

**Tesi Doctoral**

**Mediadors d'apoptosi durant la  
preservació d'òrgans**

**Meritxell Genescà i Ferrer**

**Universitat de Barcelona  
Departament de Fisiologia**







Programa de Doctorat de Fisiologia

Bienni 2000-2002

MEDIADORS D'APOPTOSI DURANT LA  
PRESERVACIÓ D'ÒRGANS

Tesi Doctoral presentada per Meritxell Genescà i Ferrer per optar al títol  
de Doctora per la Universitat de Barcelona

Directora: Dra. Georgina Hotter Corripio

Tutor: Prof. Luis Palacios Raufast

Barcelona, setembre 2004



## Agraïments

Aquesta tesi ha estat possible gràcies a la participació i a l'amistat de moltes persones a les que voldria expressar el meu agraïment.

Al Dr. Emili Gelpí, director de l'IIBB, per acceptar-me com a becària.

A la Gina, la directora d'aquesta tesi, per donar-me l'oportunitat de gaudir de la ciència amb el seu entusiasme, per la seva confiança i el seu *carinyo*. Per tot el que he après tant científicament com personalment...

Al Luis, tutor d'aquesta tesi, per estar sempre disposat a ajudar, per les xerrades, les idees i els bons consells...pel seu afecte incondicional.

A la resta del meu grup: a l'Anna, pel seu interès i suport en tot moment, per tot el que hem compartit treballant juntes; a l'Ángeles, per la seva ajuda tècnica i, sobretot, pel seu bon humor (per totes les cantades i ballades al laboratori!); al Jesús, per ajudar-me i ensenyar-me al principi de la tesi; i finalment al Jose, per la seva gràcia (*trentatré!*) i les bones estones passades...

Als del CNM, especialment al Toni: pels divendres, pel seu ajut i participació en tota la part de BI, per la seva paciència...perquè sense vosaltres no existiria l'alfa!

A la resta del laboratori: a la Carme Xaus, la Rosa, la Magda, la Marta, l'Esther, el Dani, l'Emma, l'Oriol i especialment a l'Anna Serrano... per les bones estones passades al laboratori (i fora del laboratori! -*léase* soparets i cafeseles-) per la simpatia i alegria que ajuden molt a l'hora de treballar...gràcies.

Tampoc em vull oblidar de la resta de gent d'altres laboratoris, sobretot alguns de masses (últimament) i de neuroquímica, amb els quals també he passat molt bones estones i han fet el dia a dia agradable i distès.

A d'altres amics que he fet pel camí, la Susana, el Llorenç, el Dani (*doctorazu!*)...i molta altra gent que han fet que aquests quatre anys hagin estat una molt bona experiència.

A la meva família durant aquest temps a Barcelona: la Leticia (...Latisia!) i la Yolanda. Per la sort que he tingut de poder viure al vostre costat!!...per tot el que hem compartit i sobretot per la vostra amistat (no em vull posar sentimental, però us trobaré molt a faltar...).

A la resta de gent que em deixo i que ha participat en alguna part d'aquest treball... i als que no han col·laborat directament en la tesi, però formen la part més important de la meva vida: la meva família i els meus amics.





## ABREVIATURES

ABC	complex avidina-biotina
ABPs	proteïnes d'unió a l'actina
Ac-DEVD-AMC	N-acetil-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-metilcumarina
ADN	àcid desoxiribonucleic
ADP	difosfat d'adenosina
AMP	monofosfat d'adenosina
AMPC	monofosfat d'adenosina cíclic
AMS	artèria mesentèrica superior
ATP	trifosfat d'adenosina
BB	vora en forma de raspall ( <i>brush border</i> )
Bcl-2	del gen <i>B-Cell Leukemia/lymphoma-2</i>
BI	bioimpedància elèctrica
BSA	albúmina sèrica bovina
CHAPS	3-[(3-colamidopropil) dimetilamoni]-1-propanosulfonat
CI	isquèmia freda ( <i>cold ischemia</i> )
DAB	diaminobenzidina
EC	EuroCollins
EDTA	àcid etilendiaminotetraacètic
EHNA	eritro-9-(2-hidroxi-3-nonil)adenina
FDP	fructosa-1,6-difosfat
FRA	fracàs renal agut
FPR	flux plasmàtic renal
GLM	ganglis limfàtics mesentèrics
GSSG	glutatió oxidat

$\alpha$ -GST	alfa glutatió S-transferasa
HBD	donant viu ( <i>heart-beating donor</i> )
H&E	hematoxilina i eosina
HEPES	àcid 4-(2-hidroxietil)-1-piperazonaetanosulfònic
HES	midó hidroxietílic
HRP	peroxidasa de rave
HSP	<i>heat shock proteins</i>
Hz	hertz
I	flux elèctric
IPJ	model d'intestí de rata aïllat i reperfós
IPK	model de ronyó de rata aïllat i reperfós
I/R	isquèmia i reperfusió
JP	jasplakinolide
LB	latrunculina B
LDH	lactat deshidrogenasa
NAD <sup>+</sup>	dinucleòtid de nicotinamida i adenina
NADH	dinucleòtid de nicotinamida i adenina reduït
NHBD	donant a cor parat ( <i>non-heart-beating donor</i> )
NO	òxid nítric
NONOs	<i>spermine NONOate</i>
NOS	òxid nítric sintetasa
NPT	nutrició parenteral total
NTA	necrosi tubular aguda
OCT	alcohol polivinílic, polietilenglicol i clorur de dimetilbenzil amoni
PBS	tampó fosfat salí

PMSF	fluorur de fenilmetilsulfonil
PE	polietilè
ROS	espècies reactives d'oxigen
SDS	dodecil sulfat sòdic
SEM	error estàndard de la mitjana
SSF	solució salina fisiològica
SwinA	swinholide A
T	teofil·lina
TAN	total de nucleòtids d'adenina
TB	translocació bacteriana
TBS	tampó tris salí
Trp	trasplantament
TUNEL	<i>terminal deoxynucleotidyltransferase d'UTP Nick End Labeling</i>
UFC	unitats formadores de colònies
UW	solució de la Universitat de Wisconsin
V	voltatge
X	xantina
XDH	xantina deshidrogenasa
XO	xantina oxidasa
WI	isquèmia calenta ( <i>warm ischemia</i> )
Z	impedància
zVAD-fmk	z-Val-Ala-Asp(OMe)-fluorometilcetona



# ÍNDIX

1. INTRODUCCIÓ	1
<b>1.1. GENERALITATS</b>	<b>3</b>
1.1.1. INTESTÍ PRIM	3
1.1.2. RONYÓ	4
<b>1.2. TRASPLANTAMENT</b>	<b>6</b>
1.2.1. TRASPLANTAMENT INTESTINAL	7
1.2.1.1. Translocació bacteriana	8
1.2.2. TRASPLANTAMENT RENAL	9
1.2.2.1. Marcadors de viabilitat	11
<b>1.3. PRESERVACIÓ D'ÒRGANS</b>	<b>13</b>
1.3.1. PRINCIPIS BÀSICS DE LA PRESERVACIÓ	14
1.3.2. SOLUCIÓ DE LA UNIVERSITAT DE WISCONSIN	17
1.3.3. PRESERVACIÓ INTESTINAL	19
1.3.4. PRESERVACIÓ RENAL	20
<b>1.4. SÍNDROME D'ISQUÈMIA I REPERFUSIÓ</b>	<b>22</b>
1.4.1. ESDEVENIMENTS CEL·LULARS DURANT LA I/R	22
1.4.2. CONSEQÜÈNCIES DE LA I/R EN EL TRASPLANTAMENT	25
<b>1.5. APOPTOSI</b>	<b>27</b>
1.5.1. CASPASES	30
1.5.3. APOPTOSI I TRASPLANTAMENT	31
<b>1.6. MEDIADORS DE L'APOPTOSI DURANT LA PRESERVACIÓ</b>	<b>33</b>
1.6.1. PRODUCTES DE LA DEGRADACIÓ DE L'ATP	33
1.6.2. FRUCTOSA	35
1.6.3. ÒXID NÍTRIC	36
1.6.2.1. Òxid nítric i apoptosi	37
<b>1.7. CITOESQUELET</b>	<b>38</b>
1.7.1. CITOESQUELET D'ACTINA	40
1.7.2. EL CITOESQUELET D'ACTINA EN LA ISQUÈMIA RENAL	42
1.7.3. CITOESQUELET I APOPTOSI	43
<b>1.8. BIOIMPEDÀNCIA</b>	<b>44</b>
2. HIPÒTESIS I OBJECTIUS	49
<b>2.1. HIPÒTESIS</b>	<b>51</b>
<b>2.2. OBJECTIUS</b>	<b>53</b>
3. MATERIALS I MÈTODES	55

<b>3.1. MODELS EXPERIMENTALS .....</b>	<b>57</b>
3.1.1. PROCEDIMENTS QUIRÚRGICS.....	57
3.1.1.1. Intestí .....	57
3.1.1.2. Ronyó .....	60
3.1.2. MODEL D'ÒRGAN AÏLLAT .....	62
3.1.2.1. Bany d'òrgans.....	62
3.1.2.2. Model aïllat d'intestí (IPJ) .....	64
3.1.2.3. Model aïllat de ronyó (IPK) .....	65
<b>3.2. GRUPS EXPERIMENTALS.....</b>	<b>66</b>
3.2.1. ESTUDI 1 .....	66
3.2.2. ESTUDI 2 .....	68
3.2.3. ESTUDI 3 .....	69
3.2.4. ESTUDI 4 .....	71
<b>3.3. RECOLLIDA DE MOSTRES.....</b>	<b>71</b>
3.3.1. INTESTÍ .....	71
3.3.2. RONYÓ.....	72
<b>3.4. DETERMINACIONS BIOQUÍMIQUES .....</b>	<b>73</b>
3.4.1. Determinació de la concentració de proteïnes .....	73
3.4.2. Determinació de nucleòtids, nucleòsids i bases púriques.....	73
3.4.3. Activitat de caspasa-3.....	73
3.4.4. Fragmentació d'ADN.....	74
3.4.5. Determinació d'òxid nítric.....	74
3.4.6. Western blot de caspasa-3.....	75
3.4.7. Determinació de creatinina.....	75
3.4.8. Determinació de l'activitat de lactat deshidrogenasa .....	75
<b>3.5. HISTOLOGIA I IMMUNOHISTOQUÍMICA.....</b>	<b>75</b>
3.5.1. Histologia intestinal.....	75
3.5.2. Histologia renal.....	76
3.5.3. Immunohistoquímica de caspasa-3.....	76
3.5.4. TUNEL .....	77
3.5.5. Microscòpia confocal.....	78
<b>3.6. DETERMINACIÓ MICROBIOLÒGICA DE LA TRANSLOCACIÓ BACTERIANA.....</b>	<b>78</b>
<b>3.7. MESURES DE FLUX .....</b>	<b>78</b>
<b>3.8. MONITORITZACIÓ DE LA BIOIMPEDÀNCIA I PROCESSAMENT DE LES DADES.....</b>	<b>79</b>
<b>3.9. ESTUDI ESTADÍSTIC.....</b>	<b>80</b>
<b>4. RESULTATS .....</b>	<b>81</b>
<b>4.1. ESTUDI 1 .....</b>	<b>83</b>
4.1.1. Nucleòtids d'adenina, adenosina i xantina a les 3 h de preservació. ....	83

4.1.2. Estudi de paràmetres apoptòtics durant la I/R intestinal. ....	84
4.1.3. Generació d'òxid nítric al final de la isquèmia. ....	86
4.1.4. Estudi anatomopatològic. ....	87
<b>4.2. ESTUDI 2</b> .....	<b>89</b>
4.2.1. Nivells d'ATP i adenosina al final de la isquèmia.....	89
4.2.2. Estudi de l'apoptosi al final de la isquèmia.....	90
4.2.3. Avaluació histològica al trasplantament .....	94
4.2.4. Translocació bacteriana en el trasplantament d'intestí prim de rata.....	96
<b>4.3. ESTUDI 3</b> .....	<b>97</b>
4.3.1. Estudi del citoesquelet d'actina al final de la preservació .....	97
4.3.2. Estudi de l'apoptosi al final de la preservació .....	99
4.3.3. Estudi de l'apoptosi a les 3 h de reperfusió .....	100
4.3.4. Dany tubular en la reperfusió .....	102
<b>4.4. ESTUDI 4</b> .....	<b>103</b>
4.4.1. Monitorització de la bioimpedància elèctrica durant la preservació.....	103
4.4.2. Avaluació histològica a les 24 h de preservació .....	104
4.4.3. Estudi d'altres marcadors bioquímics durant la preservació renal .....	105
4.4.4. Paràmetres funcionals en la reperfusió .....	106
4.4.5. Estudi del paràmetre $\alpha$ .....	107
<b>5. DISCUSSIÓ</b> .....	<b>109</b>
<b>Estudi 1: Mediadors de l'apoptosi en la I/R intestinal</b> .....	<b>111</b>
<b>Estudi 2: Efecte de la minimització de l'apoptosi durant la preservació intestinal: paper de la FDP</b> .....	<b>114</b>
<b>Estudi 3: Relació entre el citoesquelet d'actina i l'apoptosi en la I/R renal</b> .....	<b>116</b>
<b>Estudi 4: Monitorització de la BI elèctrica durant la preservació renal</b> .....	<b>119</b>
<b>6. CONCLUSIONS</b> .....	<b>123</b>
<b>7. BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>127</b>
<b>8. ANNEX</b> .....	<b>145</b>





## **1. INTRODUCCIÓ**



## 1.1. GENERALITATS

### 1.1.1 INTESTÍ PRIM

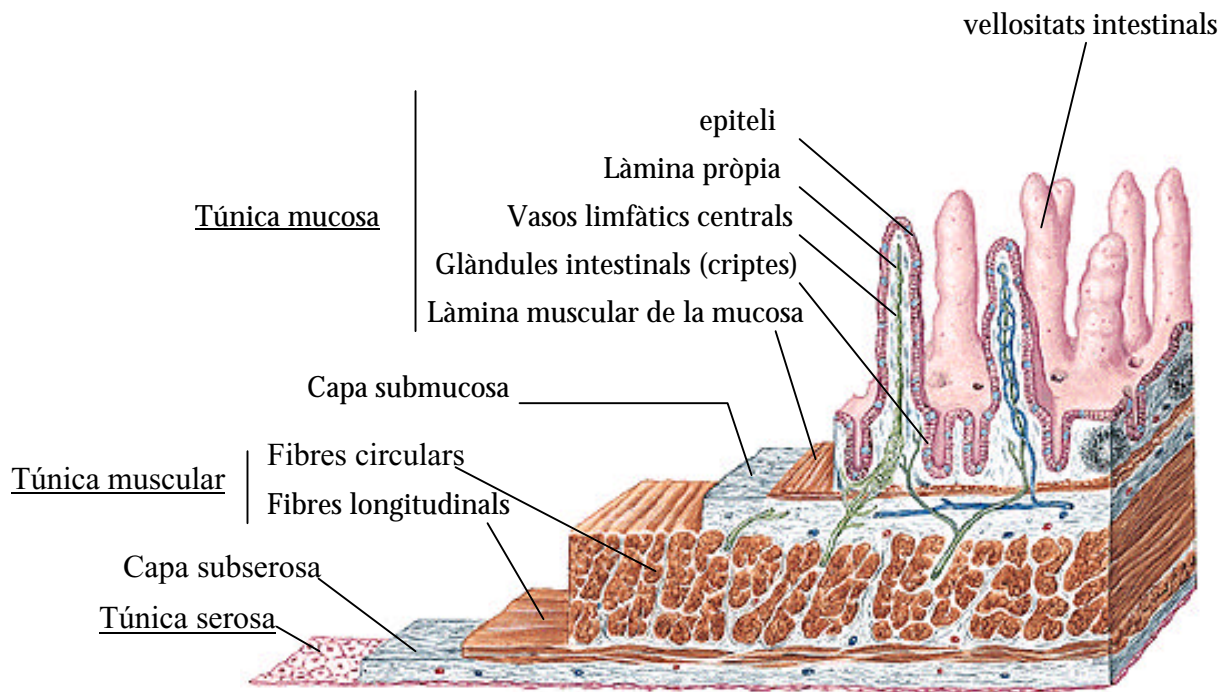
L'intestí prim és un segment del tub digestiu situat entre l'estómac i el colon o intestí gruixut. Té una longitud de 4 a 7 metres en humans i d'uns 50 a 70 cm en la rata. Es divideix en tres segments: duodè, jejú i ili. Existeixen petites diferències en la histologia de la mucosa dels tres segments de l'intestí prim, tot i que no s'observen límits precisos entre ells (1).

Partint de la llum intestinal la primera regió que s'observa és la túnica mucosa. La primera capa d'aquesta regió està formada per una monocapa de cèl·lules epitelials, les quals revesteixen les prolongacions digitiformes denominades vellositats intestinals (que incrementen la superfície de l'epiteli) i les invaginacions o criptes de Lieberkühn de l'intestí prim. Entre quatre i sis cèl·lules mare, a la base de la cripta, donen lloc als tres principals tipus cel·lulars de l'epiteli: cèl·lules absortives (enteròcits), que incrementen la capacitat absortiva total de l'intestí; cèl·lules globulars mucosecretores (caliciformes), que secreten moc per protegir a l'epiteli de l'abradió i impedir l'adherència i invasió de les bacteries patògenes; i cèl·lules enteroendocrines, que secreten diferents substàncies amb capacitat emulsiva i que afavoreixen la motilitat intestinal (1).

Les cèl·lules es multipliquen per mitosi en el terç inferior de la cripta i es diferencien en els dos terços superiors. La vida mitja d'una cèl·lula des de la base de la cripta fins l'àpex, a on finalment és eliminada, és de dos o tres dies en rosegadors de laboratori i de tres a sis en l'home. En l'epiteli normal la taxa de divisió cel·lular està igualada amb la taxa de pèrdua, i les cèl·lules que es moren es desprenen de l'àpex de la vellositat cap al lumen. Així doncs, les cèl·lules epitelials del intestí són una de les poblacions cel·lulars amb una taxa de renovació més ràpida (1).

Per sota de la capa de cèl·lules epitelials s'estén una capa de múscul llis que constitueix la capa muscular de la mucosa. Entre l'epiteli i la capa muscular de la mucosa, hi ha un teixit conjuntiu lax que forma la làmina pròpia. Aquesta làmina pròpia està formada per cèl·lules fixes i mòbils que es situen sobre una delicada trama de fibres elàstiques i reticulars, i conté una xarxa de capil·lars situat sota l'epiteli. A més a més, conté les branques terminals d'un plexe limfàtic submucós (vasos quilífers), que constitueixen una important via pel transport de lípids absorbits i d'altres nutrients (1).

La capa muscular de la mucosa separa la mucosa de la resta de capes que constitueixen l'intestí, que són: la submucosa, la muscular i la serosa (Figura 1.1).

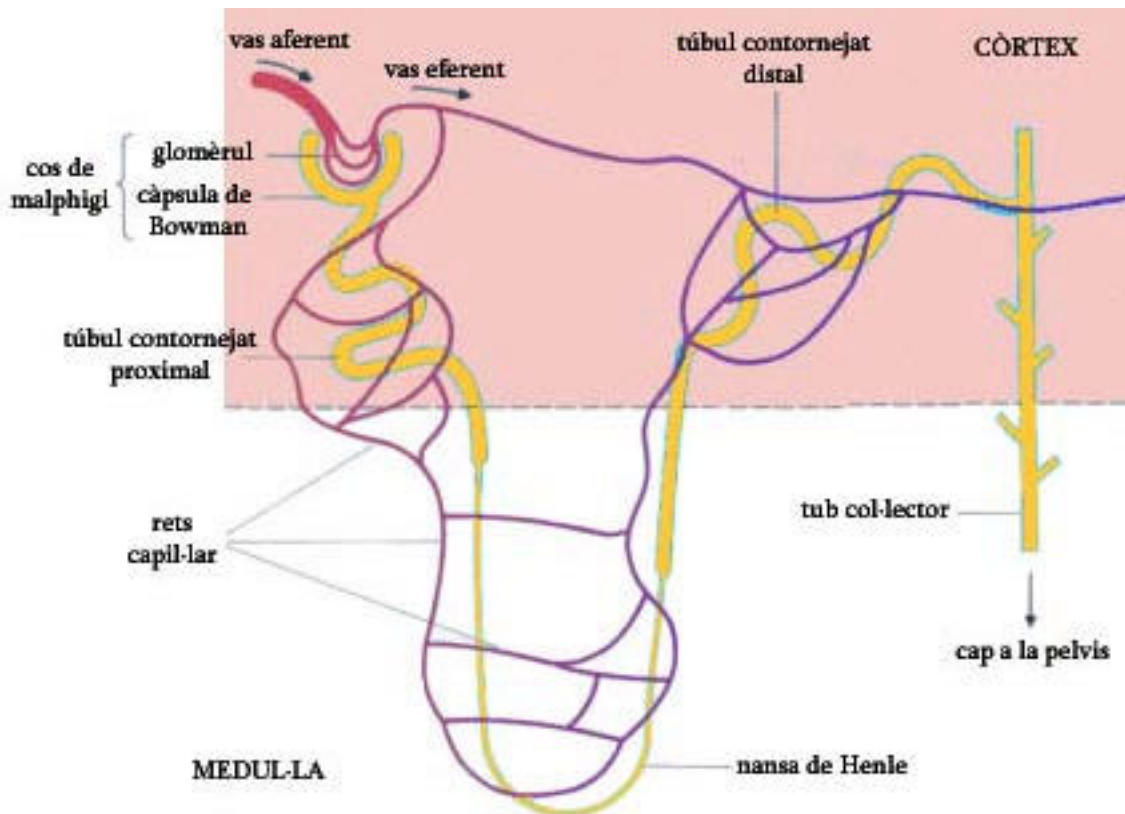


**Figura 1.1.** Esquema de les capes de l'intestí prim.

La funció principal de l'intestí prim és l'absorció de nutrients. Altres funcions de l'intestí prim són: la immunitària, ja que d'una banda conté ganglis limfàtics agrupats formant les anomenades plaques de Peyer, i de l'altre, al llarg de tota la làmina pròpia es poden trobar macròfags amb gran capacitat de fagocitosi (constituint la primera línia de defensa davant dels microorganismes que poden envair la mucosa des de la llum); i l'endocrina, a través d'una població heterogènia de cèl·lules endocrines (1).

### 1.1.2. RONYÓ

La unitat bàsica funcional del ronyó és la nefrona. Aquesta consta de glomèrul, túbul contornejat proximal, nansa de Henle, túbul contornejat distal i túbul col·lector (Figura 1.2).



**Figura 1.2.** Esquema d'una nefrona i de la seva vasculatura.

El ronyó consta de dues zones clarament diferenciades: escorça i medul·la. A l'escorça renal es localitza gran part de les estructures de la nefrona (glomèrul, túbul proximal, segment gruixut de la nansa de Henle i túbul contornejat distal) i s'anomena, per aquesta raó, nefrona cortical. A la zona de l'escorça propera a la medul·la renal també s'hi localitzen alguns glomèruls que pertanyen a nefrones anomenades juxtamedul·lars. A la medul·la es localitzen la majoria de les estructures de les nefrones juxtamedul·lars, el segment prim de les nanses de Henle de les nefrones corticals i els túbuls col·lectors. La medul·la es subdivideix, anatòmicament, en una zona interna i una d'externa. A la zona de confluència entre l'escorça renal i la medul·la externa és on es localitzen la majoria de les estructures funcionals del ronyó (2).

Hi ha dues xarxes de capil·lars que reguen el ronyó: el glomèrul i els capil·lars peritubulars. Una part especial del sistema peritubular és la dels vasos rectes que descendeixen al voltant de les parts més baixes de les nanses de Henle. Només una petita porció (1-2%) del total del flux sanguini renal flueix a través dels vasos rectes. És a dir, el flux de sang a través de la medul·la renal és menor en comparació amb l'escorça renal (2).

Les funcions principals del ronyó són: la filtració de la sang i l'excreció de les substàncies tòxiques de l'organisme (a través de l'orina s'eliminen els elements nocius, així com l'aigua i les sals minerals en excés); el manteniment de l'equilibri intern tant iònic com àcid-base i de l'estat d'hidratació, la qual cosa permet el correcte funcionament de totes les cèl·lules del cos; i, finalment, també fabrica substàncies que actuen com a hormones que estimulen la producció de glòbuls vermells, regulen la pressió arterial i mineralitzen l'esquelet (2).

## **1.2. TRASPLANTAMENT**

Pacients afectats per gran varietat de malalties les quals resulten en la fallida de l'òrgan poden, gràcies al trasplantament, reemplaçar aquests òrgans per d'altres que funcionen correctament, amb la qual cosa s'aconsegueix millorar les condicions i la qualitat de vida dels malalts. En determinats casos, el trasplantament representa l'única alternativa per curar la malaltia en fase terminal i, per tant, prolongar la vida amb un nivell de qualitat acceptable.

Espanya és el país del món amb un major índex en la donació, amb prop de 34 donants per milió de població (3). Tot i així, en els últims 2 anys s'ha arribat a un a estabilització de la taxa de donació. La potenciació dels programes de donants en assistència (donant a cor parat, NHBD), l'increment de la donació d'òrgans de donant viu (HBD) i, potser fins i tot, el xenotrasplantament en un futur no immediat, constitueixen opcions per augmentar el nombre d'òrgans per trasplantar.

La millora en el coneixement dels mecanismes de preservació, especialment mitjançant l'ús de màquines de perfusió, podria permetre rescatar òrgans amb temps d'isquèmia perllongats, avaluar la viabilitat d'aquests i modular farmacològicament el procés de preservació (4) .

En els últims anys, el desenvolupament d'immunosupressors ha disminuït la incidència del rebuig agut en el postrasplantament immediat, tot i que la seva supervivència a llarg termini és més controvertida. La incidència de neoplàsies en el pacient immunosuprimit està augmentada, això comporta la necessitat de protocols de seguiment estrictes per la seva detecció precoç i la reducció de la immunosupressió al mínim necessari i de la manera més específica (4).

### 1.2.1. TRASPLANTAMENT INTESTINAL

El trasplantament intestinal constitueix la única alternativa terapèutica que es pot oferir a aquells pacients obligats a rebre nutrició parenteral amb caràcter domiciliari per tota la vida degut a un fracàs intestinal. Les causes que condueixen al fracàs intestinal són fonamentalment tres: el síndrome d'intestí curt, els trastorns de la motilitat i les malformacions congènites. La primera causa és la més freqüent en la població adulta (5). Quan el tractament amb nutrició parenteral total (NPT) fracassa per raons d'accés venós o de sèpsia de repetició, el trasplantament intestinal es planteja com la única alternativa terapèutica.

El maneig dels pacients amb un quadre clínic d'insuficiència intestinal ha millorat gràcies als progressos obtinguts en els últims anys en NPT i, en concret, en la NPT domiciliària. De totes maneres, el trasplantament intestinal segueix sent el tractament d'elecció en alguns casos. Avui en dia, el trasplantament intestinal està indicat fonamentalment en aquells pacients que depenen de forma permanent i persistent de la NPT. Donat que la NPT generalment és ben tolerada, fins i tot durant llargs períodes, cada indicació ha de ser sospesada tenint en compte els riscos i la qualitat de vida del pacient. Quan els límits de la NPT s'han sobrepassat, com en el cas de complicacions vasculars i infeccioses del catèter o d'alteracions hepàtiques i metabòliques, s'hauria de recórrer al trasplantament intestinal. En aquests casos, el trasplantament aïllat d'intestí prim segueix essent la primera opció, mentre que el trasplantament conjunt d'intestí i fetge només està indicat pels casos de malaltia hepàtica progressiva associada (5).

L'intestí ha sigut molt més difícil de trasplantar que d'altres òrgans sòlids. Trobem diverses raons principals que expliquen aquest fet. La primera és que conté la major càrrega de teixit limfàtic de l'organisme, per la que el rebuig agut és especialment difícil de prevenir i tractar, i gran part de la mortalitat és deguda al rebuig no controlat. Un altre és el gran nombre de bacteris presents a l'intestí, els quals incrementen el risc d'infecció després del trasplantament. Així doncs, per una banda els pacients s'han de tractar amb immunosupressors per evitar el rebuig, però per l'altre aquesta immunosupressió no ha de ser excessiva perquè hi ha al perill d'infecció, essent difícil trobar l'equilibri. Aquests fets han sigut determinants perquè el desenvolupament del trasplantament intestinal no hagi sigut paral·lel al d'altres òrgans sòlids com el cor, el fetge o el ronyó (5).

Una de les principals causes de mortalitat dels pacients sotmesos al trasplantament intestinal és la fallida primària de l'empelt que té lloc com a conseqüència del síndrome d'isquèmia i reperfusió (I/R) (6). En aquest sentit, l'ús de solucions de preservació que contenen substàncies protectores envers aquesta lesió tal com

l'EuroCollins (EC) o la solució de la Universitat de Wisconsin (UW) en els últims temps, i el fet d'utilitzar la tècnica de perfusió a través de l'artèria mesentèrica superior descrita per *Cohen* (7), han sigut factors de vital importància pel desenvolupament del trasplantament intestinal.

Des de 1985, s'han realitzat més de 700 trasplantaments d'intestí prim a tot al món. En un 42% dels casos, el trasplantament ha sigut d'intestí prim amb o sense el colon; en un 45% al trasplantament d'intestí prim s'hi ha associat un empelt hepàtic; i un 13% ha sigut en el context d'un trasplantament multiorgànic (5).

Les indicacions per dur a terme el trasplantament intestinal han sigut: el síndrome d'intestí curt en un 64% dels casos; quadres de diarrea severa incontrolable i intractable en un 13%; tumors malignes abdominals en un altre 13%; i el síndrome de pseudobstrucció intestinal en un 8% dels casos (el 2% restant són altres causes) (5).

El nombre de trasplantaments realitzats per any s'ha vist incrementat de forma lineal des de 1990. La viabilitat de l'empelt i la supervivència del pacient l'any en trasplantaments realitzats després del febrer del 1995, va ser del 55% i del 69% respectivament. En casos de trasplantaments combinats (intestí i fetge), es va arribar a xifres de viabilitat del empelt i de supervivència del pacient a l'any del 63% i del 66% respectivament. També en trasplantaments multiorgànics s'aconseguien valors del 63% en quan a supervivència de l'empelt i del receptor (5).

Cal dir que al 2002 es va realitzar el primer trasplantament d'intestí en un adult a Espanya, a l'Hospital Ramón y Cajal de Madrid. Aquesta operació s'havia realitzat 140 vegades al món fins aquell moment (8).

### **1.2.1.1. Translocació bacteriana**

Com ja s'ha dit, l'intestí té una peculiaritat que el distingeix d'altres òrgans. Es tracta del contacte directe que manté amb els microorganismes del medi extern. Molts d'ells són sapròfits i no causen cap dany en condicions normals. No obstant, la majoria són potencialment patògens si es produeix una ruptura de la barrera intestinal, ja que poden originar un estat de sèpsia i fallida multiorgànica. L'intestí funciona com a barrera contra la invasió dels milions de gèrmens que hi resideixen. La membrana epitelial i les cèl·lules mucoses prevenen l'adherència bacteriana i la migració transcel·lular dels patògens potencials, així com també de les seves toxines, i les unions intracel·lulars prevenen el pas paracel·lular (9).



Existeixen però, situacions en les que poden produir-se el pas d'aquests gèrmens a través de la barrera intestinal, fenomen que es coneix com a translocació bacteriana (TB). La TB es defineix com el pas de microorganismes (vius o morts) i productes bacterians (com endotoxines, exotoxines i fragments cel·lulars) des de la llum intestinal del hoste cap a un lloc extraintestinal i estèril (10). Aquest fenomen s'ha associat a múltiples circumstàncies, incloent la teràpia antibiòtica (11), l'ús de la NPT (12), la malnutrició, el síndrome d'I/R, el sobrecreixement bacterià (13), els desordres de motilitat intestinal i els estats d'immunosupressió. La majoria d'aquestes situacions són presents als pacients sotmesos a un trasplantament intestinal. D'acord amb això, existeixen estudis en models animals de trasplantament intestinal que han demostrat el paper de la TB en la gènesi d'infeccions després d'aquest procediment (14-20). No obstant, els mecanismes que desencadenen aquests processos encara no es coneixen.

### **1.2.2. TRASPLANTAMENT RENAL**

En els malalts amb insuficiència renal crònica avançada és imprescindible instaurar un tractament substitutiu per recuperar la funció del ronyó. En general, el primer pas és la diàlisi, però quan l'estat general del malalt és bo i els avantatges superen els riscos que comporta qualsevol operació quirúrgica, està indicat practicar un trasplantament de ronyó. Per a aquests malalts el trasplantament suposa, d'una banda, una millora important pel que fa a qualitat de vida i autonomia, ja que deixen de dependre de la màquina de diàlisi i, de l'altra, un augment de la supervivència, perquè eviten moltes de les complicacions que apareixen amb la diàlisi a llarg termini (3).

Aquest tipus de trasplantament és el que més aviat va obtenir uns resultats acceptables en comparació a la resta d'òrgans. Actualment, a Catalunya, es fan al voltant de 400 trasplantaments renals cada any. La hipertensió arterial i la diabetis són les dues causes més freqüents d'insuficiència renal crònica que requereix tractament substitutiu, però també hi ha altres problemes de salut que afecten el funcionament del ronyó: malalties immunològiques, alteracions de les artèries del ronyó, infeccions, abús d'analgèsics, obstrucció de les vies urinàries o processos hereditaris (21).

El trasplantament renal de NHBD és el més freqüent a Catalunya. Al començament dels anys vuitanta, el trasplantament de HBD era la tècnica més utilitzada; l'any 1984 se'n van dur a terme 45, però posteriorment aquest tipus de trasplantament ha anat disminuint. Els trasplantaments múltiples de NHBD s'han fet més habituals. El

primer va ser el de ronyó i pàncreas en malalts diabètics, que a partir de l'any 1990 va experimentar un increment fins a arribar a més de 10 trasplantaments anuals, i que en els darrers anys es situa entre els 15 i 20 anuals. Més recents són els trasplantaments múltiples de ronyó i fetge, on l'activitat encara és reduïda, amb 5 trasplantaments l'any 1997 i 29 des de l'any 1988. Per primera vegada, l'any 1997 es van practicar trasplantaments dobles de ronyó. Amb aquesta nova modalitat es pretén obtenir un millor aprofitament dels recursos, ja que es consideren com a òrgans vàlids ronyons que, per les característiques que presenten, no s'haurien acceptat per a trasplantament d'un sol ronyó (21).

El temps d'isquèmia freda (CI) dels òrgans utilitzats en els trasplantaments del període 1990-2002, ha tendit a disminuir, ja que l'any 1991 la mitjana d'hores d'isquèmia va ser de 23,2 mentre que l'any 2002 va ser de 17,2 (21).

La incidència de pèrdua de l'empelt global durant el primer any del trasplantament és del 16,5% persones/any en el període 1990-1997 i de 10,1% persones/any en el període 1998-2000. La incidència de pèrdua de l'empelt després del primer any del trasplantament és del 5,7% persones/any en el primer període i del 3,3% persones/any en el segon. Les principals causes de pèrdua de l'empelt durant el primer any del trasplantament en ambdós períodes són la mort del pacient, les complicacions i el rebuig agut. Pel que fa a les pèrdues de l'empelt produïdes després del primer any del trasplantament les més freqüents són: el rebuig crònic i la mort del malalt (21).

La supervivència dels 5.351 empelts de NHBD practicats a Catalunya en el període 1984-2002 és del 69% als 5 anys i del 49% als 10 anys. Un cop superat el primer any, les possibilitats de perdre l'empelt són inferiors al 5% anual. La supervivència del malalt és del 90% als 5 anys i del 81% als 10 anys. La mortalitat té lloc principalment durant el primer any i és inferior al 2% anual. Els resultats en els malalts que han rebut un trasplantament de HBD són encara millors (la supervivència dels malalts és del 96% als 5 anys i del 92% als 10 anys, i la de l'empelt del 78% i del 59% respectivament). Cal dir que la supervivència de l'empelt varia molt segons l'edat del donant, tant en els receptors joves com en els grans (21).

Fa uns anys es va iniciar una recollida retrospectiva de les variables següents: presència de necrosi tubular aguda (NTA), temps de CI i dies de diàlisi posteriors al trasplantament. Malgrat que encara hi ha un percentatge elevat de no informats, la supervivència als 3 i 5 anys de l'empelt d'aquells malalts que han superat el primer any de trasplantament funcionant, en relació amb la presència o no de NTA va ser del 91% i del 77% mentre que dels que no la van tenir va ser del 93% i 85%, respectivament (21).

Actualment a Catalunya es practiquen trasplantaments a malalts més vells i a una proporció més gran de malalts diabètics, a qui principalment se'ls trasplanten simultàniament ronyó i pàncrees. També s'observa una tendència creixent en el nombre de retrasplantaments. Una altra dada interessant a comentar es que a partir de l'any 1998 hi ha hagut una disminució molt important en la pèrdua de ronyons en el primer any del trasplantament, fet que podria ser degut a la incorporació de nous fàrmacs (21).

Avui en dia, un dels problemes més acusat en aquest camp és la manca de ronyons suficients per la quantitat de pacients en espera existent. Aquest problema s'agreuja degut a que cada cop hi ha més malalts d'edat avançada –més de 60 anys- que demanden un trasplantament de ronyó per millorar la seva qualitat de vida. Per altra banda també ha augmentat l'edat dels donants, fet que comporta que els resultats que s'obtinguin siguin pitjors i s'hagin de fer més retrasplantaments (22).

Un altre dels reptes actuals d'aquesta teràpia és millorar la vida mitja dels empelts renals, ja que actualment la supervivència mitja dels òrgans procedents de cadàvers és només de 13 anys, mentre que la dels HBD és de 33 anys. Alguns estudis indiquen que l'edat, la raça, el rebuig agut, la funció renal i la tensió arterial i la isquèmia són factors determinants per la supervivència de l'empelt (23).

### **1.2.2.1. Marcadors de viabilitat**

La valoració clínica dels ronyons és subjectiva, però és la que s'utilitza de forma sistemàtica per intentar predir la viabilitat renal. Aquesta valoració es basa en considerar els següents factors els quals influiran en la viabilitat del ronyó a trasplantar: els diferents temps d'isquèmia (freda, calenta i períodes intermedis que es poden denominar com a isquèmia tèbia), l'edat del donant, les malalties del donant (especialment patologies vasculares), l'aparença macroscòpica del ronyó, la causa de la mort cerebral i el manteniment del donant prèviament i durant la mort cerebral (4, 24).

Sense cap mena de dubte, el paràmetre més important és el temps d'isquèmia. Aquest temps és recollit de forma sistemàtica i hauria de ser un paràmetre objectiu, però ni tan sols en les extraccions de donants amb mort cerebral (i cor latent, HBD) ho és totalment. En el cas dels NHBD la predicció clínica de la viabilitat és fa encara molt més difícil, ja que s'hi afegeix el problema de la valoració de la isquèmia calenta (WI) alhora de predir la viabilitat. La WI no és tan sols el temps que el pacient està en aturada cardíaca, el qual ja de per si és difícil de determinar en molt casos, sinó que a més, s'hi ha d'afegir maniobres de reanimació i temps d'isquèmia tèbia. Tot i que

s'intenten limitar aquests temps a la pràctica clínica, l'índex de ronyons que no funcionen de forma primerenca es situa entre el 15 i el 20% (25).

Existeixen estudis experimentals que han profunditzat en dos vies de lesió cel·lular com a marcadors de viabilitat: disminució de la càrrega energètica i augment de les resistències vasculares. Aquests dos marcadors, proporcionals al grau de lesió renal, estan relacionats entre si.

L'augment de les resistències vasculares és el resultat de l'alliberació de substàncies vasoactives (26). Aquest augment és traduït en una disminució del flux renal en el moment de la reperfusió del receptor. Amb la determinació de diverses d'aquestes substàncies vasoactives és possible predir la viabilitat renal, amb sensibilitat i especificitat superiors al 90% (26). La limitació del seu ús, a la pràctica, ve donada pel temps necessari per practicar aquestes determinacions bioquímiques, que excedeix al recomanable en el cas del NHBD en qui realment és important predir la viabilitat. El flux renal arterial també es pot utilitzar per predir la viabilitat. En estudis experimentals en porcs, s'ha demostrat que els ronyons amb fluxos arterials superiors a 50 ml/min tenen 5 cops més possibilitats de ser viables que els que tenen menor flux (27). Aquest paràmetre doncs, pot ser valorat de forma preoperatòria utilitzant la bomba de perfusió contínua, obtenint l'índex de resistència vascular del ronyó en la perfusió (28).

La disminució de la càrrega energètica és proporcional a la lesió per isquèmia i pot ser utilitzada com a factor pronòstic de viabilitat (29). En estudis experimentals s'ha observat que, probablement més que els valors absoluts de càrrega energètica de la cèl·lula, és important la capacitat de recuperació de la mateixa. L'ús d'aquest marcador ve limitat altre cop pel temps: aquestes determinacions bioquímiques no es poden obtenir de forma prou ràpida abans del trasplantament.

Altres marcadors de viabilitat són els de lesió tubular, com l'alfa glutatió S-transferasa ( $\alpha$ -GST), que poden ser determinats en el líquid de perfusió obtingut a l'utilitzar la bomba de perfusió contínua de forma prèvia al trasplantament (30). Un cop trasplantat el ronyó, en cas d'existir diüresi, és capaç de mesurar el grau de lesió tubular, que és proporcional als nivells d' $\alpha$ -GST. Valors molt elevats d' $\alpha$ -GST poden ser predictius de necrosi cortical. Aquest paràmetre s'ha acceptat com a criteri de viabilitat (juntament amb d'altres criteris) en ronyons preservats en màquina de perfusió (24). De totes maneres presenta algunes mancances. El percentatge de ronyons que presenten fallida primària després d'haver estat qualificats com a viables es traduït en un 6-12% i la desqualificació de ronyons que podrien ser aptes, s'ha estimat entre un 9-34% (24). A més a més, tot i que aquest paràmetre sembla un bon

indicador de viabilitat i funció a curt termini, no prediu l'eficàcia de la funció renal a llarg termini (31).

La determinació de molts d'aquests paràmetres requereix l'ús de màquines de preservació, les quals ara per ara, no s'usen de forma rutinària com a mètode de preservació. Tot i que presenten alguns avantatges, especialment en els ronyons de NHBD, el seu cost elevat fa plantejar-ne la necessitat. De totes maneres, sigui quin sigui el mètode de preservació, no existeix actualment cap marcador vertaderament fiable per diferenciar ronyons viables i no viables.

### 1.3. PRESERVACIÓ D'ÒRGANS

Gràcies al fet que els òrgans es poden preservar, es disposa del temps necessari per poder trobar el receptor que més necessita l'òrgan o el que millor s'hi adiu a nivell d'antígens.

Els mètodes usats per preservar els òrgans es basen en la disminució del metabolisme mitjançant la **hipotèrmia**. Perquè els òrgans tolerin la hipotèrmia, la sang es retira i es reemplaça amb una solució de preservació hipotèrmica que sigui adequada. La composició d'aquesta solució és crítica alhora de determinar la tolerància de l'òrgan a la preservació hipotèrmica.

Es coneix amb el nom de solució de preservació als líquids amb els quals es perforen i es mantenen en condicions d'hipotèrmia a l'òrgan per trasplantar; amb la finalitat de preservar-ne la seva funcionalitat.

L'evolució de les solucions de preservació va ser possible gràcies al desenvolupament de solucions de composició intracel·lular. La solució de Collins i les seves posteriors evolucions com l'EC, es caracteritzen per un alt contingut en  $K^+$ . Tot i representar el millor canvi qualitatiu en la preservació, tenen importants limitacions en temps perllongats de CI i davant la presència de WI. Aquestes limitacions, juntament amb el desenvolupament del trasplantament d'òrgans més sensibles a la isquèmia, van provocar el desenvolupament de noves solucions de preservació. Entre les més utilitzades trobem la HTK (Histidina-Triptòfan-Cetoglutarat), una solució triple aminoacídica molt popular en el trasplantament cardíac, i la solució de Celsior. De totes maneres, la més universalment utilitzada és la UW. Els motius del seu ús extens són, per una banda, la seva eficàcia en la preservació d'òrgans molt sensibles a la isquèmia i, per l'altre, el fet que la major part de les extraccions d'òrgans es realitzen en el context d'extraccions multiorgàniques (amb presència d'aquests òrgans més sensibles). Per altra banda, per exemple en el cas dels ronyons, quan les extraccions

són només d'aquest òrgan, sovint significa que ens trobem davant d'un donant subòptim: anyós, NHBD o malalts amb pluripatologia, on es fa especialment important una òptima preservació de l'òrgan (4).

### **1.3.1. PRINCIPIS BÀSICS DE LA PRESERVACIÓ**

Existeixen diverses solucions de preservació, l'ús de totes elles té com a finalitat última minimitzar el dany de l'òrgan durant tot el procés de trasplantament: extracció, conservació i, finalment, implantació i reperfusió sanguínia. Per això els seus objectius són mantenir les reserves energètiques, la concentració iònica intracel·lular dins dels límits fisiològics, evitar els canvis de volum i morfologia de les cèl·lules i reduir les conseqüències de l'acidosi metabòlica secundària a la isquèmia.

En resposta a aquestes necessitats les solucions preservadores, malgrat les diferències en la seva composició, comparteixen unes característiques comuns:

#### 1. Manteniment dels nivells d'ATP:

Per tal de protegir l'empelt, la solució de preservació ha d'atenuar la disminució de la càrrega energètica cel·lular que té lloc durant la isquèmia, per assegurar el metabolisme basal durant aquest període i, sobretot, facilitar el retorn a la funció en la reperfusió.

