínas totales, mediante el método de Lowry y cols.⁽¹²⁰⁾ Este es un método colorimétrico de valoración, basado en dos reacciones químicas: la primera es la unión de los iones de cobre de las proteínas de la muestra en condiciones alcalinas, los cuales forman un complejo con los enlaces peptídicos; la segunda es la reducción del reactivo de Folin-Ciocalteu por el complejo cobre-enlace peptídico, que da lugar a la formación de un compuesto coloreado, absorbible a 750 nm. Posteriormente, a través de una curva de calibrado realizada con albúmina sérica bovina (BSA) como patrón, y por interpolación de los valores de absorbancia, se obtiene la concentración de proteína de la muestra problema.

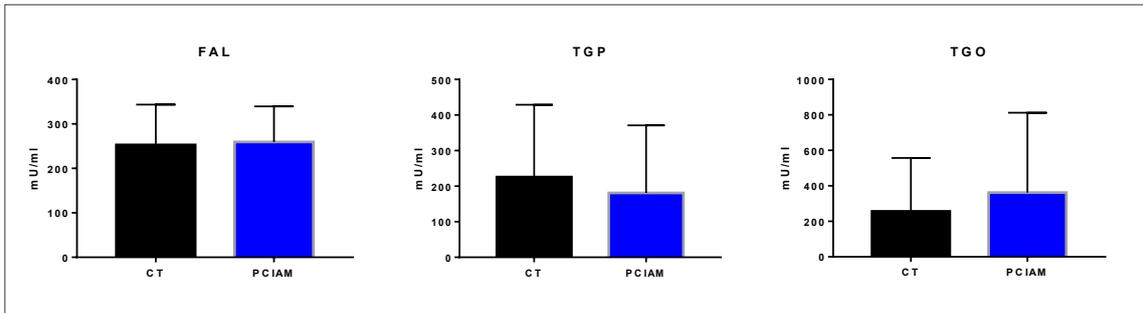
El procedimiento consiste en preparar una solución madre de albúmina bovina de concentración igual a 0,5 mg/ml. A continuación, en tubos de ensayo se mezclan 745 µl de reactivo C con 5 µl de homogeneizado de la muestra de tejido (hígado, intestino delgado, o riñón de rata), y se deja reposar durante 15 – 20 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se añade el segundo reactivo (formado por 75 µl de reactivo de Folin y de agua destilada) a los tubos, se agitan y se incuban durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se procede a la lectura de las absorbancias frente al blanco en espectrofotómetro a 750 nm.⁽¹²⁰⁾

Análisis estadístico: El análisis estadístico fue realizado de la misma forma en que fue descrito anteriormente.

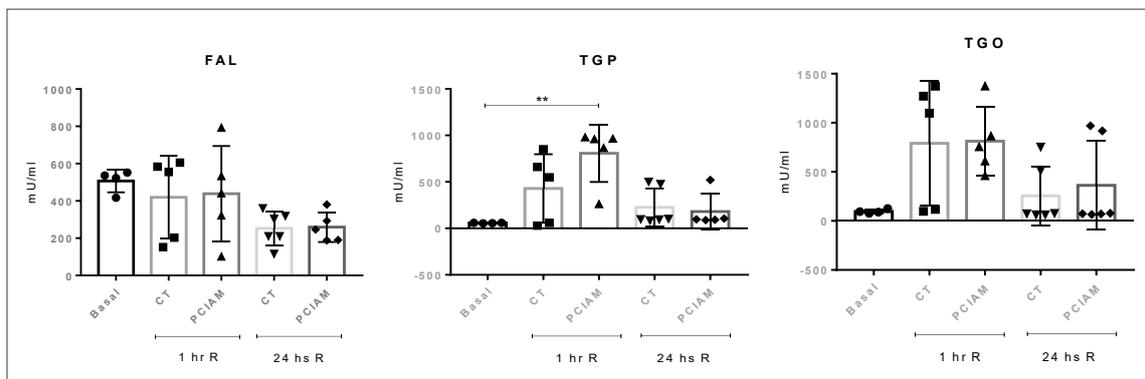
Resultados: En hígado, con una hora de reperfusión, las enzimas hepáticas en los grupos CT y PCIAM alcanzaron valores superiores con respecto al grupo de 24 horas de reperfusión. Se observaron valores estadísticamente significativos ($P < .05$) en TGP con relación a los basales. No se hallaron diferencias significativas al comparar CT y PCIAM en esta serie (Gráficos 13-15). Con 24 horas de reperfusión hepática, los valores séricos de enzimas hepáticas fueron similares en ambos grupos, con un leve aumento de la TGO en PCIAM (Gráficos 16-18). Respecto a intestino delgado el grupo PCIAM presentó valores elevados de LDH con relación al CT, mientras que en riñón los valores de urea y creatinina fueron ligeramente inferiores en el grupo tratado con PCIAM. Sin embargo, en ningún caso los valores reflejados fueron estadísticamente significativos (Gráficos 22-24). Los resultados de absorbancia en espectrofotómetro demuestran un mayor nivel de estrés tisular en los grupos CT tanto en hígado como en riñón; en este último se obtuvo un $\bar{X}=0,82 \pm 0,36$ (CT) y $\bar{X}=0,56 \pm 0,21$ (PCIAM) resultando estos valores comparativos estadísticamente significativos ($p < .05$). En intestino delgado no se hallaron diferencias en los valores de estrés oxidativo y nitrativo (Gráficos 25-27). En el análisis histopatológico realizado a una hora post IR se observó un score de Liu $\bar{X}= 3 \pm 1,4$ en CT y $\bar{X}= 2,8 \pm 1,3$ para PCIAM que aumenta en el grupo CT y disminuye en el grupo PCIAM al compararlo con los resultados obtenidos a las 24 horas post reperfusión: $\bar{X}=7,66 \pm 8,3$ (CT) y $\bar{X}=0,83 \pm 0,75$ (PCIAM), presentando en este caso significancia estadística ($p < .05$); en intestino delgado el grupo CT obtuvo un score de Park/Chiu $\bar{X}=2 \pm 2,3$ mientras que el grupo PCIAM presentó un Park $\bar{X}=1,5 \pm 1,6$; en riñón el score de Banff en el grupo CT alcanzó $\bar{X}=2 \pm 1,52$ con un score $\bar{X}=1,14 \pm 0,89$ para el grupo PCIAM (Gráficos 28-30). Al valorar el grado de injuria remota estudiado en intestino delgado para el grupo hepático, así como en pulmón para el grupo intestinal, no se observó daño evidenciable en el análisis histopatológico de dichos órganos tanto en los grupos CT como en los grupos PCIAM. El Score de Sagsöz modificado obtenido en las muestras de útero de ambos grupos arrojó una mínima tendencia a la protección con PCIAM ($\bar{X} 12,5 \pm 2,38$) con relación al CT ($\bar{X} 13,75 \pm 2,21$) sin obtenerse una diferencia estadísticamente significativa (Gráfico 31). Las principales alteraciones en el CT incluyeron la presencia de leucocitos y abundante edema tanto en el epitelio de superficie, que produce zonas de descamación, como en el epitelio glandular asociado con edema y congestión estromal. El grupo PCIAM presenta mínima o nula presencia de leucocitos tanto en epitelio de revestimiento como en el glandular. Los principales hallazgos en este caso incluyen degeneración del epitelio de revestimiento y edema e infiltrado del estroma.



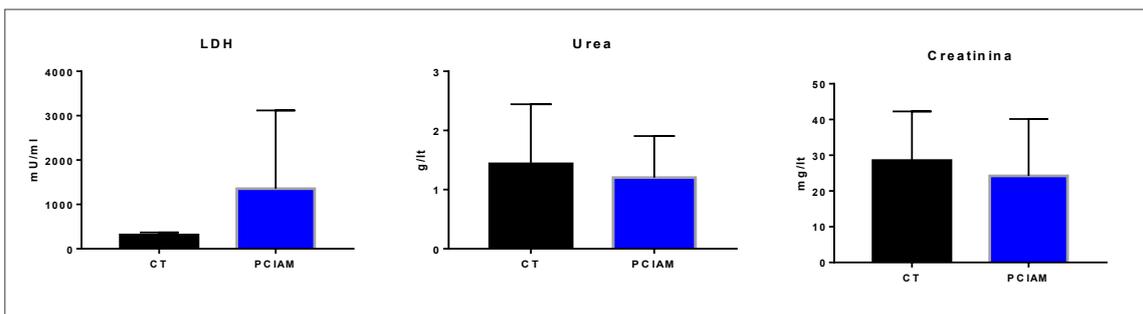
Gráficos 13; 14; y 15: Determinaciones plasmáticas de FAL, TGP, y TGO en grupos CT y PCIAM con 40 minutos de isquemia asociado a una hora de reperfusión hepática comparados al basal.



