UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

Trabajo de Tesis realizado como requisito para optar al título de
DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS

EFFECTO DEL PRECONDICIONAMIENTO ISQUEMICO EN MODELOS
EXPERIMENTALES MICROQUIRURGICOS DE ISQUEMIA-REPERFUSION
INTESTINAL

Autor: M.V Pablo Luis Stringa

Director: Dra. Natalia Lausada

Co-Director: Dra. Mariana Machuca

Asesor Científico: Dr. Gabriel Gondolesi

Instituto de Trasplante Multiorgánico- Hospital Universitario

Fundación Favaloro.

Laboratorio de Trasplante de Organos y Tejidos- Facultad de Ciencias Médicas

Universidad Nacional de La Plata.

Miembros del Jurado: Dra. Alejandra Quiroga - Dr. Sung Ho Hyon

Dr. Pedro Gonzalez

Año 2013

Dedicada a Natalia Anzorandía, Ignacio Stringa,
Gervasio Burgos Stringa, Tomás Torcasso,
Simón Burgos Stringa y Lola Arias Duval.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a todas las instituciones que han permitido que realice la carrera de doctorado:

- Al CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas) por otorgarme las becas tipo I y II, lo cual permitió abocarme completamente a mi proyecto de investigación
- A la Universidad Nacional de La Plata (UNLP) por brindarme educación secundaria y universitaria, por permitir mi desarrollo profesional y docente.
- A la Facultad de Ciencias Veterinarias (FCV- UNLP), por su formación de grado, por darme la posibilidad de realizar mi tesis doctoral en esta casa de estudio.
- A la Universidad Favaloro (UF) y a la Facultad de Ciencias Médicas (FCM- UNLP), por ser los lugares donde realicé la mayor parte de las actividades necesarias para llevar adelante el presente plan de tesis.

En el transcurso de estos años, muchas personas han colaborado desinteresadamente para que pueda desarrollar el presente plan de tesis. Haber compartido este camino con gente tan predispuesta y entusiasta representa, sin duda alguna, una inmensa satisfacción. Cada uno, a su manera, fue partícipe de este trabajo, que es tanto mío como de ellos.

-A mi directora, Dra. Natalia Lausada, por abrirme las puertas del mundo de la investigación y transmitirme su pasión por la cirugía experimental, por acompañarme día a día en el desarrollo de este trabajo.

-A mi codirectora, Dra. Mariana Machuca, por su excelente predisposición, asesoramiento y compromiso.

- Al Dr. Gabriel Gondolesi, por permitirme ingresar en el fascinante mundo de los trasplantes, por cederme la posibilidad de ser integrante del Instituto de Trasplante Multiorgánico de la Fundación Favaloro.

-Al Dr. Clemente Raimondi, por dejar que sea parte del Laboratorio de Trasplante de Organos y Tejidos (LTO-FCM-UNLP), lugar que hoy considero mi segunda casa.

-A los Dres. Martin Rumbo, David Romanin, Agustina Zambenardi y todo el Laboratorio de Investigaciones del Sistema Inmune de la Facultad de Ciencias Exactas (LISIN-FCE-UNLP) por sus invaluables contribuciones que hicieron posible el desarrollo del presente trabajo, pero sobre todo , por su excelente calidad humana.

-Al Dr. Carlos Marra y su gran equipo de trabajo (Eva, Norma y Cristina) del Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (INIBIOLP-FCM-UNLP), por

estar siempre a disposición, por aconsejarme día a día , por sus palabras de aliento y esos cafecitos reconfortantes.

- A mis compañeros de la UF, especialmente a los Dres. Dominik Meier y Mauricio Almau Trenard, por sus aportes y críticas constructivas, por discutir de manera entusiasta todos aquellos temas inherentes a esta tesis.

-A mis compañeros del LTO, Claudio Ledesma, Gonzalo Irigoyen, Fernanda Ruiz y Gustavo Zalazar, por estar siempre dispuestos a dar una mano, por hacer entretenidas las jornadas laborales.

-A todo personal del quirófano experimental y bioterio de la UF, especialmente a Fabian Gauna, Julio Martinez y Dra. María Inés Besanson, por su excelente asistencia y predisposición.

- A la cátedra de Patología Especial, FCV-UNLP, por brindarme el espacio necesario para realizar análisis histopatológicos.

- A los Dres. Enrique Portiansky y Carolina Zanuzzi, del Laboratorio de Imágenes, FCV-UNLP, por su gran compromiso y responsabilidad para realizar los estudios de apoptosis.

-Al Dr. Federico Cicora y a la Fundación para la Investigación y Asistencia de la Enfermedad Renal (FINAER), por su respaldo incondicional a lo largo de todos estos años.

-Al Servicio de Cirugía Pediátrica del Hospital La Paz de Madrid, especialmente al Dr. Francisco Hernández Oliveros, por transmitirme desinteresadamente sus

conocimientos en el área de cirugía experimental. Por permitirme pasar 4 meses inolvidables en esa hermosa ciudad.

-Al Dr. Diego Guerrieri, por apadrinarme en la ardua tarea del becario.

-Al Dr. Enrique Correger, por contribuir a mejorar día a día el quirófano experimental del LTO.

-A los Médicos Veterinarios Graciela Miceli, Gustavo Zapata, Walter Furno, Fernando Leone, Rodrigo Luengo, Leandro Vecchio, y todos aquellos colegas que diariamente son referentes en cuanto a mi formación profesional y personal.

- A Nati, por respetar como nadie mi trabajo. Por ser mi compañera de equipo. Por acompañarme en este camino y en los que vendrán.

- A mis viejos, Ova y Cris, por ser el mejor ejemplo del buen ejemplo. Por respaldarme en todo momento. Por brindarme el honor de trabajar con ellos en diferentes etapas de esta tesis.

-A Vicky, la mejor hermana de todas, por estar siempre pendiente de que su hermanito progrese.

-A mis abuelos, tíos, suegros y familia en general, por enseñarme que el esfuerzo es la clave para llegar a la meta.

- A **TODOS** los que se han preocupado por recuperar estos documentos y refundar nuestros hogares luego del pasado 2 de Abril.

PROLOGO

“La única verdad es el trabajo”

Osvaldo Zubeldía

El presente plan de tesis se origina de una problemática clínica inherente a los trasplantes de órganos y tejidos como es la injuria por isquemia reperusión, fenómeno que representa una amenaza para el buen funcionamiento del injerto trasplantado y para la recuperación pos-quirúrgica del paciente.

Tomando al intestino como órgano de estudio, este trabajo tiene como objetivo evaluar el efecto del preconditionamiento isquémico como estrategia para atenuar el daño ocasionado por la isquemia-reperusión intestinal en modelos experimentales, utilizando roedores de laboratorio (ratones y ratas) como reactivos biológicos.

A lo largo del manuscrito se exponen experimentos que demuestran el impacto del tiempo de isquemia intestinal en el daño local, remoto y en la supervivencia de los animales intervenidos. Además, se evalúan diferentes protocolos de preconditionamiento isquémico como posibles estrategias para disminuir el daño ocasionado por la isquemia-reperusión y se combina el preconditionamiento isquémico con un pre-tratamiento farmacológico en búsqueda de efectos sinérgicos o aditivos entre ambas terapéuticas.

Por último, se incluye una detallada descripción de las técnicas quirúrgicas utilizadas en los experimentos: procedimiento de isquemia-reperusión intestinal por oclusión

reversible de la arteria mesentérica superior en ratones y técnica de trasplante intestinal heterotópico en ratas.

Considerando que los estudios en animales son de suma utilidad para la realización de ensayos pre-clínicos, este plan de tesis intenta, desde la investigación básica, aportar herramientas e información útil sobre el preconditionamiento isquémico como estrategia válida para disminuir el daño por isquemia-reperfusión intestinal.

PUBLICACIONES PARCIALES DEL PRESENTE TRABAJO DE TESIS

PUBLICACIONES EN REVISTAS INDEXADAS

Defining the nonreturn time for intestinal ischemia reperfusion injury in mice. **Stringa P**, Lausada N, Romanin D, Machuca M, Cabanne A, Rumbo M, Gondolesi G. *Transplant Proc.* 2012 Jun; 44(5): 1214-7 PMID: 22663987

Effect of ischemic preconditioning and tacrolimus pre-treatment as strategies to attenuate intestinal ischemia-reperfusion injury in mice **P. Stringa**, D. Romanin, N. Lausada, M. Machuca, A. Cabanne, C Raimondi, M. Rumbo, G. Gondolesi. *Transplant Proc.* 2013 Jul-Aug;45(6):2480-5. doi: 10.1016/j.transproceed.2013.02.113. PMID:23953566

CONGRESOS Y JORNADAS

X Congreso Argentino de Trasplantes

Stringa P, Lausada N, Cabane A, Rumbo M, Raimondi JC, Gondolesi G. “Modelo experimental murino de isquemia-reperfusión y su impacto en órganos remotos”. Capital Federal, Argentina, 25 al 28 de Noviembre de 2009.

XXI Congreso Latinoamericano y del Caribe de Trasplante de Organos y Tejidos

Stringa P, N. Lausada, A. Zambenardi, J. Padín, G. Gondolesi. Trasplante Heterotópico de intestino en ratones como herramienta para investigación básica”. Cartagena de Indias, Colombia, 23 al 26 de Marzo de 2011.

XXI Congreso Latinoamericano y del Caribe de Trasplante de Organos y Tejidos

Stringa P, Lausada N, Romanin D, Machuca M, Cabanne A, Rumbo M, Gondolesi G. “Impacto del tiempo de isquemia intestinal en el grado de injuria post-reperusión y en la supervivencia alejada en un modelo murino”. Cartagena de Indias, Colombia, 23 al 26 de Marzo de 2011.

XII International Small Bowel Symposium

Stringa P, Lausada N, Machuca M, Romanin D, Cabanne A, Rumbo M, Gondolesi G. “Effect of ischemic preconditioning and tacrolimus pre-treatment as strategies to attenuate intestinal ischemia-reperfusion injury in a mouse model”. Washington, Estados Unidos, 15 al 18 de septiembre de 2011.

Jornadas de Medicina 2011

Stringa P, Lausada N, Machuca M, Raimondi JC, Gondolesi G. “Trasplante heterotópico de intestino en ratones: descripción de la técnica quirúrgica y análisis histopatológico en diferentes etapas del procedimiento”. La Plata, Argentina, 6 y 7 de Octubre de 2011.

XI Congreso Argentino de Trasplante

Stringa P, Lausada N, Romanin D, Machuca M, Cabanne A, Rumbo M, Gondolesi G. “Efecto sinérgico entre el preconditionamiento isquémico y el pre-tratamiento con tacrolimus en la disminución del daño por isquemia-reperfusión intestinal”. Capital Federal, Argentina, Fecha: 1º al 3 de Diciembre de 2011.

XIII International Small Bowel Symposium

Stringa P, Romanin D, Lausada N, Machuca M, Cabanne A, Raimondi C, Rumbo M, Gondolesi G. “Effect of ischemic preconditioning and tacrolimus pre-treatment as strategies to attenuate intestinal ischemia-reperfusion injury in mice. Follow up study”. Oxford, Inglaterra, 26 al 29 de Junio de 2013.

XII Congreso Argentino de Trasplante – STALYC-SAT

Stringa P, Lausada N, Machuca M, Cabanne A, Raimondi C, Hernández Oliveros F, Rumbo M, Gondolesi G. “Trasplante de intestino en ratas: protección del injerto contra la injuria por isquemia-reperfusión mediante la aplicación de preconditionamiento isquémico”. Capital Federal, Argentina, 1º al 4 de diciembre de 2013.

XII Congreso Argentino de Trasplante – STALYC-SAT

Stringa P, Lausada N, Machuca M, Romanin D, Cabanne A, Raimondi C, Rumbo M, Gondolesi G. “Efecto del preconditionamiento isquémico y pre-tratamiento con tacrolimus en la disminución del daño local y remoto ocasionado por la isquemia-reperfusión intestinal”. Capital Federal, Argentina, 1º al 4 de diciembre de 2013.

XII Congreso Argentino de Trasplante – STALYC-SAT

Stringa P, Lausada N, Machuca M, Portiansky E, Zanuzzi C, Raimondi C, Rumbo M, Gondolesi G. “Estrategias para atenuar el proceso de apoptosis en la injuria por isquemia-reperfusión intestinal en ratones”. Capital Federal, Argentina, 1º al 4 de diciembre de 2013.

INDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCION GENERAL	5
1- Anatomia, Histología y Fisiología del intestino delgado. Generalidades.....	6
1.1-Anatomia.....	6
1.2-Histología.....	6
1.3-Fisiología.....	9
1.4-Circulación sanguínea del Yeyuno-Ileon.....	12
2- Trasplante de intestino (TXI)	16
2.1 Historia y situación actual del TXI	16
2.1.1 Historia	16
2.1.2 Situación Actual del TXI.....	18
2.2 Indicaciones para el TXI	23
2.3 Tipos de TXI	25
2.4 Manejo y complicaciones pos-TXI.	26
3- Injuria por isquemia-reperfusión	29
3.1 Generalidades	29
3.2 Estrés Oxidativo y Nitrativo en la IIR.....	30
3.3 Rol de los Leucocitos en la IIR	35
3.4 Transcripción e IIR.....	37
3.5 Producción y funciones de las CQ en la IIR.	38
3.6 Muerte Celular en respuesta a la IIR.....	40
3.6.1 Necrosis	40
3.6.2 Apoptosis.....	41
3.7 Proteína hemo-oxigenasa 1 en IIR	44

3.8 Sistema del Complemento e IIR.	46
3.9 Participación de la Inmunidad Innata en la IIR.....	47
3.10 Daño remoto como consecuencia de la IIR.....	48
4-Injuria por isquemia-reperfusión intestinal.....	50
4.1 Características generales de la IIR intestinal.....	50
4.2 SIRS y SDOM.....	52
5-Estrategias para atenuar la IIR intestinal.....	54
5.1 Precondicionamiento Isquémico (PCI)	54
5.1.1 Generalidades	54
5.1.2 Vías de señalización del PCI.....	57
5.1.3 Aplicaciones clínicas del PCI.....	59
5.1.4 PCI intestinal	60
5.2 Tacrolimus.....	64
5.3 Otros tratamientos propuestos para atenuar la IIR intestinal	65
5.3.1 Hipotermia.....	65
5.3.2 Soluciones de preservación	66
5.3.3 Antioxidantes.....	68
5.3.4 Drogas inmunosupresoras	69
5.3.5 Inhibidores de los leucocitos	70
5.3.6 Poscondicionamiento isquémico (POCI).....	72
5.3.7 Terapia anticomplemento	73
CAPITULO I	75
Impacto del tiempo de isquemia en la injuria por isquemia-reperfusión intestinal en ratones.....	75
Introducción	75
Experimento I.....	77

Materiales y Métodos	77
Resultados.....	83
Endotoxemia como posible causa de muerte pos-quirúrgica en ratones sometidos a injuria por isquemia-reperfusión intestinal.	88
Introducción	88
Experimento II.....	91
Materiales y Métodos	91
Resultados.....	92
Discusión Capitulo I	95
CAPITULO II	99
Evaluación del Precondicionamiento isquémico y pre-tratamiento con tacrolimus como estrategias para atenuar la injuria por isquemia-reperfusion intestinal en ratones.	99
Introducción	99
Experimento I.....	101
Materiales y Métodos	101
Resultados.....	103
Experimento II.....	104
Materiales y Métodos	104
Resultados.....	110
Discusión Capitulo II	130
CAPITULO III	138
Trasplante de intestino en ratas: efecto del Precondicionamiento isquémico en la injuria por isquemia-reperfusión.....	138
Introducción	138
Experimento I.....	150
Materiales y Métodos	150

Resultados.....	152
Experimento II.....	153
Materiales y Métodos	153
Resultados.....	155
TXI heterotópico en ratones: nuestra experiencia	157
Introducción	157
Experimento III	157
Materiales y Métodos	157
Resultados.....	158
Discusión Capítulo III.....	160
CONCLUSIONES FINALES Y PERSPECTIVAS	165
ANEXOS	168
ANEXO I: Análisis histológico intestinal.....	169
ANEXO II: Análisis histológico pulmonar.....	175
ANEXO III: Análisis histológico hepático	179
ANEXO IV: Análisis histológico renal.....	181
BIBLIOGRAFIA	184

ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico

AMS: arteria mesentérica superior

ATP: adenosin trifosfato

CQ: citoquinas

EROS: especies reactivas del oxígeno

ERN: especies reactivas del nitrógeno

H-E: hematoxilina-eosina

HO: hemo oxigenasa

ICAM: molécula de adhesión intracelular

ID: intestino delgado

IL: interleuquina

IIR: injuria por isquemia reperfusión

IR: isquemia-reperfusión

LT: leucotrienos

NFkB: factor nuclear kappa beta

NTA: necrosis tubular aguda

ON: óxido nítrico

ORAMS: oclusión reversible de la arteria mesentérica superior

PKC: proteínquinasa C

SDOM: síndrome de disfunción orgánica múltiple

SIRS: síndrome de respuesta inflamatoria sistémica

SOD: superóxido dismutasa

SVP: segunda ventana de protección

TNF: factor de necrosis tumoral

TXI: trasplante de intestino

VCAM: molécula de adhesión vascular

VP: vena porta

XO: xantina oxidasa

HIPOTESIS

- A- El preconditionamiento isquémico aplicado al intestino por oclusión temporaria de la arteria mesentérica superior reduce los daños ocasionados por el fenómeno de isquemia-reperfusión intestinal.
- B- El preconditionamiento isquémico podría proteger órganos distantes dañados por la isquemia-reperfusión originada en el intestino.
- C- El preconditionamiento isquémico podría tener un efecto sinérgico o aditivo al combinarlo con un pretratamiento farmacológico (tacrolimus) en la disminución de la injuria por isquemia-reperfusión intestinal.
- D- Los resultados obtenidos en el modelo de preconditionamiento isquémico por oclusión temporaria de la arteria mesentérica superior son extrapolables a técnicas más complejas de trasplante de intestino en roedores, con un impacto directo sobre la funcionalidad inmediata del injerto.

RESUMEN

EFFECTO DEL PRECONDICIONAMIENTO ISQUEMICO EN MODELOS EXPERIMENTALES MICROQUIRURGICOS DE ISQUEMIA REPERFUSION INTESTINAL.

Palabras claves: injuria por isquemia-reperfusión, intestino, preconditionamiento isquémico, trasplante intestinal, ratones, ratas.

La injuria por isquemia-reperfusión (IIR) es una reacción inflamatoria con alta morbi-mortalidad en pacientes sometidos a un trasplante intestinal (TXI) o que sufren enfermedades intestinales como por ejemplo hernias estranguladas, vólvulos o enterocolitis necrotizante. Por tal motivo, la búsqueda de estrategias para atenuar este daño (especialmente en el TXI) constituye un gran desafío.

El presente plan de tesis postula al preconditionamiento isquémico (PCI) como una estrategia capaz de atenuar la IIR intestinal en modelos experimentales, ya sea cuando se aplica sola o en combinación con otros pre-tratamientos, como el inmunosupresor tacrolimus (TAC).

En el capítulo I se realizó la puesta a punto de la técnica de oclusión reversible de la arteria mesentérica superior (ORAMS) en ratones, modelo experimental de IIR intestinal utilizado en gran parte de este plan de trabajo. Además, se reportó el impacto del tiempo de isquemia en el daño intestinal y en la supervivencia de los animales intervenidos. Por último, valiéndonos de cepas de ratones mutantes, se intentó determinar alguna de las posibles causas de muerte luego del evento de isquemia-reperfusión (IR) intestinal.

Utilizando el modelo de ORAMS en ratones, el Capítulo II está abocado a determinar la efectividad del PCI en la disminución del daño local y remoto ocasionado por la IIR. Por otra parte, en este capítulo se incluye al TAC como un pre-tratamiento farmacológico capaz de complementarse con el PCI al momento de disminuir el daño por IR.

En el Capítulo III desarrollamos el TXI heterotópico en ratas, el cual constituye un modelo de IIR de gran complejidad por sus dificultades técnicas. Por tal motivo, en esta etapa final del plan de trabajo se reportan los detalles de la cirugía y se evalúa el PCI como terapéutica para proteger al injerto contra la isquemia fría prolongada y la reperusión luego del trasplante.

SUMMARY

EFFECT OF ISCHEMIC PRECONDITIONING IN EXPERIMENTAL-MICROSURGICAL MODELS OF INTESTINAL ISCHEMIA-REPERFUSION.

Keywords: ischemia-reperfusion injury, intestine, ischemic preconditioning, intestinal transplantation, mice, rats.

Ischemia-reperfusion injury (IRI) is an inflammatory reaction with high morbidity and mortality in patients undergoing intestinal transplantation (ITX) or suffering from intestinal diseases such as strangulated hernias, volvulus or necrotizing enterocolitis.

Establishing strategies to mitigate IRI are major objectives for basic and translational research in the intestinal surgical field including transplantation.

This thesis proposes ischemic preconditioning (IPC) as a strategy to attenuate intestinal IRI in animal models, either when IPC is applied alone or in combination with other pre-treatments, such as the immunosuppressant tacrolimus (TAC).

Chapter I shows the surgical technique of reversible occlusion of superior mesenteric artery (ROSMA) in mice. This model of intestinal IRI was widely used in this work. Moreover, the impact of ischemia time on intestinal damage and survival of the operated animals was reported. Finally, a strain of mutant mice was used to determine some of the possible causes of death after intestinal IRI.

Using ROSMA model in mice, Chapter II reports the effectiveness of IPC in reducing local and remote damage caused by intestinal IRI. Moreover, in this part of the work we combine IPC with TAC in search of synergistic or additive effects.

Chapter III describes in detail the heterotopic ITX in rats, which is a model of great complexity and difficulty. In this final stage, IPC was evaluated as a strategy to protect intestinal graft against prolonged cold ischemia and reperfusion after transplantation.

INTRODUCCION GENERAL

La introducción general recorrerá diferentes temas de interés para el desarrollo del presente plan de trabajo. En un primer momento, se destacarán las principales características anatómicas y fisiológicas del intestino, órgano protagonista de este manuscrito. A continuación, conoceremos algunos puntos relevantes del complejo mundo del trasplante intestinal (TXI), donde la injuria por isquemia-reperfusión (IIR) aparece como una de las principales complicaciones pos-quirúrgicas a este tratamiento. Por tal motivo, nos detendremos en los conceptos y mecanismos de la IIR en general e intestinal en particular, para culminar esta introducción destacando diferentes estrategias propuestas para atenuar la IIR.

1- Anatomía, Histología y Fisiología del intestino delgado. Generalidades

1.1-Anatomía

El intestino, localizado en la cavidad abdominal, está conformado por dos grandes segmentos morfológica y funcionalmente diferentes: el intestino delgado (ID), el cual se extiende desde el píloro gástrico hasta la válvula íleo-cecal, y el intestino grueso, que comienza en la válvula recientemente mencionada y termina en el esfínter anal.

El ID es un tubo cilíndrico compuesto por asas, ubicado en la cavidad abdominal en situación intraperitoneal. A lo largo de su trayecto, y desde el punto de vista macroscópico, está dividido en tres regiones: Duodeno, Yeyuno e Ileón. El Duodeno es la primera porción del ID y está en íntima relación con el páncreas. A continuación, se distinguen dos porciones (Yeyuno-Ileón) que no tienen un límite preciso, si no una zona de tránsito entre ellos. Generalmente, de este segmento, $\frac{2}{5}$ partes corresponden al yeyuno y $\frac{3}{5}$ al Ileón.

1.2-Histología

En lo que respecta a la Histología, el ID está compuesto por 4 capas o tunicas: mucosa (en contacto con la luz intestinal), submucosa, muscular y serosa (externa). (Figura 1)

Túnica mucosa: la capacidad de la mucosa de absorber componentes del alimento se ve favorecida por estructuras denominadas pliegues circulares, los cuales aumentan hasta un 300% la superficie intestinal. Además, en esta capa se observan evaginaciones digitiformes, conocidas con el nombre de vellosidades intestinales, quienes provocan que la capacidad de absorción crezca hasta 10 veces. Todo el intestino delgado está

cubierto por estas evaginaciones, las cuales le confieren un aspecto aterciopelado. Las criptas de Lieberkuhn son glándulas tubulares que se ubican entre las vellosidades intestinales y, entre otras funciones, colaboran a aumentar aún más la absorción por parte del ID.

La capa mucosa del intestino delgado está recubierta por un epitelio cilíndrico simple, compuesto por seis tipos celulares: células absortivas, células de Paneth, células madre, células caliciformes, células M y células enteroendócrinas. Todas estas células tienen diferentes roles en cuanto a la fisiología intestinal. Entre sus funciones, se destaca la actividad protectora y lubricante de las células caliciformes gracias a su producción de mucina; el efecto bactericida de las células de Paneth, la estimulación de las células enteroendócrinas por medio de su liberación de serotonina y la capacidad de las células madre de proliferar y diferenciarse en diferentes tipos celulares. Por último, vale destacar las funciones de las células absortivas, las cuales transportan agua, iones inorgánicos y sustancias nutritivas desde la luz intestinal hacia la circulación sanguínea y linfática.

Por debajo del epitelio de revestimiento de la túnica mucosa, se encuentra la lámina propia, compuesta por tejido conjuntivo rico en células, apareciendo en gran número células plasmáticas y linfocitos, quienes participan en la defensa del organismo frente a la presencia de microorganismos, toxinas, etc. Los linfocitos de la lámina propia suelen observarse formando folículos en esta capa.

La lámina muscular de la mucosa está compuesta por células musculares lisas y se presenta por debajo de la lámina propia. La muscular de la mucosa tiene funciones relacionadas con el movimiento de las vellosidades, el cual sería estimulado ante la presencia de alimento.

Túnica Submucosa: compuesta por tejido conjuntivo laxo, en esta capa transcurren vasos sanguíneos y vías linfáticas de mayor tamaño. También se encuentra el Plexo de Meissner, compuesto por células de tipo ganglionar.

Túnica muscular: está compuesta por dos capas musculares (circular interna y longitudinal externa) que al contraerse provocan peristaltismo, contribuyendo con la mezcla del contenido intestinal y el transporte del mismo hacia el esfínter anal. Entre ambas capas se encuentra el plexo de Auerbach, el cual las provee de inervación motora.

Túnica serosa: representada por un mesotelio con subserosa adyacente, es la capa más externa del intestino.

Figura 1: identificación de las 4 capas que conforman el intestino: mucosa (MC), submucosa (SM), muscular (MUS) y serosa (SE) (intestino de ratón, H-E 10X).

1.3-Fisiología

La función principal del tracto gastrointestinal es la digestión y absorción de agua y alimentos ingeridos. La circulación de la sangre gastrointestinal es responsable de la entrega del oxígeno requerido para realizar los procesos de absorción y secreción por parte de la mucosa, como también de la actividad motora llevada a cabo por células de tipo muscular.

El ID está adaptado para realizar el proceso de digestión-absorción-secreción. Por tal motivo, realiza diversas funciones fisiológicas, las cuales pueden ser divididas a grandes rasgos en **mecánicas y químicas**.

A-Funciones mecánicas: El ID realiza la mayor parte de la digestión y absorción de los nutrientes. La motilidad intestinal resulta de gran importancia ya que permite que el alimento se mezcle con secreciones pancreáticas, biliares e intestinales mediante movimientos no propulsivos conocidos como “movimientos de segmentación” y “movimientos pendulares”. Estos movimientos, al mezclar el quimo con los jugos digestivos y facilitar el contacto de los nutrientes con la superficie de la mucosa intestinal, favorecen la absorción.

Las contracciones peristálticas representan el patrón propulsivo, movimientos encargados de transportar el contenido intestinal a una velocidad adecuada para que se produzca un correcto aprovechamiento de los nutrientes aportados por el alimento. Además, esta motilidad permite la eliminación de restos de alimento y secreciones en forma de heces.

B-Funciones químicas: dentro de estas funciones se destaca la digestión y la absorción de nutrientes.

1-Digestión: es una de las principales funciones químicas del ID y tiene como objeto descomponer los elementos de la ingesta en compuestos solubles de bajo peso molecular, capaces de ser posteriormente absorbidos por la mucosa intestinal. Pese a que se inicia en la boca y prosigue en el estómago, la digestión culmina en el intestino gracias a la intervención del jugo pancreático, las secreciones biliares, el jugo intestinal y las hormonas intestinales.

El jugo pancreático interviene en la digestión del almidón por medio de la amilasa pancreática, en la digestión de proteínas gracias a la secreción de carboxipeptidasas, tripsina y quimotripsina. Además, intervienen en la digestión de grasas por medio de la lipasa pancreática.

La secreción biliar interviene en la digestión de grasas, convirtiendo estos compuestos en sustancias liposolubles, facilitando de esta manera su absorción. Por otro lado, la bilis posee un importante papel detoxificador, permitiendo la excreción de bilirrubina, metabolitos endógenos y fármacos.

Las enzimas peptidasas constituyen gran parte jugo intestinal. Estas enzimas actúan en el metabolismo de las proteínas, desdoblado polipéptidos, los cuales son transformados en aminoácidos de fácil absorción.

Por último, hormonas sintetizadas en el intestino tales como la gastrina, secretina, entero-glucagón, polipéptido inhibidor gástrico y polipéptido intestinal vasoactivo, entre otras, también intervienen en el proceso digestivo de los alimentos.

2-Absorción: la absorción de nutrientes a nivel intestinal puede darse a través de dos rutas diferentes: la vía paracelular (entre dos enterocitos adyacentes) y la transcelular (a través de un enterocito). Además, cabe considerar tres mecanismos por los cuales se

absorben los diferentes compuestos del alimento: la absorción pasiva, o difusión, es aquella que se da a favor de un gradiente de concentración y por ende no consume energía. La absorción activa, por llevarse a cabo contra un gradiente de concentración, consume energía proveniente del proceso de glucólisis aerobia. Por último, la absorción por difusión facilitada es aquella donde interviene un transportador y, al igual que la difusión pasiva, no requiere del suministro de energía.

En el ID se produce una gran absorción de agua, siendo el Yeyuno más activo que el Ileon. El agua, generalmente, atraviesa la barrera entérica arrastrada por un soluto, dándose su absorción mediante el proceso de difusión.

El ion sodio es absorbido mediante transporte activo mediado por una enzima ATPasa. El transporte de este ion es de vital importancia ya que va acompañado de una absorción de agua por ósmosis debido a la elevada concentración de iones en el espacio intercelular, además tiene un rol protagónico en la absorción de azúcares. Por citar otros ejemplos, los iones cloruro y potasio son absorbidos mediante difusión pasiva y el ion calcio se absorbe de manera activa a lo largo de todo el intestino.

En lo referente a la absorción de vitaminas, las A, D y K₂ se absorben de manera pasiva; la Vitamina K₁ y el Acido Ascórbico se absorben de manera activa. Por último, la vitamina B se absorbe por difusión simple.

Los hidratos de carbono constituyen la principal fuente de energía aportada por la dieta. El duodeno y el Yeyuno proximal tienen la mayor capacidad de absorción de azúcares. Los monosacáridos de la dieta que se absorben con mayor facilidad son la glucosa, la galactosa y la fructosa. La D-glucosa y la d-galactosa son absorbidas por los enterocitos a través de un sistema activo acoplado a sodio. A su vez, para abandonar los enterocitos

y pasar al torrente sanguíneo, se valen de una difusión simple independiente del ion sodio. La absorción de la fructosa se produce por difusión facilitada.

