Título:

PROTECCION FRENTE AL ENFRIAMIENTO INTENSO POR ANTICONGELANTES NATURALES. MODELO EX -VIVO DE PRESERVACION DE PULMON DE RATA

Doctorando:

RAFAEL AGUILÓ ESPASES

Director de Tesis:

Profesor

JUAN SANCHEZ-LLORET I TORTOSA

AGRADECIMIENTOS:

Al Profesor Doctor Don Juan Sánchez-Lloret i Tortosa,

director de esta tesis.

Al Doctor Don Alvar Agustí García-Navarro,

sin cuya ayuda, esta tesis no habría podido realizarse.

A mis padres, José (q.e.p.d.) y Antonia.

A los compañeros de la Unidad de Investigación del Hospital Universitario Son Dureta, Doctor Don Xavier Busquets Xaubet,

Dña. Carmen Santos Pons, y

Dña. Cristina Miralles Payeras.

A los compañeros del Hospital Universitario Son Dureta que han participado en este trabajo de investigación, D. Enric Serra Trespallé,

Dña. Aina Noguera Bennaser, y

D. Bernat Togores Solivellas

A todos mis compañeros de la Ciudad Sanitaria i Universitaria de Bellvitge "Príncipes de España" y del Hospital Universitario "Son Dureta".

A todos los que han sido mis profesores; en el parvulario, la escuela, el Instituto, la Universidad y el post-Grado.

GRACIAS

a mis hijos, Xavier e Irene.

a mi esposa, Pilar.

En el segundo piso, en el último, la casa le pareció infinita y creciente.

La casa no es tan gande, pensó. *La agrandan la penumbra,la simetría, los espejos, los muchos años, mi desconocimiento, la soledad.*

Era Red Scharlach. Los hombres maniataron a Lönrot. Éste, al fin, encontró su voz.

-Scharlach ¿usted busca el Nombre Secreto?

-No –dijo Scharlach-. Busco algo más efímero y deleznable, busco a Erik Lönrot.

Llegué a abominar de mi cuerpo, llegué a sentir que dos ojos, dos manos, dos pulmones, son tan monstruosos como dos caras.

J.L. Borges

La muerte y la brújula.

Capítulo 1º.- El trasplante de pulmón. Desarrollo histórico y estado actual.
Capítulo 2º.- Lesión pulmonar por isquemia, enfriamiento y reperfusión.
Capítulo 3º.- Preservación pulmonar en la clínica.
Capítulo 4º.- Investigación en preservación pulmonar.
Capítulo 5º.- Hipótesis y objetivos.
Capítulo 6º.- Objetivo 1. Desarrollo del modelo experimental. El pulmón aislado y perfundido ex -vivo.
Capítulo 7º.- Objetivo 2. Preservación pulmonar muy fría con crioprotección. Lesión por isquemia-reperfusión en un modelo ex -vivo de pulmón de rata.

Bibliografía.
Addendum

CAPITULO 1º

EL TRASPLANTE DE PULMÓN. DESARROLLO HISTORICO Y ESTADO ACTUAL.

1,1 INTRODUCCIÓN.

1,2 EL TRASPLANTE DE PULMÓN. DESARROLLO HISTÓRICO.

1,3 EL TRASPLANTE DE PULMÓN. ESTADO ACTUAL.

1,3-1 Indicaciones y contraindicaciones.

1,3-1A Indicaciones.

1,3-1B Contraindicaciones.

1,3-2 Evaluación del donante y del receptor.

1,3-2A Del donante**.**

1,3-2B Evaluación del receptor.

1,3-3 Elección del procedimiento quirúrgico.

1,3-3A Trasplante cardio-pulmonar.

1,3-3B Trasplante unipulmonar.

1,3-3C Trasplante unipulmonar bilateral secuencial.

1,3-3D Trasplante lobar único o lobar bilateral.

1,3-4 Resultados.

1,3-4A Morbi-mortalidad**.**

1,3-4B Resultados funcionales**.**

1,3-5 Limitaciones al trasplante pulmonar.

Areas de investigación en transplante pulmonar.

SUMARIO

CAPITULO 2º

LESIÓN PULMONAR POR ISQUEMIA, ENFRIAMIENTO Y REPERFUSIÓN.

2,1 INTRODUCCIÓN.

2,1-1 Lesión pulmonar en el donante.

2,1-2 Lesión por isquemia.

2,1-3 Lesión por enfriamiento.

2,1-4 Lesión por reperfusión.

2,1-5 Complicaciones en el receptor.

2,2 EL PROBLEMA CLÍNICO.

2,3 MECANISMOS DE LESIÓN Y DE ADAPTACIÓN A LA ISQUEMIA Y AL ENFRIAMIENTO.

2,3-1 Mecanismos de lesión por isquemia.

2,3-2 Mecanismos metabólicos de adaptación celular a la hipoxia.

2,3-3 Mecanismos de lesión por enfriamiento.

2,3-4 Mecanismos metabólicos de adaptación al enfriamiento.

2,4 MECANISMOS DE LESIÓN POR REPERFUSIÓN.

2,4-1 Lesión celular. Histología.

2,4-2 Producción de radicales libres del oxígeno.

2,4-3 Infiltración pulmonar por células inflamatorias.

2,4-4 Disfunción endotelial y vascular.

2,4-5 Alteración del surfactante pulmonar.

SUMARIO

CAPITULO 3º

PRESERVACIÓN PULMONAR EN LA CLÍNICA.

3,1 CONCEPTO.

3,2 DESARROLLO HISTÓRICO.

3,2-1 Inmersión hipotérmica simple.

3,2-2 Preparación cardio-pulmonar autoperfundida.

3,2-3 Enfriamiento del donante en by-pass cardio-pulmonar.

3,2-4 Perfusión pulmonar fría + inmersión fría.

3,2-5 Perfusión pulmonar retrógrada.

3,3 PRÁCTICA CLÍNICA ACTUAL.

SUMARIO

CAPITULO 4º

INVESTIGACIÓN EN PRESERVACIÓN PULMONAR

4,1 INTRODUCCIÓN. OBJETIVOS.

4,2 LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN EN PRESERVACIÓN PULMONAR.

4,3 MODELOS EXPERIMENTALES.

4,3-1 Introducción.

4,3-2 Células aisladas en cultivo.

4,3-3 Mitocondrias aisladas en cultivo.

4,3-4 Anillos de arteria pulmonar, de tráquea o bronquio en baño de órganos.

4,3-5 Tiras o láminas ultrafinas de pulmón en baño de órganos.

4,3-6 El pulmón aislado y perfundido ex vivo.

4,3-6A El pulmón aislado y perfundido como instrumento de experimentación.

4,3-6B Variaciones técnicas y/o instrumentales del modelo IPL.

4,3-6C Variables de función pulmonar medidas y parámetros calculados durante la fase de perfusión.

4,3-6D Variables de función pulmonar medidas y parámetros calculados después de la fase de perfusión.

4,3-7 Modelos de trasplante de pulmón en animales.

4,3-8 ¿Cómo evaluar la calidad de la preservación?

4,4 LA BÚSQUEDA DEL MÉTODO IDEAL DE PRESERVACIÓN PULMONAR.

4,4-1 Introducción.

4,4-2 Soluciones de preservación pulmonar

4,4-2A La solución de preservación pulmonar “ideal”

4,4-2B Evolución de las soluciones de preservación pulmonar.

4,4-2C Las soluciones Euro-Collins y Collins-Sacks

4,4-2D La solución de Belzer - Universidad de Wisconsin.

4,4-2E La solución UCLA.

4,4-2F La solución Low-Potassium Dextran.

4,4-2G La solución Wallwork.

4,4-2H Las soluciones de Kyoto.

4,4-2I La solución Celsior.

4,4-3 Condiciones de preservación del órgano aislado.

4,4-3A pH.

4,4-3B Temperatura.

4,4-3C Estado de insuflación/desuflación del pulmón.

4,4-4 Tratamiento en el donante.

4,4-4A Precondicionamiento a la isquemia.

4,4-4B Tratamiento del donante con golpe de calor (Heat shock).

4,4-4C Ventilación post-mortem del donante.

4,4-4D Tratamiento del donante con prostaglandinas.

4,4-4E Tratamiento del donante con óxido nítrico.

4,4-4F Tratamiento del donante con antiinflamatorios sistémicos.

4,4-4G Tratamiento del donante con moduladores de la respuesta inflamatoria.

4,4-4H Tratamiento del donante con lazaroides.

4,4-4I Tratamiento del donante con factores de inducción de la hibernación.

4,4-4J Tratamiento del donante con surfactante pulmonar.

4,4-5 Tratamiento del receptor.

4,4-5A Tratamiento del receptor con surfactante.

4,4-5B ¿Cómo hacer la reperfusión?

4,4-5C Tratamiento del receptor con óxido nítrico.

4,4-5D Tratamiento del receptor con bloqueantes de los canales del calcio.

4,4-5E Tratamiento del receptor con inhibidores / bloqueadores de la función leucocitaria.

SUMARIO

CAPITULO 5º

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

5,1 HIPÓTESIS DE TRABAJO.

5,2 OBJETIVOS CONCRETOS.

5,2-1 Objetivo 1.

5,2-2 Objetivo 2.

CAPITULO 6º

OBJETIVO 1:

DESARROLLO DEL MODELO EXPERIMENTAL. EL PULMON AISLADO Y PERFUNDIDO EX–VIVO.

6,1 INTRODUCCIÓN.

6,2 MATERIAL.

6,2-1 Animales.

6,2-2 Instrumental quirúrgico.

6,3 MÉTODOS.

6,3-1 Técnica quirúrgica en la rata .

6,3-2 Perfusión.

6,3-3 Ventilación.

6,3-4 Isquemia.

6,3-5 Reventilación y reperfusión.

6,3-6 Estudio de la función pulmonar.

6,3-6A Mediciones durante la re/perfusión.

6,3-6B Mediciones tras la re/perfusión.

GALERIA DE IMAGENES

6,4 RESULTADOS.

6,5 DISCUSIÓN.

6,5-1 De los métodos.

6,5-1A Ventilación a presión positiva.

6,5-1B Ventilación a volumen corriente constante.

6,5-1C Ventilación con carbógeno.

6,5-1D Perfusión a volumen constante.

6,5-1E Perfusión con suero de Krebs-Henseleit sin recirculación.

6,5-1F Adición al suero de Krebs-Henseleit de albúmina al 0,2%.

6,5-1G Re/perfusión durante 60 minutos.

6,5-2 Discusión de los resultados.

6,5-2A Intercambio de gases.

6,5-2B Ventilación y perfusión.

6,5-2C Medición de LDH en el líquido efluente.

6,5-2D Agua retenida en el pulmón. Peso húmedo / peso seco.

6,5-2E Estudios patológicos y de viabilidad celular.

6,6 CONCLUSIONES.

6,6-1 Validez del modelo.

SUMARIO

CAPITULO 7º

OBJETIVO 2:

PRESERVACIÓN PULMONAR MUY FRIA CON CRIOPROTECCIÓN.

LESION POR ISQUEMIA-REPERFUSION EN UN MODELO EX-VIVO DE PULMON DE RATA.

7,1 INTRODUCCION.

7,1-1 Antecedentes.

7,1-2 Hipótesis.

7,1-3 Objetivos concretos.

7,2 BASES TEÓRICAS PARA LA CRIOPROTECCIÓN.

LA SOLUCION "HOSPITAL UNIVERSITARIO SON DURETA" (HUSD).

7,3 MATERIAL Y METODOS.

7,3-1 Material.

7,3-2 Métodos.

7,3-3 Diseño.

7,3-4 Mediciones.

7,3-5 Análisis estadístico.

7,3-5A Contraste de hipótesis.

7,3-5B Tests estadísticos.

7,3-5C Relación entre variables.

7,3-5D Cálculo.

7,4 RESULTADOS.

7,4-1 Intercambio de gases.

7,4-2 Mecánica respiratoria.

7,4-3 Hemodinamia.

7,4-4 Exudación pleural.

7,4-5 Formación de edema pulmonar.

7,4-6 Lesión celular – citolisis.

7,4-7 Edema pulmonar.

7,4-8 Viabilidad celular.

7,4-9 Anatomía patológica.

7,5 ENSAYO DE HIPÓTESIS Y CORRELACIÓN.

7,5-1 Variables correlacionadas.

7,5-1A PO_2 en el líquido efluente sobre Ww/Bodyw y sobre Ww/Wd.

7,5-1B PO_2 en el líquido efluente sobre PawP.

7,5-1C PO_2 en el líquido efluente sobre exudación pleural.

7,5-1D PO_2 en el líquido efluente sobre mortalidad celular.

7,5-1E PawP sobre Ww/Bodyw y sobre Ww/Wd.

7,5-1F PawP sobre exudación pleural.

7,5-1G Exudación pleural sobre Ww/Bodyw y sobre Ww/Wd.

7,5-1H Edema pulmonar sobre PAP media.

7,5-1I LDH en el líquido efluente sobre mortalidad celular.

7,5-2 Ensayo de hipótesis.

7,5-2A Preservación estándar. Grupos Control vs. LPD 24 horas.

7,5-2B Preservación TEST. Grupos LPD 24 horas vs. HUSD 72 horas.

7, 5-2C Grupos LPD 24 horas versus HUSD 24 horas.

7,5-2D Grupos LPD 24 horas versus LPD 72 horas.

7,5-2E Comparación de los grupos test entre sí. HUSD 72 horas vs. HUSD 24 horas, y HUSD 72 horas vs. LPD 72 horas.

7,6 DISCUSIÓN.

7,6-1 La lesión por isquemia-reperfusión. El modelo experimental.

7,6-1A Coherencia de los resultados experimentales.

7,6-1B El modelo experimental.

7,6-1C La preservación estándar.

7,6-1D Desarrollo de la lesión por isquemia-reperfusión.

7,6-2 Ensayo de la hipótesis. Los grupos TEST.

7,6-3 Observaciones.

7,7 CONCLUSIONES

Bibliografia.

Addendum.

CAPITULO 1º

EL TRASPLANTE DE PULMÓN.
DESARROLLO HISTORICO Y ESTADO ACTUAL.

1,1 INTRODUCCIÓN.

Los procedimientos quirúrgicos actualmente disponibles frente a la enfermedad pulmonar avanzada, irreversible y terminal son la cirugía de reducción de volumen pulmonar y el trasplante de pulmón.

La cirugía de reducción de volumen pulmonar es un procedimiento que sólo está indicado en el tratamiento de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfisema predominante. El objetivo terapéutico es la mejoría sintomática, específicamente el alivio de la sensación de disnea, lo que posibilita un incremento en la capacidad de ejercicio y de la calidad de vida del enfermo. No está demostrado que este procedimiento sea capaz de incrementar la expectativa de vida.

Sólo un porcentaje reducido sobre el total de pacientes con enfisema pueden beneficiarse de este tipo de cirugía, debido a las condiciones de inclusión y exclusión precisas que exigen los protocolos actuales. Su discusión queda fuera del ámbito del texto presente.

Por el contrario, el abanico de indicaciones para trasplante de pulmón es mucho más amplio. El trasplante de pulmón puede plantearse, al menos potencialmente, para la enfermedad pulmonar avanzada e irreversible de cualquier etiología. Además, los objetivos terapéuticos del trasplante son mucho más ambiciosos. Estos son revertir lo (que se considera) irreversible: Restaurar la función pulmonar normal, la capacidad de ejercicio normal y alargar la vida del paciente

Las características técnicas e indicaciones de las diferentes opciones quirúrgicas (transplante unipulmonar, bipulmonar secuencial y cardio-pulmonar) están hoy perfectamente delimitadas. Así, el transplante de pulmón ha evolucionado hasta convertirse en la actualidad en el tratamiento de elección de la enfermedad pulmonar terminal, médicamente irreversible.

De nuevo, lamentablemente, sólo un número limitado de pacientes con enfermedad pulmonar terminal podrán beneficiarse de un trasplante de pulmón. Los problemas que limitan la difusión el transplante de pulmón como procedimiento clínico generalizado son la escasez de órganos hábiles, el fracaso agudo postimplante del injerto, y el rechazo inmunológico crónico, que en forma de bronquiolitis obliterante conduce a la insuficiencia respiratoria.

Expandir la práctica del trasplante de pulmón constituye uno de los grandes retos que la neumología y la cirugía torácica tienen delante. La posibilidad de solucionar los problemas

citados constituye el motor de la investigación en transplante de pulmón.

1,2 EL TRASPLANTE DE PULMÓN. DESARROLLO HISTÓRICO.

El primer trasplante de pulmón sobre un ser humano fue practicado por **JD.Hardy**[1] en 1963. En los 15 años siguientes, solamente otros 40 trasplantes pulmonares se habían realizado en el mundo, todos ellos concluidos en fracaso. El primer caso de supervivencia a largo plazo fue reportado por **F.Deron**[2] en un paciente varón de 23 años afecto de fibrosis pulmonar. El paciente murió a los diez meses de una neumonía bacteriana.

No es hasta 1982 que **BA.Reitz**[3] y su grupo de la Universidad de Standford, publican la primera serie de trasplante cardio-pulmonar con buenos resultados, en pacientes con enfermedad vascular pulmonar primaria. En 1986, el grupo de Toronto[4] liderado por **JD.Cooper**, publica la aplicación con éxito en clínica humana del trasplante unipulmonar, primero en pacientes afectos de fibrosis pulmonar primaria, después en pacientes con hipertensión pulmonar. En 1988 se publica la técnica para trasplante bipulmonar sin trasplante cardíaco asociado, indicado en pacientes afectos de enfisema pulmonar difuso[5] Por cuestiones de carácter técnico, relacionados fundamentalmente con problemas de la sutura bronquial, esta modalidad evoluciona al trasplante unipulmonar bilateral

secuenciado[6] En casos especiales, también se ha realizado el trasplante bilateral lobar (de lóbulo inferior)[7]

Sin embargo, el estímulo que más ha impulsado el desarrollo del trasplante de pulmón como un procedimiento de amplia difusión y máxima expectativa fue la demostración por **H.Mal** en 1989 que el trasplante unipulmonar es un procedimiento eficaz y seguro para el tratamiento del enfisema difuso[8] Desde entonces, el trasplante unipulmonar por enfisema se ha convertido en la indicación de trasplante de pulmón más extendida en todo el mundo[9]

Al hablar de la historia del trasplante de pulmón es preciso recordar el impacto que supuso la introducción de la ciclosporina A como agente inmunosupresor en 1984[10,11] La ciclosporina A forma parte en la actualidad de cualquier protocolo clínico de prevención del rechazo inmunológico en trasplante pulmonar[12] Desde la introducción de la ciclosporina A, las formas de rechazo hiperagudo y agudo ya no constituyen la causa más común de fracaso agudo y precoz del injerto[13] Lamentablemente, la ciclosporina A no ha solucionado, en cambio, el problema del rechazo crónico, el cual, bajo la forma clínica de bronquiolitis obliterante, resulta ser la causa más frecuente de morbi-mortalidad tardía en trasplantados pulmonares[13,14]

También es preciso recordar los problemas graves que surgían con la dehiscencia de la sutura-anastomosis bronquial termino-terminal, complicación antes muy frecuente (alrededor de

un 30%) que conlleva cuadros de infección y sepsis, y/o estenosis bronquial subsiguiente con pérdida de la funcionalidad del injerto[15] La descripción e introducción de la técnica de anastomosis bronquial con telescopage[16] permitió reducir drásticamente la prevalencia de esta complicación. Actualmente, los problemas relacionados con la dehiscencia de la sutura bronquial constituyen sólo un 5% de la morbi-mortalidad precoz en trasplante de pulmón[14] La técnica de rodear la sutura con un flap de epiplón vascularizado, evaluada primero en perros[17] e introducida en la clínica después[18] está hoy día abandonada[19-21]

1,3 EL TRANSPLANTE DE PULMÓN. ESTADO ACTUAL.

1,3-1 Indicaciones y contraindicaciones.

1,3-1A Indicaciones.

En la actualidad, las enfermedades para las que el trasplante de pulmón puede contemplarse como opción terapéutica se clasifican en cuatro grupos y son las siguientes[22-26]

1) Enfermedades vasculares pulmonares.

- Hipertensión vascular primaria.
- Hipertensión vascular secundaria:
  - A enfermedad sistémica primaria.
  - A enfermedad cardiaca primaria.
  - Síndrome de Eisenmenger.

2) Enfermedades pulmonares restrictivas.

- Fibrosis pulmonar primaria o secundaria.

3) Enfermedades pulmonares obstructivas.

Enfermedad pulmonar obstructiva crónica, secundaria a consumo de tabaco.

Enfisema secundario a déficit de $alfa_1$-antitripsina.

4) Enfermedades pulmonares supurativas.

Fibrosis quística.

Bronquiectasias generalizadas.

Además, también se considera indicación de retrasplante el desarrollo de bronquiolitis obliterante secundaria a rechazo crónico con insuficiencia respiratoria, que es nuevamente irreversible y terminal.

1,3-1B Contraindicaciones.

Absolutas:

Adicción al tabaco o a otras drogas.

Alcoholismo.

Insuficiencia respiratoria dependiente de ventilador.

Enfermedad extrapulmonar grave y/o terminal, incluyendo demencia.

Infección extrapulmonar activa.

Enfermedad maligna (en los últimos 5 años)

Anormalidad grave de la caja torácica y/o disfunción diafragmática grave.

Obesidad o caquexia importantes.

Edad avanzada.

Relativas:

Terapia corticoide actual.

Cirugía torácica o pleurodesis previa.

1,3-2 Evaluación del donante y del receptor.

1,3-2A Del donante.

Dos son las condiciones básicas que debe cumplir el donante de pulmón: Debe estar en muerte cerebral[27] y debe mantener una función pulmonar aceptable[28,29]

La evaluación clínica y funcional de los pulmones del donante pretende recabar información para seleccionar aquellos pulmones que estén libres de gérmenes patógenos, y que presumiblemente, sean capaces de soportar la agresión que supone el trasplante, estando así en condiciones de garantizar la hematosis una vez injertados en el receptor.

Deben cumplirse las siguientes condiciones clínicas en el donante[28]:

Edad < 55 años.
Ausencia de historia de neoplasia previa.
Compatibilidad del sistema ABO.
Radiografía de tórax normal.
Presión parcial de oxígeno (O_2) en sangre arterial superior a 300 mm Hg. con fracción inspiratoria de O_2 (FIO_2)=1 y presión en vía aérea al final de la espiración (positive end espiratory pressure, PEEP) = +5 cm H_2O.
Fumador < 20 paquetes*año.
Ausencia de historia de trauma torácico.
Ausencia de historia de cirugía torácica previa.
Ausencia de episodio de aspiración bronco-pulmonar de material del tracto digestivo.
No estado de sepsis.
No estado de coagulación intravascular diseminada.
Ausencia de secreciones purulentas en la broncoscopia.

Tinción de Gram del esputo con ausencia de bacterias, hongos y/o células blancas en cantidad significativa.

Puesto que la escasez de órganos es actualmente el más importante factor de limitación de la difusión del trasplante de pulmón, algunos autores, con el objetivo de ampliar el número de procedimientos, han liberalizado los criterios anteriores de selección de donantes, habiendo publicado resultados aceptables con donantes "límite" o "marginales"[30-33] Se han transplantado incluso pulmones procedentes de donantes vivos[34-36]

1,3-2B Evaluación del receptor.

La evaluación clínica del receptor pretende obtener información relativa a tres aspectos fundamentales que van a determinar la indicación y el momento de efectuar el trasplante[37]

1,3-2B 1- El ***estado evolutivo de su enfermedad respiratoria y el grado de deterioro funcional***, de modo que el momento óptimo de incluir al paciente en la lista de espera para trasplante es aquel en que la enfermedad está ya en su fase avanzada, y al mismo tiempo, que la expectativa de vida (entre 1 y 2 años) es lo suficientemente amplia que permite esperar hasta que la oportunidad de realizar el trasplante se haga efectiva.

Criterios de selección para trasplante de pulmón[37]:

Enfermedad pulmonar obstructiva crónica.-

Deterioro funcional: Clase III de la New York Heart Association (NYHA).

FEV_1 < 500 ml

FEV_1 < 20% del teórico.

Deterioro rápido del FEV_1

Hipoxia, hipercapnia.

Pérdida de peso.

Fibrosis pulmonar.-

Deterioro funcional: Clase III de la NYHA.

Hipoxia al ejercicio.

Capacidad de difusión para CO < 30% del teórico.

Hipertensión vascular pulmonar.-

Deterioro funcional: Clase III de la NYHA.

Presión media en arteria pulmonar > 55 mm Hg

Presión media en aurícula derecha > 10 mm Hg

Indice cardíaco < 4 l/min/m^2

Falta de respuesta al tratamiento médico.

Bronquiectasias. Fibrosis quística.-

Deterioro funcional: Clase III de la NYHA.

FEV_1 < 500 ml

FEV_1 < 20% del teórico.

Deterioro rápido del FEV_1

Hipoxia, hipercapnia.

Pérdida de peso.

Infecciones de repetición.

Hemoptisis. Neumotórax.

1,3-2B 2- El ***estado general del paciente***, lo que incluye la completa valoración por aparatos y sistemas del candidato[37]

Evaluación pulmonar.-

Rx tórax.

TAC tórax de alta resolución.

Gammagrafía de ventilación y perfusión.

Pruebas de función respiratoria.

Prueba de esfuerzo.

6´walk test.

Evaluación cardiaca.-

Electrocardiograma.

Ecocardiograma.

Cateterización cardiaca derecha e izquierda.

Evaluación hematológica e inmunológica.-

Hemograma.

Coagulación.

Tipaje ABO y Rh.

Screening de anticuerpos preformados.

Cultivo de esputo.

Serologías para virus de la hepatitis A, B, C, virus de la inmunodeficiencia humana, citomegalovirus, virus de Epstein-Barr, varicela-zoster, sincitial respiratorio, y virus T-linfotrópico humano tipo I.

Tests cutáneos para tuberculosis, histoplasmosis, coccidioidomicosis, y otros que se consideren oportunos.

Evaluación gastrointestinal.-

Sangre oculta en heces.

Amilasemia/lipasa.

Función hepática.

Ecografía abdominal.

Evaluación renal.-

Análisis de orina.

Creatinina sérica.

Urea en sangre.

Aclaramiento de creatinina.

Proteínas en orina.

Evaluación endocrina.-

Glucemia.

Función tiroidea.

Cortisol en sangre.

Test de estimulación de adrenocorticotropina.

Evaluación del aparato locomotor.-

Densitometría ósea.

Niveles de vitamina D.

Niveles de testosterona (en los varones)

Otros.-

Mamografía y examen pélvico (mujeres)

Antígeno prostático específico (varones)

Examen neurológico.

Examen ocular.

Examen buco-dental.

1,3-2B 3 - El ***estado psicológico del paciente***[38]

Abandono del tabaco u otras drogadicciones.

Colaborador en programas de rehabilitación.

Ambiente familiar/social adecuado.

1,3-3 Elección del procedimiento quirúrgico.

1,3-3A Trasplante cardio-pulmonar.

Indicado cuando la enfermedad pulmonar se acompaña de enfermedad cardiaca terminal, si esta última no puede ser corregida quirúrgicamente[39]

1,3-3B Trasplante unipulmonar.

Es el procedimiento de indicación más frecuente. Sus indicaciones abarcan todas las enfermedades pulmonares terminales e irreversibles no supurativas (enfisema, hipertensión pulmonar, enfermedad pulmonar intersticial) y aquellas enfermedades pulmonares que se acompañan de enfermedad

cardiaca que puede ser corregida quirúrgicamente, corrección que se efectúa en el mismo tiempo quirúrgico que el trasplante[39]

1,3-3C Trasplante unipulmonar bilateral secuencial.

Indicado en enfermedades supurativas pulmonares, como las bronquiectasias o la fibrosis quística[39]

1,3-3D Trasplante lobar único o lobar bilateral.

El donante está vivo. Está justificado para aquellos candidatos a trasplante con riesgo próximo o inmediato de muerte y para los que no se dispone de un pulmón procedente de donante cadáver[39,40]

1,3-4 Resultados.

1,3-4A Morbi-mortalidad**.**

Incluyendo todas las modalidades de trasplante pulmonar, la supervivencia actual registrada es del 78% al año y del 45% a los cinco años[14,41,42] Las causas de mortalidad son las mismas en todos los tipos de trasplante[14]

Por convención, se define como mortalidad precoz si el paciente trasplantado es éxitus dentro de los primeros 90 días post-trasplante, y mortalidad tardía si el exitus se produce más allá de este período[14]

Morbi-mortalidad precoz.

Las infecciones, bacterianas y/o por citomegalovirus, son la causa más frecuente de muerte precoz. Le siguen el fracaso agudo del injerto, (generalmente manifestación de la lesión por isquemia-reperfusión) insuficiencia cardiaca, rechazo inmune agudo o hiperagudo, hemorragia, dehiscencia de la sutura bronquial, y una miscelánea.

Morbi-mortalidad tardía.

El rechazo crónico en forma de bronquiolitis obliterante es responsable de hasta un 29% de muertes tardías. Los cuadros infecciosos y sépticos suponen el 30%. Estos últimos tienen a la bronquiolitis obliterante como factor de predisposición y se desarrollan, con frecuencia, en su presencia como enfermedad de base. El desarrollo de neoplasias causa un 6% de muertes tardías.

1,3-4B Resultados funcionales.

La capacidad de ejercicio máximo, medida mediante test de esfuerzo, o mediante capacidad de marcha en seis minutos, (6´walk test) mejora significativamente a los 3 meses tras el trasplante y sigue mejorando hasta los 12 meses, momento en que la mejoría funcional alcanza una fase de meseta. Los resultados funcionales son independientes de la modalidad de trasplante y también de la enfermedad de base por la que se indicara. Del mismo modo, la capacidad máxima de utilización periférica de

oxígeno (VO_2max) se incrementa hasta valores que alcanzan entre el 50% y el 60% del valor predictivo normal. No se conocen las causas ni los mecanismos a esta limitación permanente al esfuerzo máximo tras trasplante[14,41-43]

En cuanto a los aspectos psicológicos y sociales tras trasplante pulmonar, se ha demostrado una mejoría en la calidad de vida y en la percepción de la misma, beneficios que se mantienen a largo plazo a menos que se instaure el síndrome de bronquiolitis obliterante[13,38,43]

1,3-5 Limitaciones al trasplante pulmonar. Áreas de investigación en transplante pulmonar.

La mayor limitación al desarrollo generalizado del trasplante de pulmón es la falta de suficientes órganos disponibles. La escasez de donantes no puede modificarse como consecuencia del ejercicio de la voluntad de cirujanos y clínicos. Disponer de un órgano para trasplante depende actualmente del albur del azar. De hecho, en la medida en que mejoren la seguridad viaria y la seguridad en las condiciones de trabajo, es de esperar que el número de accidentes graves y consiguientemente, de donantes cadáver, muestre una tendencia a mantenerse. Por razones obvias, sería deseable que esta tendencia se mostrara a decrecer. Igualmente, la posibilidad de obtener pulmones de donantes vivos está limitada en sí misma por el enorme sacrificio que tal práctica impone al donante.

En segundo lugar, constituye una limitación importante los problemas que siguen al rechazo inmunológico agudo y crónico. Ambos problemas -la falta de órganos y la antigenicidad de los disponibles- se solucionarían conjuntamente si fuera posible el xenotrasplante transgénico. Esto es, el trasplante de pulmones de animales, más probablemente de cerdos, a humanos. Los animales debe(rían) ser manipulados genéticamente, de modo que los antígenos de compatibilidad ABO, Rh, linfocitaria, e hística expresados por el animal fueran los propios del receptor humano. Si llegara a conseguirse la puesta en práctica de esta metodología, sería posible obtener pulmones (u otros órganos) "***a la medida inmunológica" del receptor***. El xenotrasplante transgénico es un área de máxima investigación en trasplante de pulmón.

En tercer lugar, el otro problema que limita el desarrollo del trasplante pulmonar es la lesión por isquemia y posterior reperfusión, causa actualmente de la mayoría de los casos de fracaso precoz del injerto.

Ambos problemas, la producción de órganos transgénicos y la lesión por isquemia - reperfusión están, menos remotamente de lo que pueda parecer, de hecho, relacionados. Una, *por ahora hipotética* ***"granja de cerdos transgénicos, proveedores de pulmones a humanos***" requeriría una tecnología asociada muy compleja y costosa. Los animales, además de ser genéticamente manipulados, deberían crecer libres de patógenos propios y de patógenos humanos e, idealmente, debería disponerse de quirófano

y utillaje para la obtención de los pulmones, y que fueran éstos remitidos al hospital donde de aguarda el receptor. Así, el número de pulmones disponibles sería prácticamente ilimitado y el problema del rechazo quedaría superado. En este caso, el tiempo de isquemia y las condiciones de preservación en que viajaría el órgano aislado se convertirían en los principales factores determinantes del éxito o fracaso del injerto.

Es posible imaginar algunas -pocas- de estas granjas de alta tecnología suministrando pulmones. ¿Es ésta una imagen de ciencia-ficción? La respuesta es: Ahora sí. Pero, ¿Cuántas ficciones de antaño son ahora realidades cotidianas incluso imprescindibles?

Finalmente, son también objeto de investigación los mecanismos implicados en la aparición de complicaciones sistémicas -alteraciones del metabolismo, caquexia, afectación músculo-esquelética, depresión u otras- que con frecuencia acompañan a la enfermedad pulmonar avanzada. Resulta fundamental conocer hasta que punto esta afectación sistémica participa o determina la limitación funcional del paciente, y en qué medida son estas condiciones reversibles al revertir (cirugía de trasplante) o paliar (cirugía de reducción de volumen pulmonar) la condición supuestamente primaria de insuficiencia respiratoria crónica[44]

SUMARIO

- El transplante de pulmón ha evolucionado hasta convertirse en el tratamiento de elección de la enfermedad pulmonar irreversible y terminal.

- Las características técnicas, indicaciones y contraindicaciones de las diferentes opciones quirúrgicas están perfectamente definidas.

- La aplicación del transplante de pulmón como tratamiento a gran escala de la enfermedad pulmonar irreversible y terminal está limitada por:
    - La escasez de donantes.
    - El rechazo inmunológico.
    - La lesión por isquemia y reperfusión.

- Estas limitaciones constituyen las áreas de máxima investigación en transplante de pulmón.

CAPITULO 2º

LA LESIÓN POR ISQUEMIA - ENFRIAMIENTO Y REPERFUSIÓN.

2,1 INTRODUCCIÓN.

Al trasplantar el pulmón, éste puede resultar dañado en cualquiera de los múltiples procesos concatenados que exige un trasplante. Las lesiones pueden producirse estando el pulmón todavía en el donante, durante la fase de isquemia, (con/sin enfriamiento) y/o al ser injertado y reperfundido en el receptor[45,46]

2,1-1 Lesión pulmonar en el donante.

Ya antes de la extracción, en el donante, el pulmón puede deteriorarse primaria o secundariamente, a consecuencia de traumatismo, proliferación de agentes infecciosos, infiltración o inflamación pulmonar, embolismo, edema pulmonar (por retención de agua secundaria al cuadro de diabetes insípida debida a la alteración de la secreción de hormona antidiurética que sigue a la muerte cerebral[47]) Durante la extracción, puede producirse lesión pulmonar secundaria a las maniobras quirúrgicas.

2,1-2 Lesión por isquemia.

El trasplante de cualquier órgano, y por ende del pulmón, supone su extracción del donante para injertarlo en el receptor. Esto exige la sección completa de las conexiones viscerales del órgano. Durante el lapso de tiempo entre la extracción y la injertación quedan interrumpidos el flujo sanguíneo y la ventilación. El pulmón sufre inevitablemente un cierto período de isquemia.

Isquemia se define como “déficit de aporte de oxígeno (O_2) con relación a las necesidades tisulares”.

2,1-3 Lesión por enfriamiento.

El enfriamiento del órgano es el método utilizado para aumentar su tolerancia a la isquemia. Sin embargo, el enfriamiento a las temperaturas precisas para atenuar la lesión isquémica es causa de lesión por sí mismo[48,49]

2,1-4 Lesión por reperfusión.

La injertación o reimplante del pulmón en el receptor significa la reconstrucción de las conexiones viscerales fundamentales del órgano: arteria y venas pulmonares, y vía aérea. La vasculatura bronquial, dependiente de la circulación sistémica, habitualmente no se reconstruye. Tampoco se

reconstruye la inervación pulmonar. No se conoce el impacto deletéreo que la falta de circulación bronquial puede producir en el pulmón implantado[50]

El reimplante del órgano se sigue inmediata y súbitamente de la reperfusión y reventilación del mismo. La reperfusión es causa de nuevas lesiones pulmonares, provoca mayor deterioro estructural y funcional del que el órgano presentaba sólo por isquemia y enfriamiento[45-49,51]

Obviamente, no habría lesión por reperfusión si no hubieran lesiones previas por isquemia. Es decir, si el órgano no hubiera sufrido isquemia, o no hubiera sufrido ningún cambio o daño durante la fase de isquemia, no ***debería*** haber lesión por reperfusión[45]

2,1-5 Complicaciones en el receptor.

Después del reimplante, pueden presentarse en el receptor las complicaciones específicas de la cirugía del trasplante (ver **1,3-4A**) y/o cualquiera de las complicaciones propias de la cirugía torácica convencional, como hemorragia, infección, derrame pleural, atelectasia, etc. Toda complicación es causa de cierto grado de fracaso del injerto.

En el transplante unilateral, el pulmón nativo, aunque no ha sido sometido a isquemia ni a maniobras quirúrgicas, no está

exento de sufrir complicaciones, como neumonía, hiperdistensión, atelectasia, entre otras[52] Además, puede sufrir lesión por reperfusión, al ser también órgano diana, debido al carácter sistémico de la respuesta inflamatoria desencadenada por el pulmón trasplantado[53,54]

2,2 EL PROBLEMA CLÍNICO.

El trasplante de pulmón presenta en la clínica dificultades específicas que le confieren un carácter único. El hígado o el riñón transplantados, por ejemplo, puede sufrir cierta pérdida de función sin que ello conlleve síndrome de insuficiencia orgánica. Por el contrario, al pulmón trasplantado se le exige que sea capaz de asumir por completo y desde el primer momento su función normal o casi normal.

El pulmón, inmediatamente tras ser reimplantado, debe ser capaz de aceptar todo, (trasplante doble) o la mayor parte, (trasplante unipulmonar) del gasto cardíaco, con presiones de perfusión pulmonar que sean tolerables para el ventrículo derecho, e igualmente debe poder ser ventilado con facilidad, con aceptables presiones en vía aérea para un volumen corriente adecuado.

La mecánica respiratoria y la fisiología pulmonar así lo determinan[55,56] Cualquier lesión pulmonar, por pequeña que sea, provocará un cierto grado de alteración de la mecánica

ventilatoria y/o de la perfusión pulmonar, con deterioro de la capacidad del injerto de intercambiar gases, aumento de la diferencia alveolo - arterial de oxígeno (A-a O_2) y progresión a la insuficiencia respiratoria.

La lesión por isquemia – reperfusión (I/R) se manifiesta clínicamente en el post-operatorio inmediato como fracaso agudo del injerto. Se presenta como incapacidad del órgano para asumir su función de intercambio de gases, dificultad en la ventilación del pulmón por disminución de la distensibilidad, aumento de la resistencia vascular pulmonar con/sin hipertensión, y aparición de opacidades pulmonares en la radiología de tórax, todo lo cual no es sino la expresión de la formación de edema intersticial y alveolar, y de la infiltración del órgano por células inflamatorias[45-49]

Ya en 1986 **FJ.Veith** y **CM.Montefusco**[57] publicaron lo que denominaron como "respuesta al reimplante" para referirse al cuadro clínico anterior de insuficiencia respiratoria post-operatoria precoz por fracaso agudo del injerto, el cual, además de la lesión por I/R incluye en el diagnóstico diferencial a otros problemas graves del post-operatorio inmediato del paciente trasplantado pulmonar, como son el rechazo hiperagudo, agudo, y/o la infección pulmonar[58-60]

Además, es posible que la lesión pulmonar aguda post-reimplante pueda predisponer o facilitar el desarrollo de problemas de rechazo agudo y/o crónico, incluida la

bronquiolitis obliterante, al inducir un incremento en la expresión de los antígenos de clase II del complejo mayor de histocompatibilidad[61-63] si bién algunos autores niegan este efecto[64]

Como causa de fracaso agudo del injerto, complicación de elevada morbi-mortalidad, la lesión por I/R suponen actualmente una limitación importante para un más amplio desarrollo clínico del transplante de pulmón[45] La tolerancia del pulmón a la isquemia cálida o normotérmica sin preservación es de apenas una hora[65] Los métodos actuales de preservación pulmonar permiten mantener el órgano en isquemia durante un período de 4 a 6 horas[45,46,66] Este margen de tiempo resulta ser excesivamente corto para la utilización óptima de un recurso escaso y valioso como son los pulmones humanos aptos para trasplante.

2,3 MECANISMOS DE LESIÓN Y DE ADAPTACIÓN A LA ISQUEMIA Y AL ENFRIAMIENTO.

2,3-1 Mecanismos de lesión por isquemia.

La consecuencia inmediata del cese de la perfusión pulmonar es la interrupción del normal intercambio hídrico, electrolítico y de sustratos metabólicos entre el árbol vascular y el espacio intersticial, y entre éste y las células. Cesa también la perfusión del órgano por células hemáticas. Al estar fuera de su cavidad orgánica, el pulmón adquiere la temperatura del

ambiente. Al suspenderse también la ventilación, cesa todo aporte de O_2 a las células.

El O_2 es el aceptor último de los electrones en la cadena respiratoria (fosforilación oxidativa) mitocondrial. La falta de oxígeno paraliza la cadena respiratoria y el ciclo de Krebs. Se paraliza, por tanto, la producción aerobia de adenosín trifosfato (ATP) Se estimula entonces la glucógenolisis y la glicólisis (efecto Pasteur)[67] La síntesis de ATP queda a expensas de la glicólisis anaerobia, capaz de rendir sólo el 5% de los moles de ATP que rinde la fosforilación oxidativa completa de igual cantidad de glucosa. El metabolismo anaerobio supone la producción y acumulación de ácido láctico, capaz de atravesar la membrana celular y de salir de la célula, con la consiguiente disminución del pH intra y extracelular. Se ha demostrado que la acidosis puede alterar la estabilidad se los lisosomas, e inducir rotura de los mismos y lesión celular[68]

El ATP es el suministrador universal de energía de utilización inmediata en la célula. La síntesis limitada de ATP hace que disminuya rápidamente la carga energética celular, esto es, la relación entre las concentraciones intracelulares de ATP, adenosín difosfato (ADP) y adenosín monofosfato (AMP)[69] En consecuencia, las funciones celulares que precisan energía, (ATP dependientes) quedan rápidamente afectadas. Tales son la contracción muscular, la síntesis proteica y de ácidos nucleicos, y el transporte de iones en contra de gradientes de concentración, eléctricos u osmóticos transmembrana. Los

procesos celulares regenerativos y generativos no pueden llevarse a cabo, con lo que aparece lesión primero y necrosis después.

El pulmón es un órgano muy sensible a la isquemia[65,66,70,71] Las lesiones pulmonares, inicialmente reversibles, aparecen ya entre los 20 y 30 minutos de isquemia cálida o normotérmica[70,71] Estas lesiones iniciales consisten en ingurgitación celular por entrada de agua al interior de la célula, agua que acompaña la entrada de iones sodio (Na^+) y calcio (Ca^{++}) Al fracasar la bomba sodio/potasio dependiente de ATP, (Na^+/K^+ ATPasa) la célula es incapaz de evacuar el Na^+ que entra pasivamente a favor de gradientes de concentración, y es incapaz de retener ión potasio (K^+) que sale de la célula también pasivamente. Al entrar relativamente más Na^+ del K^+ que sale, se va perdiendo el potencial eléctrico transmembrana (en condiciones normales, el exterior celular es ligeramente positivo con relación al interior) y se irán perdiendo, consiguientemente, aquellas funciones que dependen directamente de la normalidad del mismo, como la excitabilidad, o la transmisión de potenciales de acción[68-71] La entrada de Na^+ al interior celular arrastra ión cloruro (Cl^-) a favor de gradiente eléctrico y ambos arrastran agua a favor de gradiente osmótico, con lo que la célula se ingurgita[72]

La carencia de ATP deteriora también la función de los canales del Ca^{++}. La entrada de Ca^{++} a favor de gradiente de concentración al interior de las células (las concentraciones

citosólicas de Ca^{++} son del orden de 10^{-7} molar y las del líquido extracelular de 10^{-3} molar) induce la activación de encimas calcio-sensibles, como la lipasa A_2 y proteasas, las cuales pueden iniciar procesos de degradación proteica y de las membranas de fosfolípidos[68,71]

A los 90 – 120 minutos las lesiones son ya irreversibles. El hecho de que la lesión sea o no reversible depende fundamentalmente de la depleción intracelular de nucleótidos de adenosina: Los nucleótidos (ATP, ADP y AMP) no pueden atravesar la membrana celular, pero sí lo hace le nucleósido, la adenosina, producto del nucleótido al perder su último grupo fosfato. La adenosina se degrada aún más a inosina, xantina e hipoxantina, y ésta finalmente a ácido úrico. Si ha habido pérdida masiva de adenosina será imposible, por falta de sustrato disponible, recuperar las concentraciones intracelulares normales de nucleótidos y así, la carga energética celular, incluso aunque se restablezcan las condiciones de aerobiosis[68-71]

2,3-2 Mecanismos metabólicos de adaptación celular a la hipoxia.

La respuesta celular a la hipoxia se ha estudiado en modelos experimentales de células en cultivo. Parece que las células son capaces de una cierta regulación del metabolismo en respuesta a presiones parciales bajas de O_2 especialmente si han sido sometidas previamente a una cierta adaptación a la hipoxia,

es decir, si la hipoxia se ha producido de forma lenta y progresiva[73-75]

La regulación metabólica consiste básicamente en una inhibición de la fosforilación oxidativa, que precisa O_2 como aceptor de electrones, acompañada de la inhibición simultánea y complementaria, de ***algunas*** de las funciones celulares que precisan ATP. En concreto, quedan inhibidas la síntesis proteica, de urea y la neoglucogénesis (esto último ha sido observado en hepatocitos aislados)[74] Por el contrario, aunque las demandas de ATP para la bomba Na^+/K^+ ATPasa se reducen también, su supresión en términos porcentuales es inferior a la de la inhibición general del metabolismo del ATP. El resultado es que la bomba Na^+/K^+ ATPasa consume hasta un 75% del total de gasto celular de ATP. En definitiva, ***se inhiben de modo selectivo las vías metabólicas de gasto de ATP***: Quedan fuertemente inhibidas aquellas funciones que no son imprescindibles de modo inmediato para mantener la viabilidad celular. De ese modo, las células intentan desviar el poco ATP disponible para su utilización en aquellas funciones que no admiten suspensión. Las células intentan a toda costa mantener inalteradas aquellas condiciones que son absolutamente críticas para su propia integridad, condiciones que son exactamente, el mantenimiento de la permeabilidad selectiva de iones por parte de la membrana citoplásmica, por tanto, el mantenimiento de las diferencias normales de concentración de iones entre el interior y el exterior celular, y consiguientemente, de la diferencia de potencial eléctrico transmembrana celular, y del equilibrio

osmótico. Como mecanismo a nivel molecular, **NS.Chandel**[75] ha sugerido que la encima citocromo oxidasa mitocondrial puede funcionar como sensor de la falta de oxígeno, y como inductor de los mecanismos antes citados de adaptación reversible a la hipoxia tisular.

2,3-3 Mecanismos de lesión por enfriamiento.

El enfriamiento provoca un enlentecimiento general del metabolismo. La mayoría de las encimas de animales homeotermos muestran una disminución de su actividad a la mitad por cada 10 grados centígrados de descenso de la temperatura[68] Al disminuir la actividad metabólica, el enfriamiento produce el efecto deseado de disminuir las necesidades celulares de energía y, por tanto, de ATP, aumentando de ese modo la tolerancia del órgano a la isquemia.

El enfriamiento ***enlentece pero no detiene*** el metabolismo. Durante preservación pulmonar fría, se ha demostrado consumo de O_2 y eliminación de anhídrido carbónico (CO_2) que se origina en el ciclo de Krebs como producto de la oxidación de los residuos de carbono, incluso a temperaturas tan bajas como 10ºC[76-78]

Está demostrado que el enfriamiento brinda una extraordinaria protección, puesto que el tiempo de exposición necesario para causar lesión isquémica a bajas temperaturas excede francamente del requerido para producir lesión por

isquemia cálida[45] Sin embargo, el enfriamiento puede ser lesivo en sí mismo. La presencia de lesiones adicionales a las propias de la isquemia caliente, sugiere que existen mecanismos lesionales que son propios del frío intenso[48,49]

El frío ***enlentece el metabolismo de forma no selectiva***[48,49] El enfriamiento interrumpe ***también*** los mecanismos de inhibición selectiva que la célula despliega frente a la hipoxia. Durante la fase de frío, se enlentece la producción de ATP, incluso en presencia de suficiente O_2. Parece que hay una inhibición por frío de la fosforilación oxidativa, mediada por la entrada de Ca^{++} en la mitocondria[49] La eficiencia de la bomba de Na^{+}/K^{+} queda reducida con el frío, por lo que la entrada de iones y la ingurgitación celular acompañante son fenómenos más intensos en la isquemia fría que en la normotérmica[68] Se inhibe la síntesis proteica, por lo que de nuevo los mecanismos normales de regeneración y reparación celular estarán también limitados. También lo estarán las encimas de la glucólisis anaerobia. Es posible que los mecanismos de adaptación que sobre el metabolismo energético induce la isquemia cálida, no sean exactamente superponibles a lo que sucede en isquemia fría. En este sentido, algunos autores han apuntado la posibilidad de que los ácidos grasos y/o los cuerpos cetónicos sean preferibles como sustratos del metabolismo energético a la glucosa en condiciones de hipotermia intensa[79]

Finalmente, el cambio de fase del agua líquida a sólida puede ser lesivo no sólo a nivel del citoplasma, sino

especialmente a nivel de las membranas y/o del citoesqueleto[80] La formación de cristales de hielo se inicia a los 4ºC, lo que puede ser causa de rigidez de las estructuras celulares y secundariamente de lesión. En concreto, aunque la temperatura de congelación de las membranas de fosfolípidos no se conoce, es posible que esté por encima de la de congelación del agua. De ser así, a temperatura de 4 ó 5ºC, puede que las membranas de fosfolípidos se hayan solidificado, o simplemente hayan perdido flexibilidad y se hagan más frágiles, lo que podría dar lugar a roturas o desgarros de la membrana citoplásmica, nuclear o de las organelas intracitoplasmáticas[80]

2,3-4 Mecanismos metabólicos de adaptación al enfriamiento.

Los mecanismos de adaptación metabólica al frío ambiental intenso, esto es, a temperaturas ambientales que pueden llegar incluso a ser inferiores a la temperatura de congelación del agua, han sido estudiados por **PW.Hochachka**[81] en insectos y en batracios.

Aquí es preciso hacer notar que son estos animales que adquieren siempre la temperatura ambiental, puesto que carecen de mecanismos fisiológicos de homeotermia, esto es, de conservación de la temperatura interna, mecanismos que han sido desarrollados solamente por mamíferos y aves.

Se ha observado que algunos insectos y batracios son capaces de sobrevivir a una situación de frío ambiental tan intensamente crítica que es en apariencia incompatible con la vida. El cuerpo de estos animales puede llegar incluso a congelarse. El cambio metabólico básico observado en estas situaciones es que los animales se hacen intensamente diabéticos. Grandes cantidades de glucosa, cuerpos cetónicos y polialcoholes son vertidos a la sangre (batracios) o hemolinfa (insectos), hasta concentraciones que alcanzan incluso los 3,000 mMol/litro[81] Esta situación de hiperosmolaridad les hace resistentes a la congelación por descenso crioscópico del punto de congelación de sus líquidos internos. Esto es, en solución, la temperatura de congelación del solvente, (en este caso el agua) desciende con relación a la temperatura de congelación del agua pura, tanto más cuanto mayor es la concentración de soluto/s, y dependiendo de un valor específico y constante para cada soluto, el descenso crioscópico molar, que se define como el “descenso de temperatura (con relación a 0ºC) que se precisa para congelar una solución de este soluto a concentración 1 molar”.

Estos mecanismos de defensa frente al frío intenso son, en realidad, extremadamente sutiles. La glucosa, que permanece básicamente fuera de las células, hace las veces de impermeante, es decir, retiene agua en el espacio extracelular, intentando evitar la ingurgitación celular que se sigue de la inhibición de la bomba Na^+/K^+. Por contra, los cuerpos cetónicos y los alcoholes, al poseer grupos químicos anfipáticos, hidrófilos y

lipófilos, pueden atravesar libremente las membranas lipídicas, estabilizándolas así, y pueden distribuirse uniformemente por ambos espacios intra y extracelular. De ese modo, incrementan la osmolaridad simultáneamente y por igual intensidad en ambos espacios, sin provocar cambios secundarios de arrastre de agua y/o electrólitos por gradiente osmótico y/o eléctrico. Además, los grupos alcohol, al fijar el agua, aumentan la cantidad de agua ligada (no congelable) con lo que pueden evitar la formación de cristales de hielo e interrumpir su progresión espacial. Finalmente, estabilizan la estructura tridimensional de las proteínas y consiguientemente, su función[81]

Es preciso hacer notar una diferencia importante que separa la observación realizada por **PW.Hochachka** de la práctica clínica de preservación de órganos por enfriamiento. Esta última se realiza mediante perfusión fría del órgano por vía vascular, lo que consigue un enfriamiento rápido o casi inmediato del mismo. No hay tiempo de adaptación. Por el contrario, los descensos de temperatura que sufren los animales en su medio ambiente natural son graduales, siguen la velocidad del tiempo atmosférico. Los animales detectan el descenso de temperatura y gozan de un margen de tiempo durante el que modificar su situación metabólica para adaptarse a la situación crítica que se avecina. Lo mismo puede afirmarse de la reperfusión. No hay en la clínica una fase de recalentamiento gradual y progresivo, como sucede a los animales en su medio. El órgano preservado pasa abruptamente de una temperatura extremadamente baja, de 4ºC ó 5ºC, a ser perfundido a 36ºC sin que apenas medie tiempo alguno de

"desadaptación". El choque térmico al que el órgano es sometido es muy intenso, y podría ser lesivo per se, incluso en la situación, hipotética, de que no hubiera lesión orgánica ninguna durante la fase de isquemia fría previa[82]

2,4 MECANISMOS DE LESIÓN POR REPERFUSIÓN.

2,4-1 Lesión celular y tisular.

La lesión celular y orgánica que comienza a producirse en la fase de isquemia/enfriamiento se incrementa en la de reperfusión. Se han realizado estudios histológicos de pulmón tras el período de isquemia (cálida o fría) antes de la reperfusión[83] y/o después de la misma[51,84] Tras preservación fría, la lesión histológica se caracteriza por adelgazamiento de las células endoteliales y de los neumocitos tipo I, y agregación de los cuerpos lamelares en los neumocitos tipo II. Aparece edema perivascular y peribronquiolar, y engrosamiento de la membrana basal con roturas ocasionales de la continuidad de la membrana alveolo-capilar. Las alteraciones se hacen más intensas a medida que aumenta el tiempo de preservación[51,84] Parecidos hallazgos han sido referidos para pulmones humanos[51,84,85]

La reperfusión de un órgano sometido a isquemia con o sin enfriamiento, produce intensificación y progresión de sus lesiones estructurales. En el caso del pulmón, las estructuras

diana de la lesión por reperfusión son fundamentalmente las células endoteliales y los neumocitos tipo I y II[51,76-78,83-99] A las veinticuatro horas de reperfusión in-vivo hay edema intersticial, alveolar, congestión vascular difusos, y hemorragia intraalveolar, ésta última de distribución irregular[91] Muy importante, estas alteraciones está ya presentes en el pulmón a los cinco minutos de reperfusión[94] A las veinticuatro horas de reperfusión, el endotelio vascular presenta pérdida de la conexión intercelular. Las roturas de la continuidad de la membrana alveolo – capilar se hacen más intensas y generalizadas, presentando numerosos agujeros. Las células del epitelio bronquial muestran signos de degeneración y pérdida de cilios tras isquemia, alteraciones que se mantienen a los cinco minutos de reperfusión, pero que parecen reversibles tras veinticuatro horas de reperfusión[94]

Tras treinta días de reperfusión in–vivo, los pulmones mostraron signos de inflamación crónica, cicatrización, e infiltración por abundantes macrófagos cargados de hemosiderina. El endotelio aparece como normal en aquellas arterias que han sido correctamente preservadas, o contrariamente, presentan fibrosis parietal y distorsión de la luz vascular[94]

También han sido estudiadas las alteraciones ultraestructurales de mitocondrias de las células epiteliales del bronquio[95] y del endotelio[96] Las lesiones mitocondriales consisten en distorsión de las crestas de la lámina interna, ingurgitación y alteraciones de la cromatina[95,96] Como criterio

morfológico de lesión mitocondrial se ha usado la ingurgitación del mitocondrión, medido como relación entre superficie y volumen de la mitocondria[97] Los autores de estos estudios concluyen que puede establecerse una relación significativa entre el grado de degeneración mitocondrial sobre la disfunción del pulmón a la reperfusión[95-97]

Igualmente, la intensidad de las alteraciones ultraestructurales descritas en los cuerpos lamelares de los neumocitos tipo II[98] parecen tener una relación inversa con el rendimiento funcional del injerto tras el reimplante[99]

2,4-2 Producción de radicales libres del oxígeno.

Los efectores últimos –moleculares- de la lesión por reperfusión pulmonar son los “radicales libres del oxígeno” o “especies reactivas del oxígeno” (ROS, reactive oxygen species) Estos incluyen el radical superóxido, ($O_2 \cdot^-$) el radical hidroxilo, (OH·) el peróxido de hidrógeno o agua oxigenada, (H_2O_2) y el oxígeno monoatómico (O). Los ROS se caracterizan por poseer electrones no emparejados, que son responsables de su alta reactividad química oxidante y consecuente capacidad lesiva[71,100]

En condiciones normales, los ROS son producidos en escasa cantidad en las mitocondrias y liberados al citosol. También se producen en el citoplasma de las células endoteliales durante la

síntesis de prostaglandinas, y por leucocitos (neutrófilos y macrófagos) activados. Normalmente, los ROS no causan lesión, pues son rápidamente degradados a O_2 y H_2O por tres sistemas encimáticos. La encima superóxido dismutasa (SOD) cataliza la trasformación del $O_2\cdot^-$ en H_2O_2 y H_2O. Las encimas catalasa y glutation peroxidasa catalizan la destrucción del H_2O_2 en H_2O y O_2[100]

En la lesión por isquemia y reperfusión, los ROS se constituyen en efectores últimos de la lesión a nivel molecular. En I/R el origen de los ROS es doble. Durante la hipoxia, algunos de los cambios metabólicos que acontecen en el órgano hipóxico van a conducir a un desarreglo en la producción y eliminación de los ROS. En concreto, la encima que en condiciones normales cataliza el paso de xantina a hipoxantina es la xantino deshidrogenasa. En la fase de hipoxia, esta encima se convierte en xantino oxidasa por la acción de una proteasa calcio-dependiente. Igualmente durante la hipoxia se producen cantidades anormalmente elevadas de xantina e hipoxantina por degradación de ATP, por mecanismos ya comentados anteriormente. En el momento de la reperfusión, la xantino oxidasa produce $O_2\cdot^-$ siendo los sustratos metabólicos la hipoxantina producida durante la isquemia y el O_2 aportado en la reperfusión. El radical $O_2\cdot^-$ aunque es en sí mismo relativamente inocuo, reacciona a su vez con el H_2O_2 para producir radical OH· y oxígeno monoatómico. Estas dos últimas especies químicas, altamente reactivas y peligrosas, son capaces de causar daño e incluso muerte celular por ataque oxidativo al DNA, que pierde

su estructura normal, a las proteínas, provocando inactivación encimática, y por peroxidación lipídica de los lípidos poliinsaturados, causando rotura de las membranas e inactivación de los sistemas encimáticos ligados a membranas[71,100-104]

La lesión celular así iniciada induce la activación de las células blancas (neutrófilos y macrófagos) las cuales se constituyen en el eje central de la respuesta inflamatoria que se desencadena[105,106] Las células blancas activadas son también productoras de ROS mediante un mecanismo calcio-dependiente[70,71,100-107]

2,4-3 Infiltración pulmonar por células inflamatorias.