Un òrgan isquèmic obté l'energia a través del catabolisme de la glucosa a àcid làctic (glucòlisi anaeròbia) (32) . Aquest pas però, es troba limitat per diferents factors:

- la reserva de glucosa (emmagatzemada en forma de glucogen) és limitada en tots els òrgans i un cop esgotada no es pot regenerar;
- l'acumulació d'àcid làctic a la cèl·lula autoinhibeix la glucòlisi anaeròbia (32);
- l'esgotament del contingut intracel·lular total d'ATP (malgrat la resíntesi parcial), que si cau per sota d'un nivell mínim, impedeix la continuació de la glucòlisi anaeròbia o malmet la posterior funcionalitat de l'òrgan que es considera irrecuperable.

Donat que els nivells d'ATP són mínims en el moment previ a la reperfusió i que és un substrat necessari per iniciar les diferents vies metabòliques de la cèl·lula, els líquids de preservació incorporen substàncies vàries, com l'adenosina, que actuant com a font alternativa d'energia, permeten restablir els nivells d'ATP en el moment en que es reinstaura l'aportació d'oxigen (33, 34).

Un altre mesura per mantenir l'ATP és disminuir-ne la seva utilització per part de la cèl·lula, per exemple, mitjançant els antagonistes dels canals de calci ATP dependents (35, 36). D'aquesta forma quan es bloquegen els canals, disminueix la utilització de l'ATP per part d'aquests i a més a més, es redueix l'augment de  $\text{Ca}^{2+}$  intracel·lular.

## 2. Osmolaritat i Tonicitat adequades (prevenció de l'edema cel·lular i intersticial):

Els primers líquids que s'usaren en preservació eren semblants al líquid extracel·lular pel que fa a la seva composició electrolítica. Aquestes solucions, com el sèrum salí isotònic o el Ringer lactat, contenien concentracions elevades de sodi i baixes de potassi, amb la qual cosa provocaven una ràpida pèrdua de cations intracel·lulars ( $\text{K}^+$  i  $\text{Mg}^{2+}$ ) i el sodi i l'aigua envaien les cèl·lules, donant lloc a òrgans no viables (amb les bombes iòniques disfuncionals).

Per evitar l'entrada massiva d'aigua a la cèl·lula, que es produeix com a conseqüència del desequilibri iònic secundari a la hipotèrmia, la proposta més senzilla introduïda per Collins i col. l'any 1969 (37) va ser la de rentar l'òrgan amb un líquid de característiques semblants a les del líquid intracel·lular. Actualment, la majoria de les solucions de preservació són de tipus intracel·lular, això vol dir riques en ions potassi i amb el sodi a concentracions molt més baixes ( $[\text{K}^+]=100-130 \text{ mM}$ ,  $[\text{Na}^+]=10-30 \text{ mM}$ ) (33). D'aquesta manera, malgrat l'anul·lació funcional de la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  que ocorre durant la isquèmia, s'aconsegueix mantenir la composició electrolítica intracel·lular, eliminant el gradient de concentracions transmembrana i limitant així els intercanvis passius intra i extracel·lulars (36, 38).

A més a més, és necessari que la solució tingui una osmolaritat que no excedeixi significativament la del plasma ni la del líquid intracel·lular i que per tant, estigui al voltant dels 300 mOsm, és a dir, que sigui isosmòtica amb el plasma. Si l'osmolaritat de la solució és menor a la del citoplasma, entraria aigua i això podria desestructurar la morfologia normal de la cèl·lula (edema cel·lular) i fins i tot podria trencar-se. Si l'osmolaritat fos major, l'efecte seria el contrari. Per mantenir una pressió osmòtica similar a totes dues bandes de la membrana citoplasmàtica, s'afegeixen substàncies impermeabilitzants a la solució de preservació. Aquestes molècules permeten conservar la osmolaritat i la tonicitat de la solució, entre ells trobem: manitol, rafinosa, glucosa, lactobionat i gluconat (33, 36).

A més a més, la solució de preservació ha de tenir substàncies que puguin exercir una pressió oncòtica semblant a la de les proteïnes, amb l'objectiu de limitar l'edema intersticial que podria ocórrer a conseqüència de l'extravasació del líquid intravascular. Aquestes substàncies d'elevat pes molecular (components oncòtics o

col·loides) confereixen certa viscositat a la solució de preservació i garanteixen un rentat uniforme de l'òrgan. No obstant, la viscositat del líquid de preservació cal que no sigui excessiva, ja que així s'ha d'exercir menys pressió de perfusió per introduir el mateix volum de líquid, la qual cosa es tradueix en un menor grau de lesió potencial per l'òrgan. Entre els col·loides utilitzats en les solucions de preservació trobem midó hidroxietílic (HES), polietilenglicol (PEG), dextrà i gelatina parcialment hidrolitzada (33, 36).

### 3. Capacitat tampó o amortidora:

Es convenient controlar l'acumulació d'hidrogenions ( $H^+$ ) intracel·lular per pervenir una acidosi exagerada la qual desembocaria inevitablement en necrosi cel·lular. S'han d'utilitzar substàncies amb bona capacitat amortidora a pH fisiològic i així retardar al màxim l'aparició de l'acidosi metabòlica, i amb una mínima tendència a quelar els cations bivalents com el  $Ca^{2+}$  i el  $Mg^{2+}$ . A més a més, aquestes substàncies han de ser capaces de travessar l'endoteli capil·lar per tal d'assegurar l'equilibri amb l'espai intersticial.

La importància d'una bona capacitat amortidora es deu al fet que durant la isquèmia s'acumulen a la cèl·lula hidrogenions, àcid làctic i altres metabòlits que modifiquen l'osmolaritat. Aquests osmolits han de ser expulsats ràpidament fora de la cèl·lula per evitar l'aparició d'edema cel·lular. Això s'aconsegueix mitjançant un mecanisme de transport actiu que consumeix energia i que s'inactiva amb l'aparició d'acidosi a l'espai extracel·lular i intracel·lular. És a dir, a mida que l'àcid làctic i els hidrogenions es van produint a l'interior cel·lular, van sent expulsats a l'exterior amb la conseqüent disminució del pH, que es va fent cada cop més àcid. Si el pH baixa per sota de 6 (que és el pH considerat com el límit inferior protector) la bomba de transport d'àcid làctic i d'hidrogenions s'inactivarà, amb la qual cosa aquests productes s'aniran acumulant a l'interior de la cèl·lula, l'osmolaritat anirà en augment i això comportarà l'entrada d'aigua des de l'exterior. L'acumulació intracel·lular d'hidrogenions (acidosi intracel·lular) també bloquejarà la glucòlisi anaeròbia amb la qual cosa deixarà de produir-se energia (39).

És per això que el principal objectiu d'un correcte control del pH és el d'evitar o retardar al màxim la caiguda d'aquest per sota de 6. Retardar el final de la glucòlisi anaeròbia (responsable de proporcionar l'energia necessària a la cèl·lula anòxica), permet allargar el temps d'isquèmia i evitar o retardar l'aparició de lesions irreparables de l'estructura cel·lular (39).



#### 4. Prevenció de lesions oxidatives i de la inflamació:

És ben conegut que durant les primeres fases de la reperfusió es produeixen moltes espècies reactives d'oxigen (ROS). Aquestes, donada la seva capacitat de reacció, tenen un paper molt rellevant en la lesió per I/R. A més a més, la isquèmia perllongada depleciona els antioxidants protectors del teixit (36).

La font de ROS és essencialment intracel·lular, no obstant també n'existeixen al medi extracel·lular, produïts per les cèl·lules inflamatòries (40). Amb la intenció d'anul·lar l'efecte d'aquests radicals s'introdueixen, en la composició dels líquids de preservació, determinades substàncies –conegudes amb el nom de *scavengers*– capaces bé d'evitar la formació de ROS (per inhibició enzimàtica) o bé de neutralitzar-les i/o eliminar-les un cop produïdes (antioxidants, reaccions redox). Diverses solucions de preservació inclouen glutatió reduït per limitar aquest tipus de dany, així com d'altres antioxidants i scavengers, com són la superòxid dismutasa, l'al·lopurinol i la vitamina E (36).

#### 5. Prevenció de la sobrecàrrega càlcica

Una de les conseqüències de la isquèmia és la pertorbació de la homeòstasi del calci. Es constata una acumulació de  $\text{Ca}^{2+}$  lliure al citoplasma degut a la disminució del seu emmagatzematge en els orgànuls intracel·lulars i del seu flux passiu des del medi extracel·lular (41). La presència sostinguda de nivells suprafiològics de calci intracel·lular pot conduir a l'activació de fosfolipases i proteases calci dependents. És doncs primordial evitar aquesta sobrecàrrega càlcica, ja sigui aportant ATP en condicions anaeròbiques per restablir l'homeòstasi o limitant l'entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a les cèl·lules (36).

És possible limitar el flux de  $\text{Ca}^{2+}$  amb una solució de preservació pobre o fins i tot sense  $\text{Ca}^{2+}$  (42). D'aquesta manera una concentració baixa en  $\text{Ca}^{2+}$  evitarà la seva difusió passiva des del medi extracel·lular a l'intracel·lular. Aquesta acumulació citosòlica també es pot atenuar afegint una font d'energia per restablir l'homeòstasi iònica o, fins i tot, es poden afegir fàrmacs a la solució per lluitar més específicament com pot ser bloquejant els canals de calci ATP dependents (36, 43).

### **1.3.2. SOLUCIÓ DE LA UNIVERSITAT DE WISCONSIN**

En base al coneixement dels diferents mecanismes pels quals la isquèmia i la reperfusió provocaven dany als òrgans, Southard i Belzer varen desenvolupar una solució de preservació que va rebre el nom de la universitat on va ser creada, és a dir,

la solució de la UW (33). Aquesta solució contenia agents que podien millorar la preservació del fetge i del pàncreas, i es va veure que mantenia durant tres dies un pàncreas de gos en bones condicions obtenint un 100% de supervivència al trasplantament. També va ser efectiva per la preservació durant tres dies del ronyó i dos dies del fetge en el gos. Aquests resultats van ser confirmats en d'altres laboratoris. Els resultats a la clínica també han sigut molt bons, ja que és la solució que permet uns temps de preservació majors en la majoria d'òrgans. Aquesta solució té un rang d'aplicabilitat molt ampli, com ja hem dit és útil en extraccions multiorgàniques i en òrgans especialment sensibles a la isquèmia, per tot això és la més emprada arreu (33).

La seva composició electrolítica és de tipus intracel·lular i, a més, incorpora nous substrats (33, 34):

- lactobionat, com a impermeabilitzant, evitant l'edema cel·lular. El lactobionat és la lactosa oxidada i té càrrega negativa. També és un agent quelant del calci, fet que pot explicar en part la seva eficàcia en la preservació freda, així com també del ferro, la qual cosa pot reduir la lesió oxidativa la reperfusió.
- rafinosa, com a suport osmòtic o impermeabilitzant, que juntament amb el lactobionat prevé l'acumulació de lactat i manté l'osmolaritat.
- HES, com a col·loide per evitar l'expansió de l'espai extracel·lular i protegir l'arquitectura tissular.
- adenosina, estimula la síntesi d'ATP a la reperfusió.
- al·lopurinol, per bloquejar la producció de ROS mitjançant la inhibició de la xantina oxidasa (XO).
- glutatió, que actua com antioxidant o *scavenger* de ROS, evitant l'estrès oxidatiu (antioxidant).
- magnesi, com a cofactor de reaccions dependents de cations.
- dexametasona, com a estabilitzant de la membrana cel·lular.
- fosfat, com a tampó d'hidrogenions i, possiblement, com a substrat d'ATP.

**Taula 1.1.** Composició de la solució de la Universitat de Wisconsin.

COMPONENT	CONCENTRACIÓ
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	25 mmol/L
Mg SO <sub>4</sub>	5 mmol/L
KOH	100 mmol/L
NaOH	25 mmol/L
Rafinosa	30 mmol/L
Lactobionat	100 mmol/L
HES	50 g/L
Adenosina	5 mmol/L
Al·lopurinol	1 mmol/L
Glutatió	3 mmol/L
Insulina	40 U/L
Dexametasona	16 mg/L
Penicil·lina	200.000 U/L
pH	7.4
Osmolaritat	320-330 mOsm/L

La inclusió d'un col·loide també serveix per facilitar el rentat vascular; una mesura de gran importància quan s'utilitza la bomba de perfusió contínua, però que no ha demostrat la seva utilitat en la forma més habitual com a solució de rentat simple. L'èxit de la solució resideix principalment en l'ús dels impermeabilitzants. S'han obtingut resultats semblants substituint-los per gluconat i glucosa, fet que rebaixaria el preu de la solució (4). Així doncs, tot i els bons resultats d'aquesta solució, encara resta per conèixer el per què de la seva efectivitat i es qüestiona l'eficàcia real d'algun dels seus components.

### 1.3.3. PRESERVACIÓ INTESTINAL

El temps que es pot mantenir un intestí preservat en bones condicions és molt curt comparat amb els altres òrgans que es trasplanten. Aquesta discrepància ha estat atribuïda tant als efectes específics que té la hipòxia hipotèrmica en l'intestí, com a la

manca d'una solució de preservació adequada que limiti aquests efectes. Actualment, la solució de UW és la solució més utilitzada a la pràctica clínica, en part degut a que les extraccions són multiviscerals i a que el temps de preservació emprat és de 4 a 8 h (44). No obstant, existeixen estudis experimentals que mostren els mateixos resultats amb altres solucions de preservació, fins i tot usant simplement solucions cristal·loides (45). El que sí que s'ha observat que millora la funcionalitat de la barrera intestinal és la perfusió de la llum intestinal amb alguna solució com la de UW durant la preservació (45).

La solució de UW s'ha vist que manté l'òrgan en bones condicions durant 6h. A partir d'aquest temps es comença a observar trencament de l'epiteli i més endavant desenganxament de cèl·lules epitelials; aquesta alteració s'observa primer a la punta de la vellositat i, amb el temps, avança fins a les criptes (46), amb el conseqüent risc de pèrdua del teixit durant la reperfusió. No obstant, s'han reportat temps de preservació més llargs mitjançant l'ús de tècniques de preservació molt més complicades com són l'oxigenació hiperbàrica i la perfusió contínua (45), les quals no han tingut massa èxit a la pràctica.

Se sap que l'intestí és excepcionalment susceptible al dany per I/R (47, 48), per això, la preservació intestinal pot topiar amb dificultats que no apareixen a la resta d'òrgans. Els empelts intestinals, els quals pateixen el dany de la preservació, resulten en una disfunció intestinal perllongada, pèrdua de la funció de la barrera, translocació bacteriana i sèpsia postrasplantament (6, 49). Per tant, qualsevol millora en aquest terreny significaria una millora en la situació del pacient, tant al postrasplantament immediat com en el futur de l'empelt. No obstant, són necessaris més estudis i més models experimentals amb animals grans per a un millor coneixement del trasplantament intestinal.

### **1.3.4. PRESERVACIÓ RENAL**

El fracàs de la preservació renal condiona, en el millor dels casos, l'aparició de NTA. Si la lesió és irreversible, parlem de la fallida primerenca del l'empelt a conseqüència del desenvolupament d'una necrosi cortical. El desenvolupament de NTA redueix com a mínim un 10% el percentatge de ronyons que funcionen a l'any. Aquest procés està mediat tant per factors del donant com pel grau de lesió isquèmica, que s'incrementa amb el temps d'emmagatzematge, essent la presència de WI prèvia la més nociva. Clàssicament, es considera que el dany produït per 30 min de WI equivalen a 24 h de CI. Estudis recents demostren que s'ha sobreestimat aquesta lesió, ja que un 60% dels trasplantaments experimentals realitzats en porcs

han sigut viables amb 90 min de WI. De totes maneres és important evitar la WI, donat que a partir dels 40 min, en òrgans amb una CI curta, es fa imprevisible la reversibilitat de les lesions (4).

A la pràctica clínica, els ronyons són perfosos amb una solució de preservació freda que neteja la sang i un cop extrets, els ronyons poden ser preservats de dues formes diferents. La més practicada, per la seva comoditat, és l'emmagatzemat en una solució de preservació a 4°C. Això permet, si no hi hagut WI prèvia, mantenir la viabilitat renal com a mínim durant 36 h. La segona forma de preservació és la recirculació contínua de solució de perfusió mitjançant una bomba de recirculació. Aquesta tècnica té major capacitat de preservació (fins a 3 dies sense WI) però requereix més manipulació i un equipament adequat; en definitiva, és un mètode més costós que en les condicions habituals de treball del nostre país no és imprescindible. Mereixeria la seva valoració en ronyons amb WI (NHBD) en els quals podria servir a més com a instrument per valorar la viabilitat renal (4).

No obstant, la perfusió hipotèrmica contínua del ronyó aïllat pot oferir 3 avantatges: incrementar la qualitat de l'òrgan preservat, la possibilitat de monitoritzar i/o modificar els paràmetres hidrodinàmics (pressió i flux de perfusió) i finalment, regular els valors de resistència vascular mitjançant la pròpia perfusió o mitjançant l'addició de substàncies a la solució. Els principals factors desfavorables serien el seu cost elevat, així com la possibilitat de produir lesions endotelials en temps perllongats de perfusió. Les indicacions actuals d'utilització de màquines de perfusió són (4):

- la millora de la qualitat de preservació dels ronyons amb WI prèvia (NHBD);
- test de viabilitat;
- la modulació de les conseqüències de la isquèmia renal mitjançant l'administració de substàncies.

Amb tot, la tècnica d'ús més freqüent és l'emmagatzematge en fred. És un mètode senzill i econòmic. Per aquest tipus de preservació s'han dissenyat solucions varies. L'elecció d'una o altre solució de preservació sovint depèn del cost i de si hi ha o no extracció i preservació d'altres òrgans, però les més emprades són l'EC i sobretot la UW. En aquest últim cas, l'inconvenient del seu preu més elevat respecte a solucions com l'EC, queda justificat per l'estalvi obtingut al disminuir l'índex de fracàs renal postquirúrgic i la necessitat de diàlisi en el postoperatori del trasplantament.

## 1.4. SÍNDROME D'ISQUÈMIA I REPERFUSIÓ

La interrupció del subministrament de flux sanguini a un teixit pot produir-se tant per motius patofisiològics, com per motius quirúrgics, i es coneix amb el nom d'**Isquèmia**. Quan la circulació sanguínia es restableix, l'òrgan en qüestió rep de nou oxigen i nutrients a través de la sang. Es podria pensar que aquest es recupera i només li queda la lesió isquèmica, però no és així, a la pràctica al reperfondre un òrgan que ha patit isquèmia prèvia es produeix un lesió superior que s'anomena lesió per **Reperfusió**. Aquests dos esdeveniments junts donen lloc a diferents lesions tissulars més o menys greus i intenses. Aquest conjunt d'esdeveniments és conegut com a síndrome d'**I/R**. Es tracta d'un procés complex en el qual la lesió s'inicia durant la isquèmia i augmenta amb la reperfusió. El dany per I/R contribueix en gran mesura a la mortalitat i morbilitat en el trasplantament clínic d'òrgans (50).

Els mecanismes de la lesió isquèmica són comuns a tots els òrgans sòlids, però les conseqüències en la funcionalitat de l'òrgan depenen de la duració de la isquèmia, de la temperatura i de la naturalesa del propi teixit. Per aquest motiu no tots els òrgans sòlids resisteixen de la mateixa manera la lesió, essent l'intestí un dels teixits més sensibles (47, 48). A més a més, dins d'un mateix òrgan poden existir zones més sensibles que d'altres segons el tipus cel·lular que la formen, com és el cas del ronyó, on les cèl·lules dels túbuls proximals són les més sensibles a la isquèmia (51) i la zona del ronyó més sensible a la isquèmia és la zona de confluència entre còrtex i medul·la.

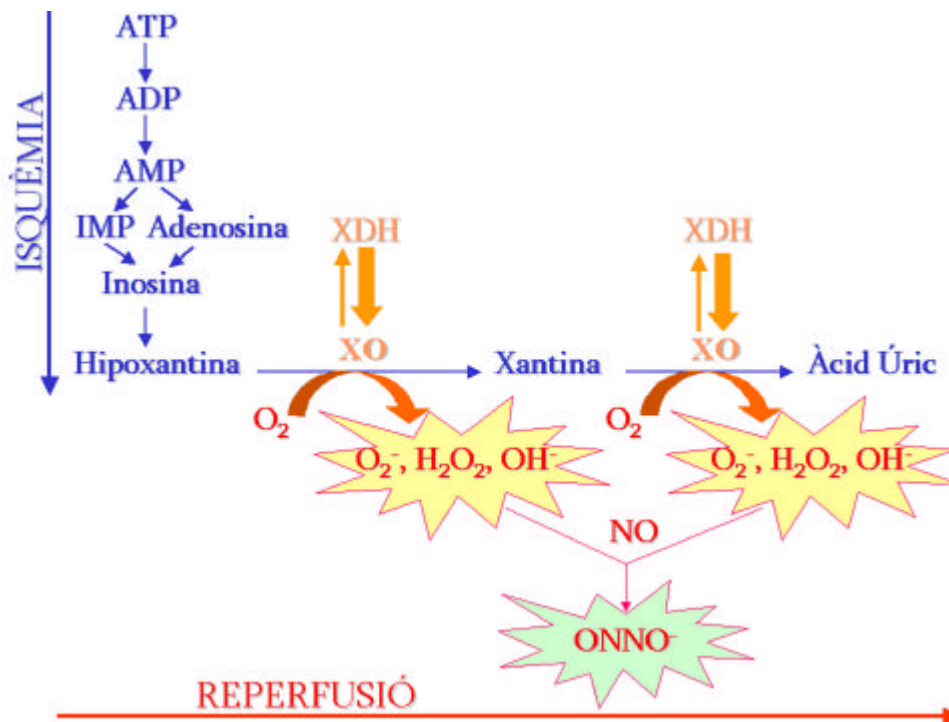
### 1.4.1. ESDEVENIMENTS CEL·LULARS DURANT LA I/R

Quan la sang que arriba a un òrgan és insuficient per afrontar la demanda metabòlica es produeixen una sèrie de canvis patològics en les cèl·lules, resultant amb una disfunció d'aquestes o fins i tot, amb la mort cel·lular.

La isquèmia provoca el pas del metabolisme aeròbic al metabolisme anaeròbic, que resulta en una ràpida disminució dels nivells intracel·lulars d'ATP. Les vies normals del metabolisme energètic es detenen, és a dir, es bloqueja la fosforilació oxidativa a nivell mitocondrial i disminueix la síntesi d'ATP i altres nucleòtids d'adenina productors d'energia. Associat a aquests esdeveniments, es troba un augment de NADH i una depleció de NAD<sup>+</sup> a l'interior de la mitocòndria, degut a la detenció dels enzims encarregats de transportar-los a través de la membrana mitocondrial. Per tant, s'acumula NADH i es consumeix ATP. La glucòlisi anaeròbia que es posa en marxa, i que només es capaç d'aprofitar un 5% del potencial energètic de la glucosa, origina l'acumulació de ions lactat i H<sup>+</sup>. Aquesta acumulació provoca una disminució

del pH cel·lular amb la ruptura de la membrana, alliberació d'enzims lisosomals i mort necròtica cel·lular (32, 52).

El procés de degradació d'ATP dona lloc a la formació d'adenosina, inosina i finalment hipoxantina la qual no pot ser metabolitzada a àcid úric en teixits isquèmics. Com a conseqüència, la seva concentració pot veure's molt incrementada en comparació a les condicions normals. Al mateix temps, la hipòxia provoca la conversió irreversible de la xantina deshidrogenasa (XDH) a XO per proteòlisi (53, 54). En una cèl·lula sana, la forma XDH és la predominant, catalitzant el pas d'hipoxantina cap a àcid úric. En condicions isquèmiques, en canvi, la XDH es converteix a XO. Durant la reperfusió, l'entrada d'oxigen permetrà a la XO generar xantina a partir de la hipoxantina acumulada, tot augmentant la producció de les ROS, que posaran en perill els mecanismes de protecció intracel·lulars (53, 54) (Figura 1.3.).



**Figura 1.3.** Esquema de la degradació dels fosfats d'alta energia durant la isquèmia i de la producció de radicals durant la reperfusió.

Una altra característica de la isquèmia és l'edema cel·lular, que lesiona les membranes citoplasmàtica, mitocondrial i lisosomal. Aquest edema s'origina per l'aturada de la bomba de sodi/potassi (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa) (38). Aquest enzim deixa de funcionar tant per la falta d'ATP, com per la hipotèrmia que té lloc durant la preservació. Quan la bomba es para, condueix a un desequilibri iònic intracel·lular, provocant un desequilibri catiònic (augmenten els ions de Na<sup>+</sup> i disminueixen els de K<sup>+</sup>), fet que provocarà la despolarització de la membrana, que pot portar al xoc

hiposmòtic (55, 56). El  $\text{Na}^+$  s'acumula a l'interior de la cèl·lula amb la conseqüent pèrdua de la càrrega negativa intracel·lular. Això permet al  $\text{Cl}^-$  entrar dins la cèl·lula i al  $\text{K}^+$  sortir en direcció oposada, cap a l'interstici. El guany net de  $\text{Na}^+$  és igual a la suma del guany de  $\text{Cl}^-$  i la pèrdua de  $\text{K}^+$  (38, 57). Per altra banda, els ions  $\text{Na}^+$  es mobilitzen cap a l'interior de la cèl·lula arrossegant amb ells aigua per tal de mantenir l'equilibri osmòtic amb l'espai intersticial del voltant. Amb la pèrdua de l'efecte osmòtic i l'entrada d'aigua dins la cèl·lula aquesta s'edematitza i perd l'arquitectura (38, 57).

Totes les cèl·lules del teixit isquèmic queden afectades en major o menor grau com a conseqüència de l'edema. A nivell de les cèl·lules endotelials de la microcirculació, l'edema origina defectes d'ompliment del llit vascular en l'òrgan en el moment de la reperfusió sanguínia. Aquest fenomen és conegut amb el nom de manca de reperfusió o *no reflow* (38). Quan l'òrgan no ha sigut correctament rentat abans de la preservació i queden hematies en el seu interior, aquests també pateixen el procés d'edematització i contribueixen a empitjorar la reperfusió (58).

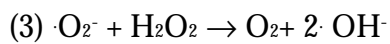
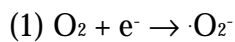
La disfunció dels enzims que depenen d'ATP afecta també les ATPases dependents de  $\text{Ca}^{2+}$ , causant l'acumulació de  $\text{Ca}^{2+}$  intracel·lular (59). Aquest augment es produeix molt ràpidament després de la I/R. Aquest calci citosòlic condueix a l'activació de diversos enzims calci dependents com són les fosfolipases (60). L'activació de la fosfolipasa  $A_2$  està associada amb la degradació de fosfolípids de membrana (61), i a canvis bioenergètics i de permeabilitat de la membrana plasmàtica i mitocondrial (62). Per altra banda, l'activitat de la fosfolipasa  $A_2$  comporta la producció de metabòlits com prostaciclins, prostaglandines, i tromboxans; alguns protectors i d'altres promotors del dany per I/R (63, 64).

En condicions normals l'ATP regula la contracció de les fibres d'actina i la seva interacció amb proteïnes i components de membrana, i és un element necessari per mantenir la composició de la membrana plasmàtica, ja que contribueix a l'esterificació d'àcids grassos i resintetitza fosfolípids. La seva desregulació provocarà una desorganització del citoesquelet (55), que donarà lloc a una manca de components fosfolipídics de membrana i s'acumularan productes de degradació fosfolipídica. Tots aquests fets ajudaran a les membranes a desestabilitzar-se, perdent les seves funcions estructurals i de membrana. La desestructuració del citoesquelet té moltes altres implicacions, les quals veurem més endavant.

La irreversibilitat de la lesió isquèmica està relacionada amb la incapacitat per restaurar la funcionalitat dels mitocondris i amb la lesió de les membranes citoplasmàtiques, essent l'afuncionalitat de les membranes una característica típica de la lesió isquèmica irreversible (65).



El dany iniciat durant la isquèmia es veu agreujat durant la reperfusió i és, majoritàriament, degut a l'entrada d'oxigen al teixit. Al mateix temps, aquest pas és un requisit fonamental per la recuperació del teixit i el restabliment del subministrament d'energia, però paradoxalment també és el causant de més dany. Aquesta reoxigenació condueix a una producció massiva de ROS, tòxiques per la cèl·lula. La toxicitat de ROS va associada a la seva alta reactivitat amb un no-radical produint nous metabòlits més o menys reactius que l'original. Hi ha tres ROS principals: (1) l'anió superòxid ( $\cdot\text{O}_2^-$ ), (2) el peròxid d'hidrogen ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) i (3) el radical hidroxil ( $\cdot\text{OH}$ ). El peròxid d'hidrogen si bé no és estrictament un radical, ja que no té un electró lliure, es considera així per la seva capacitat de donar ions hidroxil (54).



L'òxid nítric (NO) essent un molècula protectora davant de la lesió per I/R en diferents teixits és, en contacte amb els radicals superòxid, un agent citotòxic que dona lloc a la generació de peroxinitrit ( $\text{ONOO}^-$ ) (66) (Figura 1.3.). En condicions normals, la producció d'NO excedeix en gran mesura a la producció de superòxid. Això permet a l'NO actuar com a *scavenger* o captador endogen de superòxid (quan existeixen nivells intracel·lulars baixos d'aquest), però després d'uns minuts de reperfusió en un teixit isquèmic, la formació de superòxid supera àmpliament la formació d'NO (64). Aquests nivells relativament baixos d'NO reaccionen amb el superòxid que és abundant, generant peroxinitrit, i la resta de superòxid lliure genera, al mateix temps, altres radicals lliures com són  $\cdot\text{O}_2^-$  i  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Aquests no trigaran en iniciar o augmentar la inflamació en les vènules i en el sistema circulatori, promovent l'expressió i activació de molècules d'adhesió i per tant, l'adhesió i migració dels neutròfils cap a l'interior del teixit i l'inici de la reacció inflamatòria (64).

#### 1.4.2. CONSEQÜÈNCIES DE LA I/R EN EL TRASPLANTAMENT

Com ja s'ha dit anteriorment, el dany per I/R contribueix en gran mesura a la mortalitat i morbiditat en el trasplantament clínic d'òrgans (50).

En el cas de l'intestí se sap que la mucosa intestinal és un dels teixits més sensibles a la isquèmia i a la I/R (47, 48). Existeixen evidències que demostren que aquest síndrome, associat al trasplantament, és capaç d'incrementar tant la necrosi com

l'apoptosi cel·lular (67), fet que pot comprometre la viabilitat de l'òrgan durant el trasplantament degut a la destrucció de la capa mucosa i l'increment en la permeabilitat (68-71).

Durant el trasplantament la mort d'un pacient pot ser deguda al dany produït per la I/R de l'empelt. La fallida de l'empelt ocasiona la ruptura de la barrera intestinal i l'afectació a d'altres òrgans del cos, donant lloc a un percentatge de supervivència molt baix (10, 49).

En el cas del ronyó, durant la isquèmia, la reducció en l'aportació d'oxigen produeix lesions cel·lulars a l'epiteli del túbul renal. Després de llargs períodes d'isquèmia, la circulació sanguínia queda deteriorada ocasionant una reducció del flux plasmàtic dels glomèruls juxtamedul·lars i del còrtex renal.

Les conseqüències clíniques de la I/R renal han estat descrites com el retràs en la funció de l'empelt, així com el rebuig agut i crònic de l'empelt (72, 73). Les implicacions de la I/R en la disfunció del trasplantament es pot inferir de dos observacions: en primer lloc, els trasplantaments de HBD tenen millor supervivència a llarg termini que els de NHBD (74) i, en segon, els ronyons preservats a temps llargs de CI presenten episodis de rebuig agut més freqüentment que els que han estat exposats a temps mínims de CI (75). Per tant, el dany tissular associat a CI o a WI prèvia pot comprometre la viabilitat del ronyó al ser trasplantat.

Les cèl·lules epitelials tubulars renals responen de diferent manera al dany, dependent de la gravetat de l'estímul poden arribar a la necrosi o l'apoptosi cel·lular (76, 77). Tot i que la majoria dels canvis renals són reversibles, quan el teixit isquèmic és massa extens, la funció del ronyó no podrà recuperar-se per complert (78) i el dany agut anirà seguit d'una progressiva lesió renal, conduint al fracàs renal crònic (79).

El dany per I/R provoca el fracàs renal agut (FRA) del ronyó, aquest pot ser conseqüència de moltes situacions clíniques, entre elles el trasplantament (80, 81). El FRA es caracteritza per una ràpida davallada de la funció renal i la pèrdua mantinguda de l'aclariment, amb una acumulació de creatinina o urea. Així doncs la reducció pronunciada en la taxa de filtració glomerular és un dels trets més característics del FRA seguit d'una reducció del flux sanguini renal, secundari a l'increment de la resistència vascular renal. També contribueixen al dany la disminució del coeficient d'ultrafiltració i la necrosi tubular.

La pèrdua de funcionalitat de les cèl·lules epitelials tubulars com a conseqüència del despreniment o la mort cel·lular durant la preservació freda i al moment de la reperfusió són els principals factors que contribueixen al desenvolupament del FRA i

al retard en la funció de l'empelt (82). La mort cel·lular pot resultar directament de les condicions hipòxiques durant l'arrest cardíac, de la preservació freda i/o de dany per reperfusió al moment de la revascularització de l'empelt (82).

## 1.5. APOPTOSI

La mort cel·lular és la pèrdua irreversible de les funcions de la cèl·lula, donant lloc a la destrucció de l'estructura cel·lular a través de la dissolució o lisi cel·lular. La mort cel·lular es considera un procés normal en el manteniment, regeneració y creixement dels òrgans i teixits. També s'ha de considerar com una part del procés de maduració o envelliment cel·lular.

Quan la mort cel·lular sobrevé prematurament per un fenomen patològic es denomina **necrosi** o mort cel·lular patològica. La cèl·lula presenta una sèrie de característiques pròpies d'aquest tipus de mort: vacuolització severa dels mitocondris, ruptura de membranes amb extrusió citoplasmàtica, entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  i activació de les proteases i fosfatases, pèrdua contínua de coenzims i àcid ribonucleic, condensació nuclear amb agregació de cromatina (picnosi), destrucció de la cromatina (cariolisi), fragmentació nuclear (cariorrexis), digestió enzimàtica del citoplasma i nucli, fuga de compostos intracel·lulars i entrada de macromolècules extracel·lulars i, finalment, lisi cel·lular (66). Aquest tipus de mort cel·lular no està regulada, és un procés passiu induït per estímuls no fisiològics i tampoc requereix energia o síntesi de proteïnes i àcids nucleics. En la necrosi el resultat final és la ruptura de la membrana cel·lular i el vessament del contingut cel·lular a l'espai intersticial. Això comporta una resposta inflamatòria a la zona que pot ser perjudicial per les cèl·lules que l'envolten.

Existeix un altre tipus de mort cel·lular, l'**apoptosi** que pot ser definida com el conjunt de reaccions bioquímiques que tenen lloc en la cèl·lula i que conclouen amb la seva mort de forma ordenada i silenciosa. Aquesta mort cel·lular programada ha estat descrita per diferents grups al llarg dels anys, però va ser el grup de Kerr, Willie i Currie al 1972 qui finalment va donar el nom d'apoptosi per descriure aquest tipus de mort observat en diferents tipus cel·lulars (83). Segons aquest grup, la mort per apoptosi responia a un programa de mort intracel·lular que podia ser activat o inhibït per una gran varietat d'estímuls, tant fisiològics com patològics (incloent citocines, hormones, virus i insults tòxics).

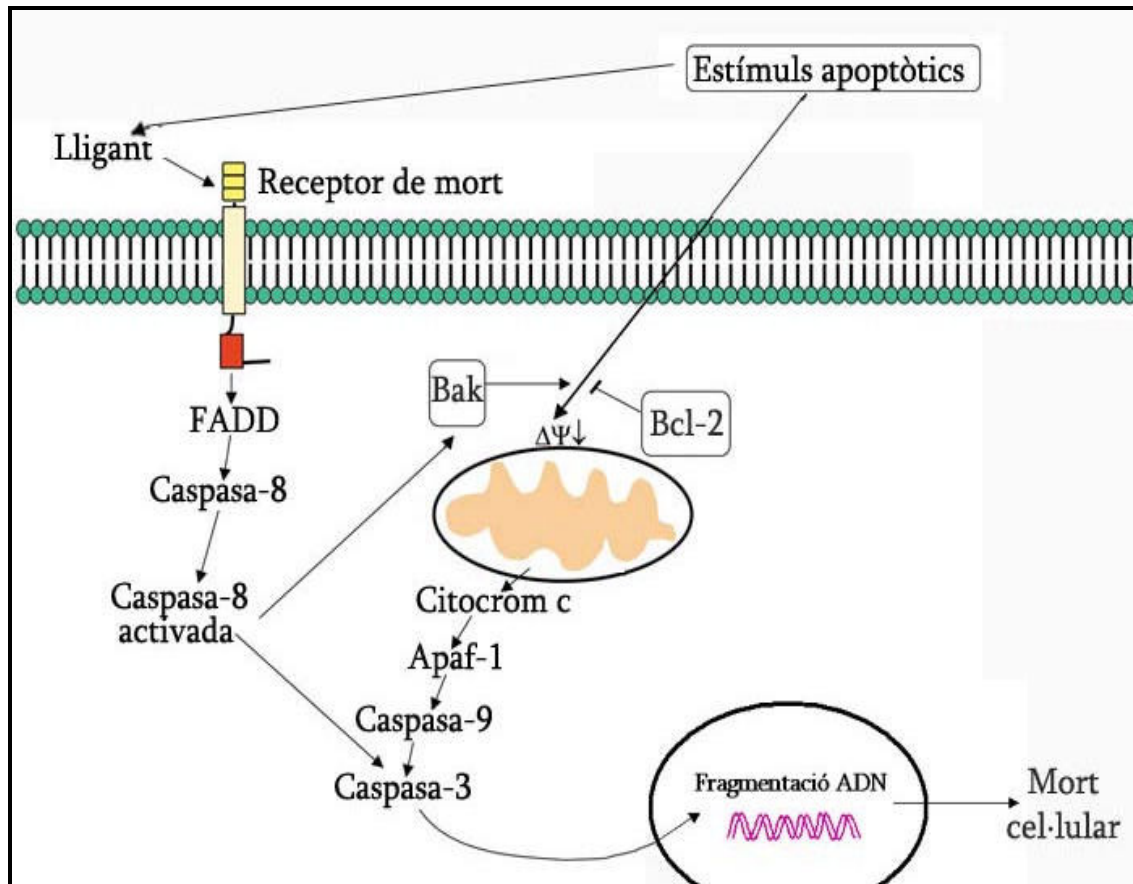
La cèl·lula apoptòtica pateix una sèrie de canvis morfològics que la defineixen com a tal. La membrana plasmàtica s'altera i es generen unes petites evaginacions

esfèriques (*blebs*). El volum cel·lular es redueix considerablement i el citoplasma es condensa. La mitocòndria sofreix una sèrie de disfuncions com (84, 85):

- desacoblament de la cadena de transport d'electrons així com detenció del metabolisme energètic;
- producció de ROS;
- alliberació de citocrom c al citosol cel·lular;
- fallida en el manteniment del potencial de transmembrana;
- formació de porus en la membrana mitocondrial a causa de l'actuació de les proteïnes de la família Bcl-2.

El nucli es redueix i la cromatina es fa més densa i es col·lapsa, dividint-se al final en diverses esferes formant els denominats **bossos apoptòtics**. L'ADN es fragmenta en subunitats regulars que resulten del tall a l'atzar entre els nucleosomes. Aquests canvis ocorren de forma predictiva, són seqüencialment reproduïbles i poden ser completats en 30-60 min (86).

Tot i que segurament hi ha vies alternatives, existeixen dos vies principals d'activació de l'apoptosi. L'extrínseca és la iniciada pels receptors de superfície de mort cel·lular que activarà la caspasa-8, i la intrínseca, és la iniciada per canvis en la integritat de la mitocòndria (controlada pels membres de la família Bcl-2) la qual formarà l'apoptosoma i activarà la caspasa-9. Les dos vies convergeixen en l'activació de la caspasa-3 i estan sotmeses a múltiples punts de regulació (84, 85).



**Figura 1.4.** Esquema simplificat de les dues vies principals que condueixen a la mort cel·lular per apoptosi.

Els receptors de mort cel·lular es troben situats a la superfície cel·lular i reben la senyal de lligants específics per cada un d'ells. Aquests receptors de superfície de mort cel·lular són una família de proteïnes transmembranals que poden donar la senyal directament a les caspases i en pocs segons disparar així el programa d'apoptosi. Els receptors de mort cel·lular pertanyen a la superfamília del receptor del factor de necrosi tumoral (TNFR), els quals tenen en comú un domini extracel·lular ric en cisteïna. Una altra característica comú a totes les molècules senyalitzadores d'apoptosi és la presència d'una seqüència situada en el seu domini intracitoplasmàtic ("domini de mort") i que serviria per acoblar el receptor amb la resta de la maquinària apoptòtica (84, 85).

Dins de les nombroses diferències bioquímiques i morfològiques entre l'apoptosi i la necrosi, probablement la característica distintiva de la necrosi és la desintegració de la membrana plasmàtica cel·lular. L'alliberació del contingut cel·lular de les cèl·lules necròtiques cap als teixits del voltant pot contribuir al dany de l'òrgan, mentre que les cèl·lules apoptòtiques són ràpidament fagocitades per macròfags evitant així la resposta inflammatòria dels teixits afectats (87, 88).

### 1.5.1. CASPASES

El component central de la maquinària que du a terme el suïcidi cel·lular o apoptosi consisteix en un sistema proteolític format per una família de proteases anomenades caspases. Aquests enzims participen en la cascada que s'activa com a conseqüència dels senyals apoptòtics que culmina amb el trencament d'una sèrie de proteïnes, resultant-ne la mort de la cèl·lula (86).

Les caspases són proteases cisteïna dependents i dirigides a l'aspartat. Aquesta família de proteases s'ha mantingut al llarg de l'evolució, des del nematode *Caenorhabditis elegans* en el qual van ser descrites per primer cop fins als humans (89). Fins al moment, la família de les caspases en humans està formada per 12 membres i tots ells tenen en comú que es troben en forma de zimogen o proenzim, amb una estructura molt ben definida (90).

Quan la cèl·lula entra en apoptosi, les caspases s'activen a través d'una o dues seqüències proteolítiques que trenquen el pèptid precursor en diferents fragments, que constitueixen els enzims actius. Aquesta proteòlisi es duta a terme per altres caspases i es tracta d'un procés irreversible; una d'aquestes molècules activa a l'altre tallant entre els seus dominis. Aquest procés d'activació permet que les caspases puguin realitzar la seva funció amb un efecte cascada que es va amplificant a si mateix des de que comença la senyal d'inici. Un cop activades, les caspases trenquen diversos polipèptids intracel·lulars, incloent la major part dels elements estructurals del citoplasma i del nucli, components dels mecanismes de reparació de l'ADN i algunes proteïnes cinases. En conjunt, tots aquests processos produeixen els canvis morfològics i bioquímics que caracteritzen la mort cel·lular per apoptosi (84-86, 90).

Les caspases es divideixen en subfamílies segons la seva preferència pel substrat, les similituds estructurals i la longitud de la seva regió reguladora N-terminal o prodomini (84-86, 90):

- les caspases amb prodomini llarg són conegudes com a caspases **iniciadores**, perquè estan involucrades en funcions de regulació de l'activació de la cascada de proteòlisi.
- les caspases amb prodomini curt, com són les caspases -3, -6 i -7, semblen estar situades en un tram més avall dins de la cadena i s'ha demostrat *in vitro*, que són activades per alguna de les caspases iniciadores. Els estudis realitzats suggereixen que aquestes caspases anomenades **efectores** (o executores) són les que actuen al final de la cascada sobre els components cel·lulars, proteolitzant-los.

Les caspases són unes de les proteases més específiques, fet que s'adiu amb l'observació que l'apoptosi no s'acompanya d'una digestió proteica indiscriminada,

sinó tot el contrari, una sèrie de proteïnes seleccionades es trenquen de forma coordinada, resultant en la pèrdua o el canvi de funció d'aquestes (86). Referent als substrats cel·lulars sobre els quals actuen les caspases cal destacar la degradació de molècules implicades en protegir la cèl·lula del procés d'apoptosi, com són alguns dels membres antiapoptòtics de la família Bcl-2, la degradació de molècules implicades directament amb l'estructura cel·lular (de manera que l'organització cel·lular resulta desmantellada) i, per últim, la degradació de proteïnes relacionades amb la reparació de l'ADN com ho és la poli (ADP-ribosa) sintetasa (PARS). El fet que les caspases inactivin proteïnes que protegeixen les cèl·lules vives de l'apoptosi com és el Bcl-2, implica a més a més una retroalimentació positiva, ja que el seu trencament genera un fragment que promou l'apoptosi. Les caspases també reconeixen estructures cel·lulars de forma indirecta mitjançant el trencament de diverses proteïnes implicades en la regulació del citoesquelet, incloent la gelsolina i la cinasa d'adhesió focal (FAK) (86, 90).

### **1.5.3. APOPTOSI I TRASPLANTAMENT**

L'impacte de l'apoptosi en la disfunció de l'empelt ha estat emfatitzada en els últims anys, amb estudis on per exemple el bloqueig amb inhibidors de les caspases o la transfecció amb Bcl-2 s'ha vist que redueixen notablement el dany després del trasplantament o durant la preservació respectivament (91). A més a més, s'ha demostrat una correlació entre l'increment en els nivells d'apoptosi i el temps d'isquèmia (35). Per tant, estratègies antiapoptòtiques tant durant la preservació com a la posterior reperfusió poden resultar altament efectives alhora de limitar el dany per I/R.