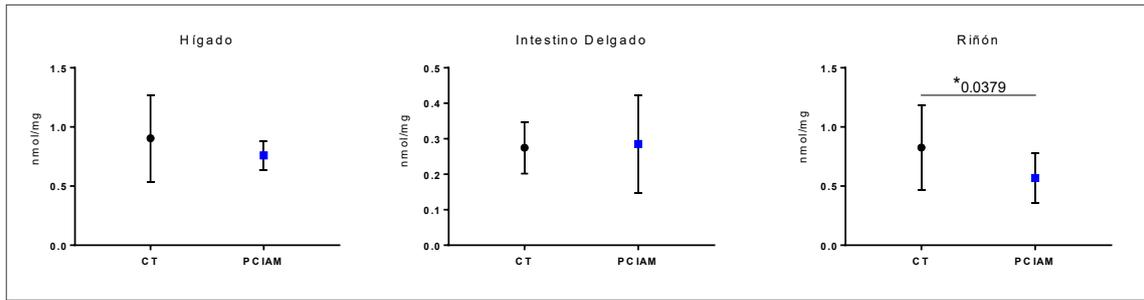
Gráficos 16; 17; y 18: Determinaciones plasmáticas de FAL, TGP, y TGO en grupos CT y PCIAM con 40 minutos de ischemia asociado a 24 horas de reperfusion hepática.



Gráficos 19; 20; y 21: Comparativo de determinaciones plasmáticas de FAL, TGP, y TGO en grupos hepáticos basales; junto a CT y PCIAM con 40 minutos de ischemia asociado a 1 o 24 horas de reperfusion (R).



Gráficos 22; 23; y 24: Resultado de determinaciones plasmáticas de lactato deshidrogenasa (LDH), urea y creatinina.



Gráficos 25; 26; y 27: Resultados de valores de absorbancia en muestras de hígado, intestino delgado, y riñón al momento del muestreo, medidos en espectrofotómetro a 750 nm. (* $p < .05$)

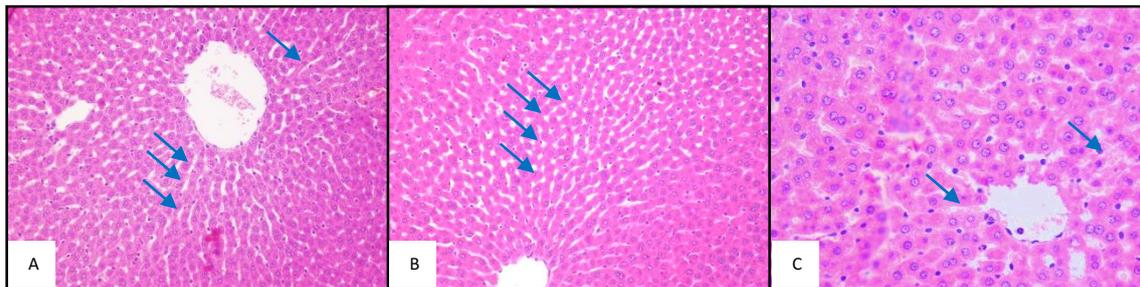


Imagen 31: Dilatación sinusoidal (A, B) y leve vacuolización (C) en muestras histopatológicas de hígado. (H-E, Obj. 20x, 10x, 40x)



Imagen 32: Ausencia de lesión (A), edema subepitelial (B), y vellosidades denudadas (C) en muestras histopatológicas de intestino delgado. (H-E, Obj. 20x, 10x, 40x)

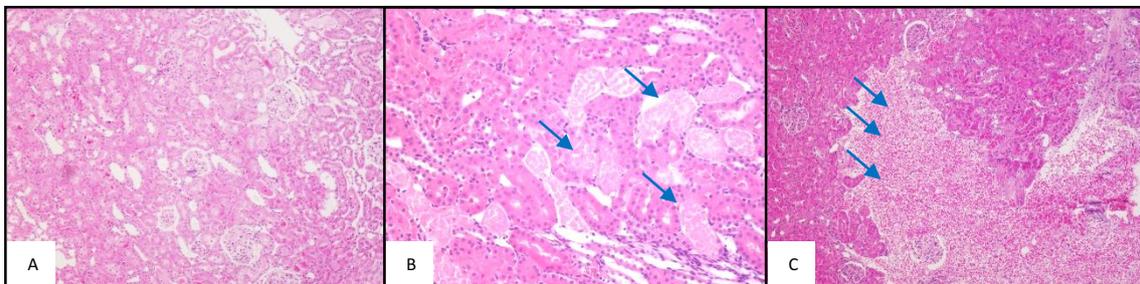


Imagen 33: Ausencia de lesión (A), necrosis tubular focal (B), y hemorragia (C) en muestras histopatológicas de riñón. (H-E, Obj. 20x, 40x, 20x)

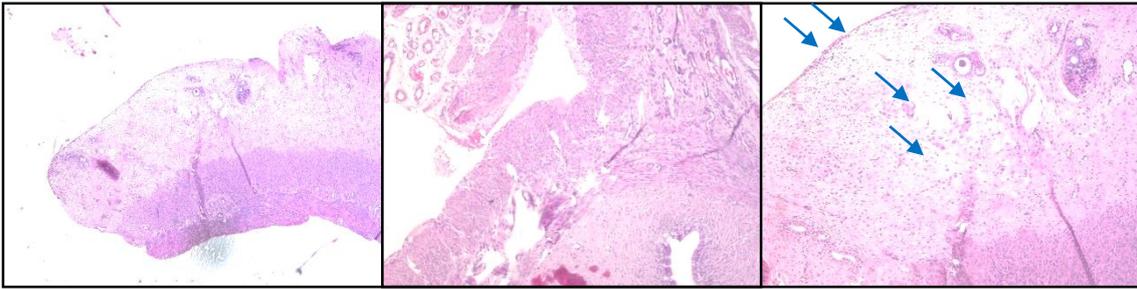
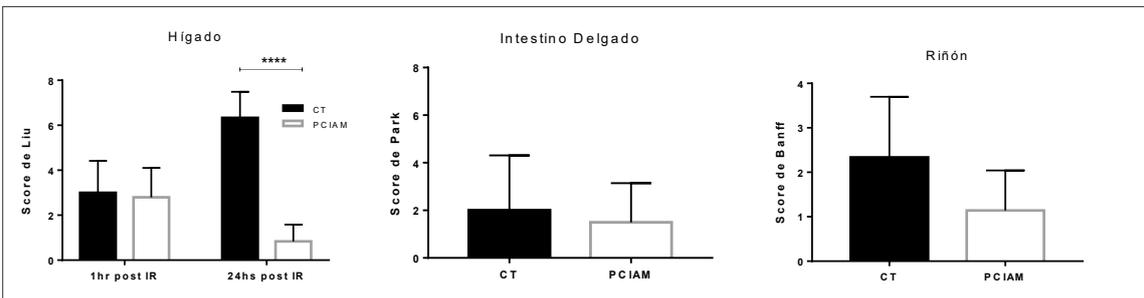


Imagen 34: Degeneración severa del epitelio de revestimiento y epitelio glandular con moderado edema y severo infiltrado estromal en muestra histopatológica de cuerno uterino. (H-E, Obj. 10x, 20x, 20x)



Gráficos 28; 29; y 30: Resultados de scores histopatológicos en muestras de tejido hepático, intestinal y renal respectivamente, comparando grupos CT y PCIAM en cada caso.

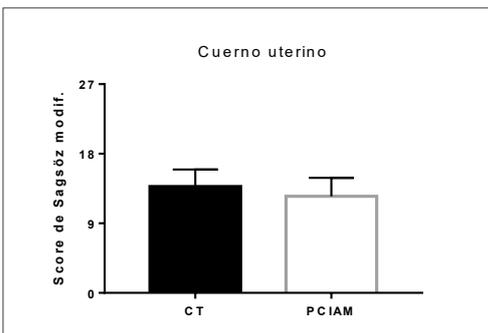


Gráfico 31: Resultado de score de Sağsöz modificado en muestras de grupos CT y PCIAM de cuerno uterino.

Conclusiones: El PCIAM asociado a un período de IR prolongado presenta resultados disímiles al comparar los marcadores sanguíneos de IIR, los valores de absorbancia, y la histopatología en hígado, intestino delgado y riñón. La comparación de estos tres parámetros de lesión del órgano en estudio nos demuestra la falta de resultados claros en cuanto a protección o daño vinculado al intestino delgado, un indicio de protección con el PCIAM en los resultados de absorbancia e histopatología relacionado al hígado, y una consistente protección del PCIAM de todos los parámetros estudiados a nivel renal. A pesar de no obtenerse resultados estadísticamente significativos en cuanto al efecto del PCIAM y su relación a la disminución de la IIR uterina, se observó una tendencia a la protección al analizar los cambios histopatológicos del mismo.

PCIAM asociado a trasplante renal heterotópico aislado

Introducción: Los resultados de las experiencias del empleo de PCIAM asociado a la isquemia prolongada de órganos sólidos intraabdominales ha demostrado un beneficio claro en la aplicación del mismo para el grupo renal. Sin embargo, en el resto de los órganos (hígado, intestino delgado y cuerno uterino) no se han obtenido los mismos resultados, aunque se ha observado que estos infieren una tendencia hacia la protección, sumado a que en ninguno de ellos se demostró mayor daño por el empleo de PCIAM. Por lo que se decide continuar con el estudio de PCIAM aplicado al trasplante de riñón.

Objetivo: Evaluar los efectos de PCIAM asociado al trasplante heterotópico aislado de riñón en ratas.

Materiales y métodos: Se emplearon 6 ratas Sprague Dawley machos (peso 283 ± 37 gr). Estas fueron divididas en dos grupos, uno CT (n=3) a las que se les realizó el trasplante renal heterotópico aislado sin tratamiento y otro grupo PCIAM (n=3) que incluyó el preconditionamiento multiorgánico aplicado al donante (10 minutos de isquemia seguidos de 10 minutos de reperfusión) previo a la extracción del riñón izquierdo, el cual luego fue implantado en el animal receptor del mismo modo que en el grupo control. A los animales receptores se les realiza la nefrectomía bilateral previa al trasplante renal.