Durante el proceso de digestión, gracias a la actividad de enzimas pancreáticas y sales biliares, las grasas son convertidas en micelas hidrosolubles que permiten su absorción por pinocitosis.

Los componentes proteicos son absorbidos en forma de dipéptidos y tripéptidos (mediante transporte activo) y en forma de aminoácidos. Los aminoácidos ingresan al enterocito utilizando tres mecanismos: difusión pasiva, transporte activo dependiente de sodio y transporte independiente de sodio. Los aminoácidos pueden pasar de la célula intestinal al torrente sanguíneo por difusión o por sistemas transportadores.

1.4-Circulación sanguínea del Yeyuno-Ileon.

La circulación sanguínea entérica es notable por su magnitud y complejidad. En reposo, el intestino recibe aproximadamente un 20-25% del gasto cardíaco, aumentando su demanda en la fase pos-prandial, donde el 35% del gasto cardíaco es destinado al lecho vascular intestinal. Mientras que el 70% del flujo sanguíneo que llega al intestino va dirigido a la capa mucosa y submucosa, el 30% restante se distribuye entre las tunicas muscular y serosa.

La circulación intestinal presenta capacidad autorregulatoria, es decir, tiende a mantener un flujo sanguíneo constante frente a cambios en la presión arterial sistémica o alteraciones en el tono simpático. Además, mecanismos miogénicos y metabólicos contribuyen a la homeostasis de la circulación intestinal. De acuerdo a la teoría metabólica, un desbalance entre la demanda y el suministro de oxígeno eleva la

producción de metabolitos locales que provocan vasodilatación e hiperemia compensatoria. El objetivo de este mecanismo es asegurar un suministro de oxígeno adecuado. Por otro lado, la teoría miogénica sugiere que una disminución aguda de la presión de perfusión provoca una respuesta a nivel arteriolar mediante receptores de tensión, los cuales provocan una reducción de la tensión de la pared de la arteriola, manteniendo de esta manera un flujo sanguíneo constante. La activación del mecanismo miogénico está orientada al mantenimiento de la presión capilar intestinal y a asegurar un intercambio transcapilar constante.

Además de estos mecanismos intrínsecos, existen sistemas y factores extrínsecos (por ejemplo sustancias autócrinas y parácrinas circulantes, nervios extrínsecos) que interactúan con el tracto gastrointestinal para garantizar un aporte adecuado de sangre al intestino.

En el proceso de desarrollo y adaptación de la mucosa intestinal para llevar a cabo funciones digestivas y de defensa del organismo, una distribución especializada y determinada de los vasos sanguíneos evolucionó en cada capa del intestino. Dentro de la organización del lecho vascular para el suministro de sangre intestinal, podemos encontrar dos circuitos en serie comprendidos por vasos extramurales e intramurales.

La sangre oxigenada llega al intestino a través de la arteria mesentérica superior (AMS), desde donde se originan vasos denominados yeyunales o ileales de acuerdo a la zona del intestino a la cual se dirijan. Estas arterias están comunicadas entre sí a través de arcadas, de las cuales se dependen numerosas arterias rectas que ingresan al intestino por el borde mesentérico, dando ramas colaterales que rodean la pared intestinal hasta anastomosarse en el borde antimesentérico.

Dentro de la pared intestinal, ramas arteriales serosas perforan la túnica muscular para formar un extenso plexo vascular en la submucosa, desde donde se originan arteriolas que cursan a lo largo de la superficie exterior de esta capa. Además, un grupo de arteriolas constituirán una red capilar que transporta sangre a las glándulas mucosas de la cripta, suministrando además arteriolas que se dirigen a la punta de la vellosidad donde forman un plexo capilar subepitelial similar a una malla. En general, una o dos venas drenan cada vellosidad, fusionándose posteriormente en grandes vénulas, continuando el flujo por la vena mesentérica superior hasta alcanzar la vena porta, la cual es responsable del retorno venoso del todo el tubo digestivo además del páncreas, bazo y vesícula biliar.

Respecto a la circulación sanguínea de las vellosidades intestinales, la disposición en paralelo entre la arteriola central y las vénulas, como la pequeña distancia que los separa (no suele exceder las 20 micras) dan lugar a un mecanismo contracorriente entre estas estructuras. Este mecanismo permite que parte del oxígeno arterial difunda hacia la vena cerca de la base de la vellosidad, sin alcanzar los capilares en la punta. (Figura 2)

Durante la autorregulación del flujo sanguíneo, la eficiencia de los intercambiadores responsables de efectuar el mecanismo contracorriente aumenta, lo que justificaría en gran medida las alteraciones presentes en la vellosidad ante determinadas situaciones clínicas, como por ejemplo , una disminución de la presión arterial. En este contexto, la parte basal de la vellosidad estaría recibiendo más oxígeno que las zonas apicales. Además, durante un cuadro de hipoxia, la velocidad del flujo sanguíneo se reduce, lo que favorece aún más la difusión de oxígeno desde el lecho arteriolar al venoso. Por lo explicado anteriormente, ante una determinada injuria, el mecanismo contracorriente tiene un rol perjudicial para la vellosidad, agravando el daño intestinal.

Figura 2: Esquematización de la circulación sanguínea y linfática dentro de las vellosidades intestinales. La circulación arterial y venosa se observan graficadas en color rojo y azul respectivamente. En color verde se representa la circulación linfática. A la derecha se aprecia una fotografía microscópica de vellosidades intestinales en un corte teñido con H-E correspondiente a yeyuno distal de ratón.

Referencias: (Zambernardi, 2013; Guyton, 2011, Garcia Sacristán, 1995; Sisson y Grossman 1982, Geneser, 1999)

2. Trasplante de intestino (TXI)

2.1 Historia y situación actual del TXI

2.1.1 Historia

Los primeros trabajos experimentales sobre TXI se remontan a principios del siglo pasado (1901) como parte de las experiencias realizadas por Alexis Carrel con anastomosis vasculares (Gondolesi y col. 2009). Más de medio siglo después (1959) Richard Lillehei desarrolló el primer modelo canino de auto-trasplante de intestino aislado en la Universidad de Minnesota, seguido al poco tiempo por Thomas Starzl, quien concibió el primer Trasplante Multivisceral incluyendo como parte del injerto no sólo el intestino, sino también hígado, estómago, páncreas, duodeno y colon (Starzl y col. 1962). Si bien ambos lograron demostrar su factibilidad técnica, la sobrevida alejada de los animales se vio comprometida por falta de inmunosupresión adecuada (Zambernardi, 2013).

A pesar de que los resultados obtenidos no eran los esperados, rápidamente se pasó del laboratorio a la clínica y en 1964 Ralph Deterling realiza el primer trasplante de intestino en humanos (caso no publicado), seguido nuevamente por Lillehei, quien en 1967 publica el primer TXI en humanos. A esta experiencia inicial le siguieron 7 casos más, los cuales tuvieron las mismas causas de fracaso observadas en el laboratorio: rechazo y sepsis. Estas vivencias fueron repetidas por Starzl con los mismos resultados desalentadores (Lillehei y col. 1960).

Es importante mencionar que en 1968 Okumura y col realizaron en San Pablo, Brasil, las primeras dos experiencias clínicas en Latinoamérica, quienes fallecieron en el post-trasplante inmediato (da Silva y col. 2008).

La carrera por el desarrollo de este trasplante se detuvo hasta la década del '80 en la que el progreso y los éxitos observados en otros trasplantes (renal y hepático), junto con la aparición de la ciclosporina, llevaron a reiniciar la actividad clínica, la cual fue entonces necesaria no sólo por el hecho de mostrar la factibilidad del procedimiento, sino porque se empezaron a observar, con frecuencia progresiva, las complicaciones asociadas a la nutrición parenteral total (NPT) desarrollada en la década del '60 por Wilmoore y Dudrick (Dudrick y col. 1969). Estas complicaciones incluían pérdida de accesos vasculares, sepsis recurrente del catéter y colestasis asociada a la NPT. Por tal motivo, estos pacientes se consideraban como portadores de falla al soporte parenteral y eran derivados para trasplante en condiciones extremadamente críticas. En esta década Delta y Kiel en Alemania, David Grant en Canadá y nuevamente el grupo de Thomas Starzl publicaron los primeros casos y series de TXI aislado, trasplante combinado en bloque y trasplante multivisceral con sobrevida alejada (57% y 50% a 1 y 3 años, respectivamente) (Gondolesi y Almau 2012).

En la década del '90 la aparición del tacrolimus, el desarrollo de diferentes innovaciones técnicas y la experiencia alcanzada por diferentes centros dedicados hicieron que el TXI sea aceptado como una opción terapéutica válida para pacientes con Insuficiencia Intestinal e imposibilidad de continuar en soporte parenteral, estimulándose además la derivación precoz que llevaría a la mejoría de los resultados (Gondolesi y col. 2009).

Finalmente, en octubre del año 2000, el TXI dejó de ser una práctica experimental para ser considerado una práctica clínica estándar aprobada (Zambernardi, 2013).

A lo largo de la historia se han utilizado diversos modelos experimentales para el estudio de diversos aspectos del TXI, cada uno con sus ventajas y desventajas. A la innovadora técnica de TXI en caninos descrita por Lillehei, le sucedieron otras

experiencias realizadas por investigadores en diferentes especies animales. De esta manera, cabe mencionar el trabajo realizado por Monchik y Russell en 1971, quienes desarrollaron un modelo de TXI en ratas, observando que si el trasplante se realizaba de padres (donantes) a hijos (receptores) se desencadenaba una enfermedad de injerto contra huésped. Si por el contrario, los donantes eran los hijos y los receptores los padres, se producía rechazo del injerto (Monchik y Russell 1971).

En 1992, Squiers y colaboradores desarrollaron el modelo experimental más complejo desde el punto de vista quirúrgico al realizar TXI en ratones, anastomosando la arteria aorta del donante con la del receptor y la vena porta del donante con la vena cava del receptor. Pese a lograr supervivencia pos-quirúrgica, estos autores citan una alta mortalidad pos-trasplante atribuible a shock, sepsis y trombosis arterial (Squiers y col. 1992).

2.1.2 Situación Actual del TXI

Desde 1985 hasta el último registro realizado en el presente año (2013) se efectuaron, contabilizando adultos y pediátricos, 2887 TXI en todo el mundo y 1416 receptores se encuentran vivos actualmente (Figuras 3 y 4). Estos procedimientos se llevaron a cabo en 82 centros que cuentan con la experiencia de haber realizado por lo menos 1 TXI. Sin embargo, hoy en día sólo 47 de estos programas de TXI se mantienen activos (Figura 5).

En lo referente a la situación geográfica, Estados Unidos es el país que cuenta con la mayor experiencia en TXI, seguido por la comunidad Europea y Sudamérica (Figura 6). En América latina se encuentran habilitados 7 programas de TXI, de los cuales 3 se

encuentran en Argentina (Hospital Alemán de Buenos Aires, Hospital Italiano de Buenos Aires y Función Favaloro) Por su parte, Brasil, Chile, Colombia y México cuentan con 1 centro de TXI cada uno.

Los resultados obtenidos hasta el momento se evalúan, tal como reporta la Figura 7, en la supervivencia pos-quirúrgica del paciente y del injerto trasplantado. La supervivencia del paciente a los 12 meses para el TXI aislado es del 90%. Por su parte, los trasplantes multiorgánicos presentan menor supervivencia del paciente, lo cual concuerda con la supervivencia de los injertos trasplantados.

Global Clinical Experience with IT

(All recipients transplanted between Jan 1985-Feb 2013)

Number of Transplants:	2887
Centre Count	82
Active Centres	47
SB Alone	1309 (45.3%)
SB+Liver	898 (31.2%)
MVT+Modified MVT	539 + 141 (23.5%)
Current Survivors	1416

Figura 3: experiencia mundial en TXI. *SB Alone*: sólo se trasplanta el intestino delgado. *SB + Liver*: TXI + hígado. *MVT + modified MVT*: trasplante multivisceral + trasplante multivisceral modificado. Cada tipo de trasplante se explica con más detalle en el ítem 2.3. Gráfico perteneciente al *Intestinal Transplant Registry Report 2013*.

Intestinal Transplants Performed

Figura 4: TXI pediátricos y adultos realizados por año. Gráfico perteneciente al *Intestinal Transplant Registry 2013*. En celeste se indican los TXI pediátricos y en azul los TXI adultos.

Figura 5: centros que cuentan con experiencia en TXI a nivel mundial (gráfico izquierda) y centros que se mantienen activos a la actualidad (gráfico derecha). Gráfico perteneciente al *Intestinal Transplant Registry 2013*. El Instituto de Trasplante Multiorgánico de la Fundación Favaloro es el centro que cuenta con mayor casuística en TXI a nivel de Latinoamérica.

Regional Intestine Transplant Case Volumes

Figura 6: reporte de TXI realizados según ubicación geográfica mundial. Gráfico perteneciente al *Intestinal Transplant Registry 2013*.

Pediatric Survival by Transplant Type (2008-2012)

Adult Survival by Transplant Type (2008-2012)

Figura 7: supervivencia de los injertos y pacientes pediátricos (gráfico superior) y adultos (gráfico inferior) luego del TXI. Gráfico perteneciente al *Intestinal Transplant Registry 2013*.

2.2 Indicaciones para el TXI

Antes de interiorizarnos en las situaciones clínicas que llevan al grupo médico a indicar un TXI, es necesario conocer algunos conceptos que se describen a continuación:

-Insuficiencia intestinal (II): imposibilidad del tracto gastrointestinal para digerir y absorber los nutrientes necesarios para mantener un balance hidroelectrolítico normal, crecimiento y salud del individuo. Según la duración, la II puede ser aguda (menor a 6 meses) o crónica si supera este tiempo (Beath y col. 2008).

Desde el punto de vista fisiopatológico hay dos tipos de II: la primera es consecuencia de una reducción de la masa o longitud intestinal, donde el síndrome de intestino corto constituye el ejemplo más característico. También puede presentarse como consecuencia a una resección masiva del intestino delgado. En el segundo tipo de II la longitud intestinal es normal, pero un trastorno en la función motora o absorptiva epitelial determinan la insuficiencia (Goulet, 1998).

-Nutrición parenteral (NP): consiste en administrar nutrientes al organismo por vía extra digestiva en cantidad y calidad necesaria para cada individuo.

De forma genérica, la NP está indicada en pacientes cuyo tracto gastrointestinal no es utilizable para la administración, digestión y/o absorción de nutrientes durante un período aproximadamente superior a los 7 días o cuando el tubo digestivo es utilizable, pero se desea mantener el mismo en reposo por cuestiones terapéuticas.

-Rehabilitación intestinal: es un proceso que intenta restaurar la autonomía nutricional, puede demorar meses o incluso años hasta completarse (principalmente en niños) y permite reducir o discontinuar el aporte enteral o parenteral. La premisa actual de las unidades especializadas en el tratamiento de la II es que "todo paciente que ingresa para

evaluación a una unidad de trasplante debe ser primero un potencial candidato a rehabilitación" (Zambernardi, 2013)

Las indicaciones para el TXI son aquellas complicaciones que llevan a la imposibilidad de continuar con NPT. De ellas, la insuficiencia hepática asociada a la NPT, la pérdida de accesos vasculares y la sepsis recurrente han sido aceptadas internacionalmente como las principales causas que llevan a indicar el trasplante. Los pacientes que presentan estas complicaciones deben considerarse como portadores de "falla" al soporte parenteral y el gran desafío entre los grupos especializados ha sido el de tratar de detectar estas complicaciones en forma precoz, es decir, antes de que las mismas se transformen en contraindicaciones para el trasplante (Colledan y col. 2013).

Actualmente, los criterios que determinan si un paciente con II será trasplantado incluyen: 1-Enfermedad hepática progresiva asociada a la NPT. 2- Trombosis de 2 o más venas centrales. 3- Haber sufrido 2 o más episodios de sepsis en un año asociadas al catéter que requirieron internación en unidad de cuidados intensivos o desarrollo de fungemia asociada al catéter. 4- episodios frecuentes y/o recurrentes de deshidratación severa a pesar del tratamiento suplementario en adición a la NPT (Gondolesi y col. 2009).

Diversas situaciones como infecciones sistémicas, inmunodeficiencias, tumores malignos, soporte social inadecuado y trastornos psiquiátricos severos son contraindicaciones del TXI.

Hoy en día, todo paciente portador de II debe ser evaluado por un equipo multidisciplinario capaz de optimizar el soporte parenteral, determinar potencialidad de rehabilitación y, en caso de no poder rehabilitar el intestino, indicar el trasplante.

2.3 Tipos de TXI

Existen diferentes tipos de TXI que son indicados según la situación clínica del paciente (Figura 8): **1-Trasplante de Intestino Aislado (TIA)**: en este caso, únicamente se trasplanta el intestino. **2- Trasplante Combinado (TC)**: el intestino se trasplanta junto al hígado. Este tipo de trasplante suele ser el indicado en aquellos pacientes que han sufrido cirrosis hepática a raíz de la NPT. **3- Trasplante Multivisceral (TM)**: al yeyuno-íleon se le suman otros órganos tales como hígado, estómago y duodeno-páncreas, conformando un injerto compuesto por varios órganos. Un ejemplo donde se indica este tipo de trasplante es en el caso de que el paciente presente una trombosis que comprometa el eje porto-mesentérico. Dentro del TM existe una alternativa conocida como TM modificado, en estos casos, pese a recibir múltiples órganos, el receptor conserva su hígado (Gondolesi y col. 2009).

Figura 8: Según el tipo de TXI, el injerto puede estar compuesto por 1 o más órganos. Los órganos trasplantados se observan en color rojo, los órganos propios del receptor en gris. (Dibujos cedidos gentilmente por el Dr Gabriel Gondolesi).

2.4 Manejo y complicaciones pos-TXI.

Las complicaciones pos-trasplante son numerosas y se presentan en gran parte de los pacientes que reciben cualquier tipo de TXI. Con el fin de clasificarlas, se pueden dividir en 2 grandes grupos: complicaciones quirúrgicas y complicaciones clínicas (Figura 9).

La convivencia del injerto con el receptor luego del TXI representa el mayor desafío para el equipo médico. Por tal motivo, el seguimiento del paciente trasplantado es constante y está orientado a la pronta detección y tratamiento de las complicaciones enumeradas.

El rechazo del o los órganos trasplantados representa la primera causa de pérdida del injerto, por lo que, desde etapas muy tempranas al TXI, diversas drogas con propiedades inmunosupresoras como esteroides, tacrolimus, micofenolato y rapamicina

son administradas al receptor, e incluso ciertos fármacos como timoglobulina son aplicados al donante. Pese a que una terapia inmunosupresora es indispensable para prevenir el rechazo, predispone a infecciones, por lo que estas son frecuentes y constituyen punto muy importante a identificar y tratar con antibioticoterapia adecuada.

En resumen, podemos decir que el manejo pos-TXI es altamente demandante, requiere un detallado monitoreo y una eficaz terapia inmunosupresora, detección precoz y tratamiento de posibles episodios de rechazo y/o de complicaciones quirúrgicas, riguroso monitoreo de complicaciones infecciosas, y una funcionalidad intestinal apropiada, a la cual se llega a través de una progresiva nutrición enteral pos-TXI.

Adentrándonos en el tema de estudio propuesto para el desarrollo del presente plan de trabajo, debemos centrarnos en una de las complicaciones más características de los trasplantes, la injuria por isquemia reperfusión (IIR). Considerando los pasos que constituyen cualquier procedimiento de trasplante, la interrupción del flujo sanguíneo del órgano en el donante (isquemia) y la restitución del mismo en el receptor (reperfusión) son eventos inevitables y necesarios para el desarrollo de este tipo de cirugías. Pese a esto, la fase de isquemia y la reperfusión pueden generar complicaciones que ponen en riesgo tanto la viabilidad del injerto como la vida del paciente. Desde el punto de vista clínico, la IIR en el TXI se manifiesta dentro de las primeras 72 horas pos-quirúrgicas y el signo más común es el sangrado por la ostomía. Las consecuencias mayores son la pérdida de la superficie de absorción, cuadro que se complica generalmente con traslocación bacteriana y eventual estado de sepsis, pudiendo llegar a una coagulación intravascular diseminada y daño en órganos distantes. Si la IIR adquiere tal magnitud, los pacientes pueden sufrir un distress respiratorio e incluso SDMO. La severidad de este cuadro clínico hace que en el TXI la

isquemia máxima tolerada sea de 10-12 horas y se busquen estrategias para atenuar la IIR (Gondolesi y col. 2009).

Complicaciones Quirúrgicas	
Injuria por Isquemia Reperfusión	Preservación inadecuada del órgano
Estenosis de anastomosis vasculares	Hemorragia intraabdominal
Fuga por anastomosis intestinal	Vólvulo del injerto
Formación de abscesos intraabdominales	Ascitis quílosa
Dehiscencia de herida de pared abdominal	Hernia paraosteómica
Complicaciones Clínicas	
Rechazo del injerto	Enfermedad de injerto contra el huésped
Infecciones	Problemas linfoproliferativos
Falla renal secundaria a inmunosupresión	Alteraciones nutricionales

Figura 9: principales complicaciones asociadas al procedimiento de TXI.

3- Injuria por isquemia-reperfusión

3.1 Generalidades

La IIR se origina en una reacción inflamatoria que tiene lugar luego de la reoxigenación de un tejido sometido a isquemia. Pese a que este fenómeno se presenta en diferentes situaciones clínica, los trasplantes se han constituido en el mejor ejemplo de IIR.

Durante la isquemia, el órgano privado de oxígeno consume y agota el adenosin trifosfato (ATP), así como otros productos metabólicos energéticos. Por tal motivo, las células isquémicas deben recurrir a la glucólisis anaerobia, con el consecuente acumulo de ácido láctico y otros metabolitos de carácter ácido. Estos productos causan una disminución del pH intracelular, estimulando la liberación de enzimas por parte de los lisosomas, las cuales dañan estructuras celulares. Simultáneamente, las células aumentan su permeabilidad, perdiendo potasio y permitiendo el ingreso de sodio, agua y calcio a su interior, lo que provoca una alteración en la homeostasis iónica que conlleva a una tumefacción celular aguda. Estos cambios van acompañados de la apertura de los poros de transición ubicados en las mitocondrias, provocando una disipación del potencial de membrana mitocondrial y perjudicando aún más la producción de ATP. La depleción de ATP producida durante la isquemia provoca la acumulación de hipoxantina, sustrato de la xantina oxidasa (XO) responsable de la producción de especies reactivas de oxígeno (EROS) durante la fase de reperfusión (Massberg and Messmer 1998; Kalogeris y col. 2012).

En el transcurso de la isquemia, la presión sanguínea disminuye y la microcirculación se ve afectada. Las pequeñas arterias y arteriolas colapsan, por lo que la sangre queda estancada en los capilares y en el sistema venoso. Cuanto más prolongada es la

isquemia, más difícil es la revascularización del órgano, dando lugar a un fenómeno conocido como “síndrome de no reflujo”. Los mecanismos de la IIR que responden a este síndrome están asociados a agregación plaquetaria, aumento en la adhesión de leucocitos al endotelio, disminución de la capacidad vasodilatadora y presencia de edema intersticial, que resultan en una obstrucción de tipo mecánica cuya consecuencia es la imposibilidad de restituir el flujo sanguíneo durante la reperfusión del órgano (Schwartz and Kloner 2012).

La fase de reperfusión se caracteriza por el aumento en la producción de radicales libres de oxígeno y nitrógeno por activación del sistema XO, 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 para 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 (Schoenberg and Beger 1993).

La patogénesis de la IIR es muy compleja y en ella intervienen diversos mecanismos, los cuales suelen relacionarse entre sí para efectivizar la respuesta del organismo ante un evento de esta índole. A continuación, se detallan los principales mecanismos implicados en esta respuesta inflamatoria, destacando los puntos más relevantes de cada uno (Figura 6).

3.2 Estrés Oxidativo y Nitrativo en la IIR

El ingreso de sangre oxigenada en un tejido isquémico es esencial para retomar la producción aeróbica de ATP. Sin embargo, la reperfusión dispara la producción de

EROS, sustancias inestables y de gran capacidad reactiva que son capaces de modificar todo tipo de molécula, provocando disfunción de las células. Además, las especies reactivas de nitrógeno (ERN), moléculas derivadas del óxido nítrico (ON), juegan un papel modulador en la respuesta celular y sistémica de la IIR (Kvietys and Granger 2012). En efecto, las interacciones entre EROS y ERN tienen un rol crítico en la determinación de la extensión de la lesión a través de la producción de especies reactivas, las cuales provocan efectos deletéreos a través de modificación de macromoléculas, inducción de muerte de células endoteliales y parenquimatosas del tejido afectado, estimulación de la producción de mediadores pro-inflamatorios, inducción de moléculas de adhesión de leucocitos y disminución de la disponibilidad de ON protector (Li and Jackson 2002).

El estrés oxidativo surge de un desequilibrio entre los compuestos antioxidantes y pro-oxidantes de las células; el exceso de EROS que se produce durante la fase de reperfusión supera la capacidad antioxidante del organismo, con la consiguiente lesión tisular y celular. Una de las EROS más importantes producida durante la IIR es el radical anión superóxido (O_2^-), el cual resulta de la reducción del oxígeno molecular y permite la formación de otras EROS. Diversos estudios demostraron la importancia del O_2^- en el daño por IR al administrar la enzima antioxidante superóxido dismutasa (SOD), lo que provocó una disminución considerable de la IIR. Por otro lado, estudios realizados en ratones transgénicos, demostraron que aquellos animales que sobreexpresan SOD son más resistentes a la IIR respecto a los animales control (van der Vliet and Bast 1992; Cantu-Medellin and Kelley 2013).

Además del O_2^- , el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($OH^\cdot$) aparecen como ERO que participan en la patogénesis de la IIR. Como características comunes a

todas las ERO podemos citar que se generan en situaciones de aerobiosis, dado que la presencia de oxígeno es una condición indispensable y que la síntesis de O_2^- es el primer acontecimiento común en todo el proceso, dando lugar posteriormente al resto de los EROS (Kalyanaraman 2013).

Durante el desarrollo de un evento de isquemia-reperfusión (IR), existen diversas fuentes enzimáticas que posibilitan la producción de EROS, entre las cuales aparecen la NADPH oxidasa, la Citocromo P450 Oxidasa, las mitocondrias (organelas que juegan un rol fundamental en la generación de EROS) y la XO, esta última representa la ruta más característica de generación de EROS durante la IIR (Figura 10) (Li and Jackson 2002).

El ON, cuyas funciones se describen más adelante, puede interactuar con el O_2 o el O_2^- , formando dinitrógeno trióxido (N_2O_3) o peroxinitrito ($ONOO^-$), respectivamente. La aparición de estas ERN se asocia con la sobreproducción de ON y O_2 , dando lugar al estrés nitrativo (van der Vliet y col. 1997).

En resumen, el estrés oxidativo y nitrativo impactan negativamente sobre el organismo de tres maneras: 1- provocan daño en estructuras celulares, tales como lípidos de membrana, proteínas y ácido desoxirribonucleico (ADN). 2- disminuyen la biodisponibilidad de ON, a través de su combinación con el O_2 , con la formación de especies tóxicas. 3- interfieren en los mecanismos de señalización celular, ya sea mediante daño sobre las células o actuando directamente sobre los sistemas efectores de señalización.

El ON es un importante determinante de la resistencia vascular producido por una familia de enzimas conocidas como óxido nítrico sintetasas. El ON reduce la

trombogenicidad del endotelio, contribuye con los mecanismos no específicos de defensa y es un neurotransmisor en los sistemas nerviosos periférico y central. Además de estas funciones fisiológicas, hay pruebas convincentes de que la producción excesiva y prolongada de ON contribuye al daño tisular en septicemia, lesiones por IR y otras condiciones inflamatorias. Se forma a partir del aminoácido L-arginina en una reacción de múltiples etapas que culmina con la formación de L- Citrulina, quienes además de ser partícipes en la formación de ON, son componentes fundamentales del ciclo de la urea. Hay por lo menos tres enzimas implicadas en la síntesis del ON. Mientras que dos de ellas se expresan constitutivamente en neuronas y células endoteliales, la tercera es una forma inducible (INOS) que se identificó originalmente en macrófagos, pero también se produce en otros tipos celulares, incluyendo endotelio vascular, músculo liso y fibroblastos. Las enzimas constitutivas poseen estricta dependencia de calmodulina y aumento de calcio intracelular para su actividad. En circunstancias normales, la elevación transitoria de calcio intracelular activa estas enzimas para producir ON. Esta producción se considera como fisiológica y subyace los efectos vasodilatadores, antiagregantes, y neurotransmisoras del ON. En contraste, la INOS no depende de calcio o calmodulina para ejercer su actividad., si no que se expresa en respuesta a estímulos, generalmente mediadores de la inflamación, como citoquinas (CQ) (Jessup y col. 1999).

En los últimos años ha habido un gran interés en el papel del ON en la IIR. Muchos estudios han proporcionado pruebas contradictorias sobre el efecto protector o dañino del ON en estas situaciones. Por ejemplo, estudios sobre IR realizados en corazones de cerdo, han reportado que la infusión de ON reduce la liberación de histamina, la desgranulación de mastocitos y la sobrecarga de calcio. Otros trabajos experimentales, también realizados en corazones, demostraron que la administración del aminoácido

precursor del ON, L-arginina, disminuye el tamaño del infarto y la actividad de mieloperoxidasa, demostrando la capacidad del ON para frenar la actividad de los neutrófilos. Contradiendo las experiencias anteriores, se ha reportado la administración de inhibidores de la síntesis de ON redujo el tamaño del infarto en corazones aislados de conejo. Los resultados citados representan las diferentes posturas en cuanto al rol del ON en la IIR, por tal motivo, el estudio del ON en este campo de investigación representa aún en la actualidad un área de gran interés (Kalogeris y col. 2012).

Figura 10: generación de EROS durante la IIR. La figura representa la cascada de acontecimientos que comienzan en la fase de isquemia con la depleción de ATP y culmina en la reperfusión mediante la producción de EROS, las cuales dañan estructuras celulares y magnifican la respuesta inflamatoria luego de un evento de IR.

3.3 Rol de los Leucocitos en la IIR

La interacción leucocito-endotelial se inicia mediante el desplazamiento (rolling) de los leucocitos a lo largo de la superficie de las células endoteliales. Este evento está mediado por glucoproteínas pertenecientes a la familia de las Selectinas, las cuales se encuentran tanto en la superficie de los leucocitos, plaquetas y células endoteliales (L - P- y E-selectinas). Esta unión débil e intermitente permite la movilización de los leucocitos hacia el foco de lesión, atraídos y activados por sustancias quimiotácticas tales como leucotrienos, fracción C5a del complemento, factor activador de plaquetas y CQ, entre otros, sintetizados desde el foco inflamatorio (Nourshargh y col. 2006). Las CQ son fundamentales en la llegada de los leucocitos al sitio inflamatorio al ejercer una quimiotaxis muy potente sobre neutrófilos, linfocitos, monocitos y eosinófilos. Una vez concluido el “rolling”, los leucocitos se adhieren firmemente al endotelio para migrar por diapédesis desde el espacio intravascular al sitio dañado (Francischetti y col. 2010). Para que se dé el proceso conocido como migración, se requiere la expresión de selectinas e integrinas desde el leucocito (CD11a, CD11b y CD11c/CD18) y moléculas de adhesión presentadas por el endotelio como moléculas de adhesión intracelular (ICAM-1, -2,-3) y moléculas de adhesión vascular (VCAM-1). La acumulación de leucocitos en el tejido dañado es la fase final de la respuesta de estas células a la injuria (Granger, 1988) (Figura 11).