#### Intestí

En condicions normals, la mucosa de l'intestí adult presenta un balanç equilibrat entre les cèl·lules que proliferen i les que es moren. En els últims anys ha cobrat interès la teoria que senyala l'apoptosi com a mecanisme fisiològic comú per la renovació cel·lular del tracte gastrointestinal (92). Per contra, clàssicament s'ha considerat la necrosi de la mucosa com la conseqüència d'un trastorn circulatori que afecta l'intestí. Tot i així, existeixen evidències que demostren que el síndrome d'I/R intestinal associat al trasplantament és capaç d'incrementar tant la necrosi com l'apoptosi cel·lular (67). De fet, Ikeda i col. van demostrar que en la destrucció de les cèl·lules de l'intestí prim de rata hi ha implicats aquests dos tipus de mort cel·lular, però que l'apoptosi és la més abundant (93). Diversos estudis han mostrat que la inducció de l'apoptosi en la I/R intestinal ocorre ja durant la fase isquèmica i

continua durant la reperfusió (94-96). De totes maneres, existeixen resultats diferents entre diferents estudis. Hi ha qui només troba una cèl·lula apoptòtica per cada 10 criptes després de 24 h de CI, mentre que amb 1 h de reperfusió l'apoptosi és abundant a les vellositats i a les criptes (67); però també hi ha qui veu més apoptosi durant la preservació que en la reperfusió (95).

Altres estudis indiquen que el percentatge de fragmentació de l'ADN, el qual depèn del temps d'isquèmia, és màxim a 1 h de reperfusió i a les 6 h de reperfusió ja està recuperat, indicant que l'apoptosi intestinal i la recuperació de la mucosa són processos ràpids (94). També s'ha descrit que la inhibició de l'apoptosi amb l'inhibidor de caspases z-Val-Ala-Asp(OMe)-fluorometilcetona (zVAD-fmk), disminueix el grau de lesió intestinal en la I/R del ratolí (97). Finalment, altres estudis indiquen que la disminució de l'apoptosi en el trasplantament intestinal experimental de rata influeix positivament en el manteniment de la integritat histològica de l'intestí i provoca una menor translocació bacteriana (98). No obstant, malgrat el nombre creixent d'estudis que analitzen els factors que modulen l'apoptosi en el teixit intestinal durant la I/R, aquests factors encara no es coneixen en profunditat.

### Ronyó

Les cèl·lules renals després d'un insult isquèmic poden morir tant per necrosi com per apoptosi (82). Recentment s'ha descrit que el desenvolupament d'apoptosi en les cèl·lules tubulars renals durant la preservació freda és un factor predictiu important de la disfunció primària de l'empelt en humans (99). Per tant, la detecció primerenca de senyals que indiquin el desenvolupament d'apoptosi a la reperfusió podria ser un bon indicador del futur de l'empelt.

Per altra banda, s'ha observat que en biòpsies de NHBD hi ha un increment significatiu d'apoptosi en les cèl·lules dels túbuls, comparat amb les dels HBD (100). Aquest fet sembla reforçar el paper de l'apoptosi en el pronòstic del trasplantament, ja que els NHBD presenten un incidència més alta de FRA. A més a més, el grau d'apoptosi s'ha vist que depèn de la durada de la isquèmia i, la durada de la isquèmia, és un altre factor independent que prediu la funció de l'empelt (101).

Estudis experimentals suggereixen que en el cas dels NHBD, la via apoptòtica que s'activa, és la mitocondrial. S'ha observat que aquests ronyons desenvolupen més apoptosi a nivell de túbuls corticals durant la preservació que els de HBD, i a les 10 h tenen nivells comparables amb els HBD a les 24 h. A períodes més llargs, els ronyons de NHBD presenten més necrosi (101).



No obstant, hi ha estudis que no detecten apoptosi fins a la reperfusió (102). En biòpsies renals de NHBD, Burns i col., trobaven significativament més apoptosi després de la reperfusió que no abans (103). D'altres grups han demostrat, en ronyó i en d'altres òrgans, l'absència de signes morfològics d'apoptosi i de fragmentació d'ADN després de la inducció de la isquèmia sense reperfusió (102). També s'ha pogut observar increments de la caspasa-3 a les 4 i 16 h de reperfusió en model d'I/R de rata, o ja a les 2 h quan hi ha hagut 45 min de WI prèvia en ratolí (102).

Un altre mecanisme implicat en l'apoptosi induïda per I/R en el ronyó és la manca sobtada de "senyals de supervivència", que normalment s'oposen als estímuls proapoptòtics. Aquests senyals de supervivència comprenen nivells circulants i expressió local de factors de creixement solubles, i també interaccions cèl·lula-cèl·lula i cèl·lula-matriu (sovint alterades durant la I/R) (102).

A més a més s'ha observat que l'apoptosi és un esdeveniment crucial en el procés que inicia la inflamació i el dany que aquesta comporta, ja que l'administració d'inhibidors de les caspases a la reperfusió evita el desenvolupament de la inflamació i la disfunció de l'òrgan (102). Per altra banda, la inflamació al mateix temps està implicada en la regulació de la mort apoptòtica (104), de manera que aquests dos processos es troben interrelacionats.

Diversos estudis suggereixen la modificació de les solucions de preservació amb inhibidors específics de les molècules implicades en l'apoptosi per tal de millorar el retràs en la funció de l'empelt típic dels ronyons que han patit WI prèvia (101) i, en general, la viabilitat de l'òrgan a trasplantar.

## **1.6. MEDIADORS DE L'APOPTOSI DURANT LA PRESERVACIÓ**

### **1.6.1. PRODUCTES DE LA DEGRADACIÓ DE L'ATP**

Els nucleòtids tissulars són substàncies que canvien d'acord amb el temps d'isquèmia. Degut a la degradació de l'ATP, els seus productes s'acumulen, de manera que segons la durada de la isquèmia trobem nivells variables d'aquestes molècules. En les primeres hores trobem increments d'AMP i adenosina, però amb el temps el que més s'acumula és hipoxantina i xantina (105).

La regulació de l'apoptosi s'ha associat a canvis en el perfil de nucleòtids, existeixen evidències que suggereixen que els nucleòsids indueixen mort cel·lular via apoptosi, mentre que els nucleòtids purinèrgics poden provocar tant la necrosi com l'apoptosi (106). També s'ha demostrat que d'addició de nucleòtids exògens altera el recanvi

cel·lular de l'epiteli intestinal humà: l'addició d'AMP resulta en un increment de l'apoptosi en l'epiteli de les vellositats (107).

Els nucleòtids i nucleòsids purinèrgics s'alliberen sobretot en cèl·lules estressades o anòxiques, danyades i metabòlicament actives. L'adenosina està sempre present en l'ambient extracel·lular, però la seva alliberació en cèl·lules intactes s'incrementa per la degradació tan extra com intracel·lular d'ATP (106).

L'acumulació de l'adenosina durant la isquèmia i el consegüent augment del nivell d'adenosina extracel·lular protegeix el teixit isquèmic (108, 109). Aquesta molècula es considera inductora de la recuperació funcional durant la I/R en diversos sistemes (110-112), reduint el dany associat a la I/R a través de la millora en l'ús d'energia durant la isquèmia i la reducció de l'adhesió de leucòcits durant la reperfusió (113, 114). En relació a l'apoptosi però, el seu paper és més controvertit, ja que se li ha atribuït tant efectes antiapoptòtics (115, 116) com proapoptòtics (117). La majoria dels estudis que atribueixen efectes citotòxics a l'adenosina involucren cèl·lules del sistema immunitari, tot i que recentment nous estudis la relacionen també amb el sistema nerviós i les cèl·lules endotelials (106). En general, les característiques d'aquesta citotoxicitat suggereixen que l'adenosina indueix apoptosi, però el paper dels receptors responsables d'aquesta citotoxicitat no és massa clar, tots han estat implicats en algun estudi i a més pot dependre del tipus cel·lular. Un dels segons missatgers que s'han implicat en l'efecte citotòxic de l'adenosina és l'AMP cíclic (AMPC), el qual s'ha observat que pot induir l'apoptosi, tot i que el seu paper també és controvertit (106).

No obstant, també hi han estudis en els que la inducció de l'apoptosi a través de l'adenosina no és mediada pels seus receptors. Per exemple, en alguns models experimentals l'adenosina i el nucleòsids relacionats són capaços d'induir l'apoptosi durant el estadis inicials del creixement i desenvolupament neuronal, o de prevenir o retardar l'apoptosi en neurones simpàtiques madures en cultiu subjectes a una deprivació de factors de creixement. Tant la inducció com la prevenció de l'apoptosi en aquest estudi són independents de l'activació de receptors i totalment dependent de l'acumulació intracel·lular i subseqüent fosforilació de l'adenosina (118). A més a més, l'adenosina indueix la producció d'NO (109), molècula senyalitzadora que també s'ha relacionat àmpliament amb els esdeveniments apoptòtics (66).

Com ja hem dit, altres molècules purinèrgiques s'han relacionat amb la inducció o protecció de fenòmens apoptòtics, per exemple, la hipoxantina s'ha correlacionat amb la inhibició de la poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP), mostrant efectes moduladors de l'apoptosi induïda per oxidació (119); però, al mateix temps, i

juntament amb la xantina, actuen com a substrat per la XO provocant la generació de ROS, les quals també poden provocar apoptosi (120, 121).

Així doncs, el paper de les molècules purinèrgiques en relació a l'apoptosi no està massa clar, de manera que una mateixa molècula pot tenir una o altra acció.

### **1.6.2. FRUCTOSA**

La Fructosa-1, 6-difosfat (FDP) és un activador de la glicòlisi pel fet que regula dos enzims d'aquesta via i, a més a més, actua com a font alternativa d'energia (122). Confereix citoprotecció als teixits i millora les condicions isquèmiques en general a través d'una gran varietat d'efectes: evita la depleció d'ATP, inhibeix la producció de ROS per part dels neutròfils, evita l'activació plaquetària, estimula l'òxid nítric sintasa (NOS), quela el calci extracel·lular i estabilitza la membrana plasmàtica (112, 122, 123).

Totes les vies que es veuen afectades per la FDP poden estar implicades en la modulació de l'apoptosi, tal com hi estan implicats la producció de ROS en alguns models (120, 121), i l'NO (66). A més a més, a les cetohehexoses en general, se'ls ha atribuït un efecte citoprotector a través de la inhibició de senyals primerenques de mort cel·lular (124).

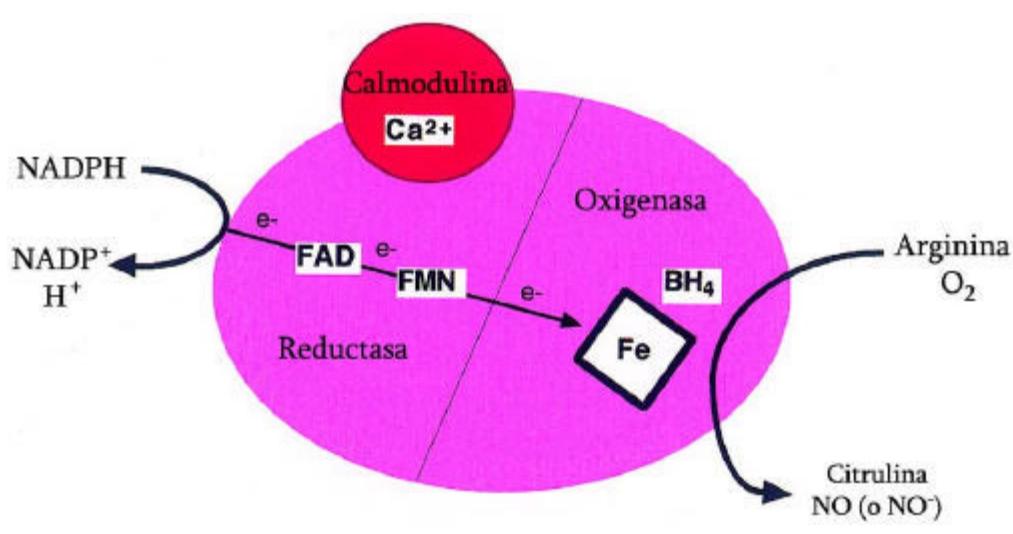
Recentment, s'ha descrit un nou efecte de la FDP sobre l'apoptosi: redueix l'índex apoptòtic en el trasplantament intestinal de rata (125). En aquest estudi, l'administració oral de FDP durant 10 dies abans i després del trasplantament, disminuïa l'apoptosi i incrementava l'índex de proliferació cel·lular de la mucosa. El mecanisme implicat no es coneix, però s'han proposat la prevenció de la depleció d'ATP, la quelació del calci extracel·lular o l'estabilització de la membrana com a possible explicació per aquest efecte (125).

La FDP millora les condicions isquèmiques durant la preservació en el cor (123), el fetge (126) i el ronyó (122). D'entre els diferents mecanismes que s'han proposat per explicar aquest paper protector, la prevenció de la depleció d'ATP és un dels més "populars" (122, 123, 126), tot i així, hi ha diferències entre estudis. Alguns observen uns nivells d'ATP incrementats (127, 128), mentre que d'altres no troben canvis en les reserves energètiques després del tractament amb FDP (129, 130). Aquesta activitat preventiva pot modificar el perfil de nucleòtids i, per tant, afectar el desenvolupament de l'apoptosi. A més a més, la FDP en l'intestí és capaç de generar una acumulació endògena d'adenosina (131).

### 1.6.3. ÒXID NÍTRIC

L'òxid nítric és un gas produït per diferents cèl·lules que té gran varietat d'efectes biològics. Clàssicament, és conegut per actuar com a relaxant muscular i com agregant de l'adhesió plaquetària. L'NO és un segon missatger altament difusible que pot exercir la seva acció relativament lluny del lloc de producció. Existeixen uns efectes directes, que són els que tenen lloc a baixes concentracions, bàsicament fruit de la interacció amb metalls complexes, tot i que també es coneixen interaccions amb proteïnes com les que contenen zinc. Els efectes indirectes són produïts per la interacció de l'NO amb l'oxigen o el radical superòxid i inclouen la nitrosilació, l'oxidació o la nitració de molècules. Així doncs, el nombre de reaccions que pot realitzar l'NO és molt ampli, i serà la seva concentració un dels principals factors alhora de determinar l'efecte biològic d'aquesta molècula (132).

L'NO endogen es genera a partir de l'aminoàcid L-arginina, el qual es converteix en L-citrulina i NO. Aquesta reacció es troba catalitzada per la NOS, que forma part d'una família de tres isoformes. Les tres isoformes de NOS utilitzen fòsfat de dinucleòtid de nicotinamida i adenina reduït (NADPH) com a donant d'electrons i cinc cofactors enzimàtics per catalitzar 5-electro-oxidacions de l'arginina cap al NO i citrulina (133) (Figura 1.6.).



**Figura 1.6.** Esquema de la NOS i de la síntesi de l'NO.

A nivells basals actuen les isoformes constitutives (cNOS), que són dues: la eNOS, descrita en primer lloc en cèl·lules endotelials però també present en d'altres tipus cel·lulars com poden ser cèl·lules epitelials, i la nNOS, associada al teixit neuronal. La seva activitat és estimulada per increments en el calci intracel·lular i clàssicament es relaciona amb la producció fisiològica d'NO en els teixits. Les funcions immunitàries

de l'NO estan en canvi mediades per la seva forma induïble (iNOS) calci-independent. Aquesta iNOS s'expressa en macròfags, neutròfils i cèl·lules endotelials entre d'altres, la seva activació requereix una activació transcripcional que es troba mediada per combinacions específiques de citocines, pot produir grans quantitats d'NO durant llargs períodes de temps i, en general, s'associa a la producció d'NO en condicions patofisiològiques. Així doncs, l'NO té un paper dual i és un important mediador tant de processos fisiològics com patològics (133).

### 1.6.2.1. Òxid nítric i apoptosi

El paper de l'NO en relació a l'apoptosi també és controvertit. Segons la concentració, l'ambient redox i la participació de mecanismes de defensa intracel·lular, l'NO pot suprimir l'apoptosi, eventualment estimular la proliferació, o activar la mort cel·lular programada. A més a més, el tipus cel·lular pot ser determinant en els seus efectes, així com també les condicions metabòliques o experimentals coexistents (134).

S'ha descrit que l'NO pot nitrosilar diverses proteïnes en els residus de cisteïna (S-nitrosilació). Aquest mecanisme regulador és comparable a la fosforilació i afecta a processos que van des de la transducció de senyals fins a la reparació de l'ADN. Respecte l'apoptosi, pot nitrosilar membres de la família de les caspases, resultant en una inhibició de la seva activitat. Concretament, *in vitro*, s'ha observat que és capaç d'inhibir a set membres d'aquesta família incloent les caspases-1, -2, -3, -4, -6, -7, i -8. Les caspases contenen un residu de cisteïna en la part activa del enzim, el qual és específicament nitrosilat per donants d'NO. Aquesta nitrosilació, reversible, probablement depèn de l'estat redox de la cèl·lula, fet que suggereix que també la conseqüent inhibició de l'apoptosi mediada per l'NO és reversible (132). A més a més, pot inhibir aquests enzims tant en la seva forma inactiva com un cop estan activats (134).

L'NO pot intervenir en una cèl·lula que ha rebut un estímul apoptòtic abans o després del punt de no retorn. Si aquest inhibeix la maquinària que du a terme la cascada apoptòtica abans que la mort de la cèl·lula sigui irreversible, el resultat serà la prevenció de l'apoptosi i la resistència a la mort. En canvi, si la intervenció és després d'aquest punt, el resultat pot ser que es produeixi un canvi en el tipus de mort de la cèl·lula, de l'apoptosi a la necrosi (134).

Per altra banda, quan l'NO reacciona amb el radical superòxid en condicions d'estrès, forma peroxinitrit el qual pot nitrar residus de tirosina, regulant així la funció d'aquestes proteïnes mitjançant la inhibició de la fosforilació de la tirosina. El

peroxinitrit també pot induir dany a l'ADN, peroxidació lipídica, degradació de proteïnes i nitrosilació de proteïnes conduint sovint cap a la mort cel·lular (66).

Les respostes proapoptòtiques i antiapoptòtiques de l'NO resulten ser específiques pel tipus de cèl·lules implicades. En moltes cèl·lules incloent macròfags, illots pancreàtics, neurones i timòcits, l'NO activa l'apoptosi. Moltes d'aquestes respostes amb donants d'NO resulten ser apoptosi a dosis baixes i necrosi a dosis altes, amb gran varietat de respostes entre tipus cel·lular. Avaluant els estudis que confereixen un paper proapoptòtic a l'NO, apareixen diferents mecanismes: directament danyant l'ADN, a través de l'increment de p53, de monofosfat de guanosina cíclic (GMPc) o de ceramida, de l'activació o inhibició de cinases, de la disfunció de la mitocondria (alteració de la permeabilitat, inhibició de la respiració mitocondrial, etc.) i de la inhibició del proteasoma (66).

Tot i que la llista de tipus cel·lulars en que l'NO promou l'apoptosi és llarg, també ho és la de cèl·lules en les que hi té un efecte antiapoptòtic. Les vies que segueix en aquests casos, també són molt diverses: a través de nucleòtids cíclics i ceramida, de la nitrosilació de les caspases i fins i tot inhibint la respiració mitocondrial (66). Altres efectes protectors de l'NO poden venir de la supressió dels efectes citotòxics de ROS mitjançant la seva acció com a *scavenger* o a través de la inducció de proteïnes protectores com ho són la ciclooxygenasa-2 o la *heat shock protein 70* (HSP70) (134).

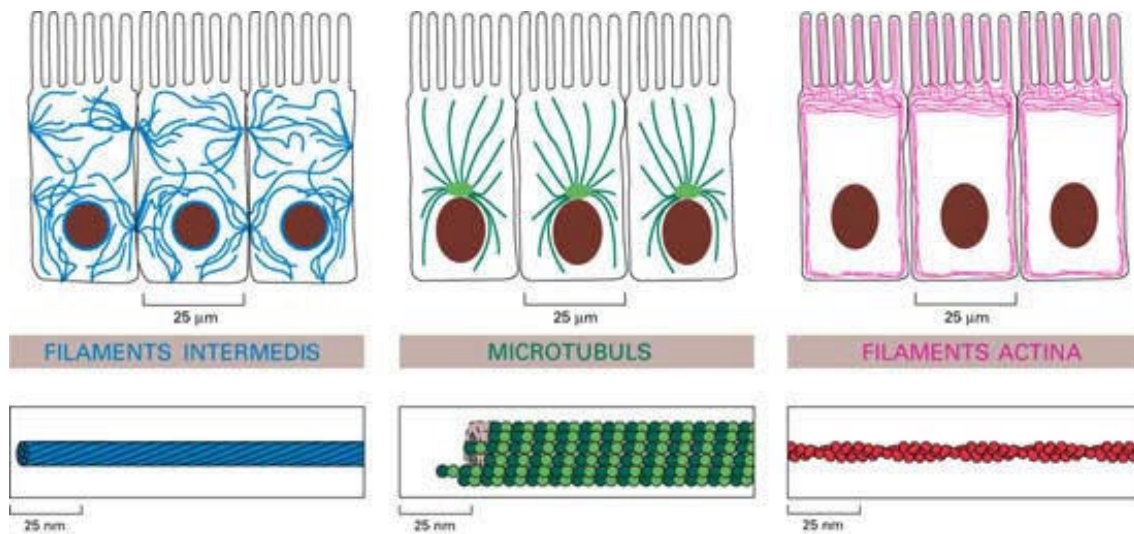
També cal dir que existeixen una sèrie de factors que modulen i, fins i tot, determinen l'efecte de l'NO sobre l'apoptosi. Entre aquests factors hi ha les proteïnes de la família Bcl-2, els antioxidants, els nivells de ferro, l'arginasa, les prostaglandines i la glucosa (66).

El potencial de la modulació de l'NO a través de la seva addició o a través de la teràpia gènica pel que fa a les NOS, esdevé per tant un camp que pot ser molt interessant pel tractament del càncer i les malalties inflamatòries, així com també pel trasplantament (66).

## **1.7. CITOESQUELET**

El citoesquelet és una ret tridimensional de proteïnes filamentoses que ocupa l'espai entre els orgànuls i dona forma i estructura a les cèl·lules. Tot i el seu nom, no és una entitat estàtica com podria pensar-se, sinó una combinació d'estructures dinàmiques. El citoesquelet de les cèl·lules contribueix a molts processos cel·lulars com són el manteniment de la integritat cel·lular, el transport i la localització dels orgànuls, la mitosi, la citocinesi i la secreció i la formació d'extensions cel·lulars. Aquest està

format per: filaments d'actina (també anomenats microfilaments), filaments intermedis i microtúbuls (Figura 1.7.).



**Figura 1.7.** Esquema de l'estructura i disposició cel·lular dels diferents elements que constitueixen el citoesquelet.

El citoesquelet és un element fonamental per mantenir la polaritat cel·lular, la qual és essencial pel bon funcionament de les cèl·lules epitelials, però també és important pel desenvolupament i manteniment de l'arquitectura cel·lular. A nivell molecular, aquesta polaritat de la cèl·lula epitelial s'obté mantenint una composició de membrana diferent a la part basal (que encara la matriu extracel·lular) i la part apical (que encara la llum). Això s'aconsegueix per una part gràcies a la secreció polaritzada i la organització del citoesquelet i, per l'altre, prevenint la migració dels components de membrana entre els dominis apical i basolateral de la membrana (135).

La polaritat cel·lular és especialment crítica en les cèl·lules epitelials que formen els túbuls renals, degut a la funció crucial de regular el volum cel·lular i el transport de ions i nutrients (135).

El citoesquelet també controla l'estabilitat estructural dels epitelis i de les cèl·lules individuals a través dels complexos d'unió localitzats al llarg de les superfícies basolaterals. Aquestes unions tenen la missió d'adherir les cèl·lules a la matriu extracel·lular (hemidesmosomes i adhesions focals), estabilitzar les interaccions cèl·lula-cèl·lula (desmosomes i bandes d'adhesió), permetre la comunicació entre cèl·lules (unions gap) i formar tant membrana plasmàtica com barrera extracel·lular (unions estretes) (51).

### 1.7.1. CITOESQUELET D'ACTINA

Els microfilaments o filaments d'actina són polímers d'actina que, juntament amb un gran nombre de proteïnes que s'hi uneixen o associen, constitueixen el citoesquelet d'actina (136).

L'actina és una proteïna de 43 kDa altament conservada entre les diferents espècies. Hi ha 3 principals isotips (alfa, beta i gamma) els quals mostren una homologia >90% dels aminoàcids. La majoria de la heterogeneïtat es troba localitzada en l'extrem aminoterminal. Aquesta proteïna representa de l'ordre del 1 al 10% del total de proteïna cel·lular. La subunitat d'actina té polaritat i, per tant, també en té el microfilament. L'actina globular (**G-actina**) polimeritza sota condicions fisiològiques per formar l'actina filamentosa (**F-actina**) en un procés dependent d'ATP. Cada molècula d'actina pot unir un ATP, el qual s'hidrolitza a ADP quan l'actina s'incorpora al polímer. L'energia no és essencial per la polimerització, però contribueix a la rapidesa en que té lloc aquesta, ja que les molècules que tenen ATP polimeritzen més ràpidament que no les que tenen ADP (136).

La F-actina és doncs un polímer format de monòmers d'actina en forma de doble hèlix, d'uns 5-6 nm de diàmetre. L'actina pot polimeritzar-se pels extrems d'aquesta hèlix, però la taxa de polimerització no és igual als dos extrems. Hi ha un extrem on aquesta polimerització és més ràpida, anomenat *barbed-end* (extrem positiu), i un altre en que és més lenta, anomenat *pointed-end* (extrem negatiu). Existeix una concentració crítica de monòmer d'actina sota la qual l'actina no polimeritzarà, aquest concentració crítica depèn de les condicions en que es troba la cèl·lula. Aquesta polimerització està regulada per proteïnes d'una família coneguda com a "proteïnes d'unió a l'actina" (ABPs) (51, 136).

Així doncs, l'ensamblatge del citoesquelet d'actina està regulat a diferents nivells, tant en l'organització dels monòmers d'actina en polímers, com en la superorganització d'aquests polímers en una xarxa filamentosa. Un gran nombre de proteïnes que s'uneixen a l'actina regulen la polimerització d'aquesta, controlant la formació dels filaments i les unions amb la xarxa d'actina. L'activitat d'aquestes proteïnes sovint és regulada per molècules de senyalització, com són el  $Ca^{2+}$  o els fosfoinosítides fosforilats (136).

La disponibilitat de monòmers i la seva polimerització en filaments preexistents està regulada per proteïnes que s'uneixen a aquests monòmers i per proteïnes que trenquen o bloquegen els filaments d'actina. Un regulador important de la concentració dels monòmers d'actina és la profilina, la qual s'uneix als monòmers



lliures d'actina i a les subunitats terminals de l'actina, evitant així que hi hagi més polimerització (136).

La gelsolina, villina, fragmina, adseverina i scinderina formen una família de proteïnes estructuralment relacionades que són capaç de trencar els filaments d'actina. Aquestes proteïnes s'uneixen als filaments d'actina i els trenquen en una reacció dependent de  $\text{Ca}^{2+}$  i, després, tapen els extrems positius d'aquests fragments. Aquests fragments, si posteriorment existeixen senyals que indueixin a la polimerització, poden servir com a nucli perquè aquesta es dugui a terme (136).

El factor despolimeritzant d'actina o la cofilina són proteïnes que també trenquen, però d'una forma menys eficient que les gelsolines, promovent el desensamblatge tot extraient els monòmers dels filaments i estabilitzant els monòmers alliberats (136).

La superorganització dels polímers d'actina en una xarxa filamentosa també està mediada per proteïnes que s'uneixen a l'actina, on s'hi inclou:  $\alpha$ -actinina, filamina, fimbrina i villina (136).

Totes aquestes proteïnes al mateix temps estan regulades per altres proteïnes. Les múltiples funcions del citoesquelet d'actina fan necessari que aquests filaments no es generin d'un forma aleatòria i uniforme en tota la cèl·lula, sinó en punts concrets de la membrana plasmàtica. Aquests punts de nucleació són majoritàriament complexes multimoleculars que controlen la nucleació d'actina. Les adhesions focals i les unions adherents són complexes associats de membrana que serveixen com a punts de nucleació de filaments d'actina i d'enllaç entre l'exterior cel·lular, la membrana plasmàtica i el citoesquelet d'actina (136).

En els últims anys, s'han acumulat evidències que indiquen que les *GTPases Rho-like* són reguladors clau en les vies de senyalització que enllacen els senyals extracel·lulars o estímuls intracel·lulars amb l'ensamblatge i organització del citoesquelet d'actina (136).

### Citoesquelet d'actina al ronyó

Els filaments d'actina es troben àmpliament distribuïts en les cèl·lules epitelials polaritzades. La membrana apical dels túbuls proximals té una estructura especialitzada per incrementar la reabsorció: la vora en forma de raspall o *brush border* (BB). El BB es pot dividir estructuralment en les microvellositats i els components de la xarxa terminal. "La columna vertebral" que manté l'estructura de les microvellositats consisteix en 20-30 filaments d'actina orientats verticalment i

polaritzats (*barbed* o extrem positiu a la punta de la microvellositat), els quals s'extenen fins la xarxa terminal. Proteïnes que s'uneixen específicament a l'actina (fimbrina i villina) serveixen per unir cada microfilament individual d'actina amb la resta de microfilaments. Els filaments d'actina de la microvellositat entren a la regió de la xarxa terminal on s'estabilitzen a través de la interacció amb d'altres ABPs (villina, tropomiosina, espectrina i miosina II no muscular). La xarxa terminal està composta per una xarxa densa d'actina i proteïnes associades i de filaments intermedis, que s'orienten principalment de forma perpendicular a les microvellositats. La F-actina prové tant de les microvellositats, com de la zònula oclusiva i adherent, mentre que els filaments intermedis s'originen dels desmosomes. Aquestes proteïnes estan fortament lligades a la xarxa terminal, tot i que les interaccions són prou dinàmiques com per permetre l'absorció i la secreció. L'actina també es distribueix al llarg de la membrana basolateral com a part de la xarxa cortical. Filaments curts d'actina s'associen amb un alt nombre de proteïnes aquí, tot formant una xarxa bidimensional, la qual està lligada a una varietat de proteïnes de superfície de la membrana basolateral, tal com la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa i els canals de Na<sup>+</sup> o de Cl<sup>-</sup>, i pot modular-ne la seva activitat. Finalment, les fibres d'estrès suporten la base de cada cèl·lula, formant un anell prim al voltant del túbul (51).

Perquè els túbuls proximals puguin funcionar correctament, requereixen la organització adequada dels elements citoesquelètics de la cèl·lula. Per exemple, l'increment de l'àrea de superfície d'absorció de les microvellositats depèn del citoesquelet d'actina; l'estabilitat, de les unions cel·lulars com són els desmosomes; les adhesions focals, depenen dels filaments intermedis i dels d'actina; i finalment, el transport vesicular a través de la cèl·lula, depèn en part dels microtúbuls i del citoesquelet d'actina. Molts estudis han documentat que les alteracions en els elements citoesquelètics trenquen l'estructura cel·lular i la integritat funcional, resultant en anormalitats específiques de la cèl·lula o del teixit i, en últim, terme en el desenvolupament d'un estat patològic (51).

### **1.7.2. EL CITOESQUELET D'ACTINA EN LA ISQUÈMIA RENAL**

Una de les principals conseqüències de la isquèmia són les alteracions del citoesquelet que condueixen a canvis estructurals de la cèl·lula, les quals poden provocar alteracions en la superfície de la membrana i disrupció de l'arquitectura tant cel·lular com tissular. El citoesquelet d'actina es veu greument danyat durant la isquèmia renal, resultant amb la pèrdua de la funció renal. Tant la isquèmia *in vivo*, com la depleció d'ATP *in vitro*, indueixen una ràpida disrupció del citoesquelet d'actina, la severitat de la qual depèn de la duració de la isquèmia (51).

*In vivo*, la isquèmia indueix trencament dels nuclis d'actina de les microvellositats i de la xarxa apical, amb redistribució de l'actina del pol apical a tot el citoplasma i pèrdua de la polaritat. També hi ha redistribució de la membrana basolateral, fet que comporta la dissociació de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa i l'espectrina del citoesquelet. Al mateix temps la superfície de la membrana pateix canvis importants. Les microvellositats apicals es perden per fragmentació, amb despreniment a la llum d'aquests fragments anomenats *blebs*, que són petites vesícules de membrana apical. Les unions estretes s'obren i les adhesions cèl·lula-cèl·lula i cèl·lula-substrat es perden, resultant-ne el despreniment de la cèl·lula de la base de la membrana cap a la llum. Aquestes cèl·lules subletalment danyades contribueixen a la disfunció renal (137-139).

Durant la fase de reperfusió hi ha un restabliment de la polaritat de les membranes apical i basal. No es coneixen els mecanismes responsables de la restitució de la polaritat, però més aviat implica remodelatge dels dominis de membranes de les cèl·lules danyades, que no pas proliferació cel·lular. S'han trobat factors que han demostrat accelerar la recuperació de la cèl·lula isquèmica i proteïnes HSP, que s'acumulen durant la isquèmia, hi poden contribuir (51).

Part de l'edema intersticial que ocorre durant la preservació d'òrgans sembla que podria estar lligat al citoesquelet: la desregulació de les proteïnes de les unions i també de l'actina, provocaria canvis importants en la permeabilitat després de la preservació. Concretament, s'han observat pèrdua de proteïnes de les unions estretes i les unions adherents, que juntament amb la desorganització i disminució del contingut de F-actina, poden tenir un paper clau en l'edema associat a la preservació d'òrgans (permeabilitat endotelial). Aquests canvis són probablement reversibles a la reperfusió, ja que tot i que s'observen modificacions en aquestes proteïnes en les primeres hores, l'òrgan roman viable durant més hores. No obstant, pot contribuir de forma molt important a la disfunció de l'òrgan, per tant, estratègies per mantenir la integritat de les unions endotelials i evitar l'edema, podrien tenir importants conseqüències terapèutiques (140).

### **1.7.3. CITOESQUELET I APOPTOSI**

Actualment hi ha un creixent interès en conèixer la relació de causa-efecte entre la desorganització del citoesquelet i l'apoptosi. No està clar com el desenganxament de la matriu extracel·lular o el trencament de les unions cèl·lula-cèl·lula condueixen a la reorganització interna del citoesquelet i, si aquest fet, precedeix o segueix la iniciació de l'apoptosi (141).

Els principals filaments citoesquelètics, incloent microtúbuls, citoqueratina i actina, són degradats durant la fase d'execució de l'apoptosi. L'actina és un substrat per les

caspses en alguns models cel·lulars i s'ha suggerit que existeix un lligam directe entre la despolimerització de l'actina i la degradació de l'ADN. Tot i que l'actina pot ser resistent al trencament en algun model *in vivo*, el fet que l'actina i filaments intermedis siguin una diana és responsable, en part, del col·lapse de la cèl·lula durant la fase d'execució de l'apoptosi. La degradació dels filaments d'actina pot trencar la tensió mecànica necessària per mantenir la cèl·lula turgent i conduir a senyals que poden facilitar el desenganxament de la mateixa.

Recentment s'han publicat estudis que demostren que el trencament de les proteïnes del citoesquelet, per si mateix, pot induir la mort cel·lular. S'ha observat, per exemple, que la disrupció farmacològica del recanvi dels microtúbuls condueix a l'apoptosi i al desenganxament cel·lular (142), la desestructuració del citoesquelet d'actina pot iniciar l'apoptosi en cèl·lules humanes d'epiteli respiratori (141) i l'estabilitat de l'actina és un factor positiu per mantenir la viabilitat de limfòcits i fibroblastes (143). Aquest lligam també s'ha suggerit en cèl·lules epitelials del túbul proximal, tant de porc com de rata, on la inducció química de l'apoptosi s'ha vist que és precedida per la desorganització de la F-actina del citoesquelet (144, 145).

## 1.8. BIOIMPEDÀNCIA

La monitorització de la Bioimpedància Elèctrica (BI) dels teixits vius és un eina emergent per la recerca biomèdica i per la pràctica mèdica, la qual es basa en l'estudi de les propietats elèctriques passives de teixits biològics.

Les propietats elèctriques passives vénen determinades per la observació de la resposta elèctrica d'un teixit a l'aplicació d'energia elèctrica de forma externa. Això vol dir que el teixit es caracteritza com si fos un circuit elèctric, compost per resistències, capacitàncies, inductors, etc. Alguns teixits biològics també presenten propietats elèctriques actives, donada la seva capacitat de generar corrents i voltatges, com per exemple els nervis (146).

Les diferents aplicacions de la bioimpedància en general tenen en comú les següents avantatges: requereixen d'instrumental de baix cost, són fàcilment aplicables a la pràctica i permeten la **monitorització on-line**. Exemples de l'aplicació d'aquesta eina són: mesures cel·lulars (coulter counter, mesura de l'hematòcrit), canvis de volum (volums cardíacs, volums de respiració pulmonar, volums de sang en les extremitats) i composició corporal (compartiments de fluid corporal –quantitat d'aigua-, compartiments de teixit adipós) (146).

Un camp on la BI pot tenir gran interès és en el del trasplantament i en els esdeveniments isquèmics dels teixits. L'edema cel·lular, l'edema intersticial i el tancament de les unions gap són alguns dels esdeveniments que indueixen canvis en els paràmetres de la BI. Actualment aquest camp es troba a nivell de recerca, existeixen diversos estudis que intenten avaluar el dany isquèmic, avaluar els òrgans abans de ser trasplantats i, fins i tot, s'ha fet algun intent de monitoritzar el rebuig de l'empelt a través de les mesures de la BI; en aquests camps els resultats són molt prometedors, de manera que aplicacions clíniques futures semblen possibles. Aquesta metodologia ja ha demostrat la seva efectivitat alhora de monitoritzar la I/R renal en rata a una sola freqüència (147).

El terme Impedància elèctrica significa la relació entre el voltatge i el corrent d'un component o sistema. Normalment, es descriu com l'oposició al flux d'un corrent elèctric altern a través d'un conductor.

El voltatge (V) és la força elèctrica que fa que el corrent es mogui en un circuit (perquè existeix una diferència entre dos punts) i el corrent elèctric (I) és el flux de la càrrega elèctrica. En els materials que condueixen el corrent, com en els teixits, hi ha partícules que es poden moure i que poden ser transportadores de càrrega, com són els electrons o els ions. Però també hi ha components que no condueixen l'electricitat, els quals s'anomenen aïllants o dielèctrics, com són les membranes cel·lulars (146).

Així doncs els teixits biològics inclouen dielèctrics els quals a part de tenir una resistència infinita (ja que no condueixen la corrent) impliquen el fenomen de capacitància. Això vol dir que, tot i que no són capaços de conduir la corrent, la poden acumular. Aquest fet, provoca que el voltatge i el corrent depenguin del temps ja que el dielèctric comença sense càrrega, però a la que s'aplica un corrent, el dielèctric va acumulant i augmentant la seva càrrega (capacitància). Arriba un moment que la càrrega acumulada en el dielèctric és gran, creant-se importants diferències de potencial; aquest fet provocarà el moviment de càrrega a ambdós bandes del dielèctric, retornant d'aquesta manera la càrrega acumulada (i, per tant, descarregant-se) (146).

S'han definit tres regions de freqüència segons les propietats dels dielèctrics que s'han observat en les mostres biològiques. En aquesta tesi, la regió que hem utilitzat (100 Hz i 10 MHz de freqüència) és la que s'associa a les propietats dielèctriques de les membranes cel·lulars i els seves interaccions amb els medis extra i intracel·lulars (146). Així doncs la BI es pot mesurar a una sola freqüència o varies freqüències (multifreqüencial). Per cada freqüència, s'obté un valor de mòdul i fase per instant de temps. Per si mateixes aquestes dades poden ser útils en molts casos. No obstant,

la caracterització multifreqüencial de la BI sempre proporciona més informació i pot ser útil per diferenciar situacions amb major claredat (146).

La impedància d'un element a determinada freqüència ( $Z$ ), es defineix com la relació entre l'entrada de voltatge i el flux de corrent per aquella freqüència ( $Z = V / I$ ). De manera que obtindrem dos relacions entre corrent i voltatge: el mòdul, que representa la relació d'amplituds entre els senyals de tensió i corrent; i la fase, que representa el retard que existeix entre aquests dos senyals. Aquestes relacions s'expressen en nombre complexos (146). D'aquesta manera, per una freqüència determinada on  $V$  i  $I$  representen els números complexos de l'entrada del voltatge i del corrent (magnitud i fase), la impedància elèctrica  $Z$  és el nombre complex amb magnitud igual a la relació de magnituds i fase igual a la diferència de fases.

$$\begin{array}{l}
 |Z| = |V| / |I| \\
 Z = V / I \Rightarrow \\
 \angle Z = \angle V - \angle I
 \end{array}$$

La part real de la impedància s'anomena resistència mentre que la part imaginària s'anomena reactància. Si només agaféssim la part real, la impedància seria la resistència d'un corrent altern (seguint la llei d'Ohm):  $Z = R = V/I$ .

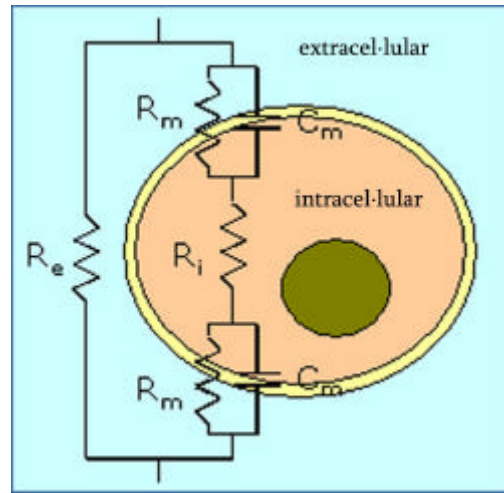
Quan hi ha fenòmens de capacitació, la corrent és proporcional a la derivació en el temps del voltatge i ja no compleix la llei d'Ohm. Si la corrent és a freqüències altes pot "travessar" el dielèctric, però si és a baixes freqüències, queden bloquejades (en realitat no travessa el dielèctric, sinó que es generen fluxos de corrent a banda i banda d'aquest).

Els teixits presenten dos compartiments que condueixen l'electricitat, l'espai extracel·lular i l'espai intracel·lular, separats per membranes aïllants. La conductància de la corrent elèctrica a través d'aquesta estructura depèn de la freqüència, de forma que necessita freqüències altes. Per tant l'espectre de la impedància segons la freqüència reflectirà només l'espai intersticial (a freqüències baixes) o tot el teixit (a freqüències altes) (146).

La membrana cel·lular té un paper passiu, separa el medi extracel·lular i intracel·lular (mitjançant la bicapa fosfolipídica) i, un paper actiu, controla l'intercanvi de les diferents espècies químiques (mitjançant canals i bombes iòniques) (146).

En la Figura 1.8. es representa com és el model elèctric segons els constituents de la cèl·lula. La corrent injectada al medi extracel·lular pot fluir a través de la cèl·lula

travessant la membrana (la qual actua com a dielèctric) o travessant els canals iònics (els quals només ofereixen certa resistència, però no són dielèctrics), o pot circular al voltant de la cèl·lula pel medi extern. Si la corrent entra dins la cèl·lula, aquesta flueix pel medi cel·lular i pot tornar a travessar la membrana o els canals (146).



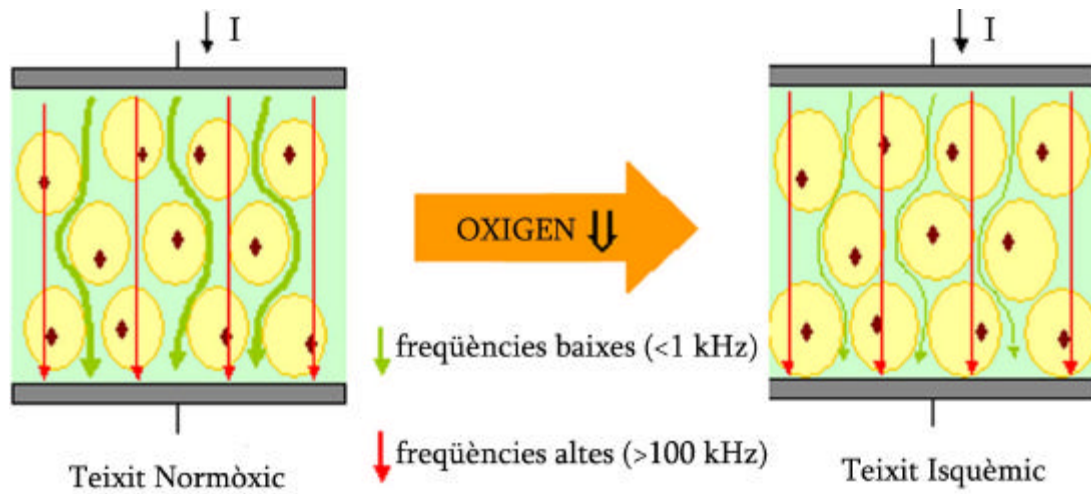
**Figura 1.8.** Esquema del model elèctric segons els constituents de la cèl·lula.

Normalment, la conductància de la membrana és molt baixa (a través de canals i bombes) de manera que s'ignora. Així doncs, a freqüències baixes ( $<1$  kHz), la corrent flueix majoritàriament per l'espai extracel·lular, sense poder travessar les membranes cel·lulars i entrar a la cèl·lula. A altes freqüències ( $>1$  MHz), la capacítància de la membrana no és un impediment perquè la corrent flueixi de forma indiscriminada a través del medi extra i intracel·lular (146).

