



00343 2  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EVALUACION DEL EDEMA EN LA PRESERVACION PULMONAR CON UN MODELO DE PERFUSION AISLADA

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

TESIS DE MAESTRIA  
PARA OBTENER EL TITULO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS EN  
BIOLOGIA ANIMAL  
P R E S E N T A  
JOSE LUIS ARREOLA RAMIREZ

ASESOR: M. en C. MARIO H. VARGAS BECERRA



en Dirección General de Bibliotecas  
se difundir en formato electrónico e impreso el  
contenido de mi trabajo recepcional.  
MEXICO, D. F., JUNIO 2003.  
FIRMARE: \_\_\_\_\_  
CARRERA: \_\_\_\_\_  
CATEDRA: \_\_\_\_\_



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**TESIS  
CON  
FALLA DE  
ORIGEN**

**CONTENIDO**

ABREVIATURAS.....	4
RESUMEN .....	5
INTRODUCCIÓN.....	6
<b>TRANSPLANTE PULMONAR</b> .....	6
<b>PRESERVACIÓN PULMONAR</b> .....	7
<b>PARTICIPACIÓN DE NEUROTRASMISORES</b> .....	10
<b>PULMON AISLADO Y PERFUNDIDO</b> .....	12
PLANTEAMIENTMO DEL PROBLEMA.....	13
HIPÓTESIS.....	14
OBJETIVOS GENERALES.....	14
OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	15
MATERIAL Y METODOS.....	15
<b>DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO</b> .....	15
<b>ANIMALES</b> .....	16
<b>OBTENCIÓN DEL BLOQUE CARDIOPULMONAR</b> .....	17
<b>LAVADO Y PRESERVACIÓN PULMONAR</b> .....	17
<b>MEDICION DEL KFC</b> .....	18
<b>DETERMINACIÓN DE MEDIADORES QUÍMICOS</b> .....	22
<b>DETERMINACIÓN DE SUSTRANCIA P</b> .....	22
<b>DETERMINACIÓN DE ACETILCOLINA</b> .....	23
REACTIVOS EMPLEADOS.....	25

ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	25
RESULTADOS.....	25
DISCUSIÓN.....	29
DISEÑO DE LA PREPARACIÓN.....	29
EVALUACIÓN DE LA SOLUCION HTK.....	31
LIBERACIÓN DE NEUROTRASMISORES.....	32
CONCLUSIONES.....	33
REFERENCIAS.....	34
ANEXOS.....	41

## ABREVIATURAS

ACE	Acetilcolinesterasa
eNANC	Sistema excitatorio no adrenérgico no colinérgico
HTK	Solución de preservación histidina-triptofano-cetoglutarato
iNANC	Sistema inhibitorio no adrenérgico no colinérgico
Kf.c	Cocficiente de filtración capilar
mKf.c	Cocficiente de filtración capilar modificado
NEP	Endopeptidasa neutra
SNC	Sistema nervioso central
SSF	Solución salina fisiológica (NaCl al 0.9%)
UW	Universidad de Wisconsin

## RESUMEN

**EVALUACIÓN DEL EDEMA EN LA PRESERVACIÓN PULMONAR CON UN MODELO DE PERFUSIÓN AISLADA.** Arreola Ramirez José Luis. Desarrollada en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.

Un problema común en el trasplante pulmonar es el desarrollo de edema el cual impide que el tejido sea implantado exitosamente. La técnica, soluciones y tiempos de preservación del pulmón determina en gran medida el éxito del trasplante. Actualmente no existe un método de preservación idóneo, por lo que el interés por el estudio de aspectos relacionados con la técnica de preservación ha tomado un gran auge. El objetivo de este trabajo es evaluar mediante un modelo de órgano aislado y perfundido, la permeabilidad capilar después de 12 h de preservación pulmonar, determinando el coeficiente de filtración capilar (K<sub>fc</sub>) en pulmones preservados y determinar la sustancia P y acetilcolina endógenas en diferentes tiempos de preservación (0, 1, 6, 12 y 24 h) al final de cada tiempo se determino la concentración de sustancia p por prueba de ELISA y acetilcolina por HPLC. Utilizamos a 42 conejos Nueva Zelanda, anestesiados con pentobarbital sódico, se les extrajo el bloque cardiopulmonar. El grupo control (n=6) el K<sub>fc</sub> se evaluó inmediatamente después de extraído el bloque, en los demás grupos el bloque se preservó por 12 h en las siguientes condiciones: a) Sangre intravascular. (n=6, b) Solución Salina (SSF n=6), c) Solución Universidad de Wisconsin. (UW, n=6) y d) Solución de Bretschneider (HTK n=6). Determinación de sustancia P (n =6) y acetilcolina (n=6). Los resultados del K<sub>fc</sub> en el grupo control se mantuvieron en rangos normales (2.85±0.83 ml/cmH<sub>2</sub>O/min/g) mientras que los grupos experimentales tuvieron los siguientes valores: Sangre 12.33±1.90, SSF 10.82±2.29, UW 15.27±3.98, HTK 6.29±1.83 ml/cmH<sub>2</sub>O/min/g. Así que los mejores resultados correspondieron al de los pulmones preservados con solución de HTK. Los resultados para la sustancia P y Acetilcolina endógenas tuvieron los siguientes valores sustancia P (17.0±2.6, 8.4 ±1.7, 0.6 ± 0.1, 0.7 ±0.2 y 0.3 ± 0.11) para Acetilcolina +colina (57.89±1.19, 22.77±1.36, 3.05±0.11, 2.44C± 0.16, 1.32 ±0.57 μM/ml/min) Concluimos que todas las soluciones de preservación mostraron una tendencia a incrementar el K<sub>fc</sub>. En el grupo de Sangre de SSF y de UW, fueron particularmente altos, siendo el grupo más consistente el grupo de HTK. Nuestros resultados sugieren que la Acetilcolina y sustancia P podrían estar participando en los cambios de permeabilidad vascular del pulmón donador, por lo que se requieren mas estudios para poder determinar su papel y la posible utilidad de antagonistas de estos neurotransmisores en la preservación pulmonar.

## INTRODUCCION

### *El trasplante pulmonar*

El trasplante de pulmón ha pasando en los últimos años de ser una técnica experimental con resultados dudosos en clínica humana, a ser una posibilidad en el tratamiento de algunas enfermedades terminales irreversibles ( Cooper JD ,1992). La posibilidad de realizar un trasplante de pulmón se remonta a los inicios del siglo XX. El antecedente más antiguo lo encontramos en las descripciones de las técnicas vasculares que hizo Alexis Carrel; sin embargo, los trabajos experimentales se inician en los años 50 con Metras, Juvenelle y Hardin (citados por Hardy y col. 1963, Veith y col. 1983, y Calhoon y col. 1991).

El primer trasplante pulmonar clínico se realizó en la Universidad de Mississippi en el año de 1963 por el Dr. J. Hardy (Hardy y col. 1963). El paciente logró una sobrevida de 18 días, indicando la posibilidad de lograr un injerto pulmonar funcional. Entre la década de los 60 y 80, un total de 39 pacientes recibieron un alotrasplante pulmonar. Desgraciadamente, los resultados no fueron satisfactorios, ya que únicamente 2 pacientes lograron sobrevidas relativamente prolongadas, de aproximadamente 10 meses (Veith y col. 1983).

Los principales problemas relacionados con este desalentador panorama fueron por un lado los biológicos, los inmunosupresores disponibles en ese entonces no eran capaces de modificar sustancialmente el fenómeno de rechazo, y por otro lado los relacionados con la técnica quirúrgica, principalmente en la anastomosis bronquial (Calhoon y col. 1991).

A partir de 1980 la introducción de la ciclosporina A como principal agente inmunosupresor permitió un nuevo auge internacional en el trasplante pulmonar clínico, así como su inicio en nuestro país.

Aunque actualmente ya se han superado los problemas relacionados con la técnica quirúrgica y con la terapia inmunosupresora, la experiencia mundial demuestra que realizar un trasplante de pulmón, es más difícil que trasplantar otros órganos (Cooper y col. 1992).

### ***La preservación pulmonar***

Debido a que usualmente hay un período de isquemia en el órgano a trasplantar, desde que se extrae del donante y es transportado hasta donde está el receptor y se implanta en él, se han desarrollado métodos que pretenden reducir al mínimo las lesiones que pudieran sufrir los órganos a trasplantar.

Aunado a la escasez de donadores, no se ha desarrollado un método de preservación adecuado que permita la conservación de los pulmones sin dañar su funcionalidad por periodos de tiempo prolongados (Santillán y col. 1988, Sotres y col. 1993, Witter y col. 2000.)

Todo ello ha provocado un renacimiento del interés por aspectos relacionados con la técnica de preservación. En el momento actual, el pulmón puede ser almacenado (en hipotermia) durante 4 h sin que su función empeore (Belzer F y col 1988, Torre y col. 1991, Aoc y col. 1996, Chiag y col. 2001)

Durante la preservación existen algunas alteraciones celulares. Cuando le falta oxígeno a la célula ésta recurre a la vía anaeróbica, incrementándose la producción de ácido láctico e hidrogeniones (Fukuse y col. 1999). Esto determina acidosis intracelular y, a lo largo, se agotan los depósitos de ATP, lo que conduce a la alteración progresiva de la bomba de Na-K ATPasa, produciéndose una entrada masiva de Na<sup>+</sup> a la célula, con la consecuente entrada de agua y producción de edema celular (Fukuse y col. 2001).

En 1994 D'Armini y col. realizaron estudios para determinar el curso temporal del deterioro de los organelos celulares en el tejido pulmonar después del paro circulatorio y muerte (D'Armini y col. 1994). Estos autores examinaron por microscopia electrónica semicuantitativa el grado de lesión celular de acuerdo al aglutinamiento de la cromatina mitocondrial, al edema intracelular y a la integridad de la membrana. Concluyeron que la mayoría de los diferentes tipos de células del pulmón toleran de 30 a 60 min de hipoxia isquémica sin que se produzcan lesiones irreversibles.

Para tratar de prolongar esta tolerancia, se han diseñado diversas técnicas de preservación que se emplean en clínica humana: enfriamiento tópico, enfriamiento mediante circulación extracorpórea, perfusión intra-arterial y el sistema de auto perfusión originalmente descrito por Robicsek y adoptado por el grupo del (Cooper y col. 1992) en Pittsburgh. Sin embargo hasta el momento, ninguna de ellas ha demostrado ser superior a las demás. Así pues, el terreno abierto a la investigación en esta línea es amplio.

Numerosos estudios han demostrado que los métodos de preservación adecuados para los llamados órganos sólidos no funcionan en la preservación pulmonar. Los resultados de estos experimentos

han sido contradictorios, aunque esporádicamente aparecen en la literatura avances de preservación pulmonar, estos reportes resultan útiles únicamente en la fase experimental. Desgraciadamente, no han sido lo suficientemente consistentes o reproducibles para permitir su aplicación clínica y con ninguno de ellos ha sido posible realizar procuraciones rutinarias prolongadas.