Tanto los neumocitos como las células endoteliales dañadas son productoras y liberadoras de factores mediadores de la inflamación, citocinas e interleucinas[105-126]

Factores mediadores de la inflamación son los eicosanoides, grupo de sustancias biológicamente activas que se generan a partir del ácido araquidónico, constituyente normal de las membranas celulares y que se libera por acción de la fosfolipasa A_2. Por la llamada “vía de la ciclooxigenasa”, a partir del ácido araquidónico van a producirse tromboxano A_2 y B_2 (TxA_2 y TxB_2) prostaciclina (PGI_2) y prostaglandinas, PGD_2 PGE_2 y $PGF_{2\text{-alfa}}$. También a partir del ácido araquidónico, por la “vía de la lipooxigenasa” se originan los leucotrienos, LTA_4 LTB_4 LTC_4 LTD_4 y

LTE_4[108] El factor de activación plaquetaria (PAF, platelet activating factor) es también sintetizado a partir de lípidos, en este caso por acción de la lipasa A_2[107,108] Otras citocinas liberadas son el factor alfa de necrosis tumoral (TNF-alpha, tumor necrosis factor-alpha) interferón gamma, e interleucinas IL-1, Il-2, IL-6, IL-8[109-116] La liberación de estos mediadores resulta en el reclutamiento exponencial, en cascada, del segundo componente de la lesión por reperfusión, la respuesta inflamatoria, con activación leucocitaria, del sistema complemento y de la coagulación[104-126]

La activación del sistema complemento lleva a la liberación de C3a y C5a que pueden aumentar la permeabilidad vascular, causar contracción del músculo liso, inducir quimiotaxis y migración de leucocitos, opsonización y fagocitosis, y provocar agregación plaquetaria. Las proteínas terminales del complemento forman el complejo terminal C5b-C9, el cual capaz de provocar lisis celular por ataque directo a la membrana[117,118]

La inflamación produce aumento de la permeabilidad vascular, secuestro leucocitario, agregación plaquetaria, e infiltración del órgano y lesión inflamatoria por leucocitos, macrófagos, y plaquetas activados/as. Se cierra así un círculo vicioso lesivo, puesto que la respuesta inflamatoria está originada por, y dirigida contra el órgano injertado[104-126]

La importancia e intensidad de la lesión por los mecanismos sistémicos de inflamación queda patente con la demostración de

que, tras trasplante unipulmonar, la lesión post reperfusión desencadenada por el pulmón trasplantado, afecta también al pulmón nativo, sin que éste haya sufrido hipoxia, reperfusión, ni trauma quirúrgico[53,54]

2,4-4 Disfunción endotelial y vascular.

En condiciones normales, las células endoteliales resultan claves en la regulación del tono vasomotor y en el mantenimiento de la homeostasis vascular. La lesión endotelial en la isquemia y reperfusión produce alteración de la fisiología endotelial[127,128]

A nivel intracelular, y dependiendo del receptor que haya sido estimulado, las sustancias efectoras de la relajación del músculo liso vascular son el adenosín mono fosfato 3´5´ cíclico (3´5´cAMP) y el guanosín mono fosfato 3´5´ cíclico (3´5´cGMP)[71] En condiciones normales, el óxido nítrico (NO) es continuamente sintetizado y liberado por el endotelio. En el interior de las células musculares lisas, el NO activa la guanilato ciclasa, encima que cataliza la producción de 3´5´cGMP, el cual efectúa la relajación muscular, y consiguientemente, la disminución del tono y de la resistencia vasculares[127-129] Se ha demostrado inhibición del NO en la reperfusión[71,129,130] Junto a la acción vasodilatadora, el NO posee, además, actividad antiinflamatoria, pues inhibe la adhesión y diapedesis neutrófila, y la agregación plaquetaria[129-133]

Profundizando en el mecanismo de acción del NO, en un estudio realizado en un modelo de trasplante de pulmón en rata, se observó que los efectos preservantes de la nitroglicerina (sustrato metabólico en la producción de NO) adicionada a la solución de preservación, fueron mejores que si se adicionaba hidralacina, aunque esta última poseyera un efecto vasodilatador más potente, precisamente porque la primera era capaz de inhibir la reacción inflamatoria[134] Del mismo grupo es un estudio en el que se administra dibutiril AMP cíclico, compuesto análogo al 3´5´cAMP y capaz de atravesar la membrana celular. Los efectos beneficiosos observados no se limitan a la simple vasodilatación[135]

Sin embargo, el NO puede también tener efecto deletéreo en I/R. En determinadas condiciones de pH acidótico e hiperoxia, el NO puede reaccionar con el $O_2^{\cdot -}$ con producción de peroxynitrito ($ONOO^-$) el cual puede inducir muerte celular por toxicidad directa o por inducción de apoptosis[130,136,137]

En resumen: ingurgitación y rotura celular, edema intersticial y taponamiento intraluminal por agregados y/o restos celulares son alteraciones morfológicas características de la isquemia-reperfusión que contribuyen al deterioro de la conductancia vascular. A ello debe adicionarse la disregulación funcional del tono vasomotor pulmonar por inhibición del NO, potente vasodilatador, y por la liberación, por parte de leucocitos y plaquetas activadas, de péptidos vasoactivos y otras sustancias vasoconstrictoras, como la serotonina[138] y el

tromboxano A_2, éste último generado en el catabolismo de los lípidos por la vía de la ciclooxigenasa, fenómenos todos ellos que son característicos de la respuesta inflamatoria que ha sido desencadenada.

2,4-5 Alteración del surfactante pulmonar.

El surfactante pulmonar está compuesto de una mezcla de proteínas y fosfolípidos, el más importante de los cuales es la dipalmitoil-fosfatidilcolina. El surfactante, producido por los pneumocitos tipo II y secretado al interior de la luz alveolar, tapiza la faz aérea de la membrana alveolo – capilar. Su función es disminuir la tensión superficial de la interfase líquido-gaseosa en el interior del pulmón, lo que evita el colapso de unidades alveolares en la espiración y facilita la expansión pulmonar en la inspiración, es decir, aumenta la distensibilidad pulmonar, disminuyendo así el trabajo respiratorio[139] Posee también función inmunológica de defensa física frente a partículas y microorganismos inhalados[139]

Cada vez más se está reconociendo el papel que la lesión específica de los neumocitos tipo II y/o el deterioro de la composición, función o metabolismo del surfactante pulmonar pueden jugar como mecanismos de lesión en la isquemia-reperfusión[139-142]

Es de suponer que, durante el período de isquemia – enfriamiento, la síntesis de surfactante está inhibida en el marco general de la inhibición metabólica que produce el enfriamiento. En el momento de la reperfusión, el déficit de surfactante empeora, en tanto son lesionados los neumocitos tipo II, y en tanto los fosfolípidos constituyentes del surfactante hayan sido objeto de peroxidación por los ROS.

Sea cual sea el/los mecanismo/s exactamente implicados, la alteración cuantitativa y/o cualitativa del surfactante va a provocar disminución de la distensibilidad pulmonar. El pulmón precisará mayores presiones en la vía aérea para poder ser ventilado. Habrá más facilidad para que se produzcan zonas de atelectasia. El déficit de surfactante favorece y se acumula a los demás factores que conducen al fracaso agudo del injerto.

SUMARIO

- La lesión por isquemia / reperfusión es actualmente la causa más frecuente de fracaso agudo del injerto.

- La isquemia desencadena la paralización de la producción aerobia de adenosín tri-fosfato (ATP) el suministrador universal de energía de utilización inmediata en todas células.

- El enfriamiento del órgano a trasplantar es el método más aceptado de protección frente a la lesión por isquemia. Sin embargo, el enfriamiento intenso es lesivo en sí mismo.

- La lesión por reperfusión se caracteriza por lesión endotelial y de los neumocitos tipo I y II, lo que desencadena respuesta inflamatoria por leucocitos, macrófagos y plaquetas activados, con infiltración pulmonar y lesión mediada por radicales libres de oxígeno, disfunción vasomotora y alteración del surfactante pulmonar.

CAPITULO 3º

PRESERVACIÓN PULMONAR.

3,1 CONCEPTO.

En los primeros trasplantes de pulmón, donante y receptor se hallaban ubicados en el mismo centro hospitalario, en quirófanos adyacentes, con el objeto de minimizar el tiempo de isquemia y la lesión subsiguiente[143] El órgano, tras ser extraído del donante, era inmediatamente injertado en el receptor, por lo que, con este método, no se puede hablar propiamente de preservación. Esta práctica presenta serias dificultades logísticas y financieras. Supone que, o bien sólo podrán ser trasplantados pulmones donados por enfermos de un mismo centro hospitalario, o bien que debe trasladarse el donante en situación de muerte clínica, (no el órgano aislado) al centro en que se realizará el trasplante. Ambas posibilidades imponen límites rigurosos a su realización.

Incluso en esta situación aparentemente óptima, el tiempo de isquemia puede alargarse entre 60 y 90 minutos, desde que el hilio pulmonar es clampado en el donante hasta que es reconstruido en el receptor, tiempo precisado por las maniobras de la cirugía[143] Esta práctica clínica ha sido abandonada.

La otra alternativa es transportar el órgano aislado o en bloque junto con otros órganos. Ello requiere de algún/os método/s de preservación.

CONCEPTO.

Por "preservación" deben entenderse el "conjunto de técnicas y/o tratamientos cuyo objetivo es el mantenimiento estructural y funcional del órgano que se transplanta".

3,2 DESARROLLO HISTÓRICO.

Hasta el momento, los métodos de preservación pulmonar que han sido utilizados son:

3,2-1 Inmersión hipotérmica simple.

Consiste en la introducción del órgano, inmediatamente después de su extracción, en una solución de preservación a baja temperatura, (aproximadamente 4º centígrados) en un recipiente térmicamente aislado[46] Este método fue utilizado por el grupo de Toronto en sus primeras series de trasplante[4]

Sin embargo, ya en 1988, un estudio experimental en cerdos en el que se utilizó solución de preservación Euro-Collins, demostró la superioridad de realizar el enfriamiento por perfusión fría versus por simple inmersión hipotérmica[144] Más recientemente, otro estudio experimental también en cerdos, utilizando solución Low-Potassium Dextran, ha informado del

mantenimiento del pulmón en inmersión fría, durante doce horas con función pulmonar aceptable tras reperfusión[145]

Actualmente, en la práctica clínica, la inmersión hipotérmica se precede de enfriamiento rápido del pulmón por perfusión fría[45,46]

3,2-2 Preparación cardio-pulmonar autoperfundida.

Este modelo, inicialmente diseñado para estudios fisiológicos experimentales[146] fue adaptado para preservación cardiaca, pulmonar y/o cardio-pulmonar por el grupo de Pittsburg[147] Este grupo publicó en 1991 los resultados de un ensayo clínico comparando preservación del bloque autoperfundido versus preservación por perfusión hipotérmica con solución Euro-Collins, con mejores resultados para el primer grupo[148]

El método consiste en la extracción en bloque y preservación conjunta del corazón y los pulmones. Las arterias coronarias son perfundidas a normotermia por sangre del donante, la cual es impulsada por el corazón funcionante que se autorregula. Se precisa de un reservorio de estabilización entre la aorta y la aurícula derecha, reservorio que hace las veces de circulación sistémica. El reservorio se coloca un metro por encima de la válvula aórtica, y determina la presión en la aorta. El flujo desde el reservorio a la aurícula derecha determina el retorno venoso, el flujo arterial pulmonar y el

volumen latido. Los pulmones se ventilan a 4 litros/minuto, con aire ambiente adicionado de CO_2 al 5% ó 10%. La normotermia queda asegurada por inmersión de los órganos en una solución cristaloide en baño de órganos[149]

El bloque cardio-pulmonar autoperfundido consigue mantener buena función pulmonar y cardiaca durante unas cinco a seis horas[150] El deterioro funcional del pulmón se manifiesta por desarrollo de hipertensión pulmonar y aumento de la diferencia alveolo – arterial de O_2. Como mecanismos de lesión pulmonar, se ha demostrado activación del sistema complemento, agregación plaquetaria y secuestro pulmonar de leucocitos, ya desde la primera hora de funcionamiento del sistema[150] Un estudio experimental no logró demostrar ventajas del sistema de autoperfusión versus enfriamiento interno del donante en by-pass cardio-pulmonar[151]

Se han realizado estudios experimentales de preservación prolongada y de investigación de los requerimientos metabólicos del bloque cardio-pulmonar autoperfundido[152,153] Se consumen ácidos grasos libres en primer lugar, después glucosa. A las 6 ó 7 horas, cuando los niveles de glucosa han caído por debajo de 10 mgr/dl el corazón entra en insuficiencia, se dilata y sufre parada. La adición de glucosa + insulina a la sangre consiguió mantener el bloque cardio-pulmonar en buenas condiciones durante 18 horas[154] Tras este período, la preparación muestra signos de contaminación bacteriana, por lo que necesita de la adición de antibióticos para conseguir su mantenimiento hasta 24 horas[154]

Otros ensayos han conseguido alargar el tiempo durante el que la preparación permanece en buen estado mediante la depleción de leucocitos en el perfusato[155,156]

Estas limitaciones, unido a la complejidad técnica y a las dificultades de índole logística que esta metodología presenta, han hecho que este método viera limitada su difusión clínica. Sólo el grupo de Pittsburg utilizó este método de preservación pulmonar en la clínica[147,148] Desde 1987 lo abandonaron a favor de la perfusión e inmersión frías[157]

3,2-3 Enfriamiento del donante en by-pass cardio-pulmonar.

El método consiste en poner al donante en by-pass cardio-pulmonar y enfriar su sangre mediante un intercambiador externo de calor, hasta que alcance una temperatura de aproximadamente 10ºC[45]

Este método permite un enfriamiento controlado de todo el organismo del donante, de modo que posibilita una extracción multiorgánica perfectamente programada y secuencial[158] Utilizar la sangre del propio donante como vehículo de la pérdida de calor es teóricamente preferible frente a cualquier otro líquido de perfusión, siendo la sangre una solución coloide con alta presión oncótica, que aporta todos los nutrientes sin excepción, y que conserva íntegros los mecanismos naturales de tampón ácido-base, y de eliminación de radicales libres del oxígeno[45]

Sin embargo, el enfriamiento por by-pass no está exento de inconvenientes importantes para la preservación del pulmón. Se sabe que el by-pass cardio-pulmonar resulta deletéreo en sí mismo para la función pulmonar, debido a que provoca liberación de citocinas, activación del sistema complemento, con secuestro y activación leucocitaria, y disfunción vasomotora[159-162] También porque durante el período de by-pass, el pulmón se encuentra en una situación de relativa isquemia, al recibir solamente sangre arterial a través de las arterias bronquiales y la poca sangre venosa que se recoge a través del seno coronario[163] Por la misma razón, el enfriamiento pulmonar es relativamente ineficiente, comparado con el que se consigue para otros órganos, como hígado o riñón[45,46] Como último y definitivo inconveniente, no es despreciable la complejidad técnica y de aparataje que se requiere, unido a que tampoco se ha demostrado superioridad en la calidad de la preservación que se consigue frente a la perfusión e inmersión frías[164-168]

3,2-4 Perfusión pulmonar fría + inmersión fría.

Consiste en la perfusión del órgano, a través de la arteria pulmonar, con una solución de preservación a baja temperatura en el momento de la extracción, e inmersión del órgano en la misma solución fría durante el período de isquemia[45,46] (Aunque teóricamente, las soluciones de perfusión y de inmersión podrían ser diferentes) Se consiguen así tiempos aceptables de isquemia de entre cuatro a seis horas[45,46]

La gran ventaja que ofrece este método es su sencillez unida a su eficacia, lo que se demostró en modelos experimentales ya desde el inicio mismo de los estudios de técnicas de preservación[167-173] La técnica es fácil y el aparataje ninguno. El pulmón es perfundido con la solución preservante durante unos cinco o diez minutos, hasta que se observa la salida de la misma por las venas pulmonares. Este método consigue un enfriamiento rápido y eficaz del órgano. Se consigue además, eliminar del interior de la vasculatura pulmonar gran parte de los elementos de la sangre que pueden resultar lesivos para el órgano, como leucocitos, plaquetas, o micro trombos de fibrina. El método de preservación se completa por inmersión del órgano ya perfundido en la solución preservante, manteniéndose a baja temperatura durante el período de isquemia.

Ventajas adicionales, pero no menos importantes que ofrece este método, son que no interfiere en los trabajos de extracción ni en la metodología de preservación de otros órganos, y que permite ensayar con facilidad variantes de la técnica y/o de la composición de la solución de preservación, tanto en modelos experimentales como clínicos.

3,2-5 Perfusión pulmonar retrógrada.

Algunos autores han llamado la atención sobre las ventajas que pueda suponer la perfusión pulmonar retrógrada, esto es,

desde la aurícula izquierda, por cuanto permite que el flujo de perfusión no sólo alcance la vasculatura pulmonar, sino la bronquial también[174-176]

En nuestro país, **A.Varela** ha estudiado y llevado a la clínica[177] esta variante de la perfusión pulmonar. En un modelo experimental en cerdos, ha comparado la distribución de macroagregados de albúmina marcada con ^{99}tecnecio, mediante incorporación de los mismos a la perfusión vía arteria pulmonar versus vía aurícula izquierda. Los resultados le permitieron concluir que la perfusión por vía retrógrada consigue una mejor distribución de la solución preservante en la pared de la tráquea y del árbol bronquial. La funcionalidad del injerto resultó mejor en el grupo de perfusión retrógrada[178-179]

3,3 PRÁCTICA CLÍNICA ACTUAL.

En la práctica clínica actual, la totalidad de los centros que transplantan pulmón realizan la preservación pulmonar mediante el método anterior de perfusión e inmersión frías[45,46]

Todos los autores resaltan la importancia de evitar que haya zonas del pulmón que no resulten bañadas por la solución de preservación y que no estén, por tanto, preservadas. Para conseguir que la distribución de la solución de preservación en los pulmones sea uniforme y completa se aconseja perfundir a

baja presión, con el pulmón insuflado y mientras está siendo ventilado[45,46,78] También se aconseja adicionar la solución con prostaciclina (PGI_2) potente vasodilatador arterial pulmonar. Se pretende con ello evitar la vasoconstricción refleja que puede provocar la perfusión del árbol vascular pulmonar[45,46]

Por lo demás, no existe unanimidad ni en cuanto al tratamiento/s que debe/n administrarse al donante, ni en cuanto a la composición del líquido a perfundir, o a las condiciones más adecuadas de almacén del órgano, ni en cómo debe hacerse la reperfusión, ni en el/los tratamiento/s en el receptor.

SUMARIO

- “Preservación” es el “conjunto de técnicas y/o tratamientos cuyo objetivo es el mantenimiento estructural y funcional del órgano que se transplanta”.

- En la práctica clínica actual, la preservación pulmonar se realiza mediante de perfusión e inmersión frías en una solución de preservación.

- Otras modalidades de preservación pulmonar o cardio-pulmonar han sido abandonadas.

CAPITULO 4º

INVESTIGACIÓN EN PRESERVACIÓN PULMONAR.

4,1 INTRODUCCIÓN. OBJETIVOS.

A los veinte años desde el inicio de los primeros programas clínicos de trasplante de pulmón, apenas sí se han introducido cambios en lo que a la metodología de la preservación del órgano se refiere. Con el sistema actual de perfusión e inmersión frías, el tiempo tolerable aceptado de isquemia de seis horas no ha podido ser alargado[180-186]

Sin duda, el reto que se considera es realmente formidable. Frente a las seis horas actuales, se trata de mantener vivo/viable un pulmón, (con mínima o sin lesión) fuera del organismo, por un período de al menos 12 horas, y conservando la simplicidad metodológica que brindan el sistema de perfusión e inmersión frías.

Queda así definido el objetivo que podría llamarse estratégico. Este es la “búsqueda de un método óptimo de preservación pulmonar”, el cual debería:

1) Mejorar la calidad de la preservación, es decir, mejorar la función del órgano post-reimplante, y/o

2) Alargar el tiempo de isquemia, al menos hasta 12 ó 24 horas, óptimamente hasta 48 ó 72 horas.

La consecución de estos dos objetivos estratégicos permitiría acceder al cumplimiento de objetivos de aplicación clínica inmediata[45,46] Sería así posible:

-Aumentar el número de donantes.

-Facilitar los aspectos logísticos del trasplante y permitir así un uso más eficiente de los recursos, con la creación de verdaderas redes de donación y compartición de pulmones.

-Realizar el tipaje prospectivo del sistema mayor de histocompatibilidad HLA.

-Practicar las intervenciones de trasplante en forma semielectiva, en vez de en las actuales condiciones de intervención urgente.

-Reducir la incidencia de complicaciones agudas y crónicas.

4,2 LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN EN PRESERVACIÓN PULMONAR.

Esta búsqueda del modo de preservación pulmonar ideal exige el rigor del método científico, el cual se caracteriza por el planteamiento inductivo de hipótesis que deben ser validadas (o refutadas) en el laboratorio primero, para poder ser aplicadas en la clínica después.

... *ay, there´s the rub* (Hamlet; III, 65) *Ahí está la dificultad*. Porque son tan numerosas las variables que de un modo u otro intervienen o pueden intervenir en el problema de la

preservación pulmonar. Son tan numerosas, y consideradas conjuntamente, producen un tan alto número de posibles permutaciones, que devienen en gran dificultad. Considérense los numerosos mecanismos interdependientes que producen lesión pulmonar en el trasplante. Considérense las posibles variaciones de la composición de la solución de preservación, variaciones en su contenido de electrolitos, en la adición o no de fármacos u otros sustancias, las diferentes condiciones de almacenamiento que se han propuesto, los muy diferentes modelos experimentales que son utilizados, los múltiples tratamientos evocados contra la lesión de reperfusión, etc. Resulta en la práctica imposible diseñar un experimento que pretenda abarcar tanta variabilidad. Hay que avanzar despacio, paso a paso.

Por ello, es necesario que la investigación en preservación pulmonar progrese gracias al trabajo paralelo de equipos de investigadores que diseñan sus experimentos siguiendo líneas de investigación que se complementan mutuamente, perfectamente definidas y aceptadas por la comunidad científica internacional[45,46] Estas son:

1.- Desarrollo y validación de modelos experimentales que permitan reproducir y estudiar la lesión por isquemia – enfriamiento – reperfusión.

2.- ¿Cómo mejorar la preservación?

La preservación pulmonar se realiza actualmente mediante perfusión e inmersión frías. Otras modalidades de preservación

pulmonar han sido abandonadas. En la última década, apenas si hay publicaciones sobre el enfriamiento simple externo o interno (by-pass) o sobre autoperfusión del bloque cardio-pulmonar[143,187-192]

En cambio, las publicaciones que versan sobre variaciones de la técnica de enfriamiento pulmonar por perfusión + inmersión fría son plétora. Tanta producción se explica por las muchas variaciones posibles que esta técnica permite, variaciones que se ramifican y multiplican, y por la complejidad de los mecanismos lesionales en I/R. Aún más, a medida que se va progresando el conocimiento de los mecanismos lesionales a nivel celular y molecular, se van definiendo paralelamente nuevas posibilidades terapéuticas que precisan ser experimentadas.

Dentro de esta línea de investigación, de modo subjetivo y solapados, podrían definirse los siguientes campos:

-Tratamiento / preparación del donante?

-¿Cómo (en qué condiciones) hay que mantener el órgano aislado?

-¿Como es el metabolismo durante la fase de preservación?

-¿Cual es la temperatura óptima de almacenamiento?.

-¿Estado de insuflación del pulmón?.

-¿Cual es la composición ideal de la solución preservante?

-¿Qué composición de electrolitos?

-¿Qué pH?

-¿Qué aditivos?:

-Impermeantes?

-Medicamentos?

-Hormonas?

-Sustratos metabólicos?

-Otros?

-Tratamiento / preparación del receptor?

-¿Cómo hacer la reperfusión?

4,3 MODELOS EXPERIMENTALES.

4,3-1 Introducción.

Así pues, la primera dificultad que se plantea en el estudio de la lesión por I/R es el desarrollo de modelos experimentales que permitan el estudio del metabolismo en isquemia cálida o fría, de los mecanismos celulares adaptativos a la hipoxia con/sin enfriamiento, de los mecanismos de lesión orgánica, y del modo de prevenirlos o atenuarlos.

Cualquier modelo experimental debe buscar la combinación de sencillez y reproducibilidad. Se han desarrollado modelos in-vitro, ex-vivo, e in-vivo. No existe un modelo “perfecto” capaz de adaptarse a todas las necesidades o exigencias de los investigadores. Cada modelo presenta sus ventajas e inconvenientes: Logísticos, de costo, de reproducibilidad, etc.

Es importante considerar que la información que rinde cada modelo queda limitada por las mismas características técnicas e

instrumentales que definen el modelo en cuestión. Es decir, el modelo experimental no es neutro en la producción de resultados. La manipulación e instrumentación que sufre (necesariamente) el objeto de estudio (en este caso, el pulmón) hace que, por una parte, los parámetros mesurables varíen de uno a otro modelo; por otra, que los resultados obtenidos no sean siempre reproducibles o concordantes al cambiar de un modelo a otro. La reacción de las células frente a un estímulo o noxa puede ser, y de hecho es, diferente según se hallen en cultivo, en el órgano aislado, en el órgano reimplantado o en el órgano intacto.

En consecuencia, al diseñar un proyecto de investigación, hay que tener presente que es preciso elegir el modelo experimental más adecuado a los objetivos concretos que se pretendan alcanzar, y es también necesario aceptar como inevitables las limitaciones que son propias del modelo que se haya elegido. Cada modelo experimental permite observar ***algunos*** aspectos del problema que se ha planteado. Nos permite ver un mismo problema desde una –su propia- perspectiva. O lo que es lo mismo, la información obtenida por diferentes experimentos se complementa, incluso en caso que los resultados se contradigan. Igualmente, es muy importante incluir en el diseño experimental un grupo control, que de validez al modelo en concreto desarrollado, y que establezca valores de referencia propios, valores frente a los que poder comparar aquellos obtenidos en los grupos experimentales. Estos comentarios conllevan una pregunta importante: ¿Cómo evaluar la calidad de la preservación?

Para dar contestación a esta pregunta, es necesario primero conocer las características fundamentales de los diferentes modelos experimentales que se utilizan en la actualidad para estudiar los fenómenos lesión por isquemia – enfriamiento – reperfusión.

4,3-2 Células aisladas en cultivo.

Este modelo consiste en mantener en cultivo neumocitos[193-195] células endoteliales[196-201] u otras[202-205]

Para obtener células pulmonares, el pulmón del animal (rata u otro) es sometido a digestión encimática por perfusión, a través de la arteria pulmonar, de sueros conteniendo sucesivamente desoxirribonucleasa, papaína, pronasa, colagenasa y elastasa. Las células pulmonares se obtienen mediante ultracentrifugación del efluente, y son mantenidas en cultivo en condiciones controladas. A los cinco días, más de un setenta por cien de las células así obtenidas mantienen su viabilidad en condiciones adecuadas de cultivo[206-207]

Ya en cultivo, pueden las poblaciones celulares ser sometidas a estímulos fisiológicos o nocivos, por ejemplo, toxinas, hipoxia, reoxigenación, hiperoxia, etc. En estos modelos, puede estudiarse la viabilidad de las células en cultivo mediante tinción exclusiva con trypan azul[193] o mediante estudios metabólicos, como el índice de síntesis de ácidos

nucleicos y/o de proteínas, mediante cuantificación de la incorporación de ^{3}H-timidina[193] y de ^{35}S-metionina[194] respectivamente. La liberación al medio de encimas intracelulares, como la encima lactato deshidrogenasa, (LDH) es indicador de lisis o necrosis celular[193,205] Las alteraciones estructurales y ultraestructurales de las células y/o organelas pueden observarse y cuantificarse mediante las técnicas habituales de microscopía óptica y/o electrónica[195,198,200,201,205] Como mayor inconveniente, es obvio que la arquitectura del órgano ha sido destruida. Por tanto, no pueden estudiarse parámetros de función pulmonar.

4,3-3 Mitocondrias aisladas en cultivo.

Las mitocondrias son aisladas de pulmones frescos que han sido previamente sometidos a isquemia y reperfusión.

La calidad de la preservación mitocondrial se valora mediante por evaluación de la fosforilación oxidativa según consumo de O_2[208]

4,3-4 Anillos de arteria pulmonar o de bronquio en baño de órganos.

El modelo consiste en obtener anillos de arteria pulmonar[209-212] o de bronquio[213] y mantenerlos viables en baño de órganos.

Se puede estudiar la respuesta (contracción / dilatación) del segmento vascular y/o de la vía aérea antes, durante y después de ser sometido a determinado estímulo: un tóxico, un fármaco, hipoxia, hiperoxia, frío, etc. Se pueden hacer estudios histológicos y metabólicos[212] En el caso de la vía aérea, es posible evaluar la motilidad ciliar[213]

La gran ventaja de estos modelos es que resulta relativamente fácil obtener fragmentos de arteria pulmonar y/o vía aérea de sujetos humanos. Por ejemplo, de pacientes que son sometidos a resección pulmonar mayor por tumor o por nódulo pulmonar de localización periférica.

4,3-5 Tiras o láminas ultrafinas de pulmón en baño de órganos.

El modelo consiste en obtener tiras o láminas de pulmón ultrafinas, cortadas a micrótomo, y mantenidas en baño de órganos. Los especimenes se mantienen viables incluso hasta 70 horas[214,215]

De nuevo, el modelo permite someter el tejido pulmonar al estímulo deseado y medir su respuesta metabólica y/o funcional. Los especímenes pueden también procesarse para estudio microscópico estructural y/o ultraestructural[214,215]

Este modelo resulta muy ventajoso en tiempo y economía. De un único animal, por ejemplo de una rata, se pueden obtener

hasta veinte especímenes, y realizar por consiguiente, otras tantas observaciones. Otra ventaja importante es que permite conservar, en parte, la estructura pulmonar y, en cierto modo, las características del órgano completo[214,215]

El método no está exento de cierta complejidad y dificultades. Las láminas obtenidas tienen que ser realmente ultrafinas, (250 ± 20 micras) puesto que, en caso contrario, los vasos pulmonares y las vías aéreas son cortados en bisel, lo que dificulta o imposibilita la lectura fiable del experimento[214,215]

Como ya se comentó antes, el gran inconveniente que comparten todos los modelos in–vitro es que los resultados obtenidos no siempre son reproducibles en modelos ex-vivo o in-vivo frente al mismo estímulo. La manipulación inherente al modelo, al privar al segmento de tejido de sus relaciones normales en el órgano completo, y por tanto, al privarle de los mecanismos reguladores normales humorales y/o nerviosos, locales y/o sistémicos, le confieren tan inconveniente variabilidad. El ámbito de validez de las conclusiones queda restringido al propio modelo experimental.

4,3-6 El pulmón aislado y perfundido ex vivo.

4,3-6A El pulmón aislado y perfundido como instrumento de experimentación.

El modelo experimental de pulmón aislado y perfundido ex–vivo (IPL - Isolated and Perfused Lung) consiste en extraer el

bloque cardio-pulmonar del animal tras haber cateterizado la tráquea, arteria pulmonar y aurícula izquierda, siendo entonces ventilado y perfundido en condiciones controladas[216,217] Las ramas pulmonares de los vagos, y la circulación arterial bronquial quedan seccionadas, y el drenaje linfático se interrumpe. No quedan claras las consecuencias deletéreas que ello pueda suponer sobre la función del pulmón aislado[216]

El IPL presenta la gran ventaja de conservar ex–vivo la integridad estructural y funcional del órgano. Es posible, por tanto, medir y registrar, y en otros casos calcular, parámetros de gran importancia en función pulmonar, como son el intercambio de gases, la mecánica respiratoria, la resistencia vascular pulmonar, la permeabilidad capilar, y la formación de edema pulmonar. También es posible hacer estudios sobre funciones metabólicas del pulmón. Así mismo, al final de cada experimento, se pueden utilizar parte o la totalidad de ambos pulmones para estudios analíticos, de viabilidad celular, e histológicos, estructurales y/o ultraestructurales[216,217]

Frente a los modelos de trasplante en animales, El IPL presenta una ventaja muy importante: su más fácil reproducibilidad. El IPL permite controlar con exactitud y a voluntad las condiciones de ventilación y de perfusión, (lo que es imposible en el animal vivo) facilitando así la evaluación funcional del pulmón[216,217] Permite también administrar fármacos o aditivos en la dosis y por la ruta deseada.

Por el contrario, es obvio que el IPL no puede evaluar supervivencia. Sólo los modelos de trasplante pulmonar en animales, que reproducen con la máxima precisión la realidad clínica del trasplante en humanos, permiten evaluar la supervivencia tras el trasplante, parámetro que es definitivo, por cuanto constituye el objetivo princeps de toda acción terapéutica.

Además, otro problema del modelo es que, en el IPL, la función pulmonar sufre deterioro espontáneo con el tiempo. Incluso sin que medie ningún estímulo lesional específico, el órgano aislado va reteniendo agua y formándose edema perivascular y peribronquiolar, con lo que el pulmón va perdiendo distensibilidad y ofreciendo cada vez más resistencia vascular al flujo[216,217] El pulmón aislado puede mantenerse en buenas condiciones un máximo de 3 horas. Por el contrario, en los modelos experimentales de trasplante pulmonar en animales, la función del pulmón puede analizarse a corto, medio y largo plazo, días o semanas después de la implantación. El problema de los modelos in-vivo, que se analizan más adelante, es que exigen una mayor complejidad instrumental y técnica, y que son económicamente mucho más gravosos.

Con sus ventajas indudables y con sus limitaciones, el IPL es el modelo experimental más ampliamente utilizado en investigación de la fisiología, fisiopatología y farmacología pulmonar. El IPL ha sido utilizado en numerosos, incontables experimentos cuyo objeto era el estudio de la lesión por

isquemia y reperfusión pulmonar. EL IPL ha demostrado ser un instrumento eficaz en la reproducción experimental de la lesión pulmonar por isquemia y reperfusión.

4,3-6B Variaciones técnicas y/o instrumentales del modelo IPL.

-Patrón de ventilación.

El patrón de ventilación normal para el IPL puede variar entre 50 y 100 ciclos por minuto y volumen corriente (V_T, volumen tidal) entre 1.5 y 3 ml, para totalizar un volumen minuto entre 150 y 200 ml. Se aconseja mantener un nivel de presión positiva al final de la espiración (PEEP, positive end-espiratory pressure) de +3 ó +4 cm de H_2O para mantener el pulmón "abierto" y facilitar la ventilación[216]

- Ventilación a presión positiva o a presión negativa.

El pulmón aislado puede ser ventilado mediante presión positiva en vía aérea, o mediante técnicas de presión negativa. En este último caso, el pulmón debe permanecer colgado de la tráquea en el interior de una cámara completamente cerrada. Existen dispositivos que trasforman la presión positiva que genera el ventilador en presión de succión o negativa[218] El sistema de presión negativa reproduce con mayor fidelidad las condiciones fisiológicas del pulmón en el interior del tórax.

La presión en la vía aérea producida por el ventilador, sea positiva o negativa (de succión), va a ser transmitida al árbol vascular pulmonar. Así pues, la utilización de uno u otro modo de ventilación tiene repercusiones no sólo sobre la mecánica respiratoria, sino también sobre la hemodinamia pulmonar. Consecuentemente, y dependiendo del tipo de ventilación, van a cambiar los valores normales de los parámetros funcionales a medir[213-220] Para igual presión de perfusión, la ventilación a presión positiva disminuye significativamente el flujo de perfusión pulmonar.

- Composición del gas inspirado.

El gas inspirado puede ser aire ambiente, cuya fracción inspiratoria de oxígeno (FIO_2) es del 21%, o pueden utilizarse mezclas de gases, como el carbógeno (cuya composición es O_2 95% + CO_2 5%) u otros. Estas mezclas gaseosas están disponibles en el mercado, contenidas en bombonas, las cuales simplemente se abren a una bolsa sellada de Douglas y ésta se conecta al ventilador.

El estudio de las relaciones ventilación-perfusión y de la fracción shunt queda facilitado por el control exacto de las condiciones de perfusión y de ventilación y, por ende, de la composición del gas alveolar que el modelo permite[55,56]

- Perfusión a volumen constante o a presión constante.

Para la perfusión, puede utilizarse una bomba que impulsa un volumen constante de perfusato, o bien puede éste fluir desde

un reservorio, el cual queda colocado a una altura determinada y constante con relación al pulmón, lo que producirá un flujo de perfusión a presión constante[216,217]

- Perfusión con solución polielectrolítica vs. sangre diluida vs. sangre total.

Es posible perfundir con cualquiera de los tres líquidos mencionados. La solución polielectrolítica resulta la variante más sencilla y con más frecuencia utilizada[216]

La solución polielectrolítica estándar de perfusión pulmonar es la solución de Krebs-Henseleit (K-H). La composición electrolítica de la solución de K-H es la siguiente[216]:

NaCl 118mM/l, KCl 4.7 mM/l, KH_2PO_4 1.2 mM/l, $MgSO_4$ 1.2 mM/l, $CaCl_2$ 2.5 mM/l, $NaHCO_3$ 13 mM/l.

PH 7.4

Osmolaridad 310 mOsm/l.

A la solución K-H se adiciona albúmina bovina 2 gr% y glucosa 1 gr%. Puede también adicionarse HEPES 0.3 gr%. La adición de albúmina u otro impermeante –Dextran, Ficoll- es imprescindible para poder perfundir el pulmón[216,217,221] En ausencia de impermeantes, se produce edema pulmonar intersticial y alveolar inmediatamente desde el principio mismo de la perfusión, lo que hace imposible ventilar y perfundir el órgano.

Puede también perfundirse el pulmón con sangre total o con sangre diluida en solución K-H. Será preciso en estos casos adicionar heparina sódica a la solución.

La perfusión con sangre total reproduce más fielmente la realidad fisiológica de la lesión por I/R. Los registros de función pulmonar son más fidedignos, puesto que la sangre, con su contenido celular y de proteínas, posee características oncóticas y reológicas diferentes de las que exhiben las soluciones electrolíticas[222] Por lo mismo, se perfunde el pulmón con células blancas, las cuales tienen un papel importante en la génesis y mantenimiento de la lesión por reperfusión (ver **2,4**)

Como inconveniente, la perfusión con sangre diluida o total obliga a obtener sangre homóloga en cantidad suficiente para llenar el circuito de perfusión con su reservorio. De cada rata sólo pueden extraerse aproximadamente 10 cc. de sangre por punción cardíaca percutánea.

- Perfusión con / sin recirculación del perfusato.

El líquido de perfusión puede recogerse y entrar en recirculación o desecharse. La primera opción suele ser necesaria si se quiere perfundir con sangre o sangre diluida puesto que la disponibilidad de la misma es limitada.

La recirculación de la sangre exige su “desoxigenación”, es decir, exige inducirle valores de presión parcial de los gases diluidos propios de la sangre venosa mixta, antes de su reentrada en el pulmón. Algunos experimentos han sido diseñados utilizando un segundo pulmón ex–vivo o in-vivo como desoxigenador[223-227] otros lo hacen mediante un desoxigenador instrumental de membrana[228] o de burbuja.

4,3-6C Variables de función pulmonar medidas y parámetros calculados durante la fase de perfusión.

-Intercambio de gases.

Se pueden recoger muestras del líquido de perfusión afluente y efluente para su procesamiento en el analizador de gases.

Podrán calcularse, mediante la ecuación del gas alveolar, la diferencia alveolo-arterial de oxígeno (A-a O_2) y la fracción shunt (Q_S/Q_T)[56] Puesto que las condiciones de perfusión y de ventilación se conocen con exactitud, es posible deducir a partir de la ecuación del gas alveolar que, como expresión del intercambio de gases que está realizando el pulmón ex –vivo, la medición de la presión parcial de O_2 en el líquido efluente pulmonar es equivalente al cálculo de la A-a O_2 y de la Q_S/Q_T.

-Hemodinamia pulmonar.

Las relaciones entre presión y flujo de perfusión vienen expresadas por la ecuación siguiente[216]:

$$P_V = R_V * Q \quad \text{(Ecuación 1)}$$

En la que P_V = Presión de perfusión.

R_V = Resistencia vascular.

Q = Flujo.

En caso de prefundir a presión constante, entonces debe medirse el flujo; si se perfunde a flujo constante, entonces la variable independiente que hay que medir es la presión.

-Mecánica respiratoria.

Las relaciones entre presión de ventilación, flujo aéreo y expansión pulmonar, quedan expresadas por la ecuación[216]:

$$P = (1/C_L * V) + (R_L * dV/dt) \quad \text{(Ecuación 2)}$$

En la que P = Presión en vía aérea

C_L = Compliance o distensibilidad pulmonar.

V = Volumen corriente

R_L = Resistencia (al flujo).

dV/dt = Flujo.

Se considera que C_L corresponde a la resistencia que ofrece el parénquima pulmonar a ser expandido, mientras que R_L corresponde a la resistencia que las vías aéreas ofrecen al paso del gas.

Al final de la inspiración y de la espiración, el flujo aéreo es igual a cero (dV/dt = 0). En estos puntos, la ecuación 2 queda reducida a:

$$P = 1/C_L * V \quad \text{(Ecuación 3)}$$

o, lo que es lo mismo,

$$C_L = \Delta V / \Delta P \quad \text{(Ecuación 4)}$$

Si se ventila a volumen constante fijado por el ventilador, es decir, $\Delta V = V_T$ = constante, y puesto que P aumenta desde el inicio de la inspiración hasta alcanzar su valor máximo precisamente al final de la inspiración, entonces se deduce de las ecuaciones equivalentes 3 y 4 que la presión máxima

inspiratoria en vía aérea, (PawP, peak airway pressure) registrada por el correspondiente sensor, es un parámetro que expresa la C_L para ese V_T de modo inversamente proporcional. La PawP deberá aumentar a medida que el pulmón pierde distensibilidad o, lo que es lo mismo, aumenta su rigidez.

Del mismo modo, si se ventila a presión constante (positiva o negativa) entonces el parámetro dependiente es el V_T. V_T irá disminuyendo a mediada que el pulmón se va haciendo más rígido.

-Registro continuo de formación de edema pulmonar.

Para ello es preciso colgar el bloque cardio-pulmonar de un sensor de peso el cual registrará el incremento de peso que experimenta el órgano a medida que va reteniéndose líquido. El instrumental necesario para esta medición varía según se ventile a presión negativa o positiva[216-219]

-Permeabilidad vascular. Coeficiente de filtración capilar.

El coeficiente de filtración capilar (Kf,c) puede calcularse en pulmones aislados en condiciones de isogravedad a partir del cambio súbito de peso registrado como consecuencia de cambios súbitos en la presión capilar mediante la maniobra de la doble oclusión[216-220,229,230]

La permeabilidad vascular pulmonar también ha sido evaluada midiendo el grado de extravasación de proteínas usando albúmina marcada con Iodo radiactivo(I^{125})[230]

-Estudios metabólicos.

En el órgano entero, pueden medirse las concentraciones de ATP, fosfato inorgánico y fosfomonoéster mediante resonancia magnética nuclear utilizando fósforo marcado (P^{31})[231,232]

Se ha demostrado alteración en la capacidad de eliminación de catecolaminas vasoactivas por el pulmón tras isquemia pulmonar por by-pass[233] y alteración de la síntesis de DNA tras isquemia-reperfusión[234] Se ha detectado alteración del metabolismo de la serotonina (5-hidroxitriptamina) marcada con carbono 14 (C^{14}) y de noradrenalina marcada con tritio (H^3)[233] Otro experimento correlaciona positivamente (r^2=0,62) el deterioro hemodinámico y del intercambio gaseoso por I/R con la alteración de la síntesis de DNA medida por incorporación de timidina tritiada[234] También se ha relacionado la capacidad máxima del pulmón de producir prostaglandina I2 (PGI2) tras estimulación con bradicinina como marcador bioquímico de daño pulmonar tras seis horas de isquemia y reperfusión[235]

-Liberación de lactato deshidrogenasa.

La liberación de la encima intracitoplásmica lactato deshidrogenasa (LDH), medida en líquido pleural y/o en muestras de lavado bronco-alveolar, se ha reconocido como indicador de lisis celular en la lesión pulmonar aguda[236,237] En el modelo de pulmón aislado, se ha utilizado en la valoración de la viabilidad del órgano tras preservación, medida en este caso en el líquido efluente[238]

-Producción de radicales libres del oxígeno.

La producción de radicales libres del oxígeno (ROS) puede medirse indirectamente como especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS, Thiobarbituric acid-reactive species) en muestras de lavado broncoalveolar y/o en muestras de líquido efluente de perfusión pulmonar[239] Los autores del ensayo concluyen que el nivel de peroxidación lipídica puede reflejar adecuadamente el grado de lesión pulmonar tras isquemia – reperfusión.

4,3-6D Variables de función pulmonar medidas y parámetros calculados después de la fase de perfusión.

Los parámetros que se comentan a continuación se miden con las mismas técnicas, tanto en el IPL, como en pulmones transplantados y reperfundidos in-vivo. En el primer caso, los estudios se realizan al final el período prefijado de reperfusión; en el segundo, tras la muerte espontánea o el sacrificio programado del animal.

-Medición de la cantidad de agua pulmonar.

Otro método, éste indirecto, de evaluación del edema pulmonar, consiste en calcular la relación entre los registros del peso húmedo y seco del órgano (W_W/W_D, wet to dried weight ratio) una vez ha concluido la reperfusión[217] Es igualmente útil la relación entre el peso húmedo del pulmón y el peso corporal total del animal (W_W/W_B, wet lung weight to body weight

ratio)[217] Ambos índices son medidas indirectas del edema pulmonar. Más exactamente, evalúan la cantidad de agua contenida en el pulmón.

El edema pulmonar (intersticial) también ha sido evaluado mediante análisis al microcopio óptico. Las muestras de pulmón se congelan y se procesan para estudio histológico. Los autores del trabajo miden el área de sección de arteriolas y vénulas, y el área de sección del espacio intersticial alrededor de los mismos vasos; luego calculan la relación entre ambas medidas como índice de edema intersticial[240]

-Viabilidad celular.

Al finalizar el experimento el/los pulmón/es son perfundidos con colorante azul trypan 0,4 gr% en solución salina balanceada. El colorante es incapaz de penetrar en aquellas células cuya membrana celular permanece íntegra; las células dañadas se colorearán. Las células viables pueden ser contadas por campos al microscopio óptico, y referidas porcentualmente sobre el total[217,230,241]

-Metabolismo de los nucleótidos de la adenosina.

Los niveles de nucleótidos ATP, ADP y AMP pueden medirse a partir de muestras de homogeneizado de tejido mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, High Performance Liquid Chromatography)[230,241]

-Estudios con microscopía óptica y/o electrónica.

Los pulmones en su totalidad o biopsias pulmonares pueden ser procesados para estudios histológicos según las técnicas habituales de microscopía óptica y/o electrónica.

4,3-7 Modelos de trasplante de pulmón en animales.

En este caso, el modelo experimental consiste en realizar el trasplante pulmonar en un animal. No hay diferencias sustanciales en las técnicas anestésicas y/o quirúrgicas con relación al transplante en humanos[242,243]

Los modelos de autotransplante y alotransplante en animales son los que mejor pueden evaluar la calidad de la preservación del órgano. Permiten realizar, en el animal completo, los múltiples estudios de función pulmonar, analíticos, metabólicos etc. que se han comentado para el modelo ex-vivo. Además, son los únicos modelos experimentales que permiten analizar la supervivencia a corto, medio, o largo plazo de los animales trasplantados, siendo este parámetro el más importante al evaluar la calidad de la preservación, pues el aumento de la expectativa y de la calidad de vida (del paciente) son los objetivos últimos de toda intervención terapéutica.

El problema de estos modelos experimentales es el costo económico que suponen. Por su mejor reproducibilidad, es preferible utilizar animales de gran tamaño, primates, cerdos,

perros, que son de difícil manejo. Estos animales facilitan el trabajo del cirujano, pero resultan muy costosos. Precisan de quirófanos experimentales y salas de reanimación o cuidados intensivos de modo que pueda reproducirse lo que sucede en la clínica humana con el máximo realismo.

Para evaluar la función del órgano transplantado, el animal receptor debe ser sometido a neumonectomía contralateral, de modo que la función pulmonar corra a cargo exclusivamente del injerto. Los valores control para la comparación estadística son los obtenidos del animal donante. Una variación técnica introducida por el grupo de **J.Cooper** consiste en implantar sendos manguitos hinchables alrededor de cada arteria pulmonar principal del animal receptor. Los manguitos están conectados a sendos reservorios subcutáneos que permiten hinchar y deshinchar cada manguito con la máxima simplicidad y de forma independiente. Cuando está hinchado, el manguito comprime la arteria pulmonar correspondiente e impide el flujo a su través. De ese modo, será posible anular funcionalmente uno u otro pulmón a voluntad y de modo reversible. Con este modelo, el pulmón nativo del receptor puede servir de control para comparación con el injerto[244]

Por su más fácil manejabilidad y menor coste, se han utilizado modelos de trasplante pulmonar en conejos y pequeños roedores[245-247] En estos animales de pequeño tamaño es necesario utilizar técnicas de microcirugía[245] Las dificultades de la técnica quirúrgica introducen tal grado de variabilidad que

pueden restar reproducibilidad al modelo, incluso hasta el punto de que el análisis d la supervivencia puede carecer de verdadera significación[245]

Con el objetivo de solventar estas dificultades técnicas y disminuir el tiempo de la operación, se han descrito variaciones de la cirugía con la utilización de manguitos de material protésico en las líneas de sutura vasculares[246,247]

4,3-8 ¿Cómo evaluar la calidad de la preservación?

A lo largo del desarrollo anterior, con el análisis de los varios modelos experimentales, se han ido apuntando algunos puntos clave en la investigación de la lesión por isquemia – reperfusión pulmonar, que ahora se recapitulan.

1) Modelos de trasplante pulmonar en animales. Análisis de la supervivencia.-

El objetivo último de todo tratamiento es aumentar la expectativa de vida y mejorar la calidad de vida del paciente. Solamente la completa reproducción del proceso de trasplante pulmonar mediante ensayos en modelos animales es capaz de rendir información significativa en cuanto al impacto que sobre la supervivencia del animal pueda tener la verificación (o refutación) de la hipótesis planteada, objeto del ensayo.

2) Modelos in-vitro y ex-vivo.-

Los modelos experimentales in-vitro y ex-vivo rinden información que es válida solamente referida al modelo experimental que se ha utilizado. La mayor simplicidad y menor coste económico de estos modelos les hace útiles para realizar estudios piloto previos, cuyo objetivo sea limitado a obtener información ***parcial*** sobre aspectos funcionales, metabólicos, histológicos etc... de la lesión pulmonar por I/R.

Por consiguiente, un buen diseño estratégico en investigación sobre isquemia, enfriamiento y reperfusión pulmonar consiste en desarrollar primero un modelo experimental de bajo costo, que permita un estudio piloto de aproximación a la hipótesis planteada, para después, si se considera procedente, realizar el ensayo definitivo en un modelo de trasplante animal.

4,4 LA BÚSQUEDA DEL MÉTODO IDEAL DE PRESERVACIÓN PULMONAR.

4,4-1 Introducción.

Siguiendo ahora el hilo de la reflexión que se dejó en **4,2** como línea de investigación fundamental que es, la búsqueda de un método “ideal” de preservación pulmonar, ha dado pié a más de un millar de publicaciones en los últimos diez años. Por abrumadora mayoría, estas publicaciones versan sobre variaciones del método de perfusión e inmersión frías del pulmón. Es decir,

los investigadores parten de la aceptación de que, por su sencillez y versatilidad, éste es el método sobre cuyo perfeccionamiento se debe trabajar.

Sigue ahora un texto que pretende sintetizar la evolución y la actualidad de esta búsqueda en sus aspectos fundamentales. Con el siguiente desarrollo:

1)Soluciones de preservación,

2)Condiciones de preservación, y

3)Tratamiento/s del donante y del receptor.

4,4-2 Soluciones de preservación pulmonar.

4,4-2A La solución de preservación pulmonar "ideal"

Las soluciones de preservación pulmonar no son sino soluciones polielectrolíticas, cristalo-coloides, en medio acuoso, con un valor de pH fisiológico, o cercano al fisiológico.

Las varias soluciones difieren entre sí por su composición electrolítica y por la incorporación de determinadas sustancias que se adicionan a la solución "base" con el objetivo de cumplir los requisitos que **FO.Belzer**[68] propone para la solución de preservación "ideal".

Según Belzer, la solución de preservación “ideal” debería prevenir / evitar / minimizar los mecanismos lesionales y las lesiones propias de la I/R:

1) La ingurgitación celular.

2) La acidosis.

3) El edema intersticial.

4) La lesión por ROS.

5)Debería estabilizar las membranas y estabilizar la estructura de las proteínas.

6)Debería facilitar o procurar la regeneración intracelular de los nucleótidos de alta energía, (ATP, ADP y AMP) y de la carga energética celular.

Fenómenos, los anteriores, comunes a todos los órganos.

7) Además, debería ser órgano específica, esto es, adaptarse a las particulares características físicas, estructurales y metabólicas del órgano cuya preservación se pretende, en este caso, el pulmón[68,248-249]

Esta última consideración resulta de la máxima importancia, por cuanto, en el pulmón, estructura y función están íntimamente relacionados. Exactamente, ¿qué particularidades, en cuanto a la fisiología y estructura del pulmón, resultan claves al plantearse el problema de la preservación de este órgano?

En primer lugar, el pulmón no es exactamente un órgano sólido, al menos no en el mismo sentido en que lo son el hígado y el riñón; tampoco es un órgano hueco como los que forman el

tubo digestivo. En su estado fisiológico normal, es decir, expandido, ventilado y perfundido, el pulmón se asemejase a una esponja, con una interfase líquido – gaseosa, que es la superficie de intercambio de gases, sometida continuamente a estiramiento y contracción, siguiendo los movimientos del ciclo respiratorio. El pulmón es un órgano ***móvil*** (pasivamente).

Este movimiento pasivo del pulmón es el que hace que, con la glotis abierta, el aire atmosférico entre y salga del tórax. El pulmón es un órgano ***interno / externo***. Es decir, el pulmón es el único órgano interno que está en permanente contacto con el exterior; es el único órgano interno que recibe aire (consecuentemente, oxígeno) directa y continuamente del exterior.

En segundo lugar, la función más importante del pulmón es el intercambio de gases, lo que determina la estructura de la membrana alveolo-capilar. En algunas zonas, las membranas basales de las células endoteliales y de los neumocitos llegan a estar en contacto o a fundirse; es decir, el espacio intersticial puede llegar a ser mínimo o inexistente[250] Esto es importante para facilitar el intercambio de gases. Tanto el O_2 como el CO_2 se movilizan pasivamente, por las diferencias de presión parciales en el alveolo y la sangre del capilar pulmonar. Es pues muy importante que la resistencia que opongan las estructuras del órgano al paso de los gases sea la menor posible.

Para funcionar, el pulmón tiene que estar expandido, ventilado, perfundido y seco. Esto explica las características histológicas de la membrana alveolo – capilar. El endotelio de la vasculatura pulmonar es delgado y continuo[250] Y explica también la abrumadora riqueza que muestra el drenaje linfático del intersticio pulmonar.

Por consiguiente, en preservación y reperfusión pulmonar, mantener la integridad de la membrana alveolo-capilar es un factor crítico. Para que el pulmón esté seco, es importante no sólo evitar la ingurgitación celular, sino evitar la salida de líquido del espacio intravascular a los espacios intersticial y aéreo.

Así, todas las soluciones de preservación pulmonar incorporan alguna sustancia impermeante, esto es, alguna sustancia de acción coloidosmótica que no pueda abandonar la luz del vaso sanguíneo y que, por consiguiente, retenga agua en el interior del mismo, según la ley de Starling[251]

Finalmente, también exclusivo del pulmón es el hecho de recibir la totalidad del gasto cardíaco, y de hacerlo a baja presión. El pulmón (la circulación pulmonar) se halla incrustado entre la circulación venosa y la arterial sistémica. Esta ubicación resulta óptima para que el pulmón se constituya en el órgano de metabolización / aclaramiento de sustancias o factores vasoactivos que, recogidos por la circulación venosa, pueden ser potencialmente peligrosos de alcanzar la circulación sistémica.

4,4-2B <u>Evolución de las soluciones de preservación pulmonar</u>.

Como se describe a continuación, por su contenido en electrolitos, impermeantes y otros aditivos, la composición de las soluciones de preservación pulmonar ha ido evolucionando a medida que se ha ido progresando en el conocimiento de los mecanismos mediadores y efectores, celulares y moleculares de la lesión por I/R.

<u>4,4-2C Las soluciones Euro-Collins y Collins-Sacks</u>.

La primera solución que se utilizó en preservación pulmonar mediante perfusión e inmersión frías fue la solución Euro-Collins (E-C) la cual había sido introducida por **GH.Collins**[252] para preservación renal. La solución E-C se caracteriza por su elevada concentración de K^+ (115 mEq/l) y baja en Na^+ (10 mEq/l) concentraciones parecidas a las que se encuentran en el citoplasma celular (ver **Tabla 1**) La perfusión con E-C pretende igualar las concentraciones del interior y del exterior de la célula, y evitar así la entrada y salida pasivas respectivamente de sodio y potasio, que tienen lugar durante la fase de isquemia y enfriamiento por inhibición de la bomba Na^+/K^+ (ver **2,3-1** y **2,3-3**) Como impermeante, la solución E-C utiliza glucosa[253]

La solución E-C presenta buenos resultados con tiempos de isquemia de hasta seis horas[162, 254-258] más allá de las cuales, la preservación resulta deficiente[258-260]

Una variación de la solución de E-C es la solución Collins-Sacks, (C-S) introducida en 1973 también para preservación renal por **SA.Sacks**[261]. Las soluciones E-C y C-S se distinguen porque la solución E-C utiliza glucosa como impermeante, mientras que la C-S incorpora el manitol para tal función (ver **Tabla 1**)

El problema de las soluciones E-C y C-S como preservantes de pulmón es que su alto contenido en potasio induce vasoconstricción pulmonar a temperaturas superiores a los 10ºC[262] La vasoconstricción puede provocar irregularidades en la distribución intrapulmonar de la solución, lo que puede dar lugar a que haya zonas del pulmón a las que la solución preservante no haya accedido, y resultar en una disminución de la calidad de preservación del órgano[263]

Tabla 1. Composición de las soluciones de preservación.

Solución	E-C	C-S	UW	LPD-G	Et-K	It-K	nEt- K	C
Na+	10	17	30	165	100	20	107	100
K+	115	115	125	4	44	130	44	15
Mg++	5	5	5	2	-	-	-	13
Ca++	-	-	-	-	-	-	-	0,25
Cl-	15	15	-	101	-	-	-	-
CO_3H-	10	10	-	-	-	-	-	-
PO_4H_2-	58	58	25	36	26	25	25	-
SO_4=	5	5	5	-	-	-	-	-
Glucosa	195	-	-	56	-	-	-	-
Gluconato	-	-	-	-	100	100	100	-
Lactobionato	-	-	100	-	-	-	-	80
Adenosina	-	-	5	-	-	-	-	1
Glutation	-	-	3	-	-	-	-	1
Alopurinol	-	-	1	-	-	-	-	1
Trehalosa	-	-	-	-	120	-	120	-
Raffinosa	-	-	30	-	-	-	-	-
Dextran 40(g/L)	-	-	-	20	-	-	-	-
Manitol(g/L)	-	37,5	-	-	-	-	-	60
EDTA(g/L)	-	0,075	-	-	-	-	-	-
HES(g/L)	-	-	50	-	30	30	30	-
NAC	-	-	-	-	-	-	10	-
Db c-AMP	-	-	-	-	-	-	2	-
Nitroglicerina	-	-	-	-	-	-	0,44	-
pH	7,4	7,4	7,4	7,4	7,4	7,4	7,4	7,3
Osmolaridad(**)	355	420	325	335	370	370	600	360

E-C: Euro-Collins.
C-S: Collins-Sacks.
UW: University of Wisconsin – Beltzer.
LPD-G: Low potassium Dextran – Glucose.
ET-K: Extracellular-type Kioto.
IT-K: Intracellular-type Kioto.
nET-K: nueva ET-K
C: Celsior.
EDTA: Etilene diamino tetraacético, acido.
HES: Hidroxyethyl starch.
NAC: N-acetilcisteína.
Db c-AMP: Dibutiril AMP cíclico.

Las concentraciones están expresadas en mMol/L.
Excepto (*) en gr/L.

(**) La osmolaridad está expresada en mOsm/L.

La adición a las soluciones E-C y C-S, de prostaglandina E1 (PGE1), prostaciclina (PGI), u otros vasodilatadores, supuestamente capaces de contrarrestar la vasoconstricción inducida por el ion K^+, se informa favorablemente de modo casi unánime[263-271], introduciéndose en el protocolo clínico de preservación con solución E-C[263] También la nifedipina, de acción vasodilatadora por bloqueo de los canales del calcio, se ha utilizado con éxito como alternativa a la PGE1.

La solución E-C, adicionada con vasodilatador, ha sido ampliamente utilizada en clínica como solución estándar de preservación pulmonar por perfusión e inmersión frías. En investigación, ha permanecido durante años como referente de comparación con otras soluciones de preservación pulmonar de aparición posterior y/o como solución base en ensayos con aditivos, que se constituían así en la variable independiente.

Además de los vasodilatadores, otras muchas sustancias han sido ensayadas como aditivos a la solución E-C: Glutation[272-275] y dimetiltiourea (DMTU)[276] como eliminadores de ROS; alopurinol, por su acción de inhibición de la xantino-oxidasa[277-279] factores antagonistas de la activación plaquetaria (PAFA, platelet activating factor antagonist)[280] pentoxifilina[281] derivado de la metilxantina, para la que se han demostrado efectos beneficiosos en lesión pulmonar mediada por neutrófilos, selenio (Se)[282] nicorandil[283] abridor ATP sensible de los canales de K^+; anticuerpos monoclonales específicos contra las moléculas de adhesión intercelulares[284] dibutiril AMP cíclico (db 3´5´c-AMP)

análogo permeable del c-AMP, y 8-bromo guanosín monofosfato cíclico (8-Br c-GMP) análogo permeable del c-GMP[285,286] lodoxamina trometamina, inhibidor de la degranulación de los mastocitos[287] aprotinina, por sus propiedades antiproteolíticas y de estabilización de las membranas lipídicas[288] Los autores, en sus artículos, reportan mejores resultados en la preservación funcional y/o estructural del pulmón con el aditivo elegido en el ensayo. Sin embargo, es preciso señalar que estos aditivos no han pasado, de momento, de la fase experimental[268-288]

4,4-2D La solución de Belzer - Universidad de Wisconsin.