Aunque una de las principales funciones de los leucocitos es la eliminación de desechos tisulares mediante fagocitosis, la llegada de estas células a focos inflamatorios como en el caso de la IIR, paradójicamente empeora el cuadro. Los leucocitos activados producen una gran cantidad de agentes oxidativos (O_2^- , H_2O_2), con destrucción por peroxidación lipídica de membranas celulares y una consecuente desintegración de

células, con liberación y activación de enzimas lisosomales tales como elastasas, colagenasas y proteasas. Además, secretan CQ pro-inflamatorias como el factor de necrosis tumoral α (TNF α) e interleuquinas (IL) 1, 6, y 12 que amplifican la respuesta inflamatoria.

Por último, durante la fase de reperfusión, los leucocitos están implicados en la obstrucción de los capilares colaborando con el fenómeno de “no reflujo”, siendo este otro mecanismo por el cual los leucocitos magnifican el daño durante la IR (Francischetti y col. 2010).

Figura 11: Secuencia de acontecimientos en la emigración de neutrófilos hacia el foco inflamatorio. 1-Desplazamiento (Rolling) de los leucocitos sobre el endotelio vascular. 2- Adhesión firme entre células endoteliales y leucocitos. 3-Extravasación. 4-una vez en el sitio dañado, los leucocitos magnifican la respuesta inflamatoria.

3.4 Transcripción e IIR

El estrés oxidativo, ya sea directamente por la acción de EROS o a través de productos liberados de la peroxidación lipídica, puede iniciar el proceso de transcripción génica, el cual se dispara como mecanismo adaptativo ante la injuria. Diversos factores de transcripción son activados durante la IIR, sin embargo, el factor nuclear Kappa B (NFKB) aparece como uno de los más importantes, teniendo un papel protagónico en la inmunidad innata y en reacciones inflamatorias. NFKB es un factor de transcripción nuclear que regula la expresión de diversos genes implicados en la patogénesis de procesos como apoptosis, inflamación y diversas enfermedades autoinmunes. Sin embargo, se ha reportado una actividad paradójica del NFKB que estaría relacionada con propiedades citoprotectoras y antiapoptóticas (Kalogeris y col. 2012).

Pese a que se sabe que el NFKB es activado por más de 100 inductores, durante un evento de IR los activadores más importantes son la hipoxia, la producción de EROS, la IL-1 α y β , la IL-2 y las proteínas de choque térmico (HSP). Una vez activado, NFKB tiene injerencia sobre ciertos genes entre los que se destacan la VCAM-1, ICAM-1, metaloproteinasas (MMP-2, MMP-9) y otros genes que regulan el funcionamiento de la célula endotelial. Adicionalmente, NFKB promueve la expresión de genes involucrados en la IIR como por ejemplo IL-6, IL-8 y TNFa (Gueler y col. 2004).

En la IIR, la duración y gravedad de la isquemia primaria determinan la intensidad de la respuesta inmune. Cuando el periodo de isquemia es relativamente breve, la hipoxia y las vías mediadas por EROS logran un bajo nivel de inducción en la actividad de NFKB, promoviendo la síntesis de compuestos citoprotectores. Sin embargo, cuando el grado de isquemia es más agresivo, el NFKB adopta un rol pro-inflamatorio, por lo que

se produce la liberación masiva de CQ (IL-1 α y TNFa) y HSP (Eltzschig and Eckle 2011).

3.5 Producción y funciones de las CQ en la IIR.

Las CQ son un grupo de proteínas secretadas por varios tipos celulares, las cuales actúan sobre células diana que expresan en su membrana receptores específicos para una CQ dada. La unión de una CQ a su receptor de membrana desencadena señales hacia el interior de la célula, conduciendo a cambios en la activación y expresión de genes. Las CQ funcionan como mensajeros: regulan la intensidad y duración de la respuesta inmune, estimulando o inhibiendo la proliferación de varias células, la secreción de anticuerpos o de otras CQ. Pueden actuar mediante diferentes acciones: a) autócrina: uniéndose a la misma célula que la secreta; b) parácrina: actuando sobre una célula cercana; c) endocrina: uniéndose a células distantes (Kalogeris y col 2012).

Las CQ pueden jugar un papel pro o antiinflamatorios en la IIR. Existe una amplia literatura sobre la función de las CQ en la lesión pos-isquémica, donde el TNFa aparece como un contribuyente importante en la patogénesis del daño por IR. Aunque TNFa es producido por una gran variedad de tipos celulares, los macrófagos representan una fuente de síntesis importante durante un evento de IR. TNFa actúa tanto a nivel local como remota. Una vez liberado, se une con receptores específicos para inducir la expresión de quimoquinas, la producción de EROS, la activación de factores de transcripción tales como el NF κ B y la expresión moléculas de adhesión, promoviendo el reclutamiento y activación de los neutrófilos en los tejidos pos-isquémicos (Frangogiannis 2007).

La IL-1b aparece como protagonista de la respuesta inflamatoria junto al TNFa. Ambas CQ, secretadas inicialmente por monocitos y macrófagos activados, poseen propiedades pro-inflamatorias por lo que inducen a macrófagos intestinales, fibroblastos, neutrófilos y células musculares a secretar otros mediadores solubles de la inflamación, como prostaglandinas y proteasas (Serracino-Inglott y col. 2001).

Otras CQ intervienen en el proceso de IIR; la IL-2 es producida por células T luego de su activación. Esta CQ tiene efectos importantes sobre otras células al activar linfocitos B, monocitos y células Natural Killer. Además, estimula la síntesis de interferon, e induce la liberación de IL-1 y TNFa.

La IL-8, sintetizada por células endoteliales y epiteliales, está involucrada en el proceso de quimiotaxis, atrayendo principalmente neutrófilos al sitio de lesión.

La IL-6 es segregada por macrófagos, células T, células endoteliales y fibroblastos. Su liberación está inducida por la IL-1 y se incrementa en respuesta a TNFa. Estudios experimentales han demostrado diferentes funciones de la IL-6 en respuesta a procesos inflamatorios, por lo que se considera que tiene actividad anti y pro-inflamatoria (Oltean y col. 2009).

La IL-10 es otra de las CQ con propiedades antiinflamatorias. IL-10 es producida por monocitos, macrófagos, células T y células epiteliales. Estudios *In vitro* demostraron que IL-10 inhibe la síntesis de TNFa, IL1 β e IL6. Estudios sobre IR intestinal realizados en modelos vivos demostraron efectos protectores de la IL-10, sin embargo, otras publicaciones sostienen que la IL-10 no tendría una actividad protectora en la IIR intestinal (Eltzschig and Eckle 2011).

3.6 Muerte Celular en respuesta a la IIR

3.6.1 Necrosis

La necrosis se define como aquellos cambios morfológicos que siguen a la muerte celular en un tejido u organismo vivo, y que se debe a la acción degenerativa de enzimas sobre las células lesionadas de forma letal. Considerada como “accidental”, la necrosis es el tipo de muerte que más afecta a las células en las fases iniciales de la IIR. Las alteraciones iónicas presentes en la patogénesis del daño por IR explicadas anteriormente, provocan que los mecanismos responsables de mantener la homeostasis dentro de la célula fallen. De esta manera, se acumula sodio en el espacio intracelular y en consecuencia, ingresa agua. Por tal motivo, las células que entran en el proceso de necrosis se hinchan hasta romper sus membranas, liberando componentes celulares al medio que las rodea y contribuyendo a amplificar el proceso de respuesta inflamatoria (Moquin and Chan 2010).

A diferencia de la apoptosis, la necrosis se produce por mecanismos no controlados y aleatorios en respuesta a un estrés que sobrepasa la capacidad adaptativa de la célula (McHugh and Turina 2006). Sin embargo, el concepto de necrosis programada, también denominado necroptosis, está ganando cada vez más aceptación, inclusive en el área de la IIR. Se sabe que el estrés celular o la activación del receptor de muerte moviliza y activa un grupo de quinasas serina - treonina llamadas proteínas de interacción con el receptor (PIR). En particular, PIR1 y PIR3 parecen actuar de coordinación como mediadores de necrosis (Kaczmarek y col. 2013).

3.6.2 Apoptosis

La apoptosis es un mecanismo de muerte celular programada que permite eliminar células sin dañar estructuras vecinas ni desencadenar una respuesta inflamatoria asociada, representando un proceso fisiológico de importancia que contribuye a mantener la homeostasis del organismo. Sin embargo, este tipo de muerte celular puede ser disparado por diversos procesos patológicos (White and Sullivan 1998).

La apoptosis depende de señales codificadas genéticamente o de actividades dentro de una célula moribunda que conducen a daño irreversible gracias a una cascada organizada dependiente de energía que lleva a la desfragmentación controlada del ADN y a la muerte celular, con la consiguiente remoción de restos celulares (cuerpos apoptóticos) sin respuesta inflamatoria asociada (Lopez-Neblina y col. 2005). La muerte celular programada puede ser activada a través de señales provenientes del interior de la célula (vía intrínseca) o mediante señales extracelulares (vía extrínseca). Aunque las etapas iniciales de estas vías son completamente diferentes, ambas están mediadas por la misma familia de proteasas, entre las que se destacan las caspasas. La vía de señalización intrínseca y la extrínseca convergen en un punto (caspasa 3) que conduce a una ruta común cuyo fin es activar enzimas endonucleasas para la fragmentación del ADN.

Las manifestaciones morfológicas básicas más relevantes que suceden durante la apoptosis incluyen la formación de ampollas en la membrana celular, la contracción de la célula, la lesión de la envoltura nuclear, la reorganización del citoesqueleto y la fragmentación del ADN (McHugh and Turina 2006).

La IIR dispara una respuesta de tipo intrínseca, la cual se ejecuta en respuesta a daño en el ADN. Las proteínas pro-apoptóticas que intervienen en esta vía de apoptosis derivan de una gran familia conocida como Bcl2, la cual posee subfamilias con actividad pro-apoptótica y otras con funciones antiapoptóticas (Lopez-Neblina y col. 2005).

La vía intrínseca de la apoptosis también es conocida como vía Mitocondrial, dado el rol protagónico de esta organela en este proceso de muerte celular. Como su nombre lo indica, la vía intrínseca se inicia dentro de la célula; los estímulos internos, tales como un daño genético irreparable, la hipoxia, concentraciones extremadamente altas de calcio citosólico y un estrés oxidativo severo, son disparadores para iniciar la vía mitocondrial o intrínseca. Independientemente del estímulo, esta vía es el resultado de una permeabilidad mitocondrial aumentada y de la liberación de moléculas pro-apoptóticas tales como la citocromo-c hacia el citoplasma. Esta vía está estrechamente regulada por un grupo de proteínas que pertenecen a la familia Bcl-2. Hay dos grupos principales de proteínas Bcl-2, específicamente las proteínas pro-apoptóticas (Bax, Bak, Bad, Bcl-Xs, Bid, Bik, Bim y Hrk) y las antiapoptóticas (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, Bfl-1 y Mcl-1) (Saikumar y col. 1998). En tanto las proteínas antiapoptóticas frenan la apoptosis bloqueando la liberación mitocondrial de citocromo-c, las proteínas pro-apoptóticas actúan promoviendo la liberación de citocromo-c desde la mitocondria hacia el citoplasma. El balance entre las proteínas pro- y antiapoptóticas es lo que determina si se va a iniciar o no la apoptosis. Además, existen otros factores apoptóticos que se liberan desde el espacio intermembranoso mitocondrial hacia el citoplasma, entre estos se destacan el factor inductor de apoptosis (FIA) y el segundo activador de caspasa derivado de mitocondria (Smarc) (Whelan y col. 2010).

Una vez liberado, el citocromo C se asocia con la Apaf-1 (*Apoptosis protease-activating factor-1*) y luego con la pro-caspasa 9 formando el apoptosoma. Una vez unida, la pro-caspasa 9 sufre un cambio de conformación dando lugar a su forma activa de caspasa-9, la cual es capaz de activar caspasas efectoras como la caspasa-3, 6 y 7. Esta sucesión de acontecimientos concluye en la activación de otras caspasas y de factores de degradación de ADN que se encargarían de fragmentar el material genético (Figura 12) (Eefting y col. 2004).

Durante un evento de IR, la cantidad de células muertas por apoptosis puede comprometer la vitalidad del órgano y llevarlo a una falla irreversible (Fishbein y col. 2004). Estudios realizados por nuestro grupo de investigación, donde se utilizó un modelo de autotrasplante renal en ratas, demostró que el pre-tratamiento con inmunosupresores tales como tacrolimus, rapamicina y micofenolato disminuyen el número de células apoptóticas en la fase de reperfusión, mejorando la funcionalidad de los riñones trasplantados (Cicora y col. 2011).

Figura 12: esquematización de la vía intrínseca de la apoptosis disparada por la IIR.

3.7 Proteína hemo-oxigenasa 1: proteína de shock térmico (HSP) de relevancia en el fenómeno de IR.

La hemo-oxigenasa (HO) es la principal enzima implicada en el catabolismo oxidativo del grupo hemo, produciendo como consecuencia tres derivados: biliverdina (la cual es convertida a bilirrubina), monóxido de carbono (CO) y hierro (Fe^{2+}).

La HO-1, también conocida como HSP-32 es una isoforma inducible de la HO a la cual se le atribuyen diversas propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y antiapoptóticas. Estos efectos no los logra solo por sí misma, si no que los lleva a cabo gracias a los productos que ella misma es capaz de generar. Su expresión se incrementa considerablemente en presencia de hipoxia, hiperoxia, endotoxinas, CQ, EROS y ERN, etc. La HO-1 aparece implicada en diversos procesos fisiopatológicos, entre los cuales

podemos mencionar enfermedades inflamatorias intestinales, trasplante de órganos y eventos de IR (Ollinger and Pratschke 2010).

La HO-1 previene el daño oxidativo en las células endoteliales y reduce la migración leucocitaria a través de la inhibición de la síntesis y liberación de mediadores inflamatorios, dentro de los que se incluyen radicales libres, agentes quimiotácticos y activadores celulares. La inducción de la enzima disminuye la expresión de E y P-selectinas inducidas por LPS en pulmón, riñón, hígado e intestinos, disminuye la expresión de la molécula de ICAM-1 endotelial e inhibe la adhesión leucocitaria generada por EROS (Geuken y col. 2005).

En procesos inflamatorios, como la IIR, el incremento en la expresión de la HO-1 traería como consecuencia la inhibición de hemoproteínas tales como la ciclooxigenasa (COX) y la iNOS, debido a una disminución en la disponibilidad del grupo hemo. Además, inhibe la transcripción del NFkB y disminuye la síntesis de IL1 β y TNF α incrementando la síntesis de IL-10 (citoquina con actividad antiinflamatoria) (Patel y col. 2004).

En lo que refiere a su capacidad antioxidante, la HO-1 actúa por medio de sus derivados bilirrubina y biliverdina, los cuales previenen la oxidación de ácidos grasos insaturados. En modelos experimentales de IR hepática, se ha demostrado que la supervivencia pos-trasplante hepático en ratas mejora ante la inducción de la HO-1. En trasplante de islotes pancreáticos, tanto el CO como la inducción de la HO-1 disminuyeron la apoptosis inducida por CD95/CD95L. En el caso de los trasplantes de corazón, la producción de CO generado por la HO-1 es capaz de suprimir el rechazo en xenotrasplantes (de ratones a ratas) y la biliverdina incrementa la supervivencia de los animales en modelos de trasplante cardiaco entre individuos con diferentes complejos mayor de histocompatibilidad (Liao y col. 2013).

3.8 Sistema del Complemento e IIR.

El complemento es un sistema complejo de proteínas plasmáticas o tisulares que por su mecanismo de acción pertenece a los sistemas enzimáticos, cuya activación se produce en forma de cascada. Está constituido por moléculas implicadas en la defensa del organismo, siendo el principal mecanismo efector de la inmunidad humoral además de poseer un gran poder inflamatorio. La mayor parte de los factores del complemento son proteínas plasmáticas y una pequeña proporción de ellos son proteínas de membrana (Hill and Ward 1971).

Entre las principales funciones del complemento se encuentra su acción citolítica, quimiotáctica, anafilotóxica, y facilitadora de la fagocitosis. Además, el complemento es regulador de la respuesta inmune, potenciador de la respuesta inflamatoria e interviene en el *clearence* de inmunocomplejos circulantes en sangre, los cuales suelen ser dañinos para el organismo (Chen y col. 2013).

Estudios clínicos y experimentales en diversos órganos han demostrado que eventos de IR provocan la activación del sistema del complemento, la cual se produce tempranamente iniciada la IIR, provocando la liberación de sustancias biológicamente activas entre las que se incluyen anafilotoxinas, factor 3a y 5a del complemento, y el complejo de ataque a membranas C5b-9, amplificando la respuesta inflamatoria.

Ensayos en ratones deficientes en las fracciones C3 y C4 del complemento demostraron la injerencia de este sistema en la fisiopatología de la IIR. Luego de un evento de IR en miembros inferiores, los animales carentes de fracciones del complemento demostraron una reducción importante en el grado de inflamación comparado con animales no deficientes (Arumugam y col. 2009).

3.9 Participación de la Inmunidad Innata en la IIR

El sistema inmune está compuesto por diversas células y moléculas que coordinan su acción frente a la entrada de sustancias ajenas al organismo. La respuesta inmune se puede en una respuesta de tipo innata y otra adaptativa o adquirida.

La inmunidad innata es la primera línea de defensa del organismo y permite controlar la mayor parte de los agentes patógenos. Se caracteriza por la baja especificidad, la escasa diversidad para el reconocimiento de antígenos extraños y por la falta de memoria inmunológica. Los principales componentes de este tipo de respuesta son las barreras físicas y químicas, constituidos por piel y mucosas, las proteínas de la sangre, incluyendo el sistema del complemento y otros mediadores de la inflamación como células fagocíticas (macrófagos, neutrófilos, células dendríticas y leucocitos como células natural killer, linfocitos T y B.) (Lenaerts y col. 2013). El sistema inmune innato puede reconocer estructuras peligrosas para el organismo y disparar mecanismos de defensa en respuesta. Para esto utiliza receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) como los Toll-like receptors (TLR) que se encuentran en los macrófagos, monocitos, células dendríticas, neutrófilos y células epiteliales permitiendo el reconocimiento de estructuras o patrones moleculares y enviando una señal de alarma al sistema inmune que activa mecanismos efectores no específicos, culminando en el establecimiento de un proceso inflamatorio.

Hay evidencia creciente que el sistema inmune desempeña un papel en la fisiopatología de la IIR, sin embargo, su influencia en este fenómeno todavía no está claramente determinada. En el área de los trasplantes de órganos, la IIR activa el sistema inmune provocando inflamación y aumentando la inmunogenicidad el injerto, lo que se traduce en una mayor probabilidad a disparar fenómenos de rechazo (Kreisel and Goldstein 2013).

3.10 Daño remoto como consecuencia de la IIR.

Los efectos adversos de la IIR no están necesariamente restringidos a los tejidos específicos donde sucede el evento (Santora y col. 2010). Una consecuencia de esta patología es la presencia de alteraciones en otros órganos (lesión en órganos remotos), fenómeno que puede darse en la mayoría de los tejidos que sufren un evento de IR, incluyendo intestino, pulmón, hígado, riñón, músculo esquelético y corazón. Los pulmones son especialmente vulnerables al daño remoto, en particular después de eventos de IR hepática o intestinal ya que en ambos casos los pulmones representan el primer gran lecho capilar por el cual pasa la sangre proveniente de los órganos afectados directamente por la IIR. En efecto, uno de los primeros síntomas clínicos de la falla multiorgánica es la disfunción respiratoria (Carden and Granger 2000).

Los mecanismos que intervienen en el desarrollo de lesiones remotas son en gran medida similares a los que producen el daño local durante la IIR. Las EROS y ERN, los leucocitos y diferentes mediadores inflamatorios juegan un papel principal en la expansión del daño por IR. La XO, enzima generadora de O_2^- y H_2O_2 , ha sido implicada como un factor importante en la lesión remota. El mecanismo por el cual la XO contribuye con el daño en órganos distantes no está claro, pero implicaría la generación de altas cantidades de EROS y reclutamiento de células polimorfonucleares en órganos alejados del foco inflamatorio inicial.

Los leucocitos juegan un papel importante en la lesión a órganos remotos. Estas células se activan en el lecho vascular pos-isquémico para posteriormente migrar y reclutarse en tejidos distantes donde se produce activación de células endoteliales, las cuales expresan moléculas de adhesión en su superficie (He y col. 2011).

Por último, la liberación sistémica de mediadores de la inflamación como CQ y la activación del complemento también han sido reportadas como mecanismos que

promueven y amplifican la lesión sistémica en respuesta a la IIR (de Arruda y col. 2006).

4-Injuria por isquemia-reperfusión intestinal

4.1 Características generales de la IIR intestinal

La IIR intestinal se presenta en situaciones clínicas donde el intestino es privado temporalmente de su flujo sanguíneo, como en el caso de hernias estranguladas, cirugía de aneurisma de aorta abdominal, enterocolitis necrotizante, vólvulo y TXI (Collard and Gelman 2001).

Pese a que durante un evento de IR intestinal los mecanismos intervinientes en la fisiopatología son iguales a los explicados anteriormente, este órgano posee ciertas características que lo diferencian del resto. Al estar compuesto por células que son fácilmente dañadas ante un evento de isquemia, se postula al intestino como uno de los órganos más susceptible a la IIR. Los enterocitos ubicados en la punta de la vellosidad son más propensos a dañarse que aquellos cercanos a la cripta intestinal, presentándose diferentes hipótesis que pretenden justificar esta característica (Hinnebusch y col. 2002). Por un lado, se ha demostrado que debido al mecanismo de irrigación de las vellosidades intestinales, los enterocitos localizados en el ápice de la vellosidad reciben una tensión de O₂ menor que las células cercanas a la base, lo que las predispone al daño. Otros estudios señalan que la sensibilidad de los enterocitos a la injuria está íntimamente relacionada con su grado de diferenciación, lo que justifica la mayor delicadeza de los enterocitos apicales a sufrir alteraciones. Una tercera hipótesis sostiene que la susceptibilidad de los enterocitos apicales estaría en relación a la exposición de estas células a fuerzas mecánicas dañinas provenientes desde el contenido intestinal (Kampp y col. 1968; Schoenberg and Beger 1993; Kong y col. 1998).

Durante un evento de IR la mucosa intestinal se convierte en productora de diversas proteínas de fase aguda y CQ, con formación de EROS y ERN, activación de neutrófilos y del sistema del complemento (van der Vliet and Bast 1992). Un evento de IR de gran magnitud puede provocar que el intestino pierda su capacidad de barrera, por lo que bacterias intraluminales y endotoxinas como lipopolisacáridos (LPS) de membrana de bacterias pasan a través del epitelio de la mucosa hacia la circulación sistémica, en procesos conocidos como translocación bacteriana y endotoxemia (Cerqueira y col. 2005). Estas bacterias viables se diseminan por todo el organismo (linfonódulos mesentéricos, hígado, bazo, pulmón, etc.) contribuyendo con los mecanismos ya descritos al desarrollo de lesiones remotas. Además, se ha hecho evidente que el intestino sometido a IR sintetiza mediadores de la inflamación dentro de los conductos linfáticos, por lo que parte de estos compuestos pro-inflamatorios llegan a la circulación sistémica a través del conducto torácico, destacando la importancia de la vía linfática en la expansión del daño por IR intestinal. Se ha demostrado en estudios experimentales que la ligadura del conducto linfático mesentérico atenúa el daño remoto disparado por la IIR intestinal (Haglund 1994; He y col. 2011).

En ciertas situaciones, el daño originado en el intestino se magnifica y compromete varios órganos y tejidos, dando lugar a un Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica (SIRS) que puede derivar en un Síndrome de Disfunción Orgánica Múltiple (SDOM), el cual suele tener como desenlace la muerte (Kinross y col. 2011).

4.2 SIRS y SDOM

El SIRS es un cuadro subclínico o clínico progresivo, que puede ser causado por una serie de condiciones clínicas incluyendo shock, pancreatitis, traumas, quemaduras y eventos de IR. En general, el SIRS juega un papel adaptativo en la supervivencia del huésped, pero en situaciones críticas la producción de mediadores de la inflamación no puede ser controlada, magnificándose aún más la respuesta y dando lugar al SDMO.

El SDOM (antes conocido como falla multiorgánica) se define como un cuadro clínico que se caracteriza por disfunción progresiva, y en ocasiones secuencial, de dos o más sistemas fisiológicos que no pueden mantener la homeostasis sin una intervención terapéutica. El SDOM se desencadena ante una respuesta inflamatoria o antiinflamatoria excesiva por parte del huésped.

Tanto en el SRIS como en el SDOM, la causa desencadenante puede ser infecciosa o de otra naturaleza (como es el ejemplo de la IIR). Recientemente se ha puesto mucha atención en el tracto gastrointestinal como posible fuente de mantenimiento de la respuesta inflamatoria, y se ha considerado a éste como el “motor” del SDMO (Rotstein 2000) (Figura 13).

Ante la presencia de una mucosa intestinal dañada, bacterias y endotoxinas pueden trasladarse desde el intestino hacia órganos distantes, expandiendo la injuria por el organismo. Las EROS desempeñan un papel fundamental en el daño de la mucosa intestinal luego de un evento de IR, los oxidantes generados en el intestino son capaces de inducir translocación del NF κ B en células de órganos distantes, las cuales inician la expresión de CQ con la subsiguiente quimiotaxis de células polimorfonucleares. Además, moléculas pro-inflamatorias se sintetizan desde el tracto gastrointestinal,

llegando a la circulación a través de la linfa mesentérica (Johnson and Mayers 2001; Marshall 2001).

La IIR intestinal reúne todos los factores necesarios para el desarrollo de un SDOM, cuadro que presenta una elevada morbi-mortalidad en unidades de cuidados intensivos. Por tal motivo, la IIR intestinal es un área de interés tanto en investigación como en la clínica, en búsqueda de una mejor comprensión del proceso y de estrategias para mitigar el daño.

Figura 13: el intestino como motor del SDOM. La IIR altera la barrera intestinal, dando lugar a translocación bacteriana (TB) y pasaje de LPS de bacterias Gram negativas, los cuales actúan directamente sobre órganos distantes e inducen la secreción de CQ por parte de monocitos y macrófagos (M-M). Además, el intestino dañado vierte CQ directamente a la circulación sistémica, magnificando la respuesta inflamatoria.

5-Estrategias para atenuar la IIR intestinal

Existe un amplio espectro de terapéuticas propuestas para atenuar la IIR en general e intestinal en particular. Por tal motivo, dada la extensa bibliografía disponible en cuanto a este tema, a continuación se describirán en detalle solo las 2 estrategias evaluadas durante el plan de tesis (ítems 5.1 y 5.2) y se realizará una mención general de las restantes (5.3).

5.1 Precondicionamiento Isquémico (PCI)

5.1.1 Generalidades

El PCI consiste en exponer un órgano, antes de períodos prolongados de isquemia, a períodos breves de isquemia seguidos de perfusión, aumentando así su resistencia a al daño por IR (Stringa y col. 2013).

El PCI fue descrito por Murry y col en 1986, quienes reportaron el proceso de PCI como estrategia para atenuar el daño por IR en el corazón. Utilizando un modelo de infarto de miocardio en perros, este grupo de investigación observó que cuatro episodios de 5 minutos de isquemia, cada uno seguido de 5 minutos de perfusión, conferían protección frente a una nueva lesión isquémica. En los perros que recibían PCI, la zona de miocardio infartada se reducía hasta un 70% en comparación con los animales no tratados, los cuales eran únicamente sometidos a 40 minutos de isquemia por oclusión coronaria reversible (Murry y col. 1986).

A raíz de estos experimentos, el PCI fue motivo de estudio en el área de la fisiopatología cardiovascular, sin embargo, su utilidad se ha demostrado en otros órganos como el riñón e hígado.

En 1993, Kuzuya y col publicaron que a las 12-24 horas posteriores al estímulo del PCI inicial, se desarrollaba una segunda ventana de protección (SVP). A diferencia de la protección precoz de corta duración ofrecida por el PCI, la cual es efectiva durante las primeras horas, la SVP ejerce su acción protectora durante 48-96 horas. La eficacia de la SVP ofrecida por el PCI es menor y los mecanismos efectores distintos. Por lo tanto, respecto a las lesiones por IR, el PCI induce una protección bifásica: primero un estímulo protector fuerte pero breve, seguido de una protección más tardía, menos potente y más larga (Figura 14). Otra característica del PCI sugiere que períodos repetitivos de esta estrategia no son aditivos ni acumulativos. En este sentido, tal como se observa en la Figura 15, múltiples episodios de PCI pueden convertir la protección bifásica en una protección monofásica, mientras que la amplitud de la protección no es aumentada ante aplicaciones reiteradas de PCI (Pasupathy and Homer-Vanniasinkam 2005).

Figura 14: protección bifásica del procedimiento de PCI. Se presenta una protección temprana (P1) de elevada magnitud protectora y una protección tardía (P2) que brinda una defensa más leve pero prolongada respecto a P1.

Figura 15: El tiempo de protección está determinado por el momento en que se aplica el último estímulo de PCI. Reiterados protocolos no tienen efecto aditivo, si no que pueden tornar una protección bifásica en monofásica.

5.1.2 Vías de señalización del PCI

Si bien es claro que diversas vías de señalización intracelular son necesarias, los mecanismos moleculares que median el fenómeno de protección originado por el PCI no han sido dilucidados en forma completa.

Diversas líneas de investigación, sobre todo en el área cardiovascular, están abocadas a esclarecer de qué manera el PCI es capaz de proteger un órgano contra la IIR. El primer avance importante en cuanto a los mecanismos del PCI se produjo cuando se evidenció que este fenómeno estaba mediado por receptores. Durante la fase isquémica del PCI, las células liberan numerosas sustancias químicas que incluyen adenosina, catecolaminas, bradicininas y opioides que colaboran a efectivizar el PCI (Pasupathy and Homer-Vanniasinkam 2005).

La adenosina es un catabolito que se origina dentro de la célula isquémica ante una hidrólisis neta de ATP. Producida a escasos segundos del inicio de la fase isquémica del PCI, la adenosina es liberada en grandes cantidades al espacio extracelular, ya que tiene la capacidad de salir fácilmente de la célula para unirse a receptores específicos de superficie. Estudios experimentales realizados en miocardio de conejos demostraron que si se bloquea el receptor de adenosina, el PCI es incapaz de disparar su mecanismo protector. Resultados similares fueron reportados en estudios donde se bloqueó el receptor de bradicininas, lo que sugiere su rol protagónico al momento de gatillar la respuesta del PCI (Thompson y col. 2012).