Después de más de 30 años de investigación sobre preservación pulmonar, actualmente se tiene bien establecido que periodos cortos de isquemia, de entre 5 y 7 horas (en hipotermia y con soluciones especiales), todavía son compatibles con una buena función pulmonar.

El método de preservación pulmonar preferido en la actualidad incluye una perfusión del pulmón a través de la arteria pulmonar con solución de Eurocollins y prostaglandina E2. Soluciones como la de la UW y fármacos antagonistas del factor activador de plaquetas (PAF) también se han utilizado.

La falla del trasplante pulmonar está asociada con una alta morbilidad y mortalidad. Las causas de este proceso son aún desconocidas pero el resultado es un marcado decremento en la función pulmonar que involucra hipoxia progresiva y edema pulmonar (King y col. 1997). Desde el punto de vista clínico, la disfunción pulmonar que ocurre inmediatamente después del trasplante de un pulmón con una preservación inadecuada se caracteriza por una disminución en la presión parcial de oxígeno y un aumento en la resistencia vascular pulmonar.

Las nuevas técnicas quirúrgicas han ido abriendo nuevas posibilidades en el tratamiento y curación de órganos en pacientes afectados por patologías importantes. Sin embargo, el problema principal con el que se han enfrentado los cirujanos y que durante mucho tiempo les ha limitado, ha sido la tolerancia a la isquemia que presentan prácticamente todos los órganos y que les obligaba a realizar intervenciones en muchos casos contrarreloj (Muhlbaecher y col. 1999). De ahí que fuera necesario investigar en el desarrollo de nuevas soluciones que permitieran prolongar en la medida de lo posible dicha tolerancia. Para ello era necesario por un lado, reducir los requerimientos energéticos de las células durante la anaerobiosis y por otro conseguir una capacidad amortiguadora adecuada que impidiera o retrasara al máximo la acidosis metabólica que se da durante la anaerobiosis y de este modo la glucosa pudiera seguir metabolizándose de forma que la provisión de energía para células durante la isquemia quedara garantizada (Erhard y col. 1993).

Las células endoteliales son muy sensibles a los estímulos nocivos como lo son la hipoxia, exposición a citocinas, endotoxinas, colesterol, y estímulos físicos tales como la manipulación quirúrgica.

En esta respuesta a los estímulos, las células endoteliales se modifican y participan profundamente en la respuesta inflamatoria. Esta respuesta "llamada activación endotelial" modifica su

comportamiento y por tanto induce cambios en la función provocando vasoconstricción, coagulación y aumento en la adhesividad plaquetaria.

El agotamiento de las reservas intracelulares de trifosfato de adenosina (ATP) en un tejido hipóxico se asocia con incapacidad para mantener el balance iónico, modificaciones en la homeostasis del calcio, disfunción mitocondrial, liberación de enzimas hidrolíticas, activación de sistemas como la fosfolipasa A2 y enzimas vinculadas al metabolismo del ácido araquidónico entre otros eventos involucrados en el complejo mecanismo de daño celular por hipoperfusión (Wescott y col 1988, Chien y col. 2000).

Adicionalmente aparecen modificaciones en la permeabilidad e integridad de la barrera endotelial, y la activación leucocitaria con cambios en la adhesividad intracelular, la agregación plaquetaria y fenómenos de coagulación intravascular.

El daño secundario a la isquemia produce inicialmente un aumento en la adhesividad leucocitaria al endotelio vascular; la reperfusion subsecuente al tejido con sangre oxigenada, acentúa el daño tisular al producir la liberación de radicales superóxido reaccionan con óxido nítrico, disminuyendo los niveles del mismo y produciendo peroxinitrito el cual causa peroxidación de lípidos en la membrana aumentando el daño tisular.

Se ha reconocido que la preservación exitosa del injerto es un factor importante en el trasplante clínico. A pesar de los beneficios demostrados por la hipotermia el daño secundario al efecto "isquemia reperfusion" limita en gran medida la viabilidad del injerto.

La criopreservación ha sido utilizada en la preservación de órganos en el medio clínico, para inhibir la actividad metabólica del tejido. Sin embargo, aún a cero grados existe hidrólisis de ATP por parte del tejido; éste al ser incapaz de obtener energía a través de la glucólisis aeróbica, inicia mecanismos de anaerobiosis produciendo hidrogeniones y acidificación del medio; la consecuente caída de pH produce daño endotelial. (Chae y col. 1998).

La creación de soluciones alcalinas permite la estabilidad del medio y la preservación del tejido La histidina es un amortiguador efectivo y es un aminoácido que contribuye a la estabilidad ácido base del medio extracelular. Varios investigadores han demostrado que las soluciones con histidina permiten mejor la preservación del tejido miocárdico y del endotelio arterial.(Erhard y col 1994)

En 1998, Takigami y col. describieron que la utilización de una solución con histidina promueve la glucólisis aeróbica y, por lo tanto la recuperación de ATP y el mantenimiento de la preservación endotelial (Takigami y col. 1998).

Dentro de la investigación clínica se han desarrollado un gran número de soluciones de preservación. Existen soluciones de las llamadas intracelulares, las cuales contiene una concentración osmótica de sodio y de calcio similar al entorno intracelular. De éstas, las más utilizadas son las de la Universidad de Wisconsin, la solución de Eurocollins y la solución de histidina-cetoglutarato-triptofano (HTK), también llamada de Bretschneider (Wright y col. 2000; Chiag y col. 2001). Las soluciones intracelulares tienen la ventaja de disminuir la necesidad de equilibrar los gradientes normales transmembranales posterior a la reperfusión y, por ende, disminuye el edema y el daño consiguiente.

***Posible participación de neurotransmisores (acetilcolina y sustancia P)***

El tejido nervioso es uno de los tejidos más sensibles al efecto nocivo de la hipoxia. Se sabe que las neuronas del cerebro detienen rápidamente su metabolismo a los 5 ó 10 segundos de presentarse cese completo de la irrigación sanguínea, y que al cabo de pocos minutos de isquemia puede ocurrir daño irreversible de este tejido (Guyton y Hall, 1997). Por lo tanto, es posible que uno de los primeros fenómenos que ocurra durante el período de preservación pulmonar sea la lesión de las células nerviosas, con liberación subsecuente de sus neurotransmisores. Muchos de estos neurotransmisores pueden tener efecto al nivel de la vasculatura pulmonar, y por lo tanto tener influencia sobre la permeabilidad capilar durante la preservación pulmonar. En especial, la acetilcolina (neurotransmisor del sistema vagal) y la sustancia P (neurotransmisor del sistema excitatorio no-adrenérgico no-colinérgico [eNANC]) son potentes mediadores que incrementan la permeabilidad vascular en diversos tejidos (Delaunoy A y col 1994a, Segura y col. 1999).

**Acetilcolina.** La Acetilcolina es el principal neurotransmisor posganglionar del sistema nervioso parasimpático (Delaunoy y col. 1994b) así como de las motoneuronas, las fibras preganglionares tanto del parasimpático como del simpático y muchas neuronas del sistema nervioso central (SNC) (ganglios basales, corteza motora, etc).

Se sintetiza en la terminal nerviosa a partir de la colina y la acetilcoenzima A procedente de las mitocondrias, por medio de la enzima colina-acetiltransferasa. (Delaunoy y col. 1993,1995). Las concentraciones de acetilcolina en la fibra nerviosa están reguladas por la actividad de la colina-acetiltransferasa y por la captación de colina por las mismas terminales nerviosas que la liberaron. Este neurotransmisor se almacena en vesículas de la terminal nerviosa, de donde puede ser liberada al exterior cuando esta estructura es estimulada. Se ha demostrado que la estimulación directa de la terminal nerviosa por factores locales como la hipoxia puede liberar acetilcolina (Delaunoy y col. 1993). Una vez liberada, la acetilcolina es capaz de interactuar con dos tipos de receptores:

nicotínicos y muscarínicos. La estimulación del receptor colinérgico muscarínico interviene en múltiples fenómenos celulares tales como la contracción y relajación del músculo liso en diferentes órganos, la disminución del cronotropismo e inotropismo cardíacos, la estimulación de glándulas exocrinas y en acciones excitatorias e inhibitorias en SNC. En el pulmón la acetilcolina provoca contracción del músculo liso bronquial y vascular a través de los receptores M3 y M2, respectivamente, y en la microcirculación provoca contracción de la célula endotelial, con lo que incrementa la permeabilidad vascular, favoreciendo la salida de líquido al espacio intersticial (Delaunois y col. 1994b). La interacción de la acetilcolina con su receptor cesa rápidamente debido a la hidrólisis de la acetilcolina en colina y acetato, mediada por la enzima acetilcolinesterasa (ACE) que se encuentra cerca de los receptores.

La acetilcolina, además, es un neuromodulador con otras vías neurológicas, ya que, por ejemplo, se ha demostrado que en pulmones aislados y perfundidos de conejo la acetilcolina exógena induce liberación de sustancia P de las fibras nerviosas del sistema eNANC (Delaunois y col. 1993).

**Sustancia P.** La sustancia P es un péptido de 11 aminoácidos que se encuentra distribuido en el sistema nervioso central y periférico de muchas especies, incluyendo el humano (Ludenberg y col. 1983). Fue descubierta en 1939 por Van Euler y Gaddum en extractos de cerebro e intestino de quinos (citado por Joose y col. 1988). Estos extractos contenían un factor espasmogénico e hipotensor cuya acción no era afectada por la atropina. Van Euler y Gaddum prepararon un polvo seco para hacer varios experimentos y se refirieron a él como P, abreviación de "polvo"; así se desarrolló el término de sustancia P (Joose y col. 1988).

La sustancia P se localiza en los nervios de diversas especies incluyendo el humano, es sintetizada sobre todo en el ganglio nodoso del nervio vago y luego es trasportada a lo largo del vago a las ramas periféricas aferentes pulmonares (Barnes y col. 1991, Martins y col. 1990).

En las vías respiratorias la sustancia P se encuentra almacenada en las fibras nerviosas aferentes denominadas fibras C, pertenecientes al sistema NANC. Este neuropéptido es liberado de las fibras C cuando éstas son estimuladas por factores como el humo de cigarro o la capsicina (Ludenberg y col. 1983, Delaunois y col. 1993). La enzima responsable de la degradación de la sustancia P y, por lo tanto, de la terminación de su efecto, es la endopeptidasa neutra (NEP), también llamada neprilisina.