No obstant, tot el que s'ha explicat fins ara és simplificar. Seria una explicació raonable per suspensions cel·lulars, però en realitat el teixit és més complex, degut a d'altres elements com són les unions cel·lulars gap o d'altres elements propis dels teixits (146).

En general, s'accepta que existeix relació entre la isquèmia i la BI: l'edema cel·lular que resulta de la inhibició del metabolisme energètic estreny l'espai extracel·lular i, conseqüentment, redueix l'amplitud del camí per les corrents a baixa freqüència (les membranes plasmàtiques es consideren com a dielèctrics), per tant disminuint la conductància i incrementant la resistència. En condicions normòxiques, una quantitat important del corrent a baixa freqüència pot fluir a través dels espais extracel·lulars. En condicions d'isquèmia en canvi, degut a l'edema cel·lular es produeix una reducció de l'espai extracel·lular el qual implica que el mòdul de la impedància a baixa freqüència augmenti (146) (Figura 1.9.).

No obstant, les característiques de la BI pel que fa a les estructures biològiques i els esdeveniments fisiològics, encara estan mancades d'explicacions completes. Altres relacions causa-efecte entre BI i fisiologia s'han proposat (146).



**Figura 1.9.** Esquema de com es monitoritza la isquèmia a través de la BI i segons la freqüència.



## **2. HIPÒTESIS I OBJECTIUS**



## 2.1. HIPÒTESIS

La isquèmia provoca una sèrie d'alteracions que poden conduir a la mort cel·lular, que pot ser tant per necrosi com per apoptosi. Recentment, l'apoptosi està prenent importància en el trasplantament d'òrgans, ja que la presència d'aquesta s'ha relacionat amb la integritat i la viabilitat de l'empelt i, per tant, amb el futur del pacient.

Durant la isquèmia (tant freda com calenta) ocorren diversos fenòmens que provoquen alteracions de molècules i substàncies, que poden modular el desenvolupament de l'apoptosi. Un dels primers esdeveniments conseqüència de la isquèmia és la degradació de l'ATP. Aquest fet, indueix l'acumulació dels seus productes, substàncies que varien en funció del temps d'isquèmia, com poden ser l'adenosina i la xantina. L'adenosina pot induir l'alliberació d'NO i la xantina, actuant com a substrat de la XO, pot generar superòxid posteriorment. Tant l'NO com les ROS s'han relacionat com a molècules senyalitzadores d'apoptosi.

Per altra banda, una altra de les conseqüències principals de la isquèmia és l'alteració del citoesquelet. S'ha observat molt recentment que aquestes alteracions poden induir el desenvolupament d'apoptosi en determinats tipus cel·lulars. Per tant, la desestructuració del citoesquelet conseqüència de la isquèmia no només altera l'estructura cel·lular de forma subletal, sinó que a més pot provocar despreniment cel·lular i apoptosi.

Així doncs, la hipòtesi de treball d'aquesta tesi va ser que, determinades substàncies i molècules que s'alteren o varien en funció del temps d'isquèmia, poden ser moduladores del desenvolupament de l'apoptosi. Per tant, l'acció farmacològica sobre aquestes substàncies, podria prevenir o disminuir el desenvolupament del suïcidi cel·lular. A més a més, la predicció d'aquests fenòmens durant la preservació podria ser una eina molt útil alhora de determinar la viabilitat dels òrgans. Concretament adenosina i xantina (productes de la degradació d'ATP) i les alteracions del citoesquelet d'actina han sigut l'objecte dels nostres estudis.



## 2.2. OBJECTIUS

L'objectiu general d'aquesta tesi ha sigut caracteritzar el paper de determinades molècules en relació a l'apoptosi durant la preservació d'òrgans, per poder modificar-la farmacològicament i predir-la.

1. Determinar la implicació de l'adenosina i de la xantina sobre l'apoptosi durant la I/R intestinal, i conèixer quin era el paper del NO en aquest procés.
2. Esbrinar si la FDP podia tenir un paper protector davant el desenvolupament de l'apoptosi durant la preservació intestinal. Determinar l'efecte de l'apoptosi durant la preservació en la translocació bacteriana al trasplantament.
3. Dilucidar si les alteracions en el citoesquelet d'actina durant la preservació renal indueixen l'apoptosi en la reperfusió i, si aquests esdeveniments, es troben relacionats de la mateixa manera en el cas dels ronyons provinents de NHBD.
4. Avaluar si la BI és una eina útil alhora determinar les conseqüències de la isquèmia durant la preservació renal. Com a objectiu subseqüent es va determinar si un dels paràmetres obtinguts d'aquestes mesures (el qual mostrava una evolució singular durant la preservació) estava relacionat amb les alteracions en el citoesquelet d'actina.

Per tal d'assolir aquests objectius es van utilitzar dos models diferents, segons les característiques pròpies de cada òrgan, l'estat en el que es troba el trasplantament de cada un d'ells i les experiències investigadores prèvies: el model intestinal pels dos primers objectius i el de ronyó pels altres dos.



### **3. MATERIALS I MÈTODES**





### 3.1. MODELS EXPERIMENTALS

Els animals d'experimentació utilitzats van ser rates mascle de la soca Wistar (IFFA-CREDO, L'abresie, França) de pes comprès entre 250 i 300 g, estabulats a la Facultat de Medicina una setmana abans de la seva intervenció. Les condicions ambientals es van mantenir constants, la temperatura va ser de 21-22°C, la humitat relativa del 70% i els cicles alternants de llum/foscor de 12 h. Els animals van ser alimentats amb una dieta estàndard de pinso AO4 (Panlab, Barcelona) i aigua de la xarxa de Barcelona *ad libitum*. En el cas de les cirurgies intestinals, els animals eren traslladats a gàbies individuals el dia abans i restaven en dejú durant 12 h amb sèrum glucosali *ad libitum*. D'aquesta manera la intervenció era molt més còmode, tant durant la manipulació quirúrgica com en la posterior neteja de la llum intestinal.

Tots els estudis es van realitzar d'acord amb les normes reguladores de la Unió Europea per models d'experimentació animal (Directiva 86/609/ECC).

Els models utilitzats van ser el model d'intestí de rata aïllat i reperfós en un bany d'òrgans (IPJ) i el model de ronyó de rata també aïllat i reperfós en un bany d'òrgans (IPK). Aquest model de treball consisteix en extreure l'òrgan i mantenir-lo en una primera fase de CI a 4°C durant el període de temps que duri la preservació, i en una segona fase es connecta al bany d'òrgans on es reperfon a 37°C durant el temps d'estudi establert.

#### 3.1.1. PROCEDIMENTS QUIRÚRGICS

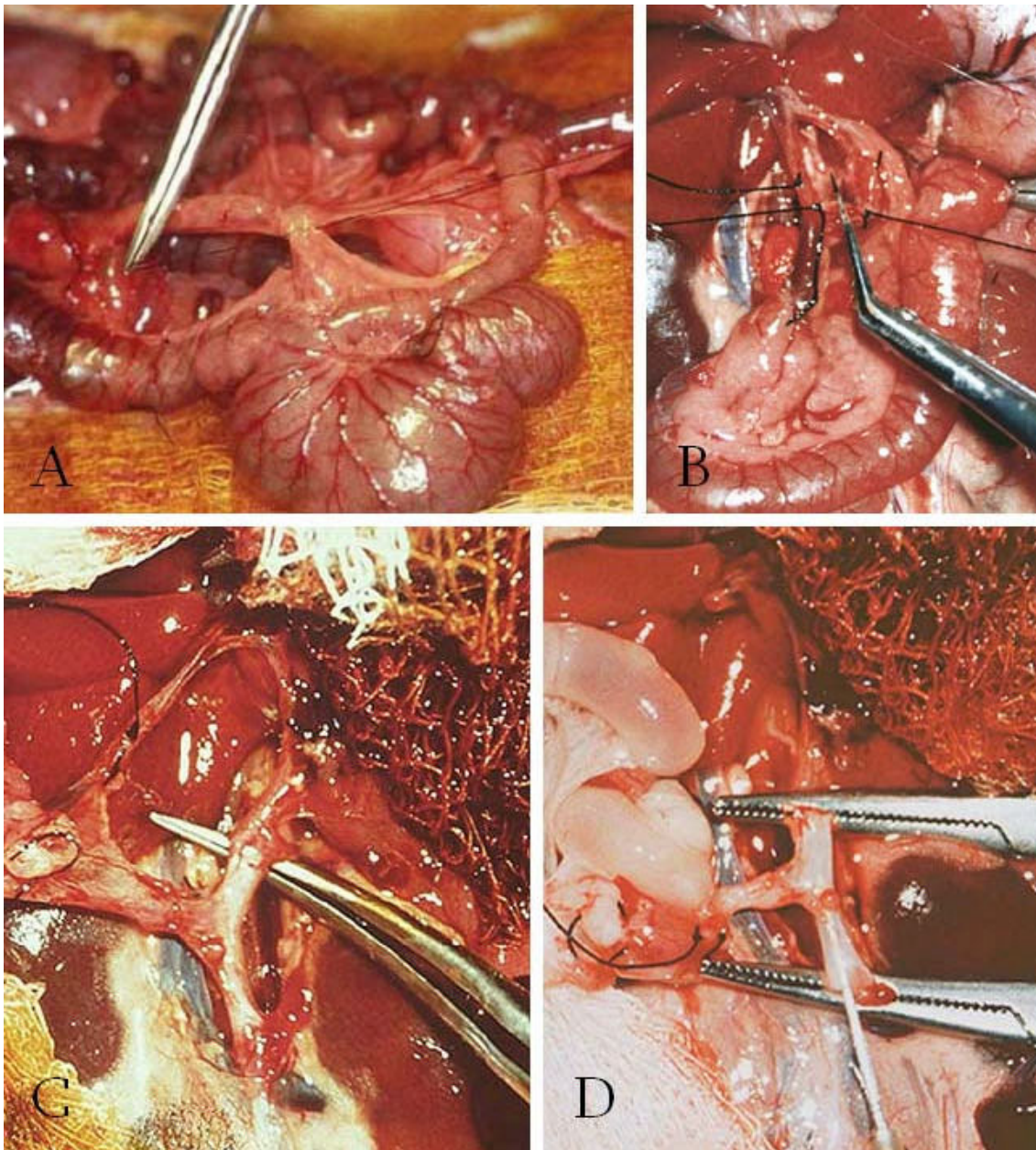
##### 3.1.1.1. Intestí

Els animals s'anestesiaven amb uretà 10% (10 mg/kg) administrat de forma intraperitoneal. Després de rasurar el pèl, l'animal es col·locava en posició supina sobre la taula d'operacions.

El jejú s'aïllava seguint la tècnica descrita per Dubois i col. (150), modificada posteriorment per Minor i col. (151). En primer lloc es feia una incisió laparotòmica en forma de T invertida, la qual proporcionava un excel·lent camp de visió per la dissecció dels pedicles vasculars. S'embolcallava l'intestí amb una gasa, prèvia irrigació d'aquesta amb solució salina fisiològica (SSF), per tal de mantenir-lo en condicions òptimes d'humitat i temperatura. A continuació, es seccionava una làmina serosa fina que uneix l'angle de Treitz de l'intestí al mesocolon esquerre (el lligament de Treitz). La operació pròpiament dita, s'iniciava amb una colectomia total, per això es dissecaven els vasos còlics mitjos i drets, i es seccionaven, fet que

permetia retirar el colon distalment (Figura 3.1.A.). A continuació, s'iniciava la dissecció dels pedicles vasculars: es començava per la dissecció portal, lligant les seves tributàries esplènica, pilòrica i els vasos pancreàtics (Figura 3.1.B.). Les estructures venoses en la rata són d'una paret extremadament fina i de difícil identificació quan estan exsangües, per tant la seva dissecció ha de ser molt acurada en tota la longitud de la vena fins la seva divisió a l'hili hepàtic. La cura en la dissecció facilitarà la posterior canulació. Finalment, es disseccionava l'artèria mesentèrica superior (AMS) i el segment aòrtic on neix aquesta (Figura 3.1.C.).

El nivell de secció duodenal venia determinat pel canvi de color (cap a la isquèmia) que condicionava el dèficit d'irrigació causat per la lligadura pancreàtica. En aquest moment la llum intestinal es rentava a baixa pressió, per evitar la distensió de la paret intestinal i la lesió del llit microcirculatori, amb 10 ml de solució de preservació de UW a 4°C (Figura 3.2.A.). Després es procedia a l'obliteració de l'aorta per sobre i per sota de l'AMS i, immediatament, es canulava l'AMS amb tub de polietilè (PE-50) i es perfovia amb 5 ml de UW a 4°C (Figura 3.1.D.). Quan el rentat intravascular era correcte, el teixit quedava d'un color rosat pàl·lid i el mesenterí blanc, amb les estructures vasculars transparents. La vena porta també es canulava amb PE-150. Després es lligava i es seccionava l'aorta per sobre i per sota de la cànula, la porta per sobre la cànula i s'alliberava el jejú del teixit retroperitoneal. Els extrems del jejú es canulaven amb PE-250 i aquest es submergia amb cura en un recipient amb 25 ml de UW a 4°C, on es mantenia durant tot el període de preservació (Figura 3.2.B.).



**Figura 3.1.** A) Lligadura dels vasos còlics com a pas previ a la colectomia total. B) Dissecció de l'eix venós mesentèric portal amb lligadura dels vasos col·laterals pilòrics i pancreàtic-duodenals. C) Dissecció de l'aorta abdominal i de l'AMS. D) Detall de la perfusió de la llum vascular de l'intestí amb solució de preservació UW a 4°C. Dues pinces hemostàtiques ocloïxen l'aorta per sobre i per sota de l'AMS. Observis la petita porció de meso jejunal amb els seus vasos totalment translúcids a causa del rentat.



**Figura 3.2.** A) Rentat de la llum intestinal a baixa pressió, per no malmetre les vellositats. B) Intestí després de la perfusió vascular i el rentat de la llum en solució de preservació de UW a 4°C.

En un dels estudis es va dur a terme un trasplantament heterotòpic d'intestí prim, per tal de correlacionar els efectes de la preservació amb la translocació bacteriana. La tècnica utilitzada es basava en la descrita al 1971 per Monchik i Russell (152) i va ser realitzada pel Dr. Daniel Azuara a la unitat de cirurgia de l'Hospital de Bellvitge, sota la direcció del Dr. Javier de Oca.

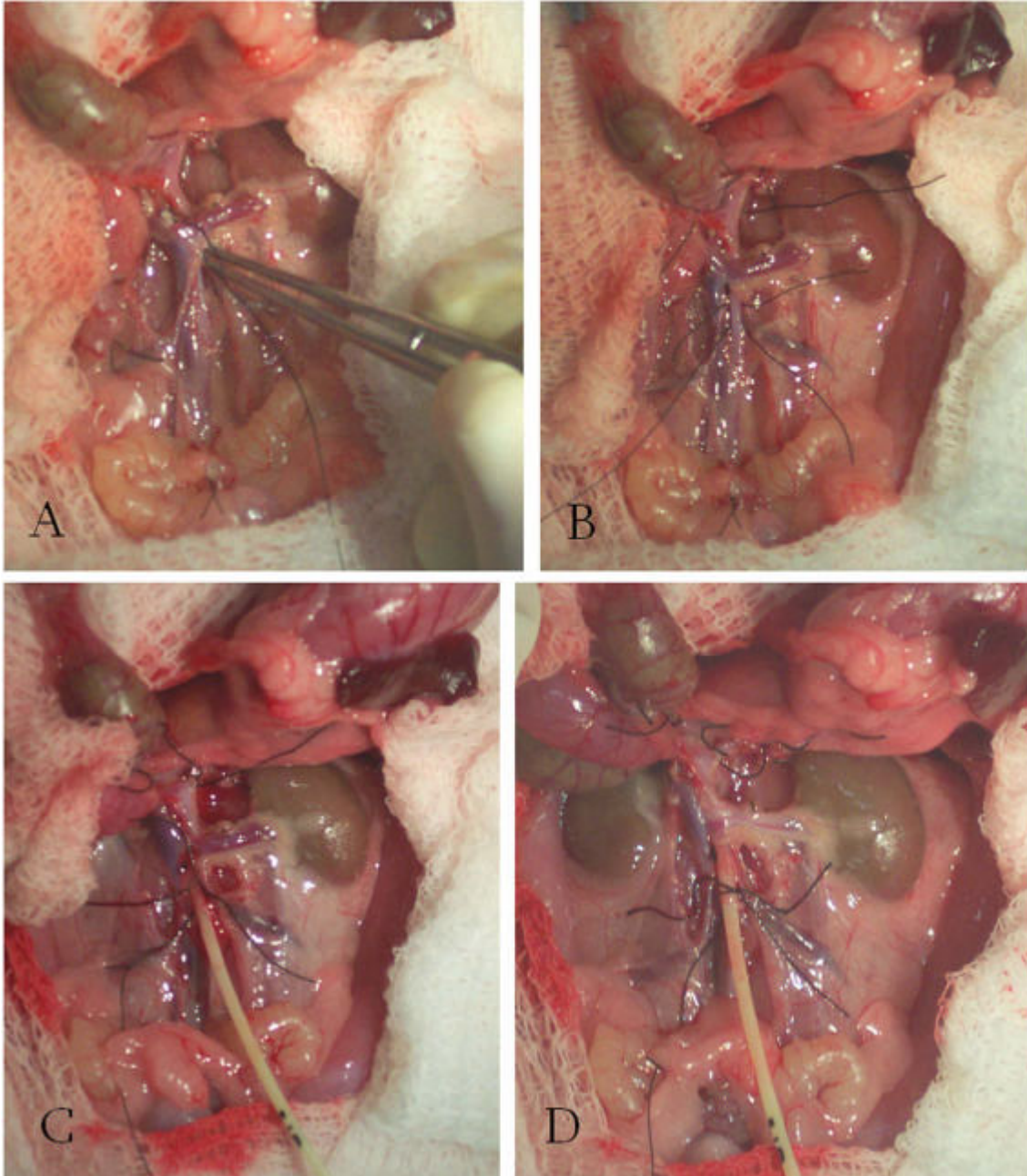
### 3.1.1.2. Ronyó

Els animals s'anestesiaven amb una injecció intraperitoneal de pentobarbital sòdic (30 mg/kg). Després de rasurar el pèl, l'animal es col·locava en posició supina sobre la taula d'operacions.

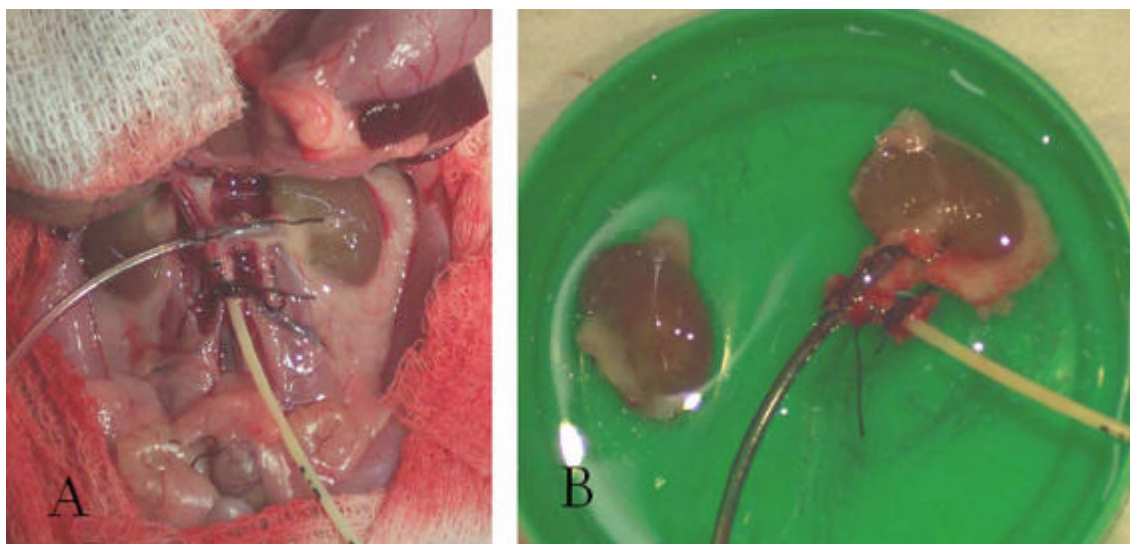
El ronyó s'aïllava segons la tècnica apresada amb el grup d'Hauet i col. (153). En primer lloc es feia una incisió laparotòmica en forma de T invertida, la qual proporcionava un excel·lent camp de visió per la dissecció dels pedicles vasculars. El paquet intestinal es retirava a un costat per exposar la zona que interessava (embolcallant-lo també amb una gasa, prèvia irrigació d'aquesta amb SSF, per tal de mantenir-lo en condicions òptimes d'humitat i temperatura). Amb el mateix objectiu, es seccionava el colon per la meitat i es retirava cap a les zones proximal i distal cada part corresponent. A continuació es dissecava l'aorta a nivell infra i suprarenal, tot lligant i seccionant l'artèria adrenal esquerra i les lumbar que hi havien (Figura 3.3.A. i B.). Un cop es tenia aquesta zona neta, l'artèria aorta i la vena cava aïllades, s'administrava 1000 U d'heparina per la vena peniana. Just després de l'oclusió de l'artèria aorta a nivell suprarenal, s'inseria un catèter de PE-80 a l'aorta infrarenal (per sota dels vasos renals). Immediatament, els ronyons es perfonien amb 8 ml de UW a 4°C a una pressió màxima de 60 mm Hg mesurada per gravetat (Figura 3.3.C. i D.). Mentrestant, la vena renal es canulava amb un catèter de PE-150 (des de la vena cava) (Figura 3.4.A.). Un cop s'havien perfós els ronyons, es procedia a la seva

extracció i es submergien dins d'un recipient amb 20 ml de solució de UW a 4°C durant el temps CI previst (Figura 3.4.B.).

D'aquesta manera s'obtenia els dos ronyons: l'esquerre canulat que podia ser reperfós, i el dret sense canular, el qual era processat al final de la isquèmia.



**Figura 3.3.** A) Lligadura que abarca tota la zona dorsal de l'aorta per tal de poder lligar les petites branques lumbar que hi han. B) Moment previ a la perfusió amb les lligadures preparades a l'AMS, a l'aorta suprarenal (per parar el flux sanguini i permetre el pas de la solució directament als ronyons) i a l'aorta infrarenal per fixar la cànula. C) Inici de la perfusió mitjançant la cànula inserida. D) Un altre detall de la perfusió, on es pot observar la transparència de la vena renal i el canvi de color dels ronyons perfosos.



**Figura 3.4.** A) Final de la perfusió amb la inserció de la cànula de la vena renal a través de la vena cava. B) Ronyons extrets i a punt de ser preservats en solució de UW a 4°C. El ronyó esquerre mostra la cànula arterial a l'aorta infrarenal i la venosa a la vena renal.

### 3.1.2. MODEL D'ÒRGAN AÏLLAT

#### 3.1.2.1. Bany d'òrgans

El model de bany d'òrgans consisteix en reperfondre un òrgan *ex vivo* en condicions el més fisiològiques possibles. Un bany d'òrgans consta, bàsicament, d'un receptacle on reposa l'òrgan, un reservori on s'emmagatzema el líquid de reperfusió, un sistema d'oxigenació d'aquest líquid i una bomba que el fa circular (150, 151, 154-156). Sobre aquesta base es poden afegir diverses modificacions, tant en la composició del líquid de reperfusió com en el muntatge del mateix bany, que confereixen diferents graus de complexitat i de precisió al model.

El model de bany d'òrgans és un eina experimental usada des de fa temps. Va ser introduïda per primer cop per Weiss i col. l'any 1959 per l'estudi de la regulació del flux sanguini renal, reperfont en el bany ronyons de rata (IPK) (157). Actualment aquests models s'usen amb altres finalitats com poden ser l'estudi d'aspectes fisiològics i bioquímics, i en el cas d'intestí, sobretot per estudis d'absorció. Els models aïllats de fetge (126), pulmó (158), intestí (150, 151) i ronyó (122, 155, 156) han estat utilitzats amb èxit com a models per avaluar la preservació d'òrgans amb tècniques senzilles d'emmagatzemat en fred.

La tècnica de perfusió del ronyó/intestí aïllat en un bany d'òrgans és un test rigorós de preservació renal/intestinal que permet estudiar l'efecte de la CI i de la reperfusió normotèrmica sobre la funció i el metabolisme de l'òrgan. La validació de l'ús

d'aquests models ja ha estat demostrada prèviament (122, 126, 150, 151, 154-156, 159). Aquests models permeten reproduir i modificar les condicions en que es troba l'òrgan en ser trasplantat: període de CI i reperfusió en condicions novament fisiològiques sense les dificultats que comporta el trasplantament.

Els avantatges del model són obvis i evidents: les variables poden modificar-se amb facilitat i rapidesa i estan sempre sota control, un gran número de maniobres poden ser testades i comprovades, s'eliminen les influències nervioses i hormonals, permet l'estudi dels paràmetres funcionals immediats i l'efecte de la preservació hipotèrmica pot ser aïllat. Per altra banda, el model no impedeix la formació natural de metabòlits per part de les cèl·lules, i els fenòmens apoptòtics que s'hi puguin observar, es deuen principalment a les cèl·lules de l'òrgan en qüestió, i no a cèl·lules inflamatòries provinents de la circulació sanguínia.

Per contra, també presenta alguns problemes. Un d'ells és que donat que l'oxigen dissolt difon malament als teixits, existeix cert grau de dèficit d'oxigen en perfusat lliure de cèl·lules. Això s'evita oxigenant la solució fins aconseguir una pressió parcial d'oxigen igual o superior a 500 mm Hg (160, 161). En el cas del ronyó existeixen defectes associats a la manca d'aminoàcids, per exemple: la taxa de filtració glomerular és un 75-80% (de la mesurada *in vivo*) durant els primers 30 min de reperfusió i després cau; aquesta mancança es resol afegint un barreja d'aminoàcids (154, 162) de manera que la seva concentració final és el més semblant possible a la concentració fisiològica del plasma de rata.

El bany d'òrgans usat en aquest treball era un sistema tancat, és a dir, que el líquid de reperfusió recircula. El medi s'escalfava a 37°C i s'oxigenava amb carbogen (95% O<sub>2</sub> / 5% CO<sub>2</sub>) durant 2 h abans de començar la reperfusió i es mantenia així durant tota la reperfusió. Aquest medi es mantenia en un recipient de vidre de 250 ml de capacitat, que tenia tres funcions bàsiques: actuar com a reservori del líquid de reperfusió, fer de camera d'expansió on s'esmorteïa el cop de la bomba de manera que el flux pulsàtil que produïa la bomba arribava a l'òrgan convertit en un flux continu i, per últim, evitar que pogués entrar aire i/o escuma a l'interior de l'òrgan provocant una embòlia gasosa. Des de la camera reservori, el líquid de reperfusió passava directament a l'òrgan a través d'un tub connectat a la cànula arterial. L'efluent venós es recollia en un altre recipient on es tornava a oxigenar i es recirculava mitjançant una bomba peristàltica de nou cap al reservori, previ pas per un filtre. Aquest filtre tenia 5 µm de diàmetre (Millipore Corporation, Bedford, MA, EUA) i s'instal·lava *on-line* en el sistema per tal de retirar qualsevol petit detritus de la circulació.

Tots els reservoris que contenien perfusat, així com també el receptacle que acollia l'òrgan que s'estava reperfonent, tenien una doble camera exterior per on circulava

aigua calenta (escalfada mitjançant un bany extern), que mantenia el líquid de reperfusió i l'òrgan a 37°C. El medi bàsic de perfusió era la solució de Krebs-Henseleit (Taula 3.1.) que segons el model es modificava de forma pertinent.

**Taula 3.1.** Composició de la solució de Krebs-Henseleit.

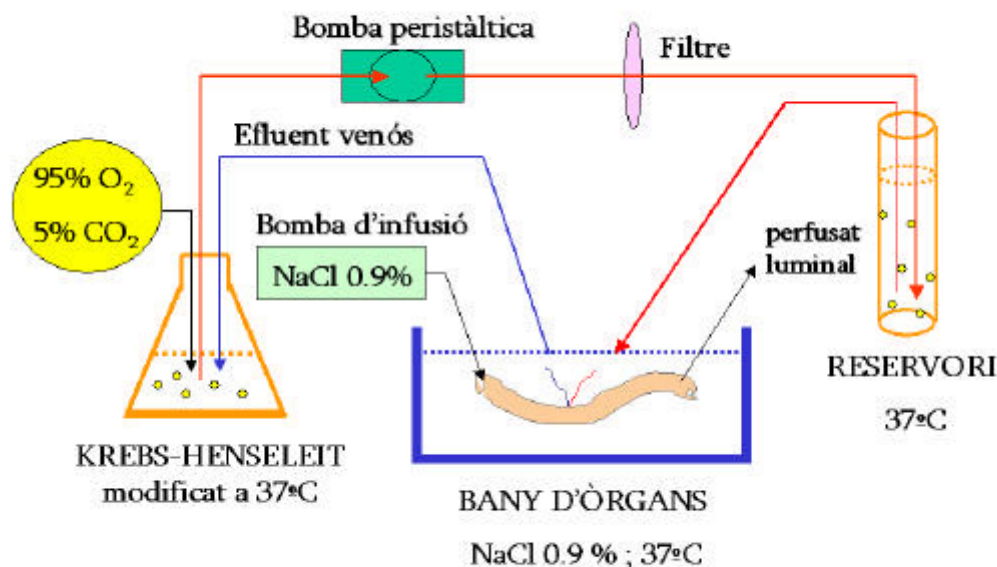
COMPONENT	CONCENTRACIÓ
NaCl	140 mmol/L
KCl	4.9 mmol/L
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	123 mmol/L
CaCl <sub>2</sub>	2.2 mmol/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.2 mmol/L
O <sub>2</sub> / CO <sub>2</sub>	95% / 5%
pH	7.35-7.45

### 3.1.2.2. Model aïllat d'intestí (IPJ)

Aquest model es va adaptar del descrit prèviament per Minor i col. (151). Després de la preservació i just abans de començar la reperfusió, el jejú es col·locava en el receptacle amb 100 ml de SSF que es trobava a 37°C i es perfonia amb 5 ml de SSF a 37°C a través de la cànula arterial. Immediatament, es connectaven les cànules de l'òrgan a les del bany i es reperfonia durant 1 h.

A la solució bàsica de Krebs únicament s'hi afegeix glucosa (200 mg/dl). Aquest perfusat es fa arribar a l'AMS a una velocitat constant de 3 ml/min mitjançant una bomba peristàltica. La llum intestinal, que també està canulada, es connectava a una cànula que anava a una bomba d'infusió on, mitjançant una xeringa, es subministrava SSF a 37°C. La taxa de perfusió de la llum intestinal era de 0.5 ml/min.





**Figura 3.1.** Esquema del sistema per reperfondre el jejú aïllat de rata (IPJ).

### 3.1.2.3. Model aïllat de ronyó (IPK)

El model de reperfusió va ser adaptat del descrit prèviament per Herrero i col. (122). El medi utilitzat per reperfondre el ronyó va ser molt més elaborat. A la solució bàsica de Krebs s'hi afegia EDTA 0.04 mM i D-glucosa 5 mM. Per garantir una pressió oncòtica adequada s'addicionava albúmina sèrica bovina dialitzada (BSA) (fracció V, Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, EUA), a una concentració de 4.5 g /100 ml. Com a mesura profilàctica s'afegia antibiòtics: estreptomina (10 mg/l) i penicil·lina G (100.000 UI/l). Previ a la seva utilització, aquest medi s'esterilitzava per filtració amb un filtre de 0.22 µm de diàmetre de porus (Millipore) i després es complementava amb els aminoàcids i les altres substàncies.

Per tal de garantir la correcta funció tubular, s'afegia al medi una barreja de 20 aminoàcids (Aminoplasmal L-12.5, Braun medical, Espanya) a dilució final 1/140, que s'enriqueix amb quantitats addicionals d'aminoàcids essencials (tirosina 0.2 mM, glicina 1.4 mM, lisina 0.6 mM, cisteïna 0.45 mM i glutamina 2 mM) de manera que s'obtenia una barreja de 22 aminoàcids, la composició final dels quals era semblant a la que es troba al plasma de rata (163). Amb la mateixa finalitat, el medi es suplementava amb urea 6 mM, creatinina 0.13 mM, àcid màlic 1 mM, piruvat 0.3 mM, lactat 2.1 mM,  $\alpha$ -cetoglutarat 1 mM i insulina 4 UI/l.

En el cas del ronyó, el flux de perfusió era variable, mantenint una pressió màxima de 60 mm Hg.

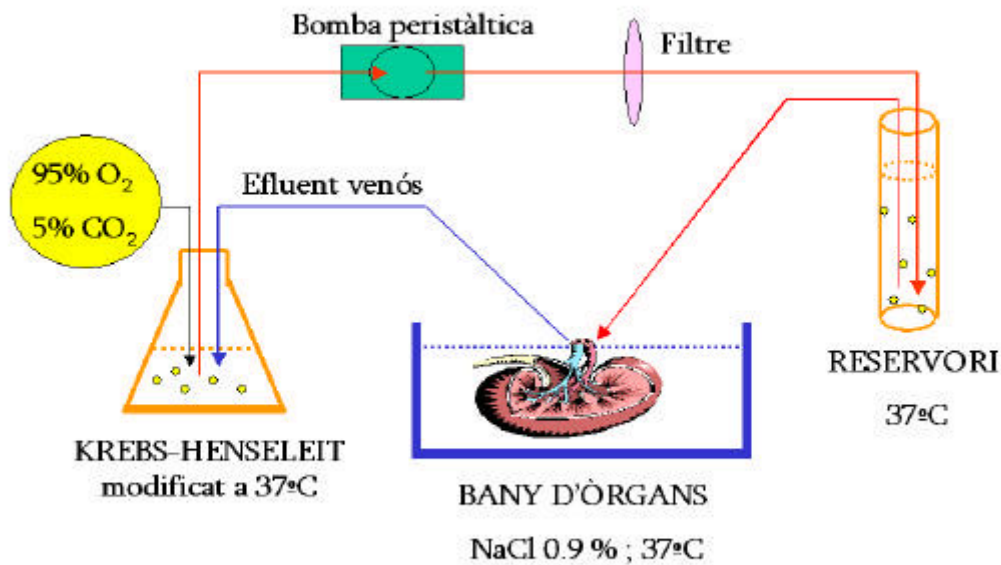


Figura 3.1. Esquema del sistema per reperfundre el ronyó aïllat de rata (IPK).

## 3.2. GRUPS EXPERIMENTALS

**Grup Control o Sham:** Aquest grup es va dissenyar amb la finalitat de determinar els efectes del procediment quirúrgic i així diferenciar-los dels efectes conseqüència directa de la isquèmia o dels efectes conseqüència de la I/R. Els animals destinats aquest grup eren sotmesos a tota la operació d'extracció de l'òrgan, el qual era immediatament processat sense període de CI.

### 3.2.1. ESTUDI 1

Amb la finalitat de determinar la implicació de l'adenosina i de la xantina sobre l'apoptosi durant la I/R intestinal i conèixer quin era el paper del NO en aquest procés es va realitzar l'estudi 1.

Per tal de seleccionar un temps d'isquèmia adequat (en el qual es pogués detectar alteracions en els paràmetres apoptòtics i variacions en el nivell de nucleòtids), es va dur a terme un estudi pilot en el que es va mesurar el nivell de nucleòtids tissulars, l'alliberació de lactat deshidrogenasa al medi de preservació i la fragmentació de

l'ADN a diferents temps de preservació. D'aquest estudi previ se'n va triar les 3 h d'isquèmia.

L'efecte de la xantina durant la I/R intestinal es va avaluar a través de l'administració d'aquesta substància durant la CI. La teofil·lina, un antagonista competitiu dels receptors d'adenosina (164), es va afegir a la solució de preservació amb l'objectiu d'avaluar l'efecte que tenia la supressió de la funció de l'adenosina. L'efecte d'un excés d'adenosina es va investigar mitjançant l'addició directa d'adenosina a la solució de preservació. Per avaluar si l'efecte de l'adenosina era mediat per l'NO o, alternativament, si aquest era capaç de potenciar l'efecte de l'adenosina o la xantina, es va afegir a la solució de preservació d'altres grups experimentals un donant d'NO: *spermine NONOate* (NONOs). Els animals es van assignar de forma aleatòria als 8 grups de l'estudi (n=5):

Grup 1 (**CI**): 3 h d'isquèmia + 1 h de reperfusió

Grup 2 (**CI+X**): 3 h d'isquèmia + 1 h de reperfusió + xantina. La xantina es va dissoldre prèviament en SSF (pH=7.4) i després es va afegir al volum total de UW usat per animal (40 ml) a una concentració de 0.62 mM. Per tant, la UW amb el que es va perfondre la llum vascular i la llum intestinal, així com el que s'utilitzava per mantenir l'òrgan en preservació, era rica en xantina.

Grup 3 (**CI+T**): 3 h d'isquèmia + 1 h de reperfusió + teofil·lina. L'administració de teofil·lina (2.8 mM) va seguir el mateix patró que per la xantina, però aquesta va ser dissolta directament als 40 ml de UW.

Grup 4 (**CI+T+X**): 3 h d'isquèmia + 1 h de reperfusió + teofil·lina + xantina. Les dues substàncies, teofil·lina i xantina, es van administrar al mateix temps dissolent-les en els 40 ml de UW a les concentracions descrites anteriorment.

Grup 5 (**CI+X+NONOs**): 3 h d'isquèmia + 1 h de reperfusió + xantina + NONOs. La xantina es va administrar com s'ha descrit abans. El NONOs (16 mg/kg) es va resuspendre en 300 µl de tampó fosfat salí (PBS) (pH=7.4) 30 min abans de la seva administració. Just abans de la isquèmia es va dissoldre en 1 ml de UW i es va administrar per l'AMS al final de la seva perfusió amb UW.

Grup 6 (**CI+A**): 3 h d'isquèmia + 1 h de reperfusió + adenosina. L'adenosina (0.5 mM) es va dissoldre directament en els 40 ml de UW.

Grup 7 (**CI+T+NONOs**): 3 h d'isquèmia + 1 h de reperfusió + teofil·lina + NONOs. Tant la teofil·lina com el NONOs es van administrar com s'ha descrit prèviament.

Grup 8 (**CI+A+NONOs**): 3 h d'isquèmia + 1 h de reperfusió + adenosina + NONOs. L'adenosina i el NONOs es van administrar tal com s'ha descrit anteriorment.

### 3.2.2. ESTUDI 2

Amb la finalitat d'esbrinar si la FDP podia tenir un paper protector davant el desenvolupament de l'apoptosi durant la preservació intestinal i determinar l'efecte de l'apoptosi durant la preservació en la translocació bacteriana al trasplantament, es va realitzar l'estudi 2.

La FDP es va afegir a la UW amb la intenció d'esbrinar si podia tenir un efecte antiapoptòtic durant la preservació. A més a més, la teofil·lina també es va addicionar en el grup tractat amb FDP per saber si l'addició de les dues substàncies tenia un efecte sinèrgic alhora de millorar el desenvolupament d'apoptosi a la preservació i, al mateix temps, esbrinar si l'adenosina mediava l'efecte de la FDP mitjançant els seus receptors. A més a més, un inhibidor de l'adenosina deaminasa (165), eritro-9-(2-hidroxil-3-nonil)adenina (EHNA), també es va afegir a la solució de preservació en aquest grup, per avaluar si l'increment endogen d'adenosina potenciava o contrarestava l'efecte de la FDP sobre l'apoptosi. Finalment, un grup es va tractar amb l'inhibidor de caspases zVAD-fmk (166), com a control negatiu. Els animals es van assignar de forma aleatòria al grups d'estudi (n=5):

Grup 1 (**C**) Grup control (*sham*). El jejú es va extreure i es va processar immediatament sense preservació freda.

Grup 2 (**CI**): Grup amb 6 h d'isquèmia freda. El jejú es va extreure i es va preservar en 25 ml de UW durant les 6 h de preservació.

Grup 3 (**CI+FDP**): Grup amb 6 h d'isquèmia freda + FDP. La FDP (5 mM) es va dissoldre en el volum total usat per animal (40 ml) a pH 7.4. Per tant, la UW que es va usar per perfondre la llum vascular i intestinal, així com la usada per preservar el jejú, eren riques en FDP.

Grup 4 (**CI+FDP+T**): Grup amb 6 h d'isquèmia freda + FDP + teofil·lina. L'administració de la teofil·lina (2.8 mM) va seguir el mateix patró que la FDP, per tant, les dos substàncies es van dissoldre directament en els 40 ml de solució de UW.

Grup 5 (**CI+FDP+EHNA**): Grup amb 6 h d'isquèmia freda + FDP + EHNA. La FDP es va administrar tal com s'ha descrit abans. L'inhibidor de l'adenosina deaminasa, EHNA (500 µg per animal), es va dissoldre només en els 10 ml de solució de UW usats per perfondre la llum intestinal.

Grup 6 (**CI+zVAD-fmk**): Grup amb 6 h d'isquèmia freda + zVAD-fmk. L'inhibidor de caspases zVAD-fmk (250 µg per animal) es va administrar dissolt en 1 ml de SSF per la vena cava 1 h abans dels procediments quirúrgics.

Tots aquest grups es van fer per duplicat, de manera que un conjunt dels grups es va processar al final de les 6 h d'isquèmia, i a l'altre se'ls va practicar un trasplantament intestinal, per tal d'avaluar l'efecte de l'apoptosi durant la preservació en la translocació bacteriana a les 3 h de trasplantament. Aquests altres grups es van anomenar de la següent manera:

Grup 7 (**Trp**): Grup de trasplantament, amb 6 h de preservació freda i 3 h de reperfusió.

Grup 8 (**Trp+FDP**): Grup de trasplantament + FDP. L'administració de FDP es va fer de la mateixa manera que en el grup 3.

Grup 9 (**Trp+FDP+T**): Grup de trasplantament + FDP + teofil·lina. L'administració de FDP i teofil·lina es va fer de la mateixa manera que en el grup 4.

Grup 10 (**Trp+FDP+EHNA**): Grup de trasplantament + FDP + EHNA. L'administració de FDP i EHNA es va fer de la mateixa manera que en el grup 5.

Grup 11 (**Trp+zVAD-fmk**): Grup de trasplantament + zVAD-fmk. L'administració de zVAD-fmk es va fer de la mateixa manera que en el grup 6.

### 3.2.3. ESTUDI 3

Per tal de dilucidar si les alteracions en el citoesquelet d'actina durant la preservació renal indueixen l'apoptosi en la reperfusió i, si aquests esdeveniments, es troben relacionats de la mateixa manera en el cas dels ronyons provinents de NHBD, es va dur a terme l'estudi 3.

L'efecte de la WI sobre el citoesquelet i l'apoptosi va ser analitzat en un grup sotmès a 45 min de WI prèvia a la preservació. Per veure si el trencament del citoesquelet d'actina produïa efectes semblants als de la WI, es van administrar dos agents disruptors d'aquests microfilaments durant la preservació: Swinholide A (SwinA) i Latrunculina B (LB) (Sigma-Aldrich). El SwinA trenca els filaments d'actina i segresta els monòmers d'actina en dímers; i la LB, segresta la G-actina implicant-ne la polimerització i promou la despolimerització de la F-actina (167). Per tal d'avaluar si l'estabilització de la F-actina tenia algun efecte protector davant el desenvolupament d'apoptosi es va administrar Jasplakinolide (JP) (Calbiochem, La Jolla, CA, EUA) en

alguns dels grups que presentaven el citoesquelet d'actina alterat. El JP estabilitza els filaments d'actina a través de la seva unió a la F-actina *in vitro* (167), tot i que els seus efectes *in vivo* no són tan clars, podent induir fins i tot disrupció o formació d'agregats anormals d'aquesta actina polimeritzada (168).

Els animals es va assignar aleatòriament a un dels següents grups d'estudi (n=8):

**Grup 1 (CI):** Grup d'isquèmia freda. Els ronyons es van aïllar i preservar durant 24 h en solució de UW.

**Grup 2 (WI+CI):** Grup d'isquèmia calenta + isquèmia freda. Els ronyons van patir 45 min de WI prèvia a l'aïllament i preservació d'aquests.

**Grup 3 (CI+SwinA):** Grup d'isquèmia freda + Swinholide A. Els ronyons d'aquest grup van seguir el mateix procediment que en el cas del grup CI, però just abans de la preservació es van perfondre amb 500 µl de UW que contenia 500 nM de SwinA.

**Grup 4 (CI+LB):** Grup d'isquèmia freda + Latrunculina B. Els ronyons d'aquest grup van seguir el mateix procediment que en el cas del grup CI, però just abans de la preservació es van perfondre amb 500 µl de UW que contenia 1 µM de LB.

**Grup 5 (CI+JP):** Grup d'isquèmia freda + Jasplakinolide. Els ronyons d'aquest grup van seguir el mateix procediment que en el cas del grup CI, però just abans de la preservació es van perfondre amb 500 µl de UW que contenia 20 nM de JP.

**Grup 6 (CI+SwinA+JP):** Grup d'isquèmia freda + Swinholide A + Jasplakinolide. Els ronyons d'aquest grup van seguir el mateix procediment que en el cas del grup CI, però just abans de la preservació es van perfondre amb 500 µl de UW que contenia 500 nM de SwinA i 20 nM de JP.

**Grup 7 (WI+CI+JP):** Grup d'isquèmia calenta + isquèmia freda + Jasplakinolide. Els ronyons d'aquest grup van ser sotmesos als 45 min de WI com en el cas del grup 2, però just abans de començar aquesta WI se'ls va administrar 1ml de SSF amb JP (20 nM). Després dels 45 min de WI, van ser preservats durant 24 h tal com es va fer en la resta de grups.