Todo lo relacionado al cuidado de los animales, así como el tipo de analgesia y anestesia fue similar a los modelos anteriores. Tanto el donante como el receptor tuvieron agua y alimento a demanda.

El sacrificio y toma de muestra del receptor se realizó a las 24 horas de realizado el trasplante.

Muestreo y análisis: En el donante el riñón izquierdo es ablacionado para el implante, mientras que se tomaron muestras del riñón derecho. En el receptor previo al trasplante se realiza la nefrectomía bilateral y se toman muestras de ambos riñones nativos. Estas muestras renales conforman el grupo basal.

A las 24 horas post implante se biopsia el riñón trasplantado y se realiza extracción de sangre con heparina. Esta se procesa a fin de obtener plasma para el estudio de urea, creatinina y LDH.

Las muestras de tejido se procesan para análisis de estrés oxidativo, expresión de genes por método qPCR y el análisis histopatológico mediante el Score de Banff.

Cuantificación de la expresión de genes

Extracción de RNA a partir de tejido:

Para la extracción de RNA se utilizó el kit Illustra™ RNAspin mini RNA Isolation Kit. 0.5 cm (aprox.) de tejido se suspendieron en una solución de lisis y β -mercaptoetanol y se homogenizaron completamente por acción mecánica. El homogenato obtenido se filtró en filtro RNA spin y se centrifugó 1 minuto a 11000g. Se adicionó al tubo colector etanol 70% y se agitó en agitador vortex. Se transfirió la muestra a una columna RNA spin dentro de un tubo colector y se centrifugó 30 segundos a 8000g. Se agregó desalting buffer y se centrifugó 1 minuto a 11000g. Luego se trató a la muestra con DNAsa I y se incubó 15 minutos a temperatura ambiente.

Una vez transcurrido este tiempo, se adicionó el buffer de lavado I, se centrifugó 1 minuto a 11000g y se transfirió a un nuevo tubo. Se adicionó buffer de lavado II, se centrifugó 1 minuto a 11000g y se descartó el sobrenadante. Se repitió este paso con centrifugación de 2 minutos a 11000g.

Se transfirió la columna RNA spin a un microtubo de centrifuga libre de RNAsas. Se agregó agua libre de RNAsas para diluir el RNA retenido en la columna RNA spin y se centrifugó 1 minuto a 11000g.

Medida de concentración de RNA por muestra para posterior RT-PCR:

En una placa del equipo Varioskan Lux® se agregaron 2uL de cada muestra, para medir su concentración (ng/uL). Se estandarizó el agregado de RNA para su posterior ensayo, en base a la que presentó menor concentración.

Obtención de cDNA por RT-PCR:

En tubos libres de RNAsa se agregó 1µL de Random Primers y 11µL del RNA obtenido de la muestra. Se incubaron en termociclador Techne® a 70°C por 10 minutos y luego se llevó a 4°C.

Una vez transcurrida la incubación, se adicionaron 8uL de una premix que contenía DTT 0.1 M (1.5 µL), RNase OUTTM Recombinant 40 U/uL (0.5 µL), Retrotranscriptasa del Virus de la Leucemia Murina 200 U/uL (1 µL), desoxirribonucleótidos trifosfato 10X (1 µL) y First Standar Buffer 5X (4 µL). Las muestras fueron procesadas en termociclador Techne®.

Todos los reactivos utilizados en la obtención de cDNA pertenecen al kit de Invitrogen®.

GEN	FOWARD PRIMER	REVERSE PRIMER
β-Actina	5'-ACAACCTTCTTGCAGCTCCTC-3'	5'-CTGACCCATACCCACCATCAC-3'
CXCL10	5'-CTGCACCTGCATCGACTTCC-3'	5'-TTCTTTGGCTCACCGCTTTC-3'
IL-6	5'-CTGATTGTATGAACAGCGATG-3'	5'-GAACTCCAGAAGACCAGAGC-3'
TNFa	5'-CCACCAAGCGGAGGAGCAGC-3'	5'-TCGGCTGACGGTGTGGGTGA-3'

Análisis de datos:

En base a los valores de Ct arrojados por el programa, se analizaron los niveles de expresión por el método "2^{-ΔCt}". Los valores de Ct se traducen en número de ciclos necesarios para superar el threshold (el valor umbral). Lo primero que se hace es calcular la diferencia relativa entre el gen de interés (el que se esté analizando) y el housekeeping (debe ser un gen que se exprese de manera constitutiva, en este caso B-actina).

$$\Delta Ct = Ct (\text{gene of interest}) - Ct (\text{housekeeping gene})$$

Luego se calcula 2^{-ΔCt} para cada muestra, y a ese valor se lo divide por el promedio de los ΔCt del grupo control (en este caso se comparó con el basal). La lectura del resultado consiste en cuántas veces más se expresó el gen de interés con respecto al de B-actina, normalizado por la expresión del mismo gen en el grupo control. (Gráficos 37-39)

Indicadores de estrés oxidativo

Para la determinación de estrés oxidativo se evaluaron sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS); carbonilos proteicos (CPs), y la actividad reductora férrica del plasma (FRAP).⁽¹²¹⁾

Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) ⁽¹²²⁾

Fundamento: Esta técnica se basa en la reacción del ácido tiobarbitúrico con productos secundarios de la peroxidación lipídica, tales como el malondialdehído (MDA), 4-hidroxihexanal y 4-hidroxinonal, para formar aductos de color rosado que pueden ser leídos en un espectrofotómetro a una DO de 532 nm.

Procedimiento: Se tomaron alícuotas que se diluyeron con PBS a un volumen final de 200 μ L. Luego se adicionaron 200 μ L de SDS al 8.10 % y se agitó teniendo cuidado de no hacer excesiva espuma. A continuación, se añadieron 1.5 mL de buffer acético/acetato 100 mM (pH 3.50), 1.5 mL de TBA al 0.8 % y 600 μ L de agua bidestilada. Las muestras fueron incubadas a 95°C durante 60 minutos. Pasado este tiempo se dejaron enfriar y se les agregó 1 mL de agua bidestilada y 3 mL de alcohol isobutílico agitando vigorosamente en shaker. La fase orgánica se leyó en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 532 nm. Para determinar las concentraciones de TBARS en las muestras problema, se realizó una curva de calibración utilizando como testigo una solución comercial de MDA (bis-dimetil-acetal o 1,1,3',3'-tetrametoxipropano) en el rango de concentraciones 4.5 a 36.0 nmoles de MDA/tubo.

Carbonilos proteicos (CPs) ⁽¹²³⁾

Fundamento: Esta técnica detecta la formación de grupos carbonilos u “oxo” que se forman en las proteínas debido a la oxidación de los aminoácidos de las cadenas laterales por ROS. Estos carbonilos reaccionan con la 2,4-dinitrofenilhidracina (2,4-DNPH) para formar dinitrofenilhidrazonas de color caoba que pueden ser leídas por espectrofotometría.

Procedimiento : Alícuotas apropiadas de las muestras se llevaron a volumen final 1.5 mL con PBS. Se agregaron 1.5 mL de DNPH (2,4-dinitrofenilhidrazina) 10 mM en HCl 2 N y se incubaron las muestras en oscuridad durante 30 minutos a temperatura ambiente. Al finalizar la incubación, se agregó a cada tubo 2 mL de una solución de NaOH 2 N y 1 mL de etanol absoluto para evitar la turbidez debida a restos de proteína desnaturalizada. Luego de cada agregado se agitó de inmediato en vortex. De esta manera se obtuvieron complejos de color caoba que se leyeron a 505 nm en el espectrofotómetro Cintra-20.

La curva de calibración se efectuó utilizando una solución standard de piruvato de sodio 2.30 mM, empleando alícuotas entre 40 y 100 μ L.

Ensayo FRAP ^(124,125)

Fundamento: A pH ácido se puede determinar la habilidad de cualquier líquido biológico para reducir iones férricos a ferrosos. Esto se puede cuantificar colorimétricamente por formación de

un complejo (cromóforo) entre el hierro ferroso y la tripiridil-triacina (TPZ) de intenso color azul con un pico de absorción a los 583 nm. Se trata de una reacción no específica que tiene en cuenta todos los componentes con capacidad reductora (bilirrubina, ácido úrico, vitámeros, etc.).

Procedimiento: Se tomaron 3 mL de la solución reactivo de trabajo compuesta por buffer acético/acetato 300 mM (pH 3.60), solución de TPZ 10 mM (Sigma) en HCl 40 mM y solución de cloruro férrico 20 mM (Mallinckrodt, USA) mezcladas en proporción 83: 8.5: 8.5, respectivamente. A 3 mL de este reactivo dispensado en una cubeta de 1 cm de paso de luz y termostatizada a 25 ° C, se le agregaron 100 µL de muestra. Tras la mezcla inmediata por inversión se obtuvieron los datos de DO (583 nm) vs tiempo durante 4 minutos mediante registro continuo. De cada curva se calculó la pendiente (velocidad) de incremento de DO y se la comparó con la pendiente obtenida para un plasma standard (Sigma) cuya capacidad antioxidante resultaba conocida. A su vez, el valor de FRAP de esta muestra de referencia se determinó por calibración con una solución comercial de concentración conocida de Trolox® (diacetato de α-tocoferol). Las muestras ensayadas para FRAP se trataron previamente con solución de uricasa en exceso disuelta en buffer fosfato 300 mM/glicerol 20 mM (pH 7.40) de forma tal de asegurar la destrucción total del ácido úrico presente, el cual contribuye significativamente al poder antioxidante. De esta manera se pudo cuantificar al resto de los antioxidantes biológicamente activos sin la interferencia de este compuesto endógeno.