En 1988, **FO.Belzer** y **JH.Southard** introducen la solución "Universidad de Wisconsin" (UW). Su objetivo es crear una solución "universal" para preservación de órganos abdominales[68] En la actualidad, la solución UW se considera efectivamente la solución estándar en preservación de órganos abdominales[289]

Las soluciones E-C, C-S y UW apenas si se distinguen entre sí por su contenido de electrolitos. Son conocidas como "intracelulares" por su alto contenido en potasio y relativamente bajo en sodio (ver **Tabla 1**)

En cambio, frente a la solución E-C, la solución UW introduce azúcares de alto peso molecular, lactobionato, rafinosa e hydroxyethil starch (almidón) como impermeantes,

adenosina como precursor metabólico de la síntesis de nucleótidos, alopurinol como inhibidor de la xantino oxidasa, y glutation como reductor de ROS[68] (ver **Tabla 1**)

Sin embargo, la verdadera eficacia preservadora de estos componentes es, al menos, dudosa. **DN.Hopkinson**[290] informa que la eliminación sucesiva de hydroxyethyl starch, magnesio, alopurinol, adenosina, glutation y lactobionato no decrementan la calidad de la preservación, en un ensayo que compara solución UW completa frente a solución UW progresivamente "mutilada" y también frente a solución E-C, esta última ofreciendo los peores resultados.

La introducción de la solución de UW en preservación pulmonar experimental y clínica, va a dar pié a numerosos ensayos sobre la efectividad de la misma aisladamente o comparativamente a otras soluciones preservantes[97,98,200,205,208,210, 291-304] La calidad de la preservación pulmonar obtenida por las soluciones E-C versus UW es similar, aunque algunos autores encuentran más favorable la solución UW[97,98,200,205,208,210, 291-304]

Mención especial merece el ensayo clínico de **RL.Hardesty**[303] que compara solución E-C (n=30) y UW (n=70) sobre un total de 100 trasplantes en 94 pacientes, informando de parecidos resultados funcionales entre ambas soluciones.

Igual que para la solución E-C, la investigación sobre la solución UW se enriquece con múltiples experimentos que ensayan

numerosos aditivos, con el objetivo común de mejorar la calidad de la preservación del pulmón. Se ha ensayado con éxito la adición de PGE1[297,304,305] u otros vasodilatadores, como la nifedipina[306] a la solución UW. Otros aditivos ensayados han sido PAFA[280] hidroxibutirato[307,308] butanediona[309] dexametasona[304] lazaroides[304,310-313] dibutiril 3´5´AMPcíclico[304] vitamina E hidrosoluble[314]

4,4-2E La solución UCLA.

En 1989, **M.Hachida** y **DL.Morton**[315] introducen la solución "Universidad de California Los Angeles" (UCLA) que es una modificación de la solución E-C con menor contenido en potasio. Con la adición de insulina (ver **Tabla 1**) se pretende que la glucosa no resulte sólo impermeante, sino que penetre en el interior celular y sea utilizada como sustrato metabólico[315] Según los propios creadores, la función pulmonar es buena tras seis horas de preservación[315] pero pobre tras doce horas[316] La solución de **M.Hachida** y **DL.Morton** no ha recibido interés por parte de otros investigadores.

El problema de la glucosa como sustrato metabólico en condiciones anaerobias es que cada molécula de glucosa se metaboliza a dos moléculas de lactato, lo que aumenta la cantidad de moléculas osmóticamente activas y, por ende, tiende a incrementar la entrada de agua y la ingurgitación celular[78]

4,4-2F La solución Low-Potassium Dextran.

En 1986, el grupo de trasplante pulmonar de Toronto introduce la solución low-potassium-dextran (LPD)[4] diseñada específicamente para preservación de pulmón. Su contenido en potasio (K^+) y sodio (Na^+) es de 4 y 160 mMol/l ambos valores cercanos a las concentraciones de estos mismos iones en el líquido extracelular[317] Como impermeante, introduce el dextrano 40 (azúcar polímero de masa molecular de 40,000 daltons) a concentración de 2 gr % (ver **Tabla 1**)

Una variante de la solución LPD, disponible comercialmente (Perfadex, Kabi Farmacia) utiliza el mismo dextrano 40 a concentraciones de 5 gr % [318,319] También se ha utilizado el dextrano a 1 gr% sin que, según los autores, se resintiera por ello la calidad de la preservación a treinta horas[320] Otra variación de la solución LPD, conocida por LPD-G incorpora glucosa a concentraciones de 10 gr/l.

El bajo contenido en K^+ parece clave en el éxito de la solución LPD. En un modelo experimental en perros, los autores comparan la calidad de preservación pulmonar de la solución LPD, versus una solución baja en potasio pero sin dextran (low potassium –LP-) versus una solución con dextran y alto contenido en potasio (high potassium dextran –HPD-) Se concluye que el grupo de LPD es significativamente superior[321] También del mismo grupo, en primates, se concluye que la solución LPD ofrece buenos resultados por su bajo contenido en potasio y presumiblemente porque el dextrano 40 ejerce efecto oncótico-

impermeante y evita la agregación eritrocitaria[322] Otro ensayo informa que el dextrano carece de acción antioxidante[323]

Se ha ensayado también dextrano de diferentes pesos moleculares, utilizando solución E-C regular como base, versus solución E-C adicionada con dextrano de $40x10^3$, $70x10^3$ y $160x10^3$ daltons. Se obtienen, con éste último, los mejores resultados[324] Ello no obstante, se ha seguido utilizando dextrano 40 como componente regular de la solución LPD.

La solución LPD acapara éxitos. Se publican estudios ampliando el tiempo de preservación a dieciocho[325] veinticuatro[326] treinta[320] y cuarenta y ocho horas[327] con LPD.

La solución LPD se utiliza en clínica humana. El grupo de trasplante pulmonar de Munich[328] en un estudio aleatorio y prospectivo sobre un total de ochenta pacientes trasplantados, informa de mejores resultados funcionales del injerto a corto y medio plazo, y de mayor supervivencia a largo plazo, en el grupo preservado con LPD-Perfadex (n=32) versus E-C (n=48).

La aparición de la solución LPD, que pretende reproducir por su composición electrolítica el medio extracelular, (frente a las de composición "intracelular") introduce el dilema del papel del potasio en la preservación pulmonar y de la necesidad, o no, de adicionar vasodilatadores. A partir de ahí, existen numerosos estudios. En su gran mayoría, las conclusiones de sus autores apoyan la superioridad de las soluciones de tipo

“extracelular”, de bajo contenido en K^+, sobre las que incorporan este ión a altas concentraciones[235, 329-343]

En este sentido, quizá merezca destacar un estudio, comparando la solución E-C base con dos soluciones E-C modificadas para concentraciones de K^+ de 10 y 40 mMol/l.Los autores alcanzan a concluir que la concentración óptima de K^+ puede estar alrededor de los 40 mMol/l[333] Un segundo trabajo en esta línea, comparando soluciones E-C y UW versus UW modificada a bajo contenido de potasio, concluye que la concentración óptima de K^+ debe ser inferior a los 20 mMol/l[334]

Otro estudio, en cambio, compara una solución polielectrolítica (no estándar) con diferentes concentraciones de potasio, llegando a concluir que la concentración de este ión tiene poco o ningún efecto en la calidad de la preservación pulmonar[335] La crítica que puede hacerse a este último trabajo es precisamente que no utiliza una solución de preservación estándar como referencia.

Se han realizado incluso varios ensayos con solución E-C modificada a bajo contenido en potasio (Low Potassium E-C, LPEC)[336] y con solución UW modificada (Low Potassium UW, LPUW)[337,338] Estos estudios concuerdan que las soluciones modificadas son mejores que las originales respectivas.

Otros ensayos comparan diferentes soluciones de bajo contenido en potasio entre sí, LPD original frente a E-C y UW

modificadas. Algunos autores alcanzan a sugerir que la mejor es la low-potassium Euro-Collins (LPE-C)[339] mientras otro estudio afirma que no se observan diferencias si el período de isquemia de dos horas, en cambio, la solución LPD es preferible en períodos de isquemia más prolongados, de dieciséis horas[340]

4,4-2G La solución Wallwork.

De bajo contenido en potasio, es decir, de tipo "extracelular", la solución Wallwork incorpora sangre del donante y manitol en su composición[341]

Un estudio de 1994 compara las soluciones E-C, UW, LPD y Wallwork. Los autores concluyen que ésta última es superior. Sin embargo, un déficit importante del estudio, como los mismos autores se autocritican, es que el intercambio de gases no está entre las variables medidas[342]

Estudios comparativos posteriores con solución E-C versus LPD versus LPD adicionada con sangre sugieren, por el contrario, que la adición de sangre no resulta favorable a dieciocho horas de preservación[343] y que puede ser incluso perniciosa a períodos más prolongados de treinta y seis o cuarenta y ocho horas[327]

4,4-2H Las soluciones de Kyoto.

El abanico de soluciones extracelulares se amplía más recientemente con la introducción experimental de las soluciones de Kyoto y Celsior. La solución de Kyoto surge al examinarse la superioridad de la sustitución de la glucosa, utilizado como impermeante en la solución E-C, por el disacárido trehalosa ($C_{12}H_{22}O_{11}$) a concentraciones de 35 gr/l[344-347] (ver **Tabla 1**) En el ser humano, la trehalosa se divide en dos moléculas de glucosa por efecto de la trehalasa.

El grupo de Kyoto realiza en 1994 un estudio de transplante pulmonar en perros, comparando solución E-C adicionada con PGE1 versus las nuevas soluciones Kyoto extracelular (extracellular type – Kyoto, ET-K) y Kyoto intracelular (intracellular type – Kioto, IT-K) ésta última también suplementada con PGE1. Las soluciones ET-K y IT-K incorporan como impermeantes trehalosa en vez de glucosa, e hydroxyethyl starch; por lo demás, se distinguen entre sí solamente por el contenido de K^+ y Na^+. Los resultados permiten concluir que la solución ET-K es superior a las de composición intracelular IT-K y E-C[347] Las publicaciones del grupo de Kyoto reportando éxitos con la nueva solución de preservación pulmonar basada en la trehalosa se suceden, incluyendo estudios de función y de ultraestructura pulmonar tras preservación y reperfusión[347-354]

El grupo de Kyoto, retoma la “filosofía” de **FO.Belzer** al incorporar a la solución de preservación pulmonar azúcares de

alto peso molecular como impermeantes, en este caso trehalosa, (disacárido) en vez de glucosa (monosacárido)

Profundizando en el tema, **DN.Hopkinson**[355] evaluó el papel de los azúcares como agentes osmóticos en preservación pulmonar, en un modelo de pulmón aislado de rata. Utilizó la solución UW como solución base y en el grupo control, éste último sin azúcar adicionado. Se estudian en grupos independientes los monosacáridos glucosa y fructosa, los disacáridos trehalosa y sucrosa, y los trisacáridos rafinosa y melitosa. Se concluye que el grupo con glucosa presenta los peores resultados funcionales.

También se han comparado les efectos en preservación pulmonar de los disacáridos trehalosa, maltosa y sucrosa, en un modelo con pulmón de rata aislado. Los autores comprueban la superioridad de la trehalosa, y sugieren, por tanto, que la observación no puede deberse solamente al peso molecular o al efecto impermeante de las moléculas, sino que la trehalosa debe ejercer además algún efecto citoprotector[356] Se ha demostrado que la trehalosa estabiliza las membranas celulares frente al enfriamiento y la desecación, uniéndose a los grupos polares de la membrana de fosfolípidos[357,358]

En 1996, el mismo grupo introduce la nueva solución extracelular de Kyoto, (new ET-K) que es igual a la “antigua” ET-K, con la adición de n-Acetilcisteína (NAC) como antioxidante, nitroglicerina (NTG) como precursor metabólico del óxido nítrico (NO) y dibutiril c-AMP, (db c-AMP) análogo del

5´c-AMP capaz de atravesar la membrana celular[359-364](ver **Tabla 1**) Recientemente, la nueva solución ET-K ha sido comparada favorablemente frente a E-C, UW, y LPD[363]

De los resultados y conclusiones de los experimentos sobre las soluciones de Kyoto, se reafirman dos conceptos que son ya paradigmas en preservación pulmonar por perfusión e inmersión frías: La superioridad de las soluciones de bajo contenido en potasio, y de las que utilizan como impermeantes azúcares polímeros de alto peso molecular (trehalosa en este caso; lactobionato, rafinosa y almidón en la solución UW; dextrano en la LPD) frente a los monosacáridos como la glucosa.

Además, la nueva solución de Kyoto (n-ETK) introduce la NTG, “donador” o sustrato metabólico para la síntesis del NO. El descubrimiento de NO como responsable de la actividad biológica del “factor de relajación endotelial” (E-DRF, endothelium-derived relaxing factor)[365] ha hecho que la investigación sobre NO en todos los campos de la medicina y biología resulte sencillamente abrumadora. El papel del NO en I/R pulmonar se ha comentado ya en **2,2-4**.

El papel de la nitroglicerina ha sido investigado por **Y.Naka**[366] utililzando suero de Ringer lactato en un modelo de trasplante de pulmón de rata tras cuatro horas de isquemia fría. Los autores concluyen que, independientemente de cualquier otro factor, la nitroglicerina mantiene la homeostasis vascular del injerto, mejorando significativamente la función pulmonar post

reimplante y la supervivencia del huésped. Otro trabajo del mismo grupo[367] demuestra la superioridad de la adición de NTG frente a las soluciones E-C, UW y LPD que no la incorporan.

Desde entonces, son numerosas las publicaciones sobre la utilidad del NO, y/o de sustratos metabólicos del NO, (NTG, nitroprusiato, L-arginina) y/o de los análogos hidrosolubles del c-AMP o del c-GMP, como aditivos a la solución de preservación[368,369] administrados al donante (ver **4,4-4E**) y/o al receptor (ver **4,4-5C**)

4,4-2I La solución Celsior.

Finalmente, la solución Celsior, (C) utilizada en la clínica como preservante cardíaco, es introducida también en la experimentación como solución de preservación pulmonar. Por su composición electrolítica, la solución C es del tipo extracelular. Por su contenido de sustancias impermeantes, la solución C se parece a la solución UW y por su contenido en sustancias tampón, se parece a la solución histidina-triptófano-cetoglutarato (HTK), introducida por **HJ.Bretschneider** para preservación cardiaca[370](ver **Tabla 1**)

En teoría, la ventaja que podría aportar la solución C es que llegara a convertirse en la solución para preservación cardíaca y pulmonar, universal de los órganos torácicos[289]

Recientemente, se han publicado diferentes estudios experimentales comparando la solución C con otras soluciones de preservación pulmonar, informando de resultados prometedores con la nueva solución Celsior[184,371-376]

4,4-3 Condiciones de preservación del órgano aislado.

4,4-3A pH

Independientemente de otros factores, el valor del pH cercano a los valores fisiológicos, o ligeramente alcalótico, (entre 7,4 y 7,8) de la solución de preservación había sido evaluado como óptimo en varios ensayos en pulmón aislado[377,378]

Sin embargo, este concepto está siendo revisado. Un estudio de 1995, también en pulmón de rata aislado concluye que es preferible un valor de pH acidótico de alrededor de 7,1. Los valores de pH cercanos a 7.4 podrían resultar iniciadores de la lesión por reperfusión, posiblemente mediante la activación del sistema de intercambio Na^+/H^+ a nivel de la membrana celular[379]

Otros estudios reportan efectos protectores superiores en la acidosis hipercápnica frente a la acidosis metabólica. En cualquier caso, parece ser que el mecanismo de beneficio sería por inhibición de la xantino oxidasa[380,381]

4,4-3B Temperatura.

La temperatura es un factor crítico en la preservación del órgano. La temperatura óptima de preservación sigue siendo objeto de discusión. Por una parte, cuanto mayor sea el descenso de temperatura, menores serán las necesidades de O_2 y de sustratos metabólicos para la síntesis de ATP; por otra, los cristales de hielo empiezan a formarse por debajo de los cuatro grados centígrados; finalmente, quizá sean preferibles temperaturas algo superiores, facilitando así un mínimo, pero cierto metabolismo aerobio durante la preservación (ver **2,3**)

Precisamente esto último ha sido demostrado en sendos experimentos en pulmones de perro y de conejo. Incluso a bajas temperaturas, si hay O_2 en los alvéolos, las células pulmonares son capaces de mantener un cierto grado de metabolismo aerobio, con consumo de O_2 y glucosa, y producción de CO_2[76,77] En este sentido, hay numerosos estudios publicados que evalúan como óptima temperatura de preservación pulmonar alrededor de 10ºC, entre los 8ºC y 15ºC[329, 382-385]

En cambio, es preferible realizar la perfusión a temperatura ambiente, y permitir que el órgano vaya enfriándose despacio, para evitar así el choque térmico que supondría el descenso inmediato desde 37ºC a menos de 10ºC[386]

4,4-3C Estado de insuflación / desuflación del pulmón.

Siguiendo con el argumento anterior, unánimemente, todos los estudios informan que la preservación pulmonar mejora si el órgano se mantiene insuflado durante la fase de isquemia. Los resultados resultan óptimos si se insufla el pulmón con O_2 100% o con aire ambiente, de modo que las células pulmonares tengan siempre O_2 disponible para mantener cierto metabolismo aerobio. Este fenómeno se ha comprobado tanto para la isquemia fría y como la caliente[387-396]

Pero incluso la insuflación anóxica, (con Nitrógeno 100%) resulta preferible a la completa desuflación del pulmón. La distensión permanente del pulmón evita el estrés mecánico que es posible que sufra el órgano en el momento de reiniciar de forma abrupta la ventilación y la perfusión[389-395] También se ha informado como beneficioso el mantenimiento permanente de una cierta presión intravascular pulmonar[395] (ver **4,4-5B**)

Por otra parte, es bueno que el pulmón permanezca insuflado, si bien con precaución. Se ha informado de los efectos deletéreos que produce la hiperinsuflación durante la isquemia, en el sentido de que se incrementa la permeabilidad vascular y el edema intersticial y alveolar en la fase posterior de reperfusión[396,397]

4,4-4 Tratamiento en el donante.

Los trabajos de investigación sobre tratamientos en el donante se centran en la exploración de aquellas intervenciones o terapias que permitan de aumentar el pool de donadores, y/o de prevenir o paliar la lesión por I/R posterior en el receptor. Se ha explorado también la posibilidad de inducir la expresión en el donante de mecanismos específicos de adaptación locales y/o sistémicos, como el precondicionamiento a la isquemia, y la expresión de un grupo de proteínas (heat shock proteins, HSP, o proteínas de golpe de calor) que se cree que están implicadas en la respuesta sistémica al stress.

En algunos ensayos, la intervención terapéutica sobre el donante se continúa sobre el pulmón en la fase de isquemia, e incluso en el receptor.

4,4-4A Precondicionamiento a la isquemia.

Por “acondicionamiento” o “precondicionamiento” a la isquemia se conoce el fenómeno por el cual cortos episodios transitorios de isquemia, seguidos de reperfusión pueden resultar protectores frente a un posterior insulto isquémico severo. Este fenómeno fue observado por primera vez por **CE.Murry**[398] en miocardio de perro. Los mecanismos de protección no están todavía establecidos[399]

Varios estudios experimentales han explorado la posible aplicación a la preservación pulmonar del precondicionamiento a la isquemia[400-404] El primero se trata de un estudio de trasplante pulmonar en ratas. En el grupo test se "precondiciona" el pulmón a la isquemia mediante oclusión completa del hilio pulmonar durante cinco minutos seguida de reperfusión y reventilación diez minutos. Los pulmones se implantan tras seis o doce horas de almacén. Los resultados demuestran mejor preservación en los grupos sometidos a precondicionamiento frente a los grupos control "no precondicionados"[400] Este fenómeno ha sido reproducido recientemente en pulmón de cobaya[401] Otros estudios señalan que el precondicionamiento resulta más eficaz con repetidos episodios de isquemia transitoria[402] Estudios muy recientes, coinciden todos en informar de efectos protectores del precondicionamiento a la lesión pulmonar por I/R[402-404]

4,4-4B Tratamiento del donante con golpe de calor (Heat shock).

Se sabe que la hipertermia corporal es capaz de inducir la síntesis de un grupo de proteínas, conocidas como "proteínas de golpe de calor" (HSP, heat shock proteins). Actualmente, se reconoce que las HSP tienen un papel importante en la respuesta celular normal al stress[405]

Sendos estudios experimentales han evaluado el papel de las HSP en la prevención de la lesión pulmonar tras isquemia y

reperfusión sistémica por oclusión temporal de la aorta abdominal. Ambos estudios concluyen que el golpe de calor previo a I/R esplácnica es capaz de proteger al pulmón. Parece ser que las HSP actuarían inhibiendo o modulando la interacción neutrófilo-endotelio[406,407] Otro estudio en un modelo animal de trasplante de pulmón informa que el golpe de calor en el donante induce la síntesis de proteína HSP 70 y que ésta resulta de gran protección en la función de los pulmones implantados[408] Otro estudio, éste en el receptor, informa de la inducción de la expresión de HSP 70, mediante la utilización de adenovirus como vector de trasferencia génica[409]

4,4-4C Ventilación post-mortem del donante.

Estas investigaciones plantean la posibilidad de obtener pulmones de donantes en parada cardio-circulatoria. Se estudia la eficacia de mantener la ventilación del donante, después de que haya cesado la circulación.

En un trabajo experimental en perros los grupos test fueron ventilados con O_2 100% y N_2 100% durante cuatro horas tras la muerte de los animales; el grupo control no fue ventilado. Después, todos los pulmones son perfundidos, (Euro-Collins) guardados y trasplantados. A la reperfusión, ambos los dos grupos de pulmones ventilados mostraron mejor funcionalismo que el grupo control. Los autores concluyen que los movimientos de ventilación en sí mismos ofrecen ventaja funcional independiente

del aporte de O_2, y que es posible obtener pulmones de pacientes que sean ventilados aunque haya cesado la circulación[410]

Resultados parecidos se obtuvieron en un modelo de trasplante en conejos. Los animales se distribuyeron en grupo control (desuflados), insuflados con aire ambiente, insuflados con O_2 100%, y ventilados con aire ambiente, con O_2 100%, o con N_2 100%. Tras analizar los resultados, los autores sugieren que la insuflación y la ventilación del cadáver prolongan el tiempo de tolerancia a la isquemia normotérmica, y que la ventilación con O_2 100% no es mejor versus aire o versus N_2 100%. En consecuencia, la prevención del colapso alveolar resulta beneficiosa independientemente del aporte de O_2[411]

El mismo grupo reporta estudios sobre cual es el mejor método de enfriamiento del pulmón (perfusión fría versus ventilación fría)[189] y sobre sus los efectos en el metabolismo de los compuestos de alta energía[190] Los autores concluyen que la perfusión fría consigue el enfriamiento inmediato de la totalidad del órgano, versus la ventilación fría, que no consigue hacer descender la temperatura de la superficie del pulmón[190] En cuanto al metabolismo energético, la perfusión fría es el método que mejor previene la deplección de ATP. El enfriamiento del cadáver por by-pass, o la ventilación con aire u O_2 100% fríos, también consiguen retrasar la pérdida de ATP frente al grupo control desuflado[190]

4,4-4D Tratamiento del donante con prostaglandinas.

Diferentes autores presentan resultados contradictorios en cuanto al tratamiento del donante con prostaglandinas (PGE1 o PGI2, prostaciclina) administradas por vía endovenosa[412-417]

Modelo de trasplante bipulmonar en rata. Grupo 1 de administración de prostaciclina (PGI2) intravenosa y en la perfusión. El grupo 2 es ventilado antes y durante la perfusión con NO 20 partes por millón. El grupo 3 es control sin tratamiento. Se sigue de un período de isquemia fría de dieciséis horas e implante. Los autores concluyen que la administración de PGI2 mejora la calidad de la preservación mientras que la ventilación con NO resulta detrimente[412]

4,4-4E Tratamiento del donante con óxido nítrico.

El tratamiento en el donante con NO y/o sustratos metabólicos del mismo, como NTG, nitroprusiato o isoproterenol son también objeto de controversia[133,418-422] Algunos autores les confieren efectos beneficiosos.

4,4-4F Tratamiento del donante con antiinflamatorios sistémicos.

Los autores utilizan un modelo de trasplante pulmonar en ratas. La administración intraperitoneal de ambroxol 0,4 mgr/kgr

o dexametasona 2 mgr/kgr no presentó ventajas frente al grupo control de ratas no tratadas[423]

4,4-4G Tratamiento del donante con moduladores de la respuesta inflamatoria.

El tratamiento del donante con antagonistas del factor de activación plaquetaria (PAFA, platelet activating factor antagonist) se informa favorablemente en varios estudios[424-426]

4,4-4H Tratamiento del donante con lazaroides.

Los lazaroides son un grupo de sustancias antioxidantes. La administración de lazaroides al donante antes de la extracción se ha ensayado en modelos experimentales con escaso éxito[427,428]

Sin embargo, en un estudio un modelo de trasplante pulmonar bilateral en ratas que compara la administración del lazaroide U74389G en el donante, versus en el receptor, versus control sin tratamiento. Tras períodos de dos o dieciséis horas de isquemia y reimplante, sólo en el grupo de administración de U74389G en el donante se redujo significativamente la disfunción pulmonar a la reperfusión[429]

4,4-4I Tratamiento del donante con factores de inducción de la hibernación.

Varios estudios coinciden en reportar buenos resultados al administrar al donante, o adicionar a la solución de preservación, una encefalina inductora de la hibernación, la cual es obtenida de suero de marmota en estado de hibernación profunda. Se trata de un delta-opioide, D-ala2,D-leu5, encefalina -DADLE-. Estos efectos beneficiosos son extensibles no sólo al pulmón, sino también a otros órganos en protocolos de extracción multiorgánica[430-432]

4,4-4J Tratamiento del donante con surfactante pulmonar.

Varios estudios han evaluado el tratamiento con extracto lipídico de surfactante bovino (bELS, bovine Extract Lipidic Surfactant) en el donante.

Modelo de trasplante en perros. Administración de bELS aerosol en el donante tres horas antes de la extracción, instilación de bELS en el receptor antes de la reperfusión, y ambas modalidades combinadas, frente a grupo control sin tratamiento. Los mejores resultados se obtienen con el grupo de terapia combinada, siguiendo en segundo lugar el grupo de administración exclusiva en el donante. Los autores concluyen que la estrategia de tratamiento con surfactante es significativa, y que este tipo de tratamiento debe iniciarse en el donante[433]

Un segundo experimento, de diseño casi idéntico en ratas. De nuevo los autores concluyen que el tratamiento con surfactante en el donante antes de la perfusión, resulta beneficioso[434]

Un tercer estudio en cerdos alcanza a concluir que el tratamiento con surfactante es capaz de aumentar la supervivencia tras trasplante pulmonar[435]

4,4-5 Tratamiento del receptor.

4,4-5A Tratamiento del receptor con surfactante

La administración de surfactante exógeno por nebulización se ha mostrado eficaz en la prevención del síndrome de disfunción del injerto, administrado en el donante (ver **4,4-4J**) y/o en el receptor[436-442]

En clínica humana **M.Struber**[442] reporta la utilización de surfactante exógeno en una serie de 31 pacientes consecutivos: transplante unipulmonar, n=8; pulmonar bilateral, n=16; trasplante cardio-pulmonar, n=7.

4,4-5B ¿Cómo hacer la reperfusión?

El momento de reiniciar la reperfusión y la reventilación es especialmente crítico para el órgano. El pulmón isquémico y frío pasa súbitamente a estar ventilado y reperfundido a treinta y siete grados. Varios autores han llamado la atención sobre la tensión mecánica y térmica que sufre el órgano en estos momentos[440,442,443] En este sentido, es notorio que la lesión por isquemia–reperfusión está establecida ya a los primeros diez a quince minutos de reperfusión[444]

Algunos ensayos informan de menor lesión pulmonar si, durante este período inicial, se reperfunde con sangre diluida[445] o con soluciones coloides sin sangre[446-448] La reperfusión con sangre incompleta, depleccionada de leucocitos también se ha informado favorablemente[449-450]

Por último, varios ensayos recomiendan empezar la reperfusión con flujos y presiones por debajo de las fisiológicas habituales durante este período crítico inicial[441,451-456]

4,4-5C Tratamiento del receptor con óxido nítrico.

Existen numerosos ensayos que refieren beneficios en la intensidad de la lesión por reperfusión si el receptor es tratado con NO inhalado. Se informa que el NO ejerce sus efectos benefactores a bajas dosis, entre 1 y 10 ppm. Parece que también

es importante que la administración de NO se realice en desde la fase más inicial, desde el inicio mismo de la reperfusión[457-473] También se han mostrado útiles algunos sustratos metabólicos del NO, (isoproterenol, nitroprusiato, L-arginina, nitroglicerina) administrados por vía endovenosa[474-478]

Igualmente se ha ensayado con eficacia la pentoxifilina, derivado de las xantinas, por sus efectos bronco y vasodilatadores[478,479]

4,4-5D Tratamiento del receptor con bloqueantes de los canales del calcio.

Ha sido informado como beneficioso durante la reperfusión la adición de verapamil, bloqueante de los canales del calcio a la solución de reperfusión[480]

4,4-5E Tratamiento del receptor con inhibidores / bloqueadores de la función leucocitaria.

A medida que se han ido reconociendo los mecanismos moleculares implicados en la iniciación, reclutamiento y multiplicación de la respuesta inflamatoria, han ido introduciéndose nuevas modalidades de terapia, específicamente dirigidas al bloqueo de la inflamación.

Se ha mostrado eficaz la administración al receptor de anticuerpos monoclonales capaces de bloquear la interacción entre las células blancas y el endotelio. Se trata de anticuerpos específicamente dirigidos contra las moléculas de adhesión leucocitaria (ICAM, Inter Cellular Adhesion Molecules), las cuales son expresadas en la membrana citoplásmica de las células blancas y resultan fundamentales para ejecutar la respuesta inflamatoria[481]

El endotelio expresa igualmente moléculas de adhesión, selectinas o endotelinas. El anticuerpo EL-246 es bloqueador específico de las L- y E-selectinas[482-484]

En la misma línea, se ha ensayado la ulinastatina, inhibidor de la degranulación de las células polimorfonucleares[485] e inhibidores del sistema complemento[486]

SUMARIO

- La investigación en preservación pulmonar tiene por objetivo la definición de un método óptimo de preservación pulmonar, el cual debe mejorar la calidad de la preservación, es decir, disminuir la intensidad de la lesión por isquemia/reperfusión, y/o alargar el tiempo tolerable de isquemia.

- Existen dos líneas fundamentales en investigación de la lesión pulmonar por isquemia/reperfusión:

  1ª) Desarrollo de modelos experimentales válidos que reproduzcan eficazmente y que permitan el estudio de la lesión pulmonar por isquemia/reperfusión.

  2ª) La búsqueda de un método óptimo de preservación pulmonar.

- Sólo los modelos de trasplante pulmomar en animales permiten valorar la supervivencia tras trasplante de pulmón.

- El pulmón aislado y perfundido ex vivo (IPL) ha demostrado ser un instrumento eficaz en la reproducción

experimental de la lesión pulmonar por isquemia/reperfusión.

- El método aceptado de preservación pulmonar se basa en el enfriamiento por perfusión e inmersión en una solución de preservación. La investigación del método óptimo de en preservación pulmonar pretende perfeccionar el sistema de perfusión e inmersión frías.

- Son ya paradignas en preservación pulmonar:

  1º) La solución de preservación, por su contenido electrolítico, debe parecerse al del líquido extracelular.

  2º) La solución de preservación debe contener azúcares polímeros de alto peso molecular en función de impermeantes osmóticos.

  3º) La solución de preservación debe contener sustratos metabólicos del óxido nítrico, el cual se ha revelado como metabolito fundamental en el mantenimiento de la homeostasis vascular del órgano.

- En cuanto a las condiciones de preservación:

  1º) Con las soluciones de preservación actuales, la temperatura óptima se ha establecido entorno a los 10º centígrados.

2º) El pH óptimo parece estar cerca del pH fisiológico.

3º) Es preferible mantener al pulmón con cierto grado de insuflación.

- La preservación pulmonar puede mejorar con tratamiento/preparación del órgano todavía en el donante y/o mediante medidas terapéuticas en el receptor. En este último, se han mostrado eficaces el tratamiento con óxido nítrico inhalado y el tratamiento sustitutivo con surfactante pulmonar por nebulización intratraqueal.

- El mejor conocimiento de los mecanismos de adaptación celular a la hipoxia y al enfriamiento, así como de los mecanismos celulares y moleculares, sensores y efectores de la lesión por isquemia/reperfusión pulmonar, va a permitir paralelamente la definición y el ensayo de nuevos métodos de prevención y/o tratamiento de la lesión pulmonar por isquemia / reperfusión.

CAPITULO 5º

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

5,1 HIPÓTESIS DE TRABAJO.

Considerando 1.

El modo fundamental de protección orgánica frente a la isquemia es el enfriamiento. Sin embargo, el frío intenso es lesivo en sí mismo. La temperatura óptima de preservación pulmonar se ha evaluado en torno a los 10ºC.

Considerando 2.

Preservar a temperaturas más bajas, al enlentecer aún más el metabolismo y disminuir, por tanto, las necesidades de energía, podría, en teoría, mejorar la calidad y/o alargar el tiempo de preservación.

Considerando 3.

Hasta el momento, no se ha evaluado la adición de anticongelantes naturales (poli/alcoholes, cuerpos cetónicos u otras moléculas afines) a la solución de preservación.

Hipótesis.

"La temperatura óptima de preservación pulmonar puede estar alrededor del punto de congelación del agua (mínimo gasto energético) si (y sólo si) se toman medidas protectoras contra la lesión inducida por el enfriamiento intenso (crioprotección). Se podría así mejorar la calidad de la preservación pulmonar y/o alargar el tiempo tolerable de isquemia"

La hipótesis planteada introduce un concepto nuevo en preservación de órganos sólidos: la crioprotección, es decir, la protección (o preservación) frente a la lesión producida por el frío intenso. Se plantea pues un nuevo método de preservación pulmonar basado en el enfriamiento intenso hasta valores cercanos a la temperatura de congelación del agua, junto a la utilización de anticongelantes naturales como aditivos a la solución de preservación.

5,2 OBJETIVOS CONCRETOS.

Para aceptar o refutar la hipótesis planteada, se precisa la consecución de los siguientes objetivos:

5,2-1 Objetivo 1.

Desarrollar y validar un modelo experimental con el que poder reproducir la lesión pulmonar por isquemia y reperfusión.

5,2-2 Objetivo 2.

Llevar a cabo un experimento, específicamente diseñado para evaluar la hipótesis planteada, utilizando el modelo antes desarrollado.

CAPITULO 6º

OBJETIVO 1:

DESARROLLO DEL MODELO EXPERIMENTAL. EL PULMON AISLADO Y PERFUNDIDO EX –VIVO.

6,1 INTRODUCCIÓN.

El objetivo primero del trabajo consistió en desarrollar y validar, en el laboratorio de la Unidad de Investigación (UNI) del Hospital Universitario Son Dureta (HUSD) uno de los varios posibles modelos de reproducción experimental de la lesión pulmonar por I/R. Por sus características metodológicas y por sus ventajas, se eligió el modelo de pulmón de rata aislado y perfundido ex vivo (ver **4,3-6**)

Para la adquisición de los animales, y del material inventariable y fungible necesario para la realización del experimento, se contó con la ayuda económica del Fondo de Investigación de la Seguridad Social (FIS), beca 97/0914, dotada con 3,608,000´- pesetas; de la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR), beca de la Fundación Española de Neumología y Cirugía Torácica, FEPAR-Convocatoria 1996, dotada con 1,000,000´- pesetas; y de la Asociació Balear de Malaltíes de l´Aparell Respiratori (ABEMAR). Se contó también con el apoyo

del personal técnico e instrumental de la UNI del HUSD y de la Facultad de Biología de la UIB.

Antes de proceder a la adquisición de datos, es necesario primero el adiestramiento en las habilidades técnicas del procedimiento quirúrgico a realizar sobre el animal y en el manejo del instrumental de laboratorio. Para ello, realicé un curso de microcirugía en rata, el XIII Curso Nacional de Microcirugía Experimental, celebrado en la Facultad de Medicina de la Universidad Valladolid del 3 al 8 de Marzo de 1997 bajo la dirección del Profesor Doctor **Carlos Vaquero**. Realicé también una estancia en el laboratorio del Doctor **Stephan Uhlig** en Borstel, Schleschvig-Hölstein, Alemania (Ver Addendum)

En el laboratorio de la UNI del HUSD, y antes de proceder a la fase experimental de adquisición de datos, se realizaron las pruebas necesarias de las diferentes técnicas quirúrgicas e instrumentales y de procesamiento de los especimenes, hasta la completa consecución satisfactoria del modelo experimental.

6,2 MATERIAL.

6,2-1 Animales.

Se utilizaron ratas Sprague-Dawley macho de peso entre 200 y 450 gramos. Frente a otros roedores de pequeño tamaño, se

eligió la rata porque es un animal resistente, de muy fácil manejo y precio asequible.

Durante todo el proceso de manipulación de los animales se cumplieron en todos sus extremos el Real decreto 223/1988 de 14 de Marzo (B.O.E. de 18 de Marzo) y la Orden de 13 de Octubre de 1989 (B.O.E. de 18 de Octubre) sobre protección de animales utilizados en experimentación y otros fines científicos.

Las ratas vivían y eran cuidadas, según las normas habituales con libre acceso a comida y agua, en el servicio de estabulario de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de les Illes Balears, (UIB) Los animales eran transportados al laboratorio del HUSD en jaulas con libre acceso a comida y agua, unas horas antes de que se procediera a la realización del experimento.

6,2-2 Instrumental quirúrgico.

Junto a la mesa de operaciones, la tabla de fijación del animal y una lámpara de magnificación, el instrumental quirúrgico es, por lo demás, sencillo. Se precisan tijeras grandes de punta roma y tijeras de precisión (de Wescott) pinzas de disección con y sin dientes, separadores-retractores (2) disectores (2) ligaduras o bramante de seda, agujas, jeringas, guantes, torundas de algodón y gasas.

El aparataje propio del experimento incluye:

Instrumental de perfusión:

Contenedor - reservorio del perfusato.

Calentador.

Bomba de perfusión.

Baño de órganos.

Calentador / refrigerador del baño de órganos.

Atrapador – eliminador de burbujas.

Cánula de arteria pulmonar.

Cánula de aurícula izquierda.

Tubos de goma.

Llaves de paso y conexiones.

Instrumental de ventilación:

Ventilador de pequeños roedores.

Bombonas de gases de concentraciones conocidas (carbógeno)

Bolsa sellada de Douglas

Humidificador.

Cánula traqueal.

Tubos de goma

Sensores:

De presión en arteria pulmonar.

De flujo de perfusión en arteria pulmonar y/o en aurícula izquierda (opcionales)

De presión y pneumotacógrafo de flujo, en vía aérea.

Transductor de peso (opcional)

De temperatura.

Aparato de análisis de gases.

Instrumentos de amplificación y registro de las señales:

Amplificador analógico para cada sensor.

Placa analógica – digital.

Hardware (computador personal compatible) y software adecuado para el registro y la lectura de las señales.

Otros:

Software para escritura, hoja de cálculo y paquete estadístico.

Báscula/s de precisión, pHmétro, termómetros, agitador, pipetas, vasos, contenedores, etc. Nevera y horno de precisión programables. Para preparar las soluciones de perfusión y preservación se precisa agua bidestilada y los solutos correspondientes.

6,3 MÉTODOS.

6,3-1 Técnica quirúrgica en la rata .

De acuerdo con la legalidad vigente, el experimento se inicia con la anestesia del animal mediante inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico a dosis de 60 - 70 mgr./kgr de peso.

Ya anestesiado, se registra el peso del animal. Se limpia la piel del animal con alcohol y se fija el animal a la tabla de operaciones.

El procedimiento quirúrgico se inicia con la apertura de la piel en línea media desde el abdomen inferior hasta la base de la boca.

Apertura del cuello en la línea media hasta alcanzar la traquea que se disecciona. Traqueotomía en la pared anterior de la traquea y canulación traqueal (14 ó 16 G) Fijación de la cánula traqueal mediante ligadura. La cánula traqueal se conecta al pneumotacógrafo para pequeños roedores, y éste a los tubos inspiratorio y espiratorio que proceden del ventilador.

Se inicia la ventilación mecánica a presión positiva. Los parámetros ventilatorios en este momento son: Volumen corriente (V_T) 2 ml, frecuencia respiratoria (RR) 90 x´, tiempo inspiratorio / tiempo total del ciclo respiratorio (T_I/T_{TOT}) 1:1, composición del gas inspirado: aire ambiente humedecido, presión positiva al final de la espiración (PEEP): 0 cm de H_2O.

Apertura del hemiabdomen superior en línea media. Apertura del diafragma en línea media retroxifoidea y radial, evitando con sumo cuidado cualquier lesión en el pulmón. Esternotomía mediana. Separación de ambas arcadas costales mediante separadores que se fijan a la tabla. Queda así expuesto el contenido del cuello, tórax y abdomen.

Seguidamente se procede a la exéresis del timo del animal mediante disección roma con torunda de algodón. Quedan expuestos los grandes vasos de entrada y salida del corazón. Se pasa una ligadura por detrás de ambas arterias pulmonar principal y aorta; se anuda sin apretar. Inyección intracardiaca de heparina sódica, 5.000 UI. Se desangra el animal por sección de la vena cava inferior intraabdominal. Se purga el catéter afluente pulmonar.

Pequeña ventriculotomía derecha sobre el cono de eyección de la arteria pulmonar. Se introduce el catéter pulmonar (Hugo Sachs Elektronics® Alemania) al interior de la arteria pulmonar principal a través de la ventriculotomía. Se fija el catéter pulmonar cerrando el nudo que incluye las raíces de ambas arterias pulmonar principal y aorta. Sigue a esta maniobra la muerte del animal.

Se inicia la perfusión pulmonar. Condiciones de perfusión: Flujo de 0,03 ml/gr de peso corporal/minuto, lo que supone 7 – 8 ml/min para una rata de 250 gr. Se procede inmediatamente a la amputación de la punta cardiaca. El perfusato debe verse salir por el ventrículo izquierdo abierto. Se procede entonces a la cateterización de la aurícula izquierda a través del ventrículo izquierdo abierto y de la válvula mitral, que debe forzarse un poco. El catéter auricular izquierdo (Hugo Sachs Elektronics® Alemania) debe recoger ahora el líquido de perfusión. Fijación del catéter auricular izquierdo mediante una ligadura que rodea ambos ventrículos.

Sección completa de la tráquea proximal a la traqueotomía. Tracción suave de la tráquea hacia adelante. Liberación de las adherencias posteriores de la tráquea, aorta y esófago; estos dos últimos se seccionan. Finalmente, sección de la vena cava inferior por encima de diafragma, con lo que el bloque cardio-pulmonar queda completamente liberado. Obtención del bloque cardio-pulmonar que se introduce en una cámara humedecida, colgando de la tráquea.

Se continúan la perfusión y la ventilación con iguales parámetros excepto que se añade PEEP +2 ó +3 cm de H_2O. La presión venosa pulmonar se deja entre +2 y +4 cm de H_2O elevando unos centímetros la salida del catéter auricular por encima de la altura de la aurícula izquierda.

La técnica quirúrgica debe suponer una duración total de unos 15 minutos.

Se dejan transcurrir unos 5 ó 10 minutos de perfusión – lavado del órgano y estabilización. Si se perfunde con una solución polielectrolítica (sin sangre) el pulmón debe perder su color rosado habitual y quedar uniformemente blanco, no deben de haber zonas de atelectasia, ni debe formarse edema pulmonar macroscópicamente visible. No debe recogerse líquido de exudación o transudación pleural. El líquido efluente debe poder recogerse por la cánula auricular sin problemas.

Puede entonces continuarse la perfusión y la ventilación e iniciarse el registro de datos, o bien pueden suspenderse durante el tiempo y en las condiciones que se hayan prefijado: período de isquemia.

6,3-2 Perfusión.

Inmediatamente tras su extracción en unos casos, o después del período de isquemia en otros, los pulmones pueden ser re/ventilados y/o re/perfundidos.

El líquido de perfusión se halla en un recipiente de cristal, y éste a su vez introducido en un baño que se mantiene a temperatura constante de treinta y siete grados centígrados mediante su propio termostato. El líquido es movilizado desde el recipiente e impulsado a través del circuito hacia la cánula en la arteria pulmonar, mediante una bomba de perfusión pulsátil de flujo constante, que se puede ajustar entre 1 y 100 ml/min (Masterflex® Radnoti® Glass Technolgy. Modelo 7521-25 Monrovia. CA. USA) Se dispone también de un eliminador de burbujas (Radnoti® Glass Technolgy. Monrovia. CA. USA) que se sitúa en el circuito afluente a la entrada del pulmón.

En la UNI del HUSD se dispone además del instrumental necesario para perfundir el pulmón a presión constante (Radnoti® Glass Technolgy. Monrovia. CA. USA)

En el modelo desarrollado en el laboratorio de la UNI del HUSD se realizó la perfusión del pulmón a volumen constante de 7-8 ml/min siendo la variable dependiente la presión registrada a la entrada del órgano.

El liquido de perfusión utilizado fue suero de Krebs-Henseleit según fórmula estándar, a 37ºC y pH 7,4 adicionado con albúmina bovina (Serva®) 0,2 gr% y HEPES (Sigma®) 0,3 gr% (ver **4,3-6B**)

En la UNI del HUSD se dispone de un baño de órganos (Radnoti® Glass Technolgy. Monrovia. CA. USA) entre cuyas paredes circula líquido a temperatura regulable entre –23ºC y 60ºC (Radnoti® Glass Technolgy. Modelo EX-221 Monrovia. CA. USA)

6,3-3 Ventilación.

Se utilizó un ventilador para pequeños roedores (Hugo Sachs Elektronics® Alemania. Modelo 7025) El aparato puede tomar aire ambiente de la habitación, o de una bolsa sellada de Douglas llena por una mezcla de gases de composición conocida. El ventilador se puede ajustar para volúmenes corrientes entre 1 y 10 ml y hasta 180 ciclos respiratorios por minuto; carece de límite de presión. Se puede colocar una resistencia a la salida de los gases en forma de sello de agua para mantener cierto nivel de presión positiva al final de la espiración (PEEP, positive end espiratory pressure)

En concreto, y de acuerdo con la literatura, la ventilación se ha realizado a volumen corriente constante de 2ml, frecuencia respiratoria de 90 ciclos x minuto, presión positiva al final de la espiración de +3 cm H_2O, fracción inspiratoria de O_2 (FIO_2) del 95% y fracción inspiratoria de CO_2 ($FICO_2$) del 5%, siendo la variable dependiente la presión registrada a la entrada de la tráquea.

6,3-4 Isquemia.

Una vez obtenido el bloque cardio-pulmonar, con los catéteres traqueal, de arteria pulmonar y de aurícula izquierda fijados in situ, se pueden suspender la perfusión y la ventilación, quedando el órgano en isquemia. El pulmón puede mantenerse suspendido de la tráquea en el baño a temperatura controlada de treinta y seis grados (isquemia caliente) o puede introducirse en un recipiente de cristal y éste en un refrigerador a temperatura regulable (Velp Científica® Italia. Modelo FOC 225 D)

6,3-5 Reventilación y reperfusión.

Tras el período de isquemia, pueden conectarse de nuevo el catéter traqueal al pneumotacógrafo (Hugo Sachs Elektronics® Alemania) y éste a los tubos de entrada y salida del respirador; y el catéter de arteria pulmonar al circuito de perfusión, con

lo que el pulmón puede ser reventilado y reperfundido en condiciones controladas.

6,3-6 Estudio de la función pulmonar.

El modelo de pulmón aislado y perfundido (IPL) permite mediciones de parámetros muy importantes de función pulmonar (ver **4,3-6**) En concreto, para la realización de este experimento se han desarrollado las siguientes:

6,3-6A Mediciones durante la re/perfusión.

Mientras el pulmón es ventilado y perfundido, independientemente de que haya habido o no un determinado período de isquemia, se registraban las siguientes variables:

6,3-6A 1 Intercambio de gases.

Las presiones parciales de los gases en disolución se pueden medir en muestras del líquido afluente y efluente al pulmón. (Analizador de gases. Izasa® España. Modelo BG 3000)

6,3-6A 2 Mecánica respiratoria.

El pneumotacógrafo (Hugo Sachs Elektronics® Alemania) está conectado e un transductor de presión diferencial (Hugo Sachs Elektronics® Alemania Modelo DP45-14) y a un transductor de presión (Hugo Sachs Elektronics® Alemania Modelo 399/2) capaces de captar el flujo aéreo y la presión en vía aérea.

Estas señales analógicas son remitidas sendos amplificadores (Hugo Sachs Elektronics® Alemania CFAA modelo 677 y Hugo Sachs Elektronics® Alemania TAM-A modelo 705/1) La señal amplificada pasa a una placa analógico-digital, y de ésta al ordenador (PC compatible) con el software apropiado para el registro (Atlantis. Lakeshore Technologies® USA) y la lectura (Pegasus. Lakeshore Technologies® USA) de la misma.

6,3-6A 3 Hemodinamia.

La presión de perfusión pulmonar se mide mediante un sensor de presión (Hugo Sachs Elektronics® Alemania. Modelo 7/IX) La señal se convierte a digital, se registra y se lee con ordenador.

El volumen del líquido efluente se medía por recolección desde la cánula de aurícula izquierda. También se recogía y medía el líquido que el pulmón pierde a través de la pleura.

Gráfico 1. Curva de registro de presión en vía aérea.

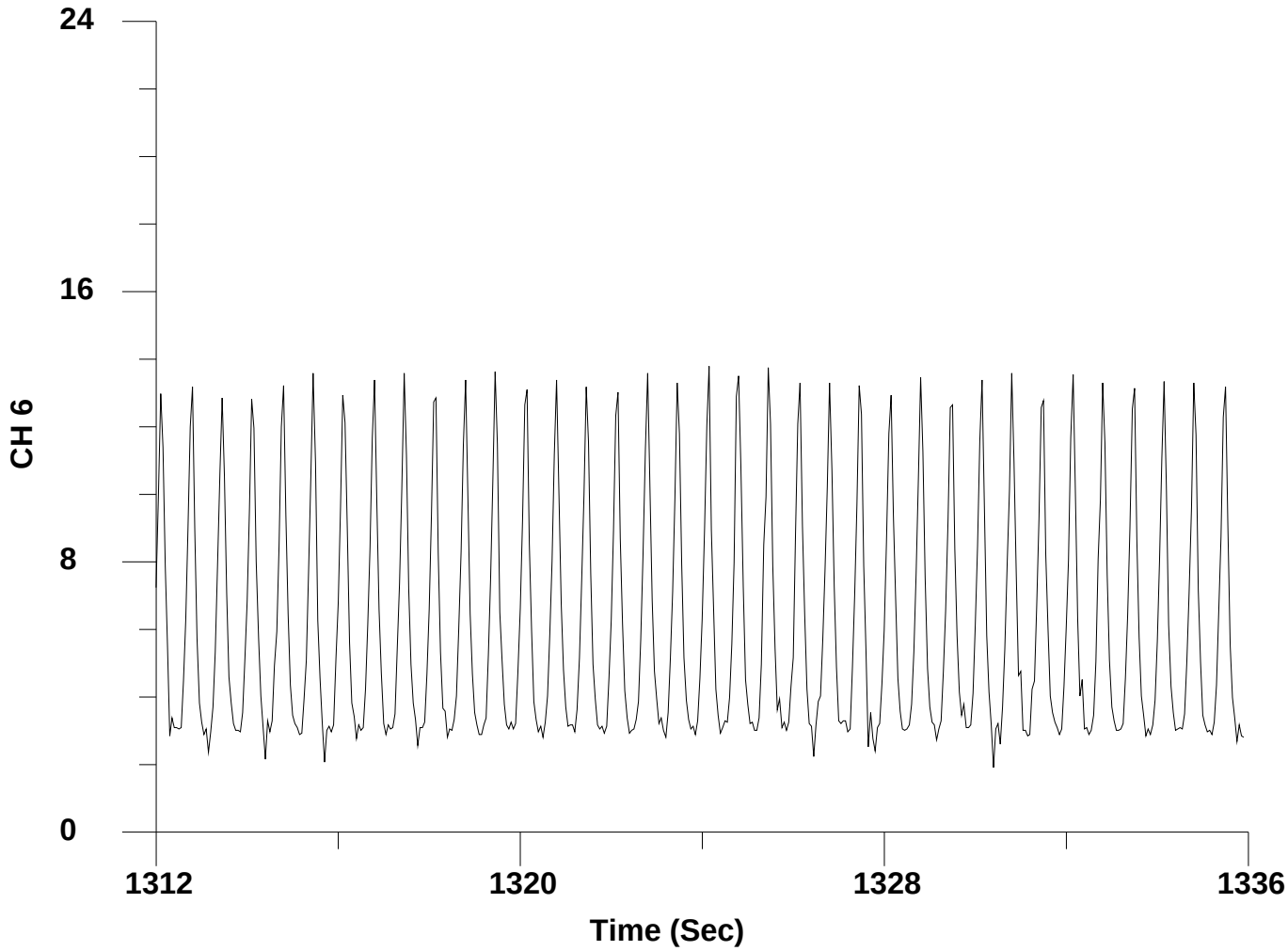


Gráfico 2. **Curva de registro de flujo en vía aérea**.

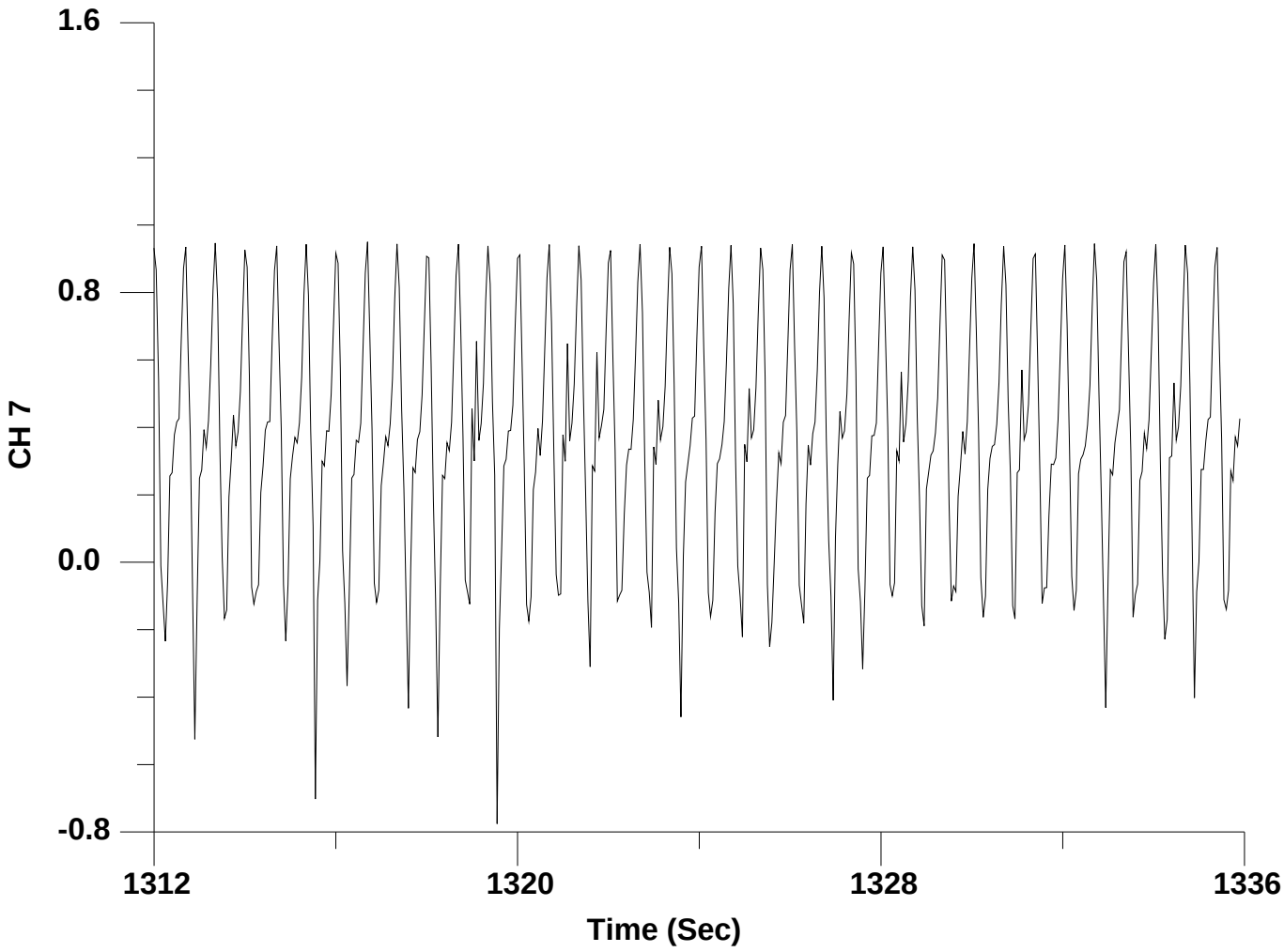
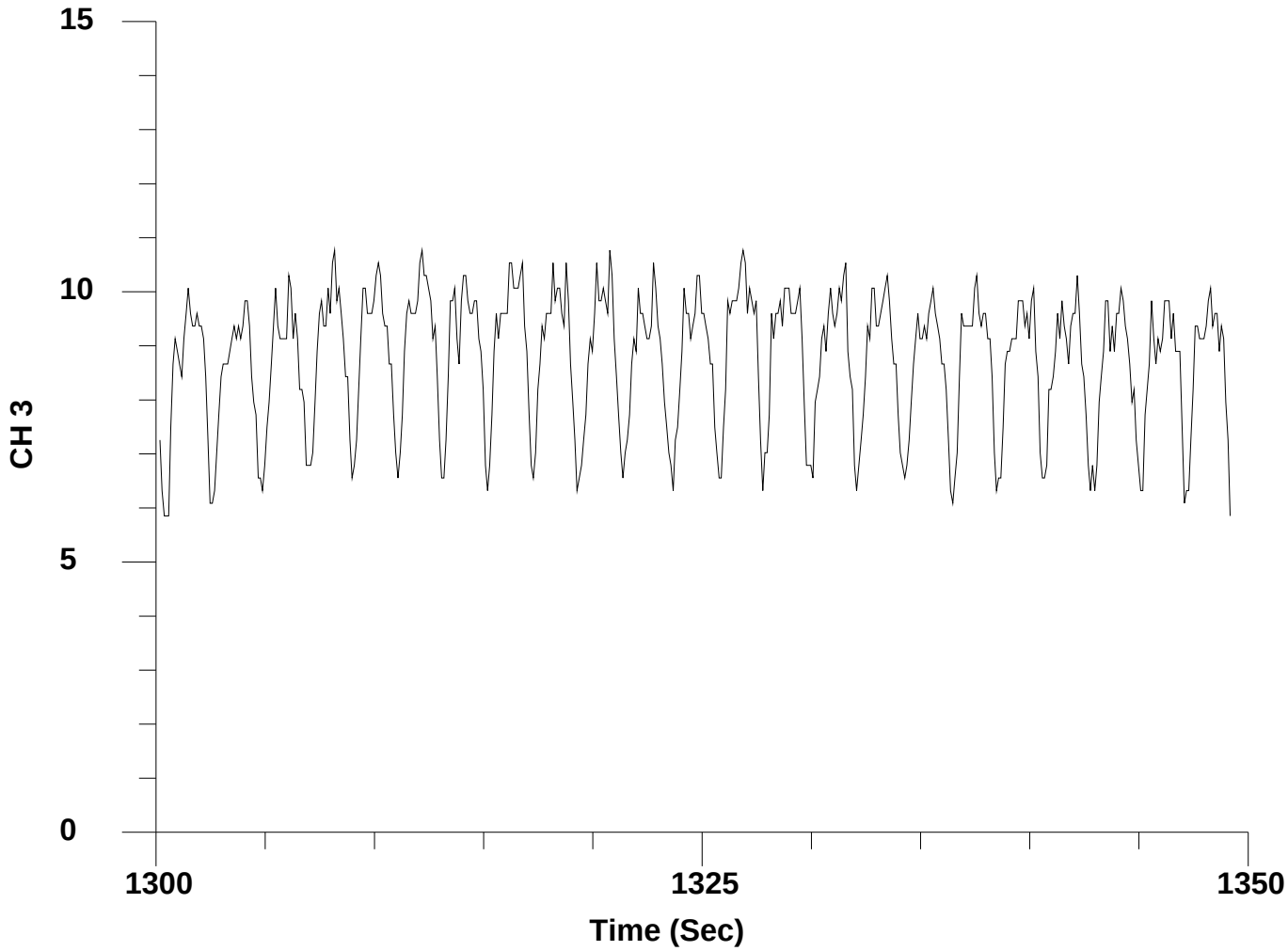


Gráfico 3. **Curva de registro de presión en arteria pulmonar**.