Por otro lado, se ha propuesto que los receptores opioides y adrenérgicos estarían implicados en el mecanismo protector del PCI. Al igual que para la adenosina y las bradicininas, se llegó a esta conclusión en modelos experimentales donde se evaluó el PCI bloqueando de manera selectiva receptores opioides o adrenérgicos, observando que en ese contexto el PCI era incapaz de ejercer su acción (Downey y col. 2007).

Los receptores de adenosina, bradicinina, catecolaminas y opioides mencionados, tienen en común que interactúan con la proteínaquinasa C (PKC), quien representa el primer elemento en de una cascada compleja compuesta por quinasas. Cuando estos receptores están ocupados, activan la proteína G, la cual provoca una serie de acontecimientos intracelulares (activación de una fosfolipasa de membrana que genera inositol trifosfato, el cual induce la liberación de calcio desde la reservas intracelulares no mitocondriales y diacilglicerol) que incluyen la activación de la PKC (Simkhovich y col 2013).

Se sabe que la PKC tiene un papel muy importante en la protección celular, y regula algunos procesos biológicos como metabolismo, transporte de iones y expresión de genes. Diversos estudios muestran que es responsable de algunos de los efectos beneficiosos del PCI. La activación de la PKC produce la fosforilación de distintas moléculas efectoras como tirosinquinasa y MAPK (incluyendo la MAPK p38) que conlleva un aumento de la tolerancia de las células frente al daño por IR.

La activación de la PKC puede inducir también la activación de diversos factores de transcripción, como NF κ B, principales responsables de los efectos protectores de la fase tardía del PC isquémico. Estos factores de transcripción modulan la expresión de determinados genes y dan lugar a la síntesis de proteínas como la SOD o HSP que se han propuesto como efectoras de la protección ejercida por el PCI. En el hígado, el PCI se asocia a la síntesis de varias formas inducibles de HSP: la HSP70, HSP72 y HSP73 y de la HO-1 (HSP32). La inducción de las HSP reduce la unión nuclear de factores de transcripción pro-inflamatorios y aumenta la capacidad antioxidante de las células. Ambos efectos pueden contribuir a la disminución de la formación de TNF α y a la atenuación de la respuesta inflamatoria. También se ha sugerido que el PCI puede disminuir la transcripción de genes como c-fos y c-jun, implicados en el desarrollo de la lesión por IR.

El papel de NFkB en los efectos del PCI no está totalmente esclarecido, puesto existen reportes en los que se ha demostrado que durante el PCI se inhibe la activación de NFkB, y que dicha inhibición es responsable de algunos de los efectos beneficiosos del PCI. Por otro lado, diversos autores afirman que la activación de NFkB contribuye a los efectos beneficiosos del PCI (Downey y col. 2007).

5.1.3 Aplicaciones clínicas del PCI

Hasta el momento, muy pocos estudios han evaluado los efectos del PCI en el campo de la cirugía humana. La aplicación del PCI en la clínica se remonta a trabajos desarrollados por Yellon y col como tratamiento quirúrgico complementario en cirugías cardíacas. Este grupo de trabajo demostró que 2 períodos de 3 minutos de isquemia seguidos de perfusión aplicados antes de una derivación de arterias coronarias reducían el daño de miocardio causado por la intervención (Pasupathy and Homer-Vanniasinkam 2005).

Existen evidencias sobre la aplicación del PCI en el campo de la cirugía hepática y pulmonar. Clavien y col. y Nuzzo y col. demostraron efectos beneficiosos de esta estrategia en la prevención del daño por IR en resecciones hepáticas. Los pacientes donde se aplicó PCI previo a una hepatectomía mostraron menor lesión celular hepática y endotelial. Sin embargo, no se pudo demostrar ninguna ventaja por parte del PCI en lo que respecta a la funcionalidad hepática, morbilidad y mortalidad pos-quirúrgica (Desai y col. 2008).

En el área del trasplante hepático, hígados preconditionados mostraron menor necrosis hepatocelular durante los primeros días pos-quirúrgicos en comparación con el grupo no tratado. A pesar de estos resultados positivos, los niveles de bilirrubina, el infiltrado de neutrófilos y la presencia de células apoptóticas fueron similares entre hígados que

recibieron PCI y los controles (Clavien y col. 2003). Continuando con los trasplantes de órganos, no existen trabajos clínicos abocados al estudio del PCI en el trasplante renal e intestinal, pese a que contar con evidencias clínicas en lo que respecta a la atenuación del daño por IR en los trasplantes de estos órganos sería muy valioso. Por un lado, entre el 20-30% de los injertos renales sufren no-función primaria, la cual puede ser causada por la IIR. Por otro lado, existe amplia evidencia que postula al intestino como uno de los órganos más sensibles al daño por IR, por lo que encontrar estrategias que atenúen este fenómeno permitiría mejorar los resultados pos-quirúrgicos en el TXI.

En cirugía de pulmón, Chen y col pinzaron la arteria pulmonar principal antes de una ablación pulmonar obteniendo resultados alentadores (Chen y col. 1999).

En un estudio clínico desarrollado en pacientes sometidos a una lesión en el antebrazo, Kharbanda y col observaron que el PCI redujo la activación de neutrófilos y el daño endotelial (Kharbanda y col. 2001).

Ensayos epidemiológicos reportaron datos sorprendentes al demostrar que pacientes con isquemia cerebral sostenida se recuperaban más rápidamente si habían sufrido algún ataque isquémico transitorio previo. En este contexto, se plantea una hipótesis que sostiene que los eventos isquémicos anteriores a la isquemia grave ejercerían un PCI que se refleja en un menor daño tisular y una mejor recuperación ante un cuadro de IIR agresivo (Pasupathy and Homer-Vanniasinkam 2005).

5.1.4 PCI intestinal

Los primeros trabajos donde se evalúa el PCI a nivel intestinal corresponden a aquellos publicados por Hotter y col. en 1996 (Hotter y col. 1996). Desde entonces y hasta la actualidad, el rol del PCI en el daño por IR constituye un tema de investigación

relevante en el campo de la cirugía intestinal, y diversos estudios experimentales pueden encontrarse en la bibliografía científica (Figura 16).

Figura 16: desde el primer reporte de PCI a nivel intestinal efectuado en 1996, diferentes artículos científicos abocados a esta temática se publican hasta la actualidad.

Pese a que puede observarse que diversas especies animales son utilizadas para realizar estos ensayos, el uso de ratas supera ampliamente a otros animales como conejos, cerdos, caninos y ratones (Figura 17). Por otro lado, existen varios modelos experimentales para el estudio de la IIR intestinal; entre estos, pueden mencionarse técnicas de isquemia transitoria por oclusión reversible de la AMS (ORAMS) y diferentes tipos de trasplante, alguno de los cuales se detallarán en el capítulo III (Figura 18).

La información necesaria para reportar las Figuras 16, 17 y 18 surgió de una búsqueda efectuada en el sitio de Internet *Pubmed* bajo la consigna “*intestinal ischemic preconditioning*” actualizada hasta el 1 de noviembre de 2013.

En general, los resultados obtenidos hasta el momento, postulan al PCI como una buena herramienta para combatir la IIR intestinal al atribuírsele capacidades tales como preservar la arquitectura del intestino, disminuir la traslocación bacteriana, estimular la

producción de HO-1, reducir la presencia de células apoptóticas, disminuir la expresión de Selectinas (y por ende la interacción leucocito-endotelial), mejorar la microcirculación, reducir la acumulación de Hipoxantina (disminuyendo las EROS), reducir la disfunción respiratoria mitocondrial y atenuar el daño remoto a nivel pulmonar (Aban y col. 2005).

Sin embargo, y pese a que los resultados positivos superan a los negativos, no todas las conclusiones respecto al rol del PCI son favorables. Se pueden encontrar posturas opuestas en cuanto a la expresión de genes luego del evento de IR intestinal. Por un lado, están aquellos que respaldan la idea de que el PCI regula la expresión de genes en pos de proteger el intestino, pero por otro, se ha reportado que el PCI no es capaz de ejercer esta función (Wang y col. 2011). Además, algunos investigadores comprobaron que ciertos protocolos de PCI no conservan la integridad del intestino luego de la IIR (Cohen y col. 1994).

Aunque los resultados obtenidos hasta la actualidad son mayoritariamente alentadores en cuanto a los efectos beneficiosos del PCI en la atenuación del daño por IR, diversas investigaciones ponen en duda la capacidad del PCI, por lo que aún hacen falta estudios y evidencias, sobre todo en el área del TXI, para pasar de la fase de experimentación a la aplicación clínica.

Figura 17: especies reportadas en estudios experimentales sobre PCI e IIR intestinal. La rata es la especie más utilizada. La única publicación indexada donde se utilizaron ratones fue realizada por nuestro grupo de trabajo.

Figura 18: el clampeo de la AMS y el trasplante intestinal heterotópico son los modelos experimentales más utilizados para el estudio del PCI en la IIR intestinal.

5.2 Tacrolimus

El TAC, descubierto en Japón en el año 1984, es un metabolito del hongo *Streptomyces Tsukubaensis*, ubicado dentro de los compuestos macrólidos (Goto y col. 1991). (Figura 19) Esta droga inmunosupresora, clasificada como inhibidor de la calcineurina, fue incorporada rápidamente a la práctica clínica de los trasplantes de órganos sólidos, donde se utiliza actualmente en la prevención y tratamiento del rechazo en el trasplante renal, hepático, cardíaco, pancreático e intestinal (Starzl y col. 1989). Además, se han obtenido resultados favorables en la utilización de TAC como tratamiento de ciertas enfermedades autoinmunes, entre las cuales se destaca la enfermedad inflamatoria intestinal. El mecanismo de acción del TAC se centra en la inhibición de los linfocitos T al unirse a las proteínas inmunofilinas intracitoplasmáticas de dichas células, lo que provoca una disminución de la producción de CQ (IL2, IL3, IL6, entre otras) (Sandborn, 2001).

Figura 19: estructura del TAC caracterizada por poseer un anillo macrocíclico, típico de los compuestos macrólidos.

Por sus propiedades lipofílicas, TAC atraviesa fácilmente la membrana plasmática, accediendo al espacio intracelular sin depender de receptores de superficie, donde se une a inmunofilinas creando un complejo inmunofilina-TAC. Este complejo bloquea la calcineurina, provocando una inhibición del factor regulador del proceso de transcripción intranuclear en células T activadas FN-AT. Este último paso evita la

transcripción del gen que codifica la IL-2, lo que conlleva a una menor activación por parte de las células T. Al actuar sobre la calcineurina, TAC tiene la capacidad de bloquear la transcripción de otros factores, entre los que se destaca el NF κ B. La inhibición específica de células T constituye la mayor contribución del TAC en el proceso de inmunosupresión. Sin embargo, toda la alteración celular inducida por TAC es un área aún en estudio. Varios estudios han demostrado que el TAC puede atenuar la IIR al disminuir el agotamiento del ATP, reducir la formación de radicales libres, inhibir las vías dependientes de calcio durante la fase inicial de la IIR e interferir en varias vías de señalización intracelular como el NF κ B (St Peter y col. 2003).

5.3 Otros tratamientos propuestos para atenuar la IIR intestinal

5.3.1 Hipotermia

Una de las primeras estrategias probadas para atenuar la IIR fue la reducción de la actividad celular a través del enfriamiento del órgano a 2-4°C. Aplicada hoy en día en todos los trasplantes, la hipotermia permite aumentar las horas de isquemia preservando la viabilidad del injerto, y es una de las pocas maniobras que ha recibido el aval de toda la comunidad médica.

El fundamento de la hipotermia radica en una disminución de las tasas metabólica y de hidrólisis, catalizada por diversas enzimas intracelulares. Sin embargo, la hipotermia no es capaz de inhibir completamente el metabolismo celular, generándose metabolitos sustancias tóxicas que dañan los tejidos. De esta manera queda claro que el almacenamiento hipotérmico no impide la muerte celular, si no que la retrasa.

Actualmente, la conservación en frío se realiza utilizando soluciones de preservación, las cuales constituyen por si mismas una estrategia útil en la disminución del daño por IR (Watson and Dark 2012).

5.3.2 Soluciones de preservación

En el caso de los trasplantes, para la hipotermia, se realiza la infusión vascular de líquidos fríos, con el objetivo de conseguir un enfriamiento homogéneo del órgano y proporcionar un lavado intravascular con arrastre de elementos sanguíneos (formas isoaglutininas y factores de coagulación) que dificultan la microcirculación. Estos líquidos, empleados para enfriar el órgano, han ido variando su composición, con nuevos aditivos para conferir al órgano una protección frente a los efectos de la isquemia y la hipotermia, constituyendo las diferentes soluciones de preservación

La conservación estática de órganos para trasplante por almacenamiento en frío se basa en la utilización de soluciones que contienen agentes específicos que permiten combatir la IIR. Un factor clave para una buena preservación es la composición de la solución, la cual debe contar con una baja viscosidad para facilitar el lavado de la sangre, incluir aminoácidos para mejorar la viabilidad, impermeabilizantes y coloides para prevenir el edema además de buffers, en búsqueda de mantener la homeostasis del pH.

Originalmente, se consideraba que para prevenir el edema celular era necesaria una solución con concentraciones altas de sodio y bajas de potasio. En este contexto, surgió la solución de la Universidad de Wisconsin (UW). Tiempo después, este concepto cambió completamente al observarse que las soluciones con altas concentraciones de potasio y bajas de sodio eran más efectivas. UW es una solución de conservación sobre la base del trisacárido rafinosa y anión lactobionato como impermeabilizante osmótico;

hidroxietil almidón como coloide y un buffer fosfato. Además posee glutatión y alopurinol como antioxidantes (Guibert y col. 2011).

La solución Celsior también es utilizada para la preservación de órganos. Celsior difiere de UW principalmente por la presencia en su composición de manitol (impermeabilizante) e histidina (buffer) y la ausencia de un compuesto coloide.

Histidina-Triptofano-Ketoglutarato (HTK) es una solución que posee entre sus componentes manitol, histidina y dos aminoácidos: triptófano, que es estabilizador de membrana y antioxidante, y Ketoglutarato, un sustrato para el metabolismo anaeróbico. Pese a que se han reportado ventajas del HTK sobre la UW en el TXI en lo que refiere al enfriamiento y lavado del órgano, son aún motivo de estudio y de controversia (Lema Zuluaga y col 2013).

Diversas soluciones de preservación son probadas en modelos experimentales. Polysol es una compleja solución con alta presión oncótica y una viscosidad 3 veces menor que UW. Además, contiene polietilenglicol como coloide, un buffer fosfato, un buffer sulfónico, rafinosa, gluconato, histidina y antioxidantes (Weiy col. 2007).

La preservación en frío y el lavado del órgano con UW se considera actualmente el “gold standard” para preservación de órganos abdominales. Este régimen protege eficazmente los riñones, el páncreas y el hígado pero es menos eficiente en cuanto a la Integridad y función intestinal. Por tal motivo, y en conclusión, la búsqueda de la solución de preservación óptima para el TXI necesita de más investigación en modelos de trasplante, a fin de cubrir las demandas fisiológicas del injerto intestinal durante la conservación y atenuar la IIR.

5.3.3 Antioxidantes

Durante el proceso de IR, los mecanismos antioxidantes fisiológicos se ven ampliamente superados por el estrés oxidativo característico de esta injuria. Estos mecanismos celulares de defensa están representados principalmente por la Superóxido Dismutasa (SOD) que cataliza la reacción entre dos radicales superóxido, generando peróxido de hidrógeno y O₂; la Catalasa, que convierte el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno molecular y la glutathion peroxidasa, que cataliza la oxidación de glutathion reducido y peróxido de hidrogeno (Mallick y col. 2004).

Estudios experimentales han reportado que la suplementación de antioxidantes es útil para disminuir el daño tisular originado por la IIR.

La administración de antioxidantes permite retrasar o prevenir la oxidación de otras moléculas. En la caso de la IIR, estas drogas actúan directamente anulando los efectos de las EROS sobre las estructuras celulares, por lo que su mecanismo de acción está íntimamente relacionado con el estrés oxidativo y la peroxidación lipídica, eventos ya descriptos en la introducción general.

Diversas drogas con propiedades antioxidantes, desde las más clásicas hasta las más exóticas, han sido probadas en modelos animales a fines de reportar sus propiedades en la disminución de la IIR (Sapalidis y col. 2013) (Figura 20).

Agente	Especie	Agente	Especie
Alopurinol	Ratas-caninos	Captopril	Ratas
Aminoguanidina	Ratas	Curcumina	Ratas
Bambú (S. senanensis)	Ratas	N-Acetyl Cisteína	Ratas-Cerdos-Conejos
Captopril	Ratas	Resveratrol	Ratas-Ratones
Curcumina	Ratas	SOD	Ratas

Figura 20: se mencionan solo algunas de la extensiva lista de drogas potencialmente aptas para ejercer un efecto antioxidante en la IIR intestinal.

5.3.4 Drogas inmunosupresoras

Además del TAC (descrito en el ítem 5.2) diversos tratamientos con drogas inmunosupresoras son objeto de estudio con el fin de evaluar su eficacia en la atenuación de la IIR intestinal.

Tal como se describió en la introducción general, cada vez existe más evidencia que denota el rol de la inmunidad innata en la IIR en general e intestinal en particular. De esta manera, surge la incógnita sobre el posible rol que tendrían los inmunosupresores en la disminución del daño por IR intestinal. Actualmente se cuenta con diversos trabajos experimentales que reportan el efecto de estas drogas en la IIR en diferentes modelos de trasplantes de órganos, de hecho, nuestro grupo de trabajo ha alcanzado

resultados alentadores en la utilización de tacrolimus, rapamicina, ciclosporina, micofenolato y sirolimus como estrategias capaces de disminuir el daño por IR en el trasplante renal. Sin embargo, en lo que refiere a este estudio a nivel intestinal, se cuenta con escasas evidencias experimentales, por lo que aún son necesarios estudios experimentales para dilucidar y comprender de mejor manera el rol de estas drogas en la IIR intestinal.

La ciclosporina y la rapamicina son potentes inmunosupresores que actúan sobre vías de señalización que incluyen a los linfocitos T-CD4 y se cree que podrían modular reacciones celulares inmunes e inflamatorias entre las que se incluye la IIR. Estudios experimentales indican que la ciclosporina y la rapamicina juegan un papel importante en la atenuación del daño por IR intestinal al disparar mecanismos citoprotectores y anti inflamatorios (Puglisi y col. 1996).

La Timoglobulina es una droga utilizada como terapia antitimocítica para prevenir el rechazo en los trasplantes de órganos en general e intestinal en particular. Pese a esto, actualmente existe muy poca bibliografía que evalúe el efecto de esta droga en la IIR intestinal. Utilizando un modelo experimental de IR intestinal en ratones, Watson y col reportaron que la Timoglobulina redujo notablemente el daño tisular, la infiltración de neutrófilos y linfocitos, la producción de CQ y la supervivencia pos-quirúrgica (Watson, y col. 2012).

5.3.5 Inhibidores de los leucocitos

Los leucocitos son células con una intensa actividad pro-inflamatoria en la IIR intestinal. Por tal motivo, la inhibición de estas células se considera un flanco a atacar al momento de plantear estrategias para disminuir el daño.

Las terapias orientadas a anular el efecto de los leucocitos pueden actuar de 3 maneras diferentes: **A-** evitando la activación, **B-** inhibiendo la síntesis de moléculas de adhesión por parte del leucocito, **C-** evitando la adhesión del leucocito al endotelio vascular (Figura 21).

Como se describió anteriormente, mediadores inflamatorios como leucotrienos (LT), factor activador de plaquetas (FAP) y TNF α son necesarios para la activación de los leucocitos, por lo tanto, la utilización de antagonistas de estos mediadores se traduce en una menor activación por parte de estas células.

La síntesis de moléculas de adhesión se realiza por transcripción, de esta manera, las estrategias que actúan tal como se describe en el ítem b, ejercen su acción sobre factores de transcripción como por ejemplo el NF κ B.

Por último, el bloqueo de la acción leucocito-endotelial se traduce en un menor infiltrado de células inflamatorias y en consecuencia, un menor daño provocado por la IR intestinal. En este contexto, los anticuerpos monoclonales representan las terapias más efectivas y específicas para inhibir la adhesión leucocitaria al endotelio vascular (Mallick y col. 2004).

Agente	Mecanismo
Anticuerpo Anti-TNF	Antagonista TNF
BN52021 y UK74505	Antagonistas FAP
CP-105,696	Antagonista LT
BAY11-7085	Inhibición NF-KB
GPI 7150 y M40401	Bloqueo de P-selectinas e ICAM-1
Olprinona	↓Expresión NF-KB, P-selectinas e ICAM-1

Figura 21: ejemplos de fármacos (y sus mecanismos de acción) estudiados como posibles terapéuticas para inhibir o disminuir la acción de los leucocitos durante la IIR.

5.3.6 Poscondicionamiento isquémico (POCI)

Existen situaciones clínicas (como por ejemplo hernias intestinales estranguladas) donde la isquemia es identificada cuando las lesiones ya están instaladas. Por lo tanto, el empleo del PCI como estrategia para atenuar la IIR se torna inviable. En este contexto, en el año 2003, Zhao y col. presentaron el concepto de POCI, el cual consiste en la realización de uno o más ciclos cortos de reperfusión seguido por uno o ciclos más cortos de isquemia inmediatamente después de concluida la fase de isquemia prolongada y antes del establecimiento de permanente reperfusión. Estos autores mostraron que al momento de atenuar el daño por IR, el POCI resultaba tan efectivo como el PCI.

Los mecanismos de acción del POCI aún no han sido revelados de manera completa, sin embargo, al igual que en el caso del PCI, se cree que la activación de los receptores de adenosina estaría relacionada al efecto protector del POCI.

Se sabe que la mayor producción de EROS sucede durante los primeros minutos de la reperusión, en este contexto, se cree que el POCI es capaz de disminuir el estrés oxidativo al ir posibilitando el ingreso de O₂ al tejido isquémico de manera gradual.

Al igual que en el caso del PCI, no existe un consenso sobre el protocolo de POCI más efectivo ni se sabe con certeza sus mecanismos de acción, por lo que es necesario contar con mayor evidencia experimental para que el POCI sea una realidad clínica (Dezfulian y col. 2013).

5.3.7 Terapia anticomplemento

Cada vez es más evidente el rol protagónico del sistema del complemento en la IIR, por lo que diversas terapias abocadas a bloquear diferentes componentes del complemento son evaluadas experimentalmente. La administración de antagonistas del receptor de la fracción C5a como de anticuerpos anti C5a demostraron ser eficaces al momento de atenuar el daño por IR intestinal de manera experimental. Aunque actualmente se cuenta con escasa o nula información sobre el uso Eculizumab y Compstatin como estrategias para atenuar el daño por IR intestinal, estas drogas con mecanismos anticomplemento aparecen como terapias prometedoras para disminuir este evento (Woodruff y col 2011; Chen y col. 2013).

CAPITULO I

CAPITULO I

Impacto del tiempo de isquemia en la injuria por isquemia-reperfusión intestinal en ratones.

Introducción

El término “isquemia” se define como una interrupción transitoria o permanente de la irrigación sanguínea de un órgano o tejido. La extensión de la lesión o muerte de las células, que impacta sobre la función de los tejidos, se ve influenciada tanto por la magnitud como por la duración de la isquemia. Por tal motivo, la restauración de flujo sanguíneo tan pronto como sea posible es el pilar de la lucha contra la lesión isquémica (O'Donnell and Nabel 2011).

Los órganos y tejidos muestran diferentes grados de susceptibilidad ante la isquemia, y las bases biológicas de estas diferencias no se conocen con exactitud. El cerebro es el órgano más sensible a las reducciones del suministro de sangre, presentando daños irreversibles detectables a los 20 minutos de ocurrida la isquemia (Ord y col. 1993). Clínicamente, el caso más común es la isquemia cerebral focal (denominado accidente cerebrovascular isquémico), que surge como una reducción en el flujo sanguíneo regional, localizado en un territorio vascular específico. El cerebro tiene significativamente menores niveles de actividad antioxidante que actúan como un mecanismo de protección, como por ejemplo, SOD, catalasa, glutatión peroxidasa, y hemo oxigenasa-1 a diferencia de lo observado en el corazón, en el hígado, en los riñones y en los pulmones (Damle y col. 2009; Adibhatla and Hatcher 2010). En este

sentido, la isquemia es mucho mejor tolerada por el tejido muscular esquelético, ya que es capaz de regenerar luego de una injuria de gran magnitud. En los casos donde lesiones arteriales agudas requieren la aplicación de torniquetes en carácter urgente, se puede observar que la isquemia de extremidades es bien tolerada siempre y cuando el torniquete se libere brevemente después de los primeros 90 a 120 minutos (Sapega y col. 1985).

Los tejidos que contienen escasa o nula vascularización prácticamente no están afectados por la isquemia. Un ejemplo serían los trasplantes de córnea, donde el tejido puede ser almacenado en los medios de cultivo durante 3 semanas presentando solo daños menores (Smith and Johnson 2010). Continuando en el área de los trasplantes, la isquemia es bien controlada en la clínica y determina la viabilidad del órgano para ser implantado o no en el receptor. De esta manera, según el órgano, el tiempo de isquemia permitido es a la actualidad: corazón, pulmón y bloque Cardiopulmonar hasta 6 horas; intestino, hígado y páncreas hasta 12 horas; riñón hasta 24 horas (Escalante, 2009).

Mientras que el "punto de no retorno" es bastante fácil de definir en el cerebro, en el corazón y en el riñón, la ventana de tiempo para una intervención exitosa es mucho más difícil de evaluar en el caso de isquemia intestinal (Kassahun y col. 2008). Por una parte, los síntomas clínicos son inicialmente sutiles, por lo que es imposible determinar con precisión el inicio de la isquemia, pero si el diagnóstico se realiza dentro de 24 horas después de la aparición de los síntomas y se realiza un tratamiento agresivo, la isquemia mesentérica aguda tiene alrededor de un 50% de supervivencia, mientras que esta tasa se reduce a 30% o menos cuando el diagnóstico se retrasa (Kalogeris y col. 2012).

Se ha reportado que la duración de la isquemia es directamente proporcional al daño intestinal (Bulkley, 1987). Los estudios de mecanismos básicos involucrados en la lesión por IR se llevan a cabo mayoritariamente en roedores de laboratorio para extrapolar posteriormente los resultados a la clínica. No obstante, no existen estudios realizados en roedores que detallen el impacto de diferentes tiempos de isquemia seguidos de un mismo período de reperusión. Por tal motivo, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de diferentes tiempos de isquemia caliente a nivel intestinal, considerando como parámetros el daño local, remoto y la supervivencia posquirúrgica de los animales intervenidos.

Experimento I

Materiales y Métodos

Animales

Se utilizaron 50 ratones de la cepa Balb/c, machos, adultos, con un peso de 30 ± 3 grs los cuales fueron alojados bajo condiciones macro y microambientales controladas. Los animales recibieron comida y agua ad-libitum hasta el momento del procedimiento quirúrgico.

Procedimiento quirúrgico y anestésico

Anestesia: se utilizó una combinación de Ketamina (100 mg/Kg) Diazepan (5 mg/Kg) y Atropina (0,04 mg/Kg) administrados vía intraperitoneal.

Cirugía: una vez logrado el plano anestésico deseado, los animales se colocan sobre la camilla operatoria en decúbito dorsal (Figura 19-A). Se realiza antisepsia con alcohol 70% y se prepara el campo quirúrgico mediante la colocación de gasas. Previamente a comenzar la cirugía, se coloca ungüento oftálmico para proteger las corneas de los animales. Además se administran 50 UI de heparina diluidas en 1 ml de solución fisiológica vía subcutánea y lidocaína (10 mg/Kg) en la piel y tejido celular subcutáneo de la zona a intervenir.

La cirugía comienza con una incisión xifo-púbica de piel (Figura 22-A), ingresando a la cavidad abdominal a través de la línea alba (Figura 22-B). Las asas intestinales son retiradas de la cavidad hacia el flanco izquierdo del animal, donde son protegidas con gasas embebidas en solución fisiológica a 37°C. A continuación se identifica y se diseca la arteria mesentérica superior (AMS) (Figura 22-C). Para realizar esta maniobra se utiliza instrumental de microcirugía y microscopio quirúrgico (10X) para magnificar el campo. Una vez aislada la AMS se ocluye con un *clamp* vascular y se provoca la isquemia intestinal (Figura 22-D). Este paso es de vital importancia ya que se debe evitar obstruir el tronco celiaco, el cual se ubica anatómicamente en íntima relación con la AMS. La correcta colocación del clamp se evidencia por un cambio inmediato en la coloración del intestino, el cual se torna pálido.

Luego del tiempo estipulado de isquemia se retira el *clamp* para dar paso a la reperusión, momento en que el intestino recupera su coloración fisiológica (Figura 22-E). Las asas intestinales son reintroducidas en la cavidad (Figura 22-F). Por último se realiza el cierre de la pared abdominal en dos planos (muscular y cutáneo) con sutura Nylon 5-0 (Figura 22-G) y se administran 2 ml de solución fisiológica tibia vía subcutánea.

Los animales se recuperan en una mantilla térmica a fin de evitar la hipotermia, la cual representa una de las principales causas de muerte pos-quirúrgica en roedores de laboratorio.

Figura 22-A: una vez anestesiados, los animales se colocan en decúbito dorsal para preparar el campo quirúrgico y comenzar la cirugía con una incisión xifo-púbica (línea punteada) de piel, tejido subcutáneo y línea alba.

Figura 22-B: abordaje de la cavidad abdominal. En un primer plano se presenta el hígado (H) y asas de intestino delgado (ID), las cuales son exteriorizadas de la cavidad.

Figura 22-C: identificación y disección microquirúrgica de la arteria mesentérica superior (AMS). En estrecha relación con esta arteria, se observa la vena porta (VP).

Figura 22-D: una vez aislada la AMS se coloca el *clamp* vascular (CL) para producir la isquemia intestinal. El intestino delgado isquémico (IDI) cambia inmediatamente su coloración, adquiriendo una palidez notoria.

Figura 22-E: transcurrido el tiempo estipulado de isquemia, el *clamp* es retirado, dando lugar a la reperfundición. En la imagen se observa el intestino delgado reperfundido (IDR).

Fotos: Gonzalo Irigoyen

Figura 22-F: el intestino reperfundido es reintroducido cuidadosamente en la cavidad abdominal.

Figura 22-G: último paso de la cirugía, el cual consiste en suturar la capa muscular y la piel con Nylon 5-0, utilizando un patrón de sutura continuo simple.

Diseño experimental

Los animales fueron divididos en 5 grupos según el tiempo de isquemia intestinal al cual fueron sometidos. El grupo 1 (N=11) recibió 30 minutos de isquemia, el 2 (N=11) 35 minutos. En los grupos 3 (N=11) y 4 (N=11) el tiempo de isquemia fue de 40 y 45 minutos respectivamente.

Treinta minutos pos-reperfusión se sacrificaron (mediante técnica de dislocación cervical) 5 animales de cada grupo para realizar la toma de muestras, la cual consistió en la obtención de hígado, pulmón derecho e intestino delgado. Según la bibliografía consultada, el yeyuno distal y el íleon proximal son los segmentos intestinales más sensibles a la IIR, por tal motivo, estas regiones fueron seleccionadas para la realización de estudios complementarios (Stallion y col. 2005).