D'aquests grups, 4 animals de cada grup es van utilitzar per estudiar el període de preservació i els altres 4, per avaluar l'apoptosi i la funció renal a la reperfusió mitjançant el model d'IPK.

### 3.2.4. ESTUDI 4

Amb la finalitat d'avaluar si la BI és una eina útil alhora determinar les conseqüències de la isquèmia durant la preservació renal es va realitzar l'estudi 4. Aquest estudi es va dur a terme inicialment en un grup amb preservació sola i un altre amb 45 min de WI prèvia.

Donat que un paràmetre dels obtinguts mitjançant l'estudi multifreqüencial de la preservació podia estar relacionat amb les conseqüències del citoesquelet (alteració de les membranes i la pèrdua de l'arquitectura tissular) es va administrar SwinA, el qual com ja hem dit, trenca el filaments d'actina i segresta l'actina en dímers (167), per veure si el trencament directe dels microfilaments produïa el mateix patró d'evolució en aquest paràmetre durant la preservació que en el cas dels ronyons que havien patit WI.

Els animals es va assignar aleatòriament a un dels tres grups (n=5):

Grup 1 (**CI**): Grup d'isquèmia freda. Els ronyons es van aïllar i preservar durant 24 h en solució de UW.

Grup 2 (**WI+CI**): Grup d'isquèmia calenta + isquèmia freda. Els ronyons van patir 45 min de WI prèvia a l'aïllament i preservació d'aquests.

Grup 3 (**CI+SwinA**): Grup d'isquèmia freda + Swinholide A. Els ronyons d'aquest grup van seguir el mateix procediment que en el cas del grup CI, però just abans de la preservació es van perfondre amb 500 µl de UW que contenia 500 nM de SwinA. Els ronyons es van aïllar i preservar durant 24 h en solució de UW.

## 3.3. RECOLLIDA DE MOSTRES

### 3.3.1. INTESTÍ

#### Mostres al final de la isquèmia

Al final de la preservació (3 o 6 h), el jejú es va dividir en 3 parts: una es va congelar immediatament per avaluar els nucleòtids i la producció d'NO; una altra es va processar per anàlisis histològics i immunohistoquímics (fixació en formol tamponat al 4% durant 24 h); i de la última, se'n va extreure la mucosa per determinar l'activitat i el Western blot de la caspasa-3.

### Mostres al final de la reperfusió

En el primer estudi, en el qual es va reperfondre el jejú *ex vivo* durant 1 h, el teixit es va partir en dos al final de la reperfusió: una meitat es va congelar per tal de mesurar la fragmentació de l'ADN i l'altre es va fixar per avaluar la mostra histològicament.

En el segon estudi, en el qual es va realitzar un trasplantament heterotòpic intestinal, un cop finalitzat el període de reperfusió (3 h), els animals es van sacrificar per punció cardíaca sota anestèsia. En primer lloc, i en condicions d'asèpsia, es van agafar mostres dels ganglis limfàtics mesentèrics (GLM) del receptor, per les determinacions microbiològiques. A continuació, per l'estudi anatomopatològic, es van extreure mostres d'intestí i es van fixar en formol tamponat al 4%. Per tal de prevenir possibles diferències degudes a l'àrea de l'intestí escollida, totes les mostres es van obtenir del jejú.

### **3.3.2. RONYÓ**

#### Mostres al final de la isquèmia

Al final de la preservació (24 h), el ronyó es va dividir en dos parts: una es va congelar immediatament per l'avaluació dels nucleòtids i de l'activitat de caspasa-3; i l'altre, es va fixar per histologia o immunohistoquímica, o es va congelar amb alcohol polivinílic, polietilenglicol i clorur de dimetilbenzil amoni (OCT) en nitrogen líquid per l'anàlisi de la F-actina mitjançant microscòpia confocal.

#### Mostres al final de la reperfusió

Els ronyons que es van reperfondre en el model d'IPK es van recollir al final de les 3 h de reperfusió i també es van dividir en dos parts: una es va congelar immediatament per determinar l'activitat de la caspasa-3 i l'altre es va processar pels anàlisis immunohistoquímics.

#### Mostres de perfusat

Durant les 3 h de perfusió *ex vivo* es va recollir l'efluent vascular cada 30 min en una proveta, amb l'objectiu d'avaluar el flux plasmàtic renal (FPR). En aquest perfusat s'hi va determinar la creatinina i l'activitat de la lactat deshidrogenasa (LDH) a les 3 h de reperfusió.



### **3.4. DETERMINACIONS BIOQUÍMIQUES**

#### **3.4.1. Determinació de la concentració de proteïnes**

La determinació de proteïnes és un determinació obligatòria per moltes altres tècniques. En el nostre cas, aquestes es van determinar mitjançant el mètode colorimètric de Bradford amb un reactiu comercial de BioRad (Munic, Alemanya). Aquest assaig es basa en la reacció d'una solució àcida del colorant blau de Coomassie en resposta a diferents concentracions de proteïnes. La concentració de proteïnes en la mostra és directament proporcional a l'absorbància observada a una longitud d'ona  $\lambda=595$  nm. Com a recta patró es va utilitzar una solució d'albumina en la que el punt més concentrat era el de 4.375  $\mu\text{g/ml}$  i, a partir d'aquest punt, es realitzaven 6 dilucions meitat. Les dilucions utilitzades eren 1/400 per mostres d'intestí i 1/800 per mostres de ronyó.

#### **3.4.2. Determinació de nucleòtids, nucleòsids i bases púriques**

La determinació d'aquests nucleòtids, així com també la de la xantina, es va realitzar per cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC). Breument, les mostres (100-150 mg de pes) van ser homogeneïtzades en 1 ml d' $\text{HClO}_4$  al 3.6% i es van mantenir a 0.5°C durant 30 min per la seva extracció. Transcorregut aquest temps, les mostres es van centrifugar a 850 g durant 15 min. Els sobrenedants es van ajustar a  $\text{pH}=6-6.5$  i es van centrifugar a 13.000 rpm durant 2 min. Es van injectar alíquotes de 50  $\mu\text{l}$  del sobrenedant en un cromatògraf líquid Waters 717 (Waters, Milford, MA, EUA) connectat a un detector d'ultravioleta. Les separacions dels diferents nucleòtids i productes de degradació es van realitzar a 254 nm (96).

#### **3.4.3. Activitat de caspasa-3**

La determinació de l'activitat de caspasa-3 es va realitzar en la mucosa intestinal mitjançant una tècnica espectrofluorimètrica. La tècnica consisteix en la quantificació del trencament del substrat específic N-acetil-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-metilcumarina (Ac-DEVD-AMC). La mucosa intestinal es va homogeneïtzar i sonicar en un tampó d'assaig (50 mmol/l HEPES, 10% sucrosa, 0.1% CHAPS, 5 mmol/l ditiotretol, 5 mmol/l GSSG, 1 mM PMSF;  $\text{pH}$  7.4). Es van utilitzar 25  $\mu\text{g}$  de proteïna de cada mostra i 12  $\mu\text{M}$  de Ac-DEVD-AMC per realitzar l'assaig. L'AMC alliberat es va quantificar en intervals de 5 min durant 1 h a 37°C per espectrofluorimetria utilitzant 380 nm d'excitació i mesurant a 450 nm d'emissió.

En el cas del ronyó, s'homogeneïtzen uns 150 mg de ronyó. Per l'assaig s'utilitzen 250  $\mu\text{g}$  de proteïna de cada mostra i 50  $\mu\text{M}$  de Ac-DEVD-AMC. La quantificació es fa durant 2 h amb els mateixos paràmetres.

Les pendents obtingudes de les cinètiques d'escissió del substrat permeten calcular la quantitat d'AMC alliberat per temps i per quantitat de proteïna (extrapolant a la corba d'AMC). Els resultat s'expressen en pmols d'AMC alliberat per mg de proteïna i min.

#### **3.4.4. Fragmentació d'ADN**

La quantitat d'ADN fragmentat es va determinar mitjançant una modificació del mètode reportat per Ikeda (93). Les mostres de mucosa intestinal es van barrejar amb 500 ml de PBS, tot pipetejant de forma vigorosa, i després es van centrifugar durant 5 min a 3.000 rpm. Els pellets es van lisar amb 0.4 ml del tampó de lisi (10 mM Tris, 10 mM EDTA; pH 8.0) amb 0.5% Tritó X-100, i després es van centrifugar a 15.000 rpm durant 20 min per separar l'ADN intacte de la cromatina fragmentada. El sobrenedant, el qual conté l'ADN fragmentat, es va dispensar en un altre tub i les dos fraccions es van precipitar amb 0.4 ml d'àcid perclòric 1N tot barrejant-los i després deixant-los reposar durant 30 min a 4°C. Els precipitats es van sedimentar a 15.000 rpm durant 20 min. Es va tornar a afegir àcid perclòric (0.1 ml 1N) als pellets i es van barrejar vigorosament amb la pipeta. Després es van bullir les mostres durant 5 min per hidrolitzar l'ADN. L'ADN es va quantificar mitjançant l'addició de difenilamina (169) i la lectura de les mostres a 595 nm en l'espectrofotòmetre. El percentatge de fragmentació d'ADN es defineix com la quantitat d'ADN del sobrenedant respecte el total de la mostra (sobrenedant + pellet).

#### **3.4.5. Determinació d'òxid nítric**

La producció de NO en el teixit intestinal es va determinar a través de l'acumulació tissular de nitrats i nitrits. Un tros d'intestí congelat es va homogeneïtzar en 1 ml de PBS (pH=7.4) a 4°C. En aquests homogenats s'hi va determinar la concentració de proteïnes. Els homogenats es van centrifugar a 40.000 g durant 60 min i 450 µl del sobrenedant es va filtrar per centrifugació mitjançant filtres amb tall de pes molecular a 10.000 kDa (Ultrafree-MC, Millipore). L'assaig de nitrits es va dur a terme seguint les instruccions d'un assaig comercial, Cayman Chemical Nitrate/Nitrite assay kit (Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI, EUA). Per tal de que els nitrits es converteixin en nitrats, es van incubar 80 µl dels filtrats amb l'enzim nitrat reductasa i els seus cofactors durant 3 h a temperatura ambient. Al final del període d'incubació, els reactius de Griess s'afegeixen a les mostres i es deixen durant 10 min a temperatura ambient. Finalment, les mostres es llegeixen a 540 nm i la concentració de nitrits es calcula mitjançant la corba de nitrat estàndard.

### **3.4.6. Western blot de caspasa-3**

La mucosa intestinal congelada es va homogeneïtzar amb el mateix tampó que es va utilitzar per la determinació de l'activitat de la caspasa-3 i se'n va quantificar la proteïna. Es van dispensar 80 µg de proteïna per mostra i carril, i es van separar per electroforesi en un gel de SDS del 16%. Les proteïnes es van transferir a una membrana de nitrocel·lulosa, que després va ser bloquejada amb 5% de llet descremada en pols al 0.06% Tween-TBS durant 1 h. Les membranes es van incubar amb l'anticòs primari contra caspasa-3 (dilució 1:800; Serotec lab., Oxford, Regne Unit) durant tota la nit a 4°C. L'endemà, les membranes es van rentar 5 cops amb 0.06 % Tween-TBS i després es van incubar durant 1 h amb l'anticòs secundari contra conill conjugat amb HRP (dilució 1:5000; Sigma-Aldrich), a temperatura ambient. Després, les membranes es van rentar 5 cops amb 0.06% Tween-TBS i tot seguit es va procedir a la detecció amb ECL.

### **3.4.7. Determinació de creatinina**

La creatinina es va determinar en el perfusat renal mitjançant un assaig comercial (Sigma-Aldrich).

### **3.4.8. Determinació de l'activitat de lactat deshidrogenasa**

L'activitat de LDH es va determinar mitjançant un assaig comercial (Roche Applied Science, Mannheim, Alemanya).

## **3.5. HISTOLOGIA I IMMUNOHISTOQUÍMICA**

### **3.5.1. Histologia intestinal**

Les mostres intestinals destinades a l'estudi anatomopatològic es van fixar en formol tamponat al 4% durant 24 h. Després de la seva inclusió en parafina, es van realitzar talls a 4 µm de gruix i es van tenyir amb hematoxilina i eosina (H&E) per la seva valoració. Aquesta valoració va ser duta a terme per 3 observadors independents, tot seguint la classificació de Park i col. (148) (Taula 3.2.).

**Taula 3.2. Criteris microscòpics en la gradació del dany intestinal segons la classificació de Park (148).**

GRAU	DESCRIPCIÓ
0	mucosa normal
1	espai subepitelial a la punta de la vellositat
2	espai subepitelial més extens
3	aixecament epitelial al llarg dels costats de la vellositat
4	denudació de la vellositat
5	pèrdua del teixit de la vellositat
6	infart de les criptes
7	infart transmucosal
8	infart transmural

El grau d'apoptosi va ser avaluat segons el nombre de cossos apoptòtics observats a les criptes intestinals al cap d'1 h de reperfusió i numerats com a: 1 (menys de tres cossos apoptòtics per cripta), 2 (de tres a cinc cossos apoptòtics per cripta) i 3 (més de cinc cossos apoptòtics per cripta).

### 3.5.2. Histologia renal

Les mostres de ronyó en aquest cas es van fixar amb solució de Bouin. Es van fer talls de 3 µm de gruix i es van tenyir amb les tincions de H&E i de PAS (*periodic acid Schiff*). Per la determinació quantitativa del dany renal es va seguir la metodologia descrita per Goujon i col. (170). Es van valorar en una escala del 1 al 5 diferents patrons morfològics típics del dany renal per isquèmia (edema intersticial, edema intracel·lular, desenganxament cel·lular i integritat de BB) essent: 1, cap anormalitat; 2, petites lesions afectant al 10% de la mostra; 3, lesions afectant al 25% de la mostra; 4, lesions afectant al 50% de la mostra; 5 lesions afectant a més del 75% de la mostra.

### 3.5.3. Immunohistoquímica de caspasa-3

Un segment del jejú es va fixar amb formol tamponat al 4% durant 24 h. El teixit es va incloure en parafina i es va tallar en seccions de 3 µm de gruix. Els talls es van desparafinar i es van incubar durant 20 min amb peròxid d'hidrogen al 3%, per tal de bloquejar la peroxidasa endògena. Després es va desemmascarar l'antigen tot bullint

les mostres durant 20 min amb EDTA 1 mM (pH=8) al 10%. Els talls es van incubar durant 1 h amb sèrum fetal boví i, després de rentar-los, es van incubar amb l'anticòs policlonal contra caspasa-3 activa (dilució 1:10.000; BD Biosciences, Pharmingen, San Diego, CA, EUA) durant tota la nit a 4°C. Després de rentar els talls, es van incubar amb l'anticòs secundari biotinilat contra conill (dilució 1:500; Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, EUA) durant 1 h. Els complexos antígen-anticòs es van detectar a través de la incubació dels talls amb avidina-HRP (dilució 1:2000; Vector Laboratories) durant 1 h. El color es va desenvolupar mitjançant l'addició del cromogen diaminobenzidina (DAB) (Vector Laboratories) durant 10 min juntament amb peròxid d'hidrogen i contrastat amb hematoxilina.

En el cas del ronyó, el mètode que es va seguir va ser diferent. Els talls a 3-5 µm es van desparafinar i es van autoclavar per desemascarar l'antigen durant 1 h amb 0.01 M de citrat sòdic a pH 6.0. L'activitat de la peroxidasa endògena es va bloquejar tot incubant els talls amb peròxid d'hidrogen al 3% durant 30 min. Després es van seguir bloquejant amb sèrum de cabra al 3% durant 20 min (Sigma-Aldrich) i després amb un assaig de bloqueig d'avidina i biotina endògenes (Vector Laboratories). Els talls es van incubar amb l'anticòs policlonal primari contra caspasa-3 activa (dilució 1:200; Cell Signaling Technology, Beverly, MA, EUA) durant tota la nit a 4°C. Després de rentar els talls, es van incubar amb l'anticòs secundari contra conill biotinilat (dilució 1:500; Vector Laboratories) durant 30 min. Els complexos antígen-anticòs es van detectar mitjançant la incubació amb l'assaig vectastain ABC (Vector Laboratories) durant 30 min, revelats després amb DAB durant 5 min en presència de peròxid d'hidrogen i contrastats amb hematoxilina.

#### **3.5.4. TUNEL**

La detecció de la fragmentació de l'ADN es va realitzar segons la tècnica del TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyltransferase d'UTP Nick End Labeling*). Es va utilitzar un assaig per intestí i un altre de diferent per ronyó. En ambdós casos, els teixits havien estat prèviament fixats en formol tamponat al 4% durant 24 h i inclosos en parafina.

En el cas d'intestí es va utilitzar *In Situ* Cell Death Detection Kit, AP (Roche Applied Science). Les seccions es van tallar a 3 µm, un cop desparafinats, els talls es van tractar per desemascarar l'antigen mitjançant l'irradiació de microones durant 10 min en EDTA a l'1%. Després es va procedir al marcatge tot seguint les instruccions del fabricant. Al final, els talls es van contrastar amb hematoxilina.

En el cas del ronyó es va utilitzar ApopTag Peroxidase *In Situ* Apoptosis Detection Kit (Intergen Company, NY, EUA). Les seccions es van tallar a 5 µm i un cop desparafinats, els talls es van tractar amb proteinasa K (20 µg/ml) durant 30 min.

Després de rentar-los, la peroxidasa endògena es va bloquejar mitjançant peròxid d'hidrogen al 3% en PBS durant 5 min. Després de tornar a rentar-los, es va dur a terme el marcatge segons les instruccions del fabricant. Finalment les mostres es van revelar a través de l'addició de DAB durant 5 min i contrastar amb hematoxilina.

### **3.5.5. Microscòpia confocal**

Tal com s'extreia el ronyó, es partia per la meitat i es submergia en un petit motlle amb OCT (Tissue-Tek OCT compound, Sakura, Torrance, CA, EUA), congelant-lo immediatament en nitrogen líquid sense fixació prèvia. Els talls fets amb el criòtom a 5 µm es fixaven en formol tamponat al 4% durant 10 min i després es permeabilitzaven amb PBS (el qual contenia 0.1% Tritó X-100 i 1% BSA) durant 30 min. Per la visualització de la F-actina, els talls s'incubaven amb Alexa Fluor 568-phalloidin (Molecular Probes Inc., Eugene, OR, EUA) en PBS amb 1% BSA, dilució 1:40, durant 30 min. Els talls es rentaven tres cops durant 5 min amb PBS i finalment es muntaven amb mowiol (Calbiochem). Les imatges s'obtenien mitjançant un microscopi confocal làser Leica TCS NT (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanya) amb l'objectiu 100x d'oli d'immersió, realitzat en el servei de la Unitat de Microscòpia de la Facultat de Medicina de la UB.

## **3.6. DETERMINACIÓ MICROBIOLÒGICA DE LA TRANSLOCACIÓ BACTERIANA**

Es va realitzar una determinació quantitativa de gèrmens de tots els animals de l'estudi. Després del sacrifici de l'animal, en condicions d'asèpsia, es van agafar mostres de GLM del receptor. Aquestes mostres es van homogeneïtzar en 2 ml de SSF i es van sembrar en 0.01 ml en plaques amb medis Agar-sang (medi enriquit per tota classe de bacteris) i Agar-McConkey (medi que inhibeix el creixement de gèrmens Gram-positius afavorint als Gram-negatius). Es van incubar a 37°C i la lectura es va realitzar a les 48 i a les 72 h per un observador independent de forma cega. Els resultats es va expressar mitjançant el logaritme d'Unitats Formadores de Colònies per gram de teixit (UFC/g teixit).

## **3.7. MESURES DE FLUX**

El FPR es mesurava mitjançant la recollida en una proveta graduada de l'efluent venós durant un min.

### 3.8. MONITORITZACIÓ DE LA BIOIMPEDÀNCIA I PROCESSAMENT DE LES DADES

La BI es va mesurar utilitzant una sonda de silici (9 mm x 0.5 mm x 0.6 mm) amb quatre elèctrodes de platí (300 µm x 300 µm). L'equip de mesura consistia en un analitzador comercial d'impedància (SI1260, Solartron Analytical, Cambridge, Regne Unit), un frontal per millorar les característiques d'entrada (CMRR i impedància d'entrada), un mòdul de multiplexació de quatre canals format per relés de quatre circuits i un ordinador que controlava els subsistemes i emmagatzemava les dades de l'analitzador. El sistema estava configurat per realitzar un escombrat freqüencial de 100 Hz a 100 kHz cada 30 segons. Es va seleccionar un voltatge de 20 mV fet que implica que la corrent injectada màxima fos de 7 µA (171).

Per cada sonda, el sistema de mesura genera un fitxer que conté la seqüència de valors de mòdul i fase per freqüència i instant de temps. Per si mateixes aquestes dades poden ser útils en molts casos (171). De totes maneres, la caracterització freqüencial (multifreqüencial) de la BI sempre proporciona més informació i pot ser útil per diferenciar situacions amb major claredat.

La caracterització freqüencial de la BI sol fer-se a partir d'una modelització de la resposta segons un model matemàtic o circuital. En aquest treball, la resposta per cada instant ha sigut modelada segons l'equació Cole-Cole d'una única dispersió (172). Aquesta modelització fa que a tres freqüències concretes (681 Hz, 2154 Hz i 14678 Hz) s'obtingui un semicercle en la representació en el pla complex (y= part imaginària, x= part real). Així doncs l'espectrograma de la impedància es caracteritza amb el model matemàtic descrit per aquest model (equació de Cole) (172) :

$$\mathbf{Z} = R_{\infty} + \frac{\Delta R}{1 + (j\omega\tau)^{\alpha}} \quad , \quad \Delta R = R_0 - R_{\infty}$$

on  $\mathbf{Z}$  és el valor de la impedància a la freqüència  $\omega$ ,  $j$  és el número complex  $(-1)^{1/2}$ ,  $R_{\infty}$  és la impedància a freqüència infinita,  $R_0$  és la impedància a freqüència zero,  $\tau$  és la constant característica del temps i  $\alpha$  és un paràmetre sense dimensió que varia entre 0 i 1.

Per cada temps i mostra, els paràmetres  $R_{\infty}$ ,  $R_0$ ,  $\tau$  i  $\alpha$  s'ajusten, per tal de reproduir l'espectrograma de la impedància. Aquest ajustament es fa automàticament a partir de les mesures a tres freqüències específiques (681 Hz, 2154 Hz i 4678 Hz), mitjançant l'arc que comprèn el punts de la part real i la part imaginària per aquestes freqüències en l'arc de Nyquist. Freqüències més altes o més baixes no són adequades

en aquest cas perquè els errors introduïts per l'agulla i les limitacions del sistema són prou significants i distorsionen la resposta en el model de Cole (171).

La sonda s'inseria ortogonalment al ronyó mitjançant punció directa, quedant el centre del conjunt d'elèctrodes a uns 5 mm de profunditat. És interessant destacar que l'agulla es manté estable en el ronyó degut a la seva pròpia forma i que el conjunt queda totalment submergit en UW sense que això afecti aparentment a les mesures.

Després d'ajustar els valors, s'obtenien les constants de Cole ( $R_{\infty}$ ,  $R_0$ ,  $\tau$  i  $\alpha$ ), expressades com a mitjana  $\pm$  error estàndard de la mitjana. Es va fer atenció especial a cert punts de la preservació (0.5, 2, 4, 8 i 24 h), tot i que es va monitoritzar durant les 24 h.

### **3.9. ESTUDI ESTADÍSTIC**

Les dades es van expressar com el valor de la mitjana  $\pm$  l'error estàndard de la mitjana (SEM). L'estudi estadístic es va realitzar mitjançant l'anàlisi de la variància (ANOVA) i la determinació del nivell de significància estadística amb el test de la T de Student. Les diferències significatives es van assumir a un error màxim d'alfa del 5% ( $p < 0.05$ ). En el cas dels estudis histopatològics, les mitjanes dels diferents grups es van comparar utilitzant el test de la U de Mann-Whitney i les diferències també es van assumir com a significatives quan  $p < 0.05$ .



## **4. RESULTATS**



## 4.1. ESTUDI 1

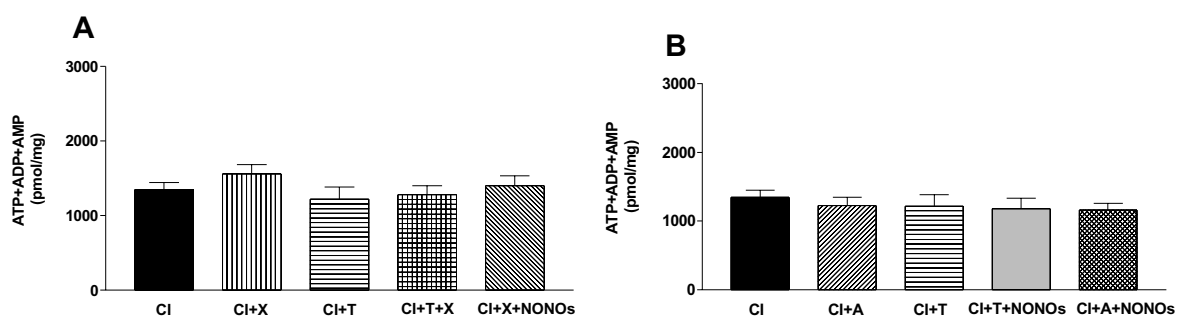
Aquest estudi perseguia avaluar si la xantina i l'adenosina, substàncies els nivells de les quals es modifiquen proporcionalment a la duració de la isquèmia, podien determinar el grau de mort cel·lular (apoptosi/necrosi) durant la I/R, així com conèixer el paper de l'NO durant aquest procés. Per això, es van estudiar els següents grups: **CI**, isquèmia freda; **CI+X**, efecte de la xantina; **CI+T**, efecte de l'adenosina (bloquejant els seus receptors a través de la teofil·lina); **CI+A**, efecte de l'excés d'adenosina; **CI+T+X**, efecte de la xantina per si sola, i **CI+T+NONOs**, **CI+A+NONOs**, **CI+X+NONOs**, paper de l'NO en l'acció de l'adenosina.

### 4.1.1. Nucleòtids d'adenina, adenosina i xantina a les 3 h de preservació.

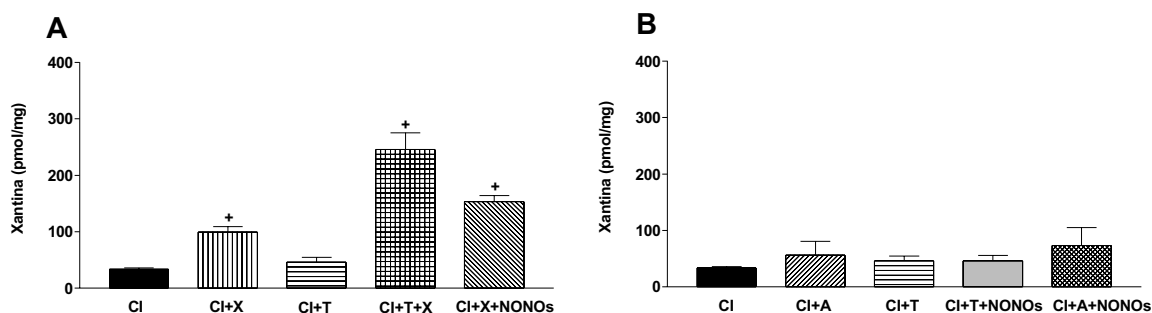
El total de nucleòtids d'adenina (TAN=ATP+ADP+AMP) no va mostrar cap diferència entre els diferents grups al final de la isquèmia (Figura 4.1.1.).

La Figura 4.1.2. mostra els nivells tissulars de xantina al final de la isquèmia. Tal i com s'esperava, la xantina es va acumular de forma significativa en el teixit intestinal dels grups en els que es va administrar xantina de forma exògena (grups CI+X, CI+T+X i CI+X+NONOS).

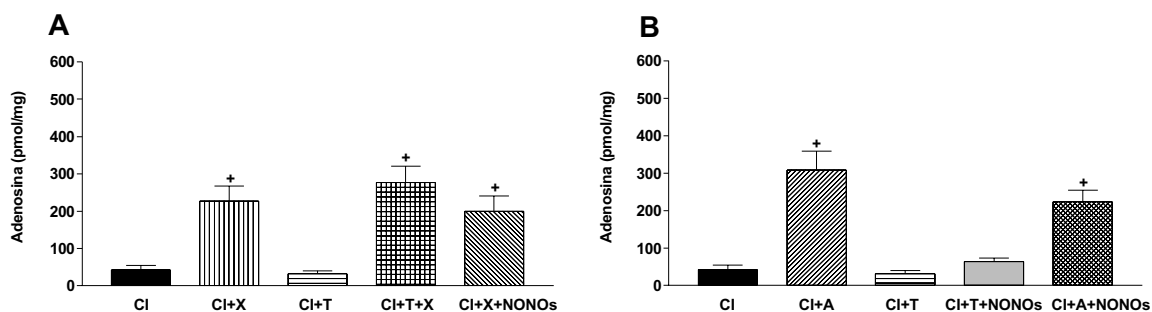
Pel que fa l'adenosina, aquesta va augmentar de forma significativa en aquells grups en els que es va administrar adenosina o xantina exògenament (Figura 4.1.3.).



**Figura 4.1.1. (A i B). Nivells intestinals d'ATP+ADP+AMP a les 3 h de preservació.** CI, isquèmia freda; X, xantina; T, teofil·lina, NONOs, spermine NONOate; A, adenosina. Els valors s'expressen com la mitjana  $\pm$  SEM.



**Figura 4.1.2. (A i B). Nivells intestinals de xantina a les 3 h de preservació.** CI, isquèmia freda; X, xantina; T, teofil·lina, NONOs, spermine NONOate; A, adenosina. Els valors s'expressen com la mitjana  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  vs. CI.



**Figura 4.1.3. (A i B). Nivells intestinals d'adenosina a les 3 h de preservació.** CI, isquèmia freda; X, xantina; T, teofil·lina, NONOs, spermine NONOate; A, adenosina. Els valors s'expressen com la mitjana  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  vs. CI.

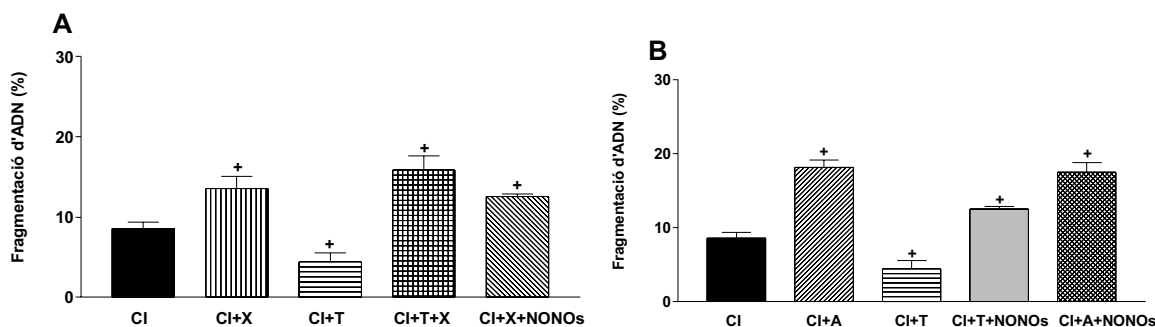
#### 4.1.2. Estudi de paràmetres apoptòtics durant la I/R intestinal.

La fragmentació de l'ADN es va determinar a la mucosa jejunal després de la I/R. El percentatge d'ADN fragmentat va incrementar significativament quan es va administrar xantina (grup CI+X) (Figura 4.1.4.A.). En canvi, quan es va administrar teofil·lina (grup CI+T), el percentatge d'ADN fragmentat va disminuir a valors significativament més baixos que els trobats en el grup CI. Aquest efecte es va revertir quan es va administrar xantina al grup anterior tractat amb teofil·lina (CI+T+X). L'administració de xantina juntament amb NONOs (grup CI+X+NONOs) també va incrementar el percentatge d'ADN fragmentat després de la reperfusió comparat amb el grup CI.

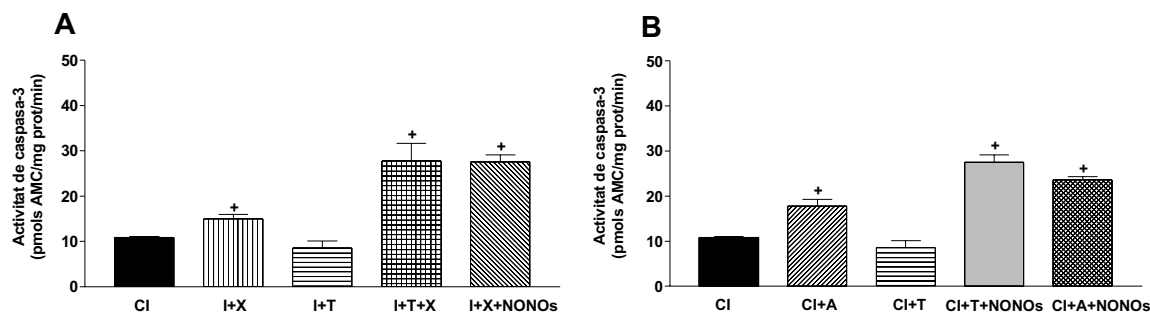
La Figura 4.1.4.B. mostra que l'administració d'adenosina sola (grup CI+A) o juntament amb NONOs (grup CI+A+NONOs) incrementa significativament la

fragmentació de l'ADN. A més a més, l'administració de NONOs juntament amb teofil·lina (grup CI+T+NONOs) va revertir l'efecte de la teofil·lina sobre la fragmentació de l'ADN, incrementant-la significativament.

L'activitat de caspasa-3 es va emprar com a un indicador més primerenc de l'apoptosi. Com es pot veure en la Figura 4.1.5.A., l'activitat de la caspasa-3 va mostrar una tendència a disminuir quan es va administrar teofil·lina (grup CI+T). Quan es va administrar xantina sola (grup CI+X), amb teofil·lina (grup CI+T+X) o amb NONOs (grup CI+X+NONOs), l'activitat de caspasa-3 va augmentar significativament comparat amb la observada en el grup CI. A la Figura 4.1.5.B. s'hi observa que l'administració d'adenosina (CI+A) també incrementa l'activitat de caspasa-3 al final de la isquèmia. L'efecte de la teofil·lina va ser revertit quan se li va administrar NONOs de forma concomitant (grup CI+T+NONOs): la caspasa-3 va augmentar un altre cop de forma significativa. L'administració d'adenosina juntament amb NONOs també va incrementar l'activitat de caspasa-3 (grup CI+A+NONOs).



**Figura 4.1.4. (A i B). Fragmentació de l'ADN (%) en la mucosa jejunal després de 3 h de preservació i 1 h de reperfusió.** CI, isquèmia freda; X, xantina; T, teofil·lina, NONOs, spermine NONOate; A, adenosina. Els valors s'expressen com la mitjana ± SEM. \*p<0.05 vs. CI.

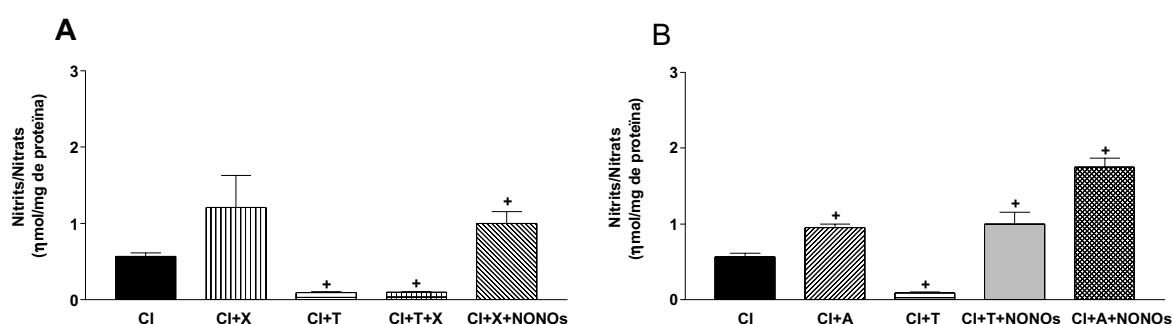


**Figura 4.1.5. (A i B). Activitat de caspasa-3 en la mucosa jejunal després de 3 h de preservació i 1 h de reperfusió.** CI, isquèmia freda; X, xantina; T, teofil·lina, NONOs, spermine NONOate; A, adenosina. Els valors s'expressen com la mitjana ± SEM. \*p<0.05 vs. CI.

### 4.1.3. Generació d'òxid nítric al final de la isquèmia.

La Figura 4.1.6.A. mostra la generació intestinal d'NO, avaluada com a producció de nitrats i nitrits. El grup on es va administrar xantina de forma exògena va mostrar una tendència no significativa a incrementar l'acumulació d'NO (CI+X). Tal com s'esperava, quan el receptor d'adenosina es va bloquejar a través de l'administració de teofil·lina (CI+T), hi va haver molt poca acumulació d'NO i els nivells trobats van ser significativament més baixos que els del grup CI. L'addició de xantina a la teofil·lina (grup CI+T+X) no va tenir cap efecte: la producció d'NO es va mantenir baixa. En canvi, la producció d'NO va augmentar quan es va administrar NONOs juntament amb xantina (grup CI+X+NONOs).

A la Figura 4.1.6.B. s'hi observa que l'administració d'adenosina incrementa significativament la generació d'NO comparat amb la trobada en el grup CI després de la isquèmia. Tal com era d'esperar, quan un donant d'NO va ser coadministrat amb la teofil·lina (grup CI+T+NONOs) o amb l'adenosina (grup CI+A+NONOs), es van detectar nivells de producció d'NO més alts.



**Figura 4.1.6. (A i B). Producció de nitrats i nitrits a l'intestí després de 3 h de preservació.** CI, isquèmia freda; X, xantina; T, teofil·lina, NONOs, spermine NONOate; A, adenosina. Els valors s'expressen com la mitjana  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  vs. CI.

#### 4.1.4. Estudi anatomopatològic.

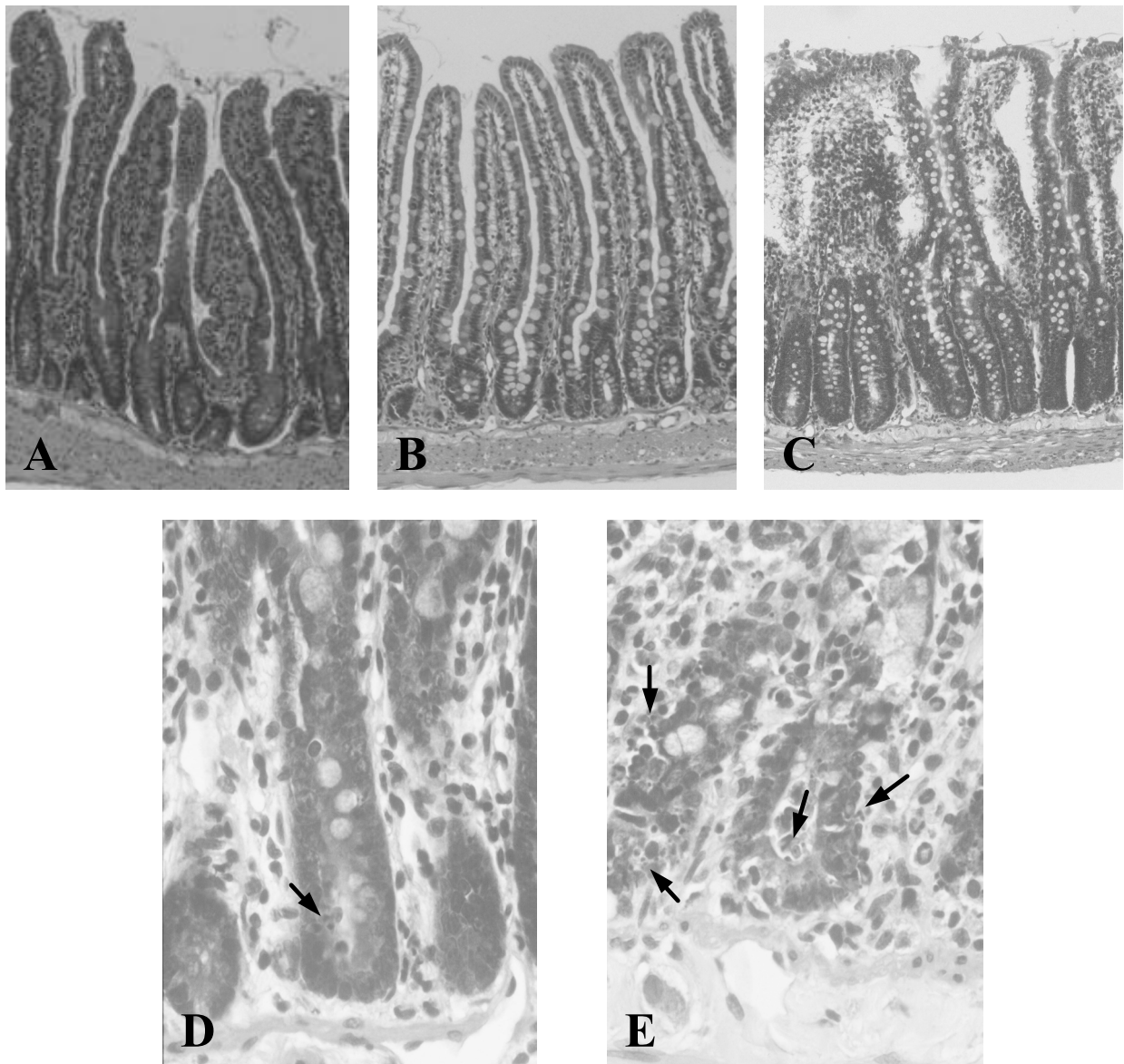
La taula 1 i la Figura 4.1.7. mostren el grau de dany histològic a les 3 h d'isquèmia d'acord amb la classificació de Park, i el grau d'apoptosi a les criptes intestinals després d'1 h de reperfusió.

El dany histològic no va mostrar diferències quan es va administrar teofil·lina (grup CI+T) comparant amb el grup CI. En canvi, aquest dany va augmentar lleugerament en els grups en que es van administrar xantina o adenosina (grup CI+X, i CI+A), o en els grups que es va administrar NONOs. El grau més alt de dany histològic es va trobar en el grup en que es administrava teofil·lina i xantina de forma conjunta (CI+T+X).

Respecte el grau d'apoptosi en les criptes intestinals després de la reperfusió, la majoria dels tractaments van mostrar un increment en el nombre de cossos apoptòtics comparat amb el grup CI: només el grup tractat amb teofil·lina (grup CI+T) va mostrar una disminució. El grau més alt de cossos apoptòtics es va trobar en els grups on es va administrar NONOs (grup CI+T+NONOs, CI+X+NONOs i CI+A+NONOs) i en el grup tractat amb adenosina (grup CI+A).

**Taula 4.1.1. Lesions histològiques observades a la mucosa intestinal després de 3 h d'isquèmia i apoptosi a les criptes intestinals al cap d'1 h de reperfusió.**

GRUPS	DANY TISSULAR	APOPTOSI (REPERFUSIÓ)
CI	1	2
CI + X	1-2	2-3
CI + T	1	1-2
CI + T + X	2-3	2-3
CI + X+ NONOs	1-2	3
CI + A	1-2	3
CI + T + NONOs	1-2	3
CI+ A+ NONOs	1-2	3



**Figura 4.1.7. Seccions histològiques d'intestí prim de rata.** (A) Arquitectura i longitud de les vellositats normals (Park 0-1), representativa dels grups CI i CI+T. (B) Espai de Gruenhagen extès al llarg de la meitat de la vellositat (Park 2), representatiu dels grups CI+X, CI+X+NONOs, CI+A, CI+T+NONOs i CI+A+NONOs. (C) Despreniment total de l'epiteli de la vellositat (Park 3) representatiu del grup CI+T+X. (D) Criptes intestinals mostrant algun cos apoptòtic ocasional (fletxa) representatiu del grup CI+T. (E) Criptes intestinals mostrant gran nombre de cossos apoptòtics a l'epiteli, la llum i la làmina pròpia (fletxes), corresponent al grup CI+T+NONOs (H&E; x100 A,B,C; x400 D,E).



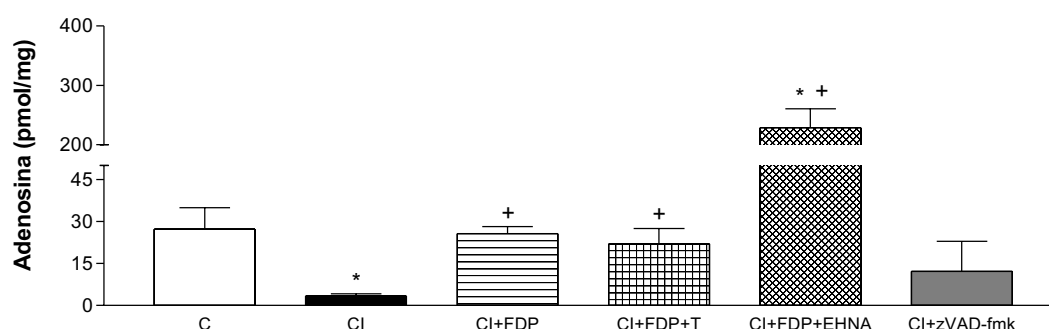
## 4.2. ESTUDI 2

Aquest estudi pretenia avaluar: 1) si la FDP tenia un efecte protector de l'apoptosi en la preservació intestinal, 2) el paper de l'adenosina en relació a la FDP i 3) l'efecte de l'apoptosi en la translocació bacteriana. Es van estudiar els següents grups: **CI**, isquèmia freda; **CI+FDP**, efecte de la FDP; **CI+FDP+T**, efecte del bloqueig de receptors d'adenosina sobre la FDP; **CI+FDP+EHNA**, efecte de l'acumulació endògena d'adenosina sobre la FDP; **CI+zVAD-fmk**, control negatiu; i **Trp**, **Trp+FDP**, **Trp+FDP+T**, **Trp+FDP+EHNA**, **Trp+zVAD-fmk**, estudi del trasplantament en els diferents grups.