6,3-6A 4 Liberación de lactato deshidrogenasa.

Las concentraciones de lactato deshidrogenasa (LDH) pueden medirse en muestras del liquido efluente y/o del líquido de exudación pleural, que se procesan según los métodos habituales en el laboratorio de urgencias del servicio de análisis clínicos del HUSD.

6,3-6B Mediciones tras la re/perfusión.

Una vez finalizada la fase de re/perfusión, se mantenía los pulmones en ventilación y se perfundían, a través de la cánula pulmonar, 10 cc. de azul trypan al 0,4% en suero fisiológico primero, y 10 cc. de fijador (glutaraldehído al 2% + formaldehído al 2%) después. Tras lo cual se procedía al cese de la ventilación. Seguidamente, se obtenían ambos pulmones por sección de los correspondientes hilios.

El pulmón izquierdo, de menor tamaño, se introducía en el mismo fijador para su posterior estudio anatomo-patológico. El pulmón derecho se utilizaba para evaluar la cantidad de agua pulmonar.

6,3-6B1 Análisis de la cantidad de agua retenida en el pulmón.

Se registraba el peso del pulmón derecho peso (húmedo), se introducía en un horno (Jouan® Francia. Modelo EU18) a temperatura fija de 60ºC durante 48 horas para desecación, y se registraba de nuevo su peso (seco) Con estos valores se calcula

la relación entre ambos (WW/DW, wet to dried weight ratio)[216,217] Es igualmente útil la relación entre el peso del pulmón al final de la re/perfusión y el peso corporal total del animal (WW/BW, wet weight to body weight ratio)[217] Ambos índices miden la cantidad de agua retenida en el pulmón al final del período de re/perfusión. Ambos índices son medida indirecta del edema pulmonar (Ver **4,3-6D**)

6,3-6B2 Estudio anatomo-patológico y de viabilidad celular.

El procesamiento para estudio anatomo-patológico se realizó según los métodos convencionales y utilizando la infraestructura material del servicio de anatomía patológica del HUSD. El estudio anatomo-patológico y la cuantificación de la viabilidad celular se llevaron a cabo por un facultativo especialista miembro del servicio de anatomía-patológica del HUSD. El lector (microscopista) desconocía a qué grupo analizado correspondía cada caso.

La determinación de la viabilidad de las células del parénquima pulmonar se realizó mediante estudio microscópico. (Olimpus® Modelo BH-2) empleando un objetivo de 100x1000 aumentos, con aceite de inmersión y ocular con retícula.

Para ello, el pulmón izquierdo se preparó para el análisis histológico según técnicas estándar en el servicio de anatomía patológica del HUSD. Las muestras eran deshidratadas en etanol a concentraciones crecientes, (70%, 96%, y 100%) aclaradas con xileno y embebidas en parafina. Se realizaron cortes de cinco

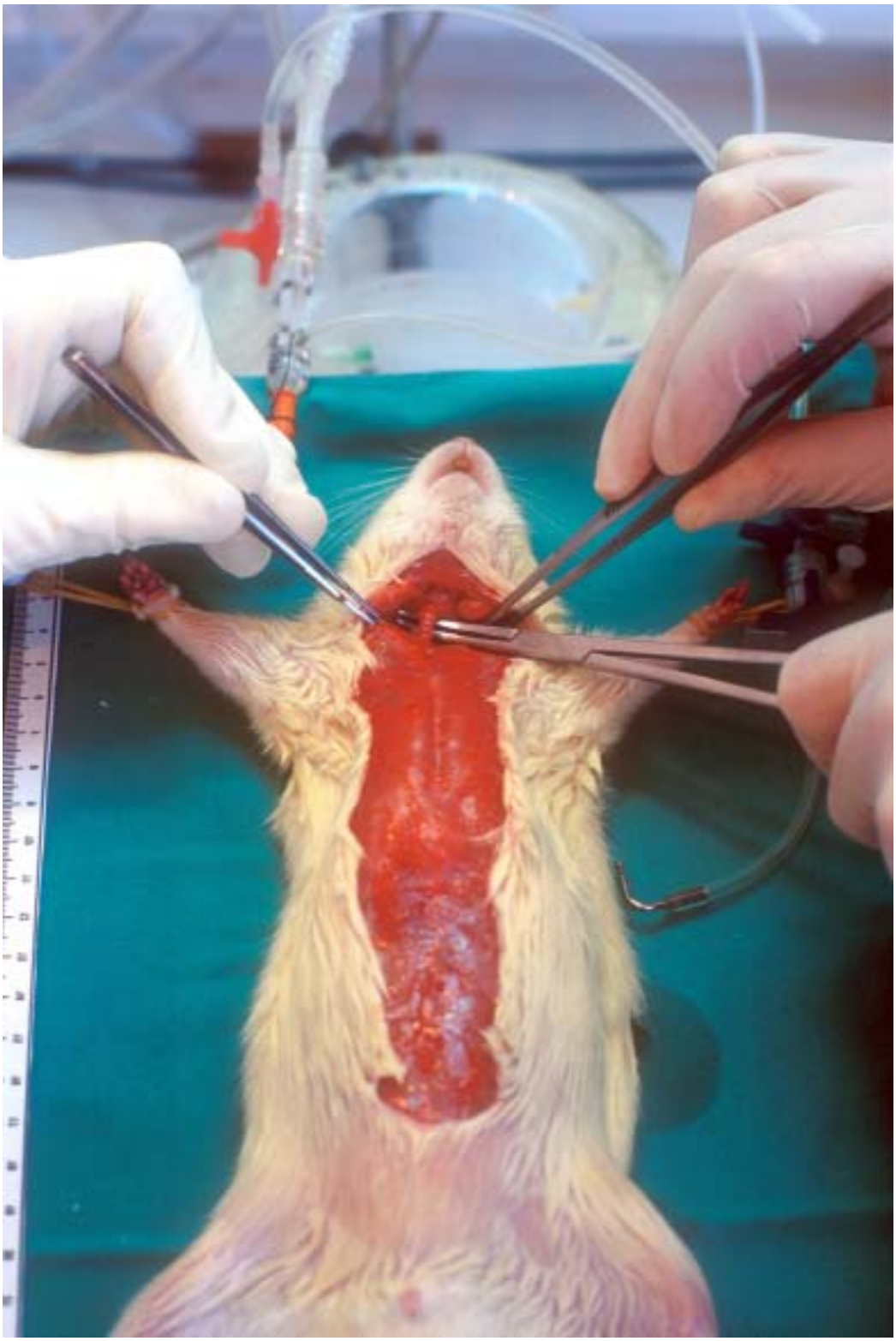
micras de espesor que se montaron en dos portas, uno para tinción de contraste, únicamente con eosina; el segundo, con hematoxilina – eosina.

El azul tripán es un tinte que no puede atravesar las membranas celulares; por tanto, quedan teñidas de azul, sólo aquellas células cuyas membranas están rotas. Para cuantificar la viabilidad celular, se examinó la preparación de tinción contrastada con eosina. Se valoraron un total de cien núcleos de células parenquimatosas, en cada caso, contando veinticinco núcleos en cuatro campos diferentes. Se registraron como viables (rosa) y no viables (azul) La cuantificación de la viabilidad celular se presentaba como porcentaje de células viables. La lectura se realizó por dos veces a diferentes intervalos; si la diferencia de los valores observados entre la primera y la segunda lecturas era superior al 10%, se realizaba una tercera y definitiva lectura, y se admitía como resultado definitivo el resultado de la media aritmética de las tres determinaciones.

Para el estudio anatomo-patológico se examinó el porta teñido con hematoxilina-eosina con objetivos de 4x, 10x y 40x. El estudio patológico valoraba la presencia edema, enfisema (rotura alveolar) y necrosis. Estas alteraciones se valoraban cualitativamente como 0, +, ++, +++.

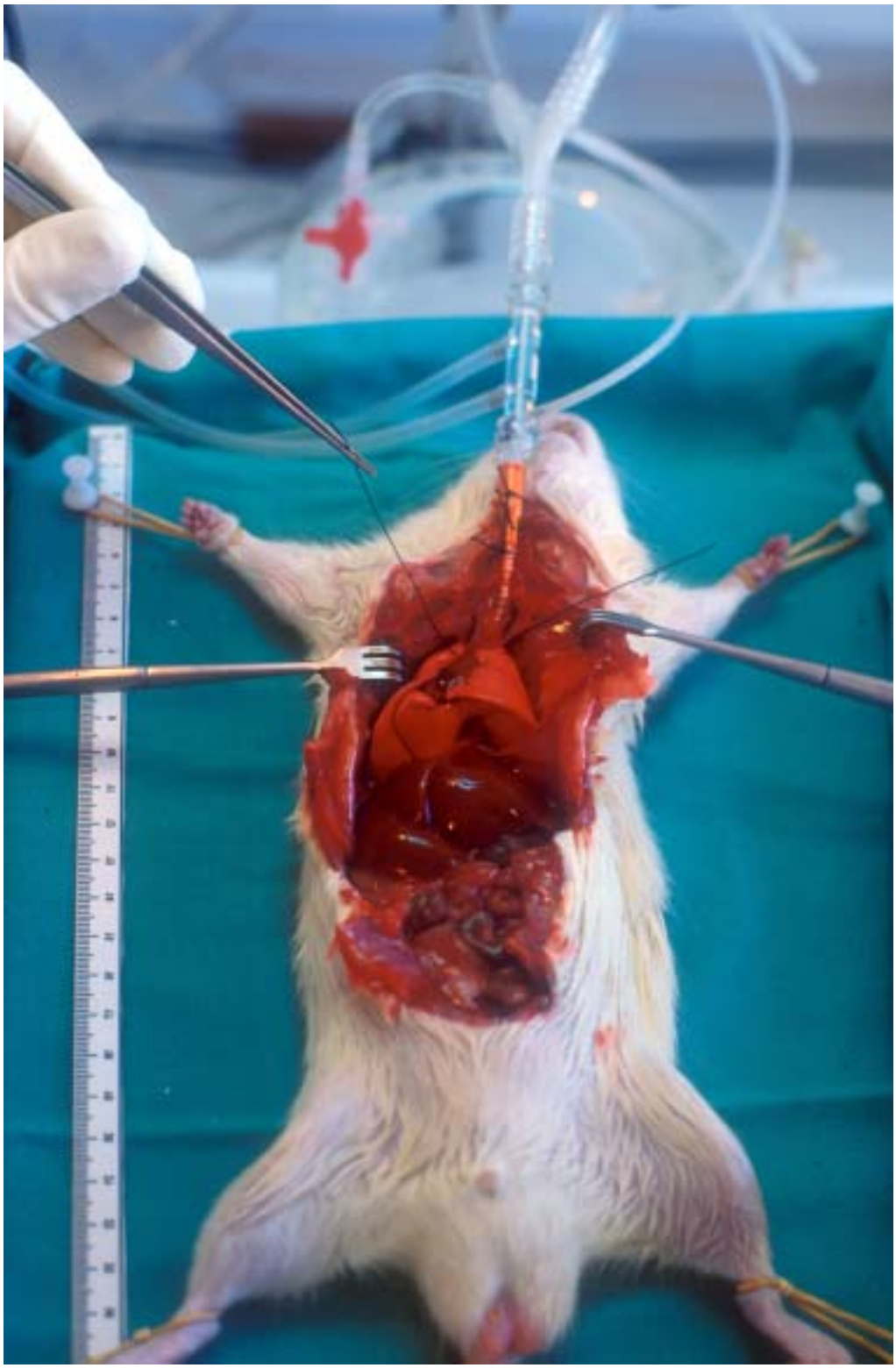
GALERIA DE IMÁGENES

Disección traqueal



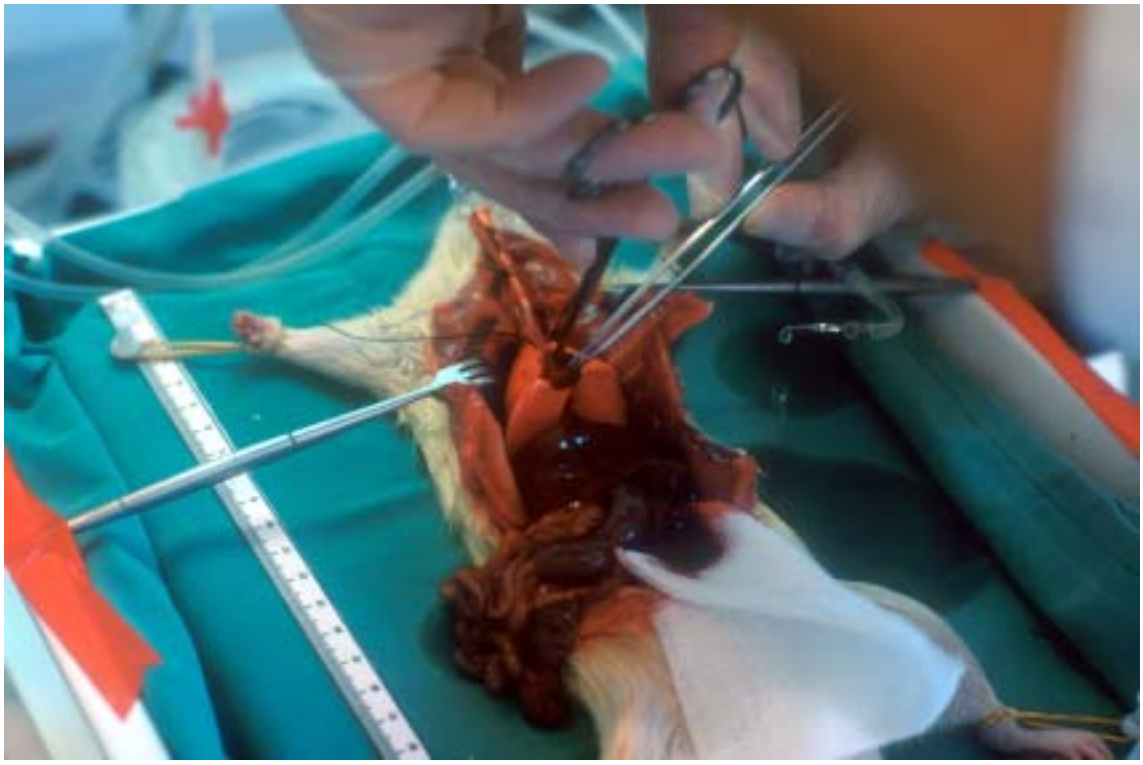
GALERIA DE IMÁGENES

Intubación traqueal. Disección de los grandes vasos



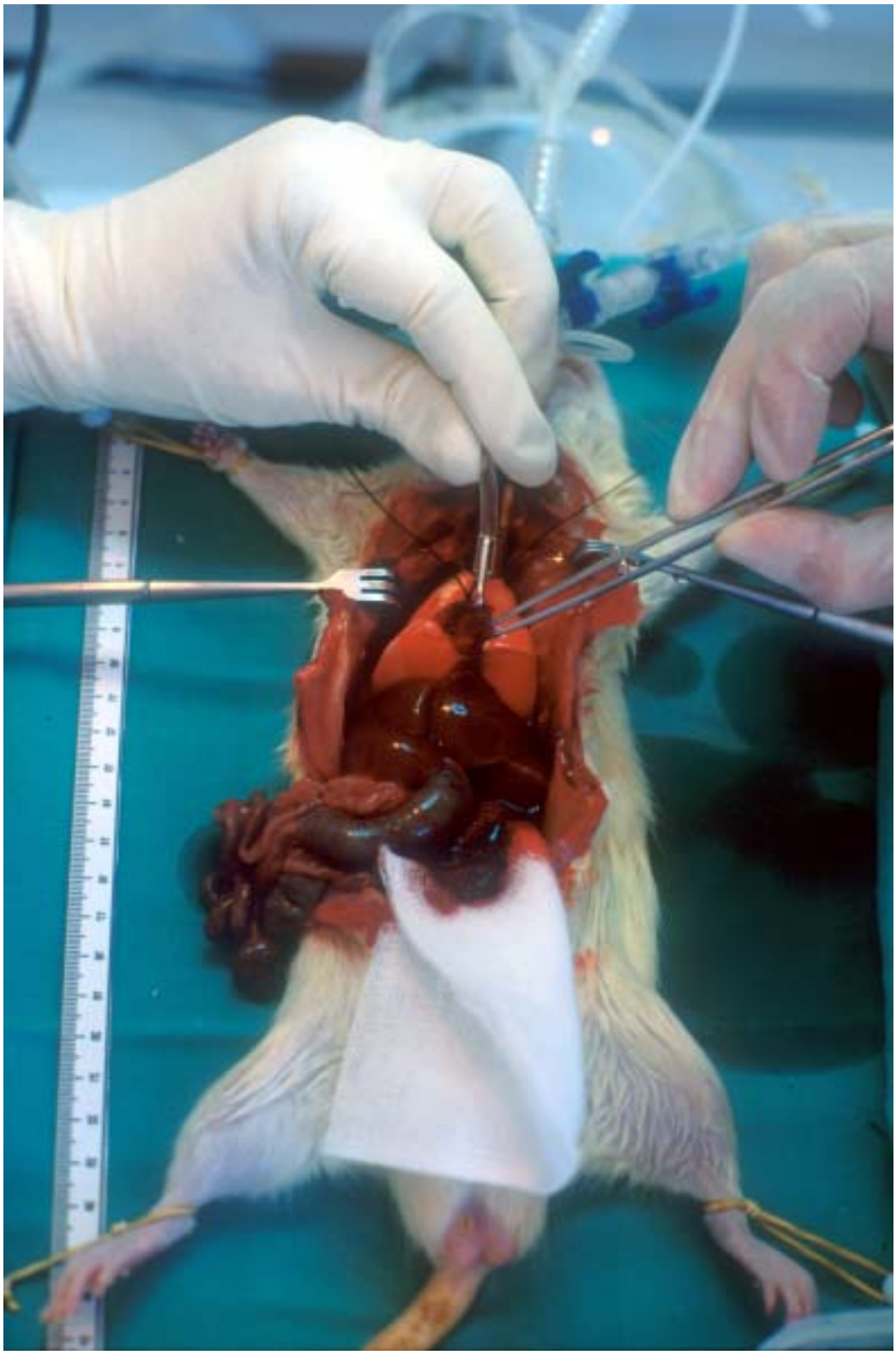
GALERIA DE IMÁGENES

Ventriculotomía derecha



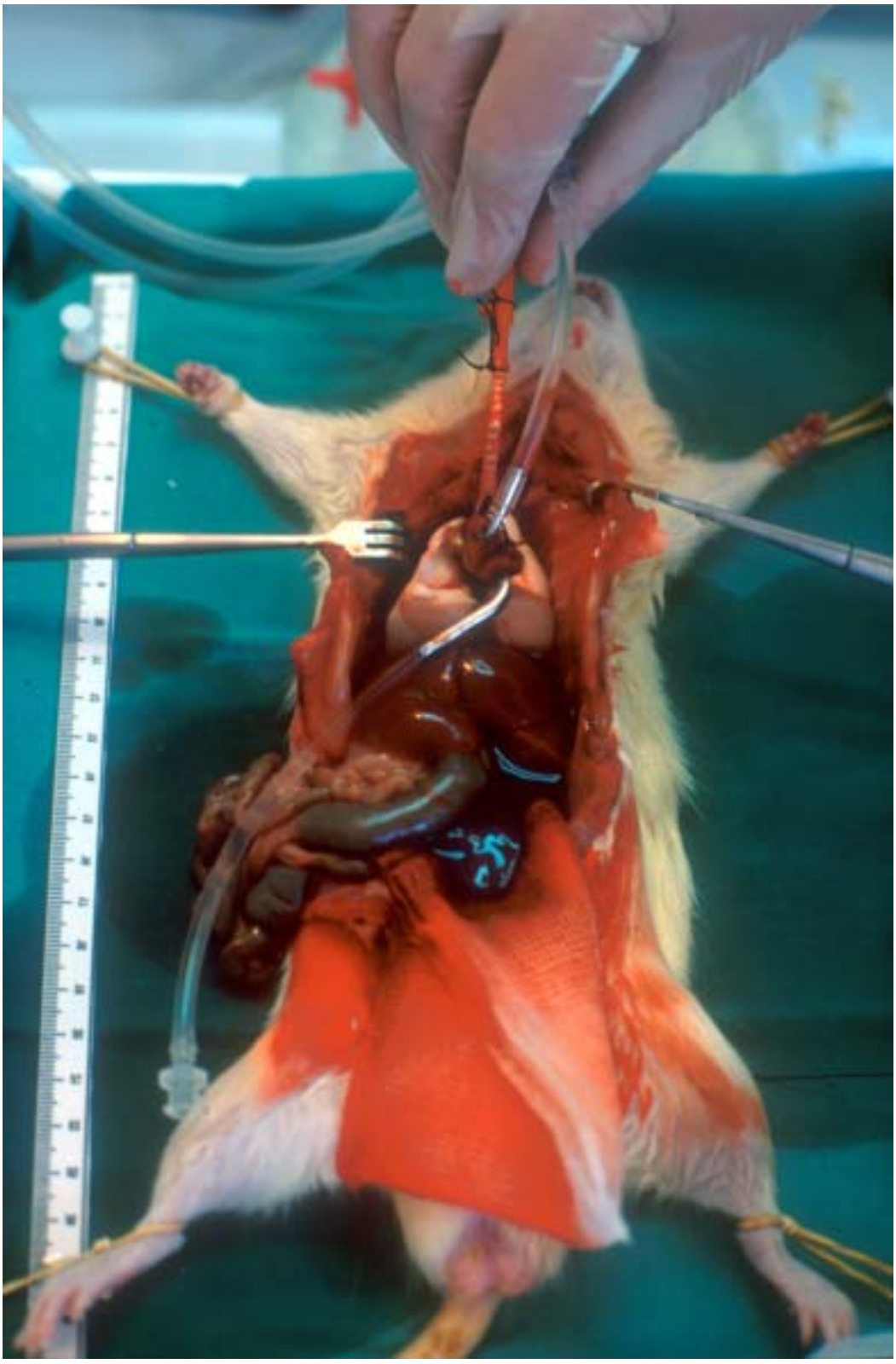
GALERIA DE IMÁGENES

Cateterización de la arteria pulmonar principal.



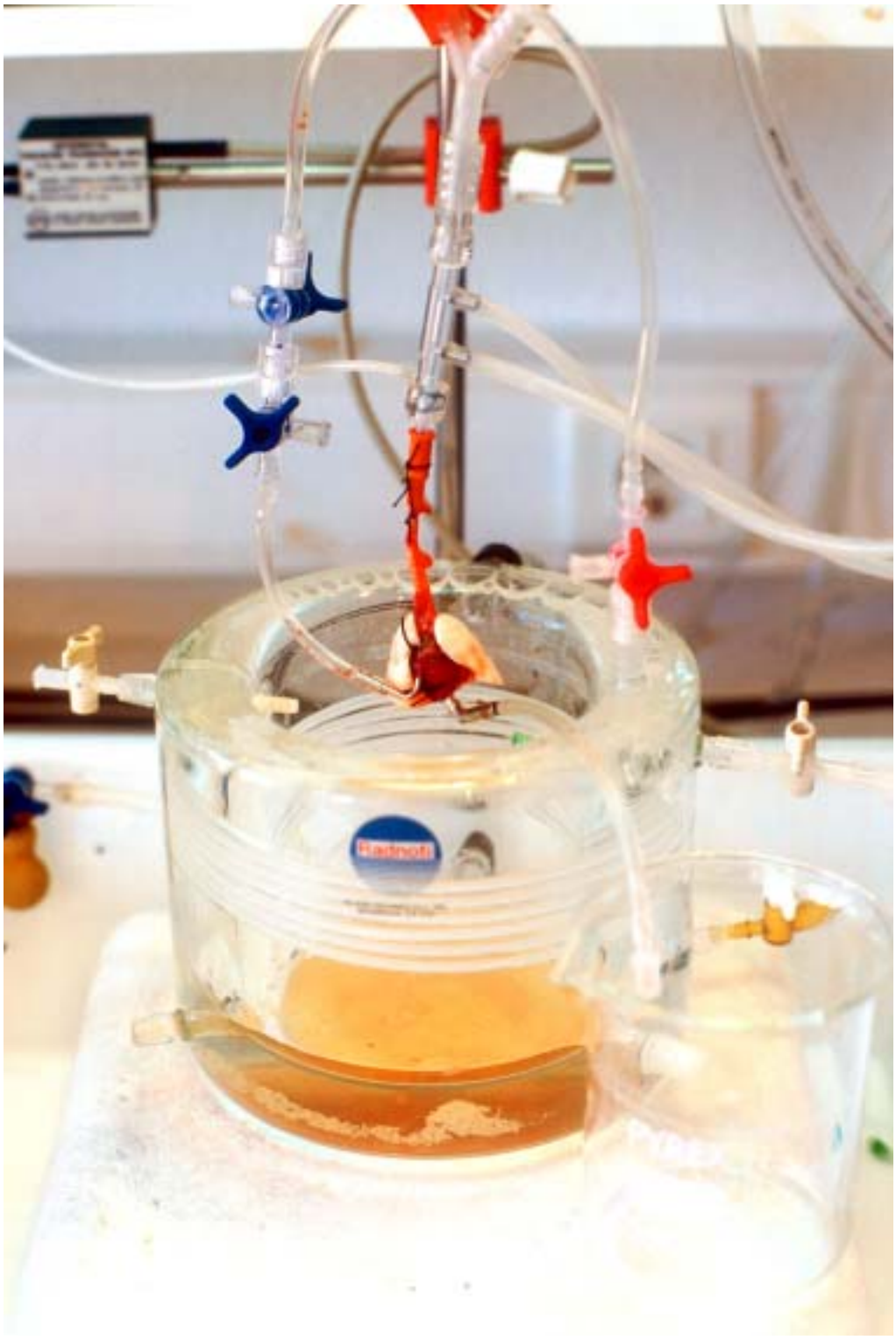
GALERIA DE IMÁGENES

Cateterización de la aurícula izquierda.



GALERIA DE IMÁGENES

El pulmón asilado y perfundido ex -vivo.



6,4 RESULTADOS.

El modelo de pulmón aislado y perfundido ex vivo, en la forma en que se ha expuesto anteriormente, está plenamente desarrollado en la UNI del HUSD.

Tabla 2.- Resultados. Grupo Control.

Variable	Minuto	Grupo Control N=7
PO_2 efluente (mm Hg)	**10**	**613±50**
	20	**617±42**
	30	**632±33**
	40	**632±42**
	50	**624±59**
	60	**610±75**
PAP media (mm Hg)	**15**	**10,4±2,1**
	30	**11,9±5,9**
	45	**14,6±11,4**
	60	**18,3±17,2**
Peak aw P (cm H_2O)	**15**	**11,0±2,2**
	30	**11,1±2,0**
	45	**11,2±2,1**
	60	**11,5±2,0**
Resistencia Vascular Pulmonar (mmHG/ml/min.)	**15**	**1,4±0,3**
	30	**1,6±0,8**
	45	**1,9±1,5**
	60	**2,0±2,4**
Exudación pleural (ml/min.)	**15**	**0**
	30	**0**
	45	**0**
	60	**0**
LDH (U/l.)	**5**	**25±5**
	15	**21±5**
	30	**<20**
	60	**<20**
1-Viabilidad(%)		**8,3±7,8**
Ww/Wd		**8,0±3,4**
Ww/Bw		**.005±.002**
Edema		**+**
Lesión		**0/+**
Necrosis		**0**

La tabla 2 expone los resultados obtenidos en el grupo denominado “control”, ya dentro del experimento. En este grupo, el pulmón no era sometido a isquemia, sino ventilado y perfundido inmediatamente tras la extracción del animal. Este grupo control se incluye en el experimento precisamente para ilustrar la validez del modelo y para obtener valores de referencia para la comparación estadística.

6,5 DISCUSIÓN.

6,5-1 De los métodos.

El texto que sigue se refiere a los métodos del modelo IPL en concreto desarrollado en el laboratorio de la UNI-HUSD. Por tanto, la discusión, crítica y conclusiones de los aspectos metodológicos deben aplicarse a ***todos*** los grupos que van a conformar el experimento, puesto que el modelo experimental es común a todos ellos.

6,5-1A Ventilación a presión positiva.

Las consecuencias fisiológicas de ventilar a presión positiva versus negativa ya se han expuesto en otro apartado de este trabajo (ver **4,3-6**) La validez de la ventilación a presión positiva está plenamente aceptada. Se eligió la modalidad de ventilación a presión positiva por motivos de mayor simplicidad

instrumental. En la actualidad, la UNI del HUSD no dispone del aparataje necesario para ventilar a presión negativa.

6,5-1B Ventilación a volumen corriente constante.

El ventilador del que se dispone (Hugo Sachs Elektronics® Alemania. Modelo 7025) permite fijar con precisión el volumen corriente y el número de ciclos por minuto, pero carece de dispositivo de ventilación con límite de presión. Al ventilar a volumen corriente constante, la variable independiente es la presión en vía aérea (ver **4,3-6**)

6,5-1C Ventilación con carbógeno.

Se utilizó carbógeno (O_2 95% + CO_2 5%) (Carburos Metálicos® España) en la ventilación, en vez de ventilar con aire ambiente, con el objetivo de intensificar las posibles diferencias entre grupos en el intercambio de gases (ver **4,3-6**)

6,5-1D Perfusión a volumen constante.

Se eligió la modalidad de perfusión a volumen constante versus a presión constante por motivos de facilidad instrumental, siendo ambas posibilidades igualmente válidas (ver **4,3-6**) Puesto que la bomba de perfusión impulsa un flujo de perfusión constante, la variable independiente es la presión en

arteria pulmonar. Por la misma razón, la presión media en arteria pulmonar expresa la resistencia vascular pulmonar (ver **4,3-6**)

6,5-1E Perfusión con suero de Krebs-Hensleit sin recirculación.

Las ventajas e inconvenientes de perfundir con una solución cristaloide versus sangre diluida versus sangre total, así como de perfundir con o sin recirculación, se discutieron ya en otro apartado (ver **4,3-6**)

El laboratorio de la UNI del HUSD dispone del instrumental necesario para la puesta en práctica de cualquiera de las seis (tres x dos) posibilidades técnicas.

El método elegido, la perfusión pulmonar con suero K-H adicionado con albúmina sin recirculación se ha utilizado en numerosos trabajos de I/R pulmonar. Se rechazó la posibilidad de perfundir con sangre autóloga porque debería haber permanecido en conservación durante el mismo tiempo que el de preservación del pulmón; y con sangre heteróloga para evitar cualquier tipo de lesión inmune que se sumara a la producida por I/R. En ambos casos se podía aumentar la variabilidad experimental de modo poco controlado, lo que se entendió como un factor que hubiera podido dificultar la posterior interpretación de los resultados.

6,5-1F Adición al suero de K-H de albúmina al 0,2%.

La literatura aconseja la adición de albúmina al suero K-H a concentraciones entre 2 gr% y 4 gr%, que son las fisiológicas en sangre. Ello no obstante, se adicionó albúmina a concentraciones entre diez y veinte veces menores, al 0,2%. Se hizo así porque durante la fase de preparación y desarrollo del modelo, se realizó la observación directa de que no se producía edema pulmonar macroscópico con estas concentraciones de albúmina y porque la preparación se mantenía estable en sus parámetros de intercambio de gases, de mecánica respiratoria y de hemodinamia pulmonar durante los sesenta minutos de perfusión.

6,5-1G Re/perfusión durante 60 minutos.

El período de reperfusión se fijó en 60 minutos porque la lesión por reperfusión está ya establecida, y porque la preparación experimental IPL se mantiene perfectamente estable durante este tiempo (ver **4,3-6**)

6,5-2 Discusión de los resultados.

La discusión de los resultados del grupo “control” y las conclusiones se refieren ***únicamente*** a este grupo.

6,5-2A Intercambio de gases.

La PO_2 del líquido efluente está siempre por encima de 600 mm Hg, lo que indica que el intercambio de gases se produce normalmente en todo momento.

La retención de agua, que es propia del modelo IPL, con formación de edema intersticial, no llega a ser suficientemente importante como para deteriorar de modo estadísticamente significativo el intercambio de gases.

6,5-2B Ventilación y perfusión.

Los valores de presión máxima inspiratoria en vía aérea (PawP)y de presión de perfusión pulmonar (PAP media) son los esperables, para ventilación a presión positiva.

La PawP apenas si se modifica con el tiempo. Es de destacar, en cambio, el aumento sostenido en el tiempo de la PAP media, que no alcanza a ser estadísticamente significativo. Paralelamente, se produce un aumento sostenido de la resistencia vascular pulmonar (PVR) que tampoco alcanza la significación estadística. El incremento en el tiempo que muestran ambos parámetros refleja un pequeño pero cierto deterioro progresivo de la perfusión pulmonar, probablemente secundario a la retención de agua que se va produciendo en el intersticio.

6,5-2C Medición de LDH en el líquido efluente.

En ningún momento se detectan valores de LDH en el líquido efluente pulmonar significativos de lisis celular en este grupo "control".

6,5-2D Agua retenida en el pulmón.

La relación entre peso húmedo y seco (W_W/W_D) observada en este grupo toma el valor 8, ligeramente alto con relación a lo esperable según la literatura[216] entre 5 y 6. Probablemente, esta observación puede explicarse por el bajo contenido de albúmina adicionada al suero de perfusión K-H.

La variable peso húmedo / peso corporal total (W_w/B_W) se refiere al peso húmedo del pulmón derecho. Los valores de referencia son propios del experimento. Por esta razón, los resultados obtenidos con W_w/B_W son más fiables que los obtenidos con W_W/W_D.

6,5-2E Estudios patológicos y de viabilidad celular.

De nuevo, y en coherencia con la observación anterior, el edema intersticial evaluado por el microscopista es mayor de lo esperado. No hay imágenes de lesión y/o necrosis en el parénquima pulmonar, tal como era de esperar.

La viabilidad celular del 92% puede considerarse un valor normal. El 8% de células no viables puede explicarse por las maniobras quirúrgicas y por la manipulación a que se ven sometidos los pulmones.

6,6 CONCLUSIONES.

6,6-1 Validez del modelo.

Los resultados obtenidos en el grupo “control” sin lesión pulmonar por I/R, demuestran el buen estado funcional de los pulmones perfundidos y ventilados ex-vivo.

Los resultados del grupo “control” que muestra la **Tabla 2** confirman la ***validez***, (los valores que toman las variables son los normales) la ***estabilidad,*** (no hay diferencias significativas entre los valores que toman las variables al inicio versus al final del período de perfusión) y la ***reproducibilidad*** (escasa dispersión de los valores que toman las variables) del modelo experimental.

Ergo, el modelo así desarrollado es válido para ser utilizado como base experimental. (En un experimento que reproduzca la lesión por I/R u otro tipo de lesión pulmonar)

Como ya se comentó, además de estimar la calidad del modelo experimental, este grupo establece los valores “de referencia normales” para los demás grupos del experimento. Las diferencias en los valores que tomen las variables entre el grupo control y los grupos que han sufrido I/R y, serán (presumiblemente) debidas a lesión por I/R.

SUMARIO

- El desarrollo de un modelo experimental válido era el objetivo primero, previo a la realización de cualquier experimento sobre lesión pulmonar por isquemia / reperfusión.

- El modelo de pulmón de rata aislado, ventilado y perfundido ex–vivo está plenamente desarrollado en el laboratorio de la Unidad de Investigación del Hospital Universitario Son Dureta.

- Los resultados obtenidos en el grupo control (sin isquemia ni reperfusión) avalan la validez, estabilidad y reproducibilidad del modelo desarrollado; y establecen los valores de referencia para las variables del estudio.

CAPITULO 7º

OBJETIVO 2:

PRESERVACIÓN PULMONAR MUY FRIA CON CRIOPROTECCIÓN.

REPRODUCCIÓN DE LA LESION POR ISQUEMIA-REPERFUSION EN UN MODELO EX-VIVO DE PULMON DE RATA

Y Dios lo hizo morir durante cien años y luego lo animó y le dijo:

-¿Cuánto tiempo has estado aquí? –Un día o parte de un día -respondió.

Alcorán, II, 261

7,1 INTRODUCCION

Con el modelo experimental desarrollado en los términos descritos en el capítulo anterior, se procedió a la realización del objetivo segundo, este es, el ensayo de la hipótesis planteada.

7,1-1 Antecedentes

La lesión por isquemia/reperfusión (I/R) pulmonar, causa frecuente de fracaso agudo post-reimplante del injerto, es una línea de investigación fundamental en trasplante de pulmón. (Ver **1,3-5**)

"Preservación" es el conjunto de maniobras o tratamientos con objeto de minimizar la lesión por I/R. (Ver **3,1**)

La investigación en preservación pulmonar pretende alcanzar un método “ideal” de preservación con el doble objetivo de mejorar la calidad y/o alargar el tiempo de preservación del órgano. (Ver **4,1** y **4,2**)

Actualmente, la preservación pulmonar se realiza por el método de perfusión e inmersión frías en una solución de preservación. Se consiguen así tiempos tolerados de isquemia de cuatro a seis horas (Ver **3,2-4** y **3,3**)

Los mecanismos de adaptación celular a la hipoxia consisten en la utilización preferente del escaso ATP disponible para el mantenimiento de la integridad estructural de las membranas y de los gradientes transmembrana (Ver **2,3-2**) El enfriamiento es protector frente a la isquemia porque produce un enlentecimiento general del metabolismo, reduciendo las necesidades tisulares de O_2 y de sustratos metabólicos. Sin embargo, el descenso de temperatura a que puede someterse el órgano es limitado porque el enfriamiento intenso es lesivo de por sí (Ver **2,3-3**) La temperatura óptima de preservación pulmonar, con las soluciones al uso de bajo contenido en potasio, se ha establecido entre los 8ºC y 15ºC, en torno a los 10ºC (Ver **4,4-3B**)

Los mecanismos metabólicos de respuesta a frío ambiental intenso han sido estudiados por **PW.Hoshashka** en algunas especies de batracios e insectos que son capaces de sobrevivir a temperaturas ambientales muy bajas, incluso por debajo de los

0ºC. Los animales se vuelven intensamente diabéticos. Se vierten al plasma (o hemolinfa) grandes cantidades de azúcares y polioles, hasta concentraciones que pueden alcanzar incluso los 3.000 mMol/l. Los polioles son crioprotectores por mecanismo de estabilización de las membranas, de las proteínas, y porque impiden la congelación (solidificación) del citosol y de las organelas celulares (Ver **2,3-4**)

No se han ensayado métodos de prevención o atenuación de la lesión por enfriamiento en preservación pulmonar. Teóricamente, debería ser posible mejorar la calidad y/o alargar el tiempo de preservación pulmonar manteniendo el órgano a temperaturas cercanas al punto de congelación del agua, disminuyendo así al máximo la demanda energética.

En definitiva,

7,1-2 Hipótesis.

La temperatura óptima de preservación pulmonar podría estar próxima a los 0ºC, si y sólo si, se proteje el órgano frente a la lesión por enfriamiento intenso. (Ver **5,1**)

7,1-3 Objetivos concretos.

Para evaluar la hipótesis planteada, se plantea realizar un experimento que compare la calidad de la preservación pulmonar según técnicas de preservación estándar, frente a la obtenida

mediante un nuevo método de preservación basado en el enfriamiento intenso a 0ºC y en la protección frente a la lesión por enfriamiento. (Ver **5,2-1** y **5,2-2**)

La novedad que presenta la "solución de preservación HUSD" es la incorporación de aditivos con (pretendidamente) la función de proteger al órgano frente a la lesión por frío intenso.

7,2 BASES TEÓRICAS PARA LA CRIOPROTECCIÓN.

LA SOLUCION "HOSPITAL UNIVERSITARIO SON DURETA" (HUSD)

La solución de preservación utilizada en los grupos TEST, y que se ha denominado "solución HUSD" es simplemente una modificación de la solución Krebs-Henseleit.

La solución HUSD es una solución acuosa del "tipo extracelular", esto es, de bajo contenido en potasio, con albúmina bovina al 0,2% como impermeante, glucosa al 1%, y con la novedad de incorporar etanol de 96º al 1% como (presunto) crioprotector. La adición del mismo pretende facilitar y/o incrementar los mecanismos fisiológicos antes citados de adaptación celular al frío.

Teóricamente, la sustancia / aditivo con función de crioprotector debería cumplir las condiciones siguientes:

-Ser hidro y liposoluble. Atravesar libremente las membranas, distribuyéndose por igual por todos los espacios, intra y extracelular.

-Aumentar la osmolaridad de la solución.

-Disminuir el punto de congelación de la solución. Y, al penetrar en la célula, disminuir el punto de congelación del citoplasma, las membranas y las organelas; es decir,

-Estabilizar los componentes celulares frente al frío intenso: Membranas, ácidos nucleicos y proteínas.

-No arrastrar agua (por gradiente osmótico) ni electrolitos (por gradiente eléctrico)

El alcohol etílico cumple estas condiciones: atraviesa libremente las membranas lipídicas, no se ioniza, establece uniones no covalentes con el agua, de modo que interrumpe la formación de cristales de hielo. Al ligar solvente, el etanol incrementa la osmolaridad. (La osmolaridad medida de la solución HUSD es de 494±13 y 485±37 mOsm/l (media ± SD) para los grupos HUSD-72 horas y HUSD-24 horas respectivamente) El alcohol etílico es una sustancia no tóxica, (en las cantidades utilizadas en este experimento) que en el individuo normal se elimina por orina, por exhalación y por metabolización hepática.

Otros compuestos, como los cuerpos cetónicos o el glicerol (éste último es un polialcohol) también cumplen las condiciones anteriores. En este experimento se decidió utilizar alcohol etílico porque es el disolvente - excipiente de la nitroglicerina de administración parenteral. El etanol, como

disolvente de la nitroglicerina, se ha utilizado en otros experimentos de preservación pulmonar ***con otro diseño,*** experimentos diseñados para ensayar la eficacia de la nitroglicerina como factor de homeostasis vascular del injerto.

Por el contrario, el diseño del experimento que se presenta obedece a otro objetivo. Este experimento pretende ser una ***aproximación*** a la crioprotección como concepto nuevo en preservación pulmonar. La solución HUSD no pretende, en ningún caso, ser la solución "definitiva o ideal" según la propuesta de **FO.Belzer** (ver **4,4-2A**) Entre otras razones, porque se han evitado aditivos de probada eficacia en preservación pulmonar, como son el NO o sus sustratos metabólicos, azúcares polímeros, etc.

7,3 MATERIAL Y METODOS.

7,3-1 Material.

El experimento se llevó a cabo en el laboratorio de la UNI del HUSD. Consiste en la reproducción de la lesión por I/R pulmonar en un modelo ex vivo de pulmón de rata (Ver **6,2**)

7,3-2 Métodos.

Las características metodológicas del modelo experimental están especificadas en el capítulo 6º. (Ver **6,3** y **6,5-1**)

7,3-3 Diseño.

El experimento está diseñado para poder comparar los resultados de 5 grupos.

- Grupo 1. GRUPO CONTROL. NO ISQUEMIA / REPERFUSIÓN. N=7

Se obtenían los pulmones según lo expuesto en **6,3-1**.

Los pulmones eran inmediatamente perfundidos y ventilados ex-vivo sin que mediara período alguno de isquemia. (Ver **6,3-2** y **6,3-3**)

Este grupo ***establece la validez del modelo experimental.*** (Ver **6,5-2** y **6,6-1**)

- Grupo 2. LPD-24 horas. **GRUPO de PRESERVACIÓN ESTÁNDAR**.

Preservación en solución Low-Potassium Dextran-Glucosa (LPD) durante 24 horas a 10º±0,5ºC. N=7

Obtención del bloque pulmonar.- Los procedimientos anestésicos y quirúrgicos para la obtención de los pulmones eran idénticos en todos los grupos (Ver **6,3-1**)

Isquemia y preservación.- Tras la obtención de los pulmones, se procedía a perfusión con solución LPD a temperatura ambiente, e inmersión en la misma solución, conservándose durante 24 horas a 10º±0,5º C (Ver **6,3-4**)

Reperfusión.- A las 24 horas de isquemia fría y preservación estándar se procedía a la reventilación y reperfusión en las mismas condiciones especificadas para el grupo 1 (Ver **6,3-2 6,3-3** y **6,3-5**)

La inclusión de este grupo en el diseño experimental es importante, puesto que sirve para valorar la lesión por I/R en el modelo desarrollado utilizando una solución de preservación estándar, LPD; a temperatura óptima para esta solución, 10ºC; y durante un tiempo estándar de 24 horas.

El grupo LPD-24 horas es pues, también un grupo control. Permite, en primer lugar, comparar los resultados propios con los reportados en la literatura, lo que sirve para confirmar la ***validez del modelo de lesión por I/R***. En segundo lugar, ***establece la calidad de la preservación estándar***, es decir, establece los valores frente a los que comparar la calidad de preservación que se obtenga en los grupos TEST.

- **Grupo 3. HUSD - 72 horas. GRUPO TEST**.

Preservación con solución HUSD, durante 72 horas a 0º±0,5ºC. N=9

Obtención del bloque pulmonar.- Idéntica en todos los grupos (Ver **6,3-1**)

Isquemia y preservación.- Tras la obtención de los pulmones, se procedía a perfusión con solución HUSD a temperatura ambiente, e inmersión en la misma solución, conservándose durante 72 horas a 0º±0,5º C (Ver **6,3-4**)

Reperfusión.- A las 72 horas de isquemia fría y preservación con crioprotección se procedía a la reventilación y reperfusión en condiciones idénticas para todos los grupos (Ver **6,3-2 6,3-3** y **6,3-5**)

- **Grupo 4. HUSD - 24 horas. GRUPO TEST.**

Preservación con solución HUSD durante 24 horas a 0º±0,5ºC. N=7

Obtención del bloque pulmonar.- Idéntica en todos los grupos (Ver **6,3-1**)

Isquemia y preservación.- Tras la obtención de los pulmones, se procedía a perfusión con solución HUSD a temperatura ambiente, e inmersión en la misma solución, conservándose durante 24 horas a 0º±0,5º C (Ver **6,3-4**)

Reperfusión.- A las 24 horas de isquemia fría y preservación con crioprotección se procedía a la reventilación y reperfusión en condiciones idénticas para todos los grupos (Ver **6,3-2 6,3-3** y **6,3-5**)

Los grupos HUSD-72 horas y HUSD-24 horas son los grupos TEST que sirven para ensayar la hipótesis. En el grupo HUSD-72, el tiempo de preservación (variable independiente) se alarga a 72 horas. En el grupo HUSD-24 se mantiene en 24 horas. En ambos casos el término de comparación (variable dependiente) es la calidad de la preservación.

- **Grupo 5. LPD - 72 horas. GRUPO TEST**

Preservación con solución LPD durante 72 horas a 10º±0,5ºC. N=8

Obtención del bloque pulmonar.- Idéntica en todos los grupos (Ver **6,3-1**)

Isquemia y preservación.- Tras la obtención de los pulmones, se procedía a perfusión con solución LPD a temperatura ambiente, e inmersión en la misma solución, conservándose durante 72 horas a 10º±0,5º C (Ver **6,3-4**)

Reperfusión.- A las 72 horas de isquemia fría y preservación estándar se procedía a la reventilación y reperfusión en condiciones idénticas para todos los grupos (Ver **6,3-2 6,3-3** y **6,3-5**)

7,3-4 Mediciones.

Se realizaron las mismas mediciones en todos los grupos. Los métodos de recolección, registro y lectura de las variables están especificados en **6,3-6**.

-Parámetros de función pulmonar durante la fase de reperfusión.

-Intercambio de gases:

-Gasometría del líquido afluente antes de iniciar la re/perfusión.

-Gasometrías seriadas del líquido efluente a los minutos 10, 20, 30, 40, 50 y 60 de re/perfusión.

-Hemodinamia:

-Registro continuo de la presión de perfusión.

-Recolección y medición del volumen del líquido efluente pulmonar.

-Cálculo de la resistencia vascular pulmonar total.

-Recolección y medición del volumen del líquido de exudación pleural.

-Mecánica respiratoria:

-Registro continuo de la presión en vía aérea.

-Lesión celular. Citolisis:

-Análisis de la concentración de LDH en muestras del líquido efluente, tomadas en los minutos 5, 15, 30 y 60 de re/perfusión.

-Parámetros tras la fase de re/perfusión:

-Relación peso húmedo/peso seco y peso húmedo/peso corporal total.

-Viabilidad celular.

-Análisis histológico.

7,3-5 Análisis estadístico.

7,3-5A Contraste de hipótesis.

-Hipótesis nula (H_0): ***No*** existen diferencias entre los grupos analizados.

-Hipótesis alternativa (H_1): Existen diferencias entre los grupos analizados.

-Nivel de significación (error de tipo I): Se consideran significativos valores de $p<.05$

7,3-5B Tests estadísticos.

-Variables paramétricas:

Para cada variable, se analizó la varianza de dos vías (two-way ANOVA) según grupo y tiempo.

Para cada variable, las diferencias entre grupos (para cada tiempo), y en el tiempo (para cada grupo) se compararon mediante análisis de la varianza de una vía (one-way ANOVA) y análisis post-hoc para la menor diferencia significativa (LSD, least significant difference)

-Variables cualitativas:

Las diferencias entre los grupos se compararon mediante test no paramétrico de Kruskal-Wallis.

7,3-5C Relación entre variables.

El grado de relación entre diferentes (dos) variables se evaluó mediante el coeficiente de correlación de Pearson (para variables cuantitativas) y mediante coeficiente de correlación de Spearmann (para variables no paramétricas)

7,3-5D Cálculo.

El cálculo de los estadísticos se realizó mediante computador personal compatible y software apropiado: hoja de cálculo Excel-Microsoft® (USA) y paquete estadístico SPSS® (USA)

7,4 RESULTADOS

7,4-1 Intercambio de gases.

Se presenta mediante la variable "presión parcial de O_2" (PO_2) medida en el líquido efluente, expresada en mm de mercurio (mm Hg) Puesto que las condiciones de re/perfusión y de re/ventilación son controladas por el investigador, los valores de PO_2 en el líquido efluente tiene el mismo valor que el cálculo de la fracción shunt (Q_S/Q_T), como expresión de la función pulmonar de intercambio de gases (Ver **4,3-6** y **6,6-3**)

Tabla 4.- **PO_2 en el líquido efluente** (mm Hg)

Media±Desviación estándar (SD)

Fracción inspiratoria de O_2 (F_IO_2)=95%

Variable	minuto	Grupo Control	Grupo 2 LPD-24h	Grupo 3 HUSD-72h	Grupo 4 HUSD-24h	Grupo 5 LPD-72h
		N =7	N =7	N =9	N =7	N =8
PO_2 efluente (mm Hg)	**10**	**613±50**	**515±143**	**528±67**	**379±109**	**458±111**
	20	**617±42**	**422±109**	**516±98**	**258±101**	**426±111**
	30	**632±33**	**373±90**	**518±89**	**209±80**	**418±96**
	40	**632±42**	**353±70**	**516±102**	**200±109**	**404±65**
	50	**624±59**	**318±88**	**509±100**	**196±85**	**398±75**
	60	**610±75**	**332±104**	**490±88**	**207±79**	**402±78**

Gráfico 4. PO_2 del líquido efluente. Media ± error estándar (SEM)

Análisis post hoc versus grupo LPD 24 horas

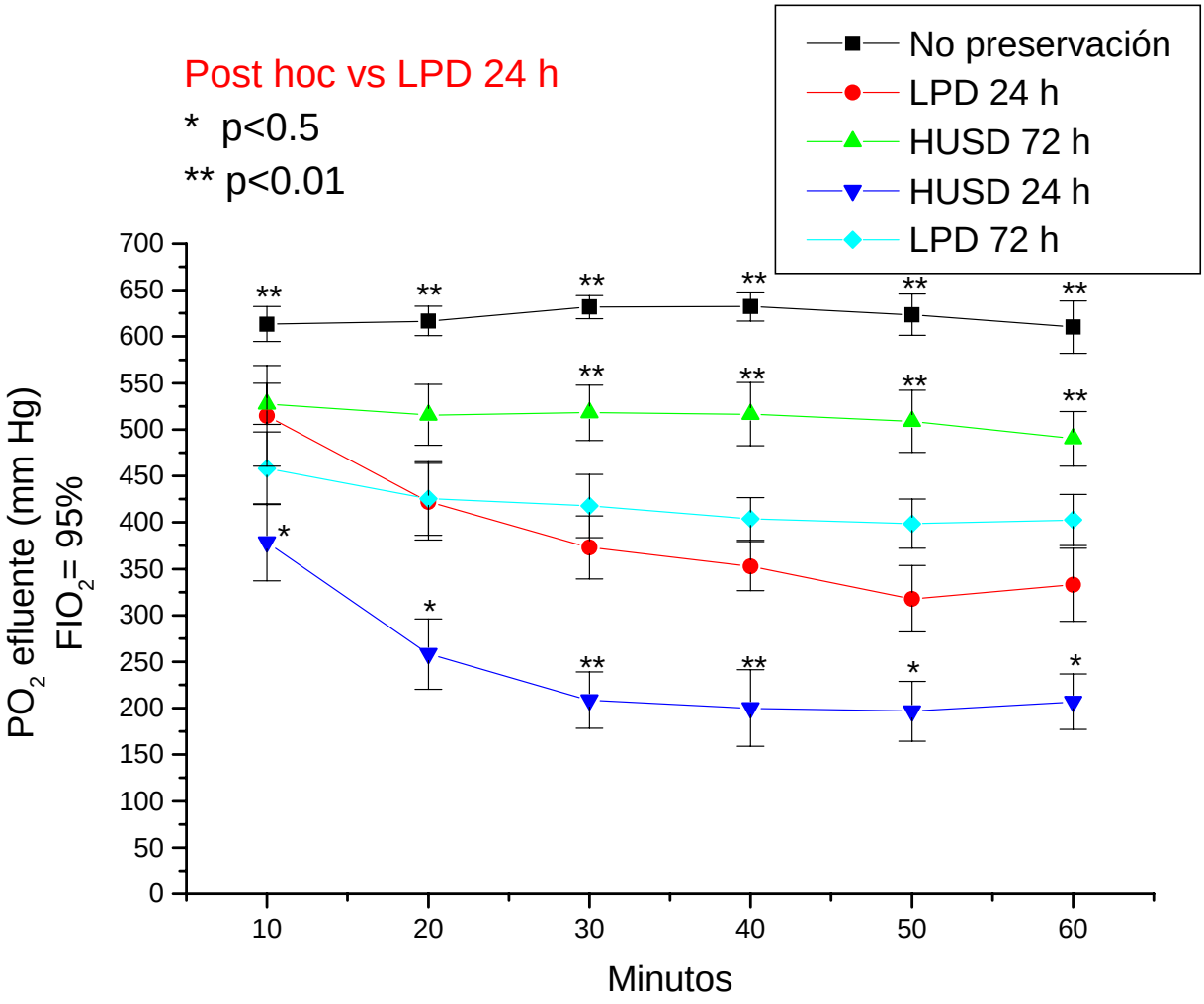
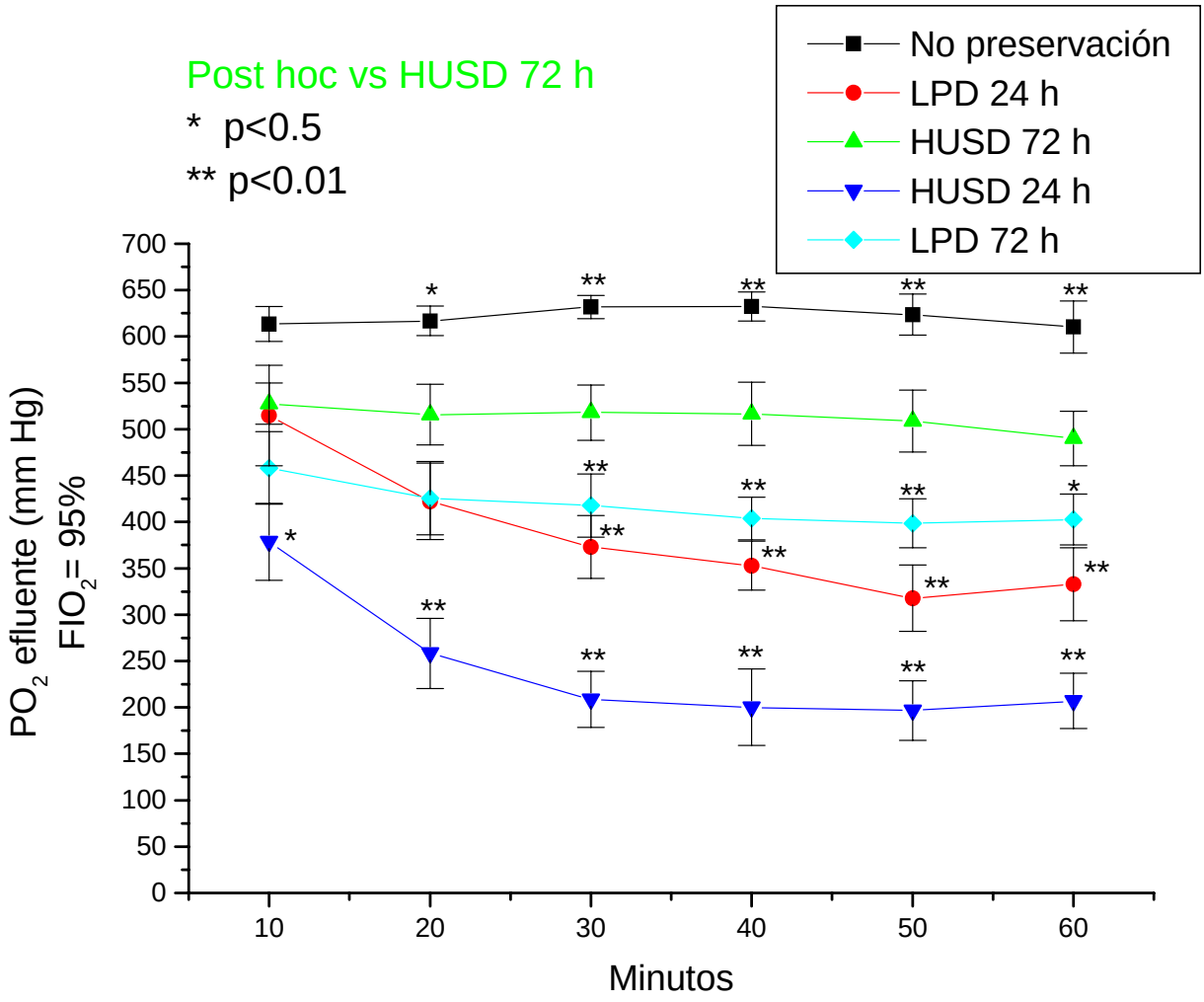


Gráfico 5. PO_2 en el líquido efluente. Media ± error estándar (SEM)

Análisis post hoc versus grupo HUSD 72 horas



La PO_2 medida en el líquido efluente pulmonar muestra un deterioro significativo en la capacidad de intercambiar gases que sufren todos los grupos que han sido sometidos a I/R con relación al grupo control.

Comparados entre sí, los dos grupos LPD, de 24 y 72 horas, no presentan diferencias estadísticamente significativas entre sí, en ningún momento de la reperfusión.

Con relación al grupo estándar LPD 24 horas, el grupo HUSD 72 horas presenta mejor función de intercambio de gases, mientras que para el grupo HUSD 24 horas es peor.

Ambos grupos de isquemia de 24 horas (LPD y HUSD) muestran un marcado deterioro inicial, en los primeros 20 minutos de reperfusión, para estabilizarse después. Por el contrario, los grupos LPD y HUSD de 72 horas de isquemia, no presentan diferencias significativas en esta función de intercambio de gases a lo largo de los 60 minutos de reperfusión.

7,4-2 Mecánica respiratoria.

Se presenta mediante la variable “presión inspiratoria máxima en la vía aérea” (PawP, Peak airway pressure) en cm de H_2O. Al ser constante el volumen corriente (V_T) la PawP expresa la distensibilidad pulmonar (Ver **4,3-6**)

Tabla 5.- **PawP** (cm H_2O) Media ± Desviación estándar (SD)

Variable	minuto	Grupo Control	Grupo 2 LPD-24h	Grupo 3 HUSD-72h	Grupo 4 HUSD-24h	Grupo 5 LPD-72h
		N =7	N =7	N =9	N =7	N =8
Peak aw P (cm H_2O)	15	11,0±2,2	45,1±10,4	30,7±4,5	35,2±13,8	ND(*)
	30	11,1±2,0	45,4±11,2	31,7±4,5	33,3±10,9	ND
	45	11,2±2,1	41,0±10,4	31,4±4,1	37,1±13,7	ND
	60	11,5±2,0	39,0±8,9	31,6±5,8	35,6±13,2	ND

(*) Debido a un problema técnico, no están disponibles los resultados para el grupo LPD 72 horas.

El grupo control, muy estable a lo largo de todo el experimento, muestra las presiones necesarias para ventilar el pulmón normal. Todos los grupos sometidos a isquemia reperfusión presentan diferencias muy significativas frente al grupo control, con deterioro marcado de la distensibilidad.