Las muestras fueron fijadas en formol neutro al 10 %. Luego de ser deshidratadas y embebidas en parafina, se tiñeron con Hematoxilina-Eosina para su posterior análisis histopatológico según una escala compuesta por 9 grados descripta por Park y col en 1986, donde: 0=mucosa normal, 1= espacio subepitelial, 2= espacio subepitelial extendido, 3= desprendimiento epitelial, 4= vellosidades denudadas, 5= pérdida de tejido vellosa, 6= infarto de criptas, 7= infarto mucoso, 8= infarto transmural (ver Anexo I) (Park y col. 1990).

Los 6 animales restantes de cada grupo retornaron al bioterio para evaluar su supervivencia pos-quirúrgica. Se realizaron observaciones a las 3, 6, 12, 18, 24 y 30 horas pos-reperfusión.

Por último se incluyó un grupo Sham (N=6) en el cual se realizó el mismo procedimiento quirúrgico omitiendo el clampeo de la AMS. Tres animales

correspondientes a este grupo fueron sacrificados y muestreados 75 minutos luego de la laparotomía, simulando 45 minutos de isquemia más 30 minutos de reperusión. Las muestras fueron procesadas de igual manera que los grupos anteriormente descritos. En los 3 animales restantes se evaluó supervivencia pos-quirúrgica.

Análisis estadístico

Se utilizó estadística descriptiva para el informe de daño histopatológico intestinal provocado por la IIR, obteniéndose los resultados mediana, media y desvío estándar.

El método *Kaplan Meier* se aplicó para el análisis de supervivencia actuarial, comparando los grupos mediante el Log-rank test, donde se consideró como significativa una $p < 0.05$.

Resultados

Análisis Histopatológico

El daño intestinal evaluado según escala de Park demostró que el grupo Sham no sufrió alteraciones histológicas en ningún caso. En el grupo 1 se observó un *score* promedio de 0.6 ± 0.55 con una mediana de 0. En este grupo la observación más representativa fue edema localizado en la punta de la vellosidad, correspondiéndose este hallazgo con un grado 1 en la escala de Park. En el grupo 2, la mediana fue de 2, con un promedio de 1.8 ± 0.45 . Las alteraciones más características observadas en este grupo corresponden a edema subepitelial, que compromete toda la longitud de la vellosidad (Park 2).

Las muestras del grupo 3 mostraron mayor daño en comparación con los grupos ya descritos, con un promedio de 4.8 ± 2.25 y una mediana de 3. Tres de las 5 muestras correspondientes a este grupo tuvieron un grado 3 en la escala de Park, indicando desprendimiento de enterocitos de revestimiento. En las dos muestras restantes se observó pérdida de vellosidades e infarto de criptas. En el grupo 4 se encontraron hallazgos indicativos de daño intestinal severo, con un Park promedio de 5 ± 1.79 y una mediana de 4. Además de las lesiones encontradas en el grupo 3, se observaron extensas áreas de vellosidades denudadas y atrofia de la mucosa intestinal. (Figura 20)

Mientras que en las muestras de hígado no se observaron lesiones, los pulmones presentaron daño, el cual se manifestó por la presencia de infiltrado polimorfonuclear y aumento de espesor de los septos alveolares. El grado de injuria pulmonar fue similar en todos los grupos, con la excepción del Sham, donde no se observaron alteraciones (Figura 24).

Los animales que alcanzaron las 30 horas pos-reperfusión fueron sacrificados por dislocación cervical. En estos animales se tomaron muestras intestinales para realizar análisis histopatológico; en todos los casos, el intestino mostró una recuperación absoluta, evidenciándose un intestino normal, correspondiente con un grado 0 en la escala de Park.

Figura 24: estudio histológico del pulmón (hematoxilina-eosina, 10x). Los pulmones del grupo SH no presentaron alteraciones histológicas (A). Todos los animales sometidos a isquemia intestinal presentaron aumento de espesor de los septos alveolares e infiltrado de neutrófilos (B).

Figura 25: supervivencia en animales sometidos a diferentes tiempos de isquemia (*) $P < 0.001$ vs grupo 1 y 2. (#) $P < 0.001$ vs Sham y grupo 1.

Endotoxemia como posible causa de muerte pos-quirúrgica en ratones sometidos a injuria por isquemia-reperfusión intestinal.

Introducción

Ante un evento de isquemia con posterior perfusión, el tejido intestinal responde rápidamente aumentando su permeabilidad. Posteriormente, esta respuesta se traduce en cambios morfológicos e histológicos que ponen de manifiesto el daño causado por la injuria. El intestino isquémico, al ser reperfundido, libera mediadores pro-inflamatorios tales como CQ, Lipopolisacáridos (LPS), EROS y ERN proporcionales al grado de injuria local (Haglund 1994; Wang y col. 2011).

A diferencia de otros órganos expuestos a IIR, el intestino posee una flora bacteriana propia compuesta principalmente por bacterias Gram negativas, que representan un gran reservorio de endotoxinas de las cuales el LPS, glicolípido que compone la membrana externa de estas bacterias, aparece como uno de los mediadores más importantes ya que es capaz de migrar del intestino dañado y amplificar la respuesta inflamatoria al ser reconocida por un tipo de receptores llamados TLR que participan de la respuesta inmune innata tal como se describió en la introducción general (Lu y col. 2008).

Los TLRs son una familia de proteínas transmembrana pertenecientes al sistema inmune, involucrados en varias enfermedades (sepsis, aterosclerosis, asma, inmunodeficiencias y diabetes). Estos receptores son capaces de activar tanto la respuesta inmunológica innata como la adaptativa al reconocer componentes estructurales de diversos patógenos denominados “patrones moleculares asociados a patógenos”. Hasta el momento se conocen 11 TLRs en humanos y 13 en ratones El TLR4, ubicado principalmente en leucocitos y otros tipos de células, fue el primer TLRs

descrito en el humano y es de especial interés en el presente estudio (Arumugam y col. 2009).

LPS activa las vías de señalización de los TLR4, que conlleva al desarrollo de una respuesta inflamatoria para eliminar el patógeno (Figura 26). Sin embargo, bajo diferentes circunstancias, una sobreestimulación del TLR4 puede disparar una respuesta inflamatoria sistémica, culminando en hipotensión, shock, SDOM y en algunos casos muerte (Watson y col. 2012).

Como se ha descrito anteriormente, ante un caso de IIR, el intestino aumenta su permeabilidad con pasaje de mediadores inflamatorios a través de su pared hacia la circulación sistémica. LPS de bacterias propias del intestino migran del órgano donde se alojaban causando lesiones remotas en tejidos blanco tales como el pulmonar y el hepático (Turnage y col. 1994). Con el objetivo de evaluar la interacción LPS-TLR4 en el daño tisular y en la supervivencia pos-quirúrgica ante un evento de IR intestinal, se realizó el siguiente experimento utilizando ratones mutantes, los cuales representan una herramienta muy útil en el campo de la investigación básica.

Figura 26: TLR4 es el receptor para LPS. Para iniciar una respuesta a LPS TLR4 requiere de una molécula MD-2 y CD14 para interactuar funcionalmente con LPS. La vía de señalización de LPS-TLR4 conduce a la translocación de NFκB. En el interior de la célula esta señalización está mediada a través de la proteína adaptadora MyD88, pero también a través de una vía independiente de MyD88, conformada por una proteína adaptadora (TRIF).

Experimento II

Materiales y Métodos

Animales

Se utilizaron un total de 20 ratones (10 C3H/HeJ y 10 de C3H/HeN) con un peso promedio de 18 ± 3 grs, los cuales fueron alojados bajo condiciones macro y microambientales controladas. Los animales recibieron comida y agua ad-libitum hasta el momento del procedimiento quirúrgico.

Características de la cepa: Los animales de la cepa C3H/HeJ poseen una mutación espontánea en el locus de respuesta al lipopolisacárido (LPS). Actualmente, se sabe que esta mutación se dio específicamente en el receptor tipo TLR4 (mutación en TLR 4, gen Tlr4lps) característica que permite a estos ratones ser resistentes a las endotoxinas al no presentarse la interacción LPS-TLR4. Por otro lado, esta cepa es altamente susceptible a las infecciones por bacterias Gram negativas, tales como Salmonella entérica. Los animales de la cepa C3H/HeN no poseen la mutación en el receptor Toll-4, por lo que sirven como controles (Poltorak y col. 1998).

Procedimiento quirúrgico

Se utilizó el mismo protocolo anestésico y procedimiento quirúrgico descrito en el experimento I.

Diseño experimental

Los 20 animales fueron sometidos a 35 minutos de isquemia intestinal mediante clampeo reversible de AMS. Treinta minutos pos-reperfusión se sacrificaron 5 animales de cada cepa para la toma de muestras. Al igual que en el experimento anterior, se muestreó yeyuno distal.

En los restantes 10 animales (5 C3H/HeJ y 5 C3H/HeN) se evaluó supervivencia quirúrgica por el transcurso de 30 horas, realizando observaciones cada 6 horas luego de terminada la cirugía.

El procesamiento de las muestras y los estudios complementarios fueron realizados con la misma metodología que en el experimento I.

Análisis estadístico

Las variables discontinuas se evaluaron a través del test de Kruskal-Wallis seguido del estadístico Dunn's, para comparación múltiple. Por último, la prueba de *Log Rank Test* fue utilizada para comparar las curvas de supervivencia. Todo el análisis estadístico se realizó en el programa GraphPad software version 5.00© (San Diego, Estados Unidos).

Resultados

Histopatología

El grupo C3H/HeJ presentó un Park promedio de $1,2 \pm 0,4$, con una mediana de 1. La observación más representativa en este grupo fue edema localizado en la punta de la

vellosidad. Los animales C3H/HeN presentaron un Park promedio de $1,6 \pm 0,5$, con una mediana de 2. En este caso, la lesión más observada fue espacio subepitelial extendido, el cual abarca toda la longitud de la vellosidad. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre grupos. (Figura 27).

Figura 27: análisis histopatológico de intestino luego de 35 minutos de ischemia y 30 minutos de perfusión en animales mutantes y controles. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos.

Supervivencia

Mientras que el grupo C3H/HeJ presentó una supervivencia del 100 % luego de 30 horas pos-reperfusión, el 80 % los animales de la cepa control murieron durante el período de observación pos-quirúrgica. Un animal murió entre las 18 y 24 horas, 3 entre las 24 y 30 horas pos-reperfusión. El restante ratón C3H/HeN logró supervivencia de 30 horas (Figura 28).

Figura 28: Evaluación de supervivencia entre animales resistentes a LPS (C3H/HeJ) y animales sensibles (C3H/HeN) luego de 35 minutos de isquemia intestinal (*) $P < 0.001$ entre ambos grupos evaluados.

Discusión Capítulo I

La IIR es causa de morbilidad y mortalidad en varias enfermedades intestinales. Se ha reportado que el período de isquemia por sí solo, o cuando es acompañado por reperusión, es determinante en términos de alteraciones estructurales y/o funcionales del intestino (Toledo-Pereyra y col. 2004). Sin embargo, no se sabe con exactitud a partir de qué momento la isquemia adquiere magnitud suficiente como para disparar un SDOM y así comprometer la supervivencia de un individuo.

El modelo utilizado en el presente experimento demostró que los 5 minutos comprendidos entre los 35 y 40 minutos de isquemia marcan el período crítico que determina la muerte de los animales durante las primeras horas pos-reperusión.

Las muestras intestinales de los animales correspondientes a los grupos 1 y 2 presentaron edema en las vellosidades. No obstante, no se observaron lesiones más severas, como erosión de enterocitos. Por otro lado, en los grupos 3 y 4, los cuales fueron sometidos 40 y 45 minutos de isquemia respectivamente, se observó desprendimiento epitelial, como también denudación y atrofia de vellosidades. El daño provocado por la IR determina que el intestino pierda su función de barrera, dando lugar al paso de bacterias y endotoxinas a todo el organismo, desencadenando una respuesta sistémica con daño en órganos remotos y posterior muerte. Trabajos publicados por otros grupos de investigación postulan a la endotoxemia como una de las principales causas de muerte luego de un evento de IR intestinal (Turnage y col. 1994). Esta información motivó la realización del experimento II, donde se demostró que el LPS influencia en la supervivencia pos-quirúrgica de los animales intervenidos. Estos datos refuerzan la importancia de la endotoxemia en el daño sistémico pos-reperusión,

pudiendo atribuírsele, en gran medida, la responsabilidad de la muerte de los animales que sufren 35 o más minutos de isquemia intestinal reportadas en nuestra experiencia.

Sileri y col obtuvieron un 85 % de supervivencia 24 horas pos-reperfusión en ratas sometidas a 45 minutos de isquemia intestinal por clampeo reversible de la AMS (Sileri y col. 2004). Estos datos permiten deducir que existen diferencias significativas entre especies, presentándose los ratones más susceptibles a la IIR intestinal. La evaluación detallada sobre el impacto de los diferentes tiempos de isquemia en el daño intestinal y la supervivencia pos-quirúrgica en esta especie puede servir de guía para futuros trabajos a realizar por nuestro equipo u otros grupos de trabajo.

El presente capítulo permitió evidenciar que el tiempo de isquemia es un factor determinante en la gravedad de la IIR intestinal, considerando que las alteraciones histopatológicas observadas son directamente proporcionales al período de isquemia al que es sometido el intestino. Además, quedó demostrado que el daño ocasionado por la IIR repercute en órganos remotos y en la supervivencia pos-quirúrgica de los animales intervenidos. Es importante destacar que todos los grupos, independientemente del tiempo de isquemia al cual fueron sometidos, presentaron alteraciones a nivel pulmonar.

Al realizar una correlación entre el daño intestinal evaluado mediante la escala de Park y la supervivencia de cada grupo, podemos concluir que los grados superiores o iguales a 3 en la escala de Park observados durante la perfusión inmediata podrían predecir la muerte de los animales dentro de las primeras horas de perfusión.

En síntesis, los resultados presentados en el experimento I resultan relevantes para posteriores trabajos ya que permiten seleccionar el tiempo de isquemia más adecuado según la experiencia que se desee realizar. Teniendo en cuenta la supervivencia de los

animales, 30 y 35 minutos de isquemia intestinal permiten realizar estudios, observaciones y toma de muestras por períodos prolongados en comparación con 40 y 45 minutos. Sin embargo, el daño intestinal ocasionado por 30 y 35 minutos de isquemia resulta insuficiente para evaluar tratamientos que atenúen la IIR intestinal.

El experimento II destaca la importancia del LPS como disparador de SDOM y posterior muerte de los animales sometidos a IIR, demostrando que la inactividad de receptores TLR4 en la respuesta inflamatoria vuelve a los animales más resistentes a la IIR. Pese a que los ratones mutantes y los controles se comportaron de igual manera en lo que refiere al daño intestinal evaluado por microscopia óptica, se encontraron diferencias significativas en la supervivencia pos-quirúrgica de los mismos. Además, este ensayo permitió evidenciar una valiosa cualidad de la especie seleccionada para el trabajo, que es la posibilidad de utilizar animales transgénicos o mutantes, lo cual representa una herramienta muy valiosa para el desarrollo de líneas de investigación básica.

Por último, en este capítulo se describió detalladamente el procedimiento quirúrgico de isquemia intestinal por oclusión reversible de AMS en ratones, técnica que resulta reproducible y adecuada para la realización de ensayos cuyo fin sea el estudio de la IIR intestinal.

CAPITULO II

CAPITULO II

Evaluación del Precondicionamiento isquémico y pre-tratamiento con tacrolimus como estrategias para atenuar la injuria por isquemia-reperfusión intestinal en ratones.

Introducción

Los resultados obtenidos en diferentes trabajos de investigación básica postulan al PCI como una estrategia prometedora para atenuar la IIR. Por tal motivo, las expectativas para trasladar esta técnica del laboratorio a la práctica clínica, puntualmente al TXI, aumentan a medida que se incrementan las evidencias sobre la capacidad protectora del PCI frente al daño por IR (Mallick y col. 2005; Wang, 2009).

La bibliografía científica indica que se han evaluado alrededor de 30 protocolos distintos de PCI a nivel intestinal, los cuales varían en los tiempos de isquemia, tiempos de perfusión y cantidad de ciclos en que se repiten estos períodos, sin existir hasta el momento un consenso sobre cuál es el protocolo de PCI más adecuado para atenuar el daño por IR intestinal. Diversos grupos de investigación se han valido de diferentes especies animales para llevar a cabo experimentos abocados a la evaluación del PCI intestinal (Ferencz y col. 2002; Claesson y col. 2008; Gomes y col. 2011; Mareta y col. 2012). Sin embargo, hasta que nuestro grupo realizó el primer reporte, no existía evidencia sobre la utilización de ratones con estos propósitos. Vale recordar, que pese a la complejidad quirúrgica que presentan estos animales debido a su pequeño tamaño, los

ratones ofrecen diversas ventajas en comparación con otras especies animales como ratas y conejos, principalmente en lo que refiere a la diversidad genética de las cepas.

Además del PCI, varios pre-tratamientos ya descriptos en la introducción general han mostrado capacidad para atenuar el daño por IR mediante diferentes mecanismos. Entre estos, el TAC se presenta como una droga de interés para nuestro grupo de investigación, considerando que este inmunosupresor es ampliamente utilizado en el área de trasplante de órganos. Pese a que se han llevado a cabo diversos estudios para evaluar el efecto del PCI y el TAC en la disminución del daño por IR intestinal, ningún trabajo combina ambas estrategias en búsqueda de efectos sinérgicos o aditivos.

En el presente capítulo se describen 2 experimentos independientes que fueron realizados con los siguientes objetivos: Experimento 1: evaluar diferentes protocolos de PCI intestinal en ratones, seleccionando el protocolo más efectivo para continuar con el plan de trabajo.

Experimento 2: evaluar el efecto del PCI aplicado de manera independiente y en combinación con TAC como estrategias para atenuar la IIR intestinal en ratones, realizando estudios complementarios durante la reperusión inmediata (30 minutos) y luego de un período prolongado de reperusión (4 horas).

Experimento I

Materiales y Métodos

Animales

Se utilizaron 25 ratones de la cepa Balb/c (adquiridos en el bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias-UNLP), machos, adultos, con un peso de 27 ± 4 g los cuales fueron alojados bajo condiciones macro y microambientales controladas. Los animales recibieron comida y agua ad-libitum hasta el momento del procedimiento quirúrgico.

Procedimiento quirúrgico y anestésico

Anestesia: se utilizó una combinación de Ketamina (100 mg/Kg), Midazolan (5 mg/Kg) y Atropina (0,04 mg/Kg) administrados vía intraperitoneal. Además se aplicó lidocaína (10 mg/Kg) en la piel y tejido celular subcutáneo de la zona a intervenir.

Procedimiento quirúrgico: se utilizó la técnica de oclusión reversible de AMS (ORAMS) descrita en el Capítulo I.

Diseño experimental

Los animales fueron divididos en 5 grupos compuestos por 5 animales cada uno. Exceptuando el grupo control, el cual recibió IR intestinal sin ningún tratamiento, en cada uno de los grupos restantes se evaluó un protocolo de PCI diferente. En el PCI-1 se aplicaron 3 ciclos de 1 minuto de isquemia, cada uno seguido de un minuto de reperusión. El PCI-2 consistió en un ciclo de 10 minutos de isquemia, seguido de 10

minutos de reperfusion. Para realizar el PCI-3, se aplicaron 3 ciclos de 2 minutos de ischemia, cada uno seguido de 2 minutos de reperfusion. Por último, en el PCI-4 se efectuaron 2 ciclos de 5 minutos de ischemia, cada uno seguido por 5 minutos de reperfusion. Al finalizar los protocolos de PCI se aplico una ischemia intestinal prolongada de 40 minutos seguida de 30 minutos de reperfusion (Figura 29).

Una vez concluidos los 30 minutos de reperfusion, los animales, aún bajo los efectos de la anestesia, fueron sacrificados por dislocación cervical. A continuación, se tomaron muestras de intestino delgado para su estudio histopatológico, las cuales fueron fijadas en formol neutro al 10% y teñidas con hematoxilina-eosina (H-E).

Figura 29: representación esquemática de los diferentes protocolos de PCI aplicados previamente al evento de IR intestinal prolongado.

Análisis estadístico

Las variables discontinuas se evaluaron mediante test Kruskal-Wallis, seguido del estadístico Dunn's, enfrentando los diferentes protocolos de PCI vs el grupo CT. Todo el análisis estadístico se realizó en el programa GraphPad software version 5.00© (San Diego, Estados Unidos).

Resultados

Estudio Histopatológico

El daño intestinal fue evaluado según escala descrita por Park (ver Anexo I). Los grados de daño promedio en los diferentes grupos fueron los siguientes: CT: $5,4 \pm 1$; PCI 1: 3 ± 1 ; PCI 2: $1,6 \pm 0,8$; PCI 3: $6,6 \pm 1,3$ y PCI 4: $4,4 \pm 0,8$ (Figura 30).

Figura 30: evaluación de los diferentes protocolos de PCI según escala descrita por Park. Se observan diferencias significativas entre el grupo CT y el PCI 2 (*) $p < 0.05$.

Experimento II

Materiales y Métodos

Animales

Se utilizaron 95 ratones de la cepa Balb/c (provenientes del bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias-UNLP), machos, adultos, con un peso de 25 ± 3 g los cuales fueron alojados bajo condiciones macro y microambientales controladas. Los animales recibieron comida y agua ad-libitum hasta el momento del procedimiento quirúrgico.

Procedimiento quirúrgico y anestésico

Los animales fueron anestesiados con Isoflurano al 4 % para su inducción y al 1,5-2% para su mantenimiento intraquirúrgico. Como protocolo analgésico, además de aplicarse Lidocaína (10 mg/kg) en piel y tejido celular subcutáneo de la zona a incidir, se utilizó Tramadol a una dosis de 20 mg/kg vía subcutánea. La técnica de ORAMS realizada fue idéntica a la descripta previamente.

Diseño experimental

Los 95 animales fueron divididos en 5 grupos de 19 individuos cada uno. En todos los grupos, excepto el Sham (SH), la isquemia intestinal realizada mediante ORAMS fue de 40 minutos.

-Grupo Control (CT): ORAMS

-Grupo Precondicionamiento Isquémico (PCI): previamente a la ORAMS, se aplicó un ciclo de 10 minutos de isquemia seguido de 10 minutos de perfusión. Este protocolo se seleccionó teniendo en cuenta los resultados del Experimento I del presente capítulo.

-Grupo Tacrolimus (TAC): 12 horas previas a la ORAMS se administraron 3 mg/kg de TAC vía intragástrica.

-Grupo PCI + TAC: previamente a la ORAMS, se aplicaron ambas estrategias de la misma manera que fueron descritas en los grupos PCI y TAC.

-Grupo Sham (SH): se realizó el mismo procedimiento quirúrgico obviando la ORAMS.

Previo al desarrollo del presente protocolo, y con el fin de utilizar dosis adecuadas, se realizaron mediciones plasmáticas de TAC en 4 ratones Balb/c, los cuales recibieron 3mg/kg de TAC vía intragástrica 12 horas previas a la extracción de sangre. Al momento de la toma de muestras, estos animales fueron anestesiados con el protocolo ya descrito y sacrificados mediante técnica de exanguinación bajo inconsciencia.

Los valores plasmáticos de TAC fueron de 10.6 ± 1.5 ng/ml. Estos resultados evidenciaron niveles plasmáticos de TAC adecuados para desarrollar el experimento.

Una vez transcurridos los 40 minutos de isquemia intestinal se retiró el *clamp* vascular para dar paso a la perfusión. De los 14 animales de cada grupo, 8 fueron sacrificados a los 30 minutos pos-perfusión para obtener muestras de intestino delgado (Yeyuno distal), pulmón y sangre. Además, 5 animales fueron muestreados a las 4 horas de iniciada la perfusión, obteniendo muestras de intestino delgado, sangre, pulmón, hígado y riñón. Luego de la recuperación anestésica, los restantes 6 animales de cada grupo retornaron al bioterio para evaluación de supervivencia. (Figura 31)

Figura 31: representación esquemática del experimento II. En todos los grupos (excepto el SH) se realizó ORAMS por 40 minutos. El Muestreo 1 se efectuó a los 30 minutos de iniciada la reperusión. El Muestreo 2 se llevó a cabo una vez transcurridas 4 horas de reperusión. Por último, se evaluó supervivencia pos-quirúrgica.

Estudio Histopatológico

Las muestras de intestino delgado y pulmón fueron fijadas en formol neutro al 10 %. Luego de ser deshidratadas y embebidas en parafina, se tiñeron con H-E para su posterior observación y análisis a través de microscopia óptica. Para evaluar daño intestinal, se utilizó el índice descripto por Park (ver Anexo I).

En ambos tiempos de muestreo, el análisis de daño remoto originado a partir del evento de IR intestinal se realizó en tejido pulmonar, mediante una escala descripta por Zhou y col, donde se tienen en cuenta parámetro tales como infiltrado leucocitario, edema

intersticial, hemorragia, formación de membrana hialina y daño de células de vías aéreas (Zhou, y col. 2010) (ver Anexo II).

El tejido hepático y renal obtenido durante el muestreo a las 4 horas fue procesado para estudio histopatológico con el fin de ampliar la información sobre alteraciones remotas ocasionadas por la IIR intestinal y la capacidad de las diferentes estrategias empleadas para atenuar este daño. Para evaluar lesiones hepáticas se consideraron 3 parámetros: congestión sinusoidal, vacuolización de hepatocitos y presencia de edema en el parénquima. De acuerdo a la severidad, cada parámetro recibió un grado de lesión (0=normal; 1=leve; 2=moderado; 3= grave). Finalmente, cada muestra recibió un valor total dado por la sumatoria de los 3 parámetros considerados (ver Anexo III) (Sano y col. 2011). El daño renal se cuantificó otorgando a las observaciones el siguiente puntaje: riñón normal=0; presencia de degeneración hidrópica=1; presencia de necrosis tubular aguda (NTA) menor al 5% =1 presencia de NTA entre 5-25%= 2; presencia de NTA mayor al 25%= 3 (Cicora y col. 2010; Cicora y col. 2012) (ver anexo IV).

Estudio inmunohistoquímico: apoptosis

Las muestras de intestino delgado se fijaron en formol neutro al 10 %. Luego fueron deshidratadas y embebidas en parafina para realizar análisis de apoptosis mediante técnica de Tunel utilizando el kit comercial In Situ Cell Death TMR (Roche). Las imágenes fueron capturadas con microscopio confocal (SV1000, Olympus). El recuento de células apoptóticas se realizó con el programa CellSence dimensión de Olympus.

Estudio molecular: extracción de ARN, transcripción inversa y qPCR

Un segmento del intestino se colocó en un buffer de lisis y las muestras se homogeneizaron inmediatamente. La extracción del ARN total se realizó utilizando un Mini kit de Extracción de ARN Ilustra (GE Healthcare). La transcripción inversa se realizó mediante primers aleatorios y MMLV-transcriptasa inversa (Invitrogen, EE.UU.). La PCR en tiempo real se llevó a cabo siguiendo directivas del fabricante, utilizando el ciclador térmico iCycler (BioRad, EE.UU.) y primers específicos para CCL20 (Mip3 alpha), IL-1b, IL-6, TNFa. Se utilizó b-actin para la normalización de la expresión génica. Por último la diferencia relativa en la expresión de los diferentes genes se calculó mediante el método ΔCT .

Medición de Nitratos y Nitritos

Para evaluar estrés nitrativo, muestras de yeyuno distal fueron congeladas en solución fisiológica a -20°C . La medición de nitratos y nitritos se realizó mediante espectrofotometría, de acuerdo técnicas ya descriptas (Miranda y col. 2001; Beda and Nedospasov 2005).

Niveles de LDH plasmática

Luego de la toma de muestras, la sangre heparinizada fue centrifugada para obtener plasma. Los niveles de LDH se cuantificaron mediante espectrofotometría (longitud de onda 366 nanómetros), utilizando un kit enzimático UV optimizado.

Microscopía electrónica de Transmisión (MET)

Con el fin de evaluar lesiones ultraestructurales a nivel mitocondrial y apreciar si las estrategias planteadas eran capaces de proteger estas organelas, muestras de Yeyuno fueron fijadas en glutaraldehído y procesadas para su posterior observación. Este método complementario se realizó únicamente en las muestras de intestino obtenidas a los 30 minutos de reperfusión.

Evaluación de supervivencia

Durante las primeras 24 horas pos-reperfusión se realizaron observaciones cada 3 horas y del segundo al séptimo día se realizó una observación diaria.

Transcurrida una semana de la cirugía, los animales que lograron supervivencia fueron sacrificados mediante dislocación cervical.

Análisis estadístico

Las variables continuas fueron analizadas mediante Análisis de Varianza (ANOVA) seguido de la prueba de Dunnet. Las variables discontinuas se evaluaron a través del test de Kruskal-Wallis seguido del estadístico Dunn's, para comparación múltiple. Por último, la prueba de *Log Rank Test* fue utilizada para comparar las curvas de supervivencia. Todo el análisis estadístico se realizó en el programa GraphPad software version 5.00© (San Diego, Estados Unidos).

Resultados

Estudio Histopatológico

Histopatología intestinal 30 minutos pos-reperusión

Ninguna muestra del grupo SH presentó alteraciones (Park 0). El grupo CT arrojó un promedio de $4,1 \pm 0,8$ con una mediana de 4. Las observaciones más características se correspondieron con vellosidades denudadas e incluso pérdida completa de vellosidades. El grupo PCI tuvo un promedio de $1,6 \pm 1,1$ con una mediana de 1,5, el grupo TAC mostró un promedio $2,5 \pm 0,7$ y una mediana de 3. El grado de Park 3 fue el hallazgo más representativo del grupo TAC (erosión de enterocitos en 5 de las 8 muestras analizadas). El grupo PCI + TAC arrojó un promedio de $1,7 \pm 0,8$ con una puntuación media de 1,5. El 50% de las muestras de este grupo tuvieron un índice de Park 1, el cual se caracteriza por la presencia de edema que se limita a la punta de la vellosidad (Figura 32-A). Se hallaron Diferencias estadísticamente significativas entre el grupo CT vs grupo PCI y PCI+TAC ($p < 0,05$).

Histopatología intestinal 4 horas pos-reperusión

El grupo CT obtuvo un Park promedio de $3 \pm 1,2$, con una mediana de 3. El grupo TAC y PCI tuvieron un promedio $1,2 \pm 0,7$ y $0,2 \pm 0,4$, con medianas de 0 y 1, respectivamente. Todas las muestras de los grupos SH y PCI+TAC mostraron una pared intestinal normal. Diferencias estadísticamente significativas fueron halladas entre el grupo CT vs los grupos PCI y PCI+TAC (Figura 32-B). En la Figura 33 se observan algunas de las lesiones intestinales detectadas por microscopía óptica siguiendo el criterio reportado por Park.

Figura 32: análisis histológico intestinal a los 30 minutos (A) y 4 horas (B) de iniciada la reperusión en grupos sometidos a diferentes tratamientos descritos en materiales y métodos. (*) $p < 0,05$ vs grupos PCI y PCI+TAC (***) $p < 0,005$ vs grupo SH.

Figura 33: diferentes grados de índice de Park: Park 0 (33-A). Park 1: espacio subepitelial localizado en la punta de la vellosidad (33-B). Park 2: el espacio subepitelial se extiende a toda la vellosidad (33-C). Park 3: erosión de enterocitos (33-D) y Park 4: vellosidades desnudas (33-E).