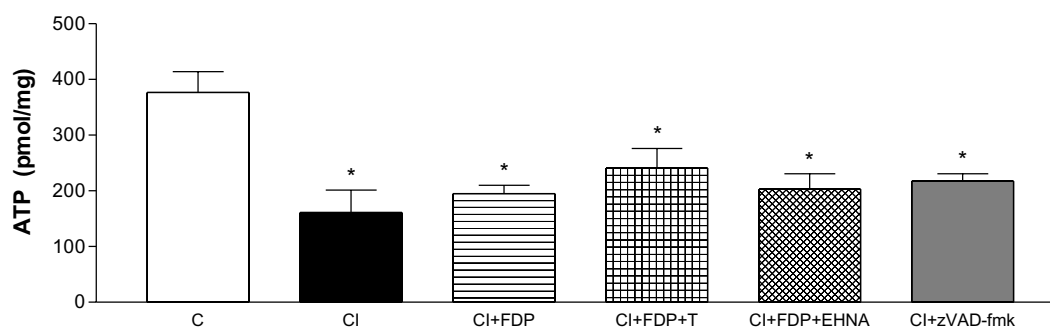
### 4.2.1. Nivells d'ATP i adenosina al final de la isquèmia

La Figura 4.2.1. mostra els nivells tissulars d'adenosina a les 6 h de preservació freda. Aquests nivells van disminuir al cap de 6 h de preservació, comparat amb el grup control, i van incrementar significativament en els grups tractats amb FDP i FDP amb teofil·lina (CI+FDP, CI+FDP+T). L'addició de l'inhibidor de l'adenosina deaminasa (EHNA) al grup amb FDP (CI+FDP+EHNA) va incrementar encara més els nivells d'adenosina. El tractament amb l'inhibidor de caspasa-3 (CI+zVAD-fmk) no va mostrar cap canvi significatiu comparat amb el grup CI.

Tal com s'esperava, el nivells d'ATP al cap de 6 h de preservació freda van disminuir comparat amb el grup control. En canvi, cap dels grups estudiats va tenir efecte en els nivells d'ATP, comparat amb el grup CI (Figura 4.2.2.).



**Figura 4.2.1. Nivells intestinals d'adenosina (pmol/mg) després de 6 h d'isquèmia freda.** C, control; CI, isquèmia freda; FDP, fructosa-1, 6-difosfat; EHNA, eritro-9-(2-hidroxi-3-nonil)adenina; T, teofil·lina; zVAD-fmk, z-Val-Ala-Asp(OMe)-fluorometilcetona. Els valors s'expressen com la mitjana  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  vs. C; + $p < 0.05$  vs. CI.



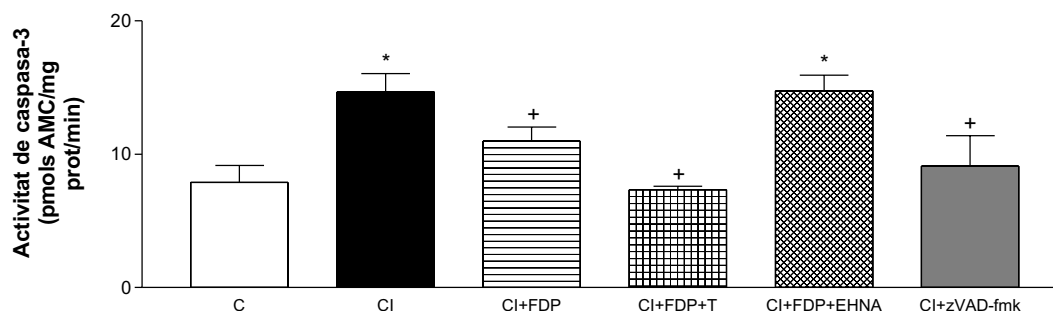
**Figura 4.2.2. Nivells intestinals d'ATP (pmol/mg) després de 6 h d'isquèmia freda.** C, control; CI, isquèmia freda; FDP, fructosa-1, 6-difosfat; EHNA, eritro-9-(2-hidroxi-3-nonil)adenina; T, teofil·lina; zVAD-fmk, z-Val-Ala-Asp(OMe)-fluorometilcetona. Els valors s'expressen com la mitjana  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  vs. C.

#### 4.2.2. Estudi de l'apoptosi al final de la isquèmia

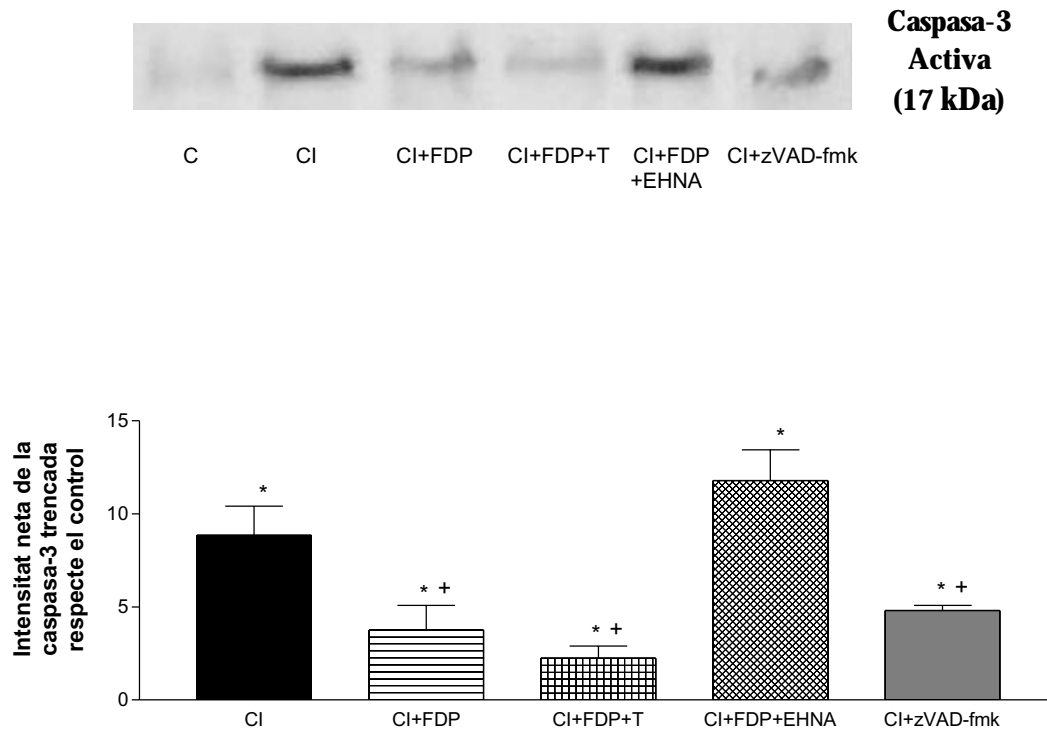
A la Figura 4.2.3. es pot observar l'activitat de caspasa-3 al final del període de preservació. A les 6 h de preservació, la caspasa-3 va augmentar significativament comparat amb el grup control. L'addició de FDP a la solució de preservació va disminuir significativament aquesta activitat, comparat amb el grup CI. Quan es va administrar teofil·lina juntament amb FDP (grup CI+FDP+T), aquesta disminució va ser encara més pronunciada i, fins i tot, significativament més baixa que en el grup CI+FDP. Per contra, l'addició de l'inhibidor de l'adenosina deaminasa (CI+FDP+EHNA) va retornar l'activitat de caspasa-3 a nivells semblants als del grup CI. Tal com era d'esperar, l'administració de l'inhibidor zVAD-fmk va disminuir significativament l'activitat de caspasa-3 al cap de 6 h d'isquèmia freda, tot i que, a la dosi administrada, l'inhibidor no va ser capaç d'eliminar l'activitat de caspasa completament.

Per tal de confirmar els resultats en l'activació de caspasa-3, es va analitzar mitjançant la tècnica del Western blot la presència de la forma activa (trencada) d'aquest enzim (17 kDa). La correlació entre els dos paràmetres va ser alta, tal com es pot observar en la Figura 4.2.4. La intensitat de la banda de caspasa-3 trencada va incrementar a les 6 h de CI, comparat amb el control. La poca activitat trobada en el grup tractat amb teofil·lina (CI+FDP+T) va ser concomitant a la disminució en l'expressió de la caspasa-3 trencada, mentre que l'addició d'EHNA (grup CI+FDP+EHNA) va incrementar-ne l'expressió. Pel que fa el grup tractat amb FDP o inhibidor de les caspases (grups CI+FDP i CI+zVAD-fmk) van mostrar una disminució en la intensitat de la banda comparat amb el grup CI, però l'efecte va ser menys marcat que l'observat en el grup tractat amb teofil·lina.

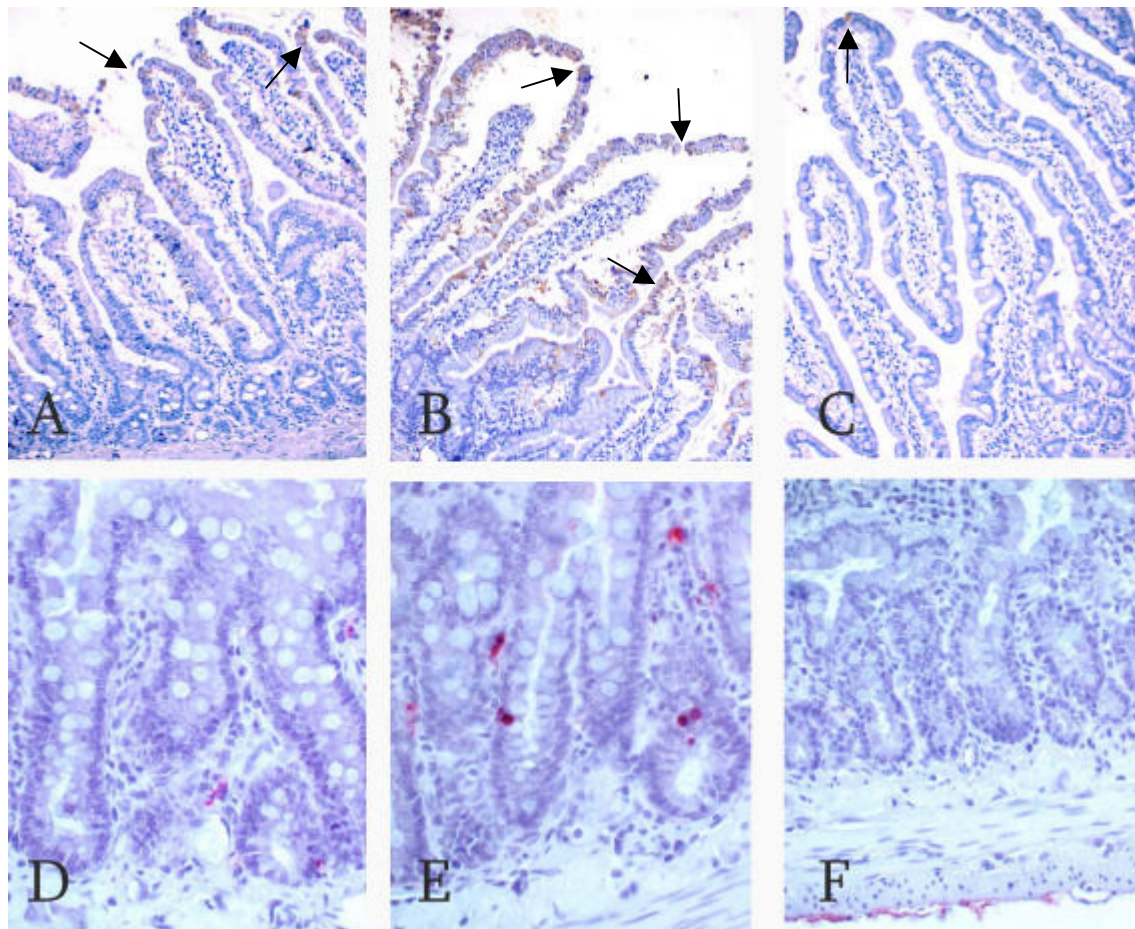
Els resultats obtinguts en els anàlisis immunohistoquímics i el marcatge amb TUNEL van avenir-se amb els altres paràmetres apoptòtics (Figura 4.2.5.). El grup control va mostrar marcatge positiu pel fragment actiu de la caspasa-3 en algunes cèl·lules de les puntes de les vellositats i en algunes cèl·lules aïllades de la làmina pròpia, les quals van incrementar en nombre després de les 6 h de preservació. Comparant la quantitat d'immunoreactivitat dels diferents grups amb el grup CI, vam poder observar que el grup tractat amb FDP va mostrar una tendència a disminuir (Fig. 4.2.5.A.), disminució que va ser més evident quan s'hi va afegir teofil·lina (Fig. 4.2.5.C.). L'addició d'EHNA al grup tractat amb FDP (CI+FDP+EHNA) va incrementar novament la immunoreactivitat de les mostres (Fig. 4.2.5.B.). L'estudi de marcatge per TUNEL es va centrar en analitzar la presència de marcatge positiu a les criptes intestinals. El nombre de cèl·lules TUNEL-positives es va calcular en 50 criptes per mostra (Taula 4.2.1.). La tendència general va ser la mateixa que la observada en la resta de paràmetres (Fig. 4.2.5.D/E/F.).



**Figura 4.2.3. Activitat de caspasa-3 (pmols AMC/mg prot/min) en la mucosa del jejú després de 6 h d'isquèmia freda.** C, control; CI, isquèmia freda; FDP, fructosa-1, 6-difosfat; EHNA, eritro-9-(2-hidroxi-3-nonil)adenina; T, teofil·lina; zVAD-fmk, z-Val-Ala-Asp(OMe)-fluorometilcetona. Els valors s'expressen com la mitjana  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  vs. C; + $p < 0.05$  vs. CI.



**Figura 4.2.4. Expressió de caspasa-3 trencada en la mucosa del jejú al cap de 6 h d'isquèmia freda.** El gràfic addicional compara la intensitat neta en l'anàlisi del Western blot dels diferents grups respecte el control. La membrana es va rentar i s'hi va determinar la b-actina com a control de càrrega. (Dades representatives de quatre experiments). C, control; CI, isquèmia freda; FDP, fructosa-1, 6-difosfat; EHNA, eritro-9-(2-hidroxi-3-nonil)adenina; T, teofil·lina; zVAD-fmk, z-Val-Ala-Asp(OMe)-fluorometilcetona. Els valors s'expressen com la mitjana ± SEM. \* $p < 0.05$  vs. C; + $p < 0.05$  vs. CI.



**Figura 4.2.5. Estudi de l'apoptosi en les criptes i vellositats jejunals al final de les 6 h de preservació en seccions de parafina.** S'observen 3 seccions representatives marcades amb la caspasa-3 per immunohistoquímica i l'ADN fragmentat per la tècnica de TUNEL. A, B, C: el marcatge marró mostra l'expressió de caspasa-3 activa en l'epiteli intestinal del grup CI+FDP (A) amb algunes cèl·lules positives a les puntes de les vellositats (fletxes); el grup CI+FDP+EHNA (B) on s'observa gran quantitat de marcatge positiu al llarg de les vellositats (fletxes); i el grup CI+FDP+T (C) on només alguna cèl·lula puntual presenta marcatge positiu a la punta de la vellositat (fletxa). D, E, F: el marcatge vermell representa les cèl·lules positives a TUNEL en les criptes intestinals de tres grups representatius, (D) presenta poques cèl·lules positives en els criptes del grup CI+FDP; (E) presenta gran nombre de cèl·lules positives en el grup CI+FDP+EHNA, mentre que en el grup CI+FDP+T no se'n observa cap de positiva (F) (Augments A, B, C: x200; D, E, F: x400).

**Taula 4.2.1. Estudi de l'apoptosi en les criptes jejunals a les 6 h d'isquèmia mitjançant la tècnica de TUNEL.**

GRUP	NÚM. DE CÈL·LULES TUNEL-POSITIVES / 50 CRIPTES
C	3.67 ± 2.68
CI	23.33 ± 4.32*
CI+FDP	10.00 ± 0.71**
CI+FDP+ T	0.67 ± 0.82 <sup>+</sup>
CI+FDP+ EHNA	48.33 ± 8.90**
CI+zVADfmk	6.00 ± 1.41 <sup>+</sup>

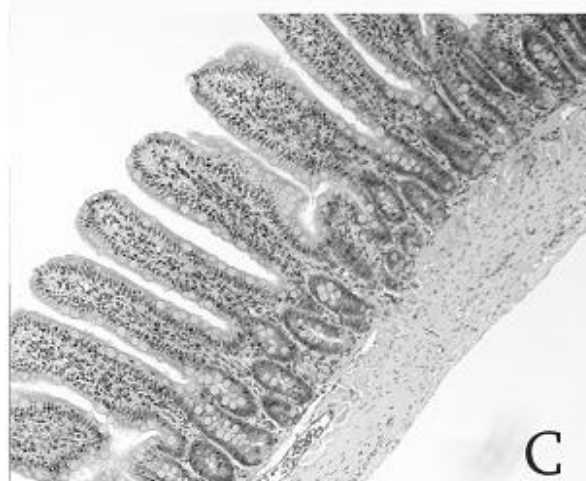
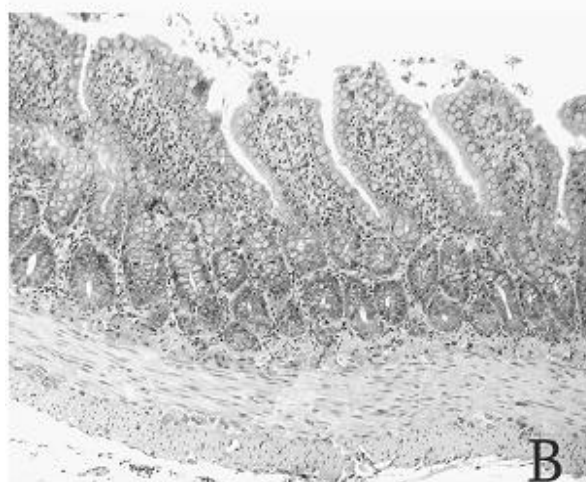
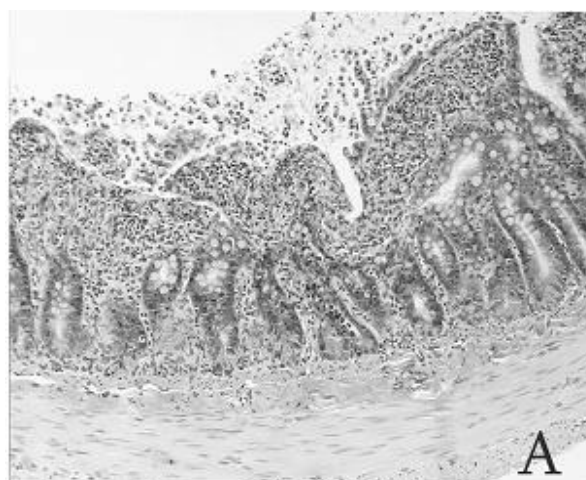
\*p<0.05 vs. C. ; <sup>+</sup>p<0.05 vs. CI. Els valors s'expressen com la mitjana ± SEM.

### 4.2.3. Avaluació histològica al trasplantament

La taula 4.2.2. i la Figura 4.2.6. mostren el grau de dany histològic avaluat segons la classificació de Park al cap de 6 h de CI i 3 h de reperfusió. L'arquitectura de les vellositats era normal en el grup control (*sham*), corresponent a un grau de lesió 0. El grau més alt de dany histològic es va trobar en el grup de trasplantament (Trp) i en el grup Trp+FDP+EHNA, els quals van presentar un desprendiment massiu de les vellositats amb exposició de la làmina pròpia, corresponent a un grau de lesió d'entre 3 i 4 (Fig. 4.2.6.A.). Quan es van afegir FDP o zVAD-fmk al grup de trasplantament (grups Trp+FDP i Trp+zVAD-fmk), el grau de lesió va disminuir de forma significativa, presentant una millora en la preservació de l'arquitectura de les vellositats comparat amb el grup Trp (Fig. 4.2.6.B.). El grup Trp+FDP+T va ser molt semblant al grup control: no va presentar lesió histològica (grau 0-1) i l'epiteli es va mantenir quasi normal (Fig. 4.2.6.C.).

**Figura 4.2.6. Seccions histològiques de l'intestí prim després del trasplantament.**

(A) Despreniment de la vellositat (classificació de Park 3-4) representativa dels grups Trp i Trp+FDP+EHNA. (B) Espai de Gruenhagen extès al llarg de la meitat de la vellositat (Park 1-2) representativa dels grups Trp+FDP i Trp+zVAD-fmk. (C) Arquitectura i llargària de la vellositat normal, representativa del grup Trp+FDP+T (Park 0-1). H&E; augments x100.



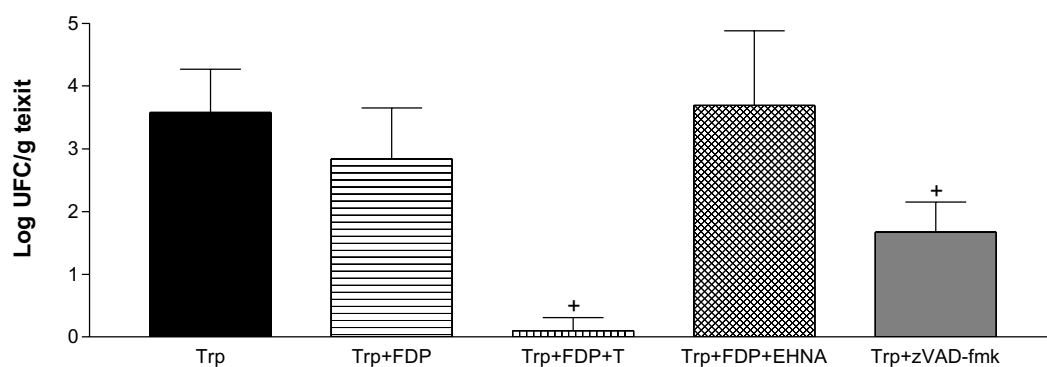
**Taula 4.2.2. Lesions histològiques observades en la mucosa intestinal després del trasplantament avaluades seguint la classificació de Park.**

GRUP	GRAU
Trp	3.50 ± 0.33
Trp+FDP	1.37 ± 0.27*
Trp+FDP+ T	0.50 ± 0.33*
Trp+FDP+ EHNA	3.62 ± 0.27
Trp+zVADfmk	1.50 ± 0.33*

\*p<0.05 vs. Trp. Els valors s'expressen com la mitjana ± SEM.

#### 4.2.4. Translocació bacteriana en el trasplantament d'intestí prim de rata

La Figura 4.2.7. mostra els valors de TB en els GLM del receptor. En el grup *sham* no es va observar TB. Per contra, el grup de trasplantament va presentar nivells alts de TB en els ganglis limfàtics. L'addició de FDP (Trp+FDP) va mostrar una tendència a la disminució en la TB, que va ser clarament significativa quan es va afegir teofil·lina i FDP (Trp+FDP+T). El tractament amb l'inhibidor de caspasa-3 (Trp+zVAD-fmk) va disminuir de forma significativa la TB comparat amb el grup Trp.



**Figura 4.2.7.** Translocació bacteriana en els ganglis limfàtics mesentèrics del receptor. Trp, trasplantament d'intestí prim; FDP, fructosa-1, 6-difosfat; EHNA, eritro-9-(2-hidroxi-3-nonil)adenina; T, teofil·lina; zVAD-fmk, z-Val-Ala-Asp(OMe)-fluorometilcetona; UFC, unitats formadores de colònies. Els valors s'expressen com la mitjana ± SEM. +p<0.05 vs. Trp.



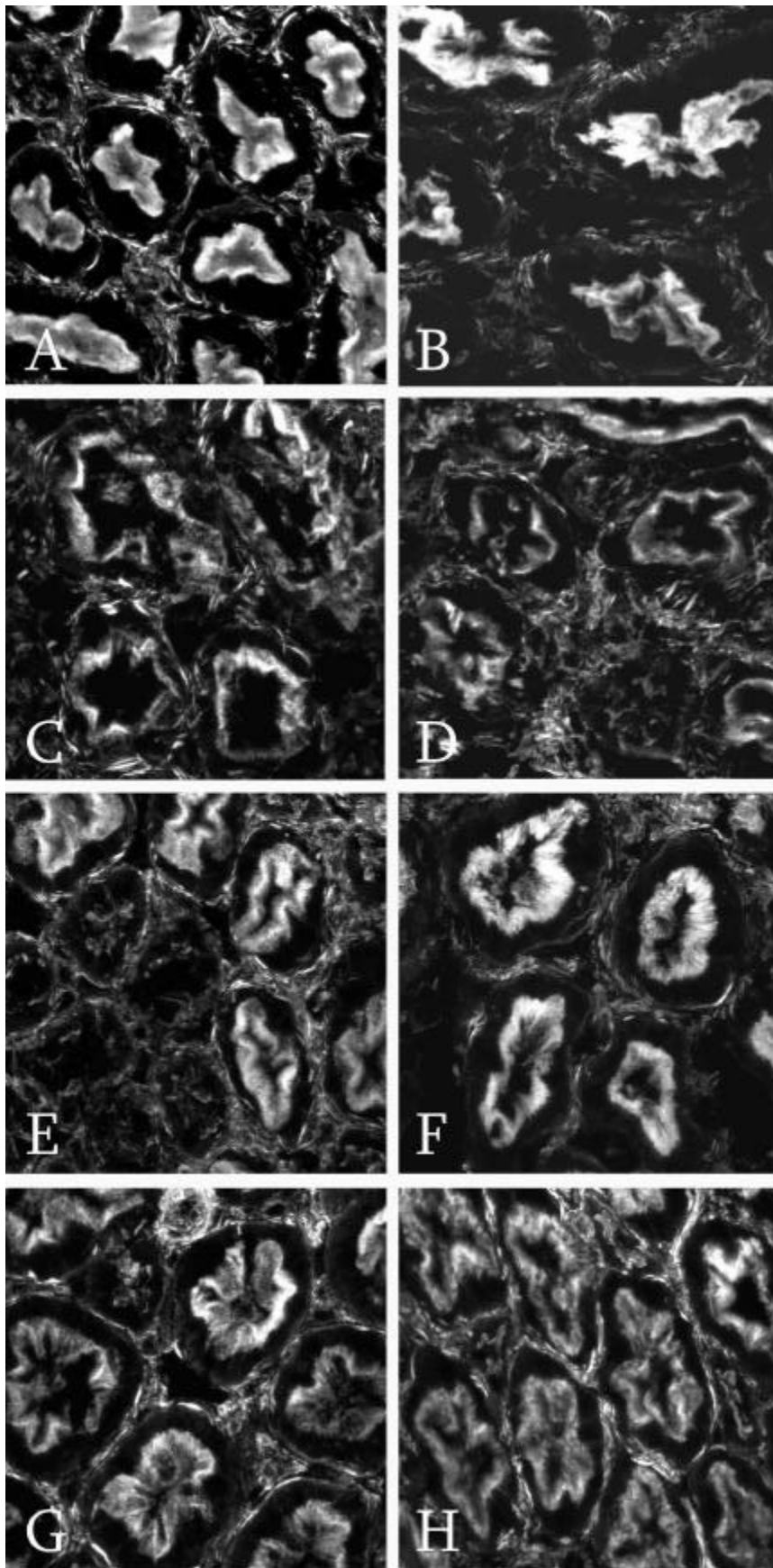
### 4.3. ESTUDI 3

Aquest estudi volia dilucidar: 1) si les alteracions en el citoesquelet d'actina durant la preservació renal induïen apoptosi en la reperfusió; 2) si en el cas dels ronyons de NHBD aquests esdeveniments es trobaven relacionats de la mateixa manera.

Amb aquest propòsit es van estudiar els següents grups: **CI**, isquèmia freda; **WI+CI**, efecte de 45 min de WI; **CI+SwinA** i **CI+LB**, efecte de l'alteració del citoesquelet d'actina a través de dos agents disruptors diferents; **CI+JP**, efecte de l'administració d'un estabilitzador de la F-actina per si sol; **WI+CI+JP** i **CI+SwinA+JP**, efecte de l'administració d'un agent estabilitzant davant d'un episodi isquèmic previ a la preservació o davant del trencament directe del citoesquelet respectivament.

#### 4.3.1. Estudi del citoesquelet d'actina al final de la preservació

La Figura 4.3.1. mostra imatges confocals de la F-actina en les cèl·lules epitelials dels túbuls proximals, mitjançant marcatge amb fal·loïdina. Tal com ha estat descrit prèviament (173), els ronyons control presentaven marcatge intens de les microvellositats així com també dels diferents feixos associats a la membrana plasmàtica basal de les cèl·lules dels túbuls proximals (Fig. 4.3.1.A.). L'efecte de la CI va ser poc marcat, observant-se només una lleugera disminució i redistribució en el marcatge de la F-actina (Fig. 4.3.1.B.). En canvi, en el grup amb WI prèvia aquestes diferències van ser molt més evidents, detectant-se una disminució significativa de la F-actina de les microvellositats i un increment en el marcatge citoplasmàtic d'aquesta (Fig. 4.3.1.C.). L'addició dels agents disruptors durant la preservació va tenir l'efecte esperat, de manera que ambdós grups (CI+SwinA i CI+LB) van presentar canvis significatius en la distribució de la F-actina (semblants als observats en el cas del grup WI+CI). Cal dir que el grup tractat amb LB però presentava un patró més heterogeni, de manera que no tots els túbuls es trobaven afectats de la mateixa manera (en alguns la F-actina es mostrava preservada mentre que en d'altres s'hi observava canvis importants) (Fig. 4.3.1.E.). En general, els grups tractats amb JP (estabilitzador) van mantenir les estructures del citoesquelet d'actina més ben preservades. El grup tractat només amb JP va ser semblant al grup CI (Fig. 4.3.1.F), mentre que l'addició de JP als grups en els que s'havia observat alteració dels microfilaments (WI+CI+JP i CI+SwinA+JP) va incrementar significativament el marcatge de F-actina en les microvellositats i el va disminuir en el citoplasma, preservant també millor la F-actina associada a la membrana plasmàtica basal, comparat amb els mateixos grups sense JP (Fig. 4.3.1.G i H).

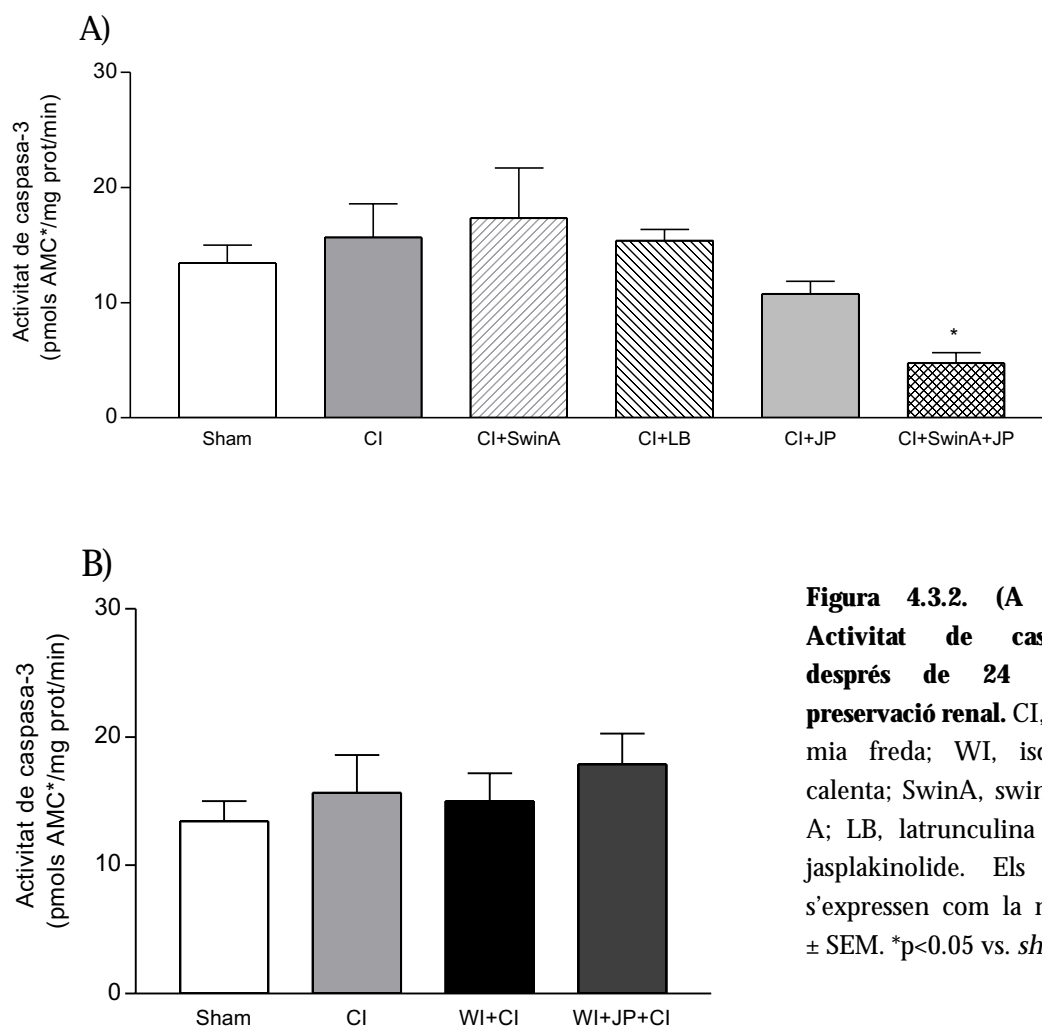


**Figura 4.3.1. Microscòpia Confocal de la F-actina en ronyons de rata preservats 24 h (marcatge amb fal·loïdina).** En rates *sham* (A) les microvellositats es mostren riques en F-actina. S'observen poques alteracions conseqüència de la CI (B), mentre que els grups tractats amb WI (C), el SwinA (D) i la LB (E) mostren modificacions en el patró de la F-actina observant-se una marcada disminució en les microvellositats apicals. L'administració de JP al grup de CI (F), al de WI (G) i al del SwinA (H), va preservar millor la F-actina, mantenint la distribució d'aquesta comparat amb els mateixos grups sense JP. Augment x100.

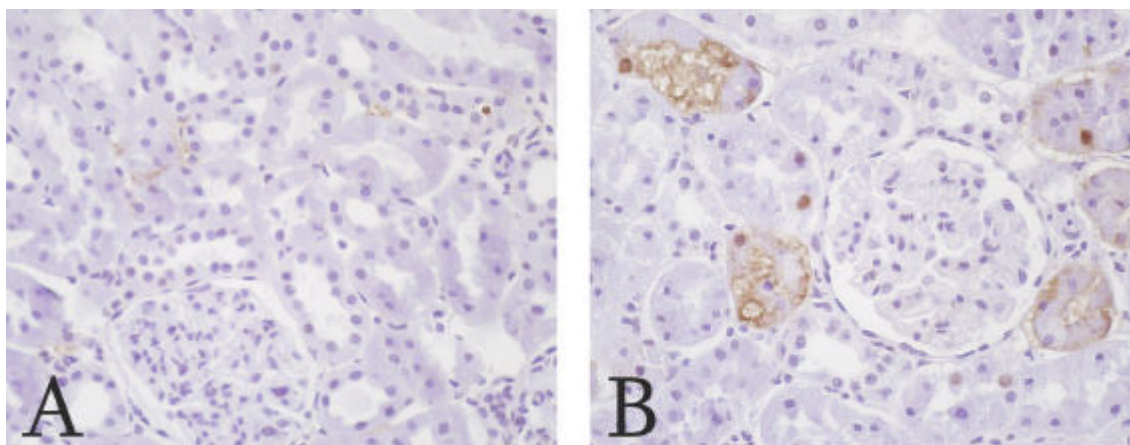
### 4.3.2. Estudi de l'apoptosi al final de la preservació

L'activitat de caspasa-3 es va determinar al final de la CI. Tal com s'observa en la Figura 4.3.2, l'activitat de caspasa-3 no va canviar després de 24 h de preservació, comparat amb els valors obtinguts en el grup *sham*. Tampoc cap dels tractaments realitzats (Fig. 4.3.2.A.), ni la WI prèvia (Fig. 4.3.2.B.), van tenir efecte en l'activitat de caspasa-3 al final de la isquèmia, excepte en el grup CI+SwinA+JP, el qual presentava una disminució significativa comparat amb el grup *sham*.

L'estudi de la fragmentació de l'ADN a través del marcatge amb TUNEL no va mostrar diferències ni degut a la CI en si (grup CI), ni a cap dels agents administrats, comparat amb el grup *sham* (Fig. 4.3.3.A.). Únicament en el cas dels grups que havien patit WI prèvia (CI+WI i CI+WI+JP), s'hi van detectar petites àrees del còrtex renal amb cèl·lules o túbuls sencers marcats positivament.



**Figura 4.3.2. (A i B). Activitat de caspasa-3 després de 24 h de preservació renal.** CI, isquèmia freda; WI, isquèmia calenta; SwinA, swinholide A; LB, latrunculina B; JP, jasplakinolide. Els valors s'expressen com la mitjana  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  vs. *sham*.

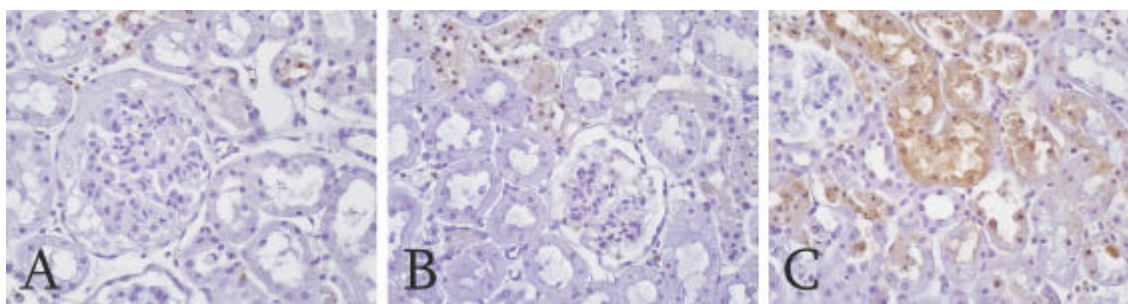
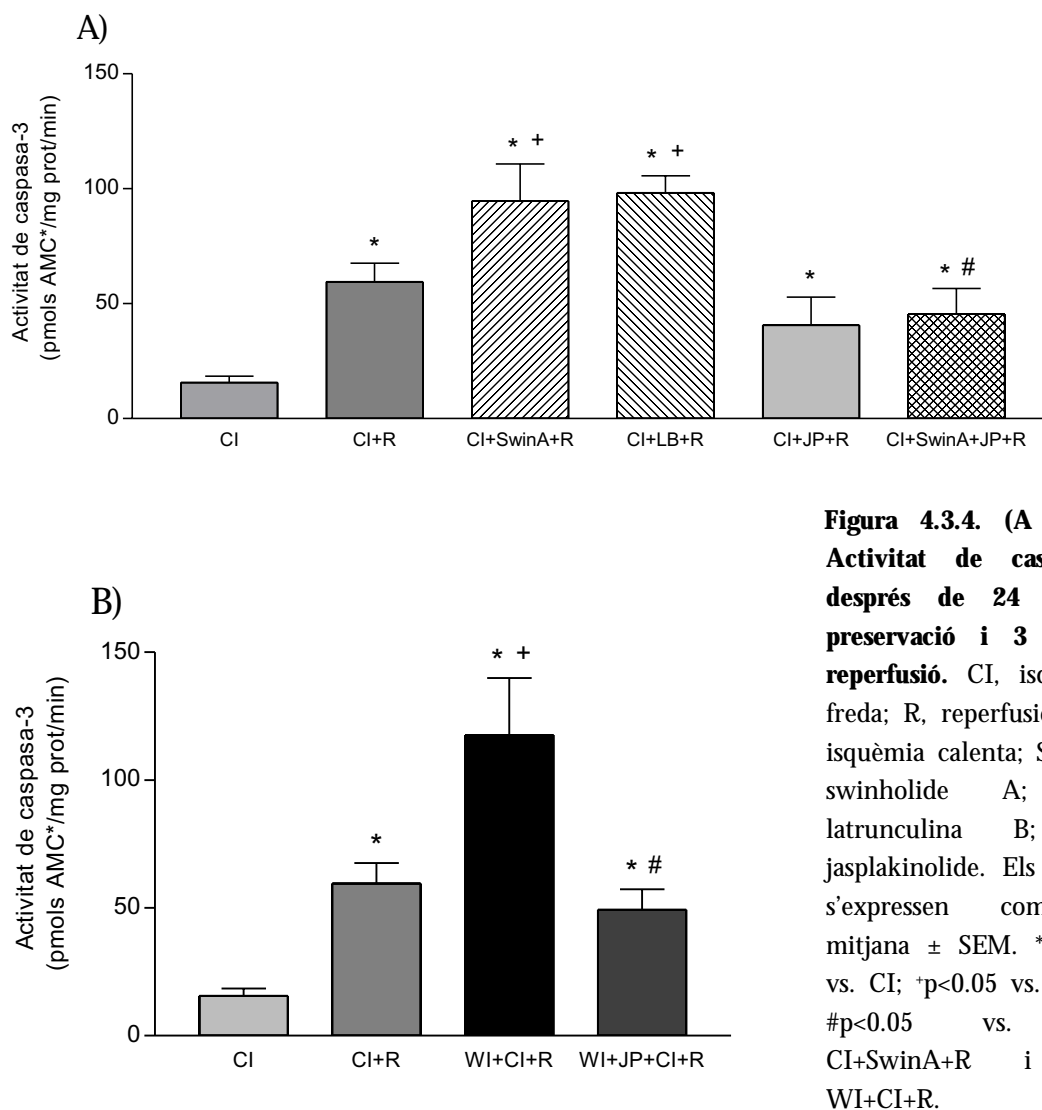


**Figura 4.3.3. Detecció de l'ADN fragmentat a través del marcatge amb TUNEL en seccions de parafina a les 24 h de preservació.** (A) S'observa només alguna cèl·lula puntual amb marcatge positiu (foto representativa de tots el grups, excepte dels grups amb WI prèvia); (B) increment en el nombre de cèl·lules positives observat en el grups WI+CI i WI+JP+CI al final de la isquèmia. Augments: x400.

### 4.3.3. Estudi de l'apoptosi a les 3 h de reperfusió

Com es pot veure en la Figura 4.3.4.A., la caspasa-3 va mostrar un increment significatiu en la seva activitat al cap de 3 h de reperfusió comparat amb el grup de CI sense reperfusió. Aquest increment va ser encara més marcat davant l'administració dels fàrmacs que trenquen la F-actina (grups CI+SwinA+R i CI+LB+R), de manera que es va assolir significància respecte el grup CI+R. Per contra, l'administració d'un estabilitzador de la F-actina, va comportar la disminució de l'activitat de caspasa-3: el grup CI+JP va mostrar una lleugera tendència a la disminució d'aquesta activitat respecte el grup CI; i el grup CI+SwinA+JP, va contrarestar l'efecte del SwinA de forma significativa. Pel que fa l'efecte de la WI sobre aquest paràmetre, tal com es pot observar en la Figura 4.3.4.B., aquest grup va mostrar un clar increment en l'activitat d'aquest enzim respecte el grup CI+R. També en aquest cas, l'administració de l'estabilitzant JP va ser capaç de revertir l'increment en l'activació de caspasa-3, mantenint els valors semblants als del grup CI+R.

Pel que fa a la detecció d'ADN fragmentat mitjançant la tècnica de TUNEL a la reperfusió, es va observar la mateixa tendència que la observada per la caspasa-3: hi va haver un clar augment en el marcatge després de la reperfusió (CI+R) (Fig. 4.3.5.A), que va ser encara més pronunciat en els grups CI+SwinA+R, CI+LB+R (Fig. 4.3.5.B) i sobretot en el grup WI+CI+R (Fig. 4.3.5.C). L'addició de JP va mostrar una tendència a disminuir el nombre de cèl·lules positives, tot i que en aquest cas, els resultats no van ser significatius.



**Figura 4.3.5. Detecció d'ADN fragmentat a través del marcatge amb TUNEL en seccions de parafina després de 24 h de preservació i 3 h de reperfusió en el model IPK.** (A) Presenta un nombre significatiu de cèl·lules positives a TUNEL, representativa del grups CI+R i CI+JP+R; (B) increment en el nombre de cèl·lules apoptòtiques comparat amb la foto prèvia, representativa del grups CI+SwinA+R, CI+LB+R i CI+SwinA+JP+R; (C) de la mateixa manera que en la foto anterior, s'observa un increment del marcatge positiu, representativa dels grups WI+CI+R i WI+JP+CI+R. Augments: x400.