Los efectos de la sustancia P exógena en las vías aéreas incluyen broncoconstricción, vasodilatación y un incremento en la permeabilidad vascular. Por lo menos en el conejo parte de este efecto es por acción directa de la sustancia P sobre las células cebadas y fibras nerviosas vagales, involucrando la

liberación de acetilcolina (Delaunais 1992, Tanaka y Grunstein 1984). Debido a su capacidad para producir estos efectos, se ha sugerido que este péptido desempeña un papel importante en la patogénesis del asma y de otras enfermedades respiratorias (Barnes y col. 1991). A nivel del parénquima pulmonar, diversos estudios han demostrado que la sustancia P exógena puede inducir edema pulmonar por incremento en la permeabilidad endotelial (Delaunais y col. 1993, 1994). Este efecto ha sido atribuido a la degranulación de las de las células cebadas, con la consecuente liberación de serotonina e histamina (Delaunais 1992).

### *El pulmón aislado y perfundido*

El método de pulmón aislado y perfundido fue descrito por primera vez en 1903 por Brodie y Dixon y, desde entonces, ha sido ampliamente utilizando en distintas especies animales (ratas, conejos, perros, cerdos) como una herramienta metodológica en estudios farmacológicos, toxicológicos y bioquímicos del pulmón (Drake y col. 1978, Andrade y col. 2000, Baker y col. 2001).

Esta preparación tiene la ventaja de permitir la evaluación de varios parámetros fisiológicos. (Hachida y cols 1988, Walmarth y col.1992). Una de las ventajas distintivas del pulmón aislado y perfundido es que se lleva a cabo en órganos intactos en donde los contactos intercelulares así como los contactos entre las células y la matriz extracelular se mantienen inalterados además de que entre las formas más utilizadas para medir la formación de edema en condiciones experimentales se encuentran la extravasación del colorante azul de Evans o de albúmina marcada radiactivamente, y la medición de la ganancia de peso (relación peso seco/peso húmedo). Este último método de medición de edema es el que se emplea en la preparación de pulmón aislado y perfundido para estudiar los cambios de la permeabilidad capilar, midiendo un coeficiente de filtración capilar (K<sub>f,c</sub>) (Townsend y col. 1986, Gustin y col. 1992). El valor de esta variable se obtiene al medir la cantidad de fluido que es filtrado a través del endotelio cuando la presión capilar es repentinamente incrementada durante algunos minutos. Este parámetro se mide en mililitros de fluido que cruzan por el lecho microvascular por minuto, por gramo de tejido pulmonar, por cmH<sub>2</sub>O de incremento de la presión capilar ( Hakim y col. 1989, 1988).

Como ya se comentó anteriormente, uno de los problemas más importantes que conducen al fracaso del trasplante pulmonar es el daño endotelial y, por lo tanto, la técnica del pulmón aislado y perfundido podría ser de utilidad para evaluar este problema (Kermit y col. 1967, Parker y col. 1983). Con este razonamiento, uno de los primeros objetivos del presente estudio fue desarrollar en nuestro laboratorio la preparación de pulmón aislado y perfundido para evaluar la calidad de la

preservación pulmonar mediante las modificaciones del Kf.c. Cabe señalar que en el tiempo en el que se confeccionó este protocolo (1997) no existían en la literatura biomédica publicaciones que usaran esta preparación para evaluar la preservación pulmonar (hasta el segundo trimestre de 2002 han aparecido ya tres publicaciones: Chae y col. 1998, Sasaki y col. 1999, Witter y col. 1999). Además, se pretendió diseñar esta preparación con tecnología relativamente simple e infraestructura ya instalada, ya que los equipos comerciales para esta preparación son relativamente caros (entre \$40,000 y \$60,000 dólares).

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La solución HTK ha sido ampliamente usada con éxito en preservación de órganos sólidos, pero no se ha evaluado bien su utilidad en la preservación pulmonar. El modelo de pulmón aislado y perfundido podría generar información para evaluar la utilidad de esta solución HTK, en comparación con otros métodos de preservación, a través de la medición de un coeficiente de permeabilidad capilar. Los equipos comerciales son relativamente caros y en la actualidad no están a nuestro alcance poder adquirirlos. En vista de que la viabilidad del pulmón es relativamente corta debido, entre otras cosas, a daño del capilar con aumento de su permeabilidad, es importante investigar los posibles mecanismos del daño, que podrían ser la liberación de sustancias endógenas capaces de incrementar la permeabilidad vascular. Por lo tanto, se plantean las siguientes preguntas: ¿Podrá la solución HTK evitar el deterioro de la permeabilidad vascular durante la preservación pulmonar? ¿Podrá el modelo de pulmón aislado y perfundido ser implementado con infraestructura propia de un laboratorio de fisiología? ¿Habrá liberación de neurotransmisores durante la preservación pulmonar y cuál será su cinética con respecto al tiempo?

## HIPÓTESIS

1. Es posible desarrollar la preparación de pulmón aislado y perfundido con tecnología simple y empleando infraestructura habitualmente disponible en laboratorios de investigación en fisiología básica.
2. La preservación pulmonar con solución HTK provoca menos deterioro de la permeabilidad capilar que la preservación en solución salina fisiológica (SSF) o UW o con sangre intravascular.
3. Durante la preservación pulmonar con SSF se produce liberación endógena de sustancia P y acetilcolina.

## OBJETIVOS GENERALES

1. Evaluar mediante una preparación de pulmón aislado y perfundido la permeabilidad capilar después de 12 h de preservación pulmonar con diversos métodos de preservación.
2. Evaluar mediante una preparación de pulmón aislado y perfundido la cinética de producción de acetilcolina y de sustancia P.

## OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1.1. Desarrollar la técnica de pulmón aislado y perfundido de conejo en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.
- 1.2. Determinar cuál de las siguientes métodos de preservación pulmonar causa menos alteraciones del coeficiente de filtración capilar modificado (mKf,c):
  - Almacenaje conservando la sangre intravascular.
  - Solución salina fisiológica (0.9%)
  - Solución de la UW
  - Solución HTK

2.1. Determinar la tasa de producción de acetilcolina y sustancia P en los líquidos recuperados del lecho intravascular una vez transcurrido diferentes tiempos de preservación (0, 1, 6, 12 y 24 h).

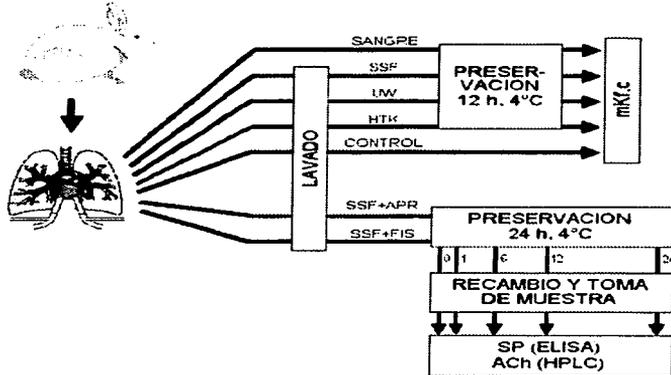
## MATERIAL Y METODOS

### *Descripción general del estudio*

En su primera fase tuvo un diseño prospectivo, longitudinal, experimental y analítico. Como se puede observar en la figura 1, las preparaciones de pulmón aislado y perfundido de conejo se preservaron por 12 h en cuatro condiciones diferentes (sangre intravascular (n=6), SSF (n=6), UW (n=6) o HTK (n=7)), y las modificaciones del mKf.c al final de este período se compararon con el grupo control (n=7), cuya medición de mKf.c fue a los pocos minutos después de la obtención del bloque cardiopulmonar. Por otro lado, en preparaciones de pulmón aislado y perfundido preservadas por 24 h en SSF (conteniendo un bloqueador muscarínico o un inhibidor de proteasas), se extrajeron muestras de solución intravascular a las 0, 1, 6, 12 y 24 h, en las cuales se determinaron las concentraciones de acetilcolina o sustancia P

### *Animales*

Se utilizaron conejos Nueva Zelanda machos con un peso aproximado de 2.5 a 3.0 Kg que se mantuvieron en condiciones convencionales de bioterio y alimentación *ad libitum*, de acuerdo con los lineamientos para el uso de animales de laboratorio de la Ley General de Salud de México y la Guía para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (US National Research Council 1999).



*Figura 1. Diseño del protocolo experimental. En pulmones aislados de conejos se determinaron los coeficientes de filtración capilar modificado (mKf.c) después de preservarlos por 12 h en diferentes condiciones. En otros pulmones se determinó la tasa de producción de acetilcolina (ACh) y sustancia P (SP) durante la preservación por 24 h. SSF=solución salina fisiológica, UW=solución de Universidad de Wisconsin, HTK=solución histidina-triptofano-cetoglutarato, APR=aprotinina, FIS=flunitrazepam*

### *Obtención y preparación del bloque cardiopulmonar*

Los conejos se anestesiaron profundamente con una inyección única intramuscular de clorhidrato de xilazina (3 mg/kg i.m., Rompun<sup>™</sup>, Bayer) y pentobarbital sódico (28 mg/kg i.v., Sedalforte<sup>™</sup>, Salud y Bienestar Animal SA). Para obtener el bloque cardiopulmonar se diseccó y canuló la tráquea de cada animal para ventilarlos mecánicamente (10 ml/kg, frecuencia respiratoria de 55/min) con un ventilador para pequeñas especies (Harvard Apparatus, Modelo Starling, Massachusetts), después de lo cual se realizó una esternotomía media. Se refirieron las venas cavas superior e inferior. Inmediatamente después se inyectó en el ventrículo derecho heparina (2000 UI/kg) para posteriormente ligar las venas cavas y exsanguinar al animal. El bloque cardiopulmonar se extrajo de la cavidad torácica (Dossari GA y col 1998). El corazón se seccionó transversalmente en ambos ventrículos, por debajo de las válvulas auriculoventriculares, para colocar dos cánulas de cristal de 15 mm de longitud por 3 mm de diámetro interno, una de las cuales se introdujo en la arteria pulmonar y la otra en la aurícula izquierda. Las estructuras adyacentes fueron incluidas en la ligadura de la arteria pulmonar y la aurícula izquierda, con el fin de disminuir la distensibilidad de dichas estructuras para que no interfieran en el registro de la presión vascular.

### *Lavado y preservación pulmonar*

Una vez obtenido el bloque cardiopulmonar, y mantenido bajo ventilación mecánica a 50 respiraciones por minuto y a 10 ml/kg de volumen corriente, la sangre intravascular de los pulmones se eliminó introduciendo de manera anterógrada 100-150 ml de solución de preservación a través de la cánula colocada en la arteria pulmonar, a una presión de 20-30 cmH<sub>2</sub>O. (Dossari y col 1998). Al finalizar este lavado, se pinzaron las cánulas arterial y venosa. Los pulmones fueron hiperinsuflados (3 veces el volumen corriente) para evitar zonas atelectásicas y en estas condiciones la tráquea fue pinzada. El bloque cardiopulmonar se sumergió en un recipiente conteniendo la misma solución de preservación que se depositó en el lecho intravascular, y se mantuvo a 4°C durante 12 h. Este procedimiento se realizó en todas las preparaciones de pulmón aislado y profundido, excepto en el grupo preservado con sangre intravascular, en el cual el pinzamiento de las cánulas se hizo inmediatamente después de la extracción del bloque (sin realizar lavado) y sumergiéndolo en solución salina.