Estudio inmunohistoquímico: apoptosis

Apoptosis 30 minutos pos-reperfusión

Teniendo en cuenta parámetros utilizados en diversos artículos científicos, el recuento se llevó a cabo considerando la cantidad de células apoptóticas presentes en 10 campos por muestra. (Figura 34-A). Todos los grupos que recibieron tratamientos simples y combinados fueron capaces de atenuar el daño de manera significativa.

Apoptosis 4 horas pos-reperfusión

Al igual que en el muestreo realizado a los 30 minutos de iniciada la reperfusión, todos los grupos que recibieron PCI, TAC o PCI+TAC disminuyeron considerablemente la cantidad de células apoptóticas respecto al grupo no tratado (CT) (Figura 34-B).

Figura 34: Apoptosis luego de 40 minutos de ischemia seguidos de 30 minutos (A) y 4 horas (B) de perfusión. Los tratamientos aplicados de manera independiente y conjunta disminuyeron la apoptosis respecto al grupo CT. (*) $p < 0,05$.

Las Figuras C representan a los grupos tratados y al SH; las Figuras D, con presencia de un gran número de células en apoptosis, corresponden al CT. En C-1 y D-1 se aprecian los núcleos celulares (DAPI). En C-2 y D-2, en color rojo, se observan los núcleos apoptóticos. Las figuras C-3 y D-3 constituyen la superposición (MERGE) de C-1 + C-2 y D-1 + D-2 respectivamente.

Niveles de Nitritos intestinales

Medición 30 minutos pos-reperusión

La IIR intestinal indujo un aumento considerable de nitritos intestinales. El grupo CT mostró los niveles más altos ($4,33 \pm 0,3$ nmol/mg), presentando diferencias significativas (*) $p < 0.01$ en comparación con los restantes 4 grupos en estudio (Figura 35-A).

Medición 4 horas pos-reperusión

El grupo CT mostró niveles de nitritos con un promedio $2,51 \pm 0,2$ nmol/mg, seguido por el grupo TAC ($2,24 \pm 0,1$ nmol/mg). Los grupos PCI y PCI+TAC tuvieron un valor promedio de $1,68 \pm 0,1$ y $1,31 \pm 0,1$ respectivamente. El grupo SH tuvo valores de $0,7 \pm 0,07$ nmol/mg. El grupo CT presentó diferencias significativas ($p < 0.01$) en comparación con los grupos PCI y PCI+TAC (Figura 35-B).

Figura 35: durante la reperusión inmediata, los pre-tratamientos disminuyen la producción de nitratos y nitritos a nivel intestinal (35-A) (**) $p < 0.01$ vs grupo SH, PCI, TAC y PCI + TAC. A las 4 horas pos-reperusión solo los grupos PCI y PCI+TAC son capaces de atenuar el estrés nitrativo (35-B) (**) $p < 0.01$ vs grupos SH, PCI y PCI+TAC.

Estudio molecular

Expresión de genes a nivel intestinal 30 minutos pos-reperusión

Considerando los marcadores analizados, la IIR manifestó diferentes impactos en referencia a la expresión génica a nivel intestinal (Figura 32). En el análisis realizado se observó un elevado aumento en la expresión de los genes para IL-6 e IL-1b (400 y 30 veces respectivamente) (Figura 36-A y 36-B). No obstante, el incremento de TNF α y CCL-20 a los 30 minutos pos-reperusión no arrojó resultados relevantes (Figura 36-C y 36-D). Pese a mostrar una tendencia a disminuir la expresión de IL-6 e IL-1b, el grupo PCI no arrojó diferencias estadísticamente significativas en comparación con el grupo

CT. Sin embargo, el pre-tratamiento con TAC y la combinación de PCI+TAC disminuyeron más de diez veces la expresión de IL-6 e IL-1b ($p < 0.05$ vs grupo CT).

Expresión de genes a nivel intestinal *4 horas pos-reperusión*

Solo se consideraron las interleuquinas más relevantes en la evaluación realizada a los 30' (IL-6 e IL-1b), descartando el análisis de CCL-20 y TNFa. No se evidenció expresión de genes en ninguno de los grupos, por lo que no se obtuvieron resultados para reportar en este tiempo de muestreo.

Figura 36: modulación en la expresión genes pro-inflamatorios a nivel intestinal luego del evento de IR. El gráfico muestra la expresión relativa de IL-6 (A), IL-1 β (B), CCL-20 (C) y TNF α (D) en muestras de Yeyuno. En todos los casos, los resultados se expresan de manera relativa a los valores del grupo SH (n=8). Se observaron diferencias significativas (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$ vs grupo CT.

Estudio histopatológico de lesiones remotas

Histopatología pulmonar *30 minutos pos-reperfusión*

La evaluación microscópica de pulmones mostró un parénquima normal en el grupo SH. Por el contrario, los pulmones del grupo CT mostraron cambios evidentes, con una puntuación general promedio de $5,8 \pm 1,5$. En estas muestras se observó infiltración moderada de neutrófilos, edema intersticial leve, descamación de células epiteliales bronquiales y hemorragia. En el grupo de PCI, el promedio de daño fue de $2 \pm 1,5$ con una mediana de 1. Este grupo reveló menos alteraciones en comparación con el CT, observándose leve infiltración de neutrófilos en todas las muestras como un hallazgo característico. Sólo tres pulmones del grupo PCI presentaron infiltración leucocitaria moderada acompañada de edema y hemorragia leve. El grupo TAC arrojó un promedio $2,5 \pm 1$ y una mediana de 3. En los pulmones del grupo TAC se observó edema leve e infiltración de neutrófilos de leve a moderada, sin alteraciones en el epitelio de células de la vía aérea ni hemorragia. Las muestras del grupo PCC + TAC presentaron alteraciones mínimas con un promedio de $1,2 \pm 0,4$ y una mediana de 1. Este grupo, junto con el SH, fue el único que mostró diferencias estadísticamente significativas vs el grupo CT (* $p < 0,05$) (Figura 37-A).

Histopatología pulmonar *4 horas pos-reperfusión*

El grupo SH no mostró alteraciones a excepción de dos muestras que presentaron infiltrado leve de neutrófilos. Los pulmones del grupo CT mostraron claras alteraciones, con un promedio de $6,6 \pm 1,8$. Las principales lesiones observadas en este grupo fueron infiltración de neutrófilos moderada (3 muestras) a grave (2 muestras), y hemorragia

Figura 38-A: pulmón normal, característico de los animales del grupo SH.

Figura 38-B: se observa arquitectura pulmonar alterada y formación de membranas hialinas (flechas).

Figura 38-C: los neutrófilos llegan al pulmón por vía intravascular (flechas) para participar del daño remoto originado por la IIR intestinal.

Figura 38-D: la hemorragia es uno de los parámetros considerados para la evaluación del daño pulmonar. En el caso de esta foto se presenta de manera moderada.

Figura 38-E: fotografía que representa las observaciones microscópicas características de los animales que sufrieron mayor daño pulmonar luego del evento de IR. Además del claro aumento en la celularidad pulmonar, se aprecia hemorragia severa (flechas blancas), daño en vías aéreas (flechas rojas) y edema (flechas amarillas).

Figura 38-F: se identifica con más detalle la presencia de edema pulmonar (flechas).

Histopatología hepática 4 horas pos-reperusión

Los animales del grupo SH no presentaron alteraciones hepáticas. Las lesiones más características del grupo CT comprendieron presencia de congestión sinusoidal y vacuolización hepática de leve a moderada (Figura 40). Solo se observó edema leve en una muestra de este grupo. En los 3 grupos tratados predominó la vacuolización de hepatocitos en carácter leve, observándose únicamente congestión sinusoidal leve en un hígado del grupo PCI y varias muestras sin signos histológicos de daño (Figura 39).

Figura 39: evaluación histológica del tejido hepático a las 4 horas de iniciada la IIR intestinal. Solo el grupo PCI+TAC disminuyó significativamente el daño remoto a nivel hepático en comparación con el grupo CT, el cual obtuvo los scores más elevados (*) $p < 0,05$ entre grupo CT vs grupos SH y PCI + TAC.

Figura 40: los grupos SH y PCI+TAC no evidenciaron alteraciones hepáticas luego de 4 horas de iniciada la IIR. (A-1 y A-2).

El grupo CT fue el que presentó mayor daño remoto. En las fotos B-1 y B-2 se observa congestión sinusoidal y vacuolización moderada de los hepatocitos.

Histopatología renal 4 horas pos-reperfusión

Todas las muestras del grupo control presentaron degeneración hidrópica y necrosis en porcentajes menores al 5% en 3 muestras y entre 5-25% en las 2 restantes (Figura 42).

Los grupos PCI y PCI+TAC presentaron en todos los casos, únicamente degeneración hidrópica, por lo que su puntuación respecto al daño fue de 1. Los animales que recibieron TAC evidenciaron una situación intermedia entre el grupo CT y los grupos PCI y PCI+TAC ya que además de presentar degeneración hidrópica en las 5 muestras evidenciaron necrosis (<5%) en dos de las mismas (Figura 41).

Figura 41: todos los grupos, con excepción del TAC, evidenciaron un menor grado de alteraciones renales en comparación con el grupo CT. (*) $p < 0,05$ entre grupo CT vs SH, PCI y PCI + TAC.

Figura 42: histología renal de los grupos SH (A-1 y A-2), CT (B-1 y B-2) y grupos tratados (C-1 y C-2).

Niveles de LDH plasmática

Los resultados de este método complementario se expresan mediante el promedio y el desvío estándar en mU/ml.

Niveles de LDH 30 minutos pos-reperusión

En los animales del grupo CT se observaron los niveles más elevados de LDH plasmática ($1304,6 \pm 573,5$). Los grupos PCI y TAC arrojaron valores de $809,8 \pm 294,8$ y $993,8 \pm 488,5$, respectivamente. Los valores más bajos de LDH correspondieron a los grupos PCI+TAC ($632,2 \pm 158,4$) y SH ($371,1 \pm 49,2$). Los tratamientos evaluados no disminuyen el nivel de LDH plasmática en comparación al grupo CT (Figura 43-A).

Niveles de LDH 4 horas pos-reperusión

Los niveles de LDH plasmática para cada grupo, expresados como promedio más desvío estándar fueron: SH: 550 ± 301 ; CT: $1696,25 \pm 339,4$; PCI: $1188,7 \pm 156,3$; TAC: $1270 \pm 450,9$ y PCI+TAC: $912,5 \pm 169,7$ mU/ml. (Figura 43-B).

Figura 43: pese a observarse una tendencia por parte de las estrategias propuestas en la disminución de LDH, no se hallaron diferencias estadísticamente significativas (A) Solo el grupo donde se aplicaron ambas estrategias (PCI+TAC) fue capaz de atenuar significativamente el nivel de LDH plasmática a las 4 horas de repercusión intestinal. (*) $p < 0,05$ (B).

Evaluación ultraestructural de mitocondrias por MET.

Como se mencionó en la introducción general, las mitocondrias son organelas que desempeñan un papel relevante en la IIR. Por tal motivo se desarrolló este método complementario, donde las lesiones mitocondriales más características observadas en los diferentes grupos fueron:

Grupo CT: dilatación y ruptura de crestas mitocondriales. También se observa moderada separación de las membranas interna y externa, con vacuolización y tumefacción de la matriz (Figura 44-A).

Grupo PCI: dilatación de crestas y leve separación entre las membranas mitocondriales interna y externa (Figura 44-B).

Grupo TAC: vacuolización moderada de la matriz mitocondrial (Figura 44-C).

Grupo PCI+TAC: vacuolización leve de la matriz mitocondrial (Figura 44-D).

Figura 44: alteraciones ultraestructurales en mitocondrias de enterocitos luego de la IIR. Las flechas indican las lesiones más representativas de cada grupo. Grupo CT (44-A), Grupo PCI (44-B), Grupo TAC (44-C), Grupo PCI+ TAC (44-D).

Supervivencia pos-quirúrgica

Todos los animales del grupo CT murieron dentro de 24 horas pos-reperfusión (3 entre 15 y 18 horas y 3 entre 21 y 24). En el grupo de TAC, 2 animales murieron entre 21 y 24 horas y 4 alcanzaron los 7 días de supervivencia. El 100% de los animales de los grupos SH, PCI y PCI + TAC sobrevivieron una semana pos-reperfusión (Figura 45). Estos animales se muestrearon al azar para obtener muestras intestinales y realizar el análisis histológico. Como era de esperar, luego de una semana, el intestino se encontró totalmente recuperado, por lo que todas las muestras arrojaron un índice de Park 0 (datos no presentados). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo CT vs grupos SH, PCI, TAC y PCI+TAC.

Figura 45: curva de supervivencia en los diferentes grupos (n=6) luego de 40 minutos de isquemia intestinal (a excepción del grupo SH). Se observaron diferencias significativas (*) $p < 0,002$ vs grupos SH, PCI, TAC y PCI + TAC.

Discusión Capítulo II

Entre los órganos abdominales, el intestino es probablemente el más sensible a la IIR, evento que causa elevada morbi-mortalidad en diversas enfermedades intestinales (Taha y col. 2010). Por tal motivo, el establecimiento de estrategias para mitigar este daño y mejorar la supervivencia pos-quirúrgica son objetivos de relevancia tanto en investigación básica como traslacional, dentro del campo de la cirugía intestinal, incluyendo el trasplante.

El PCI se postula como una estrategia fácilmente trasladable del laboratorio a la clínica. Sin embargo, este tratamiento se encuentra aún en etapas experimentales para el tejido intestinal y no existe consenso sobre el protocolo más eficaz. Por tal motivo, y ante la escasez de bibliografía científica abocada al fenómeno de PCI intestinal en ratones, realizamos el experimento I en busca de comparar diversos protocolos de PCI. Nuestros resultados indican que un ciclo de 10 minutos de isquemia seguido de 10 minutos de reperusión, aplicado previamente a un período de isquemia prolongado, aparece como un protocolo eficaz en la disminución del daño, coincidiendo con trabajos de otros autores (Aksoyek y col. 2002; Abrahao y col. 2004). Asimismo, algunos protocolos no solo no atenúan la IIR intestinal, si no que son capaces de dañar con igual o mayor intensidad en comparación con los animales no tratados tal como muestra la Figura 30. En este contexto, se ha reportado que puede aparecer tolerancia al PCI en aquellos casos donde el protocolo requiera isquemias breves repetidas, como en el caso de los protocolos PCI 1, PCI 3 y PCI 4 evaluados en este capítulo (Cohen y col. 1994).

Luego de haber evaluado los resultados del experimento I se seleccionó el PCI2 para continuar con la línea de trabajo ya que fue el único de los protocolos aplicados capaz

de atenuar la IIR intestinal. Los protocolos de PCI 1, 3 y 4 (Figura 30) fueron descartados debido a que no evidenciaron efectos protectores contra el daño por IR.

Pese a que diversos estudios experimentales han demostrado el efecto positivo del PCI en la IIR intestinal, nuestro grupo de trabajo es pionero en evaluar la combinación del PCI con una droga inmunosupresora, en este caso TAC. Hemos establecido un modelo que proporciona información útil para establecer la contribución relativa de cada estrategia preventiva para ser utilizado en la cirugía intestinal experimental o trasplante, en situaciones donde la IIR constituye una amenaza. Nuestros resultados indican que cada tratamiento aplicado de manera independiente tiene un gran impacto en diferentes parámetros estudiados, tales como la integridad histológica del intestino o la expresión de genes de carácter pro-inflamatorio.

El fenómeno PCI se ha observado en diferentes órganos, y varios mecanismos pueden contribuir a la acción protectora de esta estrategia contra la IIR, entre ellos, la disminución en el consumo de ATP, la reducción de la glucólisis, la menor demanda de energía, la preservación de la integridad mitocondrial y una menor producción de EROS y ERN (Abu-Amara y col. 2011; Xue y col. 2012).

Nuestros resultados ponen de manifiesto el impacto del PCI en la disminución del daño por IR al preservar la histología intestinal durante la reperusión inmediata y luego de períodos más prolongados de reperusión, como también en una mejor supervivencia de los animales que recibieron PCI en comparación con los no tratados tal como se reporta en la Figura 45.

Diversos trabajos experimentales en roedores han informado sobre el efecto beneficioso del pre-tratamiento inmunosupresor en para atenuar la IIR. Cicora y col demostraron

que el pre-tratamiento con TAC y rapamicina causa reducción de necrosis y apoptosis como así también una mejoría clínica en ratas que recibieron un trasplante renal isogénico (Cicora y col. 2012). Resultados presentados en el presente capítulo coinciden en el rol del TAC en la atenuación del proceso de apoptosis y en la mejor supervivencia de los animales pre-tratados. Sin embargo, y pese a observarse una tendencia a disminuir el daño, el TAC aplicado de manera independiente no evidenció diferencias significativas respecto al grupo CT en las evaluaciones histológicas realizadas a nivel intestinal.

En este estudio se pudo demostrar una correlación entre el daño intestinal y la tasa de supervivencia. Todos los grupos de animales que presentaron un grado menor que 3 en la escala de Park mostraron una buena tasa de supervivencia a largo plazo. Por otra parte, el grupo no tratado, cuyos ratones presentaron valores de Park de 4 o más durante la reperusión inmediata, murieron dentro de las primeras 24 horas de iniciada la IIR. En los animales que inmediatamente iniciada la reperusión presentan grado de daño 3 no puede realizarse un pronóstico de supervivencia, ya que estos ratones pueden sobrevivir o morir. En este contexto, nuestra hipótesis sostiene que la supervivencia depende de la extensión de la erosión de los enterocitos, característica de este grado, a lo largo de la longitud intestinal. Vale recordar que la biopsia donde se efectúa el estudio solo representa un pequeño segmento del intestino, por lo tanto, el resultado podría no representar la gravedad de la lesión del tejido y su extensión. Este inconveniente al momento de realizar un análisis histopatológico del intestino se hace presente en situaciones clínicas, ya que la o las biopsias obtenidas de los pacientes deben ser de pequeño tamaño, por lo que muchas veces no reflejan lo que está sucediendo en toda la longitud intestinal.

La mayoría de los ratones tratados sobrevivieron, a excepción de 2 animales pre-tratados con TAC que murieron dentro de las 21 y 24 horas de iniciada la reperusión. En el análisis histológico, este grupo mostró la segunda mayor puntuación de Park después del grupo CT (Figura 32).

Se ha reportado que el tratamiento de donantes con TAC reduce la activación de la vía NF κ B, lo que lleva a una reducción del proceso inflamatorio con menor destrucción de los tejidos y daño de órganos a distancia (Oltean y col. 2006). Nuestros resultados indican que el pre-tratamiento con TAC tiene un impacto considerable en la producción temprana de CQ pro-inflamatorias en el intestino, tales como IL - 6 e IL - 1b. Por su parte, el PCI sólo afecta marginalmente la expresión de estas CQ. Respecto al TNFa, no hemos detectado una alta expresión a nivel intestinal en las muestras tomadas durante la reperusión inmediata (30 minutos), lo que indica que esta CQ no estaría involucrada en los eventos iniciales de la patogenia de la IIR, tal como sugirieron otros autores (Stallion y col. 2002; Grootjans y col. 2010).

Pese a que hemos podido realizar una correlación entre el daño histológico y la supervivencia pos-quirúrgica, la expresión intestinal de CQ no permitió realizar el mismo análisis, ya que la producción local de las mismas no se correlacionó con el daño tisular y la supervivencia. En la Figura 36 se puede observar una alta expresión de IL -6 e IL -1b en el grupo PCI. Pese a esto, los animales preconditionados obtuvieron un 100 % de supervivencia pos-quirúrgica. Estos resultados coinciden con los de otros grupos de investigación que han llegado a conclusiones similares. Utilizando un modelo de TXI en ratas, Wang y col demostraron que la expresión de CQ no es capaz de predecir el efecto protector del PCI contra el daño por IR (Wang y col. 2011).

La producción de nitritos es una medida aproximada de las ERN, principalmente por la activación de NOS inducible a nivel intestinal (Suzuki y col. 2000; Barocelli y col. 2006). La activación de la NOS inducible representa un punto importante en el desarrollo de la IIR intestinal y el PCI se presenta como un mecanismo protector al inhibir la NOS. Considerando la gran cantidad de bibliografía científica donde se evalúan las EROS en la IIR intestinal, hemos decidido inclinarnos hacia el impacto del estrés nitrosativo, el cual se encuentra menos considerado. En nuestro estudio se evidenció una buena correlación entre este indicador y el daño tisular observado en el intestino, al mostrar los efectos protectores de los diferentes tratamientos utilizados, sobre todo en la fase de reperfusión inmediata (Figura 35-A) momento en el que se producen la mayor cantidad de ERO y ERN.

Las estrategias propuestas disminuyeron de manera eficaz la presencia de células apoptóticas en el intestino reperfundido. Analizando los resultados obtenidos, nuestra hipótesis sostiene que una disminución en la producción de ERN (Figura 35) repercute en menos alteraciones ultraestructurales a nivel mitocondrial (Figura 44), lo que se ve reflejado al momento de analizar la cantidad de células apoptóticas a nivel intestinal luego del evento IR. Vale recordar que las mitocondrias desempeñan un papel fundamental en el proceso de apoptosis disparada por la vía intrínseca, la cual es característica de la IIR.

Durante el presente capítulo, también hemos observado que el daño en órganos remotos puede apreciarse en el pulmón ya los 30 minutos de iniciada la reperfusión. En el muestreo II, donde se realizó la toma de muestras luego de un período prolongado de reperfusión (4 horas), los órganos remotos estudiados (pulmón, riñón e hígado) presentaron alteraciones histopatológicas. En este punto resulta interesante observar en

las Figuras 37, 39 y 41 como la combinación del PCI+TAC, en comparación con el grupo CT, fue capaz de reducir significativamente la gravedad del daño en los 3 órganos remotos evaluados. Por otro lado, y pese a apreciarse una tendencia a la disminución del daño remoto, las estrategias aplicadas de manera independiente no atenuaron de manera significativa estas lesiones, observándose una sola excepción en la evaluación del daño renal, donde el PCI aplicado sin combinación con el TAC fue capaz de reducir notoriamente el daño.

En concordancia con estos resultados, y pese a que es una medición muy inespecífica, los niveles de LDH a las 4 horas evidencian que el grupo PCI+TAC es el que presenta menos lesión sistémica (Figura 43-B). Por su parte, el PCI y TAC aplicados de manera independiente disminuyen la presencia de LDH, aunque no de manera estadísticamente significativa. Esta tendencia ya pudo observarse, con niveles plasmáticos de LDH más bajos que los obtenidos durante la reperusión inmediata (Figura 43-A).

En búsqueda de una justificación al daño remoto originado a partir de la IIR, se ha propuesto que independientemente de la amplificación de la respuesta inflamatoria ejercida por las CQ, existiría un reconocimiento innato de la microflora traslocada y de sus productos bacterianos por parte de los órganos distantes, lo que contribuiría con la patogenia del daño por IR. Durante el análisis histopatológico de órganos remotos afectados por la IIR intestinal se observaron diferencias en cuanto a la magnitud del daño entre los animales no tratados y aquellos que recibieron terapias combinadas (PCI+TAC). Pese a que en este grupo se observó un menor nivel de expresión de IL-6 e IL-1b en comparación con el PCI, ambos preservaron la histología intestinal en los 2 tiempos de muestreo. Tomadas en conjunto, estas observaciones indicarían que las lesiones observadas en órganos remotos pueden ser atribuidas a la combinación de

ambas señales: una originada a partir de la pérdida de la integridad de la barrera intestinal, donde se liberan bacterias y otros productos al torrente sanguíneo y otra disparada a nivel sistémico debido al aumento de mediadores pro-inflamatorios.

En ratones, el uso del PCI o de pre-tratamientos farmacológicos abre una variedad de posibilidades dependiendo del modelo que se desee evaluar. Por ejemplo, si los investigadores tienen previsto reducir la IIR en un modelo que no incluye el trasplante, el PCI sería la mejor opción. Por otra parte, si se realizan estudios en modelos de trasplante, los autores pueden elegir entre un tratamiento farmacológico o combinado.

Nuestro equipo de investigación ha sido el primero en describir la evaluación de diferentes protocolos de PCI en ratones y en combinar el PCI con el pre-tratamiento con TAC como estrategias para atenuar la IIR intestinal.

Estos procedimientos aplicados de manera simple o combinada tienden a atenuar la IIR intestinal al disminuir el daño histológico, la producción de CQ pro-inflamatorias, la presencia de ERN y de células apoptóticas. La disminución local de la IIR se refleja a nivel sistémico, al presentar menor lesión pulmonar, hepática y renal además de mejorar la tasa de supervivencia en los grupos tratados en comparación con la del grupo CT.

CAPITULO III

CAPITULO III

Trasplante de intestino en ratas: efecto del Precondicionamiento isquémico en la injuria por isquemia-reperfusión.

Introducción

La IIR es una complicación inmediata al TXI capaz de comprometer la funcionalidad y la supervivencia inicial del injerto y del paciente (Wolfard y col. 2007). El intestino pos-isquémico, al ser reperfundido libera mediadores en forma proporcional al grado de injuria local, lo cual puede disparar un SDOM e impactar en la vida del receptor. Con el objetivo de mitigar el efecto deletéreo de la lesión por IR intestinal, se han evaluado distintas estrategias que permanecen aún en etapas experimentales, entre las que encuentra el PCI y diversos pre-tratamientos al donante con diferentes drogas (Fishbein y col. 2003; Mallick y col. 2004).

El estudio de esta problemática en modelos experimentales de trasplante permite reproducir los pasos clásicos del TXI en humanos (extracción del órgano, isquemia fría, isquemia caliente y perfusión) dando lugar a un mayor acercamiento a la realidad clínica.

En el campo de la cirugía experimental, existen diferentes tipos de trasplantes en roedores que se clasifican según las cepas involucradas y de acuerdo al sitio de implante del órgano en el receptor.

Según las cepas involucradas el trasplante se clasifican en isogénico, alogénico:

-Trasplante Isogénico: se realizan entre animales de la misma cepa endocriada, las cuales se logran por cruzamientos entre individuos emparentados hasta la generación 20, donde se obtienen animales con una homocigosis del 98.4 % y un 1.6% de heterocigosis residual.

- Trasplante Alogénico: en este caso, el donante y el receptor pertenecen a distintas cepas o a una misma cepa pero exocriada, Este modelo es el apropiado en el caso de abordar trabajos donde se desee estudiar, por ejemplo, el fenómeno de rechazo y/o terapias inmunosupresoras.

De acuerdo al sitio anatómico donde se realiza el implante del órgano en el receptor, los trasplantes pueden ser ortotópicos o heterotópicos.

-Trasplante ortotópico: el órgano se implanta en su localización anatómica original.

-Trasplante heterotópico: el injerto se implanta en un sitio distinto a su posición anatómica original (Lausada, 2007).

El presente plan de trabajo involucra el estudio de la IIR, por tal motivo, con el fin de evaluar este fenómeno de manera pura y evitar la intersección de otros eventos que suceden durante el TXI, como es el ejemplo del rechazo, para desarrollar este capítulo seleccionamos el Trasplante Isogénico.

Por otro lado, la técnica de TXI heterotópico es particularmente apropiada para la obtención de biopsias intestinales aún desde fases inmediatas al implante del injerto, dado que por su baja invasividad la toma de muestras no compromete la supervivencia del animal.

Sin ninguna duda, el TXI constituye el mejor ejemplo de IIR intestinal, por lo que evaluar el efecto del PCI en este campo resulta apropiado para ingresar en la etapa final de este estudio. Por tal motivo, las experiencias desarrolladas en este capítulo se presentan en 2 experimentos independientes, los cuales tienen como objetivo general dilucidar si la aplicación de un protocolo de PCI disminuye la IIR en el TXI.

El experimento 1 tiene como meta evaluar si el protocolo de PCI seleccionado en etapas anteriores atenúa el daño intestinal provocado por un período prolongado de isquemia fría. En el experimento 2, utilizando un modelo de trasplante intestinal isogénico y heterotópico, se evalúa si el PCI es capaz de atenuar el daño ocasionado durante la fase de reperfusión.

Trasplante Intestinal Heterotópico en ratas: técnica quirúrgica; manejo pre y pos-operatorio de los animales:

Cirugía del donante:

Previo al procedimiento, los animales recibieron ayuno sólido (12-14 horas), sin restricción de acceso al agua de bebida.

Como droga anestésica se utilizó Isoflurano a una concentración del 8 % para la inducción y de 1,5-2% con un flujo de O₂ de 1,5 litros/hora para la fase de mantenimiento.

Una vez en plano anestésico, se rasura la zona abdominal y el animal es colocado en una mesa operatoria en decúbito dorsal. Antes de comenzar la cirugía se realiza la antisepsia de la región abdominal e inguinal con alcohol 70°. Además se administran 3

ml de solución fisiológica tibia vía subcutánea y Lidocaína (10 mg/kg) en piel y subcutáneo de la región a incidir. Como droga analgésica se utiliza Tramadol (20 mg/kg vía subcutánea).

Para realizar una correcta disección del intestino es necesario contar con instrumental de macro y microcirugía, microscopio quirúrgico y coagulador bipolar.

La extracción del órgano se realiza de manera metódica, siguiendo los pasos que se enumeran a continuación:

- 1- Incisión xifo-púbica de piel y tejido subcutáneo (Figura 46-A).
- 2- Abordaje de cavidad abdominal (Figura 46-B).
- 3- Sección del cartílago xifoides, con el objetivo de mejorar la visualización del campo operatorio.

Para realizar los pasos ya descriptos no es necesario magnificar el campo quirúrgico. A partir del punto 4 se utiliza el microscopio quirúrgico a una magnificación de 10X.

- 4- Maniobra de Kocher.
- 5- Disección de AMS. En este punto prestar especial atención a la disección del tejido avascular que une la AMS y el tronco celiaco.
- 6- Posicionar el intestino de manera tal que quede el delgado hacia la izquierda y el grueso hacia la derecha del operador Figuras (46-C y 46-D).
- 7- Seleccionar y cortar el extremo distal del injerto (Figura 46-E).
- 8- Disecar, coagular y cortar arteria y vena ileocecólica.

- 9- Ascender por el colon hasta vena cólica media, disecar, coagular y cortar.
- 10- Separar páncreas de colon, los cuales se hallan unidos por tejido avascular.
- 11- Disecar vena cólica derecha, coagular y cortar. Con este paso finaliza la disección del colon.
- 12- Seleccionar y cortar el extremo proximal del injerto, a nivel del yeyuno proximal (Figura 46-F).
- 13- Disecar, coagular y cortar aquellos vasos que irrigan y drenan el duodeno y parte del yeyuno que quedan excluidos del injerto.
- 14- Disecar vena porta (VP) de tejidos adyacentes; disecar, coagular y cortar vena esplénica y vena pilórica. En este paso es importante separar con extremo cuidado la vena porta de la arteria hepática, las cuales se encuentran en íntimo contacto.
- 15- Administrar anticoagulante vía endovenosa (50 UI de heparina).
- 16- Disecar y ocluir la arteria aorta abdominal (AA) en su tercio distal con un clamp vascular.
- 17- Disecar y ocluir la AA proximal a la AMS con un clamp vascular. A partir de este momento el injerto ingresa en la fase de isquemia, por lo tanto, es importante realizar los siguientes pasos con la mayor rapidez posible.
- 18- Seccionar VP

19- Comenzar el lavado del injerto canulando la AA desde su tercio distal; 6 ml de solución de preservación fría es suficiente para lavar correctamente el intestino, el cual debe adoptar un aspecto pálido.