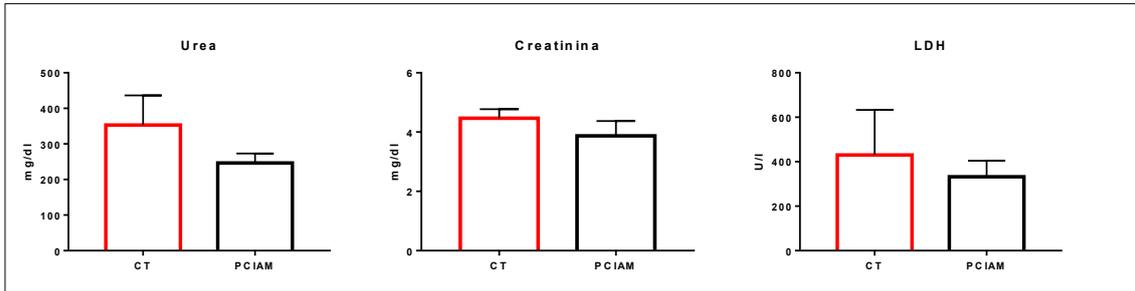
Análisis de componentes principales

El conjunto de datos obtenidos de las variables de análisis se representó en un gráfico multidimensional en el que objetos similares se encuentran cerca unos de otros y se agrupan. Se incluyen las variables de análisis representadas en vectores los cuales se representan en relación a los grupos de estudio.⁽¹²⁶⁾

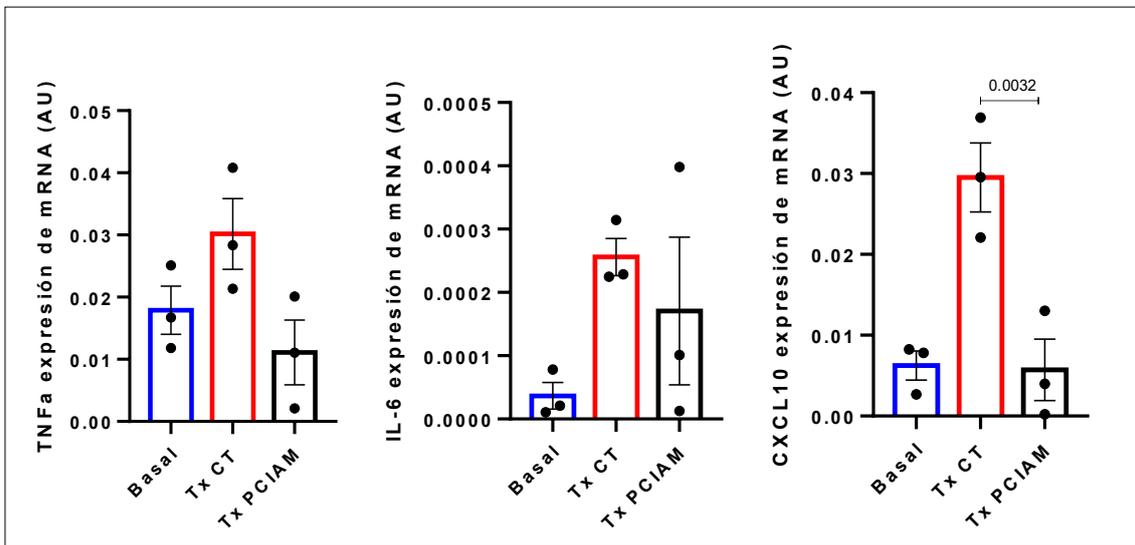
Análisis estadístico: El análisis estadístico fue realizado de la misma forma en que fue descrito en los diseños experimentales previos.

Resultados: Los análisis de sangre para determinar urea, creatinina y LDH no arrojaron diferencias significativas, sin embargo, existe una tendencia clara en beneficio del grupo tratado con PCIAM (Urea: \bar{X} 353 ± 82 mg/dl para el CT y \bar{X} 246 ± 26 mg/dl para PCIAM; creatinina: \bar{X} 4,47 ± 0,36 mg/dl para el CT y \bar{X} 3,87 ± 0,5 mg/dl para PCIAM; LDH: \bar{X} 430 ± 202 U/l para el CT y \bar{X} 332 ± 72 U/l para PCIAM) (Gráficos 32-34). Resultados beneficiosos para PCIAM se observan al analizar la expresión de genes, tanto TNFα como IL6 y CXCL10 aumentan sus valores en el grupo CT con respecto al basal, con disminución de los mismos al compararlo con el grupo PCIAM. CXCL10 presentó significancia estadística (p<.05) con un valor \bar{X} 0,0062 ± 0,0031 AU para el basal, \bar{X} 0,295 ± 0,0074 AU para el CT y \bar{X} 0,0057 ± 0,0065 AU para el grupo PCIAM en este caso.(Gráficos 35-37) Los indicadores de estrés oxidativo FRAP, TBARS, y CPs presentan valores similares entre los grupos CT y PCIAM. Se destaca una disminución de TBARS en el grupo PCIAM con significancia estadística (p<.05) entre grupos CT vs. basal, y grupo CT vs. PCIAM (\bar{X} 2,13 ± 0,16 nmol/µg para el basal, \bar{X} 2,93 ± 0,08 nmol/µg para CT; y \bar{X} 2,49 ± 0,23 nmol/µg para PCIAM). (Gráficos 38-40) El análisis histopatológico con tinción de H-E demuestra un

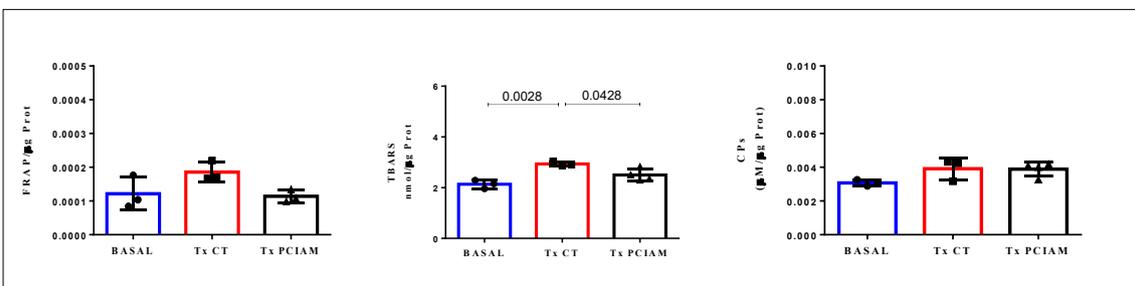
aumento en el score de Banff en el grupo CT \bar{X} 1,66 \pm 0,57 en relación al basal (score = 0), con un menor score en PCIAM (score = 1) en relación al CT. (Gráfico 41)



Gráficos 32; 33; y 34: Determinaciones de urea, creatinina y LDH en muestras de plasma de grupos CT y PCIAM con trasplante renal heterotópico.



Gráficos 35; 36; y 37: Determinaciones de ARNm (TNFalfa, IL-6, CXCL10) en muestras de riñón de grupos basal, CT y PCIAM en ratas con trasplante renal heterotópico (Tx).



Gráficos 38; 39; y 40: Determinación de FRAP; TBARS; y CPs de grupos basal, CT y PCIAM en ratas con trasplante renal heterotópico.

Discusión

Desde el advenimiento del trasplante como terapéutica a la insuficiencia terminal de un órgano o tejido, considerado el milagro del siglo XX, se han realizado avances significativos en la aplicación de dicho tratamiento. No obstante, actualmente sigue siendo preocupante la cantidad de pacientes en lista de espera. Los órganos procurados no alcanzan a subsanar esta notoria diferencia.^(127,128) Así, todo esfuerzo en incrementar la donación efectiva de órganos redundaría en beneficios concretos para los pacientes. El desarrollo de la presente tesis se enmarca en el concepto de investigación para la salud e intenta brindar información sobre una posible estrategia que permita mejorar la calidad de los órganos abdominales aumentando su procuración. El fenómeno denominado injuria por isquemia-reperfusión (IIR) es inherente a todos los procedimientos de trasplante tal como se ha descrito en la introducción del tema de investigación. Los efectos deletéreos capaces de afectar la funcionalidad del órgano sólido trasplantado instaron al estudio y a la búsqueda de la comprensión de los procesos orgánicos que involucran a la extracción e implante de órganos, a fin de implementar todas las estrategias posibles para atenuar el daño generado por la IIR. El empleo de soluciones de preservación, la hipotermia y el uso de diversos fármacos son algunos ejemplos. De este modo también, se ha investigado una estrategia quirúrgica para atenuar dicho fenómeno denominada preconditionamiento isquémico (PCI) y su efecto en cada órgano sólido abdominal individualmente. Los resultados en este sentido han sido alentadores pues afirman que el PCI confiere protección ante IIR. No obstante, sólo se ha estudiado preconditionando a los órganos en forma individual, es decir en su pedículo vascular nutricio directamente.^(3-8,129)

La técnica quirúrgica innovadora que planteamos y sentó las bases del desarrollo de la presente tesis la denominamos preconditionamiento isquémico abdominal multiorgánico (PCIAM) y permitiría unificar el tratamiento al conjunto de órganos intraabdominales procurados, de modo que su aplicación en la clínica al momento de la extracción sería altamente factible. Este ha demostrado ser bien tolerado por los animales en estudio cuando se realiza 10 minutos de isquemia seguidos de 10 minutos de reperfusión en el origen de la arteria aorta abdominal. El PCIAM como estrategia atenuante de la IIR ha arrojado resultados alentadores tanto en hígado, intestino delgado, riñones y útero en concordancia con lo afirmado por otros autores que testearon el PCI de manera individual en cada órgano evaluado.^(3-8,129) En nuestros resultados se ha destacado un beneficio claro a nivel renal, con datos serológicos e histológicos objetivos que demuestran protección del órgano. Incluir un grupo de ratas hembra ha permitido evaluar esta estrategia en el tejido uterino. A pesar de no obtener resultados estadísticamente significativos en cuanto al efecto del PCIAM y su relación a la disminución de la IIR uterina, se observó una tendencia a la protección al analizar los cambios histopatológicos del mismo. Esta tendencia a la protección es un hallazgo muy importante que no contraindicaría la extracción uterina en donantes con criterios neurológico de muerte si se aplicara PCIAM previamente a la extracción multiorgánica.