**Medición del  $m\dot{K}_f,c$** 

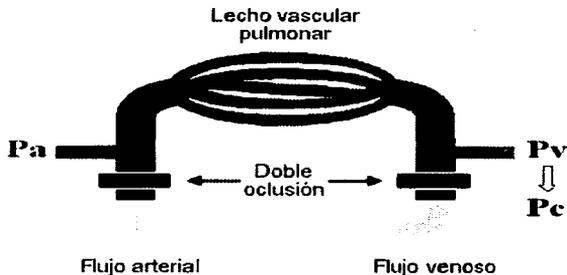
El bloque cardiopulmonar se conectó a un circuito de perfusión recirculatorio, donde fue perfundido a un flujo constante de 20 ml/min/kg de peso del animal (Kernit y col 1967). El circuito incluye una bomba peristáltica de circulación (NY-7550-62 Materflex, Barrington, IL) con indicador de flujo de perfusión y termómetro, así como un reservorio venoso con trampa de burbujas. Para tener este reservorio se utilizó un oxigenador de burbujas (modelo Bentley 5, Baxter, USA). Se tuvo especial cuidado para evitar la entrada de aire al sistema de perfusión. El bloque cardiopulmonar se colocó en una hamaca hecha con malla de Marlex<sup>®</sup> colgada de un transductor de fuerza tensil. Una vez montados en esta hamaca, los pulmones se lavaron haciendo pasar líquido de perfusión hasta eliminar al máximo la sangre existente en el lecho vascular, para mantenerlos posteriormente perfundidos con 400 ml de la solución artificial de perfusión Krebs-ringer-bicarbonato conteniendo (g/l): glucosa 0.98, NaCl 6.90, KCl 0.354, CaCl $\cdot$ 2H $_2$ O 0.373, MgSO $_4$  0.293, KH $_2$ PO $_4$  0.162, NaHCO $_3$  2.1, y 2.5% de albúmina bovina. El pH y la temperatura fueron continuamente medidos y mantenidos en límites fisiológicos (pH 7.4 a 7.5, 37 a 38°C). El pH se controló añadiendo NaHCO $_3$  (1M) o burbujando el líquido de perfusión en el reservorio venoso con una mezcla de 95% de O $_2$  y 5% de CO $_2$ .

Los pulmones se ventilaron con aire ambiental humedecido a un volumen corriente de 10 ml/kg de peso, una frecuencia de 55 respiraciones/min, y una presión final espiratoria (P $_e$ ) de 2 cmH $_2$ O. Además, los pulmones se hiperinsuflaron (3 veces el volumen corriente) periódicamente para evitar atelectasias.

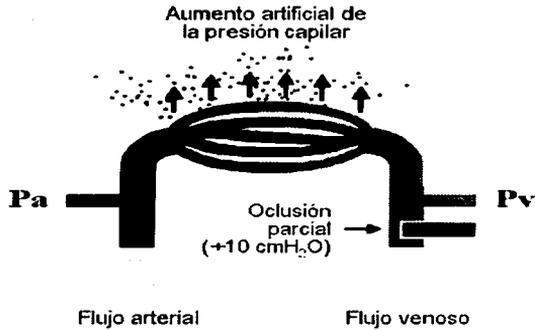
Las presiones arterial (Pa) y venosa (Pv) se midieron en las cánulas fijadas en la arteria pulmonar y la aurícula izquierda, respectivamente, a través de catéteres (diámetro externo, 2.5 mm; diámetro interno, 1.5 mm) conectados a transductores de presión (Gould 23XL, Quincy, MA). Dichas presiones se ajustaron a cero a nivel del hilo pulmonar.

Al cabo de 10 a 15 min se obtuvo el equilibrio en el sistema, que se caracterizó por un estado isogravimétrico en el cual el peso del pulmón se mantuvo relativamente constante y las presiones arterial y venosa se mantuvieron estables (Kernit y col. 1967; Rooney y col. 2000). Dentro de nuestras condiciones experimentales la máxima apertura de los vasos sanguíneos se obtiene cuando la presión arterial es mayor que la venosa y ésta es a su vez mayor que la presión al final de la espiración (Pa>Pv>P $_e$ ). A dicha condición se le conoce como la zona III (West 1996). Las presiones y el peso se registraron en un polígrafo de siete canales (modelo 7D, Grass, RI).

La permeabilidad capilar se midió a través del método de la doble oclusión (Gustin y col. 1992 Haniuda y col 1996), como a continuación se describe. De forma súbita se realiza un pinzamiento simultáneo de las cánulas arterial y venosa, durante la cual se produce inmediatamente un incremento de la Pv y un decremento de la Pa, y al cabo de 2 ó 3 segundos después ambas presiones se estabilizan (figura 2). En estas condiciones la Pv fue considerada como un indicador de la presión capilar (Pc). Después de haber transcurrido aproximadamente 10 segundos, se quita la doble oclusión y se restablece el flujo. Unos segundos después se incrementa la Pv en 10 cmH<sub>2</sub>O mediante la oclusión parcial del flujo de salida venoso y se mantiene así durante 3 min (figura 3).



*Figura 2. Medición de la presión capilar (Pc) al ocluir el lado arterial y el venoso*



*Figura 3. Después de la doble oclusión, se restablece el flujo y unos segundos después se incrementa la  $P_V$  en 10 cmH<sub>2</sub>O mediante la oclusión parcial del flujo venoso y se mantiene así durante 3 minutos.*

Esto causa un aumento rápido del peso del pulmón debido a la congestión capilar, que dura aproximadamente de 30 a 60 segundos, seguido de una ganancia más lenta de peso, que representa el líquido filtrado a través del capilar (Gustin y col. 1992, Hakin y col. 1988a y 1989b) y esto ocurre de los 60 a 180 segundos después de haber iniciado la oclusión parcial del lado venoso (figura 4). Esta fase lenta de ganancia de peso es la que se utiliza para calcular el mKf,c. Al final de los 3 minutos, y aún con la elevación de la Pv de 10 cmH<sub>2</sub>O, se realiza otra doble oclusión para obtener la Pc. El mKf,c se expresó como ml·min<sup>-1</sup>·cmH<sub>2</sub>O<sup>-1</sup>·g<sup>-1</sup>, lo que representó el líquido que se filtró a través del capilar (es decir, la ganancia de peso del pulmón, asumiendo que el líquido filtrado tiene una densidad de 1.0) por minuto de obstrucción venosa, por diferencia de Pc y por gramo de tejido pulmonar. Para evitar la influencia de la ventilación mecánica al momento del registro del mKf,c, los pulmones se desconectan temporalmente (por aproximadamente 4 minutos).

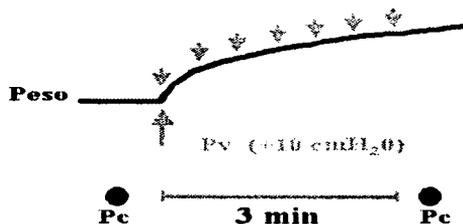


Figura 4. Representación gráfica de un registro de mKf,c. El primer minuto se caracteriza por un incremento en la ganancia de peso que corresponde a la congestión del capilar, y los siguientes dos minutos corresponden a la filtración de líquidos a través del capilar una vez que se incrementa la presión venosa a 10 cm de H<sub>2</sub>O.

### *Determinación de los mediadores químicos*

Algunos bloques cardiopulmonares se lavaron (como se describió arriba) usando SSF con fisostigmina  $10^{-6}$  M) para inhibir a la acetilcolinesterasa, o bien con aprotinina (Trasylol ®, 1500 unidades inhibitoras de kalicreína por mililitro, KIU/ml) para inhibir a la endopeptidasa neutra (Roberts RF y col. 1998). Estos compuestos (fisostigmina y aprotinina) se emplearon con el fin de evitar la degradación de acetilcolina y sustancia P, respectivamente. Los pulmones se preservaron en estas soluciones por 24 h a 4°C. A determinados intervalos (15min (basal) y 1, 6, 12 y 24 h) los pulmones eran sacados del refrigerador, se conectaba en el extremo arterial un frasco conteniendo el mismo tipo de solución usada (a 4°C), el cual se elevaba a una altura de 20 cm con el fin de que por el extremo venoso se expulsara el total de la solución intravascular. Para asegurar que la muestra de líquido intravascular proviniera del lecho capilar pulmonar, los primeros 5 ml de solución se desecharon, los siguientes 5 ml se colectaron en un tubo de ensayo, y los siguientes 10 ml se desecharon también. En mediciones previas corroboramos que 20 ml de solución son suficientes para hacer un recambio total de líquido intravascular. Las cánulas arterial y venosa fueron nuevamente pinzadas y el pulmón sumergido otra vez en su solución de preservación a 4°C. Todo este procedimiento de toma de muestras duraba no más de 5 min. Las muestras para determinar acetilcolina se congelaron a -70°C, y las destinadas para medir sustancia P a -30°C hasta su estudio.

*Determinación de sustancia P.* A las muestras de SSF con aprotinina extraídas del lecho vascular de los pulmones preservados se les realizó un proceso de extracción. Este consistió en que a 1 ml de la muestra se le añadió 1 ml de ácido trifluoroacético al 1%, se agitó mecánicamente (Vortex ®), se centrifugó a 17,000 g (10497 rpm) durante 15 min a 4°C en una ultracentrifuga (Beckman, CA), y se recuperó el sobrenadante.

Para separar la sustancia P del sobrenadante, se preparó una columna de cromatografía (Biorad, CA.), que se equilibró añadiéndole 200 mg de BioGel P-2 fino (Biorad), seguido de 1 ml de acetonitrilo y después se le añadió 10-25 ml de ácido trifluoroacético al 1%. Ya lista la columna se le añadió el sobrenadante de las muestras, quedando la sustancia P atrapada en el gel de la columna. El siguiente paso fue añadir 10 ml de ácido trifluoroacético para lavar, descartándose lo eluido.

Para despegar la sustancia P de la columna se le aplicaron lentamente 3 ml de una solución 60:40 de acetnitrilo: ácido trifluoroacético al 1%, y el fluido recuperado (los mismos 3 ml que se añadieron a la columna) se recuperaron en un tubo de plástico estéril. Este fluido se concentró mediante una centrifuga al vacío a 37°C (Speed Vac, Savant, France). La muestra se almacenó a -20 °C (Revco, TX), hasta el momento de realizar el ELISA.