20- Cortar la AMS desde su origen en la arteria aorta abdominal. Colocar en injerto en la solución de preservación fría (Figura 46-G).

21- Identificar en banco la AMS y la VP (Figura 46-H).

Durante toda la cirugía es imprescindible evitar la sequedad del intestino, para esto, se colocan gasas humedecidas en solución fisiológica tibia sobre el injerto.

El tiempo de cirugía del donante reportado por nuestro para la realización de este estudio fue de 59.9 ± 5 minutos. Con el fin de realizar un estudio homogéneo, en el presente plan de trabajo se excluyeron aquellos intestinos cuya extracción demandó más de 70 minutos.

Figura 46-A: el animal donante es colocado en decúbito dorsal y conectado al equipo de anestesia. La línea punteada representa la incisión xifo-púbica con la cual se inicia la cirugía.

Figura 46-B: al abordar la cavidad abdominal se observan asas de intestino delgado.

Figura 46-C: las asas de intestino delgado (ID) y el ciego (CG) son exteriorizados de la cavidad abdominal.

Figura 46-D: se realiza una maniobra donde el ID pasa por debajo del CG. De esta manera se expone la vena porta (VP) para su correcta disección. A continuación se selecciona el extremo distal del injerto (EDI).

Figura 46-E: se observa la VP liberada y el EDI seccionado. A continuación se selecciona el extremo proximal del injerto (EPI).

Figura 46-F: EDI y EPI seccionados, el injerto ya se encuentra listo y posicionado para su lavado.

Figura 46-G: el intestino lavado es colocado en la solución de preservación fría.

Figura 46-H: identificación de la estructura arterial (AMS) y venosa (VP) del injerto para su posterior implante en el receptor.

Cirugía del receptor:

Los animales receptores recibieron comida y agua ad-libitum hasta el momento del procedimiento quirúrgico.

El protocolo anestésico-analgésico, como la preparación del animal y el abordaje abdominal se realiza de la misma manera que en la cirugía del donante.

Se disecciona la AA y la vena cava (VC) en su tercio distal, A continuación se colocan 2 clamps que obliteran la AA y la VC, dejando espacio suficiente para realizar las anastomosis vasculares. Se realiza un ojal en cada vaso (el tamaño del mismo debe ser equivalente al tamaño de la VP del injerto en la VC y al de la AMS en la AA).

El siguiente paso consiste en realizar la anastomosis venosa termino-lateral entre la VP del donante y la VC del receptor con sutura Nylon monofilamento 8-0 o 9-0 (Figura 47-A). Una vez finalizada, se efectúa la anastomosis termino-lateral entre la AMS del donante y la AA del receptor con Nylon monofilamento 9-0 (Figura 47-B). Concluidas las anastomosis, se retiran los clamps vasculares para dar paso a la reperusión. Gracias a la restauración del flujo sanguíneo el intestino cambia su aspecto pálido a rosado (Figura 47-C).

El intestino es exteriorizado mediante dos ostomías realizadas en el flanco derecho del animal (Figuras 47-D). Las mismas se efectúan mediante técnica de eversión de mucosas con sutura PDS 7-0 colocando 6 puntos (Figura 47-E). El abdomen del receptor se cierra en dos planos (muscular y cutáneo) con Nylon monofilamento 4-0.

Los animales se recuperan de la anestesia sobre una mantilla térmica, con el objetivo de evitar la hipotermia. El protocolo analgésico (Tramadol 20 mg/Kg) continúa hasta 72 horas pos-quirúrgicas, realizando 2 aplicaciones diarias.

El tiempo de preparación de las estructuras vasculares y de las anastomosis arterial y venosa para el implante del injerto en los receptores efectuados para llevar a cabo el experimento II de este capítulo fue de $32,4 \pm 3$ minutos. Luego de revascularizado el intestino, la cirugía demanda aproximadamente 30 minutos más, tiempo dentro del cual se realizan las dos ostomias del injerto y se sutura la pared abdominal del animal.

Figura 47-A: anastomosis venosa entre vena porta del donante (VPD) y vena cava del receptor (VCR). Se observa la arteria aorta del receptor (AOR), el intestino nativo (IN) y el injerto trasplantado (IT).

Figura 47-B: anastomosis venosa (AV) finalizada y anastomosis arterial (AA) a punto de ser terminada. Se observa la sutura Nylon monofilamento 9-0 con la cual se realizan las anastomosis.

Figura 47-C: una vez reperfundido, el intestino trasplantado (IT) adopta un aspecto similar al intestino nativo (IN) del receptor.

Fotos: Gonzalo Irigoyen

Figura 47: el intestino trasplantado se exterioriza mediante dos ostomías, una proximal (OP) y una distal (OD) desde donde se obtienen las muestras para su análisis histológico.

Figura 47-E: fotografía que muestra en detalle la ostomía distal del injerto.

Experimento I

Materiales y Métodos

Animales

Se utilizaron 8 ratas de la cepa Wistar, machos, adultos, con un peso de 250 ± 20 grs provenientes del Bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP. Los animales fueron alojados bajo condiciones macro y microambientales controladas hasta el momento del procedimiento quirúrgico.

Diseño experimental

En todos los animales de este experimento se realizó la extracción intestinal según la técnica quirúrgica descripta anteriormente (cirugía del donante). Los 8 donantes fueron divididos en 2 grupos compuestos por 4 animales cada uno.

Grupo Control (CT): extracción intestinal sin tratamiento.

Grupo Precondicionamiento isquémico (PCI): en este grupo, una vez finalizada la disección y antes de comenzar al lavado del intestino, se aplicó un protocolo de PCI (10 minutos de isquemia seguidos de 10 minutos de reperusión) mediante clampeo reversible de la AMS.

En todos los casos el intestino extraído se colocó en solución ringer lactato a 4°C durante un período de 12 horas. La toma de muestras se realizó a los 30', 1, 4, 8 y 12 horas pos-lavado (Figura 48). En cada tiempo de muestreo se obtuvo un segmento intestinal de 2 cm, los cuales fueron colocados en formol neutro al 10% para posterior estudio histopatológico evaluado según índice de Park (Ver Anexo I).

Análisis estadístico

Las variables discontinuas se evaluaron a través del test de Kruskal-Wallis seguido del estadístico Dunn's, para comparación múltiple. Todo el análisis estadístico se realizó en el programa GraphPad software version 5.00© (San Diego, Estados Unidos).

Figura 48: esquematización del Experimento I del presente capítulo.

Resultados

Luego de una hora de isquemia fría, los grupos CT y PCI presentaron resultados similares en cuanto al índice de Park, observándose grados de daño entre 0 y 2 en todos los casos. Transcurridas 4 horas de iniciada la isquemia fría, el grupo CT presentó un grado 2 (N=3) y un grado 4 en la restante. Los intestinos preconditionados evidenciaron un índice de park de 2 (N=3) y de 1 (N=1). Al igual que en el tiempo de muestreo a una hora, a las 4 horas de iniciada la isquemia fría no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los injertos tratados y no tratados.

A las 8 horas, el daño en el grupo CT fue considerablemente mayor respecto al muestreo anterior, presentándose grados de Park 5 (N=2) 4 (N=1) y 3 (N=1). El grupo PCI mantuvo la arquitectura intestinal en comparación al muestreo a 4 horas, con índices de 1 (1 muestra), 2 (2 muestras) y 3 (1 muestra). En el último muestreo del grupo CT se observaron grados de daño de 4 (1 muestra), 5 (2 muestras) y 6 en la restante. Por otra parte, los intestinos preconditionados mostraron lesiones que no superaron el grado 3, observándose los mismos resultados que en el tiempo de muestreo anterior. En los análisis realizados a las 8 y 12 horas se observaron diferencias estadísticamente significativas (*) $p < 0.05$ entre los grupos CT vs PCI (Figura 49).

Figura 49: índice de Park de los injertos en diferentes tiempos de isquemia fría. A las 8 y 12 horas pos-lavado se observa una disminución del daño por IR en los intestinos que recibieron PCI (puntos rojos) en comparación con el grupo CT (puntos azules) (*) $p < 0.05$.

Experimento II

Materiales y Métodos

Animales

Se utilizaron 20 ratas de la cepa Wistar, machos, adultos, con un peso de 250 ± 20 grs provenientes del Bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP. Los animales fueron alojados bajo condiciones macro y microambientales controladas hasta el momento del procedimiento quirúrgico.

Diseño experimental

Con el objetivo de realizar un total de 10 TXI heterotópicos, los animales fueron divididos en 2 grupos de 8 animales cada uno (5 donantes, 5 receptores).

Grupo Control (CT): Cirugía del donante sin tratamiento + TXI heterotópico.

Grupo Precondicionamiento isquémico (PCI): Cirugía del donante con PCI (10 minutos de isquemia + 10 minutos de reperusión) + TXI heterotópico.

Las cirugías en los donantes y receptores se llevaron a cabo según las técnicas ya descritas.

En todos los casos el intestino extraído se colocó en solución ringer lactato a 4°C durante un período de 1 hora.

En las ratas receptoras se obtuvieron muestras del injerto desde la ostomía distal a los 30 minutos, 4 horas, 1 día y 1 semana pos-reperusión.

Al igual que en el experimento I, las muestras fueron procesadas para su histológico y analizadas según escala descripta por Park (Ver Anexo I).

Con el fin de evaluar la efectividad de la técnica quirúrgica en lo referente a la supervivencia pos-trasplante, los animales fueron sacrificados en tiempos que excedieron el protocolo de muestreo. Se consideraron 4 tiempos de sacrificio: 1 semana, 10 días, 20 días y 3 meses, incluyendo dos animales trasplantados (1 del grupo CT y 1 del grupo PCI) en cada tiempo.

Todos los receptores fueron evaluados por veterinarios durante la fase pos-quirúrgica en búsqueda de signos clínicos de malestar y/o dolor a fin de implementar, de ser necesario, el criterio de punto final.

Durante el desarrollo del experimento II obtuvimos una tasa de supervivencia del 80%, ya que 2 receptores de TXI (1 del grupo CT y uno del grupo PCI) murieron. El primero presentó estenosis en la anastomosis venosa, por lo que el intestino trasplantado tuvo un drenaje venoso defectuoso. Por tal motivo, el animal fue sacrificado inmediatamente terminada la cirugía. En el segundo caso, pese a recuperarse de manera adecuada, el receptor murió entre las 12 y 24 horas de finalizada la cirugía sin poder determinar la causa aún luego de realizada la necropsia.

Por lo explicado anteriormente, 4 TXI de cada grupo fueron exitosos en cuanto a la supervivencia y realización de análisis complementarios.

Análisis estadístico

Las variables discontinuas se evaluaron a través del test de Kruskal-Wallis seguido del estadístico Dunn's, para comparación múltiple. Todo el análisis estadístico se realizó en el programa GraphPad software version 5.00© (San Diego, Estados Unidos).

Resultados

De las muestras del grupo CT obtenidas durante la reperusión inmediata (30 minutos) analizadas según el índice de Park, el grado 4 se presentó en dos casos, mientras que el 3 y el 5 caracterizaron las muestras restantes de este grupo. En los intestinos de los animales que recibieron PCI, el 50 % presentó un grado 1 y el 50 % restante un grado 2, hallándose diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre ambos grupos.

A las 4 horas, las muestras obtenidas en ambos grupos arrojaron un grado de lesión 2, con excepción de una muestra del grupo CT y una muestra del grupo PCI, donde se observaron índices de Park 4 y 1, respectivamente. En este tiempo de muestro no hubo diferencias estadísticas entre animales tratados y no tratados.

En todos los intestinos trasplantados (grupo CT y PCI) a las 24 horas y a la semana pos-TXI, se observaron intestinos normales. (Figura 50)

Figura 50: resultados histopatológicos de injertos intestinales en diferentes tiempos luego de iniciada la reperfusion. Se observan diferencias estadísticamente significativas entre el grupo CT (puntos azules) vs grupo PCI (puntos rojos) a los 30 minutos pos-reperfusion (*) $p < 0.05$. A las 24 horas se observa una total recuperación en los intestinos trasplantados de ambos grupos que se mantiene hasta el último muestreo.

TXI heterotópico en ratones: nuestra experiencia

Introducción

La utilización de ratones para desarrollar protocolos de investigación en general y en el área de los trasplantes de órganos en particular, ofrece ventajas en lo que respecta a la disponibilidad de animales transgénicos o mutantes y reactivos para la realización de estudios complementarios. Por lo tanto, el TXI en ratones, descrito por primera vez en 1992 por Squiers y col. resulta una herramienta invaluable para la comprensión de diversos mecanismos inmunológicos que están involucrados en el TXI (Squiers y col. 1992; Liu y col. 2013).

Experimento III

Materiales y Métodos

Animales y técnica quirúrgica: con el fin de realizar la puesta a punto del modelo, ratones de la cepa C3H/HeN fueron utilizados para llevar a cabo trasplantes heterotópicos e isogénicos. La técnica de anestesia fue similar a la descrita en el Capítulo II (Ketamina, Midazolán, Lidocaína) y la técnica quirúrgica, tanto del donante como del receptor, al igual que la solución de preservación y los cuidados y pre y pos-quirúrgicos, se realizaron de la misma manera que en el experimento I de este capítulo.

Como salvedad, vale destacar que en el donante no se utilizó coagulador bipolar, realizando la disección del injerto mediante la ligadura de vasos sanguíneos utilizando

seda 7-0. Además, en el receptor, las anastomosis vasculares, tanto arterial como venosa, se llevaron a cabo utilizando Nylon monofilamento 10-0.

Diseño Experimental

Con el fin de efectuar 6 TXI heterotópicos e Isogénicos, 12 ratones machos, adultos, con un peso aproximado de 27-30 g fueron divididos en dos grupos (6 donantes, 6 receptores).

El objetivo inicial fue el de obtener muestras del injerto al finalizar la disección en el donante, luego de terminado el lavado, a los 30 minutos 4 y 24 horas de iniciada la reperusión para evaluación histológica según índice de Park. Además se evaluó la supervivencia pos-quirúrgica de los animales.

Resultados

Los tiempos quirúrgicos para el donante y el receptor fueron de 61 ± 4 y 52 ± 2 minutos respectivamente.

De los 6 TXI se pudieron obtener 15 muestras que correspondieron a la pos-disección (N=5), a la fase de pos-lavado (N=5) y a los 30 minutos pos-reperusión (N=5). Un injerto fue descartado por mal lavado, por lo que este TXI no se realizó de manera completa.

Respecto a la supervivencia pos-quirúrgica, todos los animales murieron dentro de las 4 horas de reperusión, por tal motivo no se pudieron obtener las muestras pretendidas a las 4 y 24 horas. De los 5 receptores, 2 no lograron recuperarse de la anestesia, 2

presentaron trombosis portal y el restante murió por causas que no pudieron ser identificadas luego de realizar la necropsia.

Estudio histopatológico.

Las 5 muestras obtenidas luego de finalizada la disección presentaron un grado de Park 0. Luego del lavado, se observaron intestinos sin alteraciones en 3 de las 5 muestras y grado 1 en las 2 restantes. Los injertos evaluados una vez iniciada la reperfusión fueron los que arrojaron mayor daño. Mientras que los grados 3 y 4 se presentaron en 2 muestras cada uno, el grado 5 lo hizo en la restante (Figura 51). Los tiempos quirúrgicos y los resultados histopatológicos obtenidos en los diferentes tiempos de muestreo son alentadores al ser similares a aquellos reportados por otros grupos de investigación. Sin embargo, la supervivencia obtenida por nuestro grupo indica algún error en la técnica o mantenimiento del animal que debe ser identificado y corregido para lograr supervivencia prolongada y poder llevar adelante diferentes líneas de trabajo.

Figura 51: índice de Park observado en diferentes etapas del procedimiento de TXI heterotópico en ratones.

Discusión Capítulo III

El TXI en ratas es un modelo muy utilizado en investigaciones inherentes al TXI. Luego de ser descrita por Monchik y Russell en 1971, la técnica original sufrió diversas modificaciones en búsqueda de repuestas a demandas generadas por los investigadores (Monchik and Russell 1971). De esta manera, hoy en día existe una amplia variedad de técnicas de TXI que difieren en varios aspectos. Por ejemplo, el TXI heterotópico puede realizarse implantando el injerto en la cavidad abdominal, tal como se describió en el presente capítulo, o en la región cervical del receptor (Sonnino y col. 1990; Lausada y col. 2011). Otras diferencias radican en la técnica de implante, ya que algunos grupos de investigación, como en nuestro caso utilizan suturas para la unión de las estructuras vasculares, mientras que otros autores prefieren prescindir de ellas y utilizar *cuffs* para unir la vena del injerto con la vena del receptor (Kawabe y col. 1998; Xuey col. 2009).

Pese a que el TXI ortotópico, desarrollado por Kort y col es el más apropiado para realizar estudios fisiológicos sobre el injerto, presenta una alta mortalidad pos-quirúrgica, por lo que la selección de este modelo suele realizarse en situaciones donde es la única opción posible para llevar adelante una línea de investigación (Kort y col. 1973; Guo y col. 2003). En nuestro caso, dada la necesidad de tener acceso permanente al intestino trasplantado para la realización de tomas de muestra, y considerando que este modelo permite una evaluación neta del fenómeno de IR, el TXI heterotópico resultó ser el más adecuado.

Experiencias previas desarrolladas por otros investigadores y por nuestro grupo de trabajo permitió concluir que para lograr una buena irrigación del injerto en el TXI en ratas y supervivencia pos-quirúrgica prolongada de los receptores, es necesario contar con tiempos de isquemia fría no demasiado extensos, ya que si se implanta un intestino

luego de varias horas de preservación en frío el daño ocasionado es tal que difícilmente el injerto pueda revascularizarse de manera exitosa (Wang y col. 2011). Por tal motivo, el presente capítulo contó con 2 experimentos independientes. Por un lado, se evaluó el efecto del PCI en la isquemia fría prolongada (Experimento I) donde por cuestiones ya justificadas el injerto no fue implantado. Por otro lado, se analizó el rol de este tratamiento en diferentes etapas de la reperfusión (Experimento II).

En el experimento I se observa como el transcurso del tiempo es directamente proporcional a la lesión del injerto. Los análisis histopatológicos realizados evidencian como el PCI es capaz de apaciguar la progresión del daño ocasionado por la isquemia fría en los tiempos más alejados de muestreo (8 y 12 horas), observándose diferencias significativas entre los animales tratados y los no tratados. Estos resultados coinciden con otros trabajos publicados. Sola y col reportaron, valiéndose de un modelo de TXI heterotópico en ratas, que un protocolo de PCI compuesto por un ciclo de 10 minutos de isquemia seguido de 5 minutos de reperfusión aplicado previamente a un período de isquemia fría prolongado en solución ringer lactato, protege el intestino contra la injuria isquémica (Sola y col. 2001). Por otro lado, Saeki y col. demostraron que injertos intestinales preservados en solución ringer lactato eran protegidos contra la isquemia fría cuando se aplicaba un protocolo de PCI (10 minutos de isquemia + 30 de reperfusión) (Saeki y col. 2011).

El experimento I se realizó para delinear el papel del PCI en la protección del injerto contra la preservación en frío. Tal como se describió en la introducción general, las soluciones de preservación por sí mismas constituyen una estrategia para atenuar la IIR y mejorar la funcionalidad del injerto, por esta razón, y para evitar agregar el efecto de otros agentes protectores, se utilizó ringer lactato en lugar de otras soluciones que por

sus propiedades resultan más adecuadas para la preservación de órganos con destino de trasplante. Souza Neves y col evaluaron diferentes Soluciones de preservación concluyendo que el ringer lactato es la menos eficaz al momento de proteger el intestino contra la isquemia en comparación con otras soluciones como Celsior, Belzer y Custodiol HTK. Además, estos autores reportaron que las soluciones Celsior y Belzer permitían un mejor desempeño por parte del PCI en la disminución del daño ocasionado por la isquemia fría. Estos factores considerados en el armado del diseño experimental del presente capítulo permitieron crear un ambiente hostil para el intestino extraído, a fin de validar solo el efecto del PCI sin la ayuda de otras variables protectoras (Wei y col. 2007).

El experimento II demuestra como el protocolo de PCI aplicado es capaz de atenuar el daño durante la reperusión inmediata. Además, en esta experiencia se puede apreciar una gran capacidad de regeneración por parte del intestino trasplantado: mientras que a las 4 horas de reperusión los animales no tratados presentan un daño menos severo en comparación con las muestras obtenidas a los 30 minutos, todos los análisis histológicos realizados a las 24 horas y 7 días pos-TXI reportaron índices de Park 0, lo que indica que los tejidos analizados se encuentran normales.

Teniendo en cuenta los mecanismos de acción del PCI (explicados en la introducción general) la atenuación del daño observada en los grupos tratados a las 8 y 12 horas de iniciada la isquemia fría, pudo ser producto de la “tolerancia isquémica” brindada por el PCI. En un contexto teórico, la inhibición metabólica, la limitación en el consumo de energía y el equilibrio iónico logrado mediante la aplicación de un ciclo de 10 minutos de isquemia seguidos de 10 minutos de reperusión, permitieron a los intestinos precondicionados sobrellevar de mejor manera un período prolongado de isquemia fría.

Al momento de la reperusión, el PCI pudo atenuar la IIR gracias a su protección contra el estrés oxidativo y nitrativo, sumado a la capacidad de preservar la microcirculación y disminuir el número de células apoptóticas.

Pese a que en este capítulo solo se realizaron evaluaciones histológicas como método complementario, el análisis de la lesión de la mucosa intestinal se considera el “*gold standard*” al momento de examinar la eficacia de métodos de conservación o protección, y es el parámetro más utilizado para evaluar la calidad del injerto intestinal en condiciones de almacenamiento en frío. Sin embargo, nuestro objetivo futuro contempla la posibilidad de aumentar el número de métodos complementarios para dilucidar si el PCI, además de preservar la arquitectura del injerto, es capaz de mejorar otros parámetros como apoptosis, expresión de genes pro-inflamatorios, producción de ERO y ERN, entre otros.

En comparación con otras especies, los ratones ofrecen diferentes ventajas en el campo de la investigación. Sin embargo, la realización exitosa de cirugías de alta complejidad como el TXI en estos animales presenta numerosos obstáculos, encabezados por su pequeño tamaño (Zhong y col. 1993). Paralelamente al desarrollo del TX intestinal en ratas, nuestro grupo comenzó a trabajar en la puesta a punto del TXI en ratones. Tal como se observa en la sección “resultados” del experimento III de este capítulo, los tiempos quirúrgicos y la técnica de extracción del órgano se realizaron de manera exitosa, ya que los injertos presentaron, en general, ausencia de daño. A su vez, es interesante comparar las lesiones observadas a los 30 minutos de reperusión entre ambas especies (Figuras 50 y 51) donde se aprecian grados de injuria muy similares (promedio de índice de Park de 4 en ratas vs 4,75 en ratones). Pese a esta similitud, las supervivencias fueron ampliamente diferentes. Mientras que en ratas logramos un 80%

de supervivencia prolongada, incluso con receptores que vivieron más de 1 mes en óptimas condiciones hasta que se les realizó eutanasia, la supervivencia en ratones fue solo de escasas horas luego de terminada la cirugía. La alta complejidad de esta técnica se refleja en la bibliografía y en reuniones científicas abocadas al TXI, ya que existen escasas publicaciones donde realizan TXI en ratones con tasas de supervivencia comparables a las logradas en ratas. Pese a esto, nuestro grupo sigue trabajando en la puesta a punto del TXI en ratones con el objetivo de contar con esta herramienta tan valiosa para la investigación en el área de los trasplantes.

CONCLUSIONES FINALES Y PERSPECTIVAS

En base a los resultados correspondientes a los experimentos que componen los capítulos del presente manuscrito, se pueden realizar una serie de conclusiones finales que desarrollan a continuación:

1-El tiempo de isquemia intestinal en ratones es un factor de relevancia que impacta en el daño local, remoto y en la supervivencia de los animales que sufren un evento de IIR. Tal como se reportó en el Capítulo I, nuestra experiencia indica que el “punto de no retorno” es aquel comprendido entre los 35 y 40 minutos de isquemia intestinal.

2- La endotoxemia juega un rol protagónico en la mortalidad pos-quirúrgica de ratones sometidos a un evento de IR. Los animales mutantes C3H/HeJ (insensibles a endotoxinas) utilizados en el Experimento II del Capítulo I tuvieron una mejor supervivencia que los animales control (sensibles a LPS).

3- No todos los protocolos de PCI son capaces de atenuar el daño por IR intestinal en ratones. La experiencia realizada en el Capítulo II permite concluir que algunos protocolos no protegen al intestino contra la IIR.

4- El protocolo de PCI compuesto por 10 minutos de isquemia seguido de 10 minutos de reperfusión aplicado previamente a una ORAMS en ratones protege al intestino contra la IIR. A lo largo del Capítulo II se aprecia como este protocolo de PCI es capaz de mejorar el aspecto histológico intestinal, disminuir el estrés nitrativo y el número de células apoptóticas además de mejorar la supervivencia de los animales. Sin embargo, en lo que respecta al daño remoto, solo atenuó las lesiones a nivel renal.

5- La administración de TAC de manera independiente como estrategia para atenuar el daño por IR intestinal en ratones mostró resultados alentadores y desfavorables en cuanto a la atenuación de la IIR: disminuyó la expresión de genes pro-inflamatorios, el estrés nitrativo y el número de células apoptóticas intestinales pos-reperfusión, además de mejorar la supervivencia de los animales. Sin embargo, no mostró beneficios en cuanto al daño histológico en el intestino y en órganos remotos.

6- La combinación PCI+TAC, en comparación con estas terapéuticas aplicadas individualmente, ofrece mejores resultados respecto a la disminución del daño por IR intestinal en ratones. La aplicación de ambas estrategias previamente a la ORAMS en ratones obtuvo los mejores resultados en cuanto a la disminución de la IIR tanto a nivel local como remoto.

7- El PCI propuesto (10 minutos de isquemia seguidos de 10 minutos de reperusión) disminuye el daño intestinal en las fases tardías de isquemia fría y durante la reperusión inmediata en un modelo de TXI heterotópico en ratas. Luego de 8 y 12 horas de isquemia fría, al igual que transcurridos 30 minutos de reperusión, los injertos precondicionados presentaron menor daño respecto a aquellos no tratados.

El presente manuscrito postula al PCI como una estrategia promisorio para atenuar la IIR intestinal en modelos experimentales de ORAMS y TXI. El PCI constituye una estrategia fácilmente trasladable al área clínica por su sencilla aplicación y bajo costo. Por tales motivos, la continuidad de esta línea de investigación estará enfocada en seguir dilucidando los mecanismos que efectúa el PCI para proteger al intestino contra el daño

por IR. Para esto, nuestro grupo de investigación continuará trabajando en la puesta a punto del TXI en ratones, en búsqueda de lograr una mejor supervivencia pos-quirúrgica. Contar con esta técnica y cepas de ratones mutantes o transgénicas (como las utilizadas en el Experimento II del Capítulo I) constituirá una combinación muy valiosa para el estudio de diferentes aspectos relacionados al TXI y al PCI.

Tanto la IIR como el rechazo son complicaciones inherentes al TXI. Sin embargo, el rechazo es responsable de la mayor pérdida de injertos intestinales trasplantados. Por tal motivo, otro objetivo de interés para nuestros investigadores es evaluar si la atenuación de la IIR repercute en un menor índice de rechazo pos-TXI. Para lograr este objetivo, considerando la buena supervivencia pos-quirúrgica en el TXI en ratas lograda por nuestro equipo, realizaremos TXI alogénicos aplicando PCI al donante y analizaremos la funcionalidad y supervivencia pos-quirúrgica del injerto y del receptor.

En el área clínica, casi la totalidad de los intestinos para trasplante provienen de personas con criterios neurológicos de muerte encefálica. En este aspecto, los trasplantes realizados en el presente plan de tesis tuvieron como donantes animales vivos, por lo cual, con el fin de acercarnos aún más a la realidad clínica, utilizaremos un modelo de donante cadavérico en ratas (desarrollado por nuestro grupo en el LTO-FCM) para contemplar el daño que ocasiona la muerte encefálica en los órganos trasplantables, incluido el intestino.

El presente plan de tesis, como las líneas futuras de investigación, responden a un objetivo final que es motor e incentivo diario para quienes trabajamos en el ámbito del TXI: la búsqueda de una mejor calidad de vida para aquellos pacientes que requieran este tipo de trasplante.

ANEXOS

ANEXO I

Análisis histológico intestinal

En el transcurso de los diferentes experimentos realizados para llevar a cabo el presente plan de trabajo recurrimos en reiteradas ocasiones a una escala descripta por Park y col. (Park y col. 1990) con el fin de evaluar el daño histológico intestinal como consecuencia de la IIR. La selección de este *score* se basó en que se utiliza ampliamente en el área experimental y en la práctica clínica, como en el caso de nuestro equipo de médicos del Instituto de Trasplante Multiorgánico de la Fundación Favaloro, lo que permite comparar los resultados obtenidos en investigación básica con aquellos de la clínica.

Los grados crecientes de la escala de Park se corresponden con la patogenia de la IIR. De esta manera, tal como se describió en la introducción general, las alteraciones comienzan por la punta de la vellosidad para luego extenderse hacia la base de la misma. Esta fase de la IIR está representada por los grados 1 y 2 de la escala. Si la lesión se magnifica, los enterocitos pierden sus medios de unión y comienzan a desprenderse (Park 3) hasta dejar las vellosidades intestinales desprovistas de epitelio de revestimiento (Park 4) o incluso perder dichas vellosidades como se reporta en el grado 5 de la escala. Los grados más elevados (6, 7 y 8) indican que el daño se profundizó en la pared intestinal, afectando las criptas intestinales hasta llegar al infarto transmural.

Dado el rol relevante de esta escala en el presente manuscrito, a continuación se citan los diferentes grados de daño acompañados por fotografías representativas.

PARK 0: intestino normal

PARK 1: espacio subepitelial (ubicado en la punta de la vellosidad)

PARK 2: espacio subepitelial extendido (compromete toda la vellosidad)

PARK 3: erosión de enterocitos

PARK 4: vellosidades denudadas

PARK 5: pérdida de vellosidades

PARK 6: infarto de criptas

PARK 7: infarto mucoso

PARK 8: infarto transmural

ANEXO II

Análisis histológico pulmonar

Para evaluar el grado de daño pulmonar originado por la IIR intestinal se consideraron 5 parámetros:

1- Infiltrado de neutrófilos (IN)

2- Edema

3- Daño de vías aéreas (DVA)

4- Presencia de membrana hialina (MH)

5- Hemorragia (HEM).

A su vez, cada uno de estos parámetros recibió una puntuación según la gravedad observada

0- Normal / 1- Leve / 2-Moderado / 3-Grave

Por último, el *score* total de cada muestra se obtuvo mediante la sumatoria de la puntuación de los parámetros evaluados.

En las tablas se presentan los resultados en crudo correspondientes a la observación pulmonar del experimento 2 del capítulo II.