Frente al grupo de preservación estándar, el grupo test HUSD de 72 horas, muestra mejor distensibilidad en el período inicial de la reperfusión, diferencia que se mitiga y deja de ser estadísticamente significativa después. Los grupos con I/R no presentan entre sí diferencias significativas en los minutos 45 y 60.

Gráfico 6. Presión máxima en vía aérea (cm H_2O) Media ± error estándar (SEM)

Análisis post hoc versus grupo LPD 24 horas

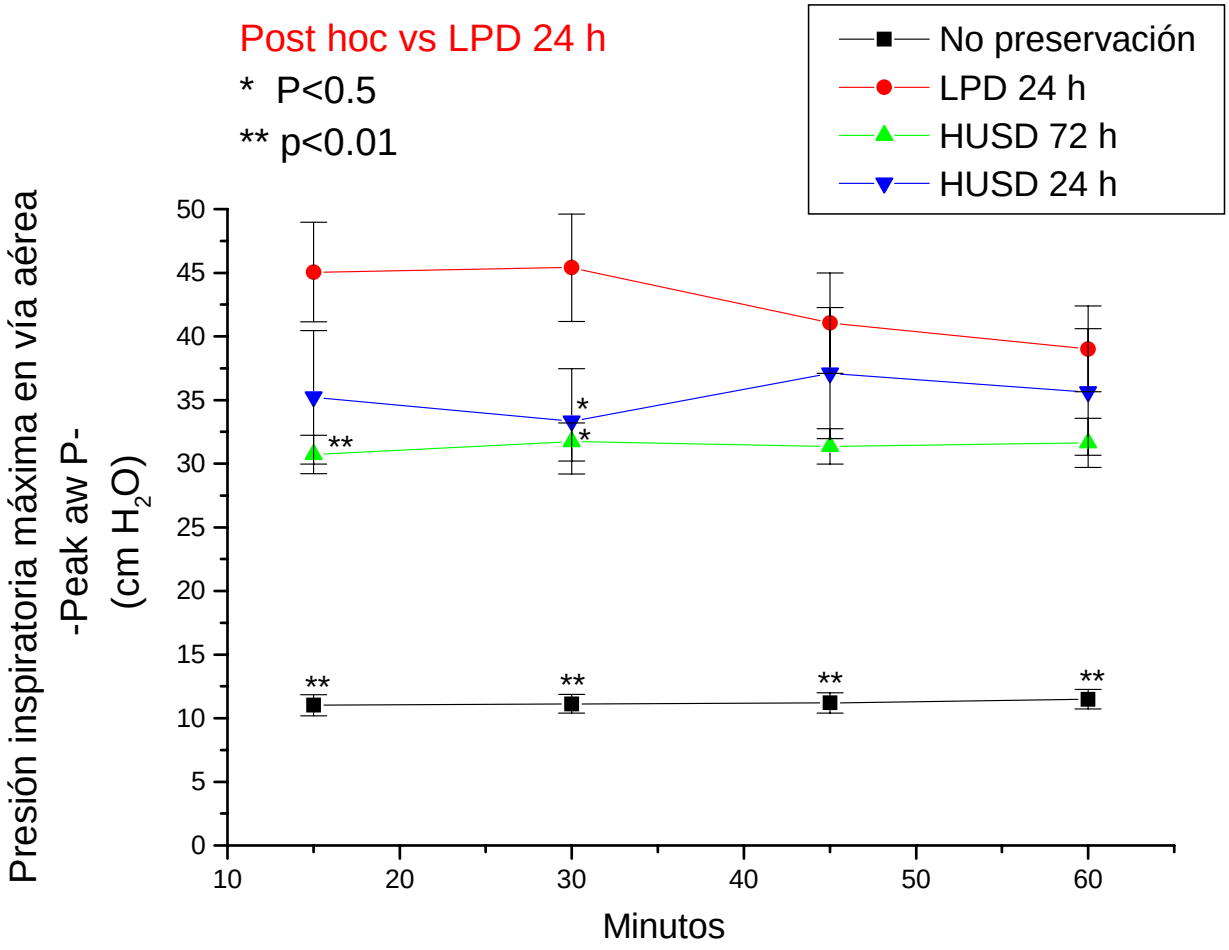
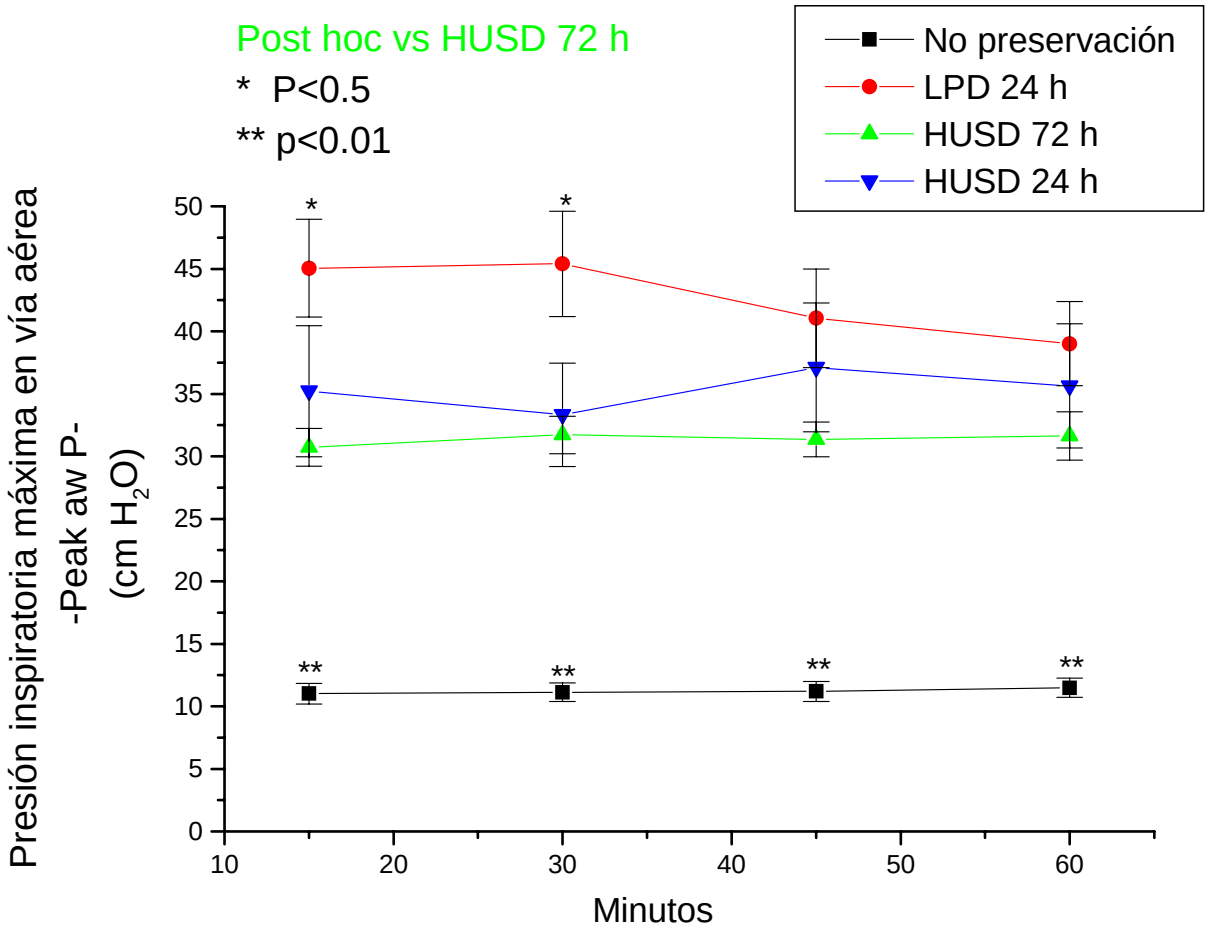


Gráfico 7. Presión máxima en vía aérea (cm H_2O) Media ± error estándar (SEM)

Análisis post hoc versus grupo HUSD 72 horas



7,4-3 Hemodinamia.

Se presenta mediante la variables "presión media en arteria pulmonar" (PAP media) en mm Hg y "resistencia vascular pulmonar total" (PVR) en mmHg/ml*min^{-1} La variable medida es PAP, mientras que PVR es calculada, función de PAP media y del flujo de perfusión, que es constante. (Ver **4,3-6C**)

Tabla 6 .- **Presión Arterial Pulmonar media** (mm Hg) y **Resistencia Vascular Pulmonar total** (mmHg/ml*min^{-1})

Media ± Desviación estándar (SD)

Variable	minuto	Grupo Control	Grupo 2 LPD-24h	Grupo 3 HUSD-72h	Grupo 4 HUSD-24h	Grupo 5 LPD-72h
		N= 7	N= 7	N= 9	N= 7	N= 8
PAP media (mm Hg)	15	10,4±2,1	20,6±5,0	10,8±3,8	18,2±6,9	13,0±4,3
	30	11,9±5,9	20,6±6,4	11,4±6,3	17,5±6,4	13,9±3,4
	45	14,6±11,4	22,0±12,1	13,4±10,0	17,0±6,0	17,4±6,6
	60	18,3±17,2	23,9±18,1	17,0±18,1	16,6±5,9	18,4±5,1
Resistencia Vascular Pulmonar (mmHg/ml/min.)	15	1,4±0,3	2,7±0,7	1,4±0,5	2,4±0,9	1,7±0,6
	30	1,6±0,8	2,7±0,9	1,5±0,8	2,3±0,9	1,9±0,5
	45	1,9±1,5	2,9±1,6	1,8±1,3	2,3±0,8	2,3±0,9
	60	2,0±2,4	3,2±2,4	2,3±2,4	2,2±0,8	2,4±0,7

La PAP media tiende a aumentar discretamente con el tiempo en todos los grupos, incluido el grupo control. Estas diferencias en el tiempo, en ningún caso alcanzan a ser significativas. La tendencia al aumento sostenido de la PAP puede explicarse por el deterioro "normal" que sufre la preparación experimental (Ver **4,3-6**)

Las diferencias entre grupos, incluido el grupo control, se manifiestan solamente en los primeros minutos de reperfusión,

con inequívoca tendencia a igualarse hacia el período final de la misma, de modo que en el minuto 60 no se aprecian diferencias. En definitiva, los grupos sometidos a I/R sólo muestran hipertensión pulmonar en los primeros 20 a 30 minutos de la reperfusión.

Gráfico 8. Presión Arterial Pulmonar media (mm Hg)

Media ± error estándar (SEM)

Análisis post hoc versus grupo LPD 24 horas

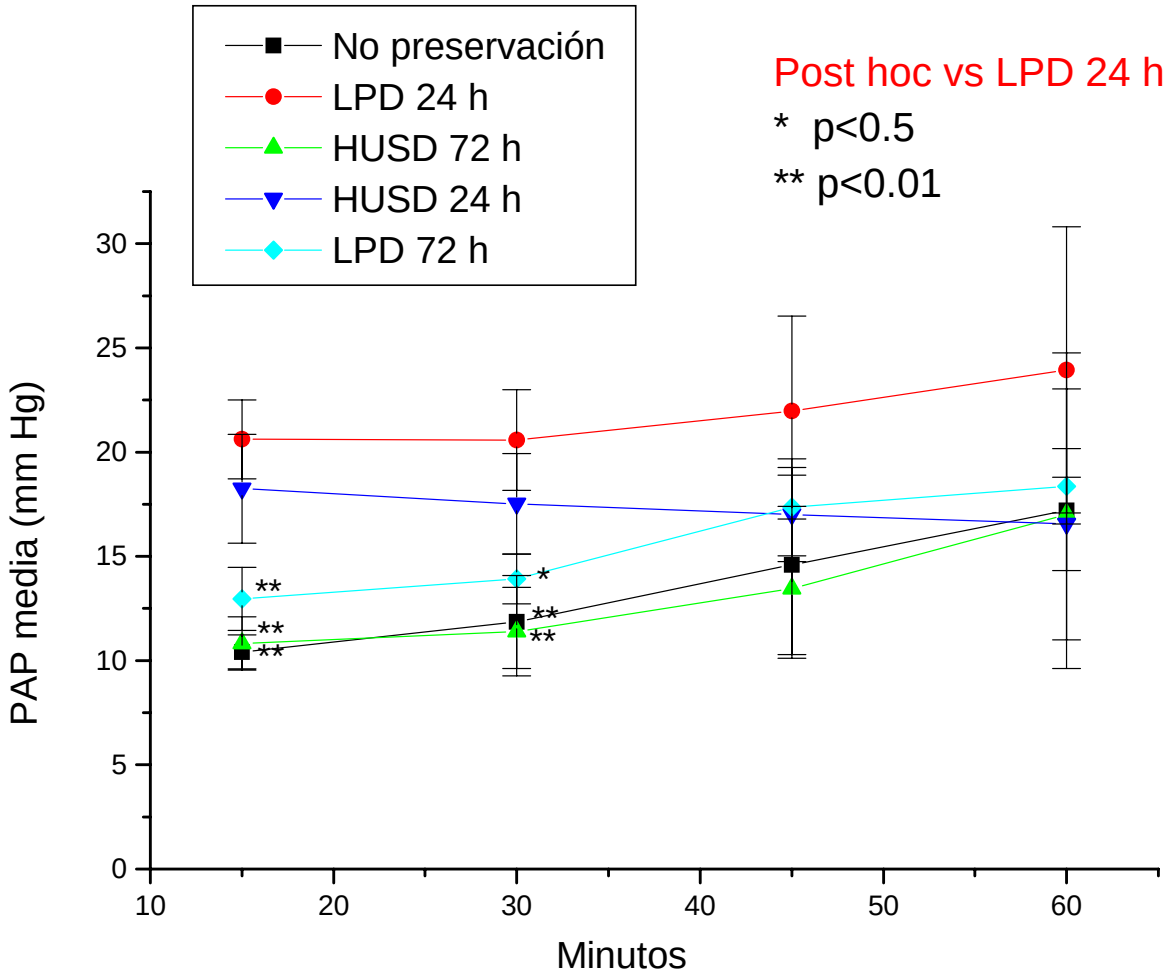


Gráfico 9. Presión Arterial Pulmonar media (mm Hg)

Media ± error estándar (SEM)

Análisis post hoc versus grupo HUSD 72 horas

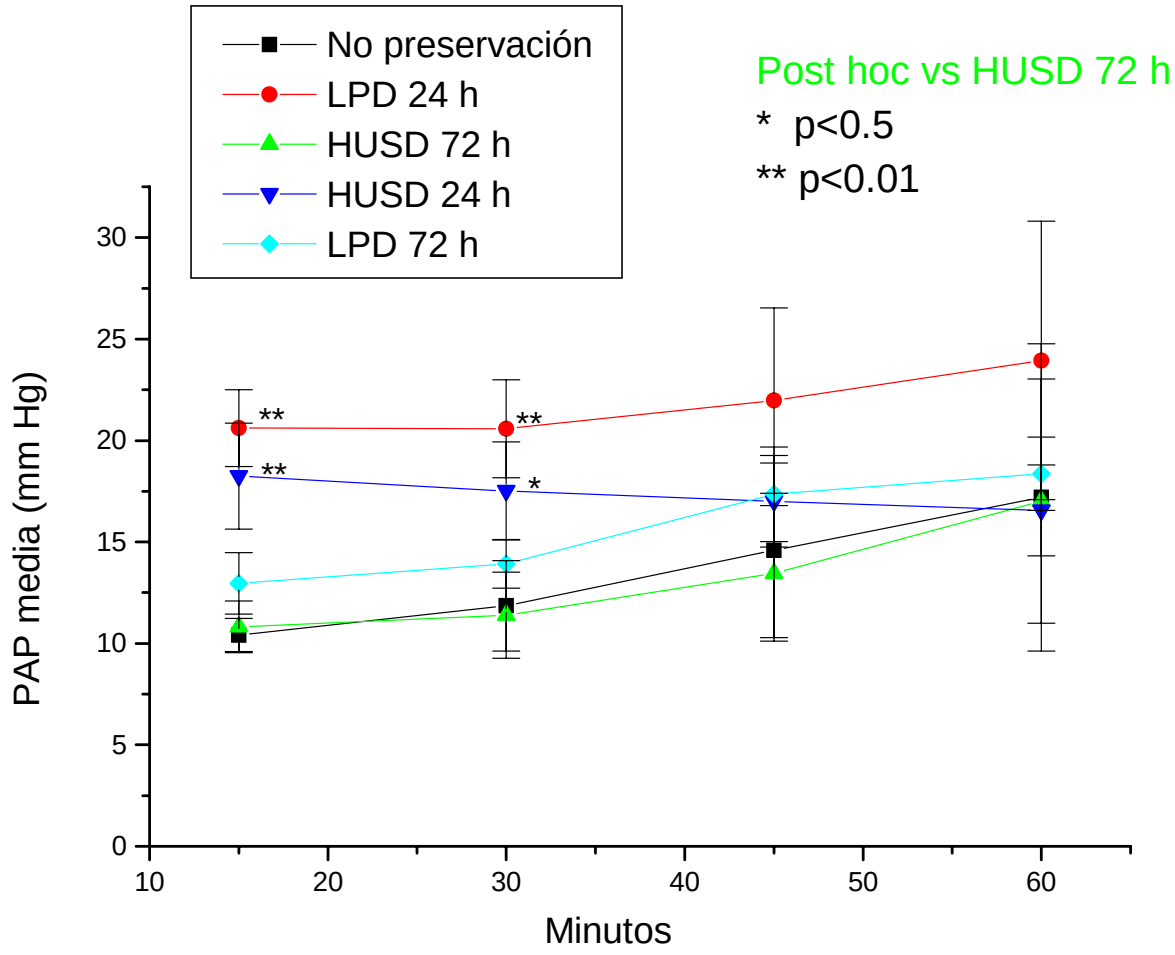


Gráfico 10. Resistencia Vascular Pulmonar total (mm Hg/ml* min^{-1})

Media ± error estándar (SEM)

Análisis post hoc versus grupo LPD 24 horas

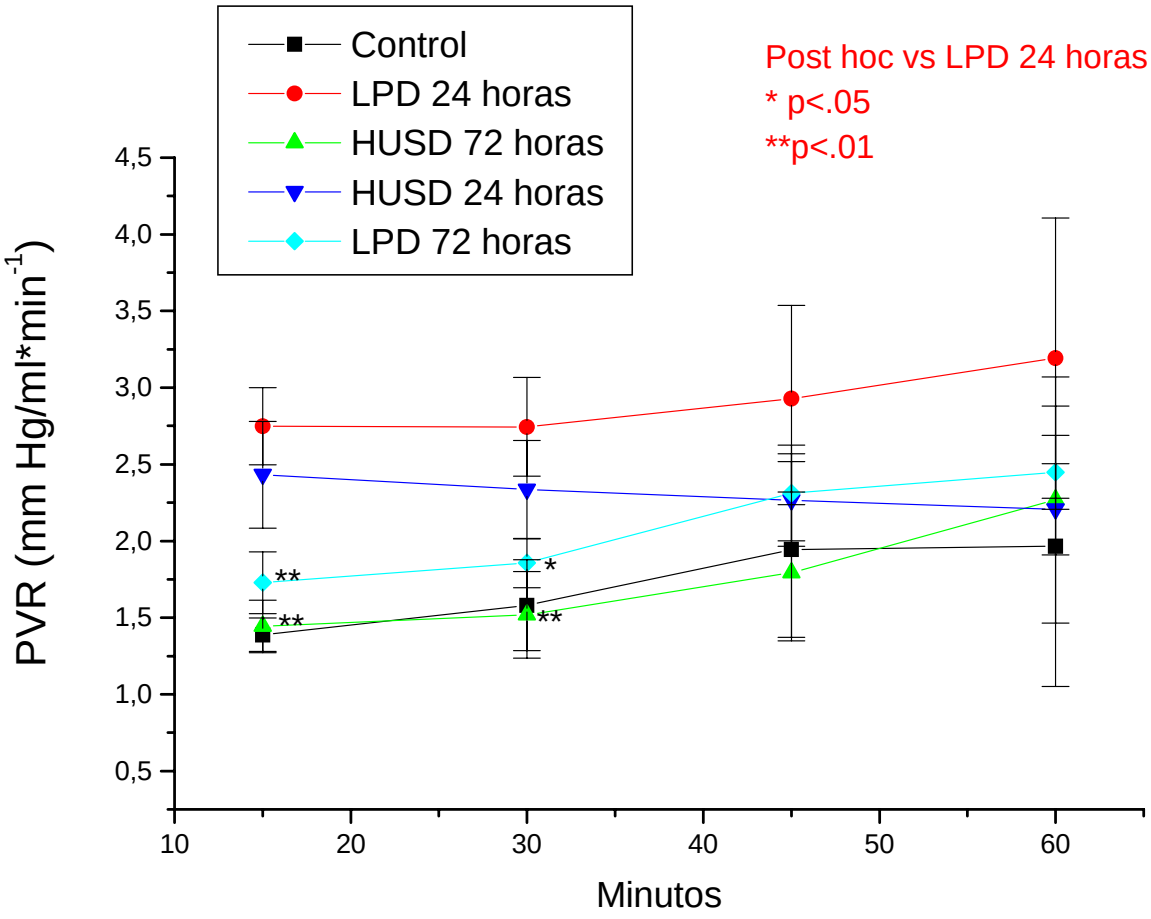
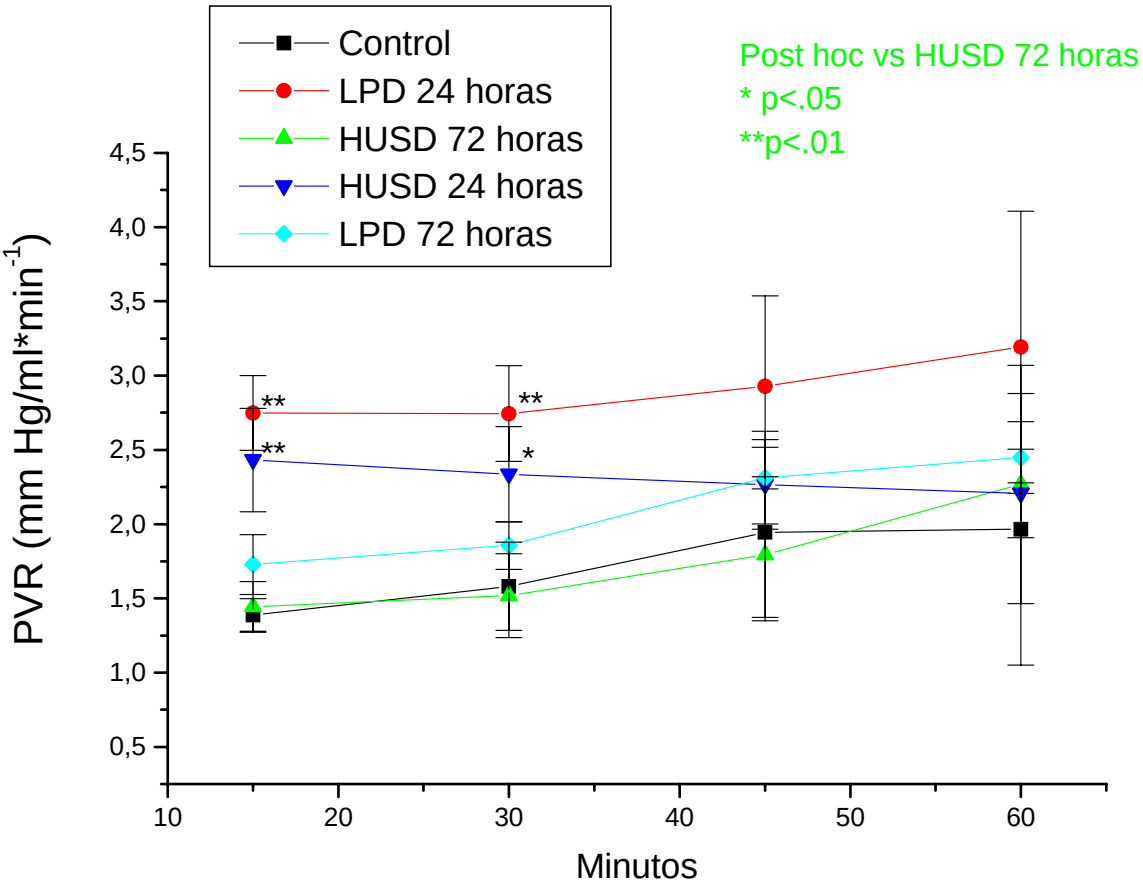


Gráfico 11. Resistencia Vascular Pulmonar total (mm Hg/ml* min^{-1})

Media ± error estándar (SEM)

Análisis post hoc versus grupo HUSD 72 horas



7,4-4 Exudación pleural.

Los pulmones del grupo control no preservado, no presentan exudación de líquido a través de la superficie pleural. En todos los demás grupos, la recolección de líquido exudado por la pleura es significativamente mayor. La exudación de líquido pleural es pues, indicador de la lesión por I/R.

Entre los grupos con I/R ambos grupos de 72 horas son los que menor producción de líquido pleural presentan, diferencias que en algunos puntos alcanzan la significación estadística.

Tabla 7.- **Exudación pleural** (ml/min) Media ± Desviación estándar.

Variable	**minuto**	**Grupo Control**	**Grupo 2 LPD-24h**	**Grupo 3 HUSD-72h**	**Grupo 4 HUSD-24h**	**Grupo 5 LPD-72h**
		N =7	**N =7**	**N =9**	**N =7**	**N =8**
Exudación Pleural (ml/min.)	**15**	**0**	**1,5±0,6**	**1,2±0,4**	**1,6±1,1**	**1,1±0,3**
	30	**0**	**2,0±0,9**	**1,3±0,6**	**1,7±0,8**	**1,2±0,4**
	45	**0**	**1,7±0,6**	**1,2±0,4**	**1,7±0,9**	**1,3±0,3**
	60	**0**	**2,0±0,7**	**1,3±0,5**	**1,7±0,7**	**1,4±0,5**

Gráfico 12. Exudación pleural (ml/min) Media ± error estándar (SEM)

Análisis post hoc versus grupo LPD 24 horas

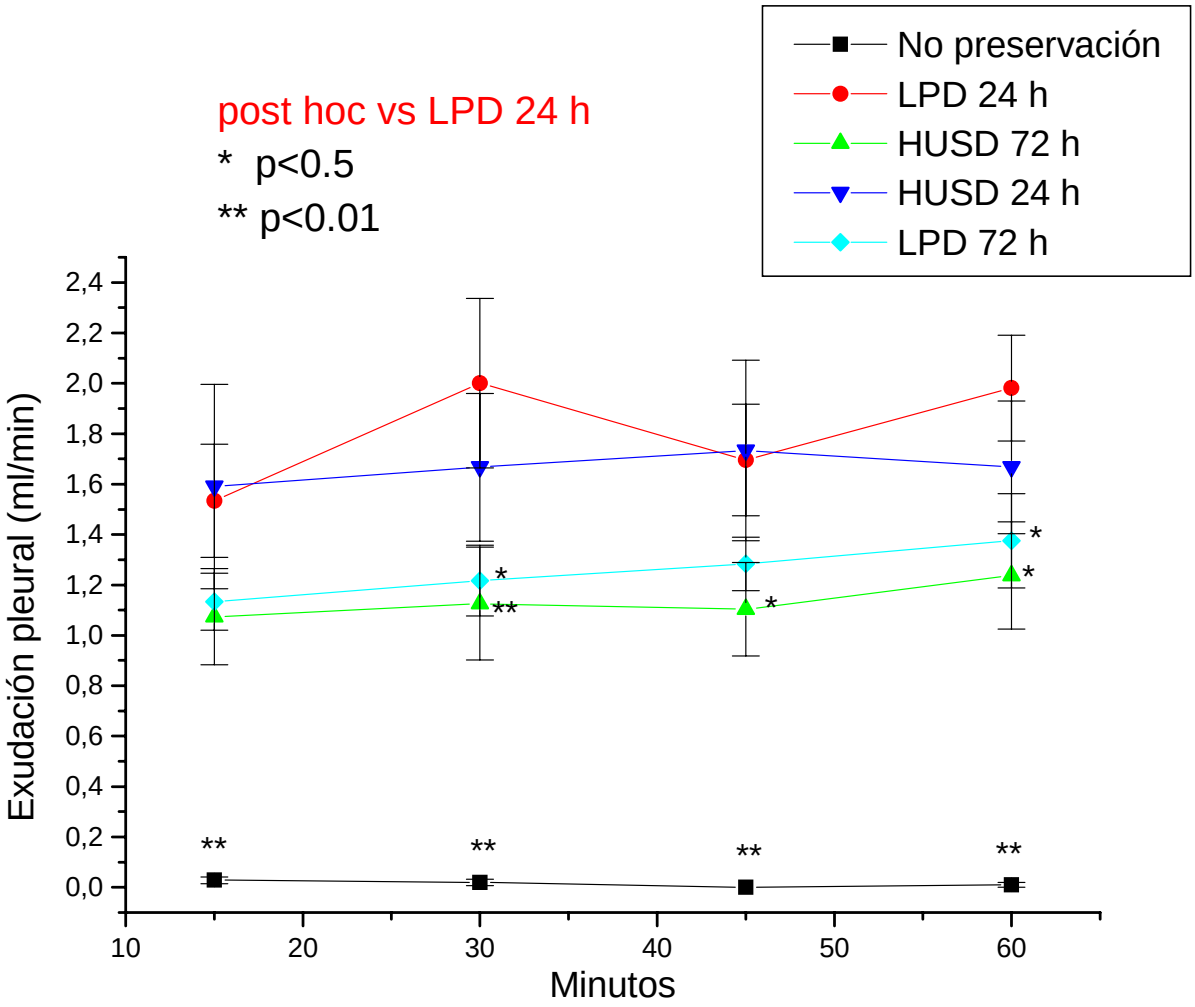
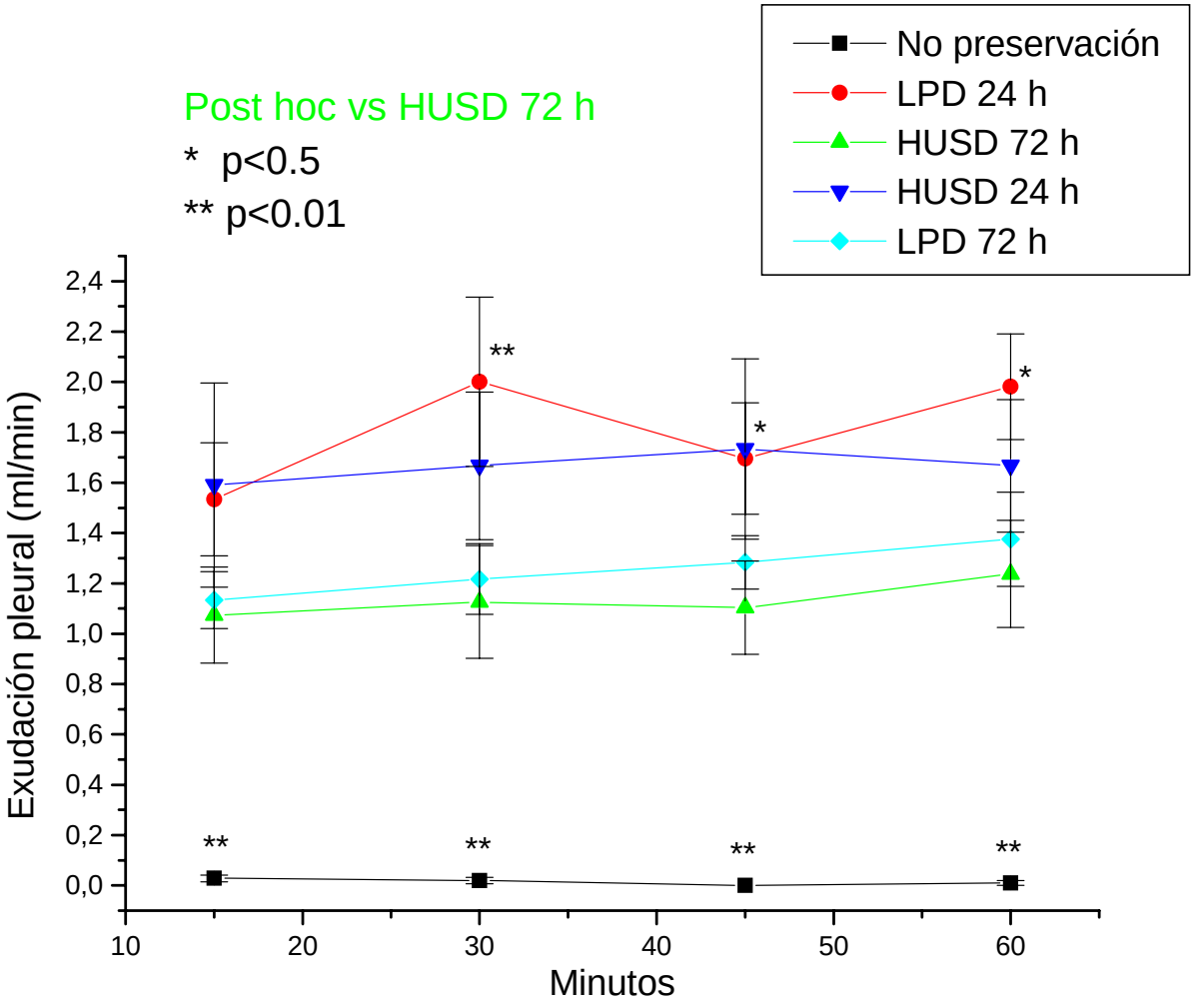


Gráfico 13. Exudación pleural (ml/min) Media ± error estándar (SEM)

Análisis post hoc versus grupo HUSD 72 horas



7,4-5 Formación de edema pulmonar

La suma del flujo de exudación pleural más el flujo efluente pulmonar resulta en la salida total de líquido del pulmón. Puesto que el flujo de entrada es constante (7-8 ml /minuto) La diferencia entre los flujos de entrada y de salida (efluente y pleural) es el líquido que retiene el pulmón, es decir, el edema pulmonar.

Gráfico 14. Formación de edema pulmonar (ml/min) Media ± error estándar (SEM)

Análisis post hoc versus grupo LPD 24 horas

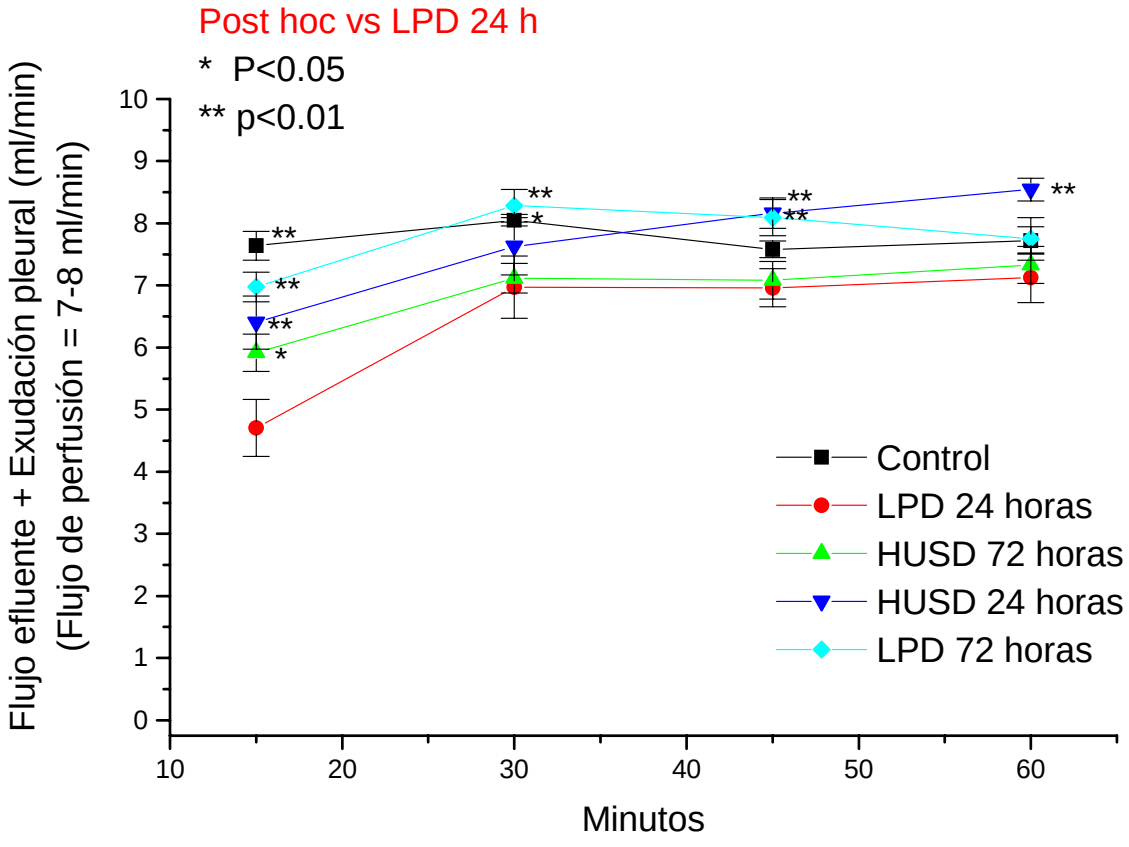


Gráfico 15. Formación de edema pulmonar (ml/min) Media ± error estándar (SEM)

Análisis post hoc versus grupo HUSD 72 horas

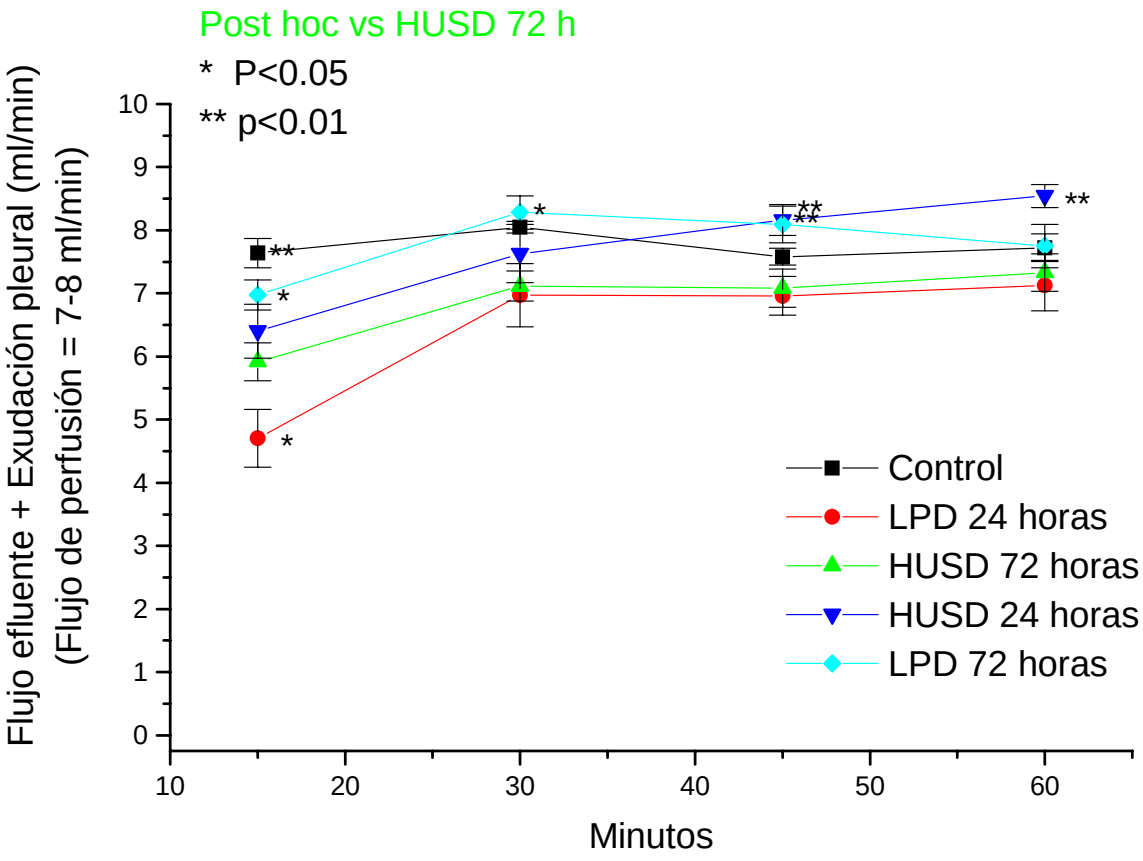
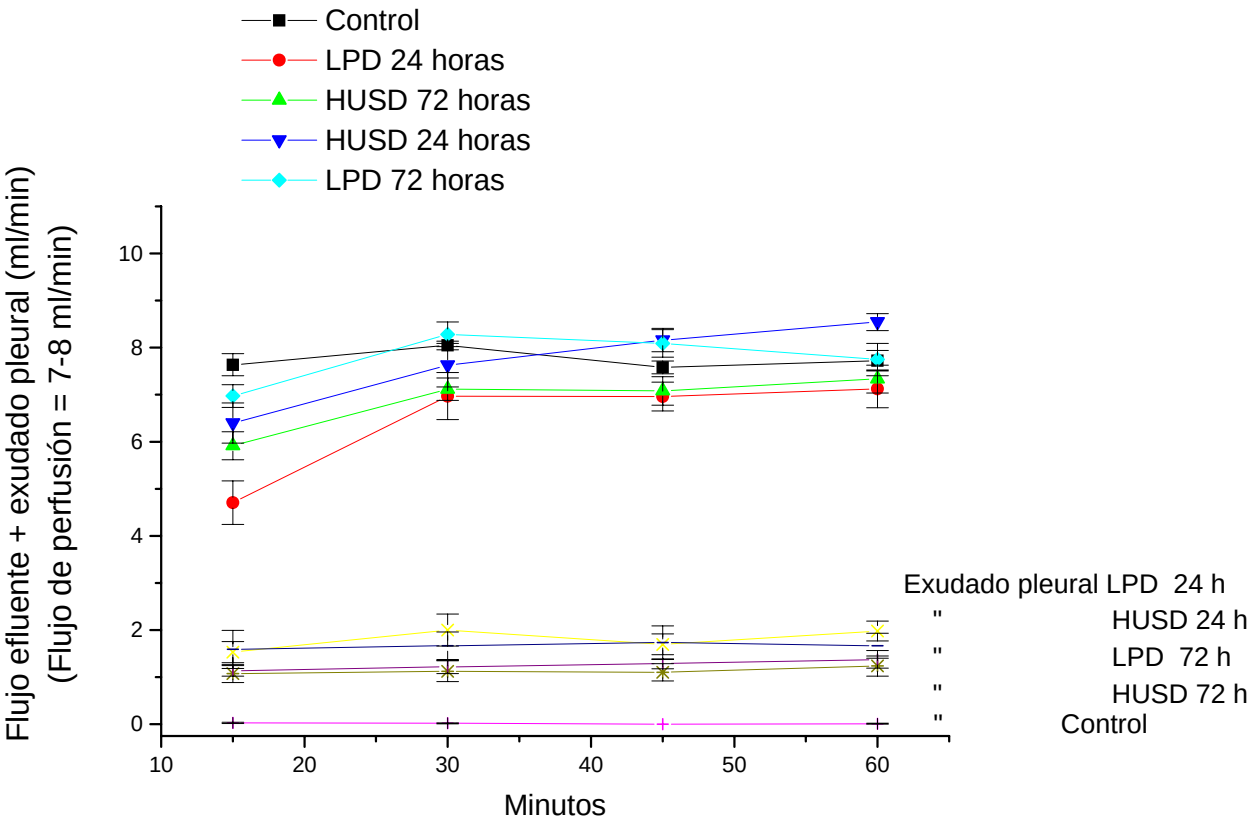


Gráfico 16. Formación de edema pulmonar / exudación pleural (ml/min)

Media ± error estándar (SEM)



Se aprecia claramente que la retención de líquido se produce en los primeros diez – quince minutos de la reperfusión (los valores que se muestran son la media ±SEM de la media de los minutos 0-15, 15-30, 30-45 y 45-60)

Lesión celular – citolisis.

Se evalúa por medición del encima lactato deshidrogenasa (LDH) en el líquido efluente pulmonar. La concentración de LDH se presenta en Unidades / litro (U/l)

Tabla 8.- LDH en el líquido efluente pulmonar (U/l)

Media ± Desviación estándar (SD)

Variable	minuto	Grupo Control	Grupo 2 LPD-24h	Grupo 3 HUSD-72h	Grupo 4 HUSD-24h	Grupo 5 LPD-72h
		N =7	N =7	N =9	N =7	N =8
LDH (U/l.)	**5**	**25±5**	**392±102**	**651±215**	**309±116**	**749±131**
	15	**21±5**	**143±102**	**268±134**	**85±18**	**368±104**
	30	**<20**	**60±18**	**116±44**	**48±12**	**166±39**
	60	**<20**	**40±9**	**61±19**	**31±5**	**99±40**

Los pulmones del grupo control, sin isquemia, no producen LDH. Todos lo grupos sometidos a I/R producen LDH en cantidades significativamente mayores con relación al grupo control, en todas las determinaciones.

Todos los grupos sometidos a I/R muestran el mismo patrón temporal, con máxima producción de LDH en los primeros minutos de la reperfusión, producción que va disminuyendo a medida que el tiempo avanza y acercándose a los valores que muestra el grupo control. Sin embargo, incluso en el minuto 60, las diferencias con relación al grupo control son significativas.

Gráfico 17. Concentración de LDH en el líquido efluente pulmonar (U/litro)

Media ± error estándar (SEM)

Análisis post hoc versus grupo LPD 24 horas

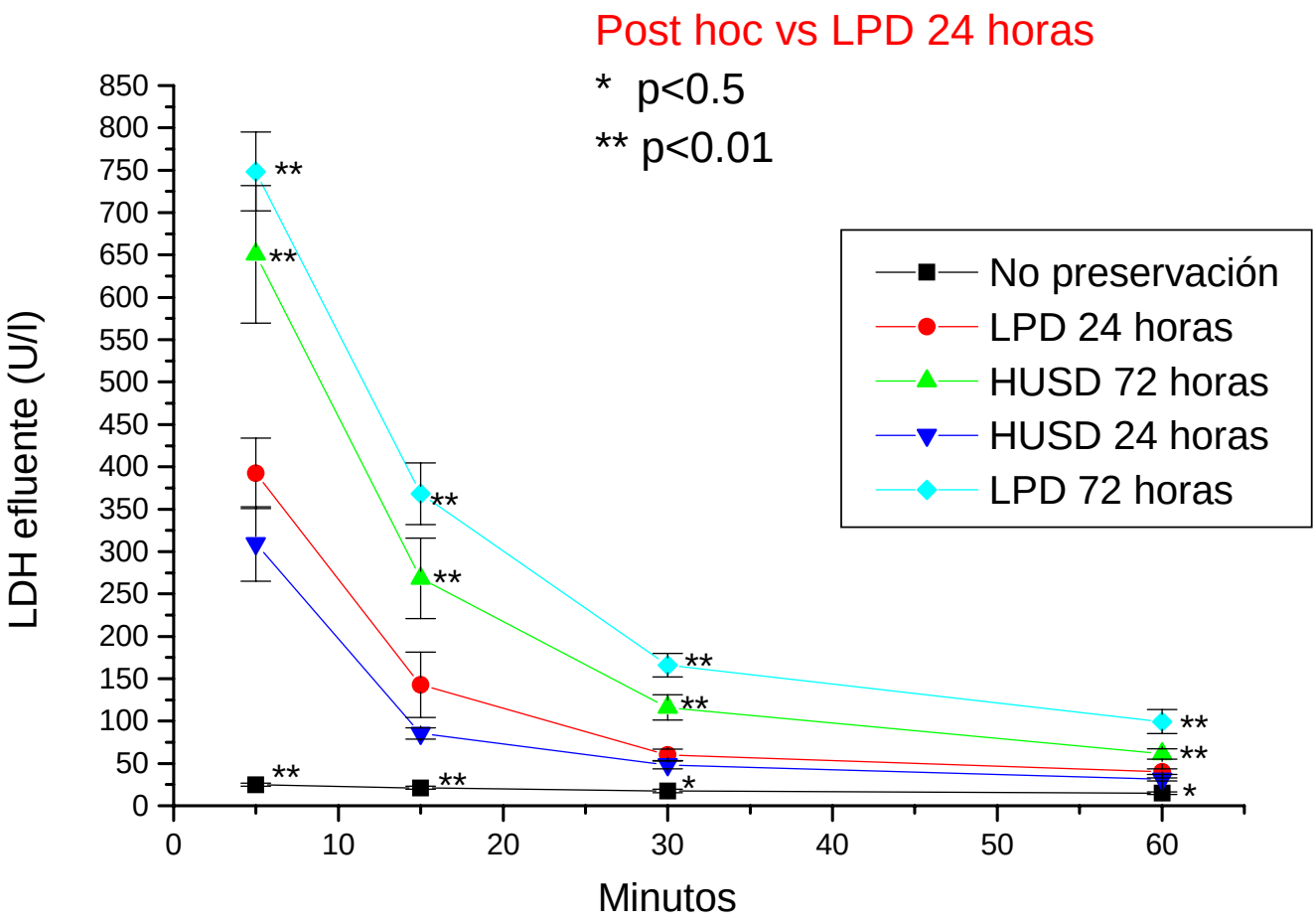
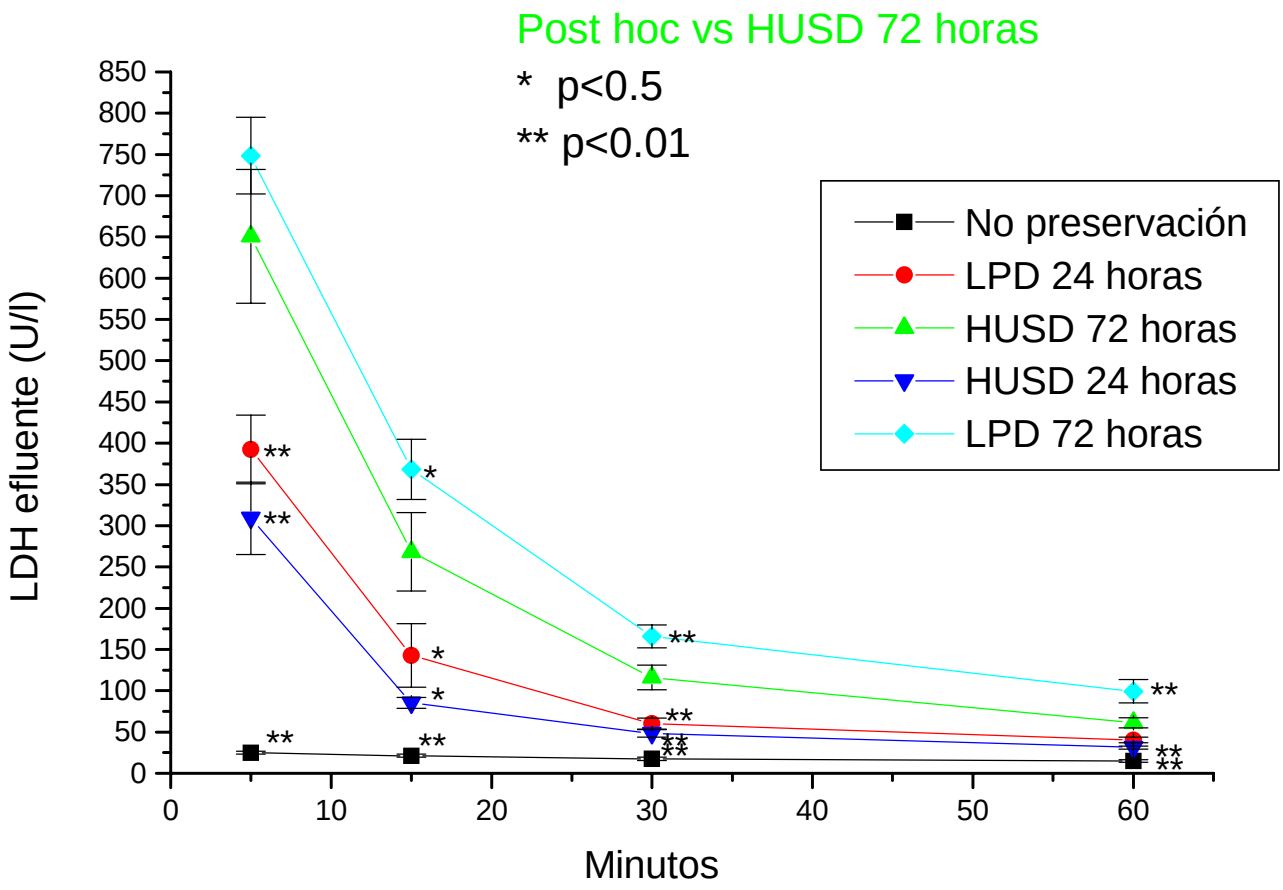


Gráfico 18. Concentración de LDH en el líquido efluente. Media ± error estándar (SEM)

Análisis post hoc versus grupo HUSD 72 horas



7,4-6 Retención de agua (edema) pulmonar.

Las variables "peso húmedo/peso seco" (Ww/Wd) y "peso húmedo/peso corporal total" (Ww/Bodyw) evalúan la cantidad de agua retenida por el pulmón, y son por tanto, un modo indirecto de medir el edema pulmonar una vez a finalizado la re/perfusión. Ambas variables carecen de unidades. (Ver **4,3-6D** y **6,5-2D**)

Tabla 9.- **Peso humedo/peso seco (Ww/Wd)** y **Peso humedo/peso corporal total (Ww/Bodyw)** Media ± Desviación estándar.

	Grupo 1 Control	Grupo 2 LPD-24h	Grupo 3 HUSD-72h	Grupo 4 HUSD-24h	Grupo 5 LPD-72h
	N= 7	N= 7	N= 9	N= 7	N= 8
Ww/Wd	8,0±3,4	23,9±2,5	21,6±4,2	23,9±4,3	25,9±7,3
Ww/Bodyw	.005±.002	.018±.005	.011±.006	.019±.006	.013±.002

Todos los pulmones que han sufrido I/R muestran retención de agua estadísticamente significativa con relación al grupo control.

Para los grupos con I/R, los resultados cambian ligeramente según se tome uno u otro índice de edema pulmonar. Exactamente, para Ww/Dw no hay diferencia entre los grupos. Si se toma Ww/Bodyw, los pulmones preservados 24 horas presentan más edema que los preservados 72 horas. El grupo test HUSD 72 horas, es el "más próximo" al grupo control.

Gráfico 19. Peso húmedo/peso seco. Media ± error estándar

Análisis post hoc versus grupo LPD 24 horas

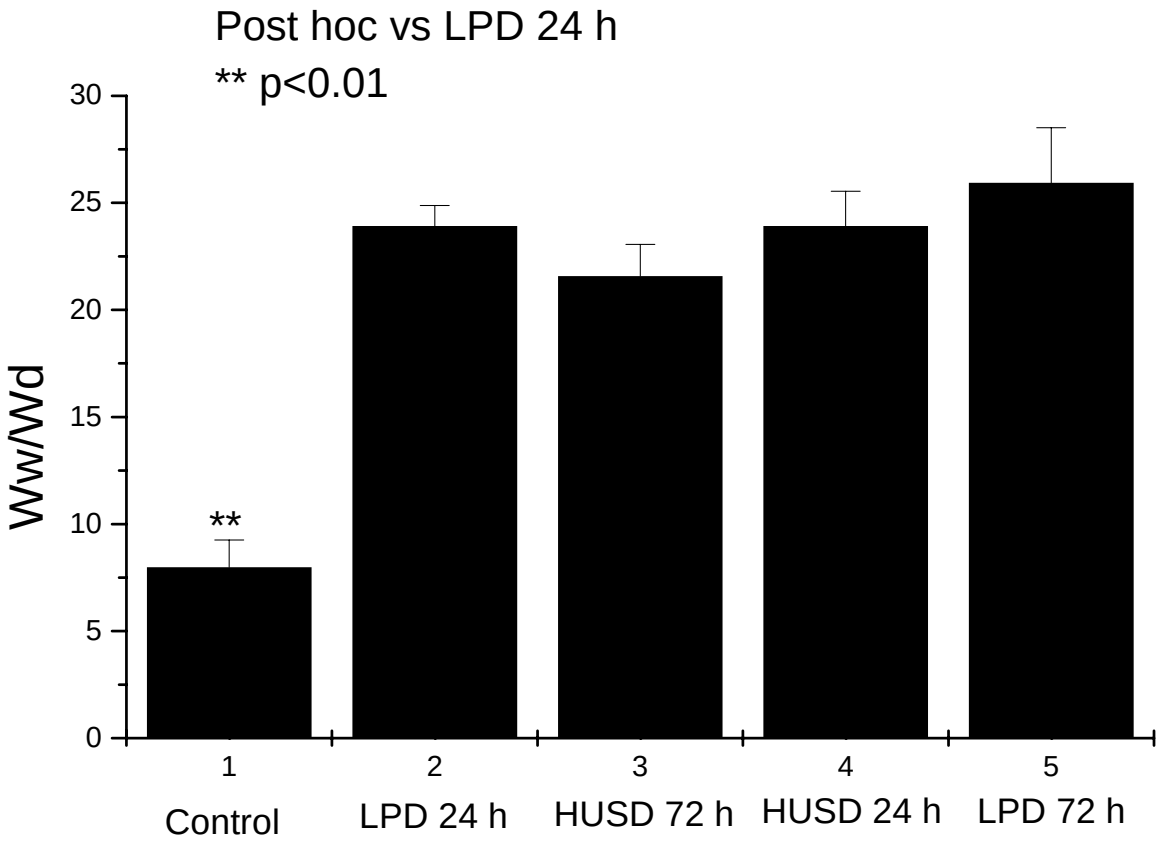


Gráfico 20. Peso húmedo/peso corporal. Media ± error estándar

Análisis post hoc versus grupo LPD 24 horas

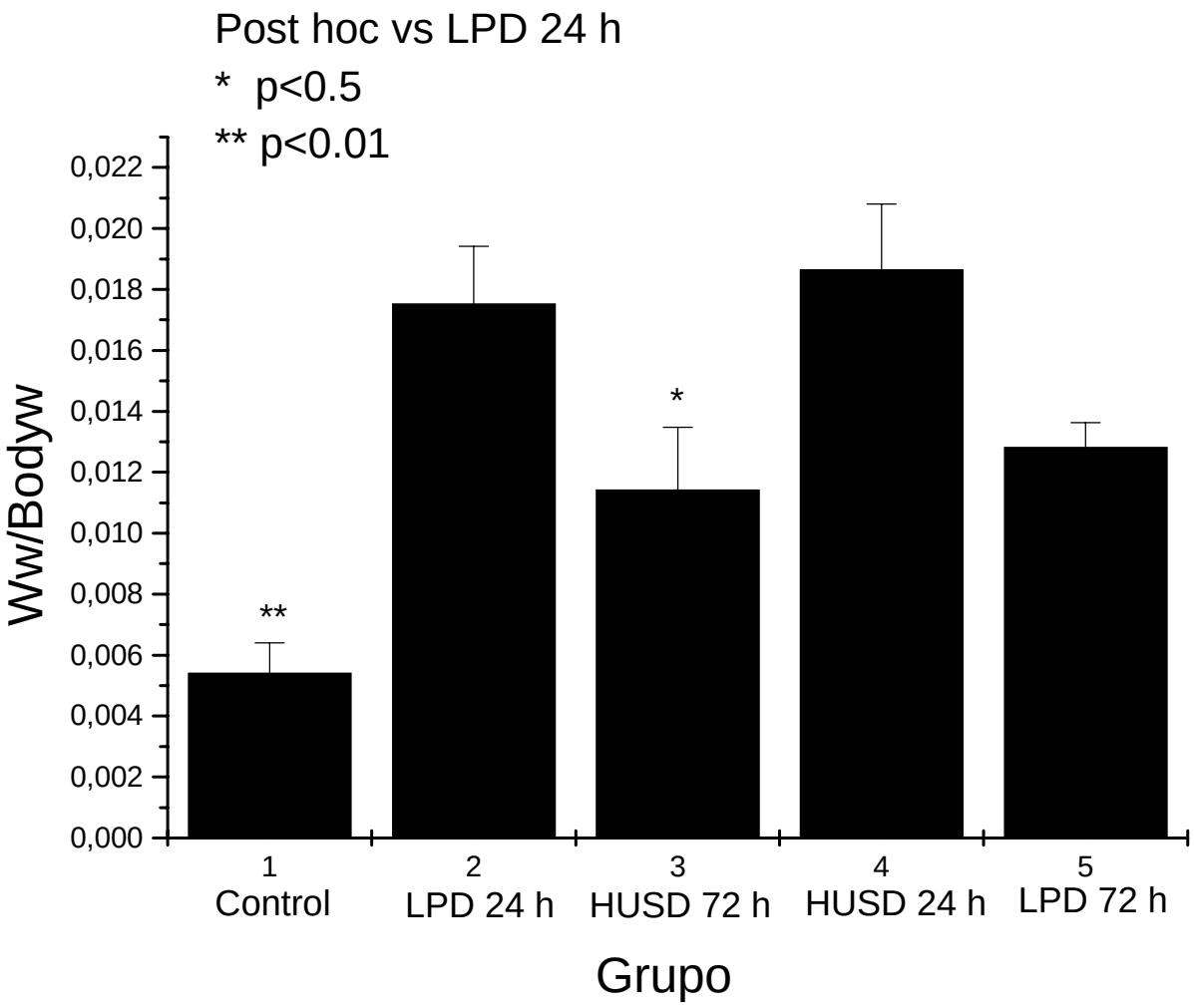
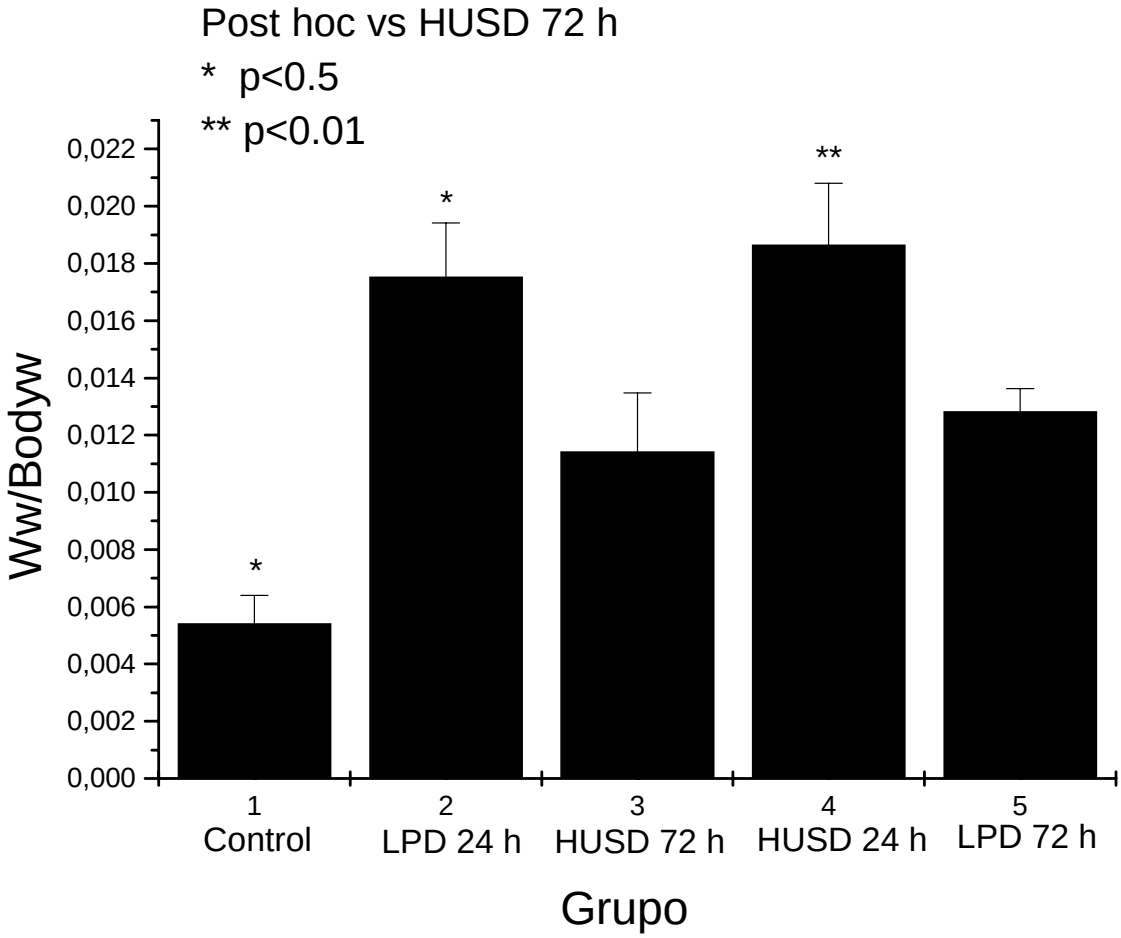


Gráfico 21. Peso húmedo/peso corporal. Media ± error estándar

Análisis post hoc versus grupo HUSD 72 horas



7,4-7 Viabilidad celular.