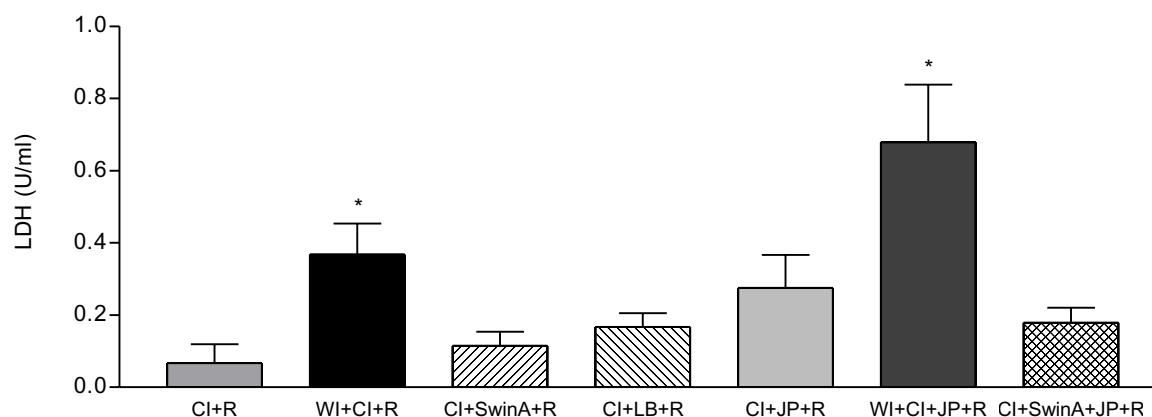
**Taula 4.3.1. Percentatge de cèl·lules apoptòtiques després de 24 h de preservació i 3 h de reperfusió amb el model d'IPK mitjançant la tècnica de TUNEL.**

GRUP	% de cèl·lules positives a TUNEL
CI+R	6.9 ± 0.93
WI+CI+R	21.6 ± 6.81*
CI+SwinA+R	14.6 ± 1.82*
CI+LB+R	17.0 ± 1.70*
CI+JP+R	10.0 ± 1.90
WI+JP+CI+R	14.8 ± 2.30*
CI+SwinA+JP+R	11.4 ± 1.25*

\*p<0.05 vs. CI+R. Els valors s'expressen com la mitjana ± SEM.

#### 4.3.4. Dany tubular en la reperfusió

Pel que fa a l'alliberació de LDH al perfusat vascular (Figura 4.4.6.), es pot observar un increment significatiu en els grups que havien patit WI prèvia (grups WI+CI+R i WI+CI+JP+R), comparat amb el grup CI+R. La resta de tractaments no va mostrar diferències significatives amb el grup CI+R, però cal destacar, que en aquest cas l'addició de JP no va tenir cap efecte positiu, sinó més aviat va mostrar una tendència a incrementar els nivells de LDH en algun dels grups administrats (grups CI+JP+R i WI+CI+JP+R).



**Figura 4.3.6. Acumulació de lactat deshidrogenasa (U/ml) en l'efluent venós a les 3 h de reperfusió en el model aïllat de ronyó (IPK).** CI, isquèmia freda; R, reperfusió; WI, isquèmia calenta; SwinA, swinholide A; LB, latrunculina B; JP, jasplakinolide. Els valors s'expressen com la mitjana ± SEM. \*p<0.05 vs. CI+R.

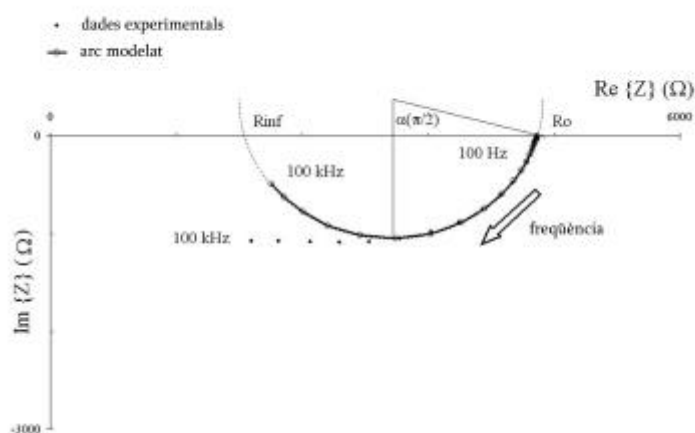
## 4.4. ESTUDI 4

En aquest estudi es va analitzar, en primer lloc, un grup amb 24 h de preservació freda (CI) i un altre grup que s'havia sotmès prèviament a 45 min de WI (WI+CI). En una segona fase es va afegir un grup tractat amb SwinA (CI+SwinA), per veure l'evolució d'un dels paràmetres obtinguts de la monitorització de la BI.

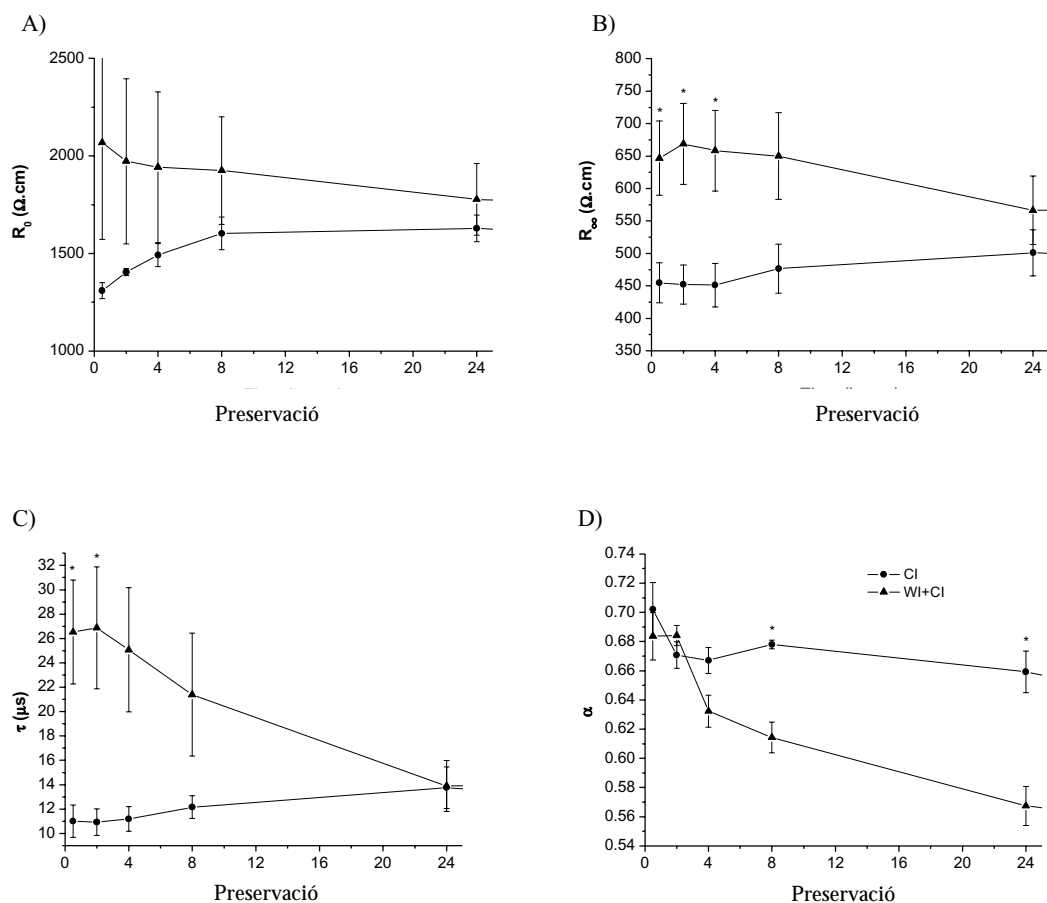
### 4.4.1. Monitorització de la bioimpedància elèctrica durant la preservació

La Figura 4.4.1. mostra un exemple de les dades obtingudes pel sistema de mesura, concretament a les 0.5 h de preservació en el grup CI. Les mesures de multifreqüència produeixen un semicercle en la representació en el pla complex (y= part imaginària, x= part real) que es compatible amb el model de Cole-Cole com s'ha explicat anteriorment (veure materials i mètodes).

La forma de l'arc i, en conseqüència, els quatre paràmetres de Cole varien amb el temps de preservació (Fig. 4.4.2.). Els dos grups van produir respostes diferents a la BI, essent les més significatives les trobades pels paràmetres  $\tau$  i  $\alpha$ . El paràmetre  $\tau$  diferencia clarament entre els grups al principi de la preservació, però tendeix a convergir conforme aquesta avança (Fig. 4.4.2.C.). Per contra, el paràmetre  $\alpha$  diferencia els grups a partir de les 6 h de preservació i continua fins a les 24 h (Fig. 4.4.2.D.). Els paràmetres  $R_0$  i  $R_\infty$  també són capaços de diferenciar entre els grups a l'inici de la preservació, però la seva desviació va ser excessivament gran (Fig. 4.4.2.A i B).



**Figura 4.4.1. Semicercle en la representació en el pla complex (y= part imaginària (Ω), x= part real (Ω)) a les 0.5 h de preservació freda en el grup CI. L'arc modelat s'ha superposat a les dades obtingudes.**



**Figura 4.4.2. Paràmetres derivats del model de Cole (A)  $R_0$  ( $\Omega \cdot \text{cm}$ ), (B)  $R_\infty$  ( $\Omega \cdot \text{cm}$ ), (C)  $\tau$  ( $\mu\text{s}$ ) i (D)  $\alpha$  (adimensional) durant diferents temps de preservació (0.5, 2, 4, 8, i 24 h). CI, isquèmia freda; WI+CI, isquèmia calenta + isquèmia freda. Els valors s'expressen com la mitjana  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  CI vs WI+CI.**

#### 4.4.2. Avaluació histològica a les 24 h de preservació

La taula 4.4.1. mostra l'avaluació histològica mitjançant la puntuació semiquantitativa donada pels diferents patrons morfològics estudiats. Tal com s'esperava, es va trobar un lleuger augment en el grau de dany dels túbuls proximals en el grup amb WI prèvia (WI+CI) comparant amb el grup CI. De totes maneres, les diferències en l'edema cel·lular, edema intersticial, pèrdua de BB i desprendiment cel·lular no van ser significatives per diferenciar entre grups.



**Taula 4.4.1. Avaluació histopatològica semiquantitativa de les cèl·lules dels túbuls proximals (valorat en una escala del 1 al 5) durant les 24 h de preservació.**

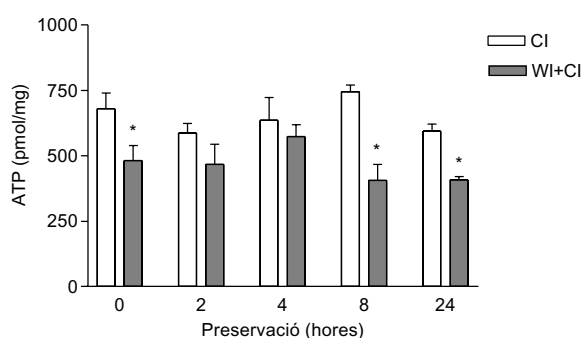
GRUP	EDEMA INTRACEL·LULAR	EDEMA INTERSTICIAL	PÈRDUA DE BB	DESPRENIMENT CEL·LULAR	PUNTUACIÓ MITJA ± SEM
CI	1.2 ± 0.5	2.0 ± 0.0	1.5 ± 0.3	1.5 ± 0.3	1.55 ± 0.19
WI+CI	1.7 ± 0.5	2.0 ± 0.2	2.0 ± 0.0	2.0 ± 0.0	1.92 ± 0.08

CI, isquèmia freda; WI+CI, isquèmia calenta + isquèmia freda.  
Els valors s'expressen com la mitjana ± SEM.

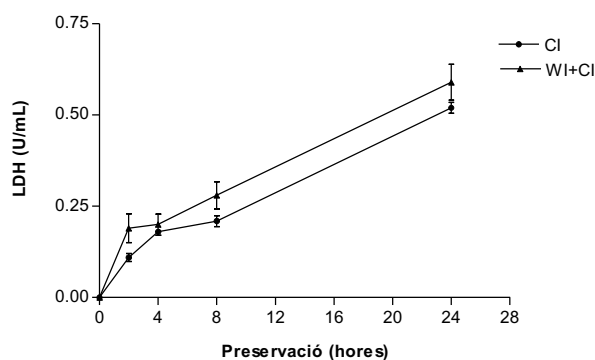
#### 4.4.3. Estudi d'altres marcadors bioquímics durant la preservació renal

La Figura 4.4.3. mostra les reserves d'ATP a diferents temps de preservació. El grup WI+CI presentava una clara disminució en els nivells d'ATP a l'inici de la preservació (conseqüència de la WI) comparat amb el grup CI. Aquestes diferències van fer-se evidents un altre cop a les 8 i 24 h de preservació.

Tal com es mostra a la Figura 4.4.3. l'acumulació de LDH en la solució de preservació, tot i que presentava una tendència a l'alça en el grup WI+CI, no va mostrar diferències significatives en el dany cel·lular mesurat a través d'aquest enzim.



**Figura 4.4.3. Nivells renals del contingut d'ATP (pmol/mg) a diferents temps de preservació (0,5, 2, 4, 8, i 24 h).** CI, isquèmia freda; WI+CI, isquèmia calenta + isquèmia freda. Els valors s'expressen com la mitjana ± SEM. \*p<0.05 WI+CI vs CI.

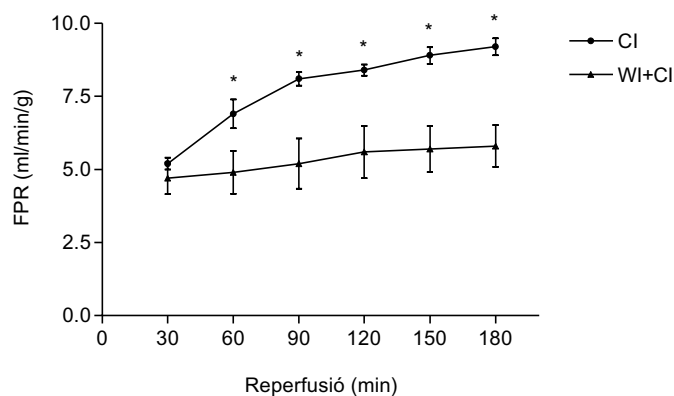


**Figura 4.4.4. Acumulació de lactat deshidrogenasa (U/ml) a diferents temps de preservació (0,5, 2, 4, 8, i 24 h) en la solució de preservació.** CI, isquèmia freda; WI+CI, isquèmia calenta + isquèmia freda. Els valors s'expressen com la mitjana ± SEM.

#### 4.4.4. Paràmetres funcionals en la reperfusió

La reperfusió en el model de IPK va mostrar importants diferències entre grups en el flux de perfusió a partir dels 60 min de perfusió i fins al final de l'experiment (180 min) (Figura 4.4.5.). El grup CI presentava un increment marcat en el FPR durant la primera hora de reperfusió, després del període d'estabilització, mentre que el grup WI+CI no va mostrar cap increment en aquest valor, mantenint sempre nivells inferiors.

En la taula 4.4.2. podem observar els valor mitjos de creatinina i LDH en el perfusat venós a les 3 h de reperfusió. Ambdós determinacions van ser significativament més altes en el grup WI+CI, comparat amb el grup CI.



**Figura 4.4.5. Valors del FPR (ml/min/g) cada 30 min durant el període de reperfusió en el model aïllat de ronyó.** La pressió es va mantenir a 60 mm Hg. CI, isquèmia freda; WI+CI, isquèmia calenta + isquèmia freda. Els valors s'expressen com la mitjana  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  WI+CI vs CI.

**Taula 4.4.2. LDH i creatinina en l'efluent venós a les 3 h de reperfusió en el model aïllat de ronyó**

Grup	LDH (U/ml)	Creatinina (mg/dl)
CI	0.015 $\pm$ 0.010	0.999 $\pm$ 0.041
WI+CI	0.146 $\pm$ 0.081*	1.132 $\pm$ 0.035*

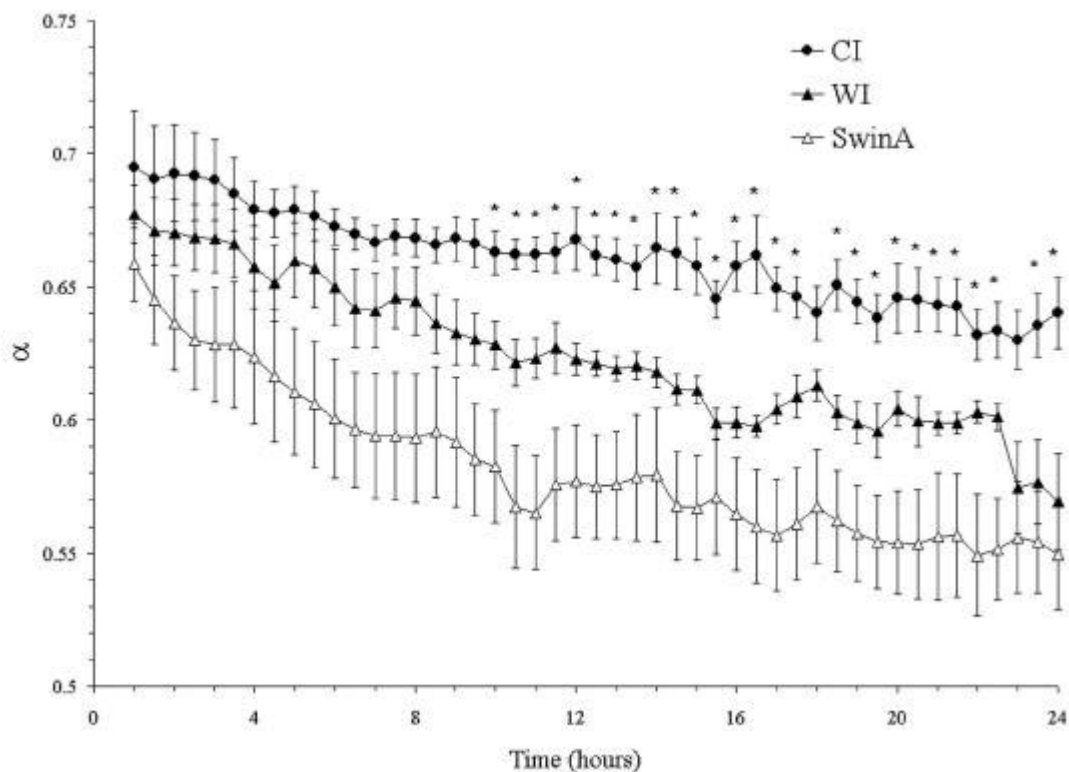
CI, isquèmia freda; WI+CI, isquèmia calenta + isquèmia freda.

Els valors s'expressen com la mitjana  $\pm$  SEM.

\* $p < 0.05$  WI+CI vs CI.

#### 4.4.5. Estudi del paràmetre $\alpha$

La Figura 4.4.6. mostra l'evolució del paràmetre  $\alpha$  durant les 24 h de preservació. En aquest experiment es va afegir un grup tractat amb SwinA per esbrinar si el paràmetre  $\alpha$  estava relacionat amb la desestructuració del citoesquelet. Inicialment els valors d' $\alpha$  eren similars en els tres grups, però amb el temps aquests divergien. El grup tractat amb SwinA mostrà la mateixa evolució que el grup WI+CI, observant-se en ambdós grups diferències significatives respecte el grup CI.



**Figura 4.4.6. Paràmetre  $\alpha$  (adimensional) derivat del model de Cole durant 24 h de preservació.** CI, isquèmia freda; WI, isquèmia calenta; SwinA, Swinholide A. Els valors s'expressen com la mitjana  $\pm$  SEM. \*p<0.05 CI vs WI+CI i SwinA.



## **5. DISCUSSIÓ**



L'estudi dels mediadors que desencadenen l'activació de l'apoptosi en el dany per I/R obre les portes a noves vies terapèutiques d'actuació, ja que es pot aplicar a la millora de la viabilitat dels òrgans durant els procediments de preservació abans de ser trasplantats. Minimitzar o contrarestar la mort cel·lular durant la preservació, mitjançant substàncies que s'addicionen a aquesta solució, és un mètode senzill i viable, fet que és important alhora de traduir l'aplicabilitat de les investigacions a la pràctica clínica.

En els nostres estudis hem volgut aproximar-nos al màxim a les condicions clíniques, tant en el procés d'extracció dels òrgans com durant la preservació. La solució de preservació que hem utilitzat ha sigut la de UW ja que, com hem esmentat anteriorment, és la més utilitzada (33).

### **Estudi 1: *Mediadors de l'apoptosi en la I/R intestinal***

La implicació de l'apoptosi en la I/R durant el trasplantament intestinal és un tema encara controvertit. Clàssicament s'ha considerat la necrosi com el mecanisme de mort cel·lular associat a trastorns circulatoris intestinals i de ser la responsable del trencament de la barrera intestinal causat pel síndrome d'I/R associat al trasplantament. En els últims anys però, s'han acumulat evidències que indiquen que els processos apoptòtics també hi tenen un paper destacat, participant de l'increment de la lesió per I/R (67) i fins i tot, en alguns casos, s'ha observat més apoptosi que necrosi (93). Entre aquests estudis cal destacar el realitzat per Shah i col. (67), els quals per primer cop van parlar de la implicació de l'apoptosi com a mecanisme de mort cel·lular de la mucosa en un isoempelt intestinal *in vivo*. Estudis previs durant la isquèmia intestinal, han demostrat que la inducció de l'apoptosi té lloc ja durant la fase isquèmica però continua en les primeres fases de la reperfusió (93, 94).

Durant la isquèmia, el consum cel·lular d'ATP condueix a l'acumulació dels seus productes de degradació, com són l'adenosina i la xantina. En aquest primer estudi es va voler determinar si aquestes dues substàncies tenien algun efecte sobre el desenvolupament de l'apoptosi, ja que segons estudis preliminars realitzats en el laboratori, són substàncies que varien amb el temps d'isquèmia de forma paral·lela al desenvolupament de l'apoptosi. Aquests estudis van portar a seleccionar les 3 h de CI, punt en el que els nivells d'ambdós substàncies es veien alterats, i en el que s'observaven ja alteracions en l'apoptosi i la necrosi. El temps de reperfusió es va seleccionar a 1 hora per diverses raons: 1) segons un estudi previ en el que havien observat que el percentatge de fragmentació de l'ADN era màxim a aquest temps (94); i 2) tenint en compte les limitacions del model.

L'acumulació d'adenosina i dels seus nivells extracel·lulars, en general, es considera protector pel teixit isquèmic (108-114). No obstant, existeixen estudis que han relacionat l'adenosina amb la inducció d'apoptosi, tant a través dels seus receptors com de forma independent (106, 117). En aquest estudi, el fet que l'administració d'adenosina indueixi un increment de la fragmentació de l'ADN, així com de l'activitat de la caspasa-3, apunta a un paper de l'adenosina com a inductor de l'apoptosi. A més a més, l'administració d'un antagonista dels receptors d'adenosina – la teofil·lina – prèvia a la I/R, va resultar en una disminució en el grau d'ADN fragmentat i de morfologies apoptòtiques, fet que indica la implicació dels receptors d'adenosina en el paper proapoptòtic d'aquesta.

No es pot descartar un efecte directe de la teofil·lina prevenint l'apoptosi. No obstant, els estudis que relacionen la teofil·lina amb l'apoptosi, només reporten un paper proapoptòtic d'aquest fàrmac: s'ha descrit l'activació d'apoptosi a través de la teofil·lina en cèl·lules limfocitàries amb leucèmia crònica (164), així com en neutròfils i eosinòfils (174). Per altra banda però, la teofil·lina pot inhibir les fosfodiesterases de forma no selectiva (però també dèbil, amb poca afinitat) (174), conduint a un increment en l'AMPc. Aquest AMPc s'ha descrit efectiu en la disminució del desenvolupament d'apoptosi en fetges preservats, quan s'ha administrat en forma de dibutiril-AMPc (175) o en la millora de la recuperació postisquèmica d'intestins preservats hipotèrmicament (176). Tot i això, existeixen altres articles on relacionen tant la inhibició de les fosfodiesterases (174) com la inducció de l'AMPc (106) amb la inducció d'apoptosi.

L'adenosina pot promoure tant la protecció cel·lular com la inducció de l'apoptosi, a través de l'activació dels diferents tipus de receptors en diferents teixits, però existeixen poques dades del paper d'aquests receptors en el teixit intestinal. Els receptors que han estat implicats en l'apoptosi mediada per adenosina en cèl·lules de la musculatura llisa arterial, cèl·lules gials i cèl·lules mesangials del glomèrul són els  $A_{2b}$  i  $A_3$  (177). En altres òrgans s'ha observat que l'activació d'uns ( $A_1$  i  $A_{2a}$ ) i la inhibició d'altres ( $A_3$ ) protegeixen davant la I/R (178, 179). L'acció específica de l'adenosina i dels seus receptors en l'activació dels diferents membres de la família de les caspases segueix essent desconeguda i constitueix un camp interessant pel desenvolupament de nous estudis.

L'NO es una molècula molt important degut al seu gran ventall d'accions, entre les quals en els últims anys, s'hi ha afegit la modulació de l'apoptosi. L'NO pot promoure o inhibir l'apoptosi dependent del tipus cel·lular, de les condicions metabòliques o experimentals coexistents i de la seva concentració (134). En general, l'NO té un efecte inhibidor davant l'apoptosi a través de la inhibició de les caspases per S-nitrosilació, inhibint l'apoptosi induïda per Fas o incrementant proteïnes



antiapoptòtiques com Bcl-2 (120). Diversos estudis suggereixen que l'NO pot ser una molècula protectora important davant de la I/R intestinal (112, 180). Altres estudis però, suggereixen que l'NO pot participar en la lesió de la mucosa intestinal després d'un insult per I/R (181). Aquest estudi evidencia que la generació d'NO incrementa quan l'adenosina s'addiciona a la solució de preservació, però disminueix quan els receptors d'adenosina es bloquegen amb teofil·lina (fins i tot davant de la presència exògena de xantina la qual mostrava una clara tendència a incrementar l'NO). Aquestes dades suggereixen que l'adenosina està relacionada amb la producció d'NO durant la I/R, d'acord amb estudis previs que descrivien que l'adenosina induïa generació d'NO durant la isquèmia en altres òrgans com el fetge (109). Les dades del primer estudi també suggereixen un efecte directe del NO en l'activació de l'apoptosi durant la I/R en l'intestí prim de rata. L'administració d'adenosina condueix a un increment en la generació d'NO que va ser concomitant a l'increment en l'activitat de la caspasa-3 i de la fragmentació d'ADN. Aquest resultat, juntament amb l'efecte de l'administració d'un donant d'NO (NONOs) en els diversos grups (com per exemple el que té quan es dona juntament amb el bloquejant dels receptors d'adenosina, resultant en un increment en la fragmentació de l'ADN i de l'activitat de caspasa-3) indica un paper de l'NO com a inductor de l'apoptosi. Aquest fet, contrasta amb la inhibició de l'apoptosi per part de l'NO trobada en les cèl·lules de la mucosa gàstrica de rata (182), però s'adiu amb altres estudis previs en els quals l'NO sembla ser imprescindible per l'activació de l'apoptosi (180, 183) i no exclou la possibilitat que l'NO pogués protegir el teixit per altres vies (180, 184). De fet, tal com es mostra en la Taula 4.1.1., l'NO no va induir dany en el teixit intestinal d'acord amb la classificació de Park. Aquest resultat està d'acord amb un estudi concomitant en trasplantament experimental de rata, en el que per una banda s'observa la inducció per part de l'NO dels fenòmens apoptòtics, però per l'altre, s'observa una protecció davant el dany histològic i la TB; protecció que en aquest cas preval sobre els efectes proapoptòtics (98).

Per la seva part, l'addició de xantina de forma exògena incrementa l'activitat de la caspasa-3, la fragmentació de l'ADN i les morfologies apoptòtiques en el teixit intestinal. Els efectes protectors trobats quan la funció de l'adenosina es bloquejava (teofil·lina) van ser considerablement revertits amb l'addició de xantina. A més a més, l'administració de NONOs al grup de xantina va induir el mateix efecte en els paràmetres apoptòtics que el de l'administració de teofil·lina; aquest resultat indica un efecte de la xantina sobre l'apoptosi independent de l'NO. Existeixen nombrosos estudis que vinculen la producció de ROS a la patofisiologia del dany tissular associat a la I/R. Una de les principals fonts de ROS és la XO (185). Els resultats del primer estudi suggereixen un paper de les ROS en el desenvolupament de l'apoptosi durant la I/R intestinal, ja que l'addició de xantina exògena com a substrat per la XO

produeix apoptosi, fins i tot, quan es bloquegen els receptors d'adenosina. Altres estudis han corroborat posteriorment la implicació de les ROS en el desenvolupament d'apoptosi en altres models (119-121), però fins aquest moment cap estudi havia determinat si el sistema XO podia influir en el desenvolupament de l'apoptosi durant la I/R intestinal.

### ***Estudi 2: Efecte de la minimització de l'apoptosi durant la preservació intestinal: paper de la FDP***

Seguint amb els estudis de preservació intestinal es va plantejar com a objectiu la millora de la solució de preservació en el seu ús a temps més llargs, a través de minimitzar el desenvolupament d'apoptosi, per tal de mantenir la barrera intestinal més íntegra. La TB s'associa tant a la necrosi com a l'apoptosi; aquesta última pot causar un increment en la permeabilitat de l'epiteli intestinal, resultant en una àrea descoberta on les toxines bacterianes o els bacteris poden unir-se i travessar l'epiteli, provocant endotoxèmia i síndrome de resposta inflamatòria sistèmica (186). Estudis recents en models d'endotoxèmia, de xoc hemorràgic o d'enterocolitis necrotitzant, han descrit la implicació de l'apoptosi via caspasa-3 en la TB (98). De la mateixa manera, un estudi del nostre grup suggereix que l'apoptosi té un paper més destacat en prevenir la TB que no pas la necrosi, tot i que òbviament, també hi està implicada (98).

La FDP confereix citoprotecció als teixits millorant les condicions isquèmiques a través de diferents vies, les quals inclouen la prevenció de la depleció d'ATP, la inhibició de la producció de ROS a través dels neutròfils, la prevenció de l'activació plaquetària, l'estimulació de la NOS, la quelació del calci extracel·lular i l'estabilització de les membranes plasmàtiques (123, 131). Totes aquestes vies poden estar implicades en la modulació de l'apoptosi, com és el cas de la producció de ROS i d'NO. També s'ha descrit que les cetoheptoses en general poden tenir un efecte citoprotector mitjançant la inhibició dels primers senyals de mort cel·lular (124). A més a més recentment, s'ha reportat que l'administració de FDP durant 10 dies abans i després del trasplantament disminueix l'apoptosi i incrementa l'índex de proliferació de la mucosa cel·lular (125). La nostra hipòtesi era que l'addició de FDP a la solució de preservació podia tenir un efecte en el desenvolupament de l'apoptosi, i s'observà que els intestins preservats amb aquesta solució (FDP-UW) mostraven una disminució en l'activació de l'apoptosi després de 6 h de preservació. Per tant, el nostre estudi amplia els efectes protectors de la FDP en la mediació dels esdeveniments apoptòtics durant la preservació de l'intestí prim.

La principal acció postulada com a protectora de la FDP és metabòlica. Durant la privació d'oxigen, la FDP millora el balanç entre consum i demanda d'ATP (127). Atès que l'efecte més extensament reportat en aquest sentit és l'habilitat de la FDP en incrementar la producció d'energia glucolítica, vam voler esbrinar si l'efecte en l'apoptosi es devia a un increment en les reserves d'ATP. Els resultats d'estudis previs en aquest sentit són controvertits. Alguns han trobat un increment en les reserves d'ATP (127, 128) però d'altres no troben cap canvi significatiu després del tractament amb FDP (130). En els nostre cas, no vam trobar diferències significatives en els nivells d'ATP quan la FDP es va afegir a la solució de preservació. Una possible explicació per aquesta manca d'efecte és la necessitat d'un període de reperfusió per veure si existeixen efectes en la recuperació del teixit i les seves reserves energètiques. En aquest sentit, alguns estudis només troben increment en el total d'ATP quan aquests nivells s'avaluen després d'un període de reperfusió (187) o quan l'oxigen és disponible (128).

Altres estudis indiquen que el pretractament amb FDP en la I/R és capaç de modificar les reserves de nucleòsids, conduint a un increment en els nivells d'adenosina durant la isquèmia (131). Els resultats obtinguts en aquest estudi indiquen que el tractament amb FDP manté els nivells d'adenosina durant 6 h de preservació (mantenint-los a nivells semblants als del control). Aquesta acumulació d'adenosina en principi no podia ser la responsable de l'efecte antiapoptòtic, ja que en el primer estudi s'havia determinat que l'adenosina promovia l'apoptosi durant la CI intestinal. El fet que la inducció endògena d'adenosina (a través de l'EHNA) tingués un paper proapoptòtic, juntament amb que el bloqueig dels receptors d'adenosina a través de la teofil·lina disminuís clarament l'apoptosi, indica que el paper antiapoptòtic de la FDP no està mediat per l'adenosina i confirma el paper proapoptòtic de l'adenosina a temps més llargs de preservació.

El mecanisme pel qual la FDP modula l'apoptosi continua essent una incògnita. Una possible explicació podria ser la seva interacció amb les membranes cel·lulars, estimulant la lipòlisi (188). D'entre els productes d'aquesta lipòlisi, el diacilglicerol i l'inositol trifosfat influencien la proliferació i l'apoptosi (189, 190). A través de l'activació de la fosfolipasa C, el diacilglicerol i l'inositol trifosfat estan involucrats en la fosforilació i la subseqüent activació del Bcl-2 (191), el qual protegeix davant de l'apoptosi. També s'ha descrit que les cetohexoses com la FDP protegeixen els hepatòcits de la necrosi i l'apoptosi a través d'un mecanisme que no està relacionat ni amb la quelació del ferro ni amb el metabolisme glucolític, suggerint que els primers senyals de mort cel·lular poden ser inhibits per aquestes substàncies (124).

La translocació bacteriana és una de les principals conseqüències no desitjades del trasplantament intestinal, per tant, mètodes efectius en la prevenció d'aquesta, així

com el coneixement dels mediadors i els mecanismes implicats, són vitals per aconseguir èxit en el trasplantament intestinal. En el segon estudi de la present tesi, s'indica que l'addició durant la preservació de FDP juntament amb teofil·lina manté la TB a nivells semblants als del control després del trasplantament. Tot i que el mecanisme exacte encara no es coneix, el fet que el comportament de l'apoptosi durant la preservació estigui relacionat amb la subseqüent TB, així com amb el dany histològic després del trasplantament, indica la rellevància dels esdeveniments apoptòtics durant la preservació en l'èxit de l'empelt intestinal. La implicació de l'apoptosi prevenint la TB i mantenint la integritat de la mucosa es confirma amb el grup utilitzat com a control negatiu (Trp+zVAD-fmk), en el que es pot veure per una banda una reducció en el desenvolupament de l'apoptosi durant la preservació i, per l'altre, una disminució en la TB i en el dany histològic. Aquests resultats mostren la importància dels fenòmens apoptòtics en el trasplantament intestinal de rata i suggereixen que l'addició de determinades substàncies (com FDP i teofil·lina) poden ser un camí interessant per minimitzar els seus efectes.

### ***Estudi 3: Relació entre el citoesquelet d'actina i l'apoptosi en la I/R renal***

Ha estat reportat àmpliament que l'ús de ronyons que provenen de NHBD (on un període de WI precedeix la preservació hipotèrmica) està associat a un increment de la fallida primària i del retràs en la funció de l'empelt, comparat amb els òrgans que provenen de HBD (192, 193). A més a més, aquests òrgans presenten predisposició al rebuig agut i crònic (72). Sembla que l'apoptosi hi juga un paper destacat, ja que s'han detectat més cèl·lules tubulars apoptòtiques en les biòpsies de NHBD comparat amb les de HBD (100). A més a més, s'ha publicat un estudi recentment en el que el desenvolupament d'apoptosi en les cèl·lules tubulars renals durant la preservació freda és un factor predictiu important de la disfunció primària de l'empelt en humans (99).

Una de les principals conseqüències de la isquèmia són les alteracions del citoesquelet, les quals condueixen a canvis en la superfície de la membrana i disrupció de l'arquitectura tant cel·lular com tissular. El citoesquelet d'actina es veu greument malmès durant la isquèmia renal, resultant amb cèl·lules subletalment danyades que contribueixen a la disfunció renal (137-139). Les conseqüències d'aquestes alteracions, entre elles reabsorció i secreció tubular anormal, obstrucció tubular i retrofuga del filtrat glomerular (144), afecten directament al futur de l'empelt. A més a més, recentment s'ha establert la relació entre les modificacions en el citoesquelet d'actina i la seva capacitat per induir apoptosi en determinats tipus cel·lulars (141, 143-145).

La WI danya la cèl·lula a través de l'activació d'una complexa seqüència d'esdeveniments bioquímics entre els quals el citoesquelet d'actina juga un paper clau. En aquest sentit, ha estat reportat que la WI indueix una ràpida redistribució del citoesquelet d'actina en les cèl·lules del túbul proximal (137, 194), la severitat de la qual, depèn de la duració de la isquèmia (51). El resultat aquí presentat s'adiuen amb estudis previs (137, 195), on la WI mostra un efecte molt marcat sobre el patró de distribució de la F-actina, evidenciant sobretot, una destrucció important d'aquesta actina polimeritzada a nivell del BB. La CI *per se* va tenir un efecte molt més subtil, de manera que existeixen clares diferències a nivell de l'estat del citoesquelet d'actina entre ronyons amb WI prèvia o sense.

Els diferents fàrmacs administrats també van tenir efecte sobre la distribució de la F-actina, fet que potser era d'esperar, si no fos per la manca de literatura referent a l'administració d'aquests fàrmacs *in vivo*. Precisament, una de les dificultats més grans amb que s'ha topat aquest treball han estat les dosis dels fàrmacs. Aquestes molècules han estat utilitzades en pocs estudis i encara menys en estudis *in vivo*. L'elecció dels fàrmacs i les dosis s'ha fet en base als efectes trobats en la literatura. El SwinA és dels pocs que s'ha utilitzat *in vivo*, demostrant la seva efectivitat en incrementar la capacitat del flux de la cambra anterior ocular en micos a la dosi de 500 nM (que va ser la més efectiva) (196). Per altra banda, tant el SwinA com la LB han estat utilitzats amb èxit per mimetitzar els efectes de la depleció d'ATP en la F-actina (197). Les latrunculines són inhibidors de la polimerització d'actina més específics que les citocalasines, i el JP és un estabilitzador dels filaments d'actina més potent i penetra millor a través de la membrana cel·lular que la fal·loïdina (196). El JP és probablement l'agent més controvertit de tots aquests fàrmacs. El seu efecte depèn totalment de la dosi administrada. Bubb i col. (168) han determinat l'efecte sobre la F-actina de l'administració de diferents dosis *in vitro*. Amb la dosi més baixa (50 nM) aquest grup observa només lleugers increments en la fluorescència de determinats feixos al centre de la cèl·lula; si les dosis s'augmenten, aquesta fluorescència també s'incrementa convertint-se en agregats d'F-actina a la regió perinuclear. L'ús de dosis baixes, com en aquest treball, minimitza els efectes no desitjats assegurant però l'estabilització del filaments (198). Pel que fa l'agent estabilitzant, alguns treballs esmenten el fet que la tècnica de la fal·loïdina no és adequada quan s'administra JP, ja que ambdós substàncies competeixen pel mateix lloc d'unió a F-actina. Tot i que s'ha demostrat que el JP s'uneix de forma competitiva amb la fal·loïdina a la F-actina, no existeixen evidències directes que els dos fàrmacs competeixen pel mateix lloc d'unió (168). Els nostres resultats ens fan pensar que l'efecte del JP a una dosi tan baixa és primordialment estabilitzador, ja que en qualsevol dels grups administrats aquest fàrmac ha sigut capaç de preservar

en millors condicions el patró de distribució de la F-actina (observant-se clarament en l'associada al BB).

Les dades d'aquest estudi demostren que el desenvolupament d'apoptosi a la reperfusió és, com a mínim en part, dependent de les alteracions en el citoesquelet d'actina. El trencament directe del citoesquelet, a través de l'administració d'agents disruptors a l'inici de la preservació, activa l'apoptosi a la reperfusió. S'ha trobat un increment de la forma activa de la caspasa-3 després de l'administració de SwinA i LB, així com un increment de la fragmentació de l'ADN en la reperfusió, que no s'observa durant el període de CI. El fet que l'administració de JP junt amb SwinA sigui capaç de retornar els nivells de caspasa-3 trencada als trobats en el grup CI+R, indica que el trencament del citoesquelet d'actina participa en l'activació d'aquest enzim.

Per altra banda la WI, que mimetitzava la situació clínica dels NHBD, també induïx un notable increment en l'apoptosi a les 3 h de reperfusió. En aquest cas, durant la isquèmia, tot i que tampoc s'observa activació de la caspasa-3, sí que es detecta marcatge amb TUNEL a nivell d'alguns túbuls del còrtex renal. Alguns d'aquests túbuls presenten marcatge uniforme, i no es descarta que es tracti de la inespecificitat de la tècnica davant de necrosi tubular. De fet, a la posterior reperfusió, els grups que han patit WI són els únics que mostren un increment significatiu en el dany tubular mesurat per l'alliberació de LDH al perfusat; indicant per tant, que existeix mort cel·lular tant per necrosi com per apoptosi com a conseqüència de la WI prèvia. Sigui com sigui, en la reperfusió la caspasa-3 s'activa de forma molt marcada en comparació als ronyons que no han patit isquèmia i aquests valors tornen a revertir-se davant l'administració del JP com a estabilitzant. Aquesta troballa suggereix, que també en aquest cas, les modificacions en el citoesquelet d'actina conseqüència de la WI són capaces d'induir l'apoptosi a les 3 h de reperfusió via caspasa-3.

Diversos grups han proposat que el factor clau en la regulació de l'apoptosi a través del citoesquelet d'actina és més aviat la seva redistribució (la taxa de polimerització i despolimerització), que no pas el seu trencament. En aquest sentit, s'ha observat que alteracions en la distribució de la F i la G-actina afecten tant la fase d'execució com les primeres vies de senyalització que condueixen a l'apoptosi en limfòcits (199). Exactament com el dany en el citoesquelet d'actina està implicat en l'activació de l'apoptosi encara no es coneix. Haldar i col. (142) van demostrar que els fàrmacs que alteren la integritat del citoesquelet causen apoptosi a través de la inactivació del Bcl-2, mentre que d'altres grups han demostrat la implicació de proteïnes de la família Rho en la modulació d'aquesta apoptosi (200, 201). Calen més estudis per tal d'identificar totes les molècules implicades i determinar-ne el mecanisme exacte. En

aquest sentit, amb aquest treball es pot dir que existeix un increment de l'apoptosi després de la reperfusió conseqüència de les modificacions en el citoesquelet d'actina durant la preservació i, que la caspasa-3, s'hi troba directament implicada.

Aquest estudi ofereix noves dades sobre l'efecte de les alteracions del citoesquelet d'actina durant la preservació en el posterior desenvolupament d'apoptosi a la reperfusió. Concretament, s'ha vist que les modificacions en el citoesquelet d'actina durant la preservació renal indueixen apoptosi durant les primeres hores de reperfusió. Aquest mecanisme es troba implicat en el desenvolupament d'apoptosi dels ronyons que provenen de NHBD. A més a més, actuant sobre aquest citoesquelet podem prevenir o minimitzar el desenvolupament d'apoptosi en la reperfusió. Aquests resultats, suggereixen un nou punt d'intervenció per tal de minimitzar el desenvolupament d'apoptosi en el trasplantament renal.

#### **Estudi 4: Monitorització de la BI durant la preservació renal**

Com hem vist prèviament, el procés isquèmic que ha patit un òrgan pot tenir un efecte dramàtic en la reperfusió (o al trasplantament en la pràctica clínica). No obstant, aquestes diferències entre òrgans no sempre es poden detectar durant la preservació. De fet, en el quart estudi de la present tesi s'ha pogut observar que l'avaluació histològica entre aquests grups (CI i WI+CI) revela lleugeres diferències pel que fa l'edema intersticial i el dany de les cèl·lules dels túbuls proximals al final de la preservació, però aquestes diferències no eren suficientment clares per discriminar entre grups. Aquestes diferències però, es reflecteixen en la funció renal a les 3 h de reperfusió mitjançant el model d'IPK. El ronyons del grup WI+CI presenten pitjor funció renal, avaluada a través de FPR i creatinina, i també presenten més dany tubular, mesurat a través de l'alliberació de LDH. Així doncs, tot i que no sempre són detectables, aquestes diferències existeixen, i per tal d'assegurar un resultat òptim, és important poder identificar-les de forma clara abans del trasplantament.

Tot i que s'han estudiat gran nombre de marcadors bioquímics de dany tissular, els més interessants han de ser determinats en perfusat renal. Aquest és el cas de l'enzim  $\alpha$ -GST, el qual s'apunta actualment com la mesura més prometedora. No obstant, en els centres en que actualment aquest paràmetre és un criteri de viabilitat acceptat, aquest s'acompanya d'altres criteris alhora de decidir: l'edat del donant, l'historial mèdic, l'aparença macroscòpica, el temps de WI i la perfusió *ex vivo* (24). A més a més, aquest paràmetre falla en detectar ronyons no viables en un 6-12% dels casos, i subestima ronyons viables en un 9-34% dels casos (24). Fins i tot, s'ha observat que

la concentració pretrasplantament d'aquest biomarcador no prediu la funció renal a llarg termini (31). Per tant, existeix encara una clara manca de marcadors fiables per diferenciar entre ronyons viables i no viables, fins i tot en el cas de la preservació en màquina de perfusió.

La mesura de marcadors bioquímics alternatius durant la preservació, com la LDH o el contingut d'ATP en el nostre cas, va mostrar diferències entre els grups. Les reserves d'ATP al teixit va discriminar clarament entre els grups a les 8 i a les 24 h de preservació, d'acord amb altres estudis (29). En el cas de l'acumulació de LDH en la solució de preservació, només va observar-se una tendència a valors més alts en el cas del grup WI+CI, suggerint més dany cel·lular en aquest grup, però les diferències no van ser significatives en cap del temps estudiats. De totes maneres, el problema amb aquests marcadors és que les seves determinacions no són senzilles, ni suficientment ràpides, per ser mesurades de forma prèvia al trasplantament (4).