Los resultados de la asociación de PCIAM en el donante renal heterotópico aislado en ratas confirma el beneficio de su uso como atenuante de la IIR al observar la mejoría de los parámetros vinculados al funcionamiento del injerto renal.

Durante el desarrollo del presente trabajo hemos buscado además ampliar el conocimiento del PCI en el tejido intestinal. A tal fin hemos incluido la técnica de BK imprescindible para realizar

biopsias seriadas del intestino sin significar la muerte del animal de experimentación en cada muestreo. El compromiso en reducir el uso de animales de laboratorio es una obligación ética que incumbe a los investigadores. Por ello el concepto de las 3´Rs (reemplazo, reducción y refinamiento) tiene una destacada vigencia. La puesta a punto de la técnica de BK en ratas nos ha permitido lograr una reducción en el uso de las mismas y un cierto grado de refinamiento aplicable al estudio de patologías intestinales en ellas. Ya que, de esta forma, es posible obtener múltiples biopsias de intestino a partir de un solo animal sin afectar significativamente su estado clínico. Cabe destacar que el tejido intestinal carece de marcadores séricos de daño situación que demanda la realización de biopsias para determinar su funcionalidad.

Los animales sujetos a la técnica Santulli tuvieron una considerable pérdida de peso y deterioro significativo de su score clínico (valor ≥ 4 en todos los casos), razón por la cual se decidió aplicar el criterio de punto final humanitario alcanzando una N=3 en lugar de 5. Estos resultados sugieren que se debe tener en cuenta el asa derivada exteriorizada por medio de la ostomía, debido a que la modificación del tránsito intestinal en Santulli repercute en el animal manifestándose en una pérdida excesiva de contenido yeyunal, y por ende en su deterioro clínico.

Al estudiar la IIR con clampeo selectivo del asa derivada en BK nos permitió obtener hasta cuatro muestras seriadas del mismo órgano, cuando en los artículos publicados sobre el estudio de IIR intestinal requieren de un animal por muestra, logrando en este caso una reducción significativa en el uso de animales (75%). Mientras que la posibilidad de aplicar tratamientos intraluminales a través de la ostomía, como en el caso del TNBS, sin producir cambios sustanciales en las condiciones clínicas generales del animal significan a su vez cierto grado de refinamiento.

La técnica de BK es aplicable a intestino grueso para el estudio de protocolos con administración de fármacos intraluminales y su análisis histopatológico por medio de biopsias seriadas a través de la ostomía. De este modo, similar a intestino delgado, es posible la obtención de múltiples biopsias de intestino. Este modelo permite el estudio de patologías inflamatorias del colon en forma localizada, evitando un grado de afectación intestinal y sistémico mayor. Por lo tanto, la técnica de BK significa una reducción y refinamiento en el uso de animales de laboratorio. La reducción en el uso de animales en este caso fue de un 66,6%.

Del recorrido del presente trabajo se desprende que el PCIAM aplicado en el origen de la arteria aorta abdominal confiere protección ante la IIR de órganos abdominales, particularmente significativa en riñón e hígado, órganos que mayormente se procuran en las donaciones multiorgánicas. Es una técnica factible de ser aplicada en roedores para el estudio de la atenuación de la IIR y se ha podido evaluar su efecto en modelos de isquemia tibia, de trasplante experimental renal y BK. Basados en los resultados consideramos que la técnica de PCIAM podría ser cuidadosamente extrapolable a la clínica luego de completar las correspondientes etapas de investigación traslacional y ahondar más aún en detalles mecanísticos.

Abreviaturas

AA: Aorta abdominal
AMS: Arteria mesentérica superior
AO: Aorta
ATP: Adenosin trifosfato
BK: Bishop-Koop
BSA: Albúmina sérica bovina
CPs: Carbonilos proteicos
CT: Grupo control
FRAP: Actividad reductora férrica del plasma
HAI: Índice de actividad histopatológica
H-E: Hematoxilina-eosina
H₂O₂: Peróxido de hidrógeno
ID: Intestino delgado
IG: Intestino grueso
IIR: Injuria por isquemia-reperfusión
IMA: Isquemia mesentérica aguda
IR: Isquemia-reperfusión
IRA: Injuria renal aguda
LDH: Lactato deshidrogenasa
NO: Óxido nítrico
NTA: Necrosis tubular aguda
O₂⁻: Radical libre de oxígeno
OAMS: Oclusión de arteria mesentérica superior
PaO₂: Presión parcial de oxígeno
PCI: Precondicionamiento isquémico
PCIAM: Precondicionamiento isquémico abdominal multiorgánico
PCP: Presión de enclavamiento pulmonar
pMLC: Fibras de miosina de tipo no muscular
POP: Posoperatorio
TAS: Tensión arterial sistólica
TBARS: Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
TGO: Transaminasa glutámico-oxalacética
TGP: Transaminasa glutámico-pirúvica
TNBS: Ácido sulfónico 2,4,6-trinitrobenceno
TOS: Trasplante de órgano sólido
VC: Vena cava
VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular

Referencias bibliográficas

1. Álvarez SP. Metodología para la elaboración de monografías y tesis. Buenos Aires; 1980.
2. Rey R. Investigación traslacional en medicina. 2016;58(262):142–8.
3. Hotter G, Closa D, Prados M, Fernández-Cruz L, Prats N, Gelpí E, et al. Intestinal preconditioning is mediated by a transient increase in nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996;222(1):27–32.
4. Saeki I, Matsuura T, Hayashida M, Taguchi T. Ischemic preconditioning and remote ischemic preconditioning have protective effect against cold ischemia-reperfusion injury of rat small intestine. *Pediatr Surg Int.* 2011;27(8):857–62.
5. Clavien PA, Yadav S, Sindram D, Bentley RC. Protective effects of ischemic preconditioning for liver resection performed under inflow occlusion in humans. *Ann Surg.* 2000;232(2):155–62.
6. Prats N, Rosello J, Peralta C, Closa D, Hotter G, Gelpí E. Liver Ischemic Preconditioning Is Mediated by the Inhibitory Action of Nitric Oxide on Endothelin Ischemic preconditioning is an inducible and potent endogenous mechanism by which repeated episodes of brief ischemia and reperfusion (I / R) confer a stat. 1996;270:264–70.
7. Torras J, Herrero-Fresneda I, Lloberas N, Riera M, Cruzao JM, Grinyo JM. Promising effects of ischemic preconditioning in renal transplantation. *Kidney Int.* 2002;61(6):2218–27.
8. Wever KE, Menting TP, Rovers M, van der Vliet JA, Rongen GA, Masereeuw R, et al. Ischemic preconditioning in the animal kidney, a systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2012;7(2):1–10.
9. Romanque U P, Uribe M M, Videla LA. Molecular mechanisms in liver ischemic-reperfusion injury and ischemic preconditioning. *Rev Med Chil.* 2005;133(4).
10. Schoenberg MH, Beger HG. Reperfusion injury after intestinal ischemia. Vol. 13, *Digestive Surgery.* 1996. p. 170–80.
11. Stringa PL. Efecto del acondicionamiento isquémico en modelos experimentales microquirúrgicos de isquemia-reperfusión intestinal. Universidad Nacional de La Plata; 2013.
12. Cobo JLE, del Río Gallegos F. Preservación de órganos. *Med Intensiva.* 2009 Aug;33(6):282–92.
13. Stringa P, Rumbo M. Current strategies to prevent ischemia reperfusion injury in organ transplantation. *Physiol Mini-Reviews.* 2014;7(July-August).
14. Nakazato PCG, Victorino JP, Fina CF, Mendes KDS, Gomes MCJ, Evora PRB, et al. Liver ischemia and reperfusion injury. Pathophysiology and new horizons in preconditioning and therapy. *Acta Cir Bras.* 2018;33(8):723–35.
15. Horiuchi T, Muraoka R, Tabo T, Uchinami M, Kimura N, Tanigawa N. Optimal Cycles of Hepatic Ischemia and Reperfusion for Intermittent Pedicle Clamping During Liver Surgery. *Arch Surg.* 2015;130:754–8.