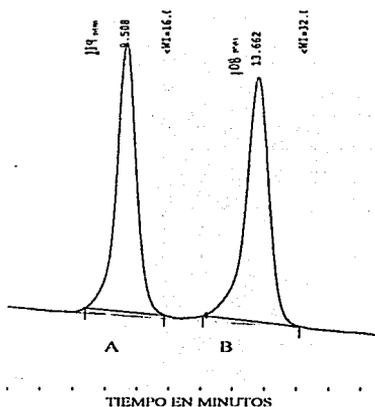
Para la determinación de la concentración de sustancia P en las muestras de líquido intravascular por prueba de ELISA se utilizó un equipo comercial (catálogo 1400, R&D, Minneapolis, MN). Este equipo consta de una microplaca de 96 pozos, que en su concavidad tienen fijos anticuerpos de cabra anti-conejo, a los que se añaden 50 µl de sustancia P conjugada con fosfatasa alcalina, y 50 µl de muestra, así como 50 µl de anticuerpos de conejo anti-sustancia P. Durante las 2 h de incubación a temperatura ambiental en un agitador horizontal, la sustancia P contenida en la muestra compite con la sustancia P conjugada con fosfatasa alcalina por los anticuerpos anti-sustancia P. Durante esta reacción los anticuerpos anti-sustancia P son capturados por los anticuerpos fijos en la placa. Después de un lavado con solución amortiguadora para eliminar el exceso de sustancia P no unida a anticuerpos, se añaden 200 µl de para-nitrofenilfosfato, que es un sustrato para la fosfatasa alcalina, cuya reacción genera un compuesto con color. La microplaca se lee en un lector de ELISA, a 405 nm, y los resultados se comparan con una curva estándar elaborada con concentraciones conocidas de sustancia P. De acuerdo a este principio, cuanto más sustancia P haya en las muestras, menor cantidad de sustancia P conjugada será captada y, por lo tanto, menor color en la lectura.

De acuerdo al fabricante del equipo empleado para la determinación de sustancia P, este análisis tiene una sensibilidad de 9.76 a 10,000 pg/ml, y muestra una reactividad cruzada de 50% con otros péptidos muy relacionados como son los fragmentos 3-11, 4-11, 7-11 y 1-4 de la sustancia P, eludósina, alfa neurocinina, beta neurocinina y somatostatina.

**Determinación de acetilcolina.** Para la determinación de acetilcolina se utilizó un cromatógrafo líquido de alta presión marca Varian (Tx: USA), integrado, entre otros elementos, por una bomba (modelo 629, Perkin-Elmer, Norwalk, CT), una toma de muestras (iss100C Perkin-Elmer, USA) y un programa computacional para el análisis de datos (StarVarian v4.0).

Las muestras de SSF con fisostigmina, extraídas del lecho vascular pulmonar, se descongelaron en hielo inmediatamente antes de su análisis. Se tomaron 10 µl con una microjeringa y se introdujeron al equipo de HPLC. En este equipo la muestra pasa sucesivamente por un sistema atrapador de

fisostigmina, luego por una columna C18 y finalmente por una unidad IMER que contiene acetilcolinesterasa y colina oxidasa (Bionaltical System). Mediante este sistema, toda la acetilcolina presente en la muestra es hidrolizada por la primera enzima en acetato y colina y, posteriormente, la colina es oxidada por la colina oxidasa en betaína y peróxido. Este último elemento (peróxido) es registrado por un detector electroquímico (Lc-4C, Bioanalytical System, West Lafayette, IN). Cuando existe colina en la muestra, ésta también puede ser detectada al entrar a la segunda reacción enzimática (colina oxidasa). Sin embargo, los picos de elusión de la acetilcolina y colina son diferentes, lo que permite su identificación por separado. La información obtenida fue analizada y almacenada mediante el programa específico. El tiempo de la corrida de la muestra fue de 20 min a una presión de 115-130 mmHg. Los tiempos de retención (donde aparecían los picos correspondientes a acetilcolina y colina) se corroboraron previamente durante la elaboración de las curvas estándar de ambos compuestos, y fueron de 9.5 y 13.6 min, respectivamente. Después de obtener el cromatograma (figura 5) se determinó la altura de cada pico mediante el programa computacional y los resultados se compararon con curvas estándar de acetilcolina y colina, elaboradas a partir de concentraciones conocidas de estos compuestos y procesadas en el HPLC de la misma forma que las muestras.



*Figura 5. Ejemplo de cromatograma (HPLC) donde se observan los picos correspondientes a correspondientes a acetilcolina (A) y colina (B) tomados durante la elaboración de las curvas estándar de ambos compuestos. En la parte superior de cada pico se señalan los tiempos de retención que fueron de 9.5 y 13.6 min, respectivamente.*

### *Reactivos empleados*

La aprotinina y el cloruro de xilacina fueron adquiridos como productos comerciales de venta en farmacias (Trasylo<sup>®</sup> y Rompum<sup>®</sup>, respectivamente, Bayer de México). La albúmina bovina, la acetilcolina, la fisostigmina y reactivos diversos fueron comprados de Sigma México.

La solución HTK fue donada por Comercializadora Mex-Mundo SA, México. La solución UW se obtuvo del Instituto Nacional de la Nutrición y Ciencias Médicas Salvador Zubirán.

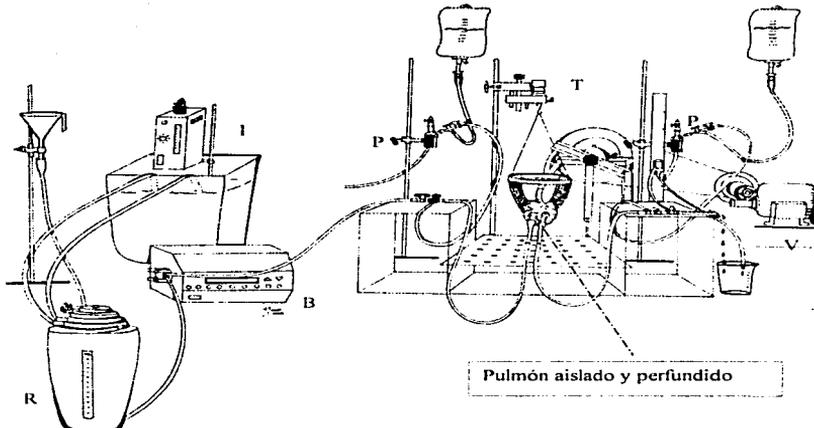
### *Análisis estadístico*

Los datos referentes a la permeabilidad capilar (mKf.c) siguieron una distribución no normal, por lo que se usaron pruebas estadísticas no paramétricas. Así, estos datos fueron analizados en forma descriptiva a través de medianas y extremos, y en forma comparativa por el análisis de varianza no paramétrico de Krustal-Wallis, seguido por la prueba U de Mann-Whitney. Los datos correspondientes a las concentraciones de acetilcolina y sustancia P fueron analizados por análisis de varianza y prueba t de Student para datos pareados. Las comparaciones múltiples fueron corregidas por el método de Bonferroni. La significancia estadística se fijó a una  $p < 0.05$  unimarginal.

## **RESULTADOS**

El primer objetivo del trabajo se cumplió al poder implementar con material ya instalado en nuestro laboratorio la técnica de pulmón aislado y perfundido de conejo, la cual utilizamos como herramienta metodológica para estudiar y evaluar el efecto de la preservación pulmonar sobre la generación de edema. Las principales adaptaciones que se hicieron a la técnica, en comparación con los equipos comerciales o con las técnicas descritas en otros países, fueron las siguientes (figura 6): 1) Encontramos que un oxigenador de burbujas, de los empleados en cirugía cardíaca, funcionó bien como reservorio y atrapador de aire. 2) Las llaves electromagnéticas que suelen usarse en otros modelos fueron sustituidas por llaves de tres vías, montadas sobre un estructura de acrílico, que además sirvió de soporte para las mangueras, para que no influyeran sobre el peso de la preparación. 3) La oclusión parcial del retorno venoso, que en otros modelos se realiza

manualmente, la logramos mediante una columna de 10 cm de altura que desembocaba a un extremo abierto, hacia la cual se desviaba el flujo mediante una llave de tres vías. Esto nos permitió aumentar la presión a 10 cmH<sub>2</sub>O de manera estable durante todo el tiempo requerido. 4) Encontramos que la suspensión del bloque cardiopulmonar en una hamaca de Marlex nos permitió mantenerlo en posición anatómica, de forma tal que evitaba dobleces (y obstrucciones parciales o totales) de los vasos sanguíneos por una mala posición.



*Figura. 6* Equipo de pulmón aislado y perfundido de conejo, desarrollado en nuestro laboratorio. Consiste de transductores de presión (P) y fuerza tensil (T), bomba peristáltica (B), reservorio (R), intercambiador de temperatura (I) y ventilador (V).

Con respecto a la evaluación de las diferentes condiciones de preservación pulmonar (figura 7), encontramos que el  $mKf_c$  en el grupo control (inmediatamente después de la extracción del pulmón) fue de  $1.96 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{cmH}_2\text{O}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$  (extremos de 1.21-6.93). En comparación con estos valores, los observados en las preparaciones preservadas con SSF, sangre y UW fueron significativamente más elevados [9.34 (3.59-19.82),  $p = 0.005$ ; 11.90 (5.49-17.55),  $p = 0.04$ ; y 13.34 (3.25-23.72),  $p = 0.009$ , respectivamente]. Por su parte, los  $mKf_c$  en el grupo HTK no alcanzaron diferencias estadísticamente significativas 7.11 (1.32-41.18),  $p = 0.11$ , con respecto al grupo control. En el grupo HTK uno de los valores fue excesivamente alto, sin que se pudiera encontrar una explicación satisfactoria. Aun si se elimina este posible valor extremo (*outlier*), el grupo se mantiene sin diferencia estadística con respecto al control ( $p = 0.20$ ).

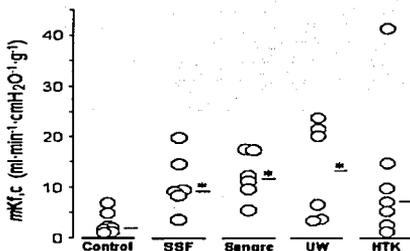
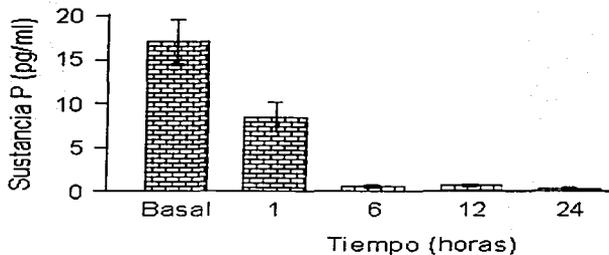


Figura 7. Se muestran los resultados de los coeficientes de filtración capilar modificado ( $mKf_c$ ) en pulmones preservados por 12 h en las diferentes condiciones.