Muestreo **30 minutos** de reperfusión intestinal

GRUPO	IN	Edema	DVA	MH	HEM	TOTAL
SH	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
CT	3	1	1	1	2	8
	2	1	2	1	1	7
	2	1	1	1	2	7
	2	1	1	0	2	6
	1	2	1	1	1	6
	1	1	1	0	2	6
	3	0	0	0	1	4
	2	1	0	0	0	3
PCI	2	1	0	0	1	4
	2	1	0	0	1	4
	2	1	0	0	1	4
	1	0	0	0	0	1
	1	0	0	0	0	1
	1	0	0	0	0	1
	1	0	0	0	0	1
	0	0	0	0	0	0

TAC	2	2	0	0	0	4
	1	2	0	0	0	3
	2	1	0	0	0	3
	2	1	0	0	0	3
	2	1	0	0	0	3
	1	1	0	0	0	2
	1	0	0	0	0	1
	1	0	0	0	0	1
PCI+TAC	1	1	0	0	0	2
	1	1	0	0	0	2
	1	0	0	0	0	1
	1	0	0	0	0	1
	1	0	0	0	0	1
	1	0	0	0	0	1
	1	0	0	0	0	1
	1	0	0	0	0	1

Muestreo a las **4 horas** de reperfusión intestinal

GRUPO	IN	Edema	DVA	MH	HEM	TOTAL
SH	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
CT	3	0	2	1	3	9
	3	0	1	2	2	8
	2	0	1	1	2	6
	2	0	0	0	3	5
	2	0	0	1	2	5
PCI	2	0	0	0	1	3
	2	0	0	0	0	2
	1	0	0	0	0	1
	1	0	0	0	0	1
	1	0	0	0	0	1
TAC	2	0	0	0	2	4
	2	0	0	0	1	3
	2	0	0	0	0	2
	1	0	0	0	0	1
	1	0	0	0	0	1
PCI+TAC	1	0	0	0	1	2
	1	0	0	0	0	1
	1	0	0	0	0	1
	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0

ANEXO III

Análisis histológico hepático

Para evaluar el grado de daño hepático originado por la IIR intestinal se consideraron 3 parámetros:

- 1- Congestión Sinusoidal (CS)
- 2- Vacuolización de hepatocitos (VH)
- 3- Edema

A su vez, cada uno de estos parámetros recibió una puntuación según la gravedad observada

0- Normal / 1- Leve / 2-Moderado / 3-Grave

El grado de daño total de cada muestra se obtuvo mediante la sumatoria de los diferentes parámetros.

En la siguiente tabla se presentan en detalle los resultados obtenidos en el experimento 2 del capítulo II.

GRUPO	CS	VH	Edema	TOTAL
SH	0	0	0	0
	0	0	0	0
	0	0	0	0
	0	0	0	0
	0	0	0	0
CT	1	2	0	3
	2	2	0	4
	1	1	1	3
	1	2	0	3
	2	1	0	3
PCI	1	1	0	2
	0	2	0	2
	0	1	0	1
	0	0	0	0
	0	1	0	1
TAC	0	1	0	1
	1	0	0	1
	0	1	0	1
	0	2	0	2
	0	0	0	0
PCI+TAC	0	0	0	0
	0	0	0	0
	0	0	0	0
	0	1	0	1
	0	0	0	0

ANEXO IV

Análisis histológico renal

Para evaluar el grado de daño hepático originado por la IIR intestinal se consideró la presencia de degeneración hidrópica (DH) y necrosis en las células de los túbulos renales.

La puntuación asignada a cada observación fue la siguiente:

Ausencia de daño evaluado =0

Presencia de necrosis tubular aguda (NTA) menor al 5% =1 punto

Presencia de NTA entre 5-25%= 2 puntos

Presencia de NTA mayor al 25%= 3 puntos.

Independientemente de la presencia de necrosis, a la observación de DH se le asignó 1 punto.

El puntaje final de cada muestra se obtuvo mediante la sumatoria de los diferentes parámetros.

En la siguiente tabla se presentan en detalle los resultados obtenidos en el experimento 2 del capítulo II.

GRUPO	DH	NTA<5%	NTA 5-25%	NTA >25%	TOTAL
SH	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0
	1	0	0	0	1
	1	0	0	0	1
	1	0	0	0	1
CT	1	1	0	0	2
	1	1	0	0	2
	1	1	0	0	2
	1	0	2	0	3
	1	0	2	0	3
PCI	1	0	0	0	1
	1	0	0	0	1
	1	0	0	0	1
	1	0	0	0	1
	1	0	0	0	1
TAC	1	0	0	0	1
	1	0	0	0	1
	1	0	0	0	1
	1	1	0	0	2
	1	1	0	0	2
PCI+TAC	1	0	0	0	1
	1	0	0	0	1
	1	0	0	0	1
	1	0	0	0	1
	1	0	0	0	1

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- Aban, N., L. Cinel, et al. (2005). "Ischemic preconditioning reduces caspase-related intestinal apoptosis." Surg Today **35**(3): 228-234.
- Abrahao, M. S., E. F. Montero, et al. (2004). "Biochemical and morphological evaluation of ischemia-reperfusion injury in rat small bowel modulated by ischemic preconditioning." Transplant Proc **36**(4): 860-862.
- Abu-Amara, M., S. Y. Yang, et al. (2011). "Role of endothelial nitric oxide synthase in remote ischemic preconditioning of the mouse liver." Liver Transpl **17**(5): 610-619.
- Adibhatla, R. M. and J. F. Hatcher (2010). "Lipid oxidation and peroxidation in CNS health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities." Antioxid Redox Signal **12**(1): 125-169.
- Aksoyek, S., I. Cinel, et al. (2002). "Intestinal ischemic preconditioning protects the intestine and reduces bacterial translocation." Shock **18**(5): 476-480.
- Arumugam, T. V., E. Okun, et al. (2009). "Toll-like receptors in ischemia-reperfusion injury." Shock **32**(1): 4-16.
- Barocelli, E., V. Ballabeni, et al. (2006). "The selective inhibition of inducible nitric oxide synthase prevents intestinal ischemia-reperfusion injury in mice." Nitric Oxide **14**(3): 212-218.
- Beath, S., L. Pironi, et al. (2008). "Collaborative strategies to reduce mortality and morbidity in patients with chronic intestinal failure including those who are referred for small bowel transplantation." Transplantation **85**(10): 1378-1384.
- Beda, N. and A. Nedospasov (2005). "A spectrophotometric assay for nitrate in an excess of nitrite." Nitric Oxide **13**(2): 93-97.
- Bulkley, G. B. (1987). "Free radical-mediated reperfusion injury: a selective review." Br J Cancer Suppl **8**: 66-73.
- Cantu-Medellin, N. and E. E. Kelley (2013). "Xanthine oxidoreductase-catalyzed reactive species generation: A process in critical need of reevaluation." Redox Biol **1**(1): 353-358.
- Carden, D. L. and D. N. Granger (2000). "Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury." J Pathol **190**(3): 255-266.
- Cerqueira, N. F., C. A. Hussni, et al. (2005). "Pathophysiology of mesenteric ischemia/reperfusion: a review." Acta Cir Bras **20**(4): 336-343.
- Cicora, F., N. Lausada, et al. (2011). "Protective effect of immunosuppressive treatment before orthotopic kidney autotransplantation." Transpl Immunol **24**(2): 107-112.
- Cicora, F., N. Lausada, et al. (2010). "Sirolimus in kidney transplant donors and clinical and histologic improvement in recipients: rat model." Transplant Proc **42**(1): 365-370.
- Cicora, F., J. Roberti, et al. (2012). "Donor preconditioning with rabbit anti-rat thymocyte immunoglobulin ameliorates ischemia reperfusion injury in rat kidney transplantation." Transpl Immunol **27**(1): 1-7.
- Cicora, F., J. Roberti, et al. (2012). "Preconditioning donor with a combination of tacrolimus and rapamycin to decrease ischaemia-reperfusion injury in a rat syngenic kidney transplantation model." Clin Exp Immunol **167**(1): 169-177.
- Claesson, J., S. Lehtipalo, et al. (2008). "Evaluation of intestinal preconditioning in a porcine model using classic ischemic preconditioning or lung recruitment maneuvers." Shock **29**(1): 98-103.

- Clavien, P. A., M. Selzner, et al. (2003). "A prospective randomized study in 100 consecutive patients undergoing major liver resection with versus without ischemic preconditioning." Ann Surg **238**(6): 843-850; discussion 851-842.
- Cohen, M. V., X. M. Yang, et al. (1994). "Conscious rabbits become tolerant to multiple episodes of ischemic preconditioning." Circ Res **74**(5): 998-1004.
- Collard, C. D. and S. Gelman (2001). "Pathophysiology, clinical manifestations, and prevention of ischemia-reperfusion injury." Anesthesiology **94**(6): 1133-1138.
- Colledan, M., C. Zanfi, et al. (2013). "Technical aspects of intestinal transplantation." Curr Opin Organ Transplant **18**(3): 291-297.
- Chen, G., S. Chen, et al. (2013). "Role of complement and perspectives for intervention in transplantation." Immunobiology **218**(5): 817-827.
- Chen, S., G. Li, et al. (1999). "[Clinical research of ischemic preconditioning on lung protection]." Hunan Yi Ke Da Xue Xue Bao **24**(4): 357-359.
- da Silva, R. F., A. C. de Paula, et al. (2008). "Report of initial experience in small bowel transplantation at Sao Jose do Rio Preto Medical School Hospital." Transplant Proc **40**(3): 827-829.
- Damle, S. S., E. E. Moore, et al. (2009). "Hemoglobin-based oxygen carrier induces heme oxygenase-1 in the heart and lung but not brain." J Am Coll Surg **208**(4): 592-598.
- de Arruda, M. J., R. S. Poggetti, et al. (2006). "Intestinal ischemia/reperfusion induces bronchial hyperreactivity and increases serum TNF-alpha in rats." Clinics (Sao Paulo) **61**(1): 21-28.
- Desai, K. K., G. S. Dikdan, et al. (2008). "Ischemic preconditioning of the liver: a few perspectives from the bench to bedside translation." Liver Transpl **14**(11): 1569-1577.
- Dezfulian, C., M. Garrett, et al. (2013). "Clinical application of preconditioning and postconditioning to achieve neuroprotection." Transl Stroke Res **4**(1): 19-24.
- Downey, J. M., A. M. Davis, et al. (2007). "Signaling pathways in ischemic preconditioning." Heart Fail Rev **12**(3-4): 181-188.
- Dudrick, S. J., D. W. Wilmore, et al. (1969). "Can intravenous feeding as the sole means of nutrition support growth in the child and restore weight loss in an adult? An affirmative answer." Ann Surg **169**(6): 974-984.
- Eefting, F., B. Rensing, et al. (2004). "Role of apoptosis in reperfusion injury." Cardiovasc Res **61**(3): 414-426.
- Eltzschig, H. K. and T. Eckle (2011). "Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation." Nat Med **17**(11): 1391-1401.
- Escalante Cobo Jose Luis, d. R. G. F. (2009). "Preservación de Órganos." Medicina Intensiva **33**(6): 282-292.
- Ferencz, A., Z. Szanto, et al. (2002). "The effects of preconditioning on the oxidative stress in small-bowel autotransplantation." Surgery **132**(5): 877-884.
- Fishbein, T. M., S. S. Kaufman, et al. (2003). "Isolated intestinal transplantation: proof of clinical efficacy." Transplantation **76**(4): 636-640.
- Fishbein, T. M., J. Liu, et al. (2004). "Increased apoptosis is specific for acute rejection in rat small bowel transplant." J Surg Res **119**(1): 51-55.
- Francischetti, I., J. B. Moreno, et al. (2010). "Leukocytes and the inflammatory response in ischemia-reperfusion injury." Rev Bras Cir Cardiovasc **25**(4): 575-584.
- Frangogiannis, N. G. (2007). "Chemokines in ischemia and reperfusion." Thromb Haemost **97**(5): 738-747.

- García Sacristan Sistema Digestivo. En: Fisiología Veterinaria. Madrid, España Ed. Interamericana. 1995. p.507-633.
- Geneser F. Aparato Digestivo. En: Histología 3ra edición. Argentina. Ed. Panamericana. 1999. p.465-485.
- Geuken, E., C. I. Buis, et al. (2005). "Expression of heme oxygenase-1 in human livers before transplantation correlates with graft injury and function after transplantation." Am J Transplant **5**(8): 1875-1885.
- Gomes, O. M., G. Brasileiro Filho, et al. (2011). "Ischemia-reperfusion histopathology alterations of the rabbit intestinal wall with and without ischemic preconditioning." Acta Cir Bras **26**(4): 285-288.
- Gondolesi, G. E. and H. M. Almau (2012). "Intestinal transplantation outcomes." Mt Sinai J Med **79**(2): 246-255.
- Gondolesi, G. E., C. Rumbo, et al. (2009). "[Intestinal transplant. Review and description of its evolution in Latin America]." Acta Gastroenterol Latinoam **39**(1): 63-80.
- Goto, T., T. Kino, et al. (1991). "FK 506: historical perspectives." Transplant Proc **23**(6): 2713-2717.
- Goulet, O. (1998). "Intestinal failure in children." Transplant Proc **30**(6): 2523-2525.
- Granger, D. N. (1988). "Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury." Am J Physiol **255**(6 Pt 2): H1269-1275.
- Grootjans, J., K. Lenaerts, et al. (2010). "Human intestinal ischemia-reperfusion-induced inflammation characterized: experiences from a new translational model." Am J Pathol **176**(5): 2283-2291.
- Gueler, F., W. Gwinner, et al. (2004). "Long-term effects of acute ischemia and reperfusion injury." Kidney Int **66**(2): 523-527.
- Guibert, E. E., A. Y. Petrenko, et al. (2011). "Organ Preservation: Current Concepts and New Strategies for the Next Decade." Transfus Med Hemother **38**(2): 125-142.
- Guo, W. H., L. Tian, et al. (2003). "Comparative study of allograft survival of heterotopic and orthotopic small bowel transplantation in rat." Transplantation **75**(11): 1895-1897.
- Guyton y Hall. Sistema Gastrointestinal. En "tratado de Fisiología Médica 12ª edición" España, Ed El Sevier 2011.
- Haglund, U. (1994). "Gut ischaemia." Gut **35**(1 Suppl): S73-76.
- He, G. Z., L. G. Dong, et al. (2011). "Lymph duct ligation during ischemia/reperfusion prevents pulmonary dysfunction in a rat model with omega-3 polyunsaturated fatty acid and glutamine." Nutrition **27**(5): 604-614.
- Hill, J. H. and P. A. Ward (1971). "The phlogistic role of C3 leukotactic fragments in myocardial infarcts of rats." J Exp Med **133**(4): 885-900.
- Hinnebusch, B. F., Q. Ma, et al. (2002). "Enterocyte response to ischemia is dependent on differentiation state." J Gastrointest Surg **6**(3): 403-409.
- Hotter G, Closa D, et al. (1996). "Intestinal preconditioning is mediated by a transient increase in nitric oxide." Biochem Biophys Res Commun **222**(1): 27-32.
- Jessup, J. M., P. Battle, et al. (1999). "Reactive nitrogen and oxygen radicals formed during hepatic ischemia-reperfusion kill weakly metastatic colorectal cancer cells." Cancer Res **59**(8): 1825-1829.
- Johnson, D. and I. Mayers (2001). "Multiple organ dysfunction syndrome: a narrative review." Can J Anaesth **48**(5): 502-509.

- Kaczmarek, A., P. Vandenabeele, et al. (2013). "Necroptosis: the release of damage-associated molecular patterns and its physiological relevance." Immunity **38**(2): 209-223.
- Kalogeris, T., C. P. Baines, et al. (2012). "Cell biology of ischemia/reperfusion injury." Int Rev Cell Mol Biol **298**: 229-317.
- Kalyanaraman, B. (2013). "Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms." Redox Biol **1**(1): 244-257.
- Kampp, M., O. Lundgren, et al. (1968). "Extravascular shunting of oxygen in the small intestine of the cat." Acta Physiol Scand **72**(4): 396-403.
- Kassahun, W. T., T. Schulz, et al. (2008). "Unchanged high mortality rates from acute occlusive intestinal ischemia: six year review." Langenbecks Arch Surg **393**(2): 163-171.
- Kawabe, T., T. Nakai, et al. (1998). "Small bowel transplantation in rats using a venous cuff technique." Microsurgery **18**(5): 344-347.
- Kharbanda, R. K., M. Peters, et al. (2001). "Ischemic preconditioning prevents endothelial injury and systemic neutrophil activation during ischemia-reperfusion in humans in vivo." Circulation **103**(12): 1624-1630.
- Kinross, J. M., A. W. Darzi, et al. (2011). "Gut microbiome-host interactions in health and disease." Genome Med **3**(3): 14.
- Kong, S. E., L. R. Blennerhassett, et al. (1998). "Ischaemia-reperfusion injury to the intestine." Aust N Z J Surg **68**(8): 554-561.
- Kort, W. J., D. L. Westbroek, et al. (1973). "Orthotopic total small bowel transplantation in the rat." Eur Surg Res **5**(2): 81-89.
- Kreisel, D. and D. R. Goldstein (2013). "Innate immunity and organ transplantation: focus on lung transplantation." Transpl Int **26**(1): 2-10.
- Kvietys, P. R. and D. N. Granger (2012). "Role of reactive oxygen and nitrogen species in the vascular responses to inflammation." Free Radic Biol Med **52**(3): 556-592.
- Lausada, N. (2007). "Estudio del metabolismo lipídico de ratas con trasplante renal y de células de hepatoma humano (HepG2) bajo el tratamiento con distintos inmunosupresores " Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.
- Lausada, N., P. Stringa, et al. (2011). "[Impact of ischemia-reperfusion injury on long survival rate in intestinal transplantation in rats]." Acta Gastroenterol Latinoam **41**(2): 129-136.
- Lema Zuluaga, G. L., R. E. Serna Agudelo, et al. (2013). "Preservation solutions for liver transplantation in adults: celsior versus custodiol: a systematic review and meta-analysis with an indirect comparison of randomized trials." Transplant Proc **45**(1): 25-32.
- Lenaerts, K., L. J. Ceulemans, et al. (2013). "New insights in intestinal ischemia-reperfusion injury: implications for intestinal transplantation." Curr Opin Organ Transplant **18**(3): 298-303.
- Li, C. and R. M. Jackson (2002). "Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury." Am J Physiol Cell Physiol **282**(2): C227-241.
- Liao, Y. F., W. Zhu, et al. (2013). "Heme oxygenase-1 and gut ischemia/reperfusion injury: A short review." World J Gastroenterol **19**(23): 3555-3561.
- Lillehei, R. C., B. Goott, et al. (1960). "Homografts of the small bowel." Surg Forum **10**: 197-201.

- Liu, X., P. Song, et al. (2013). "A simple novel technique for heterotopic intestinal transplantation in mice." Transplant Proc **45**(2): 654-658.
- Lopez-Neblina, F., A. H. Toledo, et al. (2005). "Molecular biology of apoptosis in ischemia and reperfusion." J Invest Surg **18**(6): 335-350.
- Lu, Y. C., W. C. Yeh, et al. (2008). "LPS/TLR4 signal transduction pathway." Cytokine **42**(2): 145-151.
- Mallick, I. H., W. Yang, et al. (2004). "Ischemia-reperfusion injury of the intestine and protective strategies against injury." Dig Dis Sci **49**(9): 1359-1377.
- Mallick, I. H., W. Yang, et al. (2005). "Ischaemic preconditioning improves microvascular perfusion and oxygenation following reperfusion injury of the intestine." Br J Surg **92**(9): 1169-1176.
- Maretta, M., S. Toth, et al. (2012). "Alterations of epithelial layer after ischemic preconditioning of small intestine in rats." J Mol Histol **43**(2): 171-178.
- Marshall, J. C. (2001). "Inflammation, coagulopathy, and the pathogenesis of multiple organ dysfunction syndrome." Crit Care Med **29**(7 Suppl): S99-106.
- Massberg, S. and K. Messmer (1998). "The nature of ischemia/reperfusion injury." Transplant Proc **30**(8): 4217-4223.
- McHugh, P. and M. Turina (2006). "Apoptosis and necrosis: a review for surgeons." Surg Infect (Larchmt) **7**(1): 53-68.
- Miranda, K. M., M. G. Espey, et al. (2001). "A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite." Nitric Oxide **5**(1): 62-71.
- Monchik, G. J. and P. S. Russell (1971). "Transplantation of small bowel in the rat: technical and immunological considerations." Surgery **70**(5): 693-702.
- Moquin, D. and F. K. Chan (2010). "The molecular regulation of programmed necrotic cell injury." Trends Biochem Sci **35**(8): 434-441.
- Murry, C. E., R. B. Jennings, et al. (1986). "Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium." Circulation **74**(5): 1124-1136.
- Nourshargh, S., F. Krombach, et al. (2006). "The role of JAM-A and PECAM-1 in modulating leukocyte infiltration in inflamed and ischemic tissues." J Leukoc Biol **80**(4): 714-718.
- O'Donnell, C. J. and E. G. Nabel (2011). "Genomics of cardiovascular disease." N Engl J Med **365**(22): 2098-2109.
- Oltean, M., Zhu, C. "Reduced liver injury and cytokine release after transplantation of preconditioned intestines". J Surg Res **154**(1):30-37
- Oltean, M., S. Mera, et al. (2006). "Transplantation of preconditioned intestinal grafts is associated with lower inflammatory activation and remote organ injury in rats." Transplant Proc **38**(6): 1775-1778.
- Ollinger, R. and J. Pratschke (2010). "Role of heme oxygenase-1 in transplantation." Transpl Int **23**(11): 1071-1081.
- Ordy, J. M., T. M. Wengenack, et al. (1993). "Selective vulnerability and early progression of hippocampal CA1 pyramidal cell degeneration and GFAP-positive astrocyte reactivity in the rat four-vessel occlusion model of transient global ischemia." Exp Neurol **119**(1): 128-139.
- Park, P. O., U. Haglund, et al. (1990). "The sequence of development of intestinal tissue injury after strangulation ischemia and reperfusion." Surgery **107**(5): 574-580.
- Pasupathy, S. and S. Homer-Vanniasinkam (2005). "Ischaemic preconditioning protects against ischaemia/reperfusion injury: emerging concepts." Eur J Vasc Endovasc Surg **29**(2): 106-115.

- Pasupathy, S. and S. Homer-Vanniasinkam (2005). "Surgical implications of ischemic preconditioning." Arch Surg **140**(4): 405-409; discussion 410.
- Patel, A., M. C. van de Poll, et al. (2004). "Early stress protein gene expression in a human model of ischemic preconditioning." Transplantation **78**(10): 1479-1487.
- Poltorak, A., X. He, et al. (1998). "Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene." Science **282**(5396): 2085-2088.
- Puglisi, R. N., L. Strande, et al. (1996). "Beneficial effects of cyclosporine and rapamycin in small bowel ischemic injury." J Surg Res **65**(2): 115-118.
- Rotstein, O. D. (2000). "Pathogenesis of multiple organ dysfunction syndrome: gut origin, protection, and decontamination." Surg Infect (Larchmt) **1**(3): 217-223; discussion 223-215.
- Saeki, I., T. Matsuura, et al. (2011). "Ischemic preconditioning and remote ischemic preconditioning have protective effect against cold ischemia-reperfusion injury of rat small intestine." Pediatr Surg Int **27**(8): 857-862.
- Saikumar, P., Z. Dong, et al. (1998). "Mechanisms of cell death in hypoxia/reoxygenation injury." Oncogene **17**(25): 3341-3349.
- Sandborn, W. J. (2001). "Transcending conventional therapies: the role of biologic and other novel therapies." Inflamm Bowel Dis **7 Suppl 1**: S9-16.
- Sano, T., Izuishi K. (2011). "Hepatic preconditioning using lipopolysaccharide: association with specific negative regulators of the toll-like receptor 4 signaling pathway." Transplantation **91** (10) 1082-1089.
- Santora, R. J., M. L. Lie, et al. (2010). "Therapeutic distant organ effects of regional hypothermia during mesenteric ischemia-reperfusion injury." J Vasc Surg **52**(4): 1003-1014.
- Sapalidis, K., T. S. Papavramidis, et al. (2013). "The role of allopurinol's timing in the ischemia reperfusion injury of small intestine." J Emerg Trauma Shock **6**(3): 203-208.
- Sapega, A. A., R. B. Heppenstall, et al. (1985). "Optimizing tourniquet application and release times in extremity surgery. A biochemical and ultrastructural study." J Bone Joint Surg Am **67**(2): 303-314.
- Schoenberg, M. H. and H. G. Beger (1993). "Reperfusion injury after intestinal ischemia." Crit Care Med **21**(9): 1376-1386.
- Schwartz, B. G. and R. A. Kloner (2012). "Coronary no reflow." J Mol Cell Cardiol **52**(4): 873-882.
- Serracino-Inglott, F., N. A. Habib, et al. (2001). "Hepatic ischemia-reperfusion injury." Am J Surg **181**(2): 160-166.
- Sileri, P., G. Sica, et al. (2004). "Ischemic preconditioning protects intestine from prolonged ischemia." Transplant Proc **36**(2): 283-285.
- Simkhovich, B. Z., K. Przyklenk, et al. (2013). "Role of protein kinase C in ischemic "conditioning": from first evidence to current perspectives." J Cardiovasc Pharmacol Ther **18**(6): 525-532.
- Sisson S. Sistema Digestivo. En: Anatomía de los animales domésticos. 5ta edición. España. Ed.Salvat Editores.1982. p. 118-128.
- Smith, V. A. and T. Johnson (2010). "Evaluation of an animal product-free variant of MegaCell MEM as a storage medium for corneas destined for transplantation." Ophthalmic Res **43**(1): 33-42.
- Sola, A., J. De Oca, et al. (2001). "Protective effect of ischemic preconditioning on cold preservation and reperfusion injury associated with rat intestinal transplantation." Ann Surg **234**(1): 98-106.

- Sonnino, R. E., D. H. Teitelbaum, et al. (1990). "Cervical small bowel transplantation in the rat: a useful tool." Microsurgery **11**(4): 309-313.
- Squiers, E. C., S. E. Kelley, et al. (1992). "Small bowel transplantation in the mouse: development of a model." Microsurgery **13**(6): 345-347.
- St Peter, S. D., A. A. Moss, et al. (2003). "Effects of tacrolimus on ischemia-reperfusion injury." Liver Transpl **9**(2): 105-116.
- Stallion, A., T. D. Kou, et al. (2005). "Ischemia/reperfusion: a clinically relevant model of intestinal injury yielding systemic inflammation." J Pediatr Surg **40**(3): 470-477.
- Stallion, A., T. D. Kou, et al. (2002). "IL-10 is not protective in intestinal ischemia reperfusion injury." J Surg Res **105**(2): 145-152.
- Starzl, T. E., H. A. Kaupp, Jr., et al. (1962). "Homotransplantation of multiple visceral organs." Am J Surg **103**: 219-229.
- Starzl, T. E., S. Todo, et al. (1989). "FK 506 for liver, kidney, and pancreas transplantation." Lancet **2**(8670): 1000-1004.
- Stringa, P., D. Romanin, et al. (2013). "Ischemic preconditioning and tacrolimus pretreatment as strategies to attenuate intestinal ischemia-reperfusion injury in mice." Transplant Proc **45**(6): 2480-2485.
- Suzuki, Y., E. A. Deitch, et al. (2000). "Inducible nitric oxide synthase gene knockout mice have increased resistance to gut injury and bacterial translocation after an intestinal ischemia-reperfusion injury." Crit Care Med **28**(11): 3692-3696.
- Taha, M. O., R. Miranda-Ferreira, et al. (2010). "Role of L-arginine, a substrate of nitric oxide biosynthesis, on intestinal ischemia-reperfusion in rabbits." Transplant Proc **42**(2): 448-450.
- Thompson, J. W., S. V. Narayanan, et al. (2012). "Redox signaling pathways involved in neuronal ischemic preconditioning." Curr Neuropharmacol **10**(4): 354-369.
- Toledo-Pereyra, L. H., A. H. Toledo, et al. (2004). "Molecular signaling pathways in ischemia/reperfusion." Exp Clin Transplant **2**(1): 174-177.
- Turnage, R. H., K. S. Guice, et al. (1994). "Endotoxemia and remote organ injury following intestinal reperfusion." J Surg Res **56**(6): 571-578.
- van der Vliet, A. and A. Bast (1992). "Role of reactive oxygen species in intestinal diseases." Free Radic Biol Med **12**(6): 499-513.
- van der Vliet, A., J. P. Eiserich, et al. (1997). "Formation of reactive nitrogen species during peroxidase-catalyzed oxidation of nitrite. A potential additional mechanism of nitric oxide-dependent toxicity." J Biol Chem **272**(12): 7617-7625.
- Wang, W. Z. (2009). "Investigation of reperfusion injury and ischemic preconditioning in microsurgery." Microsurgery **29**(1): 72-79.
- Wang, Z., F. Hernandez, et al. (2011). "Ischemic preconditioning of the graft for intestinal transplantation in rats." Pediatr Transplant **15**(1): 65-69.
- Watson, C. J. and J. H. Dark (2012). "Organ transplantation: historical perspective and current practice." Br J Anaesth **108** Suppl 1: i29-42.
- Watson, M. J., B. Ke, et al. (2012). "Treatment with antithymocyte globulin ameliorates intestinal ischemia and reperfusion injury in mice." Surgery **152**(5): 843-850.
- Wei, L., K. Hata, et al. (2007). "Experimental small bowel preservation using Polysol: a new alternative to University of Wisconsin solution, Celsior and histidine-tryptophan-ketoglutarate solution?" World J Gastroenterol **13**(27): 3684-3691.
- Whelan, R. S., V. Kaplinskiy, et al. (2010). "Cell death in the pathogenesis of heart disease: mechanisms and significance." Annu Rev Physiol **72**: 19-44.

- White, B. C. and J. M. Sullivan (1998). "Apoptosis." Acad Emerg Med **5**(10): 1019-1029.
- Wolfard, A., J. Kaszaki, et al. (2007). "Early microcirculatory changes after ischemic preconditioning and small bowel autotransplantation." Eur Surg Res **39**(5): 284-290.
- Woodruff, T. M., K. S. Nandakumar, et al. (2011). "Inhibiting the C5-C5a receptor axis." Mol Immunol **48**(14): 1631-1642.
- Xue, L., Y. Lu, et al. (2009). "Surgical experience of refined 3-cuff technique for orthotopic small-bowel transplantation in rat: a report of 270 cases." Am J Surg **198**(1): 110-121.
- Xue, Q., Z. Yuan, et al. (2012). "Protective role of nitric oxide induced by ischemic preconditioning on cold ischemic-reperfusion injury of rat liver graft." Transplant Proc **44**(4): 948-951.
- Zambernardi, A. (2013). "Trasplante de intestino: de la inmunofisiopatogenia del rechazo delular agudo al manejo del paciente" Universidad Favaloro.
- Zhong, R., Z. Zhang, et al. (1993). "Development of a mouse intestinal transplantation model." Microsurgery **14**(2): 141-145.
- Zhou, H., J. Liu, et al. (2010). "Carbon monoxide inhalation decreased lung injury via anti-inflammatory and anti-apoptotic effects in brain death rats." Exp Biol Med (Maywood) **235**(10): 1236-1243.