16. Hardy KJ, Tancheroen S, Shulkes A. Comparison of continuous versus intermittent ischaemia-reperfusion during liver resection in an experimental model. *Br J Surg.* 1995;82(6):833–6.
17. Belghiti J, Noun R, Malafosse R, Jagot P, Sauvanet A, Pierangeli F, et al. Continuous versus intermittent portal triad clamping for liver resection: A controlled study. *Ann Surg.* 1999;229(3):369–75.
18. Iu S, Harvey PRC, Makowka L, Petrunka CN, Ilson RG, Strasberg SM. Markers of allograft viability in the rat. Relationship between transplantation viability and liver function in the isolated perfused liver. *Transplantation.* 1987;44(4):562–9.
19. Valdivieso A. Guía de Trasplantes de Órganos Abdominales. Valdivieso A, editor. Guías Clínicas de la Asociación Española de Cirujanos. Madrid; 2016.
20. Umbro I, Tinti F, Scalera I, Evison F, Gunson B, Sharif A, et al. Acute kidney injury and post-reperfusion syndrome in liver transplantation. *World J Gastroenterol.* 2016;22(42):9314–23.
21. Robertson FP, Magill LJ, Wright GP, Fuller B, Davidson BR. A systematic review and meta-analysis of donor ischaemic preconditioning in liver transplantation. *Transpl Int.* 2016;29(11):1147–54.
22. van Erp AC, van Dullemen LFA, Ploeg RJ, Leuvenink HGD. Systematic review on the treatment of deceased organ donors. *Transplant Rev.* 2018;32(4):194–206.
23. Robertson FP, Bessell PR, Diaz-Nieto R, Thomas N, Rolando N, Fuller B, et al. High serum Aspartate transaminase levels on day 3 postliver transplantation correlates with graft and patient survival and would be a valid surrogate for outcome in liver transplantation clinical trials. *Transpl Int.* 2016;29(3):323–30.
24. Grootjans J, Lenaerts K, Buurman WA, Dejong CHC, Derikx JPM. Life and death at the mucosal-luminal interface: New perspectives on human intestinal ischemia-reperfusion. *World J Gastroenterol.* 2016;22(9):2760–70.
25. Colgan SP, Taylor CT. Hypoxia: an alarm signal during intestinal inflammation. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2010;7(5):281–7.
26. Matthijsen RA, Derikx JPM, Kuipers D, van Dam RM, Dejong CHC, Buurman WA. Enterocyte shedding and epithelial lining repair following ischemia of the human small intestine attenuate inflammation. *PLoS One.* 2009;4(9).
27. Grootjans J, Lenaerts K, Derikx JPM, Matthijsen RA, De Bruïne AP, Van Bijnen AA, et al. Human intestinal ischemia-reperfusion-induced inflammation characterized: Experiences from a new translational model. *Am J Pathol.* 2010;176(5):2283–91.
28. Schraag S. Postoperative management. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol.* 2016;30(3):381–93.
29. Cerqueira NF, Hussni CA, Yoshida WB. Pathophysiology of mesenteric ischemia/reperfusion: a review. *Acta Cir Bras.* 2005;20(4):336–43.
30. Stone JR, Wilkins LR. Acute mesenteric ischemia. *Tech Vasc Interv Radiol.* 2015;18(1):24–30.
31. Carver TW, Vora RS, Taneja A. Mesenteric Ischemia. *Crit Care Clin.* 2016;32(2):155–71.
32. O.D. R. Pathogenesis of multiple organ dysfunction syndrome: gut origin, protection, and

- decontamination. *Surg Infect (Larchmt)*. 2000;1(3):217–25.
33. Vaishnava S, Behrendt CL, Ismail AS, Eckmann L, Hooper L V. Paneth cells directly sense gut commensals and maintain homeostasis at the intestinal host-microbial interface. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(52):20858–63.
 34. Mallick IH, Yang W, Winslet MC, Seifalian AM. Ischemia-reperfusion injury of the intestine and protective strategies against injury. *Dig Dis Sci*. 2004;49(9):1359–77.
 35. Lysy T, Finotti M, Maina RM, Morotti R, Munoz-Abraham AS, Bertacco A, et al. Human Small Intestine Transplantation: Segmental Susceptibility to Ischemia Using Different Preservation Solutions and Conditions. *Transplant Proc*. 2020;52(10):2934–40.
 36. Park PO, Haglund U, Bulkley GB FK. The sequence of development of intestinal tissue injury after strangulation ischemia and reperfusion. *Surgery*. 1990;107(5):574–80.
 37. Chiu Chu-Jeng Chiu, MD; Alice H. McArdle, PhD; Rea Brown, MD; Henry J. Scott, MD; and Fraser N. Gurd, MD M. Intestinal Mucosal Lesion in Low-Flow States. *Arch Surg*. 1970;101(4):478.
 38. O’Neal JB, Shaw AD, Billings FT. Acute kidney injury following cardiac surgery: Current understanding and future directions. *Crit Care*. 2016;20(1):1–9.
 39. Kezić A, Stajic N, Thaiss F. Innate immune response in kidney ischemia/reperfusion injury: Potential target for therapy. *J Immunol Res*. 2017;2017.
 40. Siedlecki A, Irish W, Brennan DC. Delayed graft function in the kidney transplant. *Am J Transplant*. 2011;11(11):2279–96.
 41. Rosenberger C, Eckardt KU. Oxygenation of the Transplanted Kidney. *Semin Nephrol*. 2019;39(6):554–66.
 42. Panah F, Ghorbanihaghjo A, Argani H, Asadi Zarmehri M, Nazari Soltan Ahmad S. Ischemic acute kidney injury and klotho in renal transplantation. *Clin Biochem*. 2018;55:3–8.
 43. Situmorang GR, Sheerin NS. Ischaemia reperfusion injury: mechanisms of progression to chronic graft dysfunction. *Pediatr Nephrol*. 2019;34(6):951–63.
 44. Grenda R. Delayed graft function and its management in children. *Pediatr Nephrol*. 2017;32(7):1157–67.
 45. Ozkan O, Akar ME, Ozkan O, Erdogan O, Hadimioglu N, Yilmaz M, et al. Preliminary results of the first human uterus transplantation from a multiorgan donor. *Fertil Steril*. 2013;99(2):470-476.e5.
 46. Zitkute V, Kvietkauskas M, Leber B, Strupas K, Stiegler P, Schemmer P. Ischemia and reperfusion injury in uterus transplantation: A comprehensive review. *Transplant Rev*. 2020;34(3):100550.
 47. Allyse M, Amer H, Coutifaris C, Falcone T, Famuyide A, Flyckt R, et al. American Society for Reproductive Medicine position statement on uterus transplantation: a committee opinion. *Fertil Steril*. 2018;110(4):605–10.
 48. Wranning CA, Mölne J, El-Akouri RR, Kurlberg G, Brännström M. Short-term ischaemic storage of human uterine myometrium - Basic studies towards uterine transplantation. *Hum Reprod*. 2005;20(10):2736–44.
 49. Gauthier T, Piver P, Pichon N, Bibes R, Guillaudeau A, Piccardo A, et al. Uterus retrieval process from brain dead donors. *Fertil Steril*. 2014;102(2):476–82.

50. Hanafy A, Diaz-Garcia C, Olausson M, BrînnstrÖm M. Uterine transplantation: One human case followed by a decade of experimental research in animal models. *Aust New Zeal J Obstet Gynaecol.* 2011;51(3):199–203.
51. Jones BP, Saso S, Bracewell-Milnes T, Thum MY, Nicopoullou J, Diaz-Garcia C, et al. Human uterine transplantation: a review of outcomes from the first 45 cases. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol.* 2019;126(11):1310–9.
52. Belzer FO, Southard JH. Principles of solid-organ preservation by cold storage. *Transplantation.* 1988;45(4):673–6.
53. Clavien PA, Harvey PRC, Strasberg SM. Preservation and reperfusion injuries in liver allografts: An overview and synthesis of current studies. *Transplantation.* 1992;53(5):957–78.
54. Carnevale ME, Lausada N, Juan de Paz L, Stringa P, Machuca M, Rumbo M, et al. The Novel N,N-bis-2-Hydroxyethyl-2-Aminoethanesulfonic Acid–Gluconate–Polyethylene Glycol–Hypothermic Machine Perfusion Solution Improves Static Cold Storage and Reduces Ischemia/Reperfusion Injury in Rat Liver Transplant. *Liver Transplant.* 2019;25(9):1375–86.
55. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: A delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation.* 1986;74(5):1124–36.
56. Yadav SS, Sindram D, Perry DK, Clavien PA. Ischemic preconditioning protects the mouse liver by inhibition of apoptosis through a caspase-dependent pathway. *Hepatology.* 1999;30(5):1223–31.
57. Stokfisz K, Ledakowicz-Polak A, Zagorski M, Zielinska M. Ischaemic preconditioning – Current knowledge and potential future applications after 30 years of experience. *Adv Med Sci.* 2017;62(2):307–16.
58. Yin D-P, Sankary HN, Chong ASF, Shen J, Foster P, Williams JW. Protective effect of ischemic preconditioning on liver preservation-reperfusion injury in rats. *Transplantation.* 1998;66(2):152–7.
59. Stringa P, Romanin D, Lausada N, Machuca M, Raimondi JC, Cabanne A, et al. Ischemic preconditioning and tacrolimus pretreatment as strategies to attenuate intestinal ischemia-reperfusion injury in mice. *Transplant Proc.* 2013;45(6):2480–5.
60. Mallick IH, Yang W, Winslet MC, Seifalian AM. Ischaemic preconditioning improves microvascular perfusion and oxygenation following reperfusion injury of the intestine. *Br J Surg.* 2005;92(9):1169–76.
61. Sileri P, Sica G, Gentileschi P, Venza M, Manzelli A, Palmieri G, et al. Ischemic preconditioning protects intestine from prolonged ischemia. *Transplant Proc.* 2004;36(2):283–5.
62. Akso S, Cinel I, Cinel L, Gu P. Intestinal ischemic preconditioning protects the intestine and reduces bacterial translocation. 2002;18(5):476–80.
63. Vlasov TD, Smirnov DA, Nutfullina GM. Preconditioning of the small intestine to ischemia in rats. *Neurosci Behav Physiol.* 2002;32(4):449–53.
64. Stringa P, Lausada N, Romanin D, Portiansky E, Zanuzzi C, Machuca M, et al. Pretreatment combination reduces remote organ damage secondary to intestinal reperfusion injury in mice: Follow-up study. *Transplant Proc.* 2016;48(1):210–6.