Se presenta como mortalidad % = (1-viabilidad)%

Tabla 10. **Mortalidad celular**. Media ± Desviación estándar (SD)

	Grupo 1 Control	Grupo 2 LPD-24h	Grupo 3 HUSD-72h	Grupo 4 HUSD-24h	Grupo 5 LPD-72h
	N =7	N =7	N =9	N =7	N =8
1-Viabilidad(%)	8,3±7,8	18,1±7,3	38,1±17,8	16,7±9,6	34,1±29,4

El grupo control, no preservado, presenta un índice de mortalidad no desdeñable (8,3±7,8) probablemente de causa instrumental en el momento de la tinción y fijación del especímen. Todos los grupos sometidos a I/R presentan un aumento notable de la mortalidad celular. Sin embargo, las diferencias entre el grupo control y ambos grupos de isquemia de 24 horas no alcanzan la significación estadística.

Control vs. LPD 24 horas: p=.29

Control vs. HUSD 24 horas: p=.36

Los análisis post hoc frente al grupo LPD 24 horas muestran diferencias significativas solamente frente al grupo HUSD 72 horas. Las diferencias frente al grupo LPD 72 horas no alcanzan la significación.

LPD 24 horas vs. LPD 72 horas: p=.08

El grupo HUSD 72 horas presenta diferencias significativas frente al grupo no preservado y frente a ambos grupos de isquemia de 24 horas.

Gráfico 22. Mortalidad celular. Media ± error estándar (SEM)

Análisis post hoc versus grupo LPD 24 horas

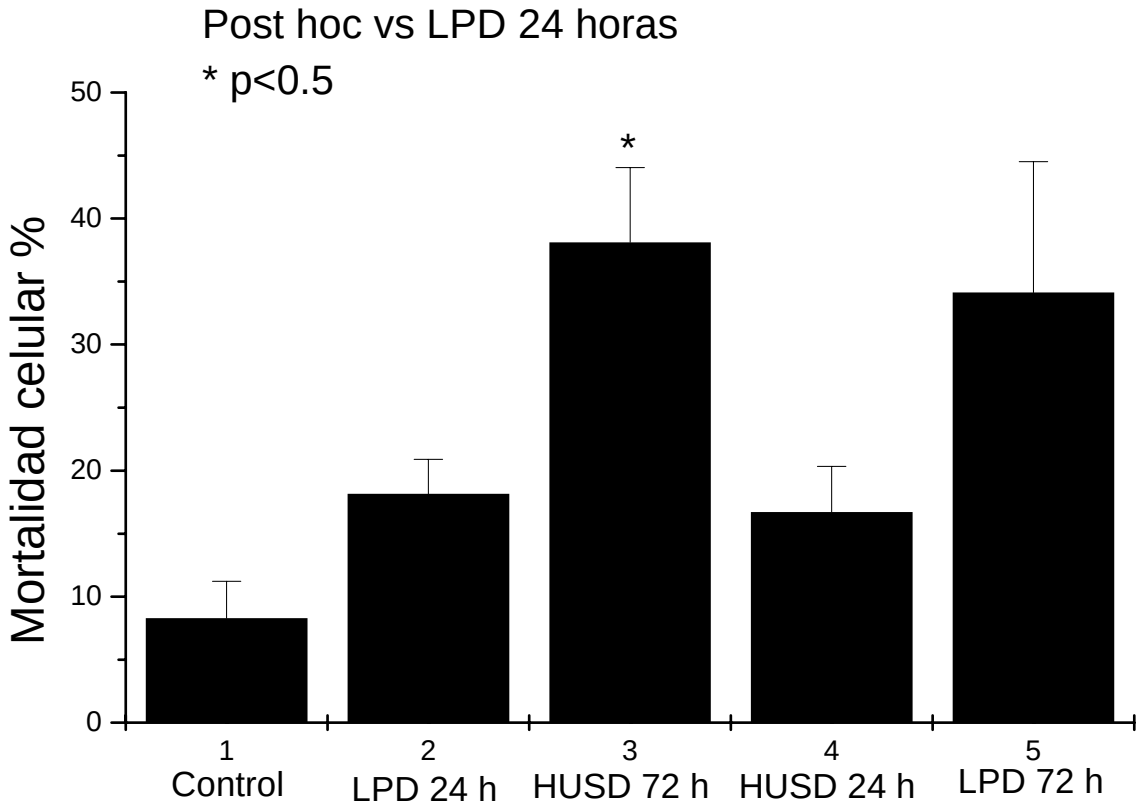
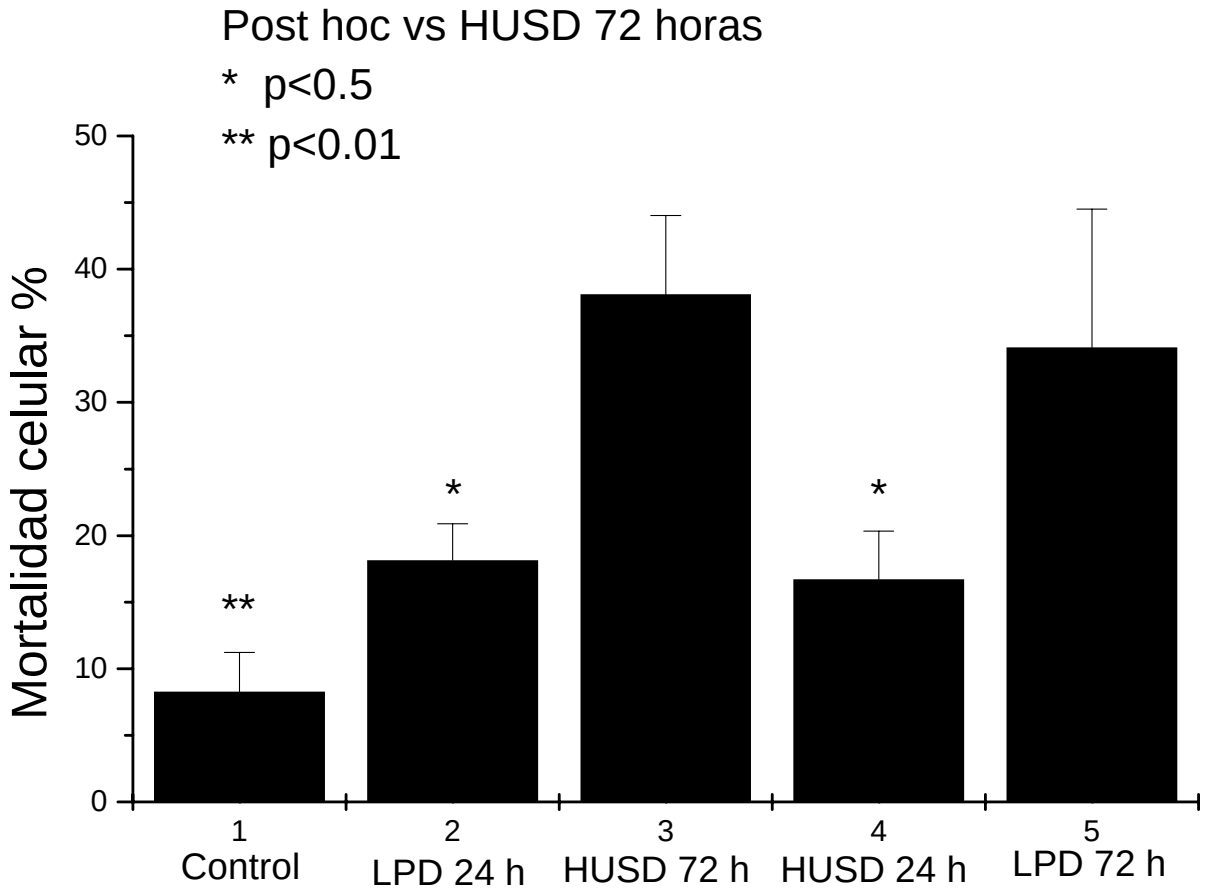


Gráfico 23. Mortalidad celular. Media ± error estándar (SEM)

Análisis post hoc versus grupo HUSD 72 horas



7,4-8 Anatomía patológica.

Edema, lesión microscópica, y necrosis se evaluaron cualitativamente entre 0 y +++ (Ver **6,3-6B**) No se apreciaron diferencias a la evaluación cualitativa de la lesión microscópica.

Tabla 11. Edema, Lesión y Necrosis.

	Grupo Control	Grupo 2 LPD-24h	Grupo 3 HUSD-72h	Grupo 4 HUSD-24h	Grupo 5 LPD-72h
	N=7	N=7	N=9	N=7	N=8
Edema	+	+	+	+	+
Lesión	0/+	+	+	+	+
Necrosis	0	0	0	0	0/+

7,5 ENSAYO DE HIPÓTESIS Y CORRELACIÓN.

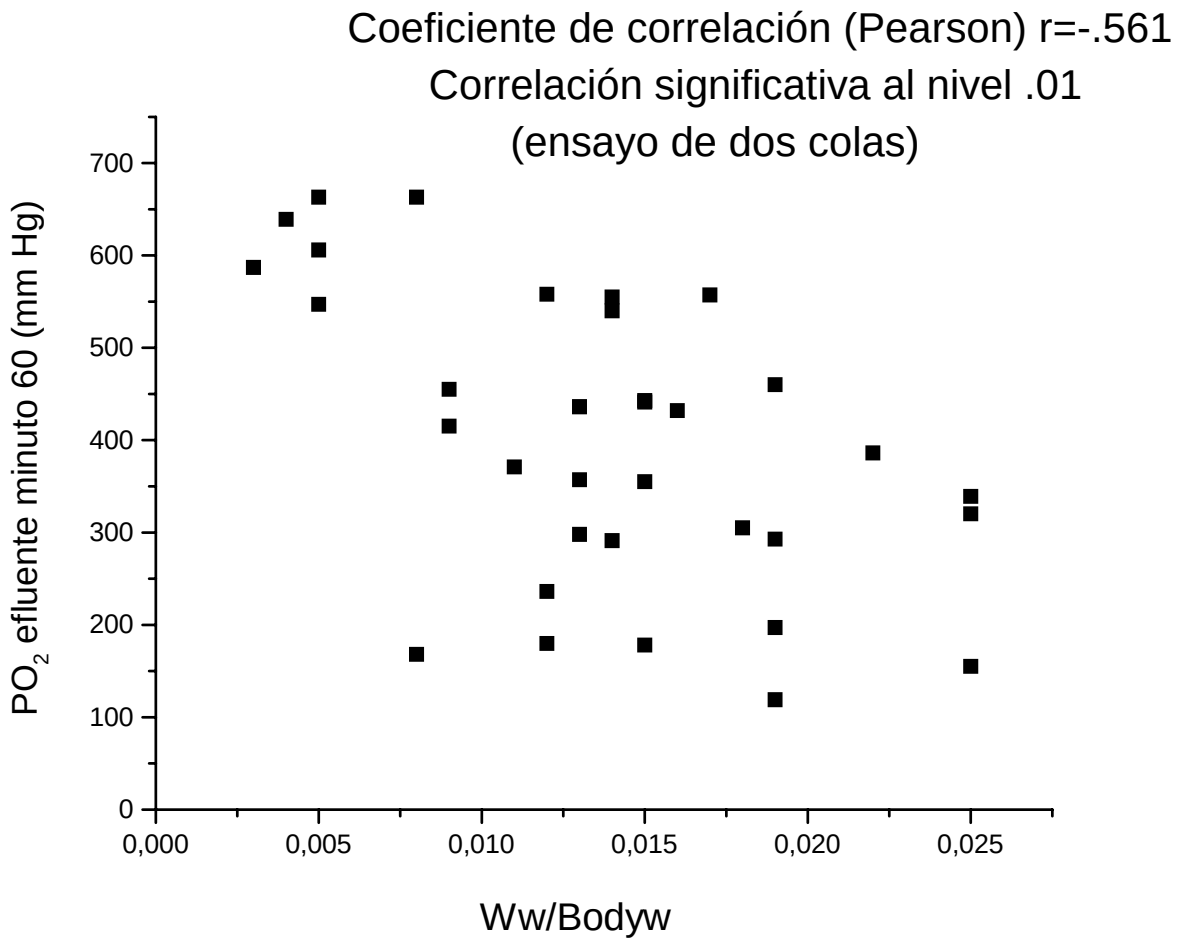
Es deber del autor recordar que, independientemente de la validez del modelo experimental, los resultados de las correlaciones entre variables, y de los ensayos de hipótesis obtenidos en este modelo, la posterior discusión, y las conclusiones que puedan derivarse, son sólo aplicables a este modelo experimental. Las conclusiones no pueden extrapolarse a trasplante pulmonar in vivo.

7,5-1 Variables correlacionadas.

7,5-1A PO_2 en el líquido efluente sobre Ww/Bodyw y sobre Ww/Wd.

La de presión parcial de O_2 en el líquido efluente, (se muestra aquí la medida en el minuto 60) presenta sobre el edema pulmonar, medido como Ww/Bodyw, correlación negativa (r=-.561) estadísticamente significativa para el nivel .01 y ensayo de dos colas. Sobre Ww/Wd, la correlación es también significativa para el nivel .01 r=-.490

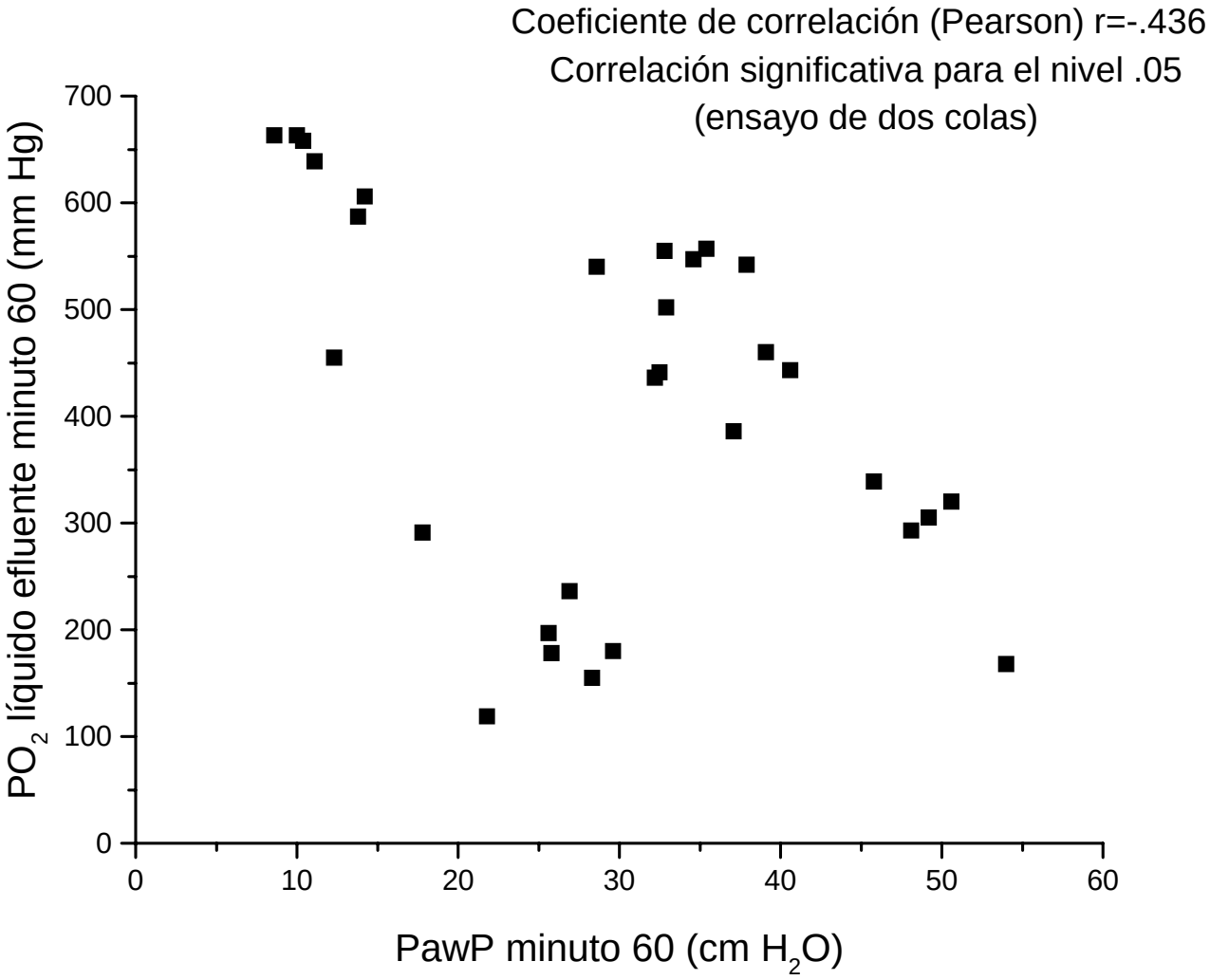
Gráfico 24. PO_2 en el líquido efluente minuto 60 sobre Ww/Bodyw.



7,5-1B PO_2 en el líquido efluente sobre PawP.

Para los valores que las variables toman en el minuto 60 de reperfusión, la PO_2 en el líquido efluente muestra sobre PawP correlación negativa, significativa para el nivel .05 y ensayo de dos colas. r=-.436

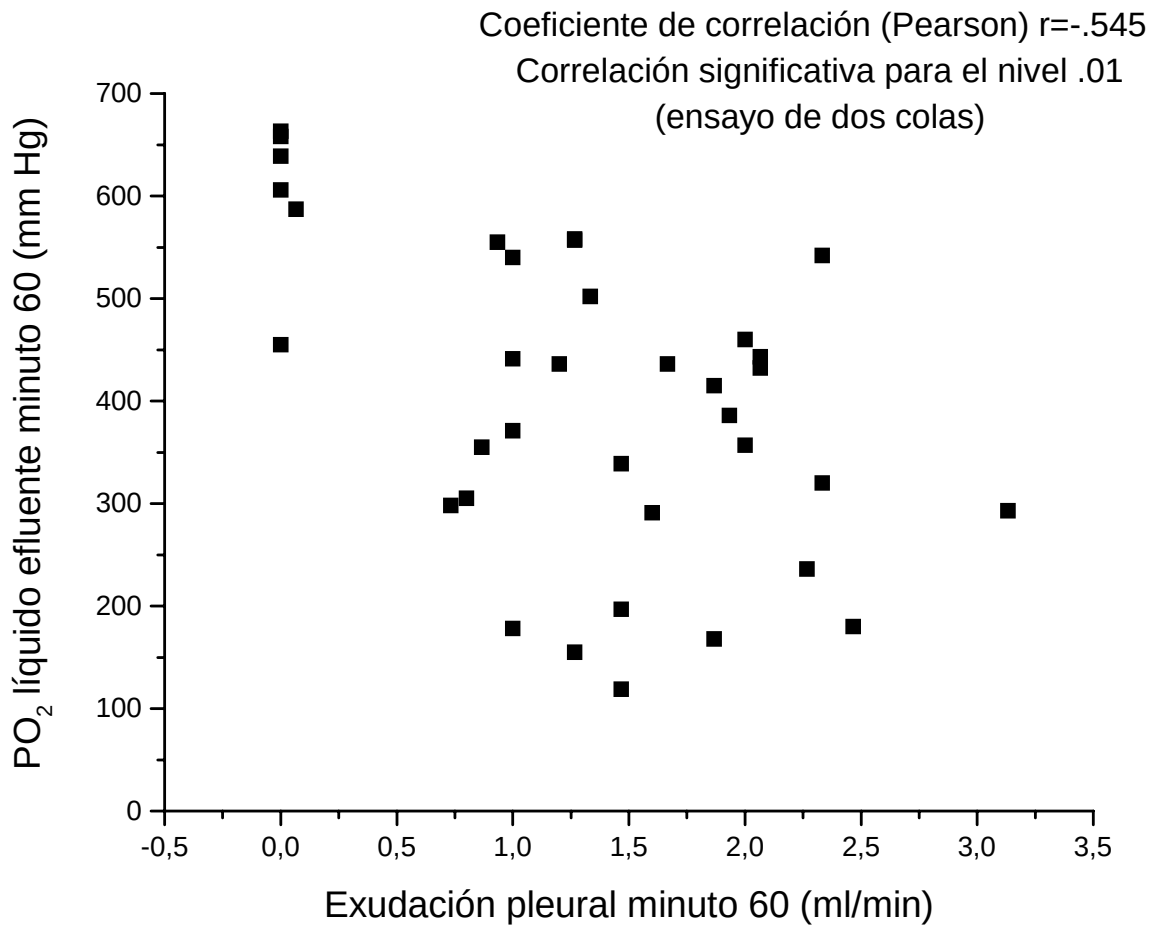
Gráfico 25. PO_2 en el líquido efluente sobre PawP.



7,5-1C PO_2 en el líquido efluente sobre exudación pleural.

Ambas variables muestran correlación significativa para el nivel .01 y ensayo de dos colas.

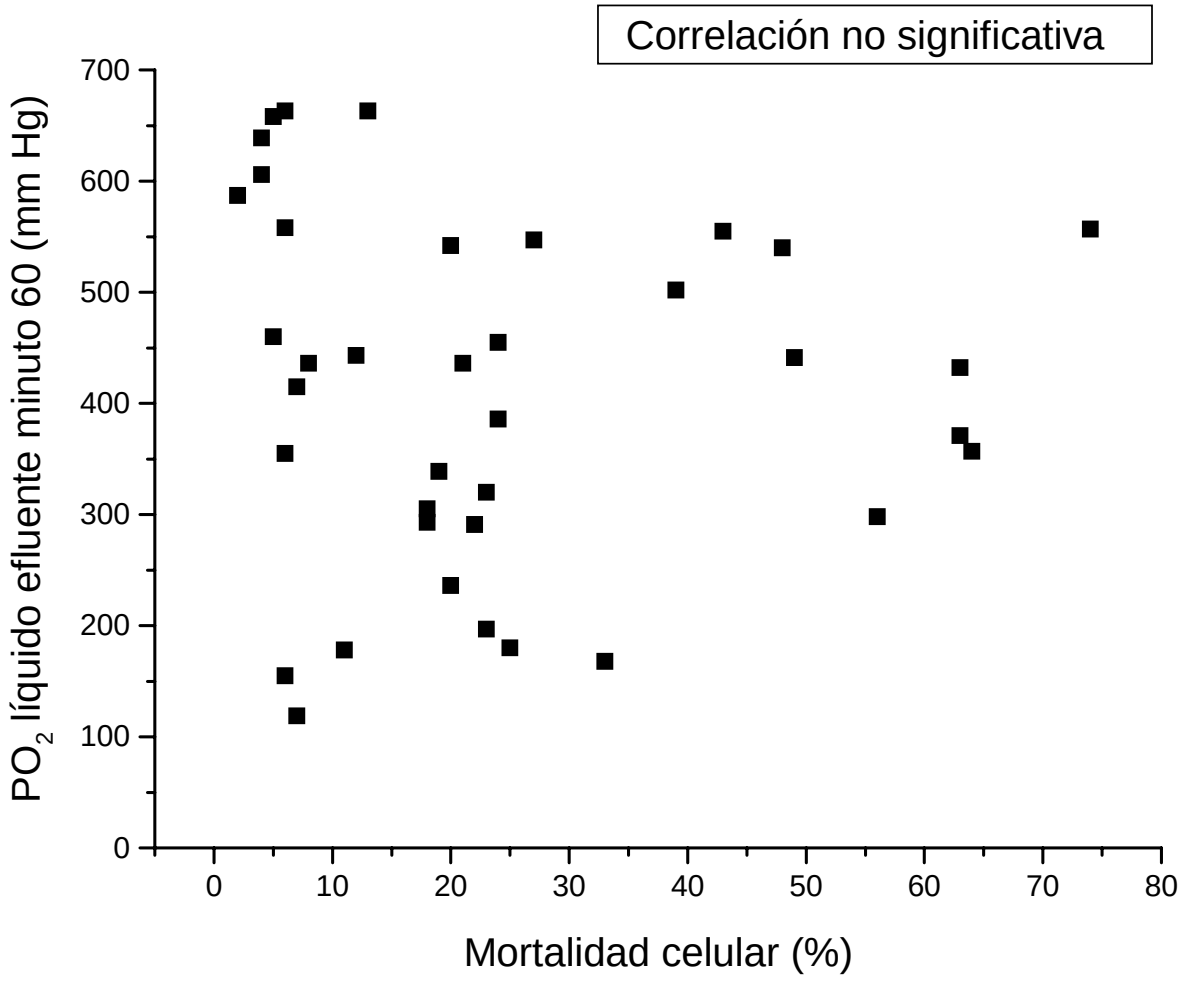
Gráfico 26. PO_2 en el líquido efluente sobre exudación pleural.



7,5-1D PO_2 en el líquido efluente sobre mortalidad celular.

Estas variables ***no*** muestran correlación significativa.

Gráfico 27. PO_2 en el líquido efluente sobre mortalidad celular.



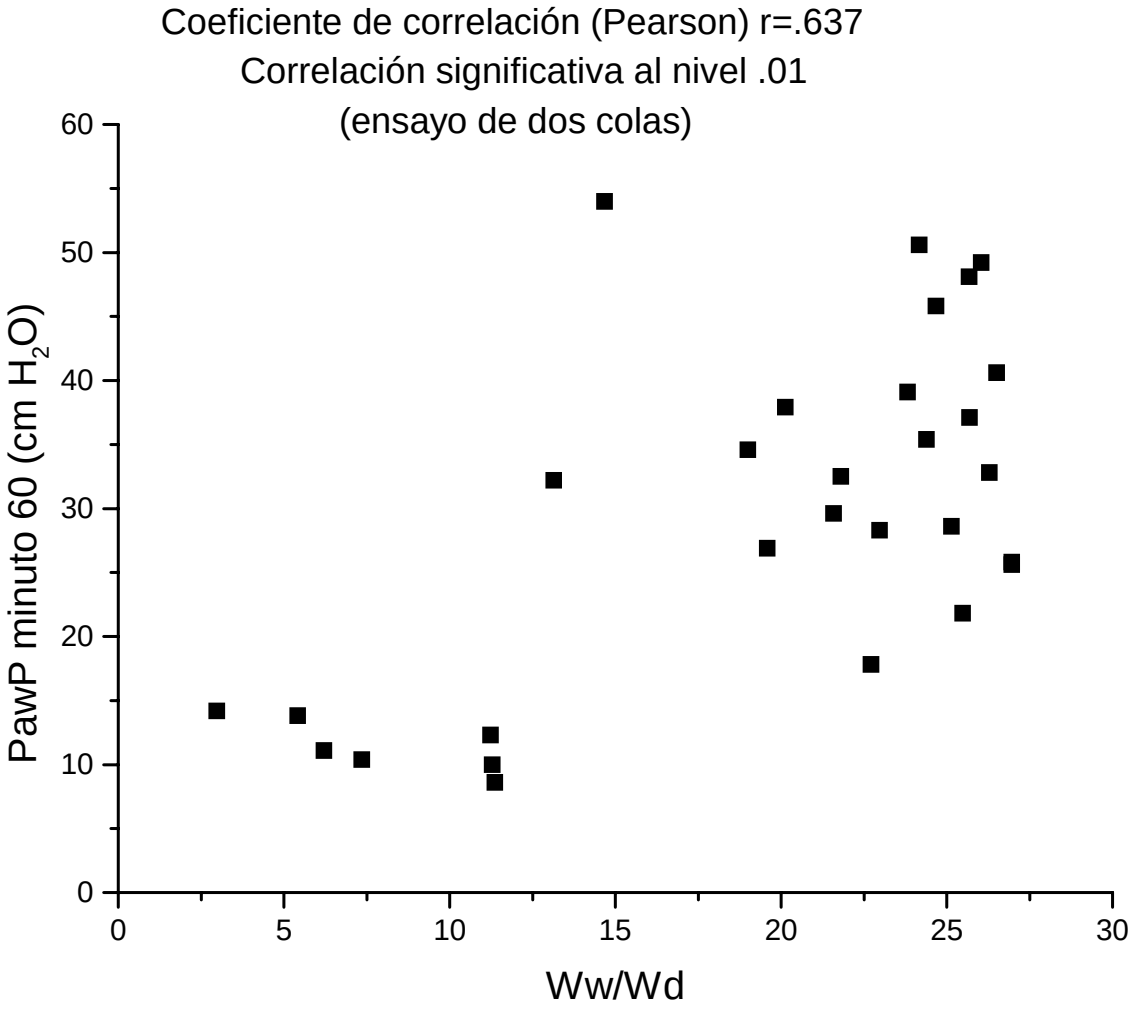
7,5-1E PawP sobre Ww/Bodyw y sobre Ww/Wd..

La PawP está correlacionada positivamente con los índices de edema pulmonar, en ambos casos para el nivel .01 y ensayo de dos colas. El valor del coeficiente de correlación (Pearson)es:

PawP sobre Ww/BodyW r=.594

PawP sobre Ww/Wd r=.637

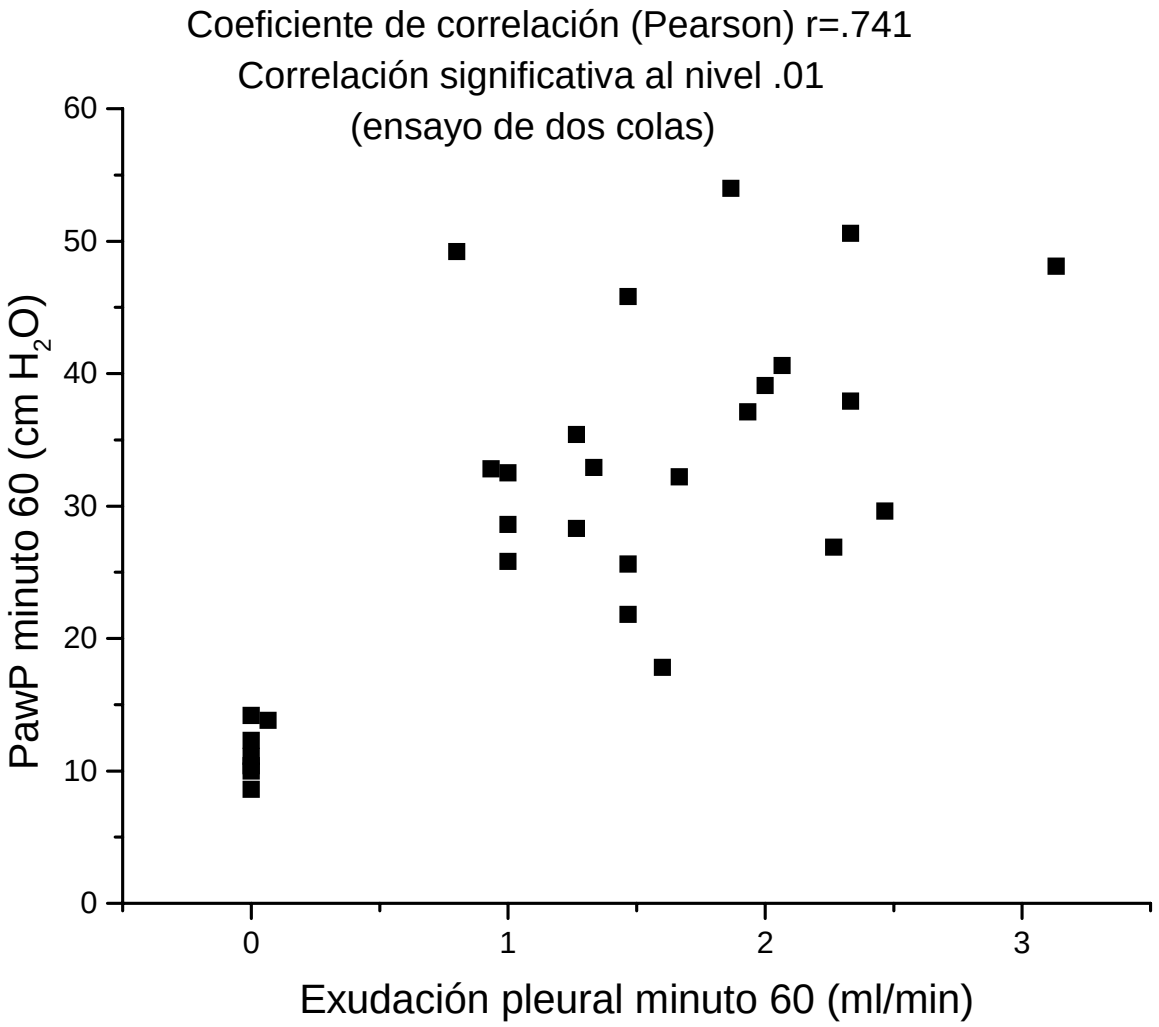
Gráfico 28. PawP minuto 60 sobre Ww/Wd.



7,5-1F PawP sobre exudación pleural.

Ambas variables (el gráfico muestra los valores medidos en el minuto 60) presentan correlación positiva significativa para el nivel .01 y ensayo de dos colas

Gráfico 29. PawP minuto 60 sobre exudación pleural minuto 60.



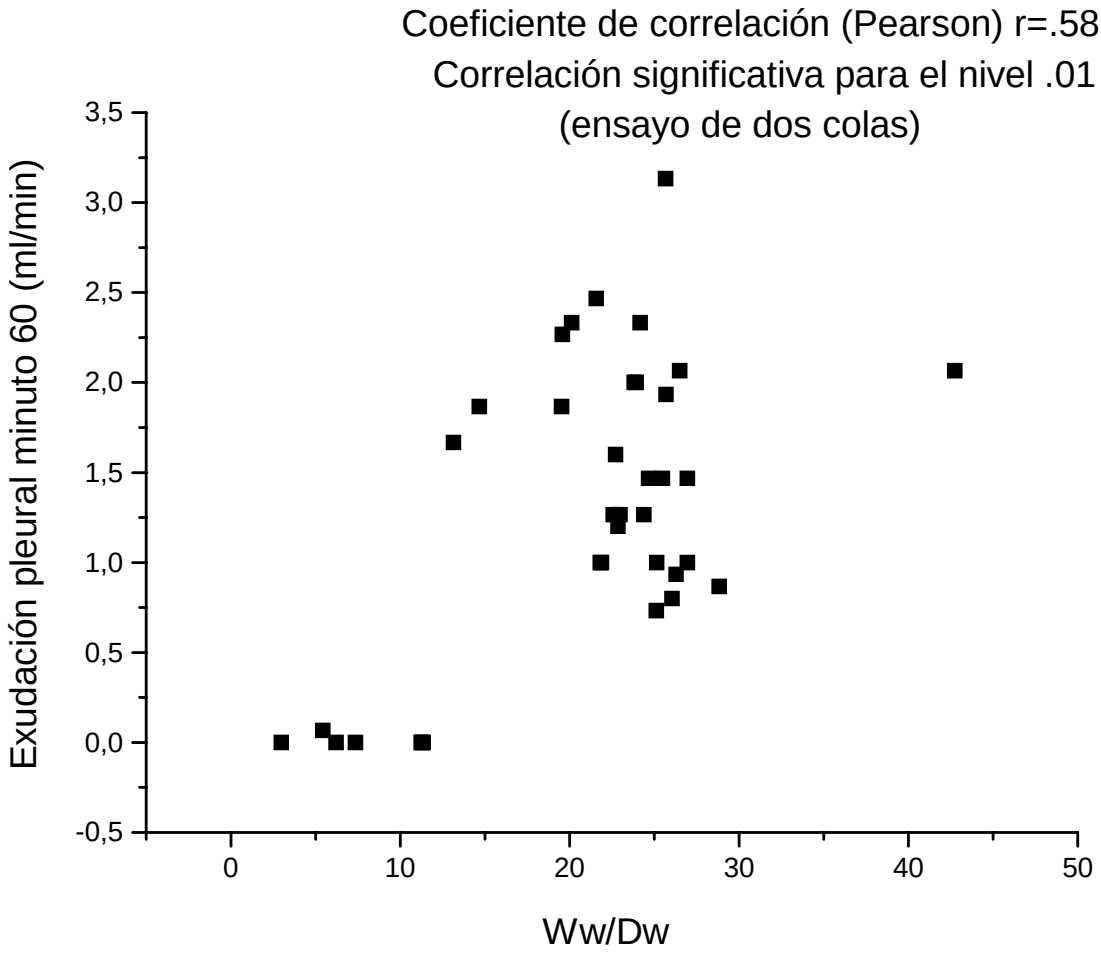
7,5-1G Exudación pleural sobre Ww/Bodyw y sobre Ww/Wd..

El volumen de líquido de exudación pleural presenta correlación positiva estadísticamente significativa para el nivel .01 y ensayo de dos colas para ambos índices de edema pulmonar:

Exudación pleural sobre Ww/Dw r (Pearson)=.587

Exudación pleural sobre Ww/Bodyw r (Pearson)=.567

Gráfico 30. Exudación pleural sobre Ww/Dw.



7,5-1H Edema pulmonar sobre PAP media .

La variables de función hemodinámica PAP media presenta relación positiva con la cantidad de agua retenida en el pulmón, si se mide ésta como Ww/Bodyw. La correlación no es significativa sobre Ww/Dw.

Es particularmente interesante observar la evolución temporal de esta correlación. La formación de edema pulmonar está relacionada con los valores que toma PAP media en los primeros minutos de la reperfusión. El valor del coeficiente de correlación va disminuyendo con el tiempo y la correlación llega a perder la significación estadística, mostrando de nuevo que la lesión pulmonar se produce en estos minutos primeros de la reperfusión.

Tabla 12. Ww/Bodyw sobre PAP media y sobre PVR .

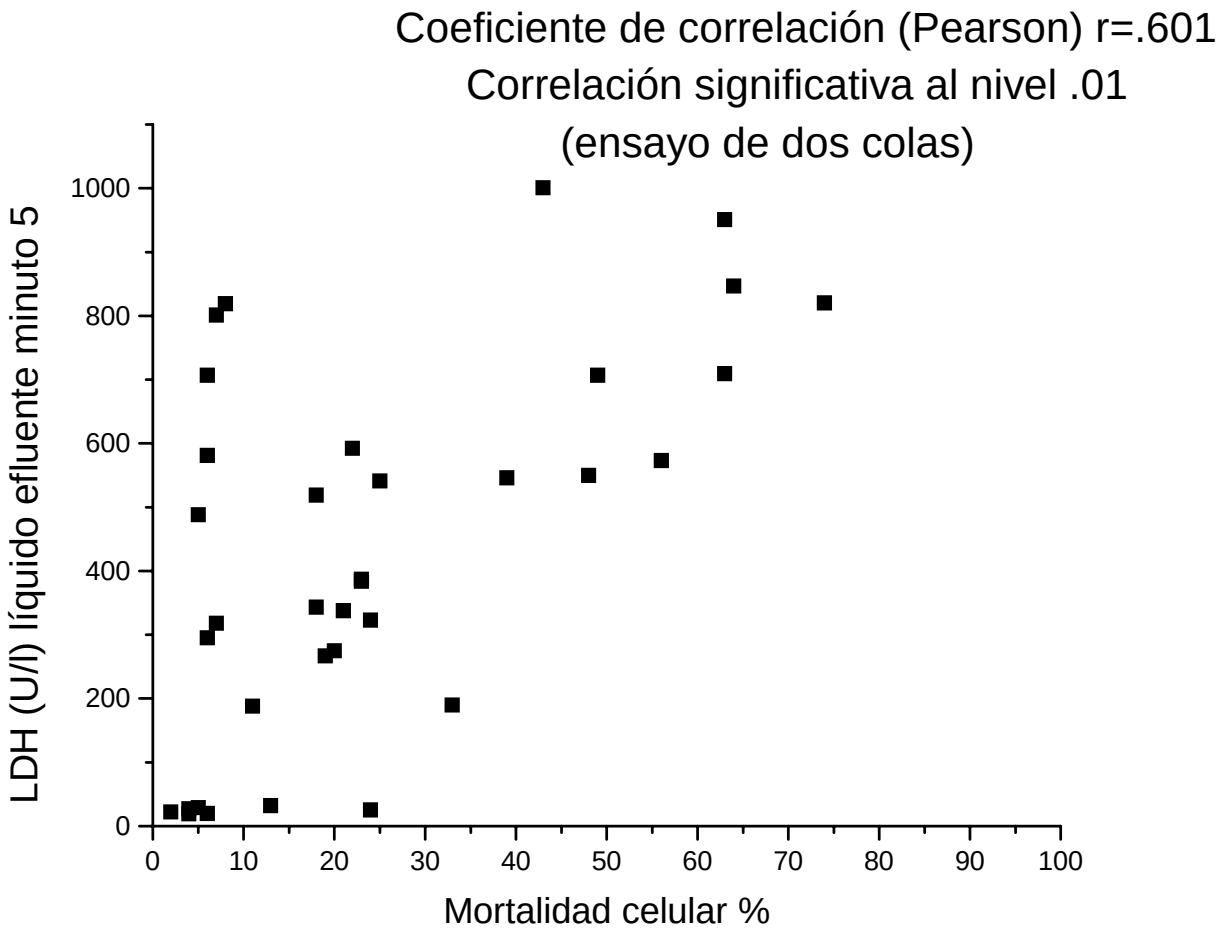
(r= Coeficiente de correlación de Pearson)

Minuto	15	30	45	60
Ww/Bodyw sobre PAP media	r=.437 p<.01	r=.385 p<.05	r=.276 p NS	r=.280 p NS

7,5-1I LDH en el líquido efluente sobre mortalidad celular.

La concentración de LDH en el líquido efluente, medida en el momento de máxima producción, éste es, en el minuto 5 de reperfusión, presenta sobre la mortalidad celular una correlación positiva (r=.601) significativa para el nivel .01 y ensayo de dos colas.

Gráfico 29. LDH efluente minuto 5 sobre mortalidad celular.



7,5-2 Ensayo de hipótesis.

La comparación entre sí de los diferentes grupos se presentará según el siguiente esquema:

1) Comparación del grupo control sin I/R frente al grupo de preservación estándar LPD 24 horas.
2) Comparación del grupo de preservación estándar frente a los grupos de preservación test.
3) Comparación de los grupos de preservación test entre sí.

7,5-2A Preservación estándar. Grupos Control vs. LPD 24 horas.

Con relación al grupo control, el grupo LPD 24 horas muestra un deterioro funcional y estructural altamente significativo en todos los parámetros del estudio, excepto en "viabilidad celular", en el que las diferencias, aún siendo marcadas, no alcanzan la significación.

Luego, debe aceptarse la hipótesis alternativa: Existen diferencias significativas entre el "grupo control" (sin I/R) y el "grupo preservación estándar" Estas diferencias expresan y cuantifican la lesión pulmonar por I/R en este modelo experimental.

Tabla 13. Grupo Control vs. Grupo de preservación estándar.

(Media ±SD)

Variable	Minuto	Grupo 1 Control N= 7	Valor de p G1 vs. G2	Grupo 2 LPD-24h N= 7
PO_2 efluente (mm Hg)	**10**	**613±50**	**<.01**	**515±143**
	20	**617±42**	**<.01**	**422±109**
	30	**632±33**	**<.01**	**373±90**
	40	**632±42**	**<.01**	**353±70**
	50	**624±59**	**<.01**	**318±88**
	60	**610±75**	**<.01**	**332±104**
PAP media (mm Hg)	**15**	**10,4±2,1**	**<.01**	**20,6±5,0**
	30	**11,9±5,9**	**<.01**	**20,6±6,4**
	45	**14,6±11,4**	**NS**	**22,0±12,1**
	60	**18,3±17,2**	**NS**	**23,9±18,1**
Peak aw P (cm H_2O)	**15**	**11,0±2,2**	**<.01**	**45,1±10,4**
	30	**11,1±2,0**	**<.01**	**45,4±11,2**
	45	**11,2±2,1**	**<.01**	**41,0±10,4**
	60	**11,5±2,0**	**<.01**	**39,0±8,9**
Resistencia vascular pulmonar (mmHG/ml/min.)	**15**	**1,4±0,3**	**<.01**	**2,7±0,7**
	30	**1,6±0,8**	**<.01**	**2,7±0,9**
	45	**1,9±1,5**	**NS**	**2,9±1,6**
	60	**2,0±2,4**	**NS**	**3,2±2,4**
Exudación pleural (ml/min.)	**15**	**0**	**<.01**	**1,5±0,6**
	30	**0**	**<.01**	**2,0±0,9**
	45	**0**	**<.01**	**1,7±0,6**
	60	**0**	**<.01**	**2,0±0,7**
LDH (U/l.)	**5**	**25±5**	**<.01**	**392±102**
	15	**21±5**	**<.01**	**143±102**
	30	**<20**	**<.01**	**60±18**
	60	**<20**	**<.01**	**40±9**
1-Viabilidad(%)		**8,3±7,8**	**NS**	**18,1±7,3**
Ww/Wd		**8,0±3,4**	**<.01**	**23,9±2,5**
Ww/Bw		**.005±.002**	**<.01**	**.018±.005**
Edema		**+**	**NS**	**+**
Lesión		**0/+**	**NS**	**+**
Necrosis		**0**	**NS**	**0**

NS = No significativo. Valores de p>.05

7,5-2B Preservación TEST. Grupos LPD 24 horas vs. HUSD 72 horas.

La comparación del grupo HUSD 72 horas frente al grupo de preservación estándar ensaya la hipótesis motivo de este trabajo.

Ambas variables de lisis celular (LDH en el líquido efluente, y mortalidad celular) presentan diferencias que son significativas. El grupo de 72 horas presenta mayor destrucción celular. Luego, debe aceptarse la hipótesis alternativa para las variables de lisis celular.

En cambio, los dos grupos no presentan diferencias en la valoración de la lesión estructural por el microscopista.

En cuanto a la evaluación funcional, el grupo de preservación test, HUSD 72 horas presenta menor retención de agua (medida como Ww/Bodyw) y muestra mejores resultados en los parámetros funcionales. Las diferencias son significativas para PO_2 efluente, y exudación pleural. Las diferencias en PAP media, PVR y mecánica ventilatoria (PawP) son significativas sólo al inicio de la reperfusión.

Debe aceptarse la hipótesis alternativa. Funcionalmente, los pulmones del grupo HUSD 72 horas se muestran ***mejor preservados*** que los del grupo de preservación estándar LPD 24 horas.

Tabla 14. Preservación estándar LPD 24 horas vs. Test HUSD 72 horas.

Variable	Minuto	Grupo 1 Control N= 7	Grupo 2 LPD-24h N= 7	Valor de p G2 vs.G3	Grupo 3 HUSD-72h N= 9
PO_2 efluente (mm Hg)	10	613±50	515±143	NS	528±67
	20	617±42	422±109	NS	516±98
	30	632±33	373±90	<.01	518±89
	40	632±42	353±70	<.01	516±102
	50	624±59	318±88	<.01	509±100
	60	610±75	332±104	<.01	490±88
PAP media (mm Hg)	15	10,4±2,1	20,6±5,0	<.01	10,8±3,8
	30	11,9±5,9	20,6±6,4	<.01	11,4±6,3
	45	14,6±11,4	22,0±12,1	NS	13,4±10,0
	60	18,3±17,2	23,9±18,1	NS	17,0±18,1
Peak aw P (cm H_2O)	15	11,0±2,2	45,1±10,4	<.01	30,7±4,5
	30	11,1±2,0	45,4±11,2	<.05	31,7±4,5
	45	11,2±2,1	41,0±10,4	NS	31,4±4,1
	60	11,5±2,0	39,0±8,9	NS	31,6±5,8
Resistencia vascular pulmonar (mmHG/ml/min.)	15	1,4±0,3	2,7±0,7	<.01	1,4±0,5
	30	1,6±0,8	2,7±0,9	<.01	1,5±0,8
	45	1,9±1,5	2,9±1,6	NS	1,8±1,3
	60	2,0±2,4	3,2±2,4	NS	2,3±2,4
Exudación pleural (ml/min.)	15	0	1,5±0,6	NS	1,2±0,4
	30	0	2,0±0,9	<.01	1,3±0,6
	45	0	1,7±0,6	<.05	1,2±0,4
	60	0	2,0±0,7	<.05	1,3±0,5
LDH (U/l.)	5	25±5	392±102	<.01	651±215
	15	21±5	143±102	<.01	268±134
	30	<20	60±18	<.01	116±44
	60	<20	40±9	<.01	61±19
1-Viabilidad(%)		8,3±7,8	18,1±7,3	<.05	38,1±17,8
Ww/Wd		8,0±3,4	23,9±2,5	NS	21,6±4,2
Ww/Bw		.005±.002	.018±.005	<.05	.011±.006
Edema		+	+	NS	+
Lesión		0/+	+	NS	+
Necrosis		0	0	NS	0

NS = No significativo.

7, 5-2C Grupos LPD 24 horas versus HUSD 24 horas.

Comparación de los dos grupos de 24 horas de isquemia, preservación con solución test HUSD, frente a preservación con solución estándar LPD.

Se observa que los parámetros de lisis / mortalidad celular, histológicos, y funcionales no presentan diferencias, excepto por la única excepción de la PO_2 en el líquido efluente. Esta variable está más deteriorada en el grupo de preservación test HUSD, mostrando diferencias que alcanzan la significación.

Luego, excepto para esta variable, debe aceptarse la hipótesis nula. No hay diferencias entre los grupos LPD 24 horas y HUSD 24 horas.

Tabla 15. Preservación HUSD 24 horas. (Media ± SD)

Variable	Minuto	Grupo 1 Control N=7	Grupo 2 LPD-24h N=7	Valor de p G2 vs. G4	Grupo 4 HUSD-24h N=7
PO_2 efluente (mm Hg)	10	613±50	515±143	<.05	379±109
	20	617±42	422±109	<.05	258±101
	30	632±33	373±90	<.01	209±80
	40	632±42	353±70	<.01	200±109
	50	624±59	318±88	<.05	196±85
	60	610±75	332±104	<.05	207±79
PAP media (mm Hg)	15	10,4±2,1	20,6±5,0	NS	18,2±6,9
	30	11,9±5,9	20,6±6,4	NS	17,5±6,4
	45	14,6±11,4	22,0±12,1	NS	17,0±6,0
	60	18,3±17,2	23,9±18,1	NS	16,6±5,9
Peak aw P (cm H_2O)	15	11,0±2,2	45,1±10,4	<.05	35,2±13,8
	30	11,1±2,0	45,4±11,2	NS	33,3±10,9
	45	11,2±2,1	41,0±10,4	NS	37,1±13,7
	60	11,5±2,0	39,0±8,9	NS	35,6±13,2
Resistencia vascular pulmonar (mmHG/ml/min.)	15	1,4±0,3	2,7±0,7	NS	2,4±0,9
	30	1,6±0,8	2,7±0,9	NS	2,3±0,9
	45	1,9±1,5	2,9±1,6	NS	2,3±0,8
	60	2,0±2,4	3,2±2,4	NS	2,2±0,8
Exudación pleural (ml/min.)	15	0	1,5±0,6	NS	1,6±1,1
	30	0	2,0±0,9	NS	1,7±0,8
	45	0	1,7±0,6	NS	1,7±0,9
	60	0	2,0±0,7	NS	1,7±0,7
LDH (U/l.)	5	25±5	392±102	NS	309±116
	15	21±5	143±102	NS	85±18
	30	<20	60±18	NS	48±12
	60	<20	40±9	NS	31±5
1-Viabilidad(%)		8,3±7,8	18,1±7,3	NS	16,7±9,6
Ww/Wd		8,0±3,4	23,9±2,5	NS	23,9±4,3
Ww/Bw		.005±.002	.018±.005	NS	.019±.006
Edema		+	+	NS	+
Lesión		0/+	+	NS	+
Necrosis		0	0	NS	0

NS = No significativa.

7,5-2D Grupos LPD 24 horas versus LPD 72 horas.

Comparación de los dos grupos en que se ha utilizado solución LPD, 24 horas versus 72 horas de isquemia:

1º.- Los parámetros de lisis celular (producción de LDH, viabilidad celular) muestran mayor deterioro en el grupo de preservación de 72 horas.

Además, el grupo LPD 72 horas es el único entre los cinco, en el cual aparecen, en algunos especímenes, algunos focos de necrosis confluente de localización perihiliar.

Al mismo tiempo,

2º.- La función pulmonar en ambos grupos es parecida, presentado pocos parámetros funcionales en los que las diferencias alcancen significación estadística. Incluso en aquellos parámetros funcionales en los que aparecen diferencias al inicio de la reperfusión, (minutos 5 a 15) tienden éstas a mitigarse o desaparecer al final de la misma (minuto 60)

Luego, debe aceptarse la hipótesis nula desde la perspectiva funcional. Es decir, básicamente, las diferencias observadas en los parámetros de función pulmonar, entre los grupos de pulmones preservados con solución LPD 24 horas y LPD 72 horas, son debidas al azar.

Tabla 16. Grupos LPD 24 horas versus LPD 72 horas (Media ± SD)

Variable	Minuto	Grupo 1 Control N=7	Grupo 2 LPD-24h N=7	Valor de p G2 vs. G5	Grupo 5 LPD-72h N=8
PO_2 efluente (mm Hg)	**10**	**613±50**	**515±143**	**NS**	**458±111**
	20	**617±42**	**422±109**	**NS**	**426±111**
	30	**632±33**	**373±90**	**NS**	**418±96**
	40	**632±42**	**353±70**	**NS**	**404±65**
	50	**624±59**	**318±88**	**NS**	**398±75**
	60	**610±75**	**332±104**	**NS**	**402±78**
PAP media (mm Hg)	**15**	**10,4±2,1**	**20,6±5,0**	**<.01**	**13,0±4,3**
	30	**11,9±5,9**	**20,6±6,4**	**<.05**	**13,9±3,4**
	45	**14,6±11,4**	**22,0±12,1**	**NS**	**17,4±6,6**
	60	**18,3±17,2**	**23,9±18,1**	**NS**	**18,4±5,1**
Peak aw P (cm H_2O)	**15**	**11,0±2,2**	**45,1±10,4**	**ND**	**ND**
	30	**11,1±2,0**	**45,4±11,2**	**ND**	**ND**
	45	**11,2±2,1**	**41,0±10,4**	**ND**	**ND**
	60	**11,5±2,0**	**39,0±8,9**	**ND**	**ND**
Resistencia vascular pulmonar (mmHG/ml/min.)	**15**	**1,4±0,3**	**2,7±0,7**	**<.01**	**1,7±0,6**
	30	**1,6±0,8**	**2,7±0,9**	**<.05**	**1,9±0,5**
	45	**1,9±1,5**	**2,9±1,6**	**NS**	**2,3±0,9**
	60	**2,0±2,4**	**3,2±2,4**	**NS**	**2,4±0,7**
Exudación pleural (ml/min.)	**15**	**0**	**1,5±0,6**	**NS**	**1,1±0,3**
	30	**0**	**2,0±0,9**	**<.05**	**1,2±0,4**
	45	**0**	**1,7±0,6**	**NS**	**1,3±0,3**
	60	**0**	**2,0±0,7**	**<.05**	**1,4±0,5**
LDH (U/l.)	**5**	**25±5**	**392±102**	**<.01**	**749±131**
	15	**21±5**	**143±102**	**<.01**	**368±104**
	30	**<20**	**60±18**	**<.01**	**166±39**
	60	**<20**	**40±9**	**<.01**	**99±40**
1-Viabilidad(%)		**8,3±7,8**	**18,1±7,3**	**NS**	**34,1±29,4**
Ww/Wd		**8,0±3,4**	**23,9±2,5**	**NS**	**25,9±7,3**
Ww/Bw		**.005±.002**	**.018±.005**	**NS**	**.013±.002**
Edema		**+**	**+**	**NS**	**+**
Lesión		**0/+**	**+**	**NS**	**+**
Necrosis		**0**	**0**	**NS**	**0/+**

NS = No significativa. ND = No disponible.

7,5-2E Comparación de los grupos test entre sí. HUSD 72 horas vs. HUSD 24 horas, y HUSD 72 horas vs. LPD 72 horas.

Al comparar los dos grupos en los que se ha utilizado solución test HUSD, con tiempos de isquemia respectivos de 24 y 72 horas, se observa de nuevo que:

1º.- Los parámetros de lisis celular muestran mayor deterioro del grupo de 72 horas de isquemia.

2º.- No hay diferencias observables de estructura a la microscopía óptica convencional.

3º.- Los parámetros funcionales que presentan diferencias, éstas se manifiestan favorables al grupo de más larga isquemia. El grupo HUSD 72 horas retiene menos agua y oxigena mejor que HUSD 24 horas.

Finalmente, al comparar los dos grupos de 72 horas, HUSD (solución test) y LPD, (solución estándar) puede apreciarse que el grupo HUSD oxigena mejor y produce menos LDH. Las otras variables no muestran hay diferencias significativas.