Donat que les conseqüències de la isquèmia com l'edema cel·lular o les alteracions del citoesquelet (pèrdua de BB, formació de *blebs* apicals, despreniment cel·lular, etc.) es tradueixen en canvis en la morfologia i l'estructura cel·lular (72, 139) i, que aquests canvis poden modificar les propietats elèctriques d'aquest teixit, es va hipotetitzar que les mesures elèctriques podien ser de gran utilitat per l'avaluació dels òrgans per trasplantament. En aquest estudi s'ha comparat el comportament dels paràmetres analitzats per la BI entre dos grups experimentals que caracteritzen dos situacions clíniques diferents, i es van relacionar posteriorment amb paràmetres funcionals a la reperfusió. Alguns d'aquests paràmetres, derivats de l'anàlisi multifreqüencial, tenen el potencial d'identificar els ronyons que han patit WI prèviament en temps diferents. La principal troballa d'aquest estudi és que un d'aquests paràmetres, la constant  $\alpha$  de l'equació de Cole, és capaç de detectar aquest dany per WI quasi bé al llarg de tot el temps de preservació.

En general s'accepta que existeix una relació entre fisiologia i BI pel que fa a la isquèmia i  $R_0$ . Aquest paràmetre s'ha relacionat amb l'edema intracel·lular (172): durant la isquèmia l'edema cel·lular resultat de la inhibició del metabolisme energètic (38) estreny l'espai extracel·lular i, en conseqüència, redueix l'amplitud del pas elèctric per corrents a freqüències baixes; per tant, disminueix la conductància, incrementa la resistència i incrementa  $R_0$ . L'evolució de  $R_0$  en la Figura 4.4.4.A. mostra que en el grup CI els valors tendeixen a augmentar durant les 24 h de preservació. En canvi, el grup WI+CI, el qual comença amb uns valors en  $R_0$  més alts (degut a l'efecte de la WI prèvia), mostra tendència a disminuir amb el temps de preservació, tot i que manté sempre valors més alts que el grup CI. Una possible explicació a l'evolució del grup WI+CI és que, després de la WI hi ha un desequilibri iònic (especialment per  $\text{Na}^+$ ) entre el medi intracel·lular i extracel·lular que causa un



increment en la pressió osmòtica i l'edema cel·lular (56). Quan el ronyó es submergit en la solució de UW, la cèl·lula perd aigua com a resultat de la hiperosmolaritat de la UW i els canvis iònics en el medi extracel·lular i, en conseqüència,  $R_0$  disminueix.

El paràmetre  $\tau$  diferencia clarament entre els grups durant períodes curts de preservació. Ha estat descrit que aquest paràmetre es relaciona amb la capacítancia de la membrana cel·lular i amb les conductivitats intra i extracel·lulars. Alguns autors han conclòs que durant l'edema cel·lular la capacítancia de la membrana incrementa degut a l'increment de la superfície de la membrana (202, 203). Aquesta explicació s'adiu amb l'increment trobat en els valors de  $\tau$  en el grup WI+CI a l'inici de la preservació, indicant que hi té lloc un procés d'edema intracel·lular conseqüència de la WI.

El paràmetre  $\alpha$  mostra diferències importants entre els dos grups durant el temps de preservació i aquestes diferències són més marcades quan més temps de preservació transcorre. Ara per ara, no es coneix el significat físic de l' $\alpha$  en el cas del teixits vius. En el cas d'altres materials i processos s'ha relacionat amb la rugositat de les superfícies (204), per tant podríem pensar que en el nostre cas podria ser indicatiu de la rugositat de la membrana cel·lular (un increment en la rugositat implicaria la disminució d' $\alpha$ ) o de la tortuositat dels espais extracel·lulars. Se sap que el citoesquelet de les cèl·lules manté la morfologia de la cèl·lula i de les membranes (205) i s'ha observat, per altres grups i pels resultats aquí presentats, que aquest citoesquelet es pot veure greument modificat durant la isquèmia (137, 194). Amb l'objectiu de saber si les alteracions en el citoesquelet es traduïen en canvis que podien ser detectats pel paràmetre  $\alpha$  es va administrar un dels agents disruptors del citoesquelet d'actina (SwinA) i es va estudiar l'evolució d'aquest paràmetre. El patró de l'evolució d'aquest paràmetre en el grup WI+CI (representant la situació clínica) va ser reproduït mitjançant el trencament directe del citoesquelet d'actina a través de l'administració de SwinA durant la preservació. Aquest fet indica la relació entre les mesures d' $\alpha$  i les modificacions en el citoesquelet d'actina.

Cal investigar més a fons la relació entre  $\alpha$  i el citoesquelet, així com corroborar els resultats en espècies més pròximes a la humana (per exemple porcina). No obstant, si el paràmetre  $\alpha$  es confirmés en altres espècies com a indicador de les alteracions en el citoesquelet, podria ser una mesura extremadament útil, no només alhora de predir la viabilitat de l'òrgan abans de ser trasplantat, sinó també en altres estats patològics en els que el citoesquelet hi té un paper clau. El fet que s'hagin relacionat els canvis en el citoesquelet d'actina com a inductors de l'apoptosi en la reperfusió, confereixen encara més rellevància a aquests resultats, de manera que el paràmetre  $\alpha$  podria ser un predictor durant la isquèmia del desenvolupament de l'apoptosi en la reperfusió.



## **6. CONCLUSIONS**



1. El desenvolupament de l'apoptosi durant la I/R en l'intestí prim de rata està modulats per l'adenosina i la xantina.
2. La inducció de l'apoptosi a través de la l'adenosina esta mediada per l'NO, en canvi la inducció per part de la xantina n'és independent.
3. La FDP disminueix el desenvolupament d'apoptosi durant la preservació d'intestí prim de rata. Aquest paper antiapoptòtic és a través de mecanismes independents de l'acumulació d'adenosina i de l'ATP.
4. L'addició de FDP i teofil·lina a la solució de preservació redueix l'apoptosi al final de la preservació i evita la translocació bacteriana al posterior trasplantament.
5. El desenvolupament de l'apoptosi a la reperfusió depèn de les modificacions en el citoesquelet d'actina durant la preservació renal.
6. Les alteracions del citoesquelet conseqüència d'un període d'isquèmia calenta en donants a cor parat (NHBD) són responsables de part de l'activació de l'apoptosi a la reperfusió.
7. Els paràmetres derivats de l'equació de Cole permeten discriminar durant la preservació entre els ronyons que han patit isquèmia calenta prèvia i els que no.
8. D'entre els paràmetres de l'equació de Cole , l'evolució del paràmetre  $\alpha$ , és una mesura senzilla, objectiva i a temps real, que està relacionada amb les alteracions del citoesquelet d'actina produïdes de forma prèvia al trasplantament.



## **7. BIBLIOGRAFIA**





1. Grant DR, Wood RFM. Small bowel transplantation. *Edward Arnold*, 1994.
2. Guyton AC, Hall JE. Tratado de fisiología médica. *McGraw-Hill-Interamericana*, 2001.
3. OCCAT. Organització Catalana de Trasplantaments. [http://www10.gencat.net/catsalut/ocatt/es/htm/don\\_tra\\_org\\_ren.htm](http://www10.gencat.net/catsalut/ocatt/es/htm/don_tra_org_ren.htm):
4. Burgos FJ, Alcaraz A, Castellón I, i col. Presente y futuro del trasplante renal. *Actas Urol Esp*, 2002. 36:731-762.
5. The Intestinal Transplant Registry. <http://www.intestinaltransplant.org/>:
6. Kong SE, Blennerhassett LR, Heel KA, i col. Ischaemia-reperfusion injury to the intestine. *Aust N Z J Surg*, 1998. 68:554-561.
7. Cohen JR, Schroeder W, Leal J, i col. Mesenteric shunting during thoracoabdominal aortic clamping to prevent disseminated intravascular coagulation in dogs. *Ann Vasc Surg*, 1988. 2:261-267.
8. Diari El País. 14 setembre 2002.
9. Martin Dunitz Ltd. Gut Ecology. *Edited By Ailsa L Hart, et al.*, 2002.
10. Wells CL. Colonization and translocation of intestinal bacterial flora. *Transplant Proc*, 1996. 28:2653-2656.
11. Berg RD. Promotion of the translocation of enteric bacteria from the gastrointestinal tracts of mice by oral treatment with penicillin, clindamycin, or metronidazole. *Infect Immun*, 1981. 33:854-861.
12. Mainous M, Xu DZ, Lu Q, i col. Oral TPN-induced bacterial translocation and impaired immune defenses are reversed by refeeding. *Surgery*, 1991. 110:277-284.
13. Deitch EA, Maejima K, Berg R. Effect of oral antibiotics and bacterial overgrowth on the translocation of the GI tract microflora in burned rats. *J Trauma*, 1985. 25:385-392.
14. De Oca J, Cuadrado S, Vallet J, i col. Protective effects of lazaroid U74389G on intestinal graft after heterotopic small bowel transplantation in rats. *J Surg Res*, 1998. 75:18-23.
15. Li YS, Li JS, Jiang JW, i col. Glycyl-glutamine-enriched long-term total parenteral nutrition attenuates bacterial translocation following small bowel transplantation in the pig. *J Surg Res*, 1999. 82:106-111.

16. Biffi R, Privitera G, Pozzi S, i col. Postoperative enteral feeding does not prevent intestinal bacterial translocation but reduces the rate of pulmonary infections in pigs undergoing total orthotopic small bowel transplantation. *Eur J Surg*, 1997. 163:703-709.
17. De Oca J, Bettonica C, Cuadrado S, i col. Effect of oral supplementation of ornithine-alpha-ketoglutarate on the intestinal barrier after orthotopic small bowel transplantation. *Transplantation*, 1997. 63:636-639.
18. Privitera G, Rossi G, Conte E, i col. Parenteral fluoroquinolones prevent translocation of enterobacteria following combined liver-small bowel transplantation in pigs. *Transplant Proc*, 1996. 28:2669-2670.
19. Gianotti L, Bergamo C, Braga M, i col. In vivo evaluation of timing degree, and distribution of bacterial translocation following experimental small bowel transplantation. *Transplantation*, 1995. 60:891-896.
20. Price BA, Cumberland NS, Clark CL, i col. The effect of rejection and graft-versus-host disease on small intestinal microflora and bacterial translocation after rat small bowel transplantation. *Transplantation*, 1993. 56:1072-1076.
21. OCCAT. Organització Catalana de Trasplantament. Informe estadístic del Trasplantament renal a Catalunya. col·lecció "Activitat Sanitària", 2002.
22. Basar H, Soran A, Shapiro R, i col. Renal transplantation in recipients over the age of 60: the impact of donor age. *Transplantation*, 1999. 67:1191-1193.
23. Diario Médico. El trasplante renal de donante vivo sobrevive más que el de cadáver. <http://www.diariomedico.com/nefrologia/n111000.html>. 11 octubre 2000.
24. Gok MA, Pelzers M, Glatz JF, i col. Comparison of perfusate activities of glutathione S-transferase, alanine aminopeptidase and fatty acid binding protein in the assessment of non-heart-beating donor kidneys. *Ann Clin Biochem*, 2003. 40:252-258.
25. Wiejnen RM, Booster MH, Stubenitsky BM, i col. Outcome of transplantation of non-heart-beating donor kidneys. *Lancet*, 1995. 345:1067-1070.
26. Alcaraz A, Luque P, Mendes D, i col. Experimental kidney transplantation in pigs from non-heart-beating donors. Evaluation of vasoactives substances and renal artery flow. *Transp Proc*, 2001. 32:198-199.

27. Alcoberro J, Alcaraz A, Álvarez-Vijande R, i col. Experimental kidney transplantation in pigs from non-heart-beating donors: evaluation of renal artery flow. *Transplant Proc*, 1999. 31:2348-2349.
28. Balupuri S, Buckley P, Mohamed M, i col. Assessment of non-heart-beating kidneys for viability on machine perfusion. *Clin Chem Lab Med*, 2000. 38:1103-1106.
29. Luque P, Álvarez-Vijande R, Alcaraz A, i col. Experimental study of the cellular energy charge in kidney transplants with non-heart-beating donors. *Transplant Proc*, 1999. 31:2352-2353.
30. Daemen JW, Oomen AP, Jansen MA, i col. Glutathione S-transferase as predictor of functional outcome in transplantation of machine-preserved non-heart-beating donor kidneys. *Transplantation*, 1997. 29:1378-1380.
31. Gok MA, Pelzers M, Glatz JF, i col. Do tissue damage biomarkers used to assess machine-perfused NHBD kidneys predict long-term renal function post-transplant? *Clin Chim Acta*, 2003. 338:33-43.
32. Das DK, Maulik N. Bioenergetics, ischemic contracture and reperfusion injury. En: *Myocardial Ischemia: Mechanisms, Reperfusion, Protection*. ed. M. Karmazyn, 1996.
33. Southard JH, Belzer FO. Organ Preservation. *Annu Rev Med*, 1995. 46:235-247.
34. Southard JH, Van Gulik TM, Ametani MS, i col. Important components of the UW solution. *Transplantation*, 1991. 49:251-257.
35. McLaren AJ, Friend PJ. Trends in organ preservation. *Transpl Int*, 2003. 16:701-708.
36. Jahania MS, Sanchez JA, Narayan P, i col. Heart preservation for transplantation: principles and strategies. *Ann Thorac Surg*, 1999. 68:1983-1987.
37. Collins GM, Bravo-Shugarman M, Terasaki PI. Kidney preservation for transportation. Initial perfusion and 30 hours' ice storage. *Lancet*, 1969. 2:1219-1222.
38. Flores J, DiBona DR, Beck CH, i col. The role of cell swelling in ischemic renal damage and the protective effect of hypertonic solute. *J Clin Invest*, 1972. 51:118-126.
39. Hochachka W, Mommsen TP. Protons and anaerobiosis. *Science*, 1983. 219:1391-1397.

40. Myers CL, Weiss SJ, Kirsh MM, i col. Effects of supplementing hypothermic crystalloid cardioplegic solution with catalase, superoxide dismutase, allopurinol, or deferoxamine on functional recovery of globally ischemic and reperfused isolated hearts. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 1986. 91(2):281-289.
41. Steenbergen C, Murphy E, Watts JA, i col. Correlation between cytosolic free calcium, contracture, ATP, and irreversible ischemic injury in perfused rat heart. *Circ Res*, 1990. 66:135-146.
42. Menasche P, Termignon JL, Pradier F, i col. Experimental evaluation of Celsior, a new heart preservation solution. *Eur J Cardiothorac Surg*, 1994. 8(4):207-213.
43. Churchill TA, Green CJ, Fuller BJ. The Importance of Calcium-Related Effects on Energetics at Hypothermia: Effects of Membrane-Channel Antagonists on Energy Metabolism of Rat Liver. *Cryobiology*, 1995. 32:477-486.
44. Anaya-Prado R, Toledo-Pereya LH. Adelantos en la preservación de órganos. *Medico Interamericano*, 1999. 18:182-188.
45. Olson DW, Jijon H, Madsen KL, i col. Human small bowel storage: the role for luminal preservation solutions. *Transplantation*, 2003. 76:709-714.
46. Tesi RJ, Jaffe BM, McBride V, i col. Histopathologic changes in human small intestine during storage in viaspan organ preservation solution. *Arch Pathol Lab Med*, 1997. 121:714-718.
47. Haglund U. Gut ischemia. *Gut*, 1994. 35:73-76.
48. Fukuyama K, Iwakiri R, Noda T, i col. Apoptosis induced by ischemia-reperfusion and fasting in gastric mucosa compared to small intestinal mucosa in rats. *Dig Dis Sci*, 2001. 46:545-549.
49. Cicalese L, Sileri P, Green M, i col. Bacterial translocation in clinical intestinal transplantation. *Transplantation*, 2001. 71:1414-1417.
50. Torras J, Cruzado J, Grinyó J. Ischemia and reperfusion injury in transplantation. *Transplantation Proceedings*, 1999. 31:2217-2218.
51. Molitoris BA, Leiser J, Wagner MC. Role of the actin cytoskeleton in ischemia-induced cell injury and repair. *Pediatr Nephrol*, 1997. 11:761-767.
52. Jennings RB, Reimer KA. The cell biology of acute myocardial ischemia. *Annu Rev Med*, 1991. 42:225-246.

53. Sola A, Hotter G, Prats N, i col. Modification of oxidative stress in response to intestinal preconditioning. *Transplantation*, 2000. 69:767-772.
54. Schoenberg M, Berger H. Oxygen radicals in intestinal ischemia and reperfusion. *Chem Biol*, 1990.
55. Kribben A, Edelstein CL, Schrier RW. Pathophysiology of acute renal failure. *J Nephrol*, 1999. 12:142-151.
56. Leaf A. Regulation of intracellular fluid volume and disease. *Am J Med*, 1970. 49:291-295.
57. Clavien PA, Harvey PR, Strasberg SM. Preservation and reperfusion injuries in liver allografts. An overview and synthesis of current studies. *Transplantation*, 1992. 53:957-978.
58. Griño JM. Líquidos de preservación renal. *Nefrología*, 1991. 11:224-228.
59. Cheung JY, Constantine JM, Bonventre JV. Regulation of cytosolic free calcium concentration in cultured renal epithelial cells. *Am J Physiol*, 1986. 251:690-701.
60. Chien KR, Abrams J, Serroni A, i col. Accelerated phospholipid degradation and associated membrane dysfunction in irreversible, ischemic liver cell injury. *J Biol Chem*, 1978. 253:4809-4817.
61. Mego JL, Farb RM, Barnes J. An adenosine triphosphate-dependent stabilization of proteolytic activity in heterolysosomes. Evidence for a proton pump. *Biochem J*, 1972. 128:763-769.
62. Malis CD, Weber PC, Leaf A, i col. Incorporation of marine lipids into mitochondrial membranes increases susceptibility to damage by calcium and reactive oxygen species: evidence for enhanced activation of phospholipase A2 in mitochondria enriched with n-3 fatty acids. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990. 87:8845-8849.
63. Asako H, Kubes P, Wallace J, i col. Modulation of leukocyte adhesion in rat mesenteric venules by aspirin and salicylate. *Gastroenterology*, 1992. 103:146-152.
64. Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischemia -reperfusion injury. *J Pathol*, 2000. 190 (3):255-266.
65. Farber JL, Chien KR, Mittnacht S Jr. Myocardial ischemia: the pathogenesis of irreversible cell injury in ischemia. *Am J Pathol*, 1981. 102:271-281.

66. Kim PK, Zamora R, Petrosko P, i col. The regulatory role of nitric oxide in apoptosis. Review. *International Immunopharmacology*, 2001. 1421-1441.
67. Shah KA, Shurey S, Green CJ. Apoptosis after intestinal ischemia-reperfusion injury: a morphological study. *Transplantation*, 1997. 64:1393-1397.
68. Ar'Rajab A, Dawidson I, Fabia R. Reperfusion injury. *New Horiz*, 1996. 4:224-234.
69. Deitch EA. The role of intestinal barrier failure and bacterial translocation in the development of systemic infection and multiple organ failure. *Arch Surg*, 1990. 125:403-404.
70. Hurlbut D, Zhong R, Wang P, i col. Intestinal permeability and bacterial translocation following orthotopic intestinal transplantation in the rat. *Transplant Proc*, 1990. 22:2451.
71. Jaffe R, Trager JD, Zeevi A, i col. Multivisceral intestinal transplantation: surgical pathology. *Pediatr Pathol*, 1989. 9:633-654.
72. Hauet T, Goujon JM, Vandewalle A, i col. Trimetazidine reduces renal dysfunction by limiting the cold ischemia/reperfusion injury in autotransplanted pig kidneys. *J Am Soc Nephrol*, 2000. 11:138-148.
73. Brook N, Waller J, Nicholson M. Nonheart-beating kidney donation: current practice and future developments. *Kidney Int*, 2003. 63:1516-1529.
74. Ojo AO, Wolfe RA, Held OJ, i col. Delayed graft function: risk factors and implications for renal allograft survival. *Transplantation*, 1997. 63:968-974.
75. Lu CY, Penfield JG, Kielar ML, i col. Hypothesis: is renal allograft rejection initiated by the response to injury sustained during the transplant process. *Kidney Int*, 1999. 55:2157-2168.
76. Padanilam BJ, Lewington AJ. Molecular mechanisms of cell death and regeneration in acute ischemic renal injury. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 1999. 8:15-19.
77. Lieberthal W, Koh JS, Levine JS. Necrosis and apoptosis in acute renal failure. *Semin Nephrol*, 1998. 18:505-518.
78. Finn WF. Prevention of ischemic injury in renal transplantation. *Kidney Int*, 1990. 37:171-182.
79. Azuma H, Nadeau K, Takada M, i col. Initial ischemia/reperfusion injury influences late functional and structural changes in the kidneys. *Trans Proc*, 1997. 29:1528-1529.

80. Shoskes DA, Shahed AR, Kim S. Delayed graft function. Influence on outcome and strategies for prevention. *Urol Clin North Am*, 2001. 28:721-732.
81. Rabb H, Martin JG. An emerging paradigm shift on the role of leukocyte adhesion molecules. *J Clin Invest*, 1997. 100:2937-2938.
82. Bellemare S, Vigneault N, Madore F, i col. Enhanced development of caspase-independent cortical cell death during cold storage in kidneys of non-heart-beating-donors. *Transplantation*, 2002. 73:1742-1751.
83. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 1972. 26:239-257.
84. Wyllie AH. Apoptosis: an overview. *British Medical Bulletin*, 1997. 53:451-465.
85. Haunstetter A, Izumo S. Apoptosis. Basic Mechanisms and implications for cardiovascular disease. *Circ Res*, 1998. 82:1111-1129.
86. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: Enemies Within. Review. *Science*, 1998. 281:1312-1316.
87. Bortner CD, Cidlowski JA. Cellular mechanisms for the repression of apoptosis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2002. 42:259-281.
88. Fiocchi C. Intestinal inflammation: a complex interplay of immune and nonimmune cell interactions. *Am J Physiol*, 1997. 273:769-775.
89. Vaux DL, Haecker G, Strasser A. An evolutionary perspective on apoptosis. *Cell*, 1994. 76:777-779.
90. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 2000. 407:770-776.
91. Rentsch M, Beham A, Iesalnieks I, i col. Impact of prolonged cold ischemia and reperfusion on apoptosis, activation of caspase 3, and expression of bax after liver transplantation in the rat. *Trans Proc*, 2001. 33:850-851.
92. Potten CS, Wilson JW, Booth C. Regulation and significance of apoptosis in the stem cells of the gastrointestinal epithelium. *Stem Cells*, 1997. 15:82-93.
93. Ikeda H, Suzuki Y, Suzuki M, i col. Apoptosis is a major mode of cell death caused by ischaemia and ischaemia/reperfusion injury to the rat intestinal epithelium. *Gut*, 1998. 42:530-537.

94. Noda T, Iwakiri R, Fujimoto K, i col. Programmed cell death induced by ischemia-reperfusion in rat intestinal mucosa. *Am J Physiol*, 1998. 274:270-276.
95. Kokudo Y, Furuya T. Comparison of University of Wisconsin, Euro-Collins, and lactated Ringer's solutions in rat small bowel preservation for orthotopic small bowel transplantation. *Trans Proc*, 1994. 26:1492.
96. Genescà M, Sola A, Miquel R, i col. Role of changes in tissular nucleotides on the development of apoptosis during ischemia/reperfusion in rat small bowel. *Am J Pathol*, 2002. 161:1839-1847.
97. Farber A, Connors JP, Friedlander RM, i col. A specific inhibitor of apoptosis decreases tissue injury after intestinal ischemia-reperfusion in mice. *J Vasc Surg*, 1999. 30:752-760.
98. Azuara D, Sola A, Hotter G, i col. Administration of nitric oxide with caspase inhibitors minimizes bacterial translocation in experimental intestinal transplantation. *Transplantation*, 2004. 77:177-183.
99. Oberbauer R, Rohrmoser M, Regele H, i col. Apoptosis of tubular epithelial cells in donor kidney biopsies predicts early renal allograft function. *J Am Soc Nephrol*, 1999. 10:2006-2013.
100. Schwarz C, Hauser P, Steininger R, i col. Failure of BCL-2 up-regulation in proximal tubular epithelial cells of donor kidney biopsy specimens is associated with apoptosis and delayed graft function. *Lab Invest*, 2002. 82:941-948.
101. Castaneda MP, Swiatecka-urban A, Mitsnefes, i col. Activation of mitochondrial apoptotic pathways in human renal allografts after ischemia-reperfusion injury. *Transplantation*, 2003. 76:50-54.
102. Daemen MA, de Vries B, Buurman WA. Apoptosis and inflammation in renal reperfusion injury. *Transplantation*, 2002. 71:1693-1700.
103. Burns AT, Davies DR, McLaren AJ. Apoptosis in ischemia/reperfusion injury of human renal allografts. *Transplantation*, 1998. 66(7):872-876.
104. de Vries B, Matthijsen RA, van Bijnen AA, i col. Lysophosphatidic acid prevents renal ischemia-reperfusion injury by inhibition of apoptosis and complement activation. *Am J Pathol*, 2003. 163:47-56.
105. Pi F, Badosa F, Sola A, i col. Effects of adenosine on ischaemia-reperfusion injury associated with rat pancreas transplantation. *Br J Sur*, 2001. 88:1366-1375.



106. Chow SC, Kass GEN, Orrenius S. Purines and their roles in apoptosis. *Neuropharmacology*, 1997. 36:1149-1156.
107. Tanaka M, Lee K, Martinez-Augustin O, i col. Exogenous nucleotides alter the proliferation, differentiation and apoptosis of human small intestinal epithelium. *J Nutr*, 1996. 126:424-433.
108. Linden J. Molecular approach to adenosine receptors: receptor-mediated mechanisms of tissue protection. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2001. 41:775-787.
109. Peralta C, Hotter G, Closa D, i col. Protective effect of preconditioning on the injury associated to hepatic ischemia-reperfusion in the rat: role of nitric oxide and adenosine. *Hepatology*, 1997. 25:934-937.
110. Wyatt DA, Edmunds MC, Rubio R, i col. Adenosine stimulates glycolytic flux in isolated perfused hearts by A1 adenosine receptors. *Am J Physiol*, 1989. 257:1952-1957.
111. Peart J, Paul Matherne G, Cermiway RJ, i col. Cardioprotection with adenosine metabolism inhibitors in ischemic-reperfused mouse heart. *Cardiovasc Res*, 2001. 52:120-129.
112. Sola A, Rosello-Catafau J, Gelpi E, i col. Fructose-1,6-biphosphate in rat intestinal preconditioning: involvement of nitric oxide. *Gut*, 2001. 48:168-175.
113. Jordan JE, Zhao ZQ, Sato H, i col. Adenosine A2 receptor activation attenuates reperfusion injury by inhibiting neutrophil accumulation, superoxide generation and coronary endothelial adherence. *J Pharmacol Exp Ther*, 1997. 280:301-309.
114. Grisham MB, Hernandez LA, Granger DN. Adenosine inhibits ischemia-reperfusion-induced leukocyte adherence and extravasation. *Am J Physiol*, 1989. 257:1334-1339.
115. Regan SE, Broad M, Byford AM, i col. A1 adenosine receptor overexpression attenuates ischemia-reperfusion-induced apoptosis and caspase 3 activity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003. 284:859-866.
116. Yao Y, Sei Y, Abbracchio MP, i col. Adenosine A3 receptor agonists protect HL-60 and U-937 cells from apoptosis induced by A3 antagonists. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997. 232:317-322.
117. Jacobson KA, Hoffmann C, Cattabeni F, i col. Adenosine-induced cell death: evidence for receptor-mediated signalling. *Apoptosis*, 1999. 4:197-211.

118. Wakade AR, Przywara DA, Wakade TD. Intracellular, nonreceptor-mediated signaling by adenosine: induction and prevention of neuronal apoptosis. *Mol Neurobiol*, 2001. 23:137-153.
119. Virag L, Szabo C. Purines inhibit poly(ADP-ribose) polymerase activation and modulate oxidant-induced cell death. *FASEB J*, 2001. 15(1):99-107.
120. Ramachandran A, Madesh M, Balasubramanian KA. Apoptosis in the intestinal epithelium: its relevance in normal and pathophysiological conditions. *J Gastroenterol Hepatol*, 2000. 15:109-120.
121. Ramachandran A, Moellering D, Go YM, i col. Activation of c-Jun N-terminal kinase and apoptosis in endothelial cells mediated by endogenous generation of hydrogen peroxide. *Biol Chem*, 2002. 383:693-701.
122. Herrero I, Torras J, Carrera M, i col. Evaluation of a preservation solution containing fructose-1, 6-diphosphate and mannitol using the isolated perfused rat kidney. Comparison with Euro-Collins and University of Wisconsin solutions. *Nephrol Dial Transplant*, 1995. 10:519-526.
123. Niu W, Zhang F, Ehringer W, i col. Enhancement of hypothermic heart preservation with fructose 1,6-diphosphate. *J Surg Res*, 1999. 85:120-129.
124. Zeid YM, Bronk SF, Fesmier PJ, i col. Cytoprotection by fructose and other ketohexoses during bile salt-induced apoptosis of hepatocytes. *Hepatology*, 1997. 25:81-86.
125. Wu XT, Li JS, Zhao XF, i col. Effects of n-3 fatty acid, fructose-1,6-diphosphate and glutamine on mucosal cell proliferation and apoptosis of small bowel graft after transplantation in rats. *World J Gastroenterol*, 2003. 9:1323-1326.
126. Torras J, Borobia FG, Herrero I, i col. Hepatic preservation with a cold-storage solution containing fructose-1, 6-diphosphate and mannitol: evaluation with the isolated perfused rat liver and comparison with University of Wisconsin solution. *Transplant Proc*, 1995. 27:2379-2381.
127. Espanol MT, Litt L, Hasegawa K, i col. Fructose-1, 6-biphosphate preserves adenosine triphosphate but not intracellular pH during hypoxia in respiring neonatal rat brain slices. *Anesthesiology*, 1998. 88:461-472.
128. Bickler PE, Buck LT. Effects of fructose-1, 6-biphosphate on glutamate release and ATP loss from rat brain slices during hypoxia. *J Neurochem*, 1996. 67:1463-1468.

129. Olsen JI, Rossini P, Schweizer MP, i col. A  $^{31}\text{P}$  NMR spectroscopy study of xenopus leavis heart perfusion in vitro with creatinol-O-phosphate, phosphocreatine, adenosine triphosphate, fructose diphosphate and ouabain. *Pharmacol Res*, 1993. 28:135-151.
130. Roig T, Bartrons R, Bermudez J. Exogenous fructose-1, 6-biphosphate reduces  $\text{K}^+$  permeability in isolated rat hepatocytes. *Am J Physiol*, 1997. 273:473-478.
131. Sola A, Panes J, Xaus C, i col. Fructose-1,6-biphosphate and nucleoside pool modifications prevent neutrophil accumulation in the reperfused intestine. *J Leukoc Biol*, 2003. 73(1):74-81.
132. Davis KL, Martin E, Turko IV, i col. Novel effects of nitric oxide. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2001. 41:203-236.
133. Bredt DS. Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology. *Free Radic Res*, 1999. 31(6):577-596.
134. Nicotera P, Bernassola F, Melino G. Nitric oxide (NO), a signaling molecule with a killer soul. *Cell Death Differ*, 1999. 6(10):931-933.
135. Palovuori R. Regulation of cell-cell adhesion and actin cytoskeleton in non-transformed and transformed epithelial cells. *OULU UNIVERSITY PRESS*, 2003. <http://herkules oulu.fi/isbn9514269306/>;
136. Schmidt A, Hall MN. Signaling to the actin cytoskeleton. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*, 1998. 14:305-338.
137. Schwartz N, Hosford M, Sandoval RM, i col. Ischemia activates actin depolymerizing factor: role in proximal tubule microvillar actin alterations. *Am J Physiol*, 1999. 276:554-551.
138. Lieberthal W, Nigam SK. Acute renal failure. II. Experimental models of acute renal failure: imperfect but indispensable. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2000. 278:1-12.
139. Ashworth SL, Sandoval RM, Hosford M, i col. Ischemic injury induces ADF relocalization to the apical domain of rat proximal tubule cells. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2001. 280:886-894.
140. Trocha SD, Kevil CG, Mancini MC, i col. Organ preservation solutions increase endothelial permeability and promote loss of junctional proteins. *Ann Surg*, 1999. 230(1):105-113.
141. White SR, Williams P, Wojcik KR, i col. Initiation of apoptosis by actin cytoskeletal derangement in human airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2001. 24:282-294.

142. Haldar S, Basu A, Croce-CM. Bcl2 is the guardian of microtubule integrity. *Cancer Res*, 1997. 57:229-233.
143. Korichneva I, Hammerling U. The cytoskeleton as checkpoint in apoptosis. *J Cell Sci*, 1999. 112:2521-2528.
144. Kruidering M, van de Water B, Zhan Y, i col. Cisplatin effects on F-actin and matrix proteins precede renal tubular cell detachment and apoptosis in vitro. *Cell Death Differ*, 1998. 5:601-614.
145. NJ van de Water B, Stevens JL. Dephosphorylation of focal adhesion kinase (FAK) and loss of focal contacts precede caspase-mediated cleavage of FAK during apoptosis in renal epithelial cells. *J Biol Chem*, 1999. 274:13328-13337.
146. Ivorra A. Bioimpedance monitoring for physicians: an overview. *Centre Nacional de Microelectrònica Biomedical Applications Group*, 2003. [http://www.cnm.es/~mtrans/PDFs/Bioimpedance\\_for\\_physicians\\_rev1.pdf](http://www.cnm.es/~mtrans/PDFs/Bioimpedance_for_physicians_rev1.pdf):
147. Sola A, Palacios L, Lopez-Marti J, i col. Multiparametric monitoring of ischemia-reperfusion in rat kidney: effect of ischemic preconditioning. *Transplantation*, 2003. 75:744-749.
148. Park PO, Wallander J, Tufveson G, i col. Cold ischemia and re-perfusion in a model of small bowel transplantation in the rat. *Eur Surg Res*, 1991. 23:18-23.
149. Bubb MR, S I. Use of the F-actin-binding drugs, misakinolide A and swinholide A. *Methods Enzymol*, 1998. 298:26-32.
150. Dubois RS, Vaughan GD, Roy CC. Isolated rat small intestine with intact circulation. Organ perfusion and preservation. *Ed. Norman, J.C., Appleton-Century crofts, New York*, 1968. 863-875.
151. Minor T, Klauke H, Isselhard W. Assessment of intestinal integrity after ischemic preservation by luminal and vascular perfusion in vitro. *Eur Surg Res*, 1997. 29:246-253.
152. Monchik GJ, Russell PS. Transplantation of small bowel in the rat: technical and immunological considerations. *Surgery*, 1971. 70:693-702.
153. Hauet T, Mothes D, Goujon JM, i col. Protective effect of polyethylene glycol against prolonged cold ischemia and reperfusion injury: study in the isolated perfused rat kidney. *J Pharmacol Exp Ther*, 2001. 946-952.
154. Radermacher J, Klanke B, Schurek HJ, i col. Importance of NO/EDRF for glomerular and tubular function: studies in the isolated perfused rat kidney. *Kidney Int*, 1992. 41(6):1549-1559.

155. Nishiitsutsuji-Uwo JM, Ross BD, Krebs HA. Metabolic activities of the isolated perfused rat kidney. *Biochem J*, 1967. 103(3):852-862.
156. Nakamoto M, Shapiro JI, Mills SD, i col. Improvement of renal preservation by verapamil with 24-hour cold perfusion in the isolated rat kidney. *Transplantation*, 1988. 45(2):313-315.
157. Weiss C, Passow H, Rothstein A. Autoregulation of flow in isolated rat kidney in the absence of red cells. *Am J Physiol*, 1959. 196(5):1115-1118.
158. Bresticker MA, LoCicero J 3rd, Oba J, i col. Successful extended lung preservation with UW solution. *Transplantation*, 1992. 54(5):780-784.
159. Cox PG, Moons MM, Slegers JF, i col. Isolated perfused rat kidney as a tool in the investigation of renal handling and effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs. *J Pharmacol Methods*, 1990. 24(2):89-103.
160. Moore KP, Taylor GW, Gove C, i col. Synthesis and metabolism of cysteinyl leucotrienes by the isolated pig kidney. *Kidney Int*, 1992. 41:
161. Galat JA, Robinson AV, Rhodes RS. The contribution of hypoxia to postischemic renal dysfunction. *Surgery*, 1988. 104(2):257-265.
162. Epstein FH, Brosnan JT, Tange JD, i col. Improved function with amino acids in the isolated perfused kidney. *Am J Physiol*, 1982. 243(3):284-292.
163. den Butter G, Saunder A, Marsh DC, i col. Comparison of solutions for preservation of the rabbit liver as tested by isolated perfusion. *Transpl Int*, 1995. 8(6):466-471.
164. Vassallo R, Lipsky JJ. Theophylline: recent advances in the understanding of its mode of action and uses in clinical practice. *Mayo Clin Proc*, 1998. 73:346-354.
165. Pragnacharyulu PVP, Varkhedkar V, Curtis MA, i col. Adenosine deaminase inhibitors: synthesis and biological evaluation of unsaturated, aromatic, and oxo derivatives of (+)-erythro-9-(2'S-Hydroxy-3'R-nonyl)adenine[(+)-EHNA]. *J Med Chem*, 2000. 43:4694-4700.
166. Piguet PF, Vesin C, Donati Y, i col. TNF-induced enterocyte apoptosis and detachment in mice: induction of caspases and prevention by a caspase inhibitor, ZVAD-fmk. *Lab Invest*, 1999. 79:495-500.
167. Spector I, Braet F, Shochet NR, i col. New anti-actin drugs in the study of the organization and function of the actin cytoskeleton. *Microsc Res Tech*, 1999. 47(1):18-37.

168. Bubb MR, Spector I, Beyer BB, i col. Effects of jasplakinolide on the kinetics of actin polymerization. An explanation for certain in vivo observations. *J Biol Chem*, 2000. 275(7):5163-5170.
169. Burton K. A study of the conditions and mechanism of diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *Biochem J*, 1956. 62:315-323.
170. Goujon JM, Hauet T, Menet E, i col. Histological evaluation of proximal tubule cell injury in isolated perfused pig kidneys exposed to cold ischemia. *J Surg Res*, 1999. 82:228-233.
171. Ivorra A, Villa R, Genescà M, i col. Medidas Multifrecuenciales de bioimpedancia con una sonda miniaturizada de silicio. *Actas del XX Congreso Anual de la Sociedad Española de Ingeniería Biomédica (CASEIB), Zaragoza*, 2002.
172. Grimnes S, Martinsen OG. Bioimpedance and Bioelectricity Basics. *London, Academic Press*, 2000.
173. Brown D, Lee R, Bonventre JV. Redistribution of villin to proximal tubule basolateral membranes after ischemia and reperfusion. *Am J Physiol*, 1997. 273(6 Pt 2):F1003-1012.
174. Barnes PJ. Theophylline: new perspectives for an old drug. *Am J Respir Crit Care Med*, 2003. 167(6):813-818.
175. Minor T, Isselhard W. Cellular signal level of cyclic AMP and functional integrity of the small bowel after ischemic preservation: an experimental pilot study in the rat. *Eur Surg Res*, 1998. 30:144-148.
176. Akbar S, Minor T. Significance and molecular targets of protein kinase A during cAMP-mediated protection of cold stored liver grafts. *Cell Mol Life Sci*, 2001. 58:1708-1714.
177. Ohana G, Bar-Yehuda S, Barer F, i col. Differential effect of adenosine on tumor and normal cell growth: focus on the A3 adenosine receptor. *J Cell Physiol*, 2001. 186(1):19-23.
178. Lien YH, Lai LW, Silva AL. Pathogenesis of renal ischemia/reperfusion injury: lessons from knockout mice. *Life Sci*, 2003. 74(5):543-552.
179. Lee H T, Emala CW. Adenosine attenuates oxidant injury in human proximal tubular cells via A1 and A2a adenosine receptors. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2002. 282:844-852.

180. Kubes P. Ischemia-reperfusion in feline small intestine: a role for nitric oxide. *Am J Physiol*, 1993. 264:143-149.
181. Takada K, Yamashita K, Sakurai-Yamashita Y, i col. Participation of nitric oxide in the mucosal injury of rat intestine induced by ischemia-reperfusion. *J Pharmacol Exp Ther*, 1998. 287:403-407.
182. Bersimbaev RI, Yugai YE, Hanson PJ, i col. Effect of nitric oxide on apoptotic activity in the rat gastrointestinal tract. *Eur J Pharmacol*, 2001. 423:9-16.
183. Liversidge J, Dick A, Gordon S. Nitric oxide mediates apoptosis through formation of peroxynitrite and Fas/Fas-ligand interactions in experimental autoimmune uveitis. *Am J Pathol*, 2002. 160:905-916.
184. Sola A, Rosello-Catafau J, Alfaro V, i col. Modification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in response to nitric oxide in intestinal preconditioning. *Transplantation*, 1999. 67:1446-1452.
185. Parks D, Granger D. Xanthine oxidase: biochemistry, distribution and physiology. *Acta Physiol Scand*, 1986. 548:87-99.
186. Nadler EP, Upperman JS, Dickinson EC, i col. Nitric oxide and intestinal barrier failure. *Semin Pediatr Surg*, 1999. 8(3):148-154.
187. Sano W, Watanabe F, Tamai H, i col. Beneficial effect of fructose-1,6-biphosphate on mitochondrial function during ischemia-reperfusion of rat liver. *Gastroenterology*, 1995. 108:1785-1792.
188. Donohoe PH, Fahlman CS, Bickler PE, i col. Neuroprotection and intracellular Ca<sup>2+</sup> modulation with fructose-1, 6-biphosphate during in vitro hypoxia-ischemia involves phospholipase C-dependent signaling. *Brain Research*, 2001. 917:158-166.
189. Marks AR. Intracellular calcium-release channels: regulators of cell life and death. *Am J Physiol*, 1997. 272:597-605.
190. Ruvolo PP. Ceramide regulates cellular homeostasis via diverse stress signaling pathways. *Leukemia*, 2001. 15:1153-1160.
191. Mai H, May WS, Gao F, i col. A functional role for nicotine in Bcl2 phosphorylation and suppression of apoptosis. *J Biol Chem*, 2003. 278:1886-1891.
192. Gonzalez Segura C, Castelao AM, Torras J, i col. Long term follow-up of transplanted non-heart-beating donor kidneys. *Transplant Proc*, 1995. 27:2948-2950.

193. Kievit JK, Oomen APA, de Vries B, i col. Update on results of non-heart-beating donor kidney transplantation. *Trans Proc*, 1997. 29:2989-2950.
194. White P, Doctor RB, Dahl RH, i col. Coincident microvillar actin bundle disruption and perinuclear sequestration in anoxic proximal tubule. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2000. 278:886-893.
195. Kellerman PS, Bogusky RT. Microfilament disruption occurs very early in ischemic proximal tubule cell injury. *Kidney Int*, 1992. 42:896-902.
196. Tian B, Kiland JA, K PL. Effects of the marine macrolides swinholide A and jaspilakinolide on outflow facility in monkeys. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2001. 42:3187-3192.
197. White P, Gu L, Chen J. Decreased actin solubility observed during ATP-depletion is mimicked by severing agents but not depolymerizing agents in isolated and cultured proximal tubular cells. *Clin Physiol Funct Imaging*, 2002. 22(5):312-319.
198. Bernstein BW, Bamberg JR. Actin-ATP hydrolysis is a major energy drain for neurons. *J Neurosci*, 2003. 23(1):1-6.
199. Celeste Morley S, Sun GP, B BE. Inhibition of actin polymerization enhances commitment to and execution of apoptosis induced by withdrawal of trophic support. *J Cell Biochem*, 2003. 88(5):1066-1076.
200. Subauste MC, Von Herrath M, Benard V, i col. Rho family proteins modulate rapid apoptosis induced by cytotoxic T lymphocytes and Fas. *J Biol Chem*, 2000. 275:9725-9733.
201. Anderson RJ, Ray CJ, P MR. Evidence for Rho protein regulation of renal tubular epithelial cell function. *Kidney Int*, 2000. 58:1996-2006.
202. Haemmerich D, Ozkan R, Tungjtkusolmun S, i col. Changes in electrical resistivity of swine liver after occlusion and postmortem. *Med Biol Eng Comput*, 2002. 40:29-33.
203. Konishi Y, Morimoto T, Kinouchi Y, i col. Electrical properties of extracted rat liver tissue. *Res Exp Med*, 1995. 195:183-192.
204. McAdams ET. Effect of surface topography on the electrode-electrolyte interface impedance. *Surface Topography*, 1989. 2:107-122.
205. Hamill OP, Martinac B. Molecular Basis of Mechanotransduction in Living Cells. *Physiol Rev*, 2001. 81:685-740.



## **8. ANNEX**



Articles publicats:

**Role of Changes in Tissular Nucleotides on the Development of Apoptosis during Ischemia/Reperfusion in Rat Small Bowel.** *Am J Pathol*, 2002.

**Electrical bioimpedance measurement during hypothermic rat kidney preservation for assessing ischemic injury.** *Biosensors & Bioelectronics*, 2004.

Articles sotmesos:

**Apoptosis inhibition during preservation by fructose-1, 6-diphosphate and theophylline in rat intestinal transplantation.** *Crit Care Med*, 2004.

**Role of actin cytoskeleton derangement on apoptosis during rat renal preservation and further reperfusion.** *Transplantation*, 2004.