65. Ren QZ, Qian ZH, Jia SH, Xu ZZ. Vascular endothelial growth factor expression up-regulated by endometrial ischemia in secretory phase plays an important role in endometriosis. *Fertil Steril*. 2011;95(8):2687–9.
66. Lausada NR, De Gómez Dumm INT, Camihort G, Raimondi JC. Lipid pattern in kidney-transplanted rats without immunosuppressive therapy. *Transplant Proc*. 2002;34(1):380–3.
67. Lausada N, De Gómez Dumm Nelva T, Georgina L, Gisela C, Clemente R. Effect of different immunosuppressive therapies on the lipid pattern in kidney-transplanted rats. *Transpl Int*. 2005;18(5):524–31.
68. Cicora F, Lausada N, Vasquez DN, Cicora P, Zalazar G, Gonzalez P, et al. Sirolimus in Kidney Transplant Donors and Clinical and Histologic Improvement in Recipients: Rat Model. *Transplant Proc*. 2010;42(1):365–70.
69. Cicora F, Lausada N, Vasquez DN, Cicora P, Guerrieri D, Gonzalez P, et al. Protective effect of immunosuppressive treatment before orthotopic kidney autotransplantation. *Transpl Immunol*. 2011;24(2):107–12.
70. Cicora F, Roberti J, Lausada N, González P, Guerrieri D, Stringa P, et al. Donor preconditioning with rabbit anti-rat thymocyte immunoglobulin ameliorates ischemia reperfusion injury in rat kidney transplantation. *Transpl Immunol*. 2012;27(1):1–7.
71. Cicora F, Roberti J, Lausada N, González P, Guerrieri D, Stringa P, et al. Inmunosupresión en donantes renales. Expresión de citoquinas proinflamatorias. *Medicina (B Aires)*. 2012;72(1):3–9.
72. Russell, W. M. S., Burch, R. L., & Hume CW. The principles of humane experimental technique. *Princ Hum Exp Tech*. 1959;Vol. 238.
73. Peng Y, Zheng H, He Q, Wang Z, Zhang H, Chaudhari PB, et al. Is the Bishop–Koop procedure useful in severe jejunoileal atresia? *J Pediatr Surg*. 2018;53(10):1914–7.
74. Ramisch D, Rumbo C, Echevarria C, Moulin L, Niveyro S, Orce G, et al. Long-Term Outcomes of Intestinal and Multivisceral Transplantation at a Single Center in Argentina. *Transplant Proc*. 2016;48(2):457–62.
75. Moulin L, Rumbo C, Romero P, Pedraza N, Garcia Hervá D, Orce G, et al. Case Report: Multivisceral Transplantation for an Extensive Cystic Lymphangioma of the Mesenteric Root. *Transplant Proc*. 2016;48(2):543–5.
76. Sehgal S, Sandler AD, Alfred Chahine A, Mohan P, Torres C. Ostomy in continuity: A novel approach for the management of children with complex short bowel syndrome. *J Pediatr Surg*. 2018;53(10):1989–95.
77. Dickson-Lowe RA, Pienaar Z, Buitendag JJP, Oosthuizen G. Bishop-Koop jejunostomy in an adult following proximal small bowel anastomotic breakdown. *BMJ Case Rep*. 2018;11(1):10–2.
78. Boczar M, Sawicka E, Zybert K. Meconium ileus in newborns with cystic fibrosis - results of treatment in the group of patients operated on in the years 2000-2014. *Dev period Med*. 2015;19(1):32–40.
79. Aرسالani-Zadeh R, Kallam R, Khan S, Macfie J. Early restoration of intestinal continuity in acute mesenteric ischaemia using bishop-koop stoma. *Ann R Coll Surg Engl*. 2010;92(3):1–2.

80. Nagar H. Meconium ileus - Is a single surgical procedure adequate? *Asian J Surg.* 2006;29(3):161–4.
81. Burjonrappa SC, Crete E, Bouchard S. Prognostic factors in jejuno-ileal atresia. *Pediatr Surg Int.* 2009;25(9):795–8.
82. Bishop HC, Koop CE. Management of Meconium Ileus. *Ann Surg.* 1957;145(3):404–14.
83. Kayastha K, Mirza B, Sheikh A. Volvulus of small bowel in a case of simple meconium ileus. *APSP J Case Rep.* 2011;2(1):7–7.
84. Hasan MS, Mitul AR, Karim S, Noor-ul Ferdous KM, Islam K. Comparison of T Tube Ileostomy and Bishop Koop Ileostomy for the Management of Uncomplicated Meconium Ileus. *J Neonatal Surg.* 2017;6(3):56.
85. Santulli T V., Blanc WA. Congenital atresia of the intestine: Pathogenesis and Treatment. *Ann Surg.* 1961;3(11):939–48.
86. Schindelin J, Arganda-Carrera I, Frise E, Verena K, Mark L, Tobias P, et al. Fiji - an Open platform for biological image analysis. *Nat Methods.* 2009;9(7).
87. Romanin DE, Llopis S, Genovés S, Martorell P, Ramón VD, Garrote GL, et al. Probiotic yeast *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 8154 shows anti-inflammatory and anti-oxidative stress properties in in vivo models. *Benef Microbes.* 2016;7(1):83–93.
88. Irarorda C, Romanin DE, Bengoa AA, Errea AJ, Cayet D, Foligné B, et al. Local treatment with lactate prevents intestinal inflammation in the TNBS-induced colitis model. *Front Immunol.* 2016;7(DEC):1–9.
89. Alex P, Zachos NC, Nguyen T, Gonzales L, Chen TE, Conklin LS, et al. Distinct cytokine patterns identified from multiplex profiles of murine DSS and TNBS-induced colitis. *2003;15(2312):341–52.*
90. Drut R, Ruia EC. The histopathology of pediatric celiac disease: Order must prevail out of chaos. *Int J Surg Pathol.* 2001;9(4):261–4.
91. Afolabi OA, Akhigbe TM, Akhigbe RE, Alabi BA, Gbolagun OT, Taiwo ME, et al. Methanolic *Moringa oleifera* leaf extract protects against epithelial barrier damage and enteric bacterial translocation in intestinal I/R: Possible role of caspase 3. *Front Pharmacol.* 2022;13(September):1–16.
92. Nojima T, Obara T, Yamamoto H, Yumoto T, Igawa T, Aokage T, et al. Luminal administration of biliverdin ameliorates ischemia-reperfusion injury following intestinal transplant in rats. *Surg (United States).* 2022;172(5):1522–8.
93. Peres EC, Victorio JA, Nunes-Souza V, Breithaupt-Faloppa AC, Rabelo LA, Tavares-de-Lima W, et al. Simvastatin protects against intestinal ischemia/reperfusion-induced pulmonary artery dysfunction. *Life Sci.* 2022;306(August).
94. Akinci O, Tosun Y, Kepil N. The Effect of Genistein on Anastomotic Healing in Intestinal Ischemia/Reperfusion Injury. *J Surg Res.* 2022;280:389–95.
95. Dai D, Dai F, Chen J, Jin M, Li M, Hu D, et al. Integrated multi-omics reveal important roles of gut contents in intestinal ischemia–reperfusion induced injuries in rats. *Commun Biol.* 2022;5(1):1–15.
96. Liu X, Yang B, Tan YF, Feng JG, Jia J, Yang CJ, et al. The role of AMPK-Sirt1-autophagy pathway in the intestinal protection process by propofol against regional