Tabla 17. Comparación de los grupos test. (Media ± SD)

Variable	Minuto	Grupo 4 HUSD-24h N =7	Valor de p G4 vs.G3	Grupo 3 HUSD-72h N =9	Valor de p G3 vs.G5	Grupo 5 LPD-72h N =8
PO_2 efluente (mm Hg)	**10**	**379±109**	**<.05**	**528±67**	**NS**	**458±111**
	20	**258±101**	**<.01**	**516±98**	**NS**	**426±111**
	30	**209±80**	**<.01**	**518±89**	**<.01**	**418±96**
	40	**200±109**	**<.01**	**516±102**	**<.01**	**404±65**
	50	**196±85**	**<.01**	**509±100**	**<.01**	**398±75**
	60	**207±79**	**<.01**	**490±88**	**<.05**	**402±78**
PAP media (mm Hg)	**15**	**18,2±6,9**	**<.01**	**10,8±3,8**	**NS**	**13,0±4,3**
	30	**17,5±6,4**	**<.05**	**11,4±6,3**	**NS**	**13,9±3,4**
	45	**17,0±6,0**	**NS**	**13,4±10,0**	**NS**	**17,4±6,6**
	60	**16,6±5,9**	**NS**	**17,0±18,1**	**NS**	**18,4±5,1**
Peak aw P (cm H_2O)	**15**	**35,2±13,8**	**NS**	**30,7±4,5**	**ND**	**ND**
	30	**33,3±10,9**	**NS**	**31,7±4,5**	**ND**	**ND**
	45	**37,1±13,7**	**NS**	**31,4±4,1**	**ND**	**ND**
	60	**35,6±13,2**	**NS**	**31,6±5,8**	**ND**	**ND**
Resistencia vascular pulmonar (mmHG/ml/min.)	**15**	**2,4±0,9**	**<.01**	**1,4±0,5**	**NS**	**1,7±0,6**
	30	**2,3±0,9**	**<.05**	**1,5±0,8**	**NS**	**1,9±0,5**
	45	**2,3±0,8**	**NS**	**1,8±1,3**	**NS**	**2,3±0,9**
	60	**2,2±0,8**	**NS**	**2,3±2,4**	**NS**	**2,4±0,7**
Exudación pleural (ml/min.)	**15**	**1,6±1,1**	**NS**	**1,2±0,4**	**NS**	**1,1±0,3**
	30	**1,7±0,8**	**NS**	**1,3±0,6**	**NS**	**1,2±0,4**
	45	**1,7±0,9**	**<.05**	**1,2±0,4**	**NS**	**1,3±0,3**
	60	**1,7±0,7**	**NS**	**1,3±0,5**	**NS**	**1,4±0,5**
LDH (U/l.)	**5**	**309±116**	**<.01**	**651±215**	**NS**	**749±131**
	15	**85±18**	**<.05**	**268±134**	**<.05**	**368±104**
	30	**48±12**	**<.01**	**116±44**	**<.01**	**166±39**
	60	**31±5**	**<.01**	**61±19**	**<.01**	**99±40**
1-Viabilidad(%)		**16,7±9,6**	**<.05**	**38,1±17,8**	**NS**	**34,1±29,4**
Ww/Wd		**23,9±4,3**	**NS**	**21,6±4,2**	**NS**	**25,9±7,3**
Ww/Bw		**.019±.006**	**<.01**	**.011±.006**	**NS**	**.013±.002**
Edema		**+**	**NS**	**+**	**NS**	**+**
Lesión		**+**	**NS**	**+**	**NS**	**+**
Necrosis		**0**	**NS**	**0**	**NS**	**0/+**

7,6 DISCUSIÓN

> Los muecines llamaban a la oración de la primera luz cuando Averroes volvió a entrar en la biblioteca. Algo le había revelado el sentido de las dos palabras oscuras. Con firme y cuidadosa caligrafía añadió estas líneas al manuscrito: *Aristú* (Aristóteles) *denomina tragedia a los panegíricos y comedia a las sátiras y anatemas. Admirables tragedias y comedias abundan en las páginas del Corán y en las mohalacas del santuario.*
>
> J L. Borges. La busca de Averroes.

7,6-1 La lesión por isquemia-reperfusión. El modelo experimental.

7,6-1A Coherencia de los resultados experimentales.

La coherencia interna de los resultados queda patente al análisis conjunto de las correlaciones observadas entre las variables de función pulmonar, que se presentan según lo esperable, a partir de los conocimientos ya establecidos de fisiología y fisiopatología pulmonar.

El intercambio de gases y la mecánica respiratoria (evaluada según PawP) están relacionados significativamente entre sí, y ambas variables lo están con el grado de edema pulmonar, tanto si se evalúa éste como Ww/Dw ó como Ww/Bodyw. A mayor grado de edema pulmonar más difícil resulta movilizar el

pulmón (aumenta PawP) y peor se efectúa la oxigenación del líquido de perfusión.

El flujo de líquido de exudación pleural está igualmente correlacionado positivamente con el grado de edema pulmonar. Cuanto más líquido penetra en el intersticio pulmonar, mayor es la presión hidrostática en el intersticio, y mayor la cantidad de líquido sale del pulmón, por vía linfática (que está interrumpida en el modelo exvivo) y/o a través de la superficie pleural. El pulmón “intenta permanecer seco” Esta observación pone de manifiesto la importancia crítica que para el normal funcionamiento del órgano tiene el drenaje del líquido intersticial (Ver **4,1**) Paralelamente, el flujo de exudación pleural muestra correlación positiva con PawP y negativa con PO_2 del líquido efluente.

Igualmente, los valores que toman las variables hemodinámicas resultan coherentes con la intensidad del daño pulmonar. Muy interesante, la PAP media, que es la variable medida, está correlacionada positiva y significativamente sobre la formación de edema pulmonar, pero sólo si se consideran los valores que toma PAP en la fase inicial de reperfusión. A medida que avanza el tiempo de reperfusión, el índice de correlación va disminuyendo, y la significación llega a perderse para los valores que toma PAP en la fase final (minutos 45 y 60) de reperfusión (Ver **tabla 12**)

Así, las variables funcionales, PAP media (medida) PVR (calculada), edema pulmonar (medido al final de la reperfusión como Ww/Bodyw) exudación pleural (medida) distensibilidad pulmonar (medida como PawP) e intercambio de gases (medida como Po_2 en el líquido efluente) se hallan correlacionadas de un modo globalmente coherente. Lo que permite alcanzar tres conclusiones importantes:

1ª) La coherencia interna de los resultados obtenidos es aval de la validez metodológica del experimento.

2ª) El grado de edema pulmonar se manifiesta como factor clave en el grado de deterioro funcional del órgano.

3ª) El flujo de líquido de exudación pleural se manifiesta como un índice fiable de daño pulmonar en la lesión por I/R. Observación esta última de la que no se dispone de referente previo en la literatura.

También las variables que miden el grado de muerte celular (producción de lactato deshidrogenasa -LDH- y viabilidad celular) se muestran coherentes. Los pulmones preservados más tiempo presentan mayor mortalidad celular y mayor producción de LDH. Ambas variables se muestran correlacionadas positivamente. La correlación positiva entre producción de LDH y mortalidad celular confirma la utilidad de la medición de LDH como marcador de lesión / muerte celular (Ver **4,3-6C**) Estos resultados son

coherentes con el principio de afirma que la lesión por isquemia depende de la intensidad y la duración de la misma.

Sin embargo, el grado de deterioro funcional no se correlaciona sobre mortalidad celular. La falta de correlación que muestra la PO_2 en el líquido efluente sobre la viabilidad celular, y sobre la producción de LDH resulta sorprendente (Ver **7,5-1D**) Al menos de modo intuitivo, a mayor mortalidad celular debería corresponder mayor grado de deterioro funcional.

7,6-1B El modelo experimental.

En definitiva, en este modelo, queda patente que la formación de edema pulmonar se erige en el epicentro de la lesión pulmonar por isquemia – reperfusión.

Esto es también coherente con los mecanismos conocidos de lesión pulmonar (Ver **2,3** y **2,4**) En este sentido, es importante recordar que, en este experimento, la reperfusión se llevó a cabo con suero, no con sangre completa o diluida (ver **4,3-6B** y **6,5-1E**) Por tanto, en este modelo experimental queda excluido cualquier mecanismo lesional que no sea puramente ***local***. Es obvio que los mecanismos sistémicos, (inflamatorios e inmunológicos) mediados por células hemáticas del receptor, quedan forzosamente excluidos, puesto que no se reperfundió con sangre.

Por las características del modelo, la lesión que se observa y cuantifica es lesión celular (células endoteliales y neumocitos) y estructural (membrana alveolo-capilar, edema intersticial y alveolar) secundaria a la isquemia, al frío intenso, y a los mecanismos locales que se disparan a la reventilación y reperfusión. Estos mecanismos locales se refieren fundamentalmente a la disfunción vascular y vasomotora, con aumento de la permeabilidad vascular, dificultad a la relajación del músculo liso perivascular y peribronquial, etc. y deterioro del surfactante pulmonar. También se ha sugerido que el stress mecánico y térmico que sufre el pulmón al ser bruscamente reventilado y reperfundido, puede jugar un papel importante para explicar el desarrollo de lesión pulmonar de modo tan agudo (ver **4,4-5B**)

7,6-1C La preservación estándar.

Las diferencias en los resultados que presentan los grupos 1 (control sin isquemia) y 2 (preservación estándar, con solución LPD e isquemia 24 horas) manifiestan la intensidad de la lesión por I/R y la calidad de la preservación estándar.

Los resultados obtenidos en el grupo 2 de preservación estándar son similares a los expuestos en la literatura[317-327] En consecuencia, de nuevo avalan la validez metodológica de la práctica concreta realizada en este experimento, doblemente:

-En cuanto a la producción de lesión pulmonar por isquemia fría de 24 horas y reperfusión cálida, y

-En cuanto a la preservación pulmonar por perfusión e inmersión frías en solución LPD.

Y, por tanto, los resultados del grupo de preservación estándar son adecuados para comparar la calidad de la preservación obtenida en los grupos de preservación test.

7,6-1D Desarrollo de la lesión por isquemia-reperfusión.

El análisis de la varianza de las variables funcionales según el factor tiempo permite observar el desarrollo de la lesión por reperfusión. Efectivamente, este experimento muestra claramente que la lesión por I/R se produce fundamentalmente en los primeros minutos de la reperfusión, fenómeno que está recogido en la literatura.

Puede observase que la retención de líquido en el pulmón (medida como diferencia entre flujo de entrada y flujo de salida: líquido efluente + exudación pleura) se produce en los primeros 15 a 20 minutos de la reperfusión / reventilación. También queda patente cómo los parámetros de función pulmonar se deterioran en estos primeros minutos críticos de reperfusión para estabilizarse después. Tras este período inicial de deterioro intenso y una vez estabilizados, los pulmones dejan de

retener agua y los parámetros funcionales siguen una evolución temporal paralela o semejante a la del grupo control, que no fue sometido a I/R.

El parámetro que se muestra más sensible al respecto es la PO_2 medida en el líquido efluente. Todos los grupos con I/R muestran un deterioro marcado de la PO_2 en el líquido efluente en los primeros veinte minutos de reperfusión, transcurridos los cuales, los valores que toma la variable se estabilizan para mantenerse sin cambios hasta el final del experimento (Ver gráficos 4,5 y 8-16) Este fenómeno es particularmente intenso en ambos grupos de preservación de 24 horas (LPD y HUSD) y en menor medida, en los grupos preservados durante 72 horas.

7,6-2 Ensayo de la hipótesis. Los grupos TEST.

La comparación de los grupos test con el grupo de preservación estándar ensaya la hipótesis planteada. Al comparar los grupos test entre sí, se pretende vislumbrar el/los posible/s mecanismo/s de acción.

El grupo 3 de preservación con solución HUSD a 0º centígrados durante 72 horas se ha mostrado incluso superior funcionalmente, a la preservación estándar. Los resultados del grupo 3 llevan a aceptar la hipótesis experimental, que, recuérdese, plantea que la temperatura óptima de preservación puede estar alrededor de los cero grados centígrados.

En cambio, la preservación con HUSD–24 horas no se muestra superior a la preservación estándar, resultado éste contrario a la aceptación de la hipótesis.

Además, la solución LPD a temperatura de 10º centígrados también se ha mostrado eficaz en la preservación funcional de los pulmones tras isquemia de 72 horas (grupo LPD-72 horas) Apenas hay diferencias en los resultados funcionales, histológicos ni de viabilidad celular entre ambos grupos de 72 horas.

En consecuencia, los resultados de los grupos HUSD-72 horas y HUSD-24 horas demuestran que, al adicionar alcohol como anticongelante, pueden llevarse los pulmones a temperatura de congelación del agua y obtener una buena preservación del órgano incluso tras 72 horas de isquemia. Pero comparados con los grupos LPD-24 horas y LPD-72 horas no queda establecida una ventaja clara en la calidad de la preservación frente al modo estándar con LPD a 10ºC.

Por tanto, la hipótesis no puede aceptarse plenamente, ni tampoco rechazarse de modo definitivo. La hipótesis sigue siendo una idea sobre la que seguir investigando.

Porque este experimento ha generado nuevas preguntas: ¿Es el alcohol el anticongelante adecuado? O, ¿Quizá serían otras sustancias, (glicerol, cuerpos cetónicos) capaces de ofrecer mejores resultados histológicos y/o funcionales?

¿Mejorarían los resultados con la adición de otros impermeantes, azúcares polímeros, y/o de sustratos metabólicos del óxido nítrico?

Además del anticongelante (antisolidificante) ¿Exige el enfriamiento intenso la introducción de otros aditivos? ¿Existen otros mecanismos, ahora desconocidos, que resulten relevantes a esta temperatura?

¿Hasta qué punto puede forzarse el descenso de temperatura? ¿Es una buena idea “intentar que se esté todo quieto”? ¿Es siquiera posible? O, ¿Son preferibles temperaturas más altas “para que haya algo de producción de ATP”? O, incluso, ¿tienen ambos métodos cada uno sus ventajas e inconvenientes, de modo que lo que se gana por un lado, se pierde por otro?

¿Cúal ha sido el/los mecanismo/s de muerte celular? ¿Es, de verdad, posible disminuir el índice de mortalidad celular al bajar la temperatura? O, por el contrario, junto a los mecanismos conocidos, ¿Se dan además mecanismos de muerte celular programada!? (apoptosis) incluso en las mejores condiciones de preservación, y debe, por tanto, aceptarse una determinada tasa de mortalidad celular que inevitablemente crece con el tiempo?

Las células muertas (teñidas con azul trypán) se distribuían de forma difusa, sin llegar a formar áreas de

necrosis confluente. La preservación estructural ha sido suficientemente buena como para que todos los pulmones hayan podido ser reperfundidos y reventilados. ¿Puede aceptarse esto como un buen resultado?

¿Cuales hubieran sido la lesión histológica y la capacidad funcional de estos pulmones si hubieran sido reperfundidos con sangre? O, ¿Injertados en animales vivos? ¿Seguirían funcionales a medio / largo plazo?

Obviamente, estas y otras preguntas sólo pueden responderse haciendo nuevos grupos, realizando nuevos experimentos. Estudiando.

7,6-3 Observaciones.

La falta de relación entre mortalidad celular y función pulmonar merece consideración, al menos por sorprendente. ¿Tiene algún fundamento biológico, y es, por tanto, un hallazgo valioso? O, ¿Es consecuencia de la manipulación experimental, y por tanto, simplemente un defecto del modelo?

Exactamente, las observación que desafía una explicación racional puede explicitarse del siguiente modo:

1) Ambos grupos de 24 horas presentan mayor viabilidad celular y menor producción de LDH (frente a los grupos de 72 horas de isquemia).

2) Sin embargo, los dos grupos de preservados con solución LPD presentan los mismos resultados funcionales tras 24 y tras 72 horas de preservación; mientras que el grupo con solución HUSD de 72 horas presenta mejores resultados funcionales que el grupo HUSD de 24 horas.

3) Además, los dos grupos de 24 horas (LPD y HUSD) muestran un deterioro muy marcado de la función de intercambio de gases en la fase primera de la reperfusión / reventilación. Las diferencias entre los valores que toma la variable (PO_2 en el líquido efluente) al inicio frente al final de la fase de reperfusión alcanzan la significación estadística. Por el contrario, los grupos de preservación de 72 horas (LPD y HUSD) aunque también se deterioran con la reperfusión, lo hacen más suavemente, de modo que las diferencias entre los valores que toma la variable al principio y al final de la misma fase no alcanzan la significación.

Parece como si hubiera una cierta atenuación de la lesión por I/R por el factor tiempo, lo que resulta paradójico, por cuanto la lesión debería ser proporcional al tiempo de isquemia. Cabe una doble explicación. O es un artefacto del diseño experimental, o es un hallazgo potencialmente importante.

La paradoja arriba expuesta podría explicarse porque, en este modelo experimental, al haberse realizado la reperfusión con suero, son las células pulmonares vivas/lesionadas remanentes las únicas posibles sensores / efectoras de la lesión por isquemia y reperfusión. Así, esta observación no sería más que un artefacto experimental que tendría que corregirse, mitigarse, o modificarse, simplemente modificando el modelo experimental, por ejemplo, si la reperfusión se efectuara con sangre total o diluida. Es decir, si el líquido de reperfusión aportara también elementos celulares sensores / efectores de lesión.

El deterioro más intenso de la función de intercambio de gases en la fase de reperfusión precoz que sufren ambos grupos de 24 horas de isquemia, podría indicar una respuesta de participación lesional "activa" de más células (endoteliales, neumocitos) lesionadas pero viables, frente a un mecanismo más “pasivo” de producción lesional en aquellos pulmones con mayor deterioro en la fase de isquemia de 72 horas, y (¿por ende?) menor "respuesta" en la fase de reventilación / reperfusión.

La alteración del tono vasomotor y de la permeabilidad vascular (que son eventos primarios) serían más intensos en los pulmones de 24 horas de isquemia porque ambos dependerían, de la lesión (pasiva) que se produce durante la fase de isquemia / frío, y también de un mecanismo activo, local, la respuesta a esta lesión por las células viables remanentes, endoteliales y

neumocitos. Esta última respuesta sería más intensa cuantas más células lesionadas (pero vivas) son viables / activas.

En cambio, la respuesta sistémica (inflamatoria) mediada por células hemáticas, sí resulta tanto más intensa cuanto más destrucción celular y tisular presente el órgano. Pero, en este modelo, no hay respuesta sistémica posible. Y es esta respuesta inflamatoria sistémica, la que cierra el círculo vicioso lesional multiplicando la respuesta local, multiplicando la lesión pulmonar ya establecida. Esta última fase nos sería producida (ni observada, ni cuantificada) en este modelo.

En definitiva, la atenuación observada de la lesión por I/R sería sólo aparente por cuanto la lesión en este modelo depende de la lesión local (por isquemia y por frío) + la respuesta local, mientras que en la clínica depende de la lesión local + la respuesta local + la respuesta sistémica + la interacción entre las respuestas local y sistémica.

Junto a esta primera interpretación pesimista, otra interpretación es que el hallazgo es potencialmente valioso, que obedece a una cierta adaptación del órgano a las condiciones de isquemia y/o frío. En definitiva, que el órgano ha sido capaz de responder a los estímulos isquemia y/o frío intensos, mediante mecanismo/s que se ha/n expresado a las 72 horas, pero no a las 24 horas. Esta segunda interpretación es más sugestiva, porque da pié a estudiar cúal/es es/son este/os (posibles) mecanismo/s,

que, de ser identificados, podría/n llegar a ser de utilidad para la clínica. Pero más sugestiva no significa más cierta.

Hay antecedentes que permiten, al menos, apoyar esta hipótesis. En primer lugar está el fenómeno de adaptación o “acondicionamiento a la isquemia” por el que pequeños episodios repetidos de isquemia resultan protectores, dentro de unos límites, frente a un insulto posterior más intenso. Aunque los mecanismos de protección son desconocidos, el acondicionamiento a la isquemia indica que existen mecanismos de sensibilidad frente a la isquemia, capaces de desencadenar una respuesta adaptativa, moduladora de la lesión por isquemia severa posterior.

También los fenómenos adaptación metabólica que tienen lugar durante la hibernación en animales homeotermos apoyarían esta interpretación. De hecho, la adición a la solución de preservación de factores inductores de la hibernación ha sido ensayada con éxito en preservación pulmonar demostrando que existen sensores al frío ambiental y efectores de respuesta al mismo.

Finalmente, el trabajo que constituye esta tesis se originó, precisamente, tomando como fundamento los mecanismos de adaptación de batracios e insectos (animales poiquilotermos) al frío ambiental intenso.

Naturalmente, las dos explicaciones anteriores no se excluyen mutuamente. El diseño experimental nunca es neutral. En este sentido, la reperfusión con sangre podría eliminar el fenómeno observado o, por el contrario, intensificarlo.

Las variables de función pulmonar son fundamentales en la evaluación de la lesión por I/R. Sin duda, también la viabilidad celular es un criterio patológico importante. En este experimento se ha observado una disociación entre una y otra. En sí misma, esta observación es ya valiosa. Pero este experimento no fue diseñado ni presuponiendo este hallazgo ni, (menos) para explicarlo. El objetivo era mantener un pulmón en buenas condiciones tras un largo plazo de isquemia. Objetivo que se ha cumplido. El equipo investigador esperaba encontrar diferencias frente al modo clásico de preservación; pero no esperaba hallar diferencias favorables frente a períodos más cortos de isquemia.

Es preciso recordar que no se pueden establecer conclusiones sobre hallazgos inesperados. Deben permanecer como meras observaciones. Me remito ahora a las reflexiones en **4,1** y **4,3-8**. ***Los resultados experimentales son útiles, siempre que la metodología sea correcta, incluso aunque parezcan contradictorios.*** Esta afirmación se muestra aquí más nítidamente cierta que nunca. Porque los mecanismos de lesión / disfunción en I/R son múltiples, complejos, y en gran parte, desconocidos. Por los límites que impone la manipulación experimental al conocimiento. Y, finalmente, porque las

contradicciones pueden creadoras. En la mente despierta, abren nuevas y más vastas preguntas que investigar.

7,7 CONCLUSIONES

O, God, I could be bounded in a nutshell
and count myself a King of infinite space.
Hamlet, II, 2

1.- El modelo experimental desarrollado, el pulmón de rata aislado y perfundido ex –vivo, ha demostrado ser un instrumento útil en el estudio de la fisiología y la fisiopatología pulmonar. En concreto, este modelo experimental permite reproducir y estudiar la lesión pulmonar por isquemia y reperfusión. Sin embargo, las limitaciones metodológicas inherentes al modelo ex vivo hacen que los resultados obtenidos y las conclusiones alcanzadas sean sólo válidos para el propio modelo utilizado.

2.- Los resultados obtenidos en el grupo control sin isquemia, y los obtenidos en el grupo de preservación estándar en solución Low-Potassium-Dextran (LPD) durante 24 horas de isquemia a 10º centígrados, son semejantes a los expuestos en la literatura.

Luego, los resultados obtenidos en el grupo control juntamente con los obtenidos en el grupo de preservación estándar avalan la validez material y metodológica del modelo experimental desarrollado en la Unidad de Investigación del Hospital Universitario Son Dureta, así como su utilización para el estudio de la lesión pulmonar por isquemia y reperfusión. La comparación de los resultados del grupo control versus el grupo de preservación estándar muestran el grado de lesión / deterioro pulmonar por isquemia y reperfusión, con preservación estándar.

3.- Al considerar globalmente los cinco grupos experimentales, las variables de función pulmonar presentan correlaciones significativas esperables según la fisiología y fisiopatología pulmonar. La coherencia interna de los datos obtenidos avala nuevamente la validez metodológica empleada.

4.- Todos los pulmones en todos los grupos fueron suficientemente bien preservados como para poder ser reventilados y reperfundidos.

El deterioro funcional pulmonar se produce (igualmente de acuerdo con la literatura) en los primeros 10 a 20 minutos de reperfusión, para estabilizarse después.

La intensidad del edema pulmonar (medido al final de la reperfusión como peso húmedo/peso seco, o como peso húmedo/peso corporal total) se ha mostrado como el factor patológico clave en el grado de deterioro funcional pulmonar.

El flujo de exudación pleural se ha mostrado como un índice válido de evaluación del grado de deterioro funcional del pulmón.

5.- En este experimento, no se ha encontrado significación estadística al correlacionar las variables de función pulmonar sobre las variables de lisis celular.

La falta de correlación observada entre mortalidad celular, y el grado de deterioro funcional resulta un hallazgo paradójico. Ello no obstante, función pulmonar y viabilidad celular deben entenderse ambos como parámetros importantes en la evaluación de la calidad de la preservación pulmonar en los modelos ex –vivo de lesión por I/R.

6.- La liberación del encima intracelular lactato deshidrogenasa (LDH) al líquido efluente pulmonar es máxima en los primeros minutos (minuto 5) de la reperfusión, para disminuir (minuto 15) y estabilizarse. Este resultado fortalece la observación de que la lesión pulmonar por

isquemia y reperfusión se produce principalmente en la fase inicial de reperfusión.

El contenido lactato deshidrogenasa, (LDH) en el líquido efluente pulmonar, medida según técnicas habituales al inicio mismo de la reperfusión (minuto 5) se ha mostrado como un marcador válido de la mortalidad celular (medida tras finalizar la fase de reperfusión)

La intensidad de la liberación de LDH no (tampoco) ha mostrado correlación con el grado de deterioro funcional de los pulmones.

7.- La solución Low-Potassium-Dextran se ha mostrado eficaz en la preservación pulmonar mediante perfusión e inmersión a 10º centígrados para períodos de isquemia de 72 horas.

8.- La preservación pulmonar muy fría (0ºC) con solución HUSD tras 72 horas de isquemia:

a. Presenta mejores resultados funcionales que la preservación LPD estándar de 24 horas.
b. Presenta mayor mortalidad celular que la preservación estándar.
c. Presenta resultados funcionales, de viabilidad, retención de agua y estructurales semejantes a la preservación LPD 72 horas, excepto para la función

de intercambio de gases, que es mejor para la solución HUSD.

9.- La preservación pulmonar muy fría con solución HUSD tras 24 horas de preservación muestra resultados funcionales, de viabilidad celular, retención de agua y estructurales semejantes a los de la preservación estándar (LPD – 24 horas) excepto en la función de intercambio de gases, la cual es algo más deficiente para la solución HUSD.

Conclusión final

En este modelo experimental de pulmón de rata aislado y perfundido ex–vivo, se ha comparado la protección frente a la lesión por isquemia / reperfusión pulmonar mediante perfusión e inmersión frías del órgano. La solución test HUSD se ha mostrado más eficaz que la solución estándar LPD tras isquemia a largo plazo (72 horas) y menos eficaz que la solución LPD tras isquemia a medio plazo (24 horas). La solución LPD se ha mostrado tan eficaz en la preservación a 24 horas como a 72 horas.

Bibliografía

(1) Hardy JD, Webb WR, Dalton ML et al.

Lung homotransplantation in man.

JAMA 1963; 186: 1065-74

(2) Deron F, Barbier F, Ringoir S, et el.

Ten months´ survival after lung homotrasplantation.

J Thorac Cardiovasc Surg 1971; 61: 835-46

(3) Reitz BA, Wallwork JL, Hunt SA, et al.

Heart-lung transplantation. Successful therapy for patients with pulmonary vascular disease.

N Engl J Med 1982; 306: 557

(4) Toronto Lung Transplant Group.

Unilateral lung transplantation for pulmonary fibrosis.

N Engl J Med 1986; 314: 1140-5

(5) Patterson GA, Cooper JD, Dark JH, et al.

Experimental and clinical double lung transplantation.

J Thorac Cardiovasc Surg 1988; 95: 70-4

(6) Kaiser LR, Pasque MK, Trulock EP, et al.

Bilateral sequential single lung transplantation: The procedure of choice for double lung replacement.

Ann Thorac Surg 1991; 52: 438-46

(7) Starnes VA, Barr ML, Cohen RG et al.

Living-donor lobar lung transplantation experience: Intermediate results.

J Thorac Cardiovasc Surg 1996; 112: 1284-91

(8) Mal H, Andreassian B, Fabrice P, et al.

Unilateral lung transplantation in end-stage pulmonary emphysema.

Am Rev Respir Dis 1989; 140: 797-802

(9) Hosenpud JD, Novick RJ, Bennet LE, et al.

The registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirteenth Official Report-1996

J Heart Lung Transplant 1996; 15: 655-74

(10) Borel JR, Feurer C, Magnee C, et al.

Effects of the new antilymphocytic peptide ciclosporin A in animals.

Immunology 1977; 32:1017-25

(11) Calne RY, Rolles K, White DJ.

Ciclosporin A initially as the only immunosuppresive agent in 34 recipients of cadaveric organs.

Lancet 1979; 2:1033-6

(12) King-Biggs MB.

Acute Pulmonary Allograft Rejection: Mechanism, Diagnosis, and Management.

Clinics in Chest Medicine 1997; 18:301-10

(13) Kelly K, Hertz M.

Obliterative Bronchiolitis

Clinics in Chest Medicine 1997; 18: 319-38

(14) Williams TJ, Snell GL.

Early and Long-Term Functional Outcomes in Unilateral, Bilateral, and Living-Related Transplants Recipients.

Clinics in Chest Medicine 1997; 18:245-58

(15) Patterson GA, Todd TR, Cooper JD, et al.

Airway complications after double lung transplantation.

J Thorac Cardiovasc Surg 1990; 99: 14-21

(16) Rabinov M, Esmore DS, Snell GI, et al.

Reverse telescope anastomotic technique reduces the incidence of bronchial strictures.

J Heart Lung Transplant 1996; 15: 243-8

(17) Morgan E, Lima O, Goldberg M, et al.

Succesful revascularization of totally ischemic bronchial autografts with omental pedicle flaps in dogs.

J Thorac Cardiovasc Surg 1982; 84: 204-10

(18) Griffith BP, Hardesty RL, Trento A, et al.

Heart-Lung trasplantation: lessons learned and future hopes.

Ann Thorac Surg 1987; 43: 6-16

(19) Colquhoun IW, Gascoigne AD, Au J, et al.

Airway Complications After Pulmonary Trasplantation.

Ann Thorac Surg 1994; 57: 141-5

(20) Daly RC, McGregor CG.

Surgical issues in lung trasplantation: options, donor selection, graft preservation, and airway healing.

Mayo Clin Proc 1997; 72: 79-84

(21) Lonchyna VA, Arcidi JM Jr, Garrity ER Jr, et al.

Refractory post-transplant airway strictures: successful management with wire stents.

Eur J Cardiothorac Surg 1999; 842-9

(22) Report of the ATS Workshop on Lung Transplantation

Am Rev Respir Dis 1993; 147: 772-6

(23) Davis RD Jr, Pasque MK

Pulmonary trasplantation

Ann Surg 1995, 221: 14-28

(24) Patterson GA.

Indications. Unilateral, Bilateral, Heart-Lung, and Lobar Transplant procedures.

Clinics in Chest Medicine 1997; 18: 225-30

(25) Smith CM

Patient Selection, Evaluation, and Preoperative Management for Lung Tranasplant Candidates.

Clinics in Chest Medicine 1997; 18: 183-97

(26) Trulock EP.

Lung Transplantation.

Am J Respir Crit Care Med 1997; 155: 789-818

(27) Beecher HK, Adams RD, Barger C, et al.

The Ad Hoc Committee: A definition of irreversible coma.

Report of the Ad Hoc Committee of the Harvard Medical School to Examine the Definition of Brain Death.

JAMA 1968; 205: 337-40

(28) Frost AE.

Donor criteria and evaluation.

Clinics in Chest Medicine 1997; 18: 231-38

(29) Cooper JD

The lung donor: special considerations.

Transplant Proc 1988; 20 (5S7): 17-8.

(30) Kron IL, Tribble CG, Kern JA et al.

Successful transplantation of marginally acceptable thoracic organs.

Ann Surg 1993; 217: 518-24

(31) Shumway SJ, Hertz MI, Petty MG, et al.

Liberalization of Donor Criteria in Lung and Heart-Lung transplantation.

Ann Thorac Sug 1994; 57: 92-5

(32) Gabbay E, Williams TJ, Griffiths AP, et al.

Maximizing the utilization of donor organs offered for lung transplantation.

Am J Respir Crit Care Med 1999; 160: 265-71

(33) Fujimura S.

A new aspect to the question, "How can we determine the functional viability of donor lungs"?

Ann Thorac Surg 1999; Apr;5(2): 67-8

(34) Cohen RG, Barr ML, Schenkel FA, et al.

Living-related donor lobectomy for bilateral lobar transplantation in patients with cystic fibrosis.

Ann Thorac Surg 1994; 57: 1423-7

(35) Mallory GB, Cohen AH

Donor considerations in Living-Related Donor Lung Transplantation.

Clinics in Chest Medicine 1997; 18: 239-244

(36) Shaw LR, Miller JD, Slutsky AS, et al.

Ethics of lung transplantation with living donors.

Lancet 1991; 338: 678-81

(37) Smith CM

Patient Selection, Evaluation, and Preoperative Management for Lung Transplant Candidates.

Clinics in Chest Medicine 1997; 18: 183-98

(38) Manzetti JD, Ankeny R, Miller D.

Psycosocial and ethical issues in surgical approaches to end-stage lung disease.

Clinics in Chest Medicine 1997; 18: 383-90.

(39) Patterson GA.

Indications. Unilateral, Bilateral, Heart-Lung, and Lobar Transplant Procedures.

Clinics in Chest Medicine 1997; 18: 225-30

(40) Starnes VA.

Living-related donor lung transplantation in cystic fibrosis patients.

Presented at the Tenth Annual North American Cystic Fibrosis Conference. Orlando, Florida; 1996.

(41) Meyers BF, Patterson GA.

Lung transplantation: current status and future prospects.

World J Surg 1999; 23: 1156-62

(42) Meyers BF, Lynch J, Trulock EP, et al.

Lung transplantation: a decade of experience.

Ann Surg 1999; 230: 362-70

(43) Gross CR, Savik K, Bolman RM, Hertz MI.

Long-term health status and quality-of-life outcomes of lung transplant recipients.

Chest 1995; 108: 1587-93

(44) Wang XN, Williams TJ, McKenna MJ, et al.

Skeletal muscle oxidative capacity, fiber type, and metabolites after lung transplantation.

Am J Respir Crit Care Med 1999; 160: 57-63

(45) Cooper JD, Vreim CE.

Biology of Lung Preservation for Transplantation.

Am Rev Respir Dis 1992; 146: 803-7

(46) Kirk A, Colquhoun IW, Dark JH.

Lung preservation: A review of current practise and future directions.

Ann Thorac Surg 1993; 56: 990-1000

(47) Cooper JD, Patterson GA.

Lung Transplantation for end-stage lung disease.

En Thoracic Surgery: Frontiers and uncommon neoplasms. Martini N, Vogt-Moykopf I. Editors. CV Mosby Co. 1989; 109-20

(48) Pegg DE.

Organ preservation.

Surg Clin North Am 1986; 66: 617-632

(49) D´Alessandro AM, Southard JH, Love RB, et al.

Organ preservation.

Surg Clin North Am 1994; 74: 1083-95

(50) Norgaard Ma, Hove JD, Efsen F, et al.

Human bronchial artery blood flow after lung Tx with direct bronchial artery revascularization.

J Appl Physiol 1999; 87: 1234-9

(51) Fehrenbach H, Hirt SW, Wahlers T, et al.

Euro-Collins flush perfusion in human lung preservation—ultrastructural studies of the preservation quality of the contralateral donor lung in clinical single lung transplantation.

J Heart Lung Transplant 1994; 13:1-13

(52) Venuta F, Boehler A, Rendina EA, et al.

Complications in the native lung after single lung transplantation.

Eur J Cardiothoracic Surg 1999; 16: 54-8

(53) Palazzo R, Hamvas A, Suman T, et al.

Injury in nonischemic lung after unilateral pulmonary ischemia with reperfusion.

J Appl Physiol 1992; 72:612-20

(54) Watanabe A, Kawaharada N, Kusajima K, et al.
Contralateral lung injury associated with single-lung ischemia-reperfusion injury.
Ann Thorac Surg 1996; 62: 1644-9

(55) West JB.
Fisiología respiratoria.
Editorial Panamericana. Buenos aires 1981.

(56) West JB.
Ventilación/perfusión alveolar e intercambio gaseoso.
Editorial Panamericana. Buenos aires 1983.

(57) Montefusco CM, Veith FJ
Lung Transplantation.
Surg Clin North Am 1986; 66: 503-15

(58) Khan SU, Salloum J, O´Donovan PB, et al.
Acute pulmonary edema after lung transplantation: the pulmonary reimplantation response.
Chest 1999; 116: 187-94

(59) Angles R, Tenorio L, Bravo C, et al.
Reimplantation lesion in the postperative period of lung transplantation. Incidence, predictive factors, prognosis and outcome. The Lung Transplantaion Group of Vall d´Hebron University General Hospital.
Med Clin 1999; 113: 81-4

(60) Choi JK, Kearns J, Palevsky HI, et al.
Hyperacute rejection of a pulmonary allograft. Immediate clinical and pathological findings.
Am J Respir Crit Care Med 1999; 160: 1015-8

(61) Serrick C, Giaid A, Reis A, Shennib H.
Prolonged ischemia is associated with more pronounced rejection in the lung allograft.
Ann Thorac Surg 1997; 63: 202-8

(62) Waddell TK, Gorczynski RM, DeCampos KN, et al.
Major histocompatibility complex expression and lung ischemia-reperfusion in rats.
Ann Thorac Surg 1996; 62: 866-72

(63) Qayumi AK, Nikbakht-Sangari MN, Godin DV, et al.
The relatioship of ischemia-reperfusion injury of transplanted lung and the up-regulation of major histocompatibility complex II on host peripheral lymphocytes.
J Thorac Cardiovasc Surg 1998; 115: 978-89

(64) Shiraishi T, Mizuta T, DeMeester SR, et al.
Effect of ischemic injury on subsequent rat lung allograft rejection.
Ann Thorac Surg 1995; 60: 947-51

(65) Van Raemdonck DE, Jannis NC, De Leyn PR, et al.
Warm ischemic tolerance in collapsed pulmonary grafts is limited to 1 hour.
Ann Surg 1998; 228: 788-96

(66) Bund M, Struber M, Heine J, et al.
Effect of lung allograft ischaemia duration on postreperfusion graft function and postoperative course.
Thorac Cardiovasc Surg 1998; 46: 93-6

(67) Guppy M, Fuery CJ, Flanigan JE.
Biochemical principles of metabolic depression.
Comp Biochem Physiol 1994; 109B: 175-89

(68) Belzer FO, Southard JH.
Principles of solid-organ preservation by cold storage.
Transplantation 1988; 45:673-6

(69) Atkinson DE.
Cellular energy metabolism and its regulation.
Academic Press, New York, 1977

(70) Fisher AB, Dodia C, Ayene I, et al.
Ischemia-reperfusion injury to the lung.
Ann NY Acad Sci 1994; 13: 998-1002

(71) Amrani M, Royston D.

Local consequences of reperfusion in the lung.

En Ischaemia-Reperfusion Injury. Grace PA y Mathie RT editores. Blackwell Science; 1999: 82- 90

(72) MacKnight ADC, Leaf A.

Regulation of cellular volume.

Physiol Rev 1977; 57: 510-4

(73) Hochachka PW, Buck LT, Doll CJ, et al.

Unifying theory of hypoxia tolerance: Molecular/metabolic defense and rescue mechanisms for surviving oxygen lack.

Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93: 9493-8

(74) Vreugdenhil PK, Ametani MS, Haworth RA, et al.

Biphasic mechanism for hypothermic induced loss of protein synthesis in hepatocytes.

Transplantation 1999; 67: 1468-73

(75) Chandel NS, Scott GR, Choe SH, et al.

Cellular respiration during hypoxia. Role of cytochrome oxidase as the oxygen sensor in hepatocytes.

J Biol Chem 1997; 272: 18808-16

(76) Date H, Matsumura A, Manchester JK et al.

Evaluation of lung metabolism during successful twenty-four hour canine lung preservation.

J Thorac Cardiovasc Surg 1993; 105: 480-91

(77) Date H, Matsumura A, Manchester JK et al.

Changes in alveolar oxygen and carbon dioxide concentration and oxygen consumption during lung preservation. The maintenace of aerobic metabolism during lung preservation.

J Thorac Cardiovasc Surg 1993; 105: 492-501

(78) Unruh HW

Lung preservation and lung injury.

Chest Surg Clin N Am 1995; 5: 91-106

(79) Petterson S, Claes G, Schersten T.

Fatty acid and glucose utilization during continuous hypothermic perfusion of dog kidney.

Eur Surg Res 1974; 6:79-94

(80) Fuller BJ.

The effects of cooling on mammalian cells.

En Fuller BJ y Grout BWW editores. Clinical Applications of Cryobiology. Boca Raton, CRC Press 1991; 1

(81) Hochachka PW, Guppy M.

Frozen frogs and frozen insects.

En Metabolic arrest and the control of biological time. Hochachka PW, editor. Harvard University Press 1987; 120-45

(82) Waddell TK, Hirai T, Piovesan J, et al.
The effect of heat shock on immediate post-preservation lung function.
Clin Invest Med 1994; 17: 405-13

(83) Hall SM, Odom N, McGregor CG, et al.
Transient ultraestructural injury and repair of pulmonary capillaries in transplanted rat lung: effect of preservation and reperfusion.
Am J Respir Cell Mol Biol 1992; 7: 49-57

(84) Fehrenbach H, Riemann D, Wahlers T, et al.
Scanning and transmission electron microscopy of human donor lungs: fine structure of the pulmonary parenchyma following preservation and ischemia.
Acta Anat (Basel) 1994; 151: 220-31

(85) Gnaiger E, Rieger G, Kuznetsov A, et al.
Mitochondrial ischemia-reoxygenation injury and plasma membrane integrity in human endothelial cells.
Transplant Proc 1997; 29: 3524-6

(86) Hidalgo MA, Manek S, Fryer PR, et al.
Morphological Changes in rat single lung isograft after long-term survival.
Int J Exp Pathol 1995; 76: 43-54

(87) Hidalgo MA, Sarathchandra P, Fryer PR, et al.
Scanning electron microscopic changes in morphology of pulmonary endothelium in rat lung isografts following hypothermic ischemic storage and transplantation.
Int J Exp Pathol 1995; 76: 339-351

(88) Kruuv J, Glofcheski DJ, Lepock JR.
Evidence for two modes of hypothermia damage in five cell lines.
Cryobiology 1995; 32: 182-90

(89) Hidalgo MA, Sah KA, Fuller BJ, et al.
Cold ischemia–induced damage to vascular endothelium results in permeability alterations in transplanted lung.
J Thorac Cardiovasc Surg 1996; 112: 1027-35

(90) Sakuma T, Suzuki S, Usuda I, et al.
Preservation of alveolar epithelial fluid transport mechanism in rewarmed human lung after severe hypothermia.
J Appl Phisiol 1996; 80: 1681-6

(91) Carbognani P, Rusca M, Solli P, et al.
Pneumocytes type II ultrastructural modifications after storage in preservation solutions for transplantation.
Eur Surg Res 1997; 29: 319-26

(92) Sakuma T, Takahashi K, Ohya N, et al.

Ischemia-reperfusion lung injury in rabbits: mechanism of injury and protection.

Am J phisiol 1999; 276: L137-45

(93) Ware LB, Golden JA, Finkbeiner WE, et al.

Alveolar epithelial fluid transport capacity in reperfusion lung injury after lung transplantation.

Am J Respir Crit Care Med 1999; 159: 980-8

(94) Pickford MA, Manek S, Price AB, et al.

The pathology of rat lungs isografts following 48 or 72 – hour cold storage and subsequent reperfusion in vivo up to 1 month.

Int J Exp Pathol 1992; 73: 685-97

(95) Stolte N, Fehrenbach H, Ochs M, et al.

Effects of ischemia and preservation on the ultraestructure of the bronchiolar epithelium. A quantitaive electron microscopic study of human and canine lungs.

Virchows Arch 1996; 429: 1009-18

(96) Ueda M, Kosaka S, Hirata T, et al.

Mitochondrial injuries in rat lungs preserved for 17 h: An ultraestructural study.

Eur Surg Res 1999; 31: 162-72

(97) Poinar HN, Strohman RD, lee CY, et al.

Digital photogrammetric quantification of surface area and volume on scanning electron micrographs of frozen hydrated lung tissue.

Scanning 1996; 18: 456-9

(98) Carbognani P, Rusca M, Solli P, et al.

Pneumocytes type II ultraestructural modifications after storage in preservation solutions for transplantation.

Eur Surg Res 1997; 29: 319-26

(99) Fehrenbach H, Wahlers T, Ochs M, et al.

Ultraestructural pathology of the alveolar type II pneumocytes of human donor lungs. Electron microscopy, stereology, and microanalysis.

Virchows Arch 1998; 432: 229-39

(100) Schachter M, Foulds S.

Free radicals and the xanthine oxidase pathway.

En Grace PA, Mathie RT, editores. Ischaemia-Reperfusion injury. Blackwell Science; Oxford 1999: 137-47

(101) Fisher AB, Dodia C, Tan ZT, et al.

Oxygen-dependent lipid peroxidation during lung ischemia.

J Clin Invest 1991; 88: 674-9

(102) Christie NA, Smith DE, Decampos KN, et al.

Lung oxidant injury in a model of lung storage and extended reperfusion.

Am J Respir Crit Care Med 1994; 150: 1032-7

(103) Haniuda M, Dresler CM, Mizuta T, et al.

Free-radical mediated vascular injury in lungs preserved at moderate hypothermia.

Ann Thorac Surg 1995; 60: 1376-81

(104) Byrne AT, Johnson AH.

Lipid peroxidation.

En Grace PA, Mathie RT, editores. Ischaemia-Reperfusion injury. Blackwell Science; Oxford 1999: 148-56

(105) Panés J, Granger DN.

Neutrophils and adhesion molecules.

En Grace PA, Mathie RT, editores. Ischaemia-Reperfusion injury. Blackwell Science; Oxford 1999: 262-80

(106) Wellbourn CR, Goldman G, Paterson IS, et al.

Pathophysiology of ischaemia reperfusion injury: central role of the neutrophil.

Br J Surg 1991; 78: 651-5

(107) Lu YT, Hellewell PG, Evans TW.

Ischemia-reperfusion lung injury: contribution of ischemia, neutrophils, and hydrostatic pressure.

Am J Phisiol 1997; 273: L46-54

(108) Williams JP, Hechtman HB.

Eicosanoids.

En Grace PA, Mathie RT, editores. Ischaemia-Reperfusion injury. Blackwell Science; Oxford 1999: 209-223

(109) Motomura N, Foegh ML.

Platelet-activating factor.

En Grace PA, Mathie RT, editores. Ischaemia-Reperfusion injury. Blackwell Science; Oxford 1999: 247-61

(110) Minamiya Y, Tozawa K, Kitamura M, et al.

Platelet-activating factor mediates intercellular adhesión molecule-1-dependent radical production in the nonhypoxic ischemia rat lung.

Am J Respir Cell Mol Biol 1998; 19: 150-7

(111) Serrick C, Adoumie R, Giaid A, et al.

The early release of interleukin-2, tumor necrosis factor-alpha and the interferon-gamma after ischemia reperfusion injury in the lung allograft.

Transplantation 1994; 58: 1158-62

(112) Harada A, Sekido N, Akahoshi T, et al.

Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation.

J Leukoc Biol 1994; 56: 559-64

(113) Serrick C, La Franchesca S, Giaid A, et al.

Cytokine interleukin-2, tumor necrosis factor-alpha, and interferon-gamma release after ischemia/reperfusion injury in a novel lung autograft animal model.

Am J Respir Crit Care Med 1995; 152:277-82

(114) Eppinger MJ, Deeb GM, Bolling SF, et al.

Mediators of ischemia-reperfusion injury.

Am J Pathol 1997; 150: 1773-84

(115) Khimenko PL, Bagby GJ, Fuseler J, et al.

Tumor necrosis factor-alpha in ischemia and reperfusion injury in rat lungs.

J Appl Physiol 1998; 85: 2005-11

(116) Kelly CJ.

Cytokines.

En Grace PA, Mathie RT, editores. Ischaemia-Reperfusion injury. Blackwell Science; Oxford 1999: 236-46

(117) Naka Y, Marsh HC, Scesney SM, et al.
Complement activation as a cause for primary graft failure in an isogeneic rat model of hypothermic lung preservation and transplantation.
Transplantation 1997; 64: 1248-55

(118) Bengtsson A, Heideman M.
Complement.
En Grace PA, Mathie RT, editores. Ischaemia-Reperfusion injury. Blackwell Science; Oxford 1999: 224-35

(119) Kuhnle GE, Reichenspurner H, Lange T, et al.
Microhemodynamics and leukocyte sequestration after pulmonary ischemia and reperfusion in rabbits.
J Thorac Cardiovasc Surg 1998; 115: 937-44

(120) vanGriensven M, Stalp M, Seekamp A.
Ischemia-reperfusion directly increases pulmonary endothelial permeability in vitro.
Shock 1999; 11: 259-63

(121) Wellbourn CR, Goldman G, Paterson IS, et al.
Pathophysiology of ischaemia reperfusion injury: central role of the neutrophil.
Br J Surg 1991; 78: 651-5

(122) Lu YT, Hellewell PG, Evans TW.

Ischemia-reperfusion lung injury: contribution of ischemia, neutrophils, and hydrostatic pressure.

Am J Phisiol 1997; 273: L46-54

(123) Schneuwly OD, Licker M, Pastor CM, et al.

Beneficial effects of leukocyte-depleted blood and low-potassium dextran solutions on microvascular permeability in porcine preserved lung.

Am J Respir Crit Care Med 1999; 160: 689-97

(124) Okada Y, Marchevsky AM, Zuo XJ, et al.

Accumulation of platelets in rat syngeneic lung transplants: a potential factor responsible for preservation-reperfusion injury.

Transplantation 1997; 64: 801-6

(125) Abolhoda A, Brooks A, Choudrhry M, et al.

Characterization of local inflammatory response in an isolted lung perfusion model.

Ann Surg Oncol 1998; 5: 87-92

(126) Allison RC, Kyle J, Adkins WK, et al.

Effect of ischemia reperfusion or hypoxia reoxigenaton on lung vascular permeability and resistance.

J Appl Physiol 1990; 69: 597-603

(127) Davies MG, Huynh TTT, Hagen P-O.

Endotelial physiology.

En Grace PA, Mathie RT, editores. Ischaemia-Reperfusion injury. Blackwell Science; Oxford 1999: 157-179

(128) Pinsky DJ.

The vascular biology of heart and lung preservation for transplantation.

Thromb Haemost 1995; 74: 58-65

(129) Pinsky DJ, Naka Y, Chowdhury NC, et al.

The nitric oxide/cyclic GMP pathway in organ transplantation: critical role in successful lung preservation.

Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91: 12086-90

(130)Stewart AG, Barker JE, Hickey MJ.

Nitric oxide in ischemia-reperfusion injury.

En Grace PA, Mathie RT editors. Ischaemia-reperfusion injury. Blakwell Science 1999: 180-95

(131) Tavaf-Motamen H, Miner TJ, Starnes BW, et al.

Nitric oxide mediates acute lung injury by modulation of inflammation.

J Surg Res 1998; 78: 137-42

(132) Meldrum DR, Shames BD, Meng X, et al.
Nitric oxide downregulates lung macrophage inflammatory cytokine production.
Ann Thorac Surg 1998; 66: 313-7

(133) Bhabra MS, Hopkinson DN, Shaw TE, et al.
Modulation of lung reperfusión injury by nitric oxide: impact of inspired oxygen fraction.
Transplantation 1999; 68: 1238-43

(134) Naka Y, Roy DK, Liao H, et al.
cAMP-mediated vascular protection in an orthotopic rat lung transplant model. Insights into the mechanism of action of prostaglandin E1 to improve lung preservation.
Circ Res 1996; 79: 773-83

(135) Naka Y, Chowdhury NC, Liao H, et al.
Enhanced preservation of orthotopically transplanted rat lungs by nitroglycerin but not hydralazine. Requirement for graft vascular homeostasis beyond harvest vasoldilation.
Circ Res 1995; 76: 900-6

(136) Eppinger MJ, Ward PA, Jones ML, et al.
Disparate effects of nitric oxide on lung ischemia-reperfusion injury.
Ann Thorac Surg 1995; 60: 1169-76

(137) Huang YC, Fischer PW, Nocik-Grayck E, et al.
Hypoxia compared with normoxia alters the effect of nitric oxide in ischemia-reperfusion lung injury.
Am J Physiol 1997; 273: L504-12

(138) Santillan-Doherty P, Sostres-Vega A, Jasso-Victoria R, et al.
Plasma thromboxane B2 concentrations and pulmonary vascular resistance during lung reperfusión.
J Invest Surg 1997; 10: 165-71

(139) Griese M.
Pulmonary surfactant in health and human lung diseases: state of the art.
Eur respir J 1999; 1455-76

(140) Erasmus ME, Petersen AH, Oetomo SB, et al.
The function of surfactant is impaired during the reimplantation response in the rat lung transplants.
J Heart Lung Transplant 1994; 13: 791-802

(141) Andrade RS, Solien EE, Wangensteen OD, et al.
Surfactant dysfunction in lung preservation.
Transplantation 1995; 60: 536-41

(142) Novick RJ, Gehman KE, Ali IS, et al.

Lung preservation: the importance of endotelial and alveolar type II cell integrity.

Ann Thorac Surg 1996; 62: 302-14

(143) Toledo-Pereyra LH, Hau T, Simmods RL, et al.

Lung Preservation Techniques.

Ann Thorac Surg 1977; 23: 487-94

(144) Locke TJ, Hooper TL, Flecknell PA, et al.

Preservation of the lung. Comparison of topical cooling and cold crystalloid pulmonary perfusion.

J Thorac Cardiovasc Surg 1988; 96: 789-95

(145) Steen S, Sjoberg T, Ingemasson R, et al.

Efficacy of topical cooling in lung preservation: is reappraisal due?

Ann Thorac Surg 1994; 58: 1657-63

(146) Robicsek F, Pruit JR, Sanger PW et al.

The maintenance of function of the donor heart in the extracorporeal stage and during transplantation.

Ann Thorac Surg 1968; 6: 330-2

(147) Hardesty RL, Griffith BP.

Autoperfusion of the heart and lungs for preservation during distant procurement.

J Thorac Cardiovasc Surg 1987; 93: 11-8

(148) Keenan RJ, Griffith BP, Kormos RL, et al.
Increased perioperative lung preservation injury with lung procurement by Euro-Collins solution flush.
J Heart Lung Transplant 1991; 10: 650-5.

(149) Ladowski JS, Kapelanski DP, Teodori MF, et al.
Use of autoperfusion for distant procurement of heart-lung allogafts.
J Heart Transplant 1986; 4: 330-3

(150) Miyamoto Y, Lajos TZ, Bhayana JN, et al.
Physiologic constraints in autoperfused heart-lung preservation.
J Heart Transplant 1987; 6: 261-6.

(151) Adachi H, Fraser CD, Kontos GJ, et al.
Autoperfused working heart-lung preparation versus hypothermic cardiopulmonary preservation for transplantion.
J Heart Transplant 1987; 6: 253-60.

(152) Robicsek F, Masters TN, Duncan GD, et al.
An autoperfused heart-lung preparation: metabolism and function.
J Heart Transplant 1985; 4: 334-338.

(153) Riveron FA, Ross JH, Swartz KA, et al.
Energy expenditure of autoperfusing heart-lung preparation.
Circulaton 1988; 78: III103-III109.

(154) Kontos GJ, Borkon AM, Adachi H, et al.

Successful extended cardiopulmonary preservation in the autoperfused working heart-lung preparation.

Surgery 1987; 102: 269-76

(155) Naka I, Hirose H, Shirakura R, et al.

Prevention of pulmonary edema developing in autoperfusing heart-lung preparation by leukocyte depletion.

Eur J Cardiothorac Surg 1989; 3: 355-8

(156) Genco CM, Connolly RJ, Peterson MB, et al.

Granulocyte sequestration and early failure in the autoperfused heart-lung preparation.

Ann Thorac Surg 1992; 53: 217-26

(157) Zenati M, Dowling RD, Armitage JM, et al.

Organ procurement for pulmonary transplantation.

Ann Thorac Surg 1989; 48: 882-6

(158) Williams GM, Cameron DE, Fraser CD, et al.

Cardiopulmonary bypass with profound hypothermia: an optimal meted for multi-organ procurement.