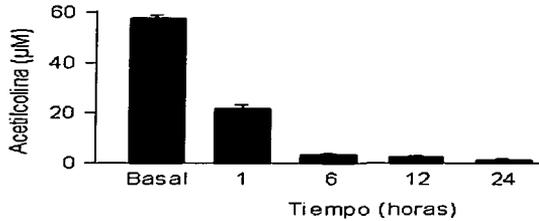
Finalmente, en cuanto a la determinación de neurotransmisores se encontró que tanto para la sustancia P como para la acetilcolina la mayor producción ocurría durante la primera hora de preservación, con una disminución paulatina en función del tiempo (figuras 8 , 9 y 10). Cabe notar que, en el caso de la determinación de acetilcolina, a pesar de la presencia constante de fisoligmina en las muestras se detectó una mucho mayor cantidad de colina que de acetilcolina.

Puesto que esta colina es producto de la hidrólisis de la acetilcolina, se decidió sumar ambos resultados en cada tiempo de preservación.

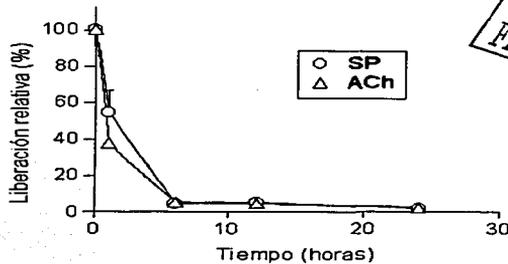


*Figura 8. Tasa de producción de sustancia P en pulmones preservados por 24 horas a 4 °C. Cada barra corresponde al (promedio ± ee) del neurotransmisor (SP) acumulado desde el momento en que se toma la muestra previa hasta el tiempo señalado, excepto en el periodo basal que corresponde a los primeros 15 min de preservación*

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



*Figura 9. Tasa de producción de acetilcolina en pulmones preservados por 24 horas a 4 °C. Cada barra corresponde al (promedio ± es) del neurotransmisor (ACh) acumulado desde el momento en que se tomó la muestra previa hasta el tiempo señalado, excepto en el periodo basal que corresponde a los primeros 15 min de preservación.*



*Figura 10. Liberación relativa de ambos neurotransmisores en pulmones preservados por 24 horas a 4 °C. La explicación sobre los tiempos aparecen en la Fig. 8*

## DISCUSION

El trasplante pulmonar es una alternativa terapéutica para los pacientes con enfermedad pulmonar terminal, ya que actualmente se han superado los problemas relacionados con la técnica quirúrgica, el cuidado postoperatorio y la terapia inmunosupresora. Sin embargo, su aplicación clínica es todavía limitada (Kelly 2000) debido a factores de diferente índole:

En muchos países uno de los principales factores que limita la aplicación de un trasplante pulmonar es la escasez de donadores. Al menos en México no existe una cultura de donación de órganos y, aunque hay intentos de introducir en la opinión pública este concepto a través de diversos medios de comunicación, sus resultados son aún desalentadores. Además, los pocos candidatos deben cubrir ciertos requisitos para ser considerados como posibles donadores de pulmón, como es el tener un pulmón funcional y libre de infección (Santillan y col. 1993). En este sentido, la complicación más relevante de la muerte cerebral es la formación de edema pulmonar neurogénico, y los largos periodos de intubación traqueal y ventilación mecánica asistida a los que están sometidos los posibles donadores hacen que sea muy alta la posibilidad de encontrar una infección pulmonar activa (Torre y col. 1991).

Además a la escasez de donadores, no existe un método de preservación pulmonar óptimo. Se han realizado innumerables investigaciones en las que se modifican ampliamente los métodos, técnicas y soluciones de preservación, siempre con el fin de proteger al pulmón durante la isquemia. Sin embargo, los resultados han sido controversiales (Muller y col. 1997, Kelly 2000). Por lo tanto, el estudio de los métodos de preservación del pulmón sigue siendo una línea de investigación de gran importancia.

### *Diseño de la preparación de pulmón aislado y perfundido*

Uno de los primeros objetivos del presente trabajo fue el intentar desarrollar el modelo de pulmón aislado y perfundido de conejo con la infraestructura disponible en nuestro laboratorio. Se realizaron diversas adaptaciones que, en general, tuvieron un excelente desempeño, lográndose

registros confiables y muy parecidos a los publicados por diversos laboratorios de otros países. Los cambios que consideramos más importantes son los siguientes.

1. Encontramos que un oxigenador de burbujas, de los empleados en cirugía cardíaca, funcionó bien como reservorio y atrapador de aire y tuvo la ventaja adicional de que se podía introducir fácilmente un catéter para burbujear con  $\text{CO}_2$  la solución de Krebs-ringer-bicarbonato, con el fin de acidificarla en caso necesario, y por una de sus llaves de tres vías se podía tomar muestras para corroborar el pH. Además, el oxigenador tiene un serpentín de teflón en contacto con la solución de Krebs-ringer-bicarbonato por el que circula agua caliente que permite tener a  $37^\circ\text{C}$  la solución, aunque para ello se requirió un recirculador térmico. Aunque el uso de este tipo de oxigenadores en experimentos animales se inició en los años 90 (Kuratani y col. 1992), hasta antes de iniciar el presente trabajo no se había empleado en la preparación de pulmón aislado y perfundido. Sin embargo, en 1998 apareció ya una publicación en la que los autores le dan este uso al oxigenador (Detry y col. 1998).
2. Colocamos una malla de Marlex<sup>SM</sup> en un aro plástico, a manera de una hamaca, con la finalidad de colocar el bloque cardiopulmonar sobre ésta y ponerlo en una posición más anatómica. Este detalle fue importante porque en otras posiciones (por ejemplo, poniéndolo sobre una superficie plana) frecuentemente ocurría oclusión parcial de los grandes vasos, modificando artificialmente las presiones registradas. Esta hamaca fue colgada en el transductor de fuerza tensil para poder registrar los cambios de peso durante las mediciones del mKf.c. La malla tiene la ventaja de poder usarla en repetidas ocasiones.
3. En lugar de llaves electromagnéticas para la oclusión arterial y venosa, empleamos llaves de tres vías, las cuales estuvieron fijas a un soporte de acrílico, diseñado para evitar vibraciones durante las maniobras de oclusión. Este soporte sirvió además para que las mangueras del circuito se asentaran en su base y no influyera en el peso del pulmón.
4. En otros equipos la elevación transitoria de la presión venosa se realiza ocluyendo parcialmente con una pinza el tubo correspondiente. Esta maniobra, al ser hecha de forma manual, dificulta mantener constante la elevación de la presión y ocasiona riesgo de vibraciones que influyen en el peso del pulmón. Para evitar esto, derivamos el flujo venoso (con una llave de tres vías) hacia una manguera de 10 cm de altura con el extremo superior abierto hacia un sistema de cascada, recolectando el líquido de perfusión para su reintegración al circuito. Este diseño permitió que la maniobra de incrementar la presión venosa se hiciera con mucha precisión durante tres minutos requeridos para medir el mKf.c.

***Evaluación de la solución HTK***

En el contexto del trasplante pulmonar en humanos, una vez que se extrae el pulmón frecuentemente ocurre daño celular endotelial, con desestabilización de las membranas celular y mitocondrial y liberación de enzimas proteolíticas. A fin de disminuir este tipo de daños durante la preservación se han utilizado soluciones especiales para la preservación. Si nuestros resultados en conejos pueden ser extrapolados al humano, el presente trabajo sugiere que la solución HTK podría ser una buena opción para las procuraciones pulmonares, ya que mostró una clara tendencia a mantener valores de mKf.c cercanos a los del grupo control, incluso ligeramente menores que los obtenidos con otras soluciones habitualmente empleadas para la preservación pulmonar, como la solución UW. Entre los pulmones que se preservaron con HTK, uno presentó un mKf.e excesivamente alto. Aunque este valor extremo (*outlier*) podría haber originado una mayor dispersión y, por lo tanto, explicar la ausencia de diferencias con el grupo control, este no fue el caso, ya que las pruebas empleadas fueron no paramétricas (que solo juzgan la posición relativa o jerarquía, con respecto a los demás valores del grupo). Además, la eliminación de este valor extremo no modificó las conclusiones. Nuestros resultados concuerdan con un estudio hecho en primates (Van Gulik y col. 1993), en el que la solución HTK fue comparada con la solución UW para preservar el bloque cardiopulmonar. Los autores encontraron que ambas soluciones tuvieron una eficacia similar después de preservar el bloque por más de 20 h. Sin embargo, morfológicamente pulmones preservados en solución HTK presentaron un menor daño ultraestructural (Human y col. 1993).

Los posibles mecanismos por los cuales la solución HTK ejerce un efecto benéfico sobre el órgano preservado, así como la descripción de sus componentes, se comentan en el **anexo I**.

Actualmente la solución HTK se ha ganado un lugar como una herramienta exitosa para la preservación multiorgánica para trasplante de corazón, hígado y riñón, además de que se utiliza como solución cardiopléjica en la cirugía de corazón abierto. Sin embargo, hasta donde sabemos la solución HTK no se había utilizado para preservar solamente pulmón (Bretschneider HJ 1980) A la luz de nuestros resultados, consideramos que es conveniente realizar mayores estudios con solución HTK para evaluar su efectividad en el trasplante de pulmón en el ser humano

### *Liberación de neurotransmisores*

El daño pulmonar por isquemia-reperusión está asociado a la lesión de las células endoteliales, con el consiguiente incremento de la permeabilidad vascular y producción de edema intersticial y/o alveolar (Andrade y col. 2000). En el organismo humano la isquemia-reperusión genera especies reactivas de oxígeno (ERO), que a su vez producen peroxidación de lípidos de membrana, factor que es determinante en el mecanismo de daño endotelial. Así mismo, los ERO producen modificaciones de las proteínas (enzimas, receptores, proteínas de canales) asociadas con estos lípidos, lo cual provoca trastornos de los sistemas de transporte con aumento en la permeabilidad para algunos elementos como el calcio.

Nosotros especulamos que uno de los primeros tejidos en sufrir el daño por isquemia en el pulmón donado es el tejido nervioso, lo que podría causar la liberación de mediadores capaces de influir sobre la permeabilidad vascular. En el presente estudio pudimos comprobar que la acetilcolina y la sustancia P tuvieron su mayor liberación en la primera hora de isquemia, con una disminución exponencial conforme pasan las horas. Hasta donde sabemos, este es el primer estudio que demuestra dicha liberación de neurotransmisores durante la preservación pulmonar. Si estos neurotransmisores realmente están involucrados en los cambios de permeabilidad, a primera vista nuestros resultados sugerirían que el mayor daño pulmonar debería ocurrir en las primeras horas después de la procuración del órgano, lo que es contrario a la experiencia clínica que corrobora que la viabilidad del pulmón se mantiene en las primeras 6 h, deteriorándose posteriormente. Para explicar esta paradoja, es importante señalar que nuestras mediciones se hicieron bajo condiciones donde el metabolismo de estos neurotransmisores estaba bloqueado, lo que permitió su acumulación en el lecho vascular pulmonar. En condiciones naturales es muy probable que tanto la acetilcolina como la sustancia P sean degradadas rápidamente por los sistemas enzimáticos correspondientes (ACE y NEP, respectivamente), y que sólo cuando estos sistemas se ven agotados pueda sobrevenir el daño pulmonar. Esta posibilidad se refuerza por el hallazgo reciente de Carpenter y Stenmark (2001), quienes encontraron que la hipoxia en ratas jóvenes disminuye la expresión de NEP, que a su vez se correlaciona con un incremento de la permeabilidad vascular. En este estudio, los autores pusieron a ratas recién destetadas bajo un ambiente hipóxico (fracción inspirada de oxígeno del 10%) durante 72 h. Ellos encontraron que a las 12 h de hipoxia había una disminución significativa de la transcripción del mRNA de la NEP.

medida mediante RT-PCR, así como una disminución progresiva de la actividad de la NEP, evaluada por ensayo fluorométrico, que alcanzó significancia estadística a las 24 h. Además, los autores demostraron por inmunohistoquímica que la NEP perivascular disminuía a las 24 h y prácticamente desaparecía a las 48 h. Interesantemente, mientras más disminuía la actividad de la NEP más se incrementaba la permeabilidad vascular (medida por el método de azul de Evans). Este cambio de la permeabilidad fue revertido administrando NEP recombinante o antagonistas de la sustancia P.

Por lo anterior, una probable hipótesis que explica los cambios de permeabilidad observados en el pulmón durante la preservación es la siguiente. Inmediatamente después de la procuración del órgano existe una liberación de acetilcolina y sustancia P cuyo efecto nocivo sobre la permeabilidad vascular se ve adecuadamente contrarrestado por los sistemas enzimáticos respectivos. Al pasar las horas, estos sistemas enzimáticos van perdiendo progresivamente su eficacia, lo que permite entonces que los neurotransmisores, aunque liberados ya en menor cantidad, tengan un efecto sobre la red capilar, incrementando su permeabilidad. Esta hipótesis deberá ser corroborada con estudios futuros, en especial utilizando bloqueadores de la acetilcolinesterasa y/o de la NEP.

## CONCLUSIONES

1. Es posible desarrollar el modelo de pulmón aislado y perfundido con equipo de uso habitual en laboratorios de fisiología.
2. La solución HTK parece tener un efecto benéfico sobre los cambios de permeabilidad vascular durante la preservación pulmonar.
3. Después de la procuración pulmonar hay una liberación de acetilcolina y sustancia P que disminuye progresivamente conforme pasan las horas.

## REFERENCIAS

- Aoe M, Okabayashi K, Cooper JD, Patterson GA. Hyperinflation of canine lung allografts during storage increases reperfusion pulmonary edema. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1996; 112:94-101.
- Andrade RS, Wangenstein OD, Jo JK, Tsai MY, Bolman RM III. Effect of hypothermic pulmonary artery flushing on capillary filtration coefficient. *Transplantation* 2000; 70:267-271.
- Baker CJ, Quardt SM, Kim JD, Darbinian SH, Starnes VA, Barr ML. A novel paracorporeal method for isolated rodent lung reperfusion. *Transplantation* 2001; 71:1244-1248.
- Barnes PJ, Baraniuk JN, Belvisi MG. Neuropeptides in the respiratory tract. *Am Rev Respir Dis* 1991; 144:1187-98.
- Bretschneider HJ. Myocardial protection. *Thorac Cardiovasc Surg* 1980;28:295-302.
- Belzer F, Southard JH Principles of solid organ preservation by cold storage. *Transplantation* 1988;45:673-676.
- Carpenter T, Stenmark KR. Hypoxia decreases lung neprilysin expression and increases pulmonary vascular leak. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001; 281:L941-948.
- Calhoun JH, Grover FL, Gibbons WJ, Bryan CL, Levine SM, Bailey SR, Nichols L, Lum C, Trinkle JK. Single lung transplantation alternative indications and technique. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1991; 101:816-825.
- Cooper JD, Vreim CE. Biology of lung preservation for transplantation *Am Rev Respir Dis* 1992; 146:803-807.
- Chien S, Zhang F, Niu W, Tseng MT, Gray L Jr. Comparison of University of Wisconsin, Eurocollins, low potassium dextran, and Krebs-Henseleit solutions for hypothermic lung preservation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2000; 119:921-930.
- Chiag CH. Comparison of effectiveness of intracellular and extracellular preservation solution on attenuation in ischemic-reperfusion lung injury in rats. *J Formos Med Assoc* 2001; 100:233-239.
- Chae Hyo P, Hoffman A, Kiser C, Egan T. Pulmonary preservation solutions: Effects on endothelial function and pulmonary energetics. *Chest* 1998; 114:396-398

Delaunois A, Gustin P, Ansay M. Altered capillary filtration coefficient in parathion and paraoxon-induced edema in isolated and perfused rabbit lungs. **Toxicol Appl Pharmacol** 1992; 116:161-169.

Delaunois A, Gustin P, Garbag M, Ansay M. Modulation of acetylcholine, capsaicin and substance P effects by histamine H<sub>1</sub> receptors in isolated perfused rabbit lungs. **Eur J Pharmacol** 1995; 227:243-250.

Delaunois A, Gustin P, Ansay M. Effects of capsaicin on the endothelial permeability in isolated and perfused rabbit lungs. **Fundam Clin Pharmacol** 1993; 7:81-91.

Delaunois A, Gustin P, Ansay M. Multiple muscarinic receptor subtypes mediating pulmonary edema in the rabbit. **Pulmonary Pharmacol** 1994b; 7:185-193.

Delaunois A, Gustin P, Ansay M. Modulatory effect of neuropeptide Y on acetylcholine-induced edema and vasoconstriction in isolated perfused lungs of rabbit. **Br J Pharmacol** 1994a; 113:973-981.

Drake R, Gaar KA, Tylor E. Estimation of the filtration coefficient of pulmonary exchange vessel. **Am J Physiol** 1978; 243:H266-H274.

D'Armini AM, Roberts CS, Griffith PK, Lemasters JJ, Egan TM. When does the lung die? I. Histochemical evidence of pulmonary viability after "death". **J Heart Lung Transplant** 1994; 13:741-747.

Dossari GA, Shumway SJ. Comparative study of solution for pulmonary preservation using an isolated rabbit lung model. **J Surg Res** 1998; 75:187-191.

Detry O, Willet K, Lambermont B, Meurisse M, Pincemail P, Serteyn D, Lamy M, Defraigne JO, Sluse FE. Comparative effects of University of Wisconsin and Euro-Collins solutions on pulmonary mitochondrial function after ischemia and reperfusion. **Transplantation** 1998;65:161-166.

Erhard J, Lange R, Scherer R, Eigler F. Experiences with histidine-tryptophan ketoglutarate-perfused organs in clinical liver transplantation. **Transplat. Proc** 1993;25:1885-1886.

Erhard J, Lange R, Scherer R, Kox WJ, Bretschneider H, et al. Comparison of histidine-tryptophan-ketoglutarate (HTK) solution versus University of Wisconsin solution for organ preservation in human liver transplantation. **Transpl Int** 1994;7:171-177

Fukuse T, Hirata T, Nakamura T, Ueda M, Kawashima M, Hitomi S, Wada H. Role of saccharides on lung preservation. **Transplantation** 1999; 68:110-117.

Fukuse T, Hirata T, Ishikawa S, Shoji T, Yoshimura T, Chen Q, Matsukura T, Hanaoka N, Wada H. Optimal alveolar oxygen concentration for cold storage of the lung. **Transplantation** 2001; 72:300-304.

Gustin P, Urbain B, Delaunois A, Zeimes K, Ansay M. Permeability of the endothelium and partitioning of the pulmonary blood flow resistance in isolated perfused pig lungs: effect of breed and age. **Vet Res Comm** 1992; 16:69-82.

US National Research Council. Guía para el cuidado y uso de los animales de laboratorio. 1a Ed., México: Academia Mexicana de Medicina, 1999.

Guyton AC, Hall JE. Human physiology and mechanism of disease. 6ta. ed. Philadelphia: WB Saunders, 1997.

Hakim TS. Identification of constriction in large vs. small vessels using the arterial-venous and the double-occlusion techniques in isolated canine lungs. **Respiration** 1988; 54:61-69.

Hakim TS, Kelly S. Occlusion pressures vs. micropipette pressures in the pulmonary circulation. **J Appl Physiol** 1989; 67:1277-1285.

Haniuda M, Hasegawa S, Shiraiishi T, Dresler CM, Cooper JD, Patterson GA. Effects of inflammation volume during lung preservation on pulmonary capillary permeability. **J Thorac Cardiovasc Surg** 1996; 112:85-93.

Hachida M, Morton DL. The protection of ischemic lung with verapamil and hydralazine. **J Thorac Cardiovasc Surg** 1988;95:178-183.

Hardy JD, Webb WR, Dalton ML, Walker GR. Lung homotransplantations in man. **JAMA** 1963; 186:1065-1074.

Human P, Jurgen H, Vosloo S. Extended cardiopulmonary preservation: University of Wisconsin solution versus Bretschneider's cardioplegic solution. **Ann Thorac Surg** 1993; 55:1123-1130.

Kuratani T, Matsuda H, Sawa Y, Kaneko M, Nakamo S, Kawashima Y. Experimental study in a rabbit model of ischemia-reperfusion lung injury during cardiopulmonary bypass. **J Thorac Cardiovasc. Surg.** 1992;103: 564-567.

Nagahiro I, Aoe M, Yamashita M, Date H, Andou A Shimizu N. EPC-K is effective in lung preservation in an ex vivo rabbit lung perfusion model. **Ann. Thorac. Surgeons** 1997;63:954-959.

Joose G, Pauwels R, Van Der Straeten M. The role of neuropeptides as neurotransmitters of non-adrenergic, non-cholinergic nerves in bronchial asthma. **Bull Eur Physiopath Respir** 1988;23:619-637.

Kelly RF. Current strategies in lung preservation. **J Lab Clin Med** 2000;136:427-440.

Kermit A, Gaar Jr, Aubrey ET, Jennigs O and Gyton A. Pulmonary capillary pressure and filtration coefficient in the isolated perfused lung. **Am. J. Physiol.** 1967; 213:910-914.

King RC, Binns OA, Kanithanon RC, Cope JT, Chun RL, Shockey KS, Tribble CG, Kron IL. A cellular low-potassium dextran preserves pulmonary function after 48 hour of ischemia. **Ann Thorac Surg** 1997;64:795-800.

Lundberg JM, Harenkrug, J, Hokfelt T et al. Coexistence of peptide histidine isoleucine (PHI) and VIP in nerves regulating blood flow and bronchial smooth muscle tone in various mammals including man. **Peptides** 1983; 5:593-596.

Martins MA, Shore SA, Gerad NP, Gerald C Drazen JM. Peptidase modulation of the pulmonary effects of tachykinins in tracheal superfused guinea pig lungs. **J Clin Invest** 1990; 85:170-176.

Muhlbacher F, Langer F, Mittermayer C. Preservation solutions for transplantation. **Transplant Proc** 1999; 31: 2069-2070.

Muller C, Hoffman H, Bittman I, et al Hypothermic storage alone in lung preservation for transplantation: a metabolic, light microscopic and functional analysis after 18 hour of preservation. **Transplantation** 1997;63:625-630.

DeLima NF, Binns OA, Buchanan SA, Cope JT, Mauney MC, Shockey KS y col. Low-potassium solution for lung preservation in the setting of high flow reperfusion. **Ann Thorac Surg** 1996a; 61: 973-976.

DeLima NF, Binns OA, Buchanan SA, Mauney MC, Cope JT, Shockey KS y col. Euro-Collins solution exacerbates lung injury in the setting of high flow reperfusion. **J Thorac Cardiovasc Surg** 1996b; 112: 111-115.

Parker J, Kvietys P, Ryan K. Comparison of isogravimetric and venous occlusion capillary pressures in isolated dog lung. *J. Appl. Physiol* 1983;55:964-968.

Rooney SJ, Levine AJ, Parkes K, Revell M, Shimada I, Bonser RS. Differential time scale of fluid and solute permeability following hypothermic lung preservation. *J. Heart Lung Transplant* 2000;19:179-184.

Roberts RF, Nishanian GP, Carey JN, Darbinian SH, Kim JD, Sakamaki Y, et al. Addition of aprotinin to organ preservation solutions decreases lung reperfusion injury. *Ann Thorac Surg* 1998; 66:225-230.

Sasaki S, Yasuda K, Cicero L. Reliable 18-hour lung preservation with University of Wisconsin solution. An ex vivo rat model with a pulsatile perfusion systems. *Jpn J. Thorac Cardiovasc Surg* 1999;47:99-103.

Santillan P, Jasso R, Diliz H, Rojas, Bordes A, Dib A, Villalba J. Lung procurement in Mexico. *Transpl. Proc.* 1993;25: 3139-3140.

Santillan Doherty P, Odor Morales A, Jasso R, Selman M, Gaxiola M, Lopez R et al. Urinary thromboxane B<sub>2</sub> as an indicator of acute rejection in lung allotransplantation *Transplantation* 1988;45:852-856.

Segura P, Chavez J, Montaña LM, Vargas MH, Delaunoy A, Carbajal V, Gustin P. Identification of mechanisms involved in the acute airway toxicity induced by parathion. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1999;6:699-710.

Sotres A, Jasso R, Olmos R, Arreola JL, Garcia D, Santillan P. Lung preservation with glucose-insulin-potassium: a solution for developing countries? *Transpl Proc* 1993; 25: 3040-3041

Takigami K, Sasaki S, Shiiya N, Kagwasaki M, Takeuchi E, Yasuda K. Evaluation of 18 hour preservation with oxygenated blood for optimal oxygen delivery. *Ann. Thorac. Surg.* 1998;66:362-366.

Tanaka DT, Grunstein MM. Mechanisms of substance P-induced contraction of rabbit airway smooth muscle. *J Appl Physiol* 1984; 57: 1551-1557.

Van Gulik T, Nio C, Cortissoos E, Klopffer P, Vander Heyde. Comparison of HTK solutions UW solutions in 24 and 48 hours preservation of canine hepatic allografts. *Transpl. Proc* 1993;25:2554.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Witter T, Fehreback A, Meyer D, Brandes H, Albes J, Richter J, Wahlers T. Retrograde flush perfusion with low-potassium solution for improvement of experimental pulmonary preservation. *J Heart Lung Transpl* 2000; 19:977-983.

Torre W, Gomez-Fleitas. Preservación prolongada del pulmón para el trasplante pulmonar. *Arch Bronconeumol* 1991;27:32-40.

Townsley MI, Korthuis RJ, Rippe B, Parker JC, Taylor AE. Validation of double vascular occlusion method for PC in lung and skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 1986; 1:127-132

Veith FJ, Kamholz SL, Mollenkopf FP, Montefusco CM. Lung transplantation 1983. *Transplantation* 1983;4:271-278.

Walmarth DR, König C, Ernest H, Bruckner F, Grimmiger, W, Seeger. Ventilation - perfusion relationships in isolated blood-free perfused rabbit lung. *J Appl. Physiol* 1992;72:374-382.

Wescott JY, McDonnell TJ, Bostwick P and Voelkel NF. Eicosanoid production in isolated perfused lung stimulated by calcium ionophore A23187. *Am. Rev. Respir Dis* 1988;138:895-900.

Witter T, Wahlers T, Cornelius JF, Elki S, Haverich A. Celsior solution for improvement of currently used clinical standards of lung preservation in an ex vivo rat model. *Eur. J. Cardiothorac Surg* 1999;15:667-671.

Wright NC, Hopkinson DN, Shaw TE, Hooper TL. 24-hour lung preservation: simplified versus conventional University of Wisconsin solution in a porcine model. *Transplantation* 2000;69:1261-1265.

## ANEXO I

## COMPONENTES DE LAS SOLUCIONES

## Solución HTK (también llamada solución de Bretschneider o Custodial®)

Cantidad en 1000 ml	Componente	Concentración (mmol/L)
0.8766 g	NaCl	15
0.6710 g	KCl	9
0.1842 g	Bi-2 ectoglutarato potásico	1
0.8312 g	MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	4
3.7773 g	Histidina HCl · H <sub>2</sub> O	18
27.928 g	Histidina	180
0.4085 g	Triptófano	2
5.4651 g	Manitol	30
0.0022 g	Cloruro de calcio	0.015
50 mEq	Cl <sup>-</sup>	
<i>PH 7.4, osmolaridad 310 mOsm/L</i>		

La solución HTK es una de las mezclas comerciales más usadas en la preservación multiorgánica, especialmente para la preservación de órganos sólidos como corazón, hígado y riñón, además de ser usada como solución cardiopléjica durante la cirugía cardíaca (Hachida y col. 1996). Por lo tanto, la mayor parte de la discusión que se hace a continuación de las propiedades de cada uno de sus componentes está basada en órganos sólidos.

En la solución HTK la concentración de  $K^+$  extracelular, es baja, es suficiente para mantener estabilizada la membrana, pero al mismo tiempo, es capaz de contrarrestar el efecto "transitorio" de  $Ca^{2+}$  extracelular, hasta su completo equilibrio. El contenido de  $K^+$  de la solución es de 10 mmol/L, ligeramente superior al contenido normal del  $K^+$  extracelular (Hachida y col 1996). Cantidades superiores pueden producir efecto opuesto, es decir, despolarización, además de que, en el momento en que la solución de preservación se incorpore a la circulación sanguínea una vez terminada la intervención, las cantidades demasiado elevadas de  $K^+$  extracelular pueden excitar anormalmente las membranas celulares y, en el caso del corazón, puede dar lugar a arritmias (Bretschneider HJ 1980).

Los iones de  $Mg^{2+}$  actúan como antagonistas del calcio, por lo que al añadir a la solución la cantidad de 4 mmol/L, y junto con los niveles óptimos de  $K^+$  de 10 mmol/L, se provoca una disminución de la excitabilidad de la membrana celular (Belzaer F.y col 1988). Cantidades superiores de 6 mmol/L de  $Mg^{2+}$  pueden producir, al menos inicialmente, el efecto opuesto, es decir, pueden liberar parte del  $Ca^{2+}$  inactivo que se halla fijado a las proteínas (Belzaer F.y col 1988).

Es importante señalar que la solución tiene un pH 7.4, ya que una solución demasiado ácida podría, al igual que las concentraciones demasiado elevadas de  $Mg^{2+}$ , aumentar el  $Ca^{2+}$  libre extracelular al producir una liberación inicial del  $Ca^{2+}$  fijado en las proteínas (Erhard 1993).

Debido a la escasa concentración de la mayoría de los electrolitos, la solución HTK presentaría una escasa osmolaridad. Una solución de esta naturaleza (con osmolaridad menor a la del interior de la célula) provocaría la entrada de agua al interior de la célula y podría alterar la morfología normal de la misma, hincharla e incluso romperla (Guyton 1997). Además, durante la isquemia ocurre que, en lugar de los productos terminales aeróbicos ( $CO_2$  y agua) que no tienen efecto sobre la regulación osmótica, se acumulan grandes cantidades de ácido láctico, hidrogeniones y otros metabolitos que sí pueden ejercer poder osmótico. Estas sustancias deben ser expulsadas rápidamente de la célula para evitar la aparición de edema celular, y esto se lleva a cabo a través de un mecanismo de transporte que requiere consumo de energía y que se inactiva con la aparición de acidosis metabólica. Para reducir estos efectos y mantener la osmolaridad un alrededor de 300 mOsm/L, es decir, para que sea isosmótica como el plasma, se incluyó manitol en la solución HTK. El manitol es un compuesto metabólicamente inerte y no ejerce ninguna presión de sustrato que requiera una elevación del metabolismo energético por parte de las células, y no es incorporado a la célula a través de sistemas de transporte especiales que requieran un gasto energético (Erhard y col. 1994). Además, actúa como atrapador de radicales libres de

oxígeno, ejerciendo en consecuencia un efecto protector, sobre todo al comienzo de la perfusión. Finalmente la osmolaridad de la solución quedará en torno a 310 mOsm/L.

La histidina actúa como sustancia amortiguadora, y con ella se disminuye el riesgo de necrosis celular y se depletan menos los almacenes de ATP, lo que a su vez se traduce en una mejor y más inmediata función del órgano. Conforme el ácido láctico y los hidrogeniones se van produciendo en el interior de la célula van siendo expulsados al espacio extracelular, por lo que el pH del compartimiento extracelular se acidifica. Si el pH baja de 6 la bomba de ácido láctico e hidrogeniones se inactiva, con lo cual dichas sustancia se acumularán rápidamente, provocando un aumento de la osmolaridad de la célula, que absorberá agua, aumentando su volumen y alterando su morfología y su función. Además, el acumulo continuo de metabolitos en el interior de la célula harán que se bloquee la reacción de la glucólisis anaeróbica, con lo cual dejará de producirse energía y se irán agotando los depósitos de ATP, hasta caer por debajo del límite permitido, que es de 4  $\mu\text{mol/g}$  de peso; por debajo de este límite el órgano se considera irrecuperable.

De ahí que el principal objetivo de la histidina sea una correcta amortiguación del pH, que