- ischemia/reperfusion injury in rats. *Int Immunopharmacol*. 2022;111(August):109114.
97. yuan F shu, Yue X, Kun L, Bin L, Yunpeng D. Ellagic Acid Alleviates Mice intestinal ischemia-reperfusion injury: A Study Based on Transcriptomics Combined with Functional Experiments. *Chem Biodivers*. 2022 Oct 10;
 98. Wan Y, Dong P, Zhu X, Lei Y, Shen J, Liu W, et al. Bibliometric and visual analysis of intestinal ischemia reperfusion from 2004 to 2022. *Front Med*. 2022;9(August):1–21.
 99. Ozban M, Aydin C, Cevahir N, Yenisey C, Birsen O, Gumrukcu G, et al. The effect of melatonin on bacterial translocation following ischemia/reperfusion injury in a rat model of superior mesenteric artery occlusion. *BMC Surg*. 2015;15(1):3–9.
 100. Afolabi AO, Akhigbe TM, Odetayo AF, Anyogu DC, Hamed MA, Akhigbe RE. Restoration of Hepatic and Intestinal Integrity by *Phyllanthus amarus* Is Dependent on Bax/Caspase 3 Modulation in Intestinal Ischemia-/Reperfusion-Induced Injury. *Molecules*. 2022;27(16).
 101. Stringa P, Romanin D, Lausada N, Papa Gobbi R, Zanuzzi C, Martín P, et al. Gut Permeability and Glucose Absorption Are Affected at Early Stages of Graft Rejection in a Small Bowel Transplant Rat Model. *Transplant Direct*. 2017;3(11):e220.
 102. Gordeeva AE, Sharapov MG, Tikhonova I V., Chemeris NK, Fesenko EE, Novoselov VI, et al. Vascular Pathology of Ischemia/Reperfusion Injury of Rat Small Intestine. *Cells Tissues Organs*. 2017;203(6):353–64.
 103. Filpa V, Carpanese E, Marchet S, Pirrone C, Conti A, Rainero A, et al. Nitric oxide regulates homeoprotein OTX1 and OTX2 expression in the rat myenteric plexus after intestinal ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol*. 2017;312(4):G374–89.
 104. Hambardikar VR, Mandlik DS. Protective effect of naringin ameliorates TNBS-induced colitis in rats via improving antioxidant status and pro-inflammatory cytokines. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2022;44(3):373–86.
 105. Silva I, Mendes P, Guerra S, Pinto R, Mateus V. Anti-Inflammatory Effect of Topiramate in a Chronic Model of TNBS-Induced Colitis. *Int J Mol Sci*. 2022;23(16).
 106. Qiu J, Wu C, Gao Q, Li S, Li Y. Effect of fecal microbiota transplantation on the TGF- β 1/Smad signaling pathway in rats with TNBS-induced colitis. *Ann Transl Med*. 2022;10(15):825–825.
 107. Li G, Wu X, Gao X, Lin R, Chen L, Sun M, et al. Long-term exclusive enteral nutrition remodels the gut microbiota and alleviates TNBS-induced colitis in mice. *Food Funct*. 2022;13(4):1725–40.
 108. Wang D, Li S, Ma X, Chen X, Tian X, Li X, et al. Immunomodulatory effects of fentanyl and morphine on DSS- and TNBS-induced colitis. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2022;0(0):1–14.
 109. Hong CJ, Chen SY, Hsu YH, Yen GC. Protective effect of fermented okara on the regulation of inflammation, the gut microbiota, and SCFAs production in rats with TNBS-induced colitis. *Food Res Int*. 2022;157(January):111390.
 110. Roy S, Dhaneshwar S, Mahmood T, Kumar S, Saxena SK. Pre-clinical Investigation of Protective Effect of Nutraceutical D-Glucosamine on TNBS-induced Colitis. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2022;0(0):1–33.

111. Liu YJ, Xu WH, Fan LM, Zhang YQ, Xu W, Chen YP, et al. Polydatin alleviates DSS- and TNBS-induced colitis by suppressing Th17 cell differentiation via directly inhibiting STAT3. *Phyther Res.* 2022;36(9):3662–71.
112. Sasöz N, Kisa Ü, Apan A. Ischaemia-reperfusion injury of rat ovary and the effects of vitamin C, mannitol and verapamil. *Hum Reprod.* 2002;17(11):2972–6.
113. Younossi ZM, Gramlich T, Liu YC, Matteoni C, Petrelli M, Goldblum J, et al. Nonalcoholic fatty liver disease: assessment of variability in pathologic interpretations. *Mod Pathol.* 1998;11(6):560–5.
114. Bernstein JC, Stagnaro JP, Maiztegui B, Flores LE, Pérez NG, Mosca SM, et al. Primer seminario de investigación científica en Ciencias Médicas. 1a ed. Edulp, editor. La Plata; 2019. 148 p.
115. Solez K, Axelsen RA, Benediktsson H, Burdick JF, Cohen AH, Colvin RB, et al. International standardization of criteria for the histologic diagnosis of renal allograft rejection: The Banff working classification of kidney transplant pathology. *Kidney Int.* 1993;44(2):411–22.
116. De Serres SA, Noël R, Côté I, Lapointe I, Wagner E, Riopel J, et al. 2013 Banff Criteria for Chronic Active Antibody-Mediated Rejection: Assessment in a Real-Life Setting. *Am J Transplant.* 2016;16(5):1516–25.
117. Roufosse C, Simmonds N, Clahsen-Van Groningen M, Haas M, Henriksen KJ, Horsfield C, et al. A 2018 Reference Guide to the Banff Classification of Renal Allograft Pathology. *Transplantation.* 2018;102(11):1795–814.
118. Atalay YO, Aktas S, Sahin S, Kucukodaci Z, Ozakpinar OB. Remifentanil protects uterus against ischemia-reperfusion injury in rats. *Acta Cir Bras.* 2015;30(11):756–61.
119. Sahin S, Ozakpinar OB, Ak K, Eroglu M, Acikel M, Tetik S, et al. The protective effects of tacrolimus on rat uteri exposed to ischemia-reperfusion injury: A biochemical and histopathologic evaluation. *Fertil Steril.* 2014;101(4):1176–82.
120. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193(1):265–75.
121. Arnal N, de Alaniz MJT, Marra CA. Alterations in copper homeostasis and oxidative stress biomarkers in women using the intrauterine device TCu380A. *Toxicol Lett.* 2010;192(3):373–8.
122. Yagi K. A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochem Med.* 1976;15(2):212–6.
123. Reznick AZ, Packer L. Oxidative damage to proteins: Spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol.* 1994;233(C):357–63.
124. Benzie IFF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Anal Biochem.* 1996;239(1):70–6.
125. Lausada N, Arnal N, Astiz M, Marín MC, Lofeudo JM, Stringa P, et al. Dietary fats significantly influence the survival of penumbral neurons in a rat model of chronic ischemic by modifying lipid mediators, inflammatory biomarkers, NOS production, and redox-dependent apoptotic signals. *Nutrition.* 2015;31(11–12):1430–42.
126. Stringa P, Toledano V, Papa-Gobbi R, Arreola M, Largo C, Machuca M, et al. Galactomannan as a Potential Modulator of Intestinal Ischemia–Reperfusion Injury. *J*

Surg Res. 2020;249:232–40.

127. INCUCAI. Memoria 2021 SINTRA-CRESI Procuración y Trasplante de órganos, tejidos y células en Argentina. 2021.
128. National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine; Health and Medicine Division; Board on Health Care Services; Board on Health Sciences Policy; Committee on A Fairer and More Equitable, Cost-Effective, and Transparent System of Donor Organ Procurement and D. Realizing the Promise of Equity in the Organ Transplantation System. Washington DC.; 2022.
129. Ejzenberg D, Soares JM, Baracat EC. Uterus transplant: Are we close to this reality? Rev Assoc Med Bras. 2016;62(4):295–6.

Agradecimientos

A las instituciones que han permitido que realice la carrera de doctorado, principalmente a la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de La Plata por haber podido realizar la carrera de grado y luego haberme brindado la posibilidad de continuar con mi formación y desarrollo profesional. Especialmente a la Cátedra-Laboratorio de Trasplantes, lugar donde realicé el presente plan de tesis. Al personal del IIFP (Instituto de Estudios Inmunológicos y Fisiopatológicos) que en numerosas oportunidades me brindaron su apoyo.

A mis padres por ayudarme y estar siempre presentes en todo lo que fuese posible en mi vida, resultando en este caso, en lograr finalizar la tesis doctoral. A mi hermano por su apoyo continuo e incondicional.

A mi madrina Marcela Hernández por su ayuda permanente.

A mis directores, Dra. Natalia Lausada por acompañarme y enseñarme en todo el camino de esta tesis, con su calidez, amabilidad, predisposición, y conocimiento; y al Dr. Pablo Stringa por ser mucho más que un codirector de tesis y haberme brindado entre ambos la posibilidad de iniciarme en la investigación científica.

A Clemente Raimondi por darme la bienvenida a la Cátedra y al mundo de los trasplantes, acompañándome en mi desarrollo inicial en el área quirúrgica.

Al Dr. Leandro Vecchio por su compañerismo día a día y sus aportes a la tesis como fueron las lecturas del índice de V/C, y análisis estadístico entre otros.

A Claudio Ledezma por su excelente predisposición para el trabajo, ayuda y compañía en el laboratorio.

A mis compañeros del laboratorio de trasplante Fernanda Ruiz y Gonzalo Irigoyen.

A Mariana Machuca por su trabajo en todo el análisis histopatológico de la tesis.

A María Cristina Pallanza y Osvaldo Stringa por su tiempo y trabajo dedicado al análisis de estrés nitrativo y análisis de plasma respectivamente.

A Nathalie Arnal por su labor en el análisis de estrés oxidativo.

A Ivana Ivanoff por su trabajo en el análisis de expresión genética.

A David Romanin por su trabajo en colitis, y labor en conjunto, en relación a la técnica de BK.

A Rodrigo Papa Gobbi por su aporte en el análisis de componentes principales.

A los integrantes del Servicio de Cirugía del Hospital Gutiérrez, quienes me enseñaron habilidades quirúrgicas que luego pude aplicar a la presente tesis.