Transplant Proc 1989; 21: 1199

(159) Fullerton DA, McIntyre RC Jr, Mitchell MB, et al.
Lung transplantation with cardiopulmonary by-pass exaggerates pulmonary vasomotor dysfunction in the transplanted lung.
J Thorac Cardiovasc Surg 1995; 109: 212-6

(160) Pearse DB, Silvestre JT.
Vascular injury in isolated sheep lungs. Role of ischemia, extracorporeal perfusion, and oxygen.
Am J Respir Crit Care Med 1996; 153: 196-202

(161) Royston D.
The inflammatory response and extracorporeal circulation.
J Cardiothorac Vasc Anesth 1997; 11: 341-54

(162) Wan S, LeClerc JL, Vincent JL.
Cytokine responses to cardiopulmonary bypass: lessons learned from cardiac transplantation.
Ann Thorac Surg 1997; 63: 269-76

(163) Friedman M, Sellke FW, Wang SY, et al.
Parameters of pulmonary injury after total or partial cardiopulmonary bypass.
Circulation 1994; 90: II262-8

(164) Wahlers T, Haverich A, Fieguth HG, et al.
Flush perfusion using Euro-Collins solution vs cooling by means of extracorporeal circulation in heart-lung preservation.
J Heart Transplant 1986; 5: 89-98

(165) Kontos GJ, Adachi H, Borkon AM et al.
Successful four hour heart-lung preservation with core-cooling on cardiopulmonary bypass: a simplified model that assesses preservation.
J Heart Transplant 1987; 6 106-11

(166) Bando K, Teramoto S, Tago M, et al.
Core-cooling, heart-perfusion, lung-inmersion technique provides successful cardioplmonary preservation for Heart-lung transplantation.
Ann Thorac Surg 1988; 625-30

(167) Harjula A, Baldwin JC, Shumway NE.
Donor deep hypothermia or donor pre-treatment with prostaglandin E1 and single pulmonary artery flush for heart-lung graft preservation: an experimental study.
Ann Thorac Surg 1988; 46: 553-5

(168) Wahlers T, Haverich A, Fieguth HG, et al.
Future horizons of lung preservation by application of a platelet-activating factor antagonist compared with current clinical standards. Euro-collins flush perfusion versus donor core cooling.
J Thorac Cardiovasc Surg 1992; 103: 200-4

(169) Starkey TD, Sakakibara N, Hagberg RC, et al.
Successful six-hour cardiopulmonary preservation with simple hypotermic crystalloid flush.
J Heart Transplant 1986; 5: 291-7

(170) Feeley TW, Mihm FG, Downing TP et al.
Hypothermic preservation of the heart and lungs with Collins solution: effect on cardiorespiratory function following heart-lung allotransplantation in dogs.
Ann Thorac Surg 1986; 41: 301-6

(171) Haverich A, Aziz S, Scott WC, et al.
Improved lung preservation using Euro-Collins solution for flush-perfusion.
J Thorac Cardiovasc Surg 1986; 34: 368-76

(172) Harjula AL, Starkey TD, Hagberg RC, et al.
Intravenous prostaglandin E1, cold crytalloid flush and topical hypothermia for cardiopulmonary graft preservation.
Ann Chir Gynaecol 1987; 76: 56-60

(173) Reichart BA, Novitzky D, Cooper DK, et al.
Successful orthotopic heart-lung transplantaion in the baboon after five hours of cold ischemia with cardioplegia and Collins´ solution.
J Heart Transplant 1987; 6: 15-22

(174) Sarsam MA, Yonan NA, Deiraniya AK, et al.
Retrograde pulmonaryplegia for lung preservation in clinical transplantation: a new technique.
J Heart Lung Transplant 1993; 12: 494-8

(175) Baretti R, Bitu-Moreno J, Beyersdorf F, et al.
Distribution of lung preservation solutions in parenchyma and airways: influence of atelectasis and route of delivery.
J Heart Lung Transplant 1995; 14: 80-91

(176) Chen CZ, Gallagher RC, Ardery P, et al.
Retrograde flush and cold storage for twenty-two to twenty-five hours lung preservation with and without prostaglandin E1.
J Heart lung Transplant 1997; 16: 658-66

(177) Varela A, Montero C, Cordoba M, et al.
Clinical experience with retrograde lung preservation.
Transpl Int 1996; 9S1: S296-8

(178) Varela A, Montero C, Cordoba M, et al.
Improved distribution of pulmonary flush solution to the tracheobronchial wall in pulmonary transplantation.
Eur Surg Res 1997; 29: 1-4

(179) Varela A, Cordoba M, Serrano-Fiz S, et al.
Early lung allograft function after retrograde and antegrade preservation.
J Thorac Cardiovasc Surg 1997; 114: 1119-20

(180) Wahlers T, Schafers HJ, Cremer J, et al.
Organ preservation for heart-lung and lung transplantation.
Thorac Cardiovasc Surg 1991; 39: 344-8

(181) Snell GI, Rabinov M, Griffiths A, et al.
Pulmonary allograft ischemic time: an important predictor of survival after lung transplantation.
J Heart Lung Transplant 1996; 15: 160-8

(182) Kshettry VR, Kroshus TJ, Burdine J, et al.
Does donor organ ischemia over four hours affect long-term survival after lung transplantation?
J Heart Lung Transplant 1996; 15: 169-74

(183) Wang LS, Yoshikawa K, Miyoshi S, et al.
The effect of ischemic time and temperature on lung preservation in a simple ex vivo rabbit model used for functional assessment.
J Thorac Cardiovasc Surg 1998; 98: 333-42

(184) Wittwer T, Wahlers T, Fehrenbach A, et al.
Improvement of pulmonary preservation with Celsior and Perfadex: impact of storage time on early post-ischemmic lung function.
J Heart Lung Transplant 1999; 18: 1198-201

(185) Ueno T, Snell GI, Williams, TJ, et al.
Impact of graft ischemic time on outcomes after bilateral sequential single-lung transplantation.
Ann Thorac Surg 1999; 67: 1577-82

(186) Novick RJ, Bennett LE, Meyer DM, et al.
Influence of graft ischemic time and donor age on survival after lung transplantation.
J Heart Lung Transplant 1999; 18: 425-31

(187) Shimokawa S, Matsunaga Y, Watanabe S, et al.
A new lung preservation method of topical cooling by ambient cold air combined with high-frecuency oscillation: an experimental study.
Transplant proc 1994; 26: 2364-6

(188) Chien S, Zhang F, Zhang Z, et al.
Two-day preservation of the lungs by normothermic perfusion.
Acta Biomed Ateneo Parmense 1994; 65: 165-79

(189) Van Raemdonck DE, Jannis NC, Rega FR, et al.
External cooling of warm ischemic rabbit lungs after death.
Ann Thorac Surg 1996; 62: 331-7

(190) Van Raemdonck DE, Jannis NC, Rega FR, et al.
Dealy of adenosine triphosphate depletion and hypoxanthine formation in rabbit lung after death.
Ann Thorac Surg 1996; 62: 233-40

(191) Muller C, Hoffmann H, Bittmann I, et al.
Hypothermic storage alone in lung preservation for transplantation: a metabolic, light microscopic, and functional analysis after 18 hours of preservation.
Transplantation 1997; 63:625-30

(192) Chien S, Maley R, Oeltgen PR, et al.
Canine lung transplantastion after more then twenty-four hours of normothermic preservation.
J Heart Lung Transplant 1997; 16: 340-51

(193)Hachida M, Hoon DS, Morton DL.
A comparison of solutions for lung preservation using pulmonary alveolar type II cell viability.
Ann Thorac Surg 1988; 45: 643-6

(194) Maccherini M, Keshavjee SH, Slutsky AS, et al.
The effect of low-potassium-dextran versus Euro-Collins solution for preservation of isolated type II pneumocytes.
Transplantation 1991; 52: 621-6

(195) Carbognani P, Rusca M, Solli P, et al.
Pneumocytes Type II ultrastructural modifications after storage in preservation solutions for transplantation.
Eur Surg Res 1997; 29: 319-26

(196) Cullen S, Haworth SG, Warren JD.
Donor organ preservation fluids differ in their effect on endothelial cell function.
J Heart Lung Transplant 1991; 10: 999-1003

(197) Unruh H.
Pulmonary endothelial cell function after modified Eurocollins solution infusion.
J Heart Lung Transplant 1993; 12: 700-5

(198) Hall SM, Komai H, Reader J, et al.
Donor lung preservation: effect of cold preservation fluids on cultured pulmonary endothelial cells.
Am J Psysiol 1994; 267: L508-L517

(199) Spaggiari L, Carbognani P, Rusca M, et al.
Methodology for the assessment of lung protection. Human pulmonary artery endothelial cell preservation using haemaccel.
Transplantation 1995; 60: 1040-3

(200) Carbognani P, Spaggiari L, Rusca M, et al.
Pulmonary endotelial cell modifications after storage in solid-organ preservation solutions.
J Int Med Res 1995; 23: 200-6

(201) Trocha SD, Kevil CG, Mancini MC, et al.
Organ preservation solutions increase endothelial permeability and promote loss of junctional proteins.
Ann Surg 1999; 230: 105-13

(202) Kruuv J, Glofcheski DJ, Lepock JR.
Evidence for two modes of hypothermia damage in five cell lines.
Cryobiology 1995; 32: 182-90

(203) Spaggiari L, Carbognani P, Alferi R, et al.
A new extracellular type solution for lung preservation: “in vitro” comparison with Belzer, low potassium dextran and Euro-Collins solutions by means of human lung fibroblasts.
J Cardiovasc Surg (Torino) 1995; 36: 185-9

(204) Carbognani P, Rusca M, Spaggiari L, et al.
The effects of trehalose on human lung fibroblasts stored in Euro-Collins and low potassium dextran solutions.
J Cardiovasc Surg (Torino) 1997; 38: 669-71

(205) Kim JS, Southard JH.
Membrane stabilizing effects of calcium and taxol during the cold storage of isolated rat hepatocytes.
Transplantation 1999; 68: 1538-40

(206) Bundschuh DS, Uhlig S, Lesit M, et al.
Isolation and characterization of rat primary lung cells.
In Vitro Cell Dev Biol Anim 1995; 31: 684-91

(207) Lee CY, Matsumoto-Pon J, Widdicombe JH.
Cultured lung epithelium: A cellular model for lung preservation.
Cryobiology 1997; 35: 209-18

(208) Detry O, Willet K, Lambermont B, et al.
Comparative effects of University of Wisconsin and Euro-Collins solutions on pulmonary mitochondrial function after ischemia and reperfusion.
Transplantation 1998; 65: 161-6

(209) Kimblad PO, Massa G, Sjoberg T, et al.
Endothelium-dependent relaxation in pulmonary arteries after lung preservation and transplantation.
Ann Thorac Surg 1993; 56: 1329-34

(210) Carbognani P, Spaggiari L, Rusca M, et al.
Pulmonary endotelial cell modifications after storage in solid-organ preservation solutions.
J Int Med Res 1995; 23: 200-6

(211) Struber M, Ehlers KA, Nilsson FN, et al.
Effects of lung preservation with Euro-Collins and University of Wisconsin solutions on endothelium –dependent relaxations.
Ann Thorac Surg 1997; 63: 1428-35

(212) Carboggiani P, Spaggiari L, Rusca M, et al.
Ultraestructural damage of the pulmonary endotelial cell after storage in lung preservation solutions. Comparison between Belzer and Euro-Collins solutions.
J Cardiovasc Surg (Torino) 1995; 36: 93-5

(213) Sarria B, Naline E, Cortijo J, et al.
Functional, biochemical and morphological studies on human bronchi after cryopreservation.
Br J Pharmacol 1995; 116: 2569-74

(214) Martin C, Uhlig S, Ullrich V.

Videomicroscopy of methacholine-induced contraction of individual airways in precision-cut lung slices.

Eur Respir J 1996; 9: 2479-87

(215) Held HD, Martin C, Uhlig S.

Characterization of airway and vascular responses in murine lungs.

Br J Pharmacol 1999; 126: 1191-9

(216) Uhlig S.

The isolated perfused lung.

En Methods in Pulmonary Research. Eds: S. Uhlig, AE Taylor. Birkhäuser Verlag, Basel 1998; 29-55

(217) Shih-Wen C, Voelkel NF.

The isolated perfused lung preparation as a research tool.

En Comparative Biology of the Normal Lung. Ed: Parent RA. CRC Press, Boca Raton 1992; 587-613

(218) Uhlig S, Wollin L.

An improved setup for the isolated perfused rat lung.

J Pharmacol Toxicol Methods 1994; 31: 85- 94

(219) Uhlig S.

Análisis of edema formation in isolated perfused rat lungs ventilated by negative pressure.

Reprinted from FFB9, Pharmacological Evaluation of Cardioprotective Substances. Biomesstechnik Verlag March 1995; 152-61

(220) Uhlig S, von Bethmann AN.

Determination of vascular compliance, interstitial compliance, and capillary filtration coefficient in isolated perfused lungs.

J Pharmacol Toxicol Methods 1997; 37: 119-27

(221) Chang RS, Wright K, Efros RM.

Role of albumin in prevention of edema in perfused rabbit lungs.

J Appl Physiol 1981; 50: 1065-70

(222) Fukuse T, Albes JM, Takahashi Y, et al.

Influence of red blood cells on lung function in an ex vivo rat heart-lung model.

J Surg Res 1995; 59: 299-404

(223) De Campos KN, Waddell TK, Slutsky AS, et al.

Assessment of postpreservation rat lung function using a new model of extended venous reperfusion.

J Appl Physiol 1993; 75: 1890-6

(224) Hopkinson DN, Odom NJ, Eloakley RM, et al.
A technique for studying the function of an isolated, perfused and ventilated lung in a rat model.
Lab Anim 1995; 29: 96-101

(225) Hanagiri T, Igisu H, Shiraishi T, et al.
Effects of glucose on rat lung preservation: report of a study conducted on an isolated lung reperfusion model utilizing another isolated lung as a "desoxigenator".
Surg Today 1995; 25: 542-7

(226) Fukuse T, Hirata T, Liu CJ.
Assessment of preserved lung function in an ex vivo rat model perfused with homologous blood.
Transplantation Proceedings 1996; 28:1832-3

(227) Wisser W, Oturanlar D, Minich R, et al.
Closed circuit perfusion of an isolated rabbit lung. A new model for the evaluation of preservation quality of stored lungs.
Eur J Cardiothorac Surg 1993; 7: 71-4

(228) Swoboda L, Clancy DE, Rieder-Nelissen CM, et al.
A modified ex-vivo rabbit lung reperfusión model for the study of lung preservation techniques.
Acta Biomed Ateneo Parmense 1994; 65: 83-99

(229) Gaar KA, Taylor AE, Owens LJ, et al.

Pulmonary capillary pressure and the filtration coefficient in the isolated perfused lung.

Am J Psysiol 1967; 213: 910-4

(230) Jones DR, Becker RM, Hoffmann SC, et al.

When does the lung die? Kfc, cell viability, and adenine nucleotide changes in the circulation-arrested rat lung.

J Appl Physiol 1997; 83: 247-52

(231) Pillai RP, Buescher PC, Pearse DB, et al.

31P RNM spectroscopy of isolated perfused lungs.

Magn Reson Med 1986; 3: 467-72

(232) Hall TS, Buescher PC, Borkon AM, et al.

31P nuclear magnetic resonance determination of changes in energy state in lung preservation.

Circulation 1988; 78: III95-III98

(233) Hammond GL, Pitt B, Gillis CN.

Pulmonary metabolic function can serve as a monitor for lung preservation.

J Heart Transplant 1986; 5: 23-8

(234) DeCampos KN, Waddell TK, Slutsky AS, et al.

Functional and biochemical assessment of postpreservation lung vibility in a rat model.

J Appl Physiol 1994; 76: 813-20

(235) Urabe N, Fujisawa T, Sayito Y, et al.
The capacity of dog lung to release prostaglandin I2 as a biochemical marker for evaluating lung damage during preservation.
Transplantation 1994; 57: 194-8

(236) Drent M, Cobben NAM, Henderson RF, et al.
Usefulness of lactate dehydrogenase and its isoenzymes as indicators of lung damage or inflammation.
Eur Respir J 1996; 9: 1736-42

(237) De Backer D, Creteur J, Zhang H, et al.
Lactate production by the lungs in acute lung injury.
Am J Respir Crit Care Med 1997; 1099-104

(238) Hanagiri T, Igisu H, Matsumura H, et al.
Functional and biochemical evaluation of the preserved lung in a rat model.
Surg Today 1996; 26: 1029-32

(239) Sakamaki F, Hoffmann H, Muller C, et al.
Reduced lipid peroxidation and ischemia-reperfusion injury after lung transplantation using low-potassium dextran solution for lung preservation.
Am J Respir Crit Care Med 1997; 156: 1073-81

(240) Love RB, Conhaim RL, Harm BA.

Effects of University of Wisconsin and Euro-Collins solutions on interstitial pulmonary edema in isolated rat lungs.

Transplantation 1996; 6: 1014-8

(241) D´Armini AM, Lemasters JJ, Egan TM.

Studies of rat lung viability and adenine nucleotide metabolism after death.

Ann Thorac Surg 1996; 62: 1448-53

(242) Kawaguchi A, Hirsh PD, Wolfgang TC, et al.

Heart and unilateral lung transplantaion in the dog.

J Thorac Cardiovasc Surg 1986; 91: 485-9

(243) Ohura H, Kondo T, Handa M, et al.

Primate model of 24-hour pulmonary preservation for clinical application.

Transplant Proc 1994; 26: 885-6

(244) Jones MT, Hsieh C, Yoshikawa K, et al.

A new model for assessment of lung preservation.

J Thorac Cardiovasc Surg 1988; 96: 608-14

(245) Marck KW, Wildevuur CRH.

Lung transplantation in the rat: technique and survival.

Ann Surg 1981; 34: 74-80

(246) Mizuta T, Kawaguchi A, Nakahara K, et al.
Simplified rat lung transplantation using a cuff technique.
J Thorac Cardiovasc Surg 1989; 97: 578-81

(247) Hausen B, Demertzis S, Schroder F, et al.
Double-lung transplantation in the rat: an acute, syngeneic in situ model.
Ann Thorac Surg 1996; 61: 184-9

(248) Schilling M, Tilton B, Beltzer FO, et al.
Fundamental metabolic defference between cold stored lungs and liver and kidneys.
Swiss Surg 1995; 4: 172-4

(249) Gryf-Lowczowski JVD.
Techniques for organ preservation.
En Grace PA, Mathie RT editors. Ischaemia-reperfusion injury. Blackwell Science 1999; 357-68

(250) Bastacky J, Lee CY, Goerke J, et al.
Alveolar lining layer is thin and continuous: low-temperature scanning electrón microscopy of rat lung.
J Appl Physiol 1995; 79: 1615-28

(251) Guyton AC.
Plasma colloid osmotic pressure.
In: Guyton´s textbook of medical physiology. 8th ed. Philadelphia: Saunders, 1991: 177-8

(252) Collins GH, Bravo-Shugarman MB, Terasaki PI.

Kidney preservation for transplantation. Initial perfusion and 30 hour ice storage.

Lancet 1969; 2: 1219

(253) Green CJ, Pegg DE.

Mechanism of action of "intracellular" renal preservation solutions.

World J Surg 1979; 3: 115-20

(254) Breda MA, Hall TS, Stuart RS, et al.

Twenty-four hour lung preservation by hypothermia and leukocyte depletion.

J Heart Transplant 1985; 4: 325-9

(255) Haverich A, Aziz S, Scott WC, et al.

Improved lung preservation using Euro-Collins´ solution for flush pefusion.

Thorac Cardiovasc Surg 1986; 34: 368-78

(256) Hall TS, Borkon AM, Gurtner GC, et al.

Improved static lung preservation with corticosteroids and hypothermia.

J Heart Transplant 1988; 7: 348-52

(257) Wu G, Zhang F, Salley RK, et al.

A systematic study of hypothermic lung preservation solutions: Euro-Collins solution.

Ann Thorac Surg 1996; 62: 356-62

(258) Feeley TW, Mihm FG, Downing TP, et al.

Hypothermic preservation of the heart and lungs with Collins solution: effect on cardiorespiratory function following heart-lung allotransplantation in dogs.

Ann Thorac Surg 1986; 41: 301-6

(259) DeLima NF, Binns OA, Buchanan SA, et al.

Euro-Collins solution exacebates lung injury in the setting of high-flow reperfusión.

J Thorac Cardiovasc Surg 1996; 112: 111-6

(260) Featherstone RL, Kelly FJ, Shattock MJ, et al.

Hypothermic preservation of isolated rat lungs in modified bicarbonate buffer, EuroCollins solution or St Thomas´ Hospital cardioplegic solution.

Eur J Cardiothorac Surg 1998; 14: 508-15

(261) Sacks SA, Petritsch PH, Kaufman JJ.

Canine kidney preservation using a new perfusate.

Lancet 1973; 1: 1024-8

(262) Kimblat PO, Sjöberg T, Massa G, et al.

High potassium contents in organ preservation solutions cause strong pulmonary vasoconstraction.

Ann Thorac Surg 1991; 52: 523-8

(263) Novick RJ, Menkis AH, McKenzie FN.

New trends in lung preservation: a collective review.

J Heart Lung Transplant 1992; 11: 377-92

(264) Jurmann MJ, Dammenhayn L, Schafers HJ, et al.

Prostacyclin as an additive to single crystalloid flush: improved pulmonary preservation in heart-lung transplantation.

Heart Transplant 1986; 5: 385

(265) Mulvin D, Jones K, Howard R, et al.

The effect of prostacyclin as a constituent of a preservation solution in protecting lungs from ischemic injury because of its vasodilatory properties.

Transplantation 1990; 49: 828-30

(266) Wahlers T, Schafers HJ, Cremer J, et al.

Organ preservation for heart-lung and lung transplantation.

Thorac Cardiovasc Surg 1991; 39: 344-8

(267) Novick JR, Reid KR, Denning L, et al.

Prolonged preservation of canine lung allografs: the role of prostaglandins.

Ann Thorac Surg 1991; 51: 853-9

(268) Aoe M, Trachiotis GD, Okabayashi K, et al.

Administration of prostaglandin E1 after lung transplantation improves early graft function.

Ann Thorac Surg 1994; 58: 655-61

(269) Kukkonen S, Heikkila LJ, Verkkala K, et al.

Prostaglandin E1 or prostacyclin in Euro-Collins solution fails to improve lung preservation.

Ann Thorac Surg 1995; 60: 1617-22

(270) Nawata S, Sugi K, Ueda K, et al.

Prostacyclin analog OP2507 prevents pulmonary arterial and airway constriction during lung preservation and reperfusion.

J Heart Lung Transplant 1996; 15: 470-4

(271) Sasaki S, Yasidu K, McCully JD, et al.

Does PGE1 attenuate potassium-induced vasoconstriction in initial pulmonary artery flush on lung preservation?

J Heart Lung Transplant 1999; 18: 139-42

(272) Bryan CL, Cohen DJ, Dew JA, et al.

Glutathione decreases the pulmonary reimplantation response in canine lung autotransplants.

Chest 1991; 100: 1694-702

(273) Basoglu A, Kocak H, Pac M, et al.

Oxygen free radical scavengers and reperfusion injury in dog lung preserved in cold ischemia.

Thorac Cardiovasc Surg 1992; 40: 144-7

(274) Bryan CL, Patefield AJ, Cohen DJ, et al.

Assessment of injury in transplanted and nontransplanted lungs after 6 h of cold storage with glutation.

J Appl Physiol 1994; 76: 1232-41

(275) Zhang F, Salley R, Wu G, et al.

Effect of glutathione on hypothermic lung preservation.

Acta Biomed Ateneo Parmense 1994; 65: 199-211

(276) Paull DE, Keagy BA, Kron EJ, et al.

Improved lung preservation using a dimethylthiourea flush.

J Surg Res 1989; 46: 333-8

(277) Egan TM, Ulickny KS Jr, Lambert CJ Jr, et al.

Effect of a free radical scavenger on cadaver lung trasnplantation.

Ann Thorac Surg 1993; 55: 1453-9

(278) Aiba M, Yokoyama Y, Snow TR, et al.

Effects of allopurinol pretreatment with pulmonary flush on lung preservation.

J Heart Lung Transplant 1992; 11: 1025-30

(279) Nezu K, Kushibe K, Tojo T, et al.

Protection against lipid peroxidation induced during preservation of lungs for transplantation.

J Heart Lung transplant 1994; 13: 998-1002

(280) Corcoran PC, Wang Y, Katz NM

Platelet activating factor antagonist enhances lung preservation.

J Surg Res 1992; 52: 615-20

(281) Okabayashi K, Aoe M, DeMeester SR, et al.

Pentoxifylline reduces lung allograft reperfusion injury.

Ann Thorac Surg 1994; 58: 50-6

(282) Soncul H, Kaptanoglu M, Oz E, et al.

The role of selenium added to pulmonary preservation solutions in isolated guinea pig lungs.

J Thorac Cardiovasc Surg 1994; 108: 922-7

(283) Uthoff K, Zehr KJ, Lee PC, et al.

Neutrophil modulation results in improved pulmonary function after 12 and 24 hours of preservation.

Ann Thorac Surg 1995; 59: 7-13

(284) Buchanan SA Mauney MC, DeLima NF, et al.
Enhanced isolated lung function after ischemia with anti-intercellular adhesión molecule antibody.
J Thorac Cardiovasc Surg 1996; 111: 941-7

(285) Nakamura T, Hirata T, Fukuse T, et al.
Dibutyryl cyclic adenosine monophosphate attenuates lung injury caused by cold preservation and ischemia-reperfusion.
J Thorac Cardiovasc Surg 1997; 114: 635-42

(286) King RC, Laubach VE, Kanithanon RC, et al.
Preservation with 8-bromo-cyclic GMP improves pulmonary function after prolonged ischemia.
Ann Thorac Surg 1998; 66: 1732-8

(287) Barr ML, Carey JN, Nishanian GP, et al.
Addition of mast cell stabilizing compound to organ preservation solutions decreases lung reperfusion injury.
J Thorac Cardiovasc Surg 1998; 115: 631-6

(288) Roberts RS, Nishanian GP, Carey JN, et al.
Addition of aprotinin to organ preservation solutions decreases lung reperfusion injury.
Ann Thorac Surg 1998; 66: 225-30

(289) Mühlbacher F, Langer F, Mittermayer C.

Preservation solutions for transplantation.

Transplantation Proceedings 1999; 31: 2069-70

(290) Hopkinson DN, Odom NJ, Bridgewater BJ, et al.

University of Wisconsin solution for lung graft preservation: which components are important?

J Heart Lung Transplant 1994; 13: 990-7

(291) Unruh HW.

Vascular and interstitial effect of University of Wisconsin solution on canine lung.

Ann Thorac Surg 1992; 54: 1168-71

(292) Labow RS, Meek E, Waghray G.

Use of the University of Wisconsin solution for the preservation of cell organelle activities in rat heart and lungs.

J Heart Lung transplant 1995; 14 66-74

(293) Hirt SW, Wahlers T, Jurmann MJ, et al.

University of Wisconsin versus modified Euro-Collins solution for lung preservation.

Ann Thorac Surg 1992; 53: 74-9

(294) Aeba R, Keenan RJ, Hardesty RL, et al.
University of Wisconsin solution for pulmonary preservation in a rat transplant model.
Ann Thorac Surg 1992; 53: 240-5

(295) Bresticker MA, LoCicero J 3rd, Oba J, et al.
Successful extended lung preservation with UW solution.
Transplantation 1992; 54: 780-4

(296) Kawahara K, Itoyanagi N, Takahashi T, et al.
Transplantation of canine lung alografts preserved in UW solution for 24 hours.
Transplantation 1993; 55: 15-8

(297) Lin PH, Hsieh MJ, Cheng KS, et al.
University of Wisconsin solution extends lung preservation after prostaglandin E1 infusion.
Chest 1994; 105: 255-61

(298) Hopkinson DN, Odom NJ, Bridgewater BJ, et al.
Lung graft preservation. Comparison of phosphate-buffered sucrose, modified Euro-Collins, and University of Wisconsin solutions.
Transplantation 1994; 58: 763-8

(299) Omote Y, Ikeda K, Yamazaki K, et al.

The superiority of UW solution for maintaining ATP concentrations during pulmonary preservation.

Surg Today 1994; 24: 616-20

(300) D´Armini AM, Roberts CS, Lemasters JJ, et al.

Lung retrieval from cadaver donors with non-beating hearts: optimal preservation solution.

J Heart Lung Transplant 1996; 15: 496-505

(301) al-Dossari GA, Shumway SJ.

Comparative study of solutions for pulmonary preservation using an isolated rabbit lung model.

J Surg Res 1998; 75: 187-91

(302) Sasaki S, Yasuda K, LoCicero J 3rd.

Reliable 18-hour lung preservation with University of Wisconsin solution. An ex vivo rat model with a pulsatile perfusion system.

Jpn J Thorac Cardiovasc surg 1999; 47: 99-103

(303) Hardesty RL, Aeba R, Armitage JM, et al.

A clinical trial of University of Wisconsin solution for pulmonary preservation.

J Thorac Cardiovasc Surg 1993; 105: 660-6

(304) Chiang CH, Hsu K, Yan HC, et al.
PGE1, dexamethasone, U-74389G, or Bt2-cAMP as an additive to promote protection by UW solution in I/R injury.
J Appl Physiol 1997 83: 583-90

(305) Chiang CH, Wu K, Yu CP, et al.
Hypothermia and prostaglandin E(1) produce synergistic attenuation of ischemia-reperfusion lung injury.
Am J Repir Crit Care Med 1999; 160: 1319-23

(306) Sasaki S, Yasuda K, McCully JD, et al.
Calcium channel blocker enhaces lung preservation.
J Heart Lung Transplant 1999; 18: 127-32

(307) Yamasaki N, Nagayasu T, Yamamoto S, et al.
Effect of gammahydroxybutyrate on donor lung function after long-term hypothermic storage using low potassium University of Wisconsin solution.
Transplant Proc 1996; 28: 1893-4

(308) Yamasaki N, Oka T, Yamamoto S, et al.
Twenty-four-hour preservation in gamma-hydroxybutyrate improves lung function in a canine single-lung allotransplantation.
Transplantation 1999; 27: 529-33

(309) Lopukhin SY, Onsager DR, Conhaim RL, et al.
University of Wisconsin solution with butanedione monoxime and calcium improves rat lung preservation.
Ann Thorac Surg 1999; 67: 203-7

(310) Aeba R, Killinger WA, Keenan RJ, et al.
Lazaroid U74500A as an additive to University of Wisconsin solution for pulmonary grafts in the rat transplant model.
J Thorac Cardiovasc Surg 1992; 104: 1333-9

(311) Sasaki S, Alessandrini F, Lodi R, et al.
Improvement of pulmonary graft after storage for twenty-four hours by in vivo administration of lazaroid U74389G: functional and morphological analysis.
J Heart Lung Transplant 1996; 15: 35-42

(312) Tanoue Y, Morita S, Ochiai Y, et al.
Successful twenty-four-hour canine lung preservation with lazaroid U74500A.
J Heart Lung Transplant 1996; 15: 43-50

(313) Kuwaki K, Komatsu K, Sohma H, et al.
Lazaroid U74389G ameliorates ischemia-reperfusion injury in the rat lung transplant model.
Ann Thorac Cardiovasc Surg 1999; 5: 11-7

(314) Baker CJ, Longoria J, Gade PV, et al.

Addition of a water-soluble alpha-tocopherol analogue to University of Wisconsin solution improves endothelial viability and decreases lung reperfusion injury.

J Surg Res 1999; 86: 145-9

(315) Hachida M, Morton DL.

A new solution (UCLA formula) for lung preservation.

J Thorac Cardiovasc Surg 1989; 97: 513-20

(316) Hachida M, Morton DL.

Lung function after prolonged lung preservation.

J Thorac Cardiovasc Surg 1989; 97: 911-9

(317) Keshavjee SH, Yamakazi F, Cardoso P, et al.

A method for safe twelfe-hour pulmonary preservation.

J Thorac Cardiovasc Surg 1989; 98: 529-34

(318) Steen S, Sjöberg T, Massa G, et al.

Safe pulmonary preservation for 12 hours with low-potassium-dextran solution.

Ann Thorac Surg 1993; 55: 434-40

(319) Spaggiari L, Bobbio P.

Dextran 40 at 2% versus 5% in low-potassium solutions: which is best?

Ann Thorac Surg 1994; 58: 1784-6

(320) Moriyasu K, McKeown PP, Novitzky D, et al.
Preservation of competent rabbit lung function after 30 hours of storage with a low-potassium dextran solution.
J Heart Lung Transplant 1995; 14: 75-9

(321) Keshavjee SH, Yamazaki F, Yokomise H, et al.
The role of dextran 40 and potassium in extended hypothermic lung preservation for transplantation.
J Thorac Cardiovasc Surg 1992; 103: 314-25

(322) Sundaresan S, Lima O, Date H, et al.
Lung preservation with low-potassium dextran flush in a primate bilateral transplant model.
Ann Thorac Surg 1993; 56: 1129-35

(323) Keshavjee SH, McRitchie DI, Vittorini T, et al.
Improved lung preservation with dextran 40 is not mediated by a superoxide radical scavenging mechanism.
J Thorac cardiovasc Surg 1992; 103: 326-8

(324) Fukuse T, Albes JM, Wilhelm A, et al.
Influence of dextrans on lung preservation: is the molecular weight important?
J Heart Lung Transplant 1996; 15: 903-10

(325) Puskas JD, Cardoso PF, Mayer E, et al.
Equivalent eighteen-hour lung preservation with low-potassium dextran or Euro-Collins solution after prostaglandin E1 infusion.
J Thorac Cardiovasc Surg 1992; 104: 83-9

(326) Steen S, Kimblad PO, Sjöberg T, et al.
Safe lung preservation for twenty-four hours with perfadex.
Ann Thorac Surg 1994; 57: 450-7

(327) King RC, Binns OA, Kaithanon RC, et al.
Acellular low-potassium dextran preserves pulmonary function after 48 hours of ischemia.
Ann Thorac Surg 1997; 64: 795-800

(328) Muller C, Furst H, Reichenspurner H, et al.
Lung procurement by low-potassium dextran and the effect on preservation injury. Munich Lung Transplant Group.
Transplantation 1999; 68: 1139-43

(329) Ueno T, Yokomise H, Oka T, et al.
The effect of PGE1 and temperature on lung function following preservation.
Transplantation 1991; 52: 626-30

(330) Yamazaki F, Yokomise H, Keshavjee SH, et al.
The superiority of an extracellular fluid solution over Euro-Collins solution for pulmonary preservation.
Transplantation 1990; 49: 690-4

(331) Spaggiari L, Cabognani P, Rusca M, et al.
Some questions about Eurocollins solution used for lung preservation.
J Cardiovasc Surg (Torino) 1994; 35(Suppl I): 149-52

(332) DeLima NF, Binns OA, Buchanan SA, et al.
Low-potassium solution for lung preservation in the setting of high-flow reperfusión.
Ann Thorac Surg 1996; 61: 973-6

(333) Bando T, Albes JM, Fehrenbach H, et al.
Influence of the potassium concentration on functional and structural preservation of the lung: where is the optimum?
J Heart lung transplant 1998; 17: 715-24

(334) Sasaki S, McCully JD, Alessandrini F, et al.
Impact of initial flush potassium concentration on the adequacy of lung preservation.
J Thorac Cardiovasc Surg 1995; 109: 1090-5

(335) Ono K, Sone Y, Irie T, et al.
Does potassium ion concentration affect lung preservation?
Surg Today 1998; 28: 192-6

(336) Fukuse T, Albes JM, Brandes H, et al.
Comparison of low potassium Euro-Collins solution and standard Euro-Collins solution in an extracorporeal rat heart-lung model.
Eur J Cardiothorac Surg 1996; 10: 621-7

(337) Oka T, puskas JD, Mayer E, et al.
Low-potassium UW solution for lung preservation. Comparison with regular UW, LPD, and Euro-Collins solutions.
Transplantation 1991; 52: 984-8

(338) Miyoshi S, Shimokawa S, Schreinemakers H, et al.
Comparison of the University of Wisconsin preservation solution and other crystalloid perfusates in a 30-hour rabbit lung preservation model.
J Thorac Cardiovasc Surg 1992; 103: 27-32

(339) Albes JM, Brandes H, Heinemann MK, et al.
Potassium-reduced lung preservation solutions: a screening study.
Eur Surg Res 1997; 29: 327-38

(340) Hausen B, Beuke M, Schroeder F, et al.
In vivo measurement of lung preservation solution efficacy: comparison of LPD, UW, EC, and low K^+-EC following short and extended ischemia.
Eur J Cardiothorac Surg 1997; 12: 771-9

(341) Mulvin DW, Jones DK, Howard RB, et al.
Extracellular flush solution that contains blood, mannitol, albumin, and prostacyclin protects rat lungs from six hours of ischemia.
J Heart Lung Transplant 1991; 10:986-9

(342) Xiong L, Mazmanian M, Chapelier AR, et al.
Lung preservation with Euro-Collins, University of Wisconsin, Wallwork, and low-Potassium-Dextran solutions.
Ann Thorac Surg 1994; 58: 845-50

(343) Binns OA, DeLima NF, Buchanan SA, et al.
Both blood and crystalloid-based extracellular solutions are superior to intracellular solutions for lung preservation.
J Thorac Cardiovasc Surg 1996; 112: 1515-21

(344) Hirata T, Yokomise H, Fukuse T, et al.
Effects of trehalose in preservation of canine lung for transplants.
Thorac Cardiovasc Surg 1993; 41: 59-63

(345) Hirata T, Yokomise H, Fukuse T, et al.
Successful 12-hour lung preservation with trehalose.
Trasplant Proc 1993; 25: 1597-8

(346) Hirata T, Fukuse T, Liu CJ, et al.

Effects of trehalosa in canine lung preservation.

Surgery 1994; 115: 102-7

(347) Bando T, Kosaka S, Liu C, et al.

Effects of newly developed solutions containing trehalose on twenty-hour canine lung preservation.

J Thorac Cardiovasc Surg 1994; 108: 98-2

(348) Bando T, Liu CJ, Kosaka S, et al.

Twenty-hour canine lung preservation using newly developed solutions containing trehalose.

Transplant Proc 1994; 26: 871-2

(349) Liu CJ, Bando T, Hirai T, et al.

Effects of ET-Kyoto solution on 20-hour canine lung preservation.

Transplant Proc 1994; 26: 876-7

(350) Liu CJ, Bando T, Hirai T, et al.

Improved 20-hour canine lung preservation with a new solution: ET-Kyoto solution.

Eur J Cardiothorac Surg 1995; 9: 548-52

(351) Hirata T, Fukuse T, Ueda Y, et al.

Effect of new ET-Kyoto solution on 17-hour lung preservation in isolated rat lungs.

Transplant Proc 1996; 28: 1922-3

(352) Kajiwara N, Taguchi M, Saito H, et al.

Evaluation of a new solution containing trehalose for twenty-hour canine lung preservation.

Transpl Int 1996; 9: 194-200

(353) Wada H, Fukuse T, Nakamura T, et al.

ET-Kyoto solution for 48-hour canine lung preservation.

Ann Thorac Surg 1996; 61: 963-8

(354) Kosaka S, Bando T, Liu CJ, et al.

Ultraestructural changes in canine lung preserved in newly developed solutions.

J Surg Res 1996; 63: 467-73

(355) Hopkinson DN, Odom NJ, Bridgewater BJ, et al.

Comparison of saccharides as osmotic impermeants during hypothermic lung graft preservation.

Transplantation 1996; 61: 1667-71

(356) Fukuse T, Hirata T, Nakamura M, et al.

Comparison of disaccharides in hypothermic pulmonary preservation: is efficacy simply related to the molecular weight?

Transplant Proc 1998; 30: 3380-1

(357) Crowe JH, Crowe LM.

Preservation of membranes in anhydrobiotic organism: the role of trehalose.

Science 1984; 223: 701-3

(358) Crowe LM, Crowe JH, Rudolph A, et al.

Preservation of freeze-dried liposomes by trehalose.

Arch Biochem Biophys 1985; 242: 240-7

(359) Liu CJ, Ueda M, Kosaka S, et al.

A newly developed solution enhances thirty-hour preservation in a canine lung transplantation model.

J Thorac Cardiovasc Surg 1996; 112: 569-76

(360) Wada H, Liu CJ, Hirata T, et al.

Effective 30-hour preservation of canine lungs with modified ET-Kyoto solution.

Ann Thorac Surg 1996; 61: 1099-105

(361) Wada H, Liu CJ, Yokomise H, et al.

Newly developed preservation solution for the lung: 30-hour preservation with the new ET-Kyoto solution.

Transplant Proc 1996; 28: 1178-80

(362) Liu CJ, Kosaka S, Ueda M, et al.
New ET-Kyoto solution containing N-acetylcysteine, nitroglycerin, and dibutyryl cyclic AMP provides reliable 30-hour canine lung preservation.
Tranplant Proc 1996; 28: 1871-3

(363) Fukuse T, Hirata T, Ueda M, et al.
Effects of Euro-Collins, University of Wisconsin, and new extracellular-type trehalase-containing Kyoto solutions in an ex vivo rat lung preservation model.
Transplantation 1996; 62: 1212-7

(364) Kosaka S, Bando T, Liu CJ, et al.
Ultrastructural changes of the pulmonary vasculature in canine lungs preserved for 20 hours in newly developed solutions.
Transplant Proc 1996; 28: 1839-40

(365) Palmer, RMJ, Ferrige AG, Moncada S.
Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor.
Nature 1987; 327: 524-6

(366) Naka Y, Chowdhury NC, Oz MC, et al.
Nitroglycerin maintains graft vascular homeostasis and enhances preservation in an orthotopic rat lung transplant model.
J Thorac Cardiovasc Surg 1995; 109: 206-10

(367) Kayano K, Toda K, Naka Y, et al.

Superior protection in orthotopic rat lung transplantation with cyclic adenosine monophosphate and nitroglycerin-containing preservation solution.

J Thorac Cardiovasc Surg 1999; 135-44

(368) Nakamura T, Hirata T, Fukuse T, et al.

Dibutyryl cyclic adenosine monophosphate attenuates lung injury caused by cold preservation and ischemia-reperfusion.

J Thorac Cardiovasc Surg 1997; 114: 635-42

(369) Hilliger S, Schmid RA, Sandera P, et al *(con LPD)*

8-Br-cGMP is superior to prostaglandin E1 for lung preservation.

Ann Thorac Surg 1999; 68:1138-43

(370) Bretschneider HJ.

Myocardial protection.

Thorac Cardiovasc Surg 1980; 28: 295-302

(371) Reignier J, Mazmanian M, Chapelier A, et al.

Evaluation of a new preservation solution: Celsior in the isolated rat lung. Paris-Sud University Lung Transplantation Group.

J Heart Lung Transplant 1995; 14: 601-4

(372) Barr ML, Nishanian GP, Sakamaki Y, et al.
A new organ preservation solution, Celsior, is superior to Euro-Collins and University of Wisconsin solutions in decreasing lung perfusion injury.
Transplant Proc 1997; 29: 1357-8

(373) Roberts RF, Nishanian GP, Carey JN, et al.
A comparison of the new preservation solution Celsior to Euro-Collins and University of Wisconsin solutions in lung reperfusion injury.
Transplantation 1999; 67: 152-5

(374) Wittwer T, Wahlers T, Cornelius JF, et al.
Celsior solution for improvement of currently used clinical standards of lung preservation in an ex vivo rat model.
Eur J Cardiothorac Surg 1999; 15: 667-71

(375) Xiong L, Legagneux J, Wassef M, et al.
Protective effects of Celsior in lung transplantation.
J Heart Lung Transplant 1999; 18: 320-7

(376) Fehrenbach A, Wittwer T, Cornelius J et al.
Improvement of rat lung structure and function after preservation with Celsior.
J Surg Res 1999; 82: 285-93

(377) Shiraishi T, Igisu H, Shirakusa T.

Effects of pH and temperature on lung preservation: a study with an isolated rat lung reperfusion model.

Ann Thorac Surg 1994; 57: 639-43

(378) Hiramatsu Y, Muraoka R, Chiba Y, et al.

Influence of pH of preservation solution on lung viability.

Ann Thorac Surg 1994; 58: 1083-6

(379) Moore TM, Khimenko PL, Taylor AE

Restoration of normal pH triggers ischemia-reperfusion injury by Na+/H+ exchange activation.

Am J Physiol 1995; 269: H1501-5

(380) Shibata K, Cregg N, Engelberts D, et al.

Hypercapnic acidosis may attenuate acute lung injury by inhibition of endogenous xanthine oxidase.

Am J Respir Crit Care Med 1998; 158: 1578-84

(381) Laffey JG, Engelberts D, Kavanagh BP.

Buffering hypercapnic acidosis worsens acute lung injury.

Am J Respir Crit Care Med 2000; 161: 141-6

(382) Nakamoto K, Maeda M, Taniguchi K, et al.

A study on optimal temperature for isolated lung preservation.

Ann Thorac Surg 1992; 53: 101-8

(383) Date H, Lima O, Matsumura A, et al.

In a canine model, lung preservation at 10º C is superior to that at 4º C.

J Thorac Cardiovasc Surg 1992; 103: 773-80

(384) Mayer E, Puskas JD, Cardoso Pf et al.

Reliable eighteen-hour lung preservation at 4 degrees and 10 degrees C by pulmonary artery flush after high dose prostaglandin E1 administration.

J Thorac Cardiovasc Surg 1992; 103: 1136-42

(385) Albes JM, Fischer F, Bando T, et al.

Influence of the perfusate temperature on lung preservation: is there an optimum?

Eur Surg Res 1997; 29: 5-11

(386) Wang LS, Nakamoto K, Hsieh CM, et al.

Influence of temperature of flushing solution on lung preservation.

Ann Thorac Surg 1993; 55: 711-5

(387) Wedwe W, Harper B, Shimokawa S, et al.

Influence of intraalveolar oxygen concentration on lung preservation in a rabbit model.

J Thorac Cardiovasc Surg 1991; 101: 1037-43

(388) Akashi A, Nakahara K, Kamiike W, et al.
Attenuation of warm ischemic imjury of rat lung by inflation with room air. Assessment of cellular components and the surfactant in the bronchoalveolar lavage fluid in relation to changes in cellular adenosina triphosphate.
Transplantation 1993; 55: 24-30

(389) DeLeyn PR, Lerut TE, Schreinemakers HH, et al.
Effect of inflation on adenosine triphosphate catabolism and lactate production during normothermic lung ischemia.
Ann Thorac Surg 1993; 55: 1073-8

(390) Hausen B, Ramsamooj R, Hewitt CW, et al.
The importance of static lung inflation during organ storage: the impact of varying ischemic intervals in a double lung rat transplantation model.
Transplantation 1996; 62: 1720-5

(391) Wagner FM, Jamieson SW, Fung J, et al.
A new concept for successful long-term pulmonary preservation in a dog model.
Transplantation 1995; 59: 1530-6

(392) Watanabe A, Kawaharada N, Kusajima K, et al.
Influence of oxygen in inflaton gas during lung ischemia on ischemia-reperfusion injury.
J Thorac Cardiovasc Surg 1997; 114: 332-8

(393) Pearse DB, Wagner EM, Permutt S.

Effect of ventilation on vascular permeability and cyclic nucleotide concentration in ischemic sheep lungs.

J Appl Physiol 1999; 86: 123-32

(394) Fukuse T, Hirata T, Nakamura, T, et al.

Influence of deflated and anaerobic conditions during cold storage on rat lungs.

Am J Respir Crit Care Med 1999; 160: 621-7

(395) Schutte H, Hermle G, Seeger W, et al.

Vascular distension and continued ventilation are protective in lung ischemia/reperfusion.

Am J Respir Crit Care Med 1998; 157: 171-7

(396) Anuda M, Hasegawa S, Shiraishi T, et al.

Effects of inflation volume during lung preservation on pulmonary capillary permeability.

J Thorac Cardiovasc Surg 1996; 112: 85-93

(397) Aoe M, Okabayashi K, Cooper JD, et al.

Hyperinflation of canine lung allografts during storage increases reperfusion pulmonary edema.

J Thorac Cardiovasc Surg 1996; 112: 94-102

(398) Murry CE, Jennings RB, Reimer KA.

Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium.

Circulation 1986; 74: 1124-36

(399) Sumeray MS, Yellon DM.

Ischaemic preconditioning.

En Grace PA, Mathie RT. Editores. Ischaemia-Reperfusion Injury. Blackwell Science, Oxford 1999: 328-43

(400) Du ZY, Hicks M, Winlaw D, et al.

Ischemic preconditioning enhances donor lung preservation in the rat.

J Heart Lung Transplant 1996; 15: 1258-67

(401) Hawaleshka A, Jacobsohn E.

Ischaemic preconditioning: mechanisms and potential clinical applications.

Can J Anaesth 1998; 45: 670-82

(402) Soncul H, Oz E, Kalaycioglu S.

Role of ischemic preconditioning on ischemia-reperfusion injury of the lung.

Chest 1999; 115: 1672-7

(403) Gasparri RI, Jannis NC, Flameng WJ, et al.
Ischemic preconditioning enhances donor lung preservation in the rabbit.
Eur J Cardiothorac Surg 1999; 16: 639-46

(404) Li G, Chen S, Lu E, et al.
Protective effects of ischemic preconditioning on lung ischemia reperfusion injury: an ex-vivo rabbit study.
Thorac Cardiovasc Surg 1999; 47: 38-41

(405) Pelham HRB.
Speculations on the functions of the major heat shock and glucose-regulated proteins.
Cell 1986; 46: 959-61

(406) Chen G, Kelly C, Stokes K, et al
Induction of heat shock protein 72kDa expression is associated with attenuation of ischaemia-reperfusion induced microvascular injury.
J Surg Res 1997; 69: 435-9

(407) Javadpour M, Kelly CJ, Chen G, et al.
Thermotolerance induces heat shock protein 72 expression and protects against ischaemia-reperfusion-induced lung injury.
Br J Surg 1998; 85: 943-6

(408) Hiratsuka M, Yano M, Mora BN, et al.

Heat shock pretreatment protects pulmonary isografts from subsequent ischemia-reperfusion injury.

J Heart Lung Transplant 1998; 17: 1238-46

(409) Hiratsuka M, Mora BN, Yano M, et al.

Gene transfer of heat shock protein 70 protects lung grafts from ischemia-reperfusion injury.

Ann Thorac Surg 1999; 67: 1421-7

(410) Ulicny KS Jr, Egan TM, Lambert CJ Jr, et al.

Cadaver lung donor: effect of preharvest ventilation on graft function.

Ann Thorac Surg 1993; 55: 1185-91

(411) Van Raemdonck DE, Jannis NC, Rega FR, et al.

Extended preservation of ischemic pulmonary graft by postmortem expansion.

Ann Thorac Surg 1997; 64:801-8

(412) Hausen B, Muller P, Bahra M, et al.

Donor pretreatment with intravenous prostacyclin versus inhaled nitric oxide in experimental lung transplantation.

Transplantation 1996; 62: 1714-9

(413) Vainikka T, Heikkila LJ, Kukkonen S, et al.
Donor lung pretreatment with prostaglandin E(1) does not improve lung graft preservation.
Eur Surg Res 1999; 31: 429-36

(414) Higgins RS, Letsou GV, Sánchez JA, et al.
Improved ultrastructural lung preservation with prostaglandin E1 as donor pre-treatment in a primate model of heart-lung transplantation.
J Thorac Cardiovasc Surg 1993; 105: 965-71

(415) Qayumi AK, English JE, Duncan S, et al.
Extended lung preservation with platelet-activating factor-antagonist TCV-309 in combination with prostaglandin E1.
J Heart Lung Transplant 1997; 16: 946-55

(416) Chiang CH, Wu K, Yu CP, et al.
Hypothermia and prostaglandin E(1) produce synergistic attenuation of ischemia-reperfusion lung injury.
Am J Respir Crit Care Med 1999; 160: 1319-23

(417) Bhabra MS, Hopkinson DN, Shaw TE, et el.
Relative importance of prostaglandin/cyclic adenosine monophosphate and nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate pathways in lung preservation.
Ann Thorac Surg 1996; 62: 1494-9

(418) Murakami S, Bacha EA, Herve P, et al.

Prevention of reperfusión injury by inhaled nitric oxide in lungs harvested from non-beating donors. Paris-Sud University Lung Transplantation Group.

Ann Thorac Surg 1996; 1632-38

(419) Murakami S, Bacha EA, Herve P, et al.

Inhaled nitric oxide and pentoxifylline in rat lung transplantation from non-heart-beating donors. The Paris-Sud University Lung Transplantation Group.

J Thorac Cardiovasc Surg 1997; 113: 821-9

(420) Yamashita M, Schmid RA, Ando K, et al.

Nitroprusside ameliorates lung allograft reperfusion injury.

Ann Thorac Surg 1996; 62:791-7

(421) Fujino S, Nagahiro I, Yamashita M et al.

Preharvest nitroprusside flush improves posttransplantation lung function.

J Heart Lung Transplant 1997; 16: 1073-80

(422) Jones DR, Hoffmann SC, Sellars M, et al.

Reduced ischemia-reperfusion injury with isoprotrenol in non-heart-beating donor lungs.

J Surg Res 1997; 69: 385-92

(423) Hausen B, Bahra M, Mueller P, et al.
Donor pretreatment with ambroxol or dexamethasone fails to ameliorate reperfusión injury in experimental lung transplantation.
Transpl Int 1998; 11: 186-94

(424) Ide S, Kawahara K, Takahashi T, et al.
Donor administration of PAF antagonist (TCV-309) enhances lung preservation.
Transplant Proc 1995; 27: 570-3

(425) Qayumi KA, English JC, Feeley EJ, et al.
A new plateket-activating factor antagonist (CV-6209) in preservation of heart and lung for transplantation.
Cardiovasc Drugs Ther 1997; 11: 777-85

(426) Stammberger U, Carboni GL, Hillinger S, et al.
Combined treatment with endothelin and PAF-antagonist reduces posttransplant lung ischemia/reperfusion injury.
J Heart lung Transplant 1999; 18: 862-8

(427) Hillinger S, Schmid RA, Stammberger U, et al.
Lazaroid donor pre-treatment does not improve lung allograft reperfusion injury in swine.
Transplant Proc 1998; 30: 3382-4

(428) Hillinger S, Schmid RA, Stammberger U, et al.
Donor and recipient treatment with the Lazaroid U-74006F do not improve post-transplant lung function in the swine.
Eur J Cardiothrac Surg 1999; 15: 475-80

(429) Hausen B, Mueller P, Bahra M, et al.
Donor treatment with the lazaroid U74389G reduces ischemia-reperfusion injury in a rat lung transplant model.
Ann Thorac Surg 1997; 64: 814-20

(430) Chien S, Oeltgen PR, Diana JN, et al.
Two-day preservation of major organs with autoperfusion multiorgan preparaton and hibernation induction trigger. A preliminary report.
J Thorac Cardiovasc Surg 1991; 102: 224-34

(431) Wu G, Zhang F, Salley RK, et al.
Delta Opioid extends hypothermic preservation time of the lung.
J Thorac Cardiovasc Surg 1996; 111: 259-67

(432) Oeltgen PR, Horton ND, Bolling SF, et al.
Extended lung preservation with the use of hibernation trigger factors.
Ann Thorac Surg 1996; 61: 1488-93

(433) Novick RJ, MacDonald J, Veldhuizen RA, et al.
Evaluation of surfactant treatment strategies after prologed graft storage in lung transplantation.
Am J Respir Crit Care Med 1996; 154: 98-104

(434) Hausen B, Rohde R, Hewitt CW, et al.
Exogenous surfactant treatment before and after sixteen hours of ischemia in experimental lung transplantation.
J Thorac Cardiovasc Surg 1997; 113: 1050-8

(435) Hohlfeld JM, Struber M, Ahlf K, et al.
Exogenous surfactant improves survival and surfactant function in ischemia-reperfusion injury in minipigs.
Eur Repir 1999; 13: 1037-43

(436) Novick RJ, Veldhuizen RA, Possmayer F, et al.
Exogenous surfactant therapy in thirty-eight hour lung graft preservation for transplantation.
J Thorac Cardiovasc Surg 1994; 108: 259-68

(437) Buchanan SA, Mauney MC, Parekh VI, et al.
Intratracheal surfactant administration preserves airway compliance during lung reperfusión.
Ann Thorac Surg 1996; 62: 1617-21

(438) Erasmus ME, Petersen AH, Hofstede G, et al.
Surfactant treatment before reperfusión improves the immediate function of lung transplant in rats.
Am J respir Crit Care Med 1996; 153: 665-70

(439) Erasmus ME, Hofstede GJ, Petersen AH, et al.
Effects of early surfactant treatment persisting for one week after lung transplantation in rats.
Am J Respir Crit Care Med 1997; 156: 567-72

(440) Holhfeld JM, Struber M, Ahlf K, et al.
Exogenous surfactant improves survival and surfactant function in ischemia-reperfusion injury in minipigs.
Eur Respir J 1999; 13: 1037-43

(441) Nonaka M, Kadokura M, Takaba T.
Effects of initial low flow reperfusión and surfactant administration on the viability of reperfused cadaveric rat lungs.
Lung 1999, 177: 37-43

(442) Struber M, Hirt SW, Cremer J, et al.
Surfactant replacement in reperfusion injury after clinical lung transplantation.
Intensive Care Med 1999; 25: 862-4

(443) Pierre AF, DeCampos KI, Liu M, et al.

Rapid reperfusión causes stress failure in ischemic rat lungs.

J Thorac Cardiovasc Surg 1998; 116: 932-42

(444) Bhabra MS, Hopkinson DN, Shaw TE, et al.

Critical importance of the first 10 minutes of lung graft reperfusión after hypothermic storage.

Ann Thorac Surg 1996; 61: 1631-5

(445) Puskas JD, Oka T, Mayer E, et al.

Hemodilution reduces early reperfusión injury in an ex vivo rabbit lung preservation model.

Ann Thorac Surg 1994; 57:731-5

(446) Moriyasu K, McKeown PP, Novitzky D, et al.

Beneficial effect of initial warm crystalloid reperfusion in 6-hour lung preservation.

J Heart Lung Transplant 1995; 14: 699-705

(447) Shibuya K, Edagawa M, Takenaka H, et al.

Protection of isolated lung from reperfusion injuries by rinsing with high colloidal osmotic solution with deferoaxmine.

Transplantation 1996; 62: 179-85

(448) Serrick CJ, Jamjoum A, Reis D, et al.
Amelioration of pulmonary allograft injury by administering a second rinse solution.
J Thorac Cardiovasc Surg 1996; 112: 1010-6

(449) Breda MA, Hall TS, Stuart RS, et al.
Twenty-four hour lung preservation by hypothermia and leukocyte depletion.
J Heart Transplant 1985; 4: 325-9

(450) Schneuwly OD, Licker M, Pastor CM, et al.
Beneficial effects of leukocyte-depleted blood and low-potassium dextran solutions on microvascular permeability in preserved porcine lung.
Am J respir Crit Care Med 1999; 160: 689-97

(451) DeCampos KN, Keshavjee S, Liu M, et al.
Prevention of rapid reperfusion-induced lung injury with prostaglandin E1 during the initial period of reperfusion.
J Heart Lung Transplant 1998; 17: 1121-8

(452) Clark SC, Sudarshan C, Khanna R, et al.
Controlled reperfusion and pentoxifylline modulate reperfusion injury after single lung transplantation.
J Thorac Cardiovasc Surg 1998; 115: 1335-41

(453) Hopkinson DN, Bhabra Ms, Odom NJ, et al.
Controlled pressure reperfusion of rat pulmonary grafts yields improved function after twenty-four-hours cold storage in University of Wisconsin solution.
J Heart Lung Transplant 1996; 15: 283-90

(454) Halldorsson AO, Kronon M, Allen BS, et al.
Controlled reperfusion prevents pulmonary injury after 24 hours of lung preservation.
Ann Thorac Surg 1998; 66: 877-84

(455) Halldorsson AO, Kronon M, Allen BS, et al.
Controlled reperfusion after lung ischemia: implications for improved function after lung transplantation.
J Thorac Cardiovasc Surg 1998; 115: 415-24

(456) Sakamoto T, Yamashita C, Okada M.
Efficacy of initial controlled perfusion pressure for ischemia-reperfusion injury in a 24-hour preserved lung.
Ann Thorac Cardiovasc Surg 1999; 5:21-6

(457) Barbotin-Larrieu F, Mazmanian M, Baudet B, et al.
Prevention of ischemia-reperfusion injury by inhaled nitric oxide in neonatal piglets.
J Appl Physiol 1996; 80: 782-8

(458) Okabayashi K, Triantafillou AN, Yamashita M, et al.
Inhaled nitric oxide improves lung allograft function after prolonged storage.
J Thorac Cardiovasc Surg 1996; 112: 293-9

(459) Bacha EA, Herve P, Murakami S, et al.
Lasting beneficial effect of short-term inhaled nitric oxide on graft function after lung transplantation. Paris-Sud University Lung Transplantation Group.
J Thorac Cardiovasc Surg 1996; 112:590-8

(460) Okabayashi K, Triantafillou AN, Yamashita M, et al.
Inhaled nitric oxide improves lung allograft function after prolonged storage.
J Thorac Cardiovasc Surg 1996; 112: 293-9

(461) Lindberg L, Kimblat PO, Sjoberg T, et al.
Inhaled nitric oxide reveals and attenuates endothelial disfunction after lung transplantation.
Ann Thorac Surg 1996; 1639-43

(462) Moore TM, Khimenko PL, Wilson PS, et al.
Role of nitric oxide in lung ischemia and reperfusion injury.
Am Physiol 1996; 271: H1970-7

(463) Murakami S, Bacha EA, Mazmanian GM, et al.
Effects of various timings and concentrations of inhaled nitric oxide in lung ischemia-reperfusion. Paris-Sud University Lung Transplantation Group.
Am J Respir Crit Care Med 1997; 156: 454-8

(464) Murakami S, Bacha EA, Herve P, et al.
Inhaled nitric oxide and pentoxifylline in rat lung transplantation from non-heart-beating donors. The Pari-Sud university lung Transplantation Group.
J Thorac Cardiovasc Surg 1997; 113: 821-9

(465) Fukahara K, Murakami A, Watanabe G, et al.
Inhaled nitric oxide after lung ischemia reperfusión; effect on hemodynamics and oxygen free radical scavenger system.
Eur J Cardiothorac Surg 1997; 11: 343-9

(466) Chetham PM, Sefton WD, Bridges JP, et al.
Inhaled nitric oxide pre-treatment but not posttreatment attenuates ischemia-reperfusion –induced microvascular leak.
Anesthesiology 1997; 86: 895-902

(467) Bhabra MS, Hopkinson DN, Shaw TE, et al.
Low-dose nitric oxide inhalation during intial reperfusión enhances rat lung graft function.
Ann Thorac Surg 1997; 63: 339-44

(468) Meyer KC, Love RB, Zimmerman JJ

The therapeutic potential of nitric oxide in lung transplantation.

Chest 1998; 113: 1360-71

(469) Kemming GI, Merkel MJ, Schallerer A, et al.

Inhaled nitric oxide (NO) for the treatment of early allograft failure after lung transplantation. Munich Lung transplant Group.

Intensive Care Med 1998; 24: 1173-80

(470) Struber M, Harringer W, Ernst M, et al.

Inhaled nitric oxide as a prophylactic treatment against reperfusion injury of the lung.

J Thorac Cardiovasc Surg 1999; 47: 179-82

(471) Hermle G, Shutte H, Walmrath D, et al.

Ventilation-perfusion mismatch after lung ischemia-reperfusion. Protective effect of nitric oxide.

Am J Respir Crirt Care Med 1999; 160: 1179-87

(472) Schmid RA, Hillinger S, Walter R, et al.

The nitric oxide synthase cofactor tetrahydrobiopterin reduces allograft ischemia-reperfusion injury after lung trasnplantation.

J Thorac Cardiovasc Surg 1999; 118: 726-32

(473) Yamagishi H, Yamashita C, Okada M.

Preventive influence of inhaled nitric oxide on lung ischemia-reperfusion injury.

Surg Today 1999; 29: 897-901

(474) Yamashita M, Schmid RA, Ando D, et al.

Nitroprusside ameliorates lung allograft reperfusión injury.

Ann Thorac Surg 1996; 62: 791-6

(475) Shiraishi Y, Lee JR, Laks H, et al.

L-arginine administration during reperfusión improves pulmonary function.

Ann Thorac Surg 1996; 62: 1580-6

(476) Bhabra MS, Hopkinson DN, Shaw TE, et al.

Attenuation of lung graft reperfusión injury by a nitric oxide donor.

J Thorac Cardiovasc Surg 1997; 113: 327-34

(477) King RC, Binns OA, Kanithanon RC, et al.

Low-dose sodium nitroprusside reduces pulmonary reperfusion injury.

Ann Thorac Surg 1997; 1398-404

(478) Normandin L, Herve P, Brink C, et al.
L-arginine and pentoxifylline attenuate endothelial dysfunction after lung reperfusion injury in the rabbit. The Paris-Sud University Lung Transplant Group.
Ann Thorac Surg 1995; 60: 646-50

(479) Chapelier A, Reignier J, Mazmanian M, et al.
Amelioration of reperfusion injury by pentoxifylline after lung transplantation. The Paris-Sud University Lung Transplant Group.
J Heart Lung Transplant 1995; 14: 676-83

(480) Swoboda L, Clancy DE, Donnebrink MA, et al.
The influence of verapamil on lung preservation. A study on rabbit lungs with a reperfusión model allowing physiological loading.
Thorac Cardiovasc Surg 1993; 41: 85-92

(481) DeMeester SR, Molinari MA, Shiraishi T, et al.
Attenuation of rat lung isograft reperfusion injury with a combination of anti-ICAM-1 and anti-beta2 integrin monoclonal antibodies.
Transplantation 1996 62: 1477-85

(482) Naka Y, Toda K, Kayano K, et al.
Failure to express the P-selectine gene or P-selectine blockade confers early pulmonary protection after lung ischemia or transplantation.
Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94: 757-61

(483) Demertzis S, Langer F, Graeter T, et al.
Amelioration of lung reperfusion injury by L- and E-selectin blockade.
Eur J Cardiothorac Surg 1999; 16: 174-80

(484) Ross SD, Tribble CG, Gaughen JR Jr, et al.
Reduced neutrophil infiltration protects against lung reperfusion injury after transplantation.
Ann Thorac Surg 1999; 67: 1428-34

(485) Binns OA, DeLima NF, Buchanan SA, et al.
Neutrophil endopeptidase inhibitor improves pulmonary function during reperfusion after eighteen-hour preservation.
J Thorac Cardiovasc Surg 1996; 112: 607-13

Y, (486) Zamora MR, Davis RD, Keshavjee SH, et al.
Complement inhibition attenuates human lung transplant reperfusion injury: a multicenter trial.
Chest 1999; 116: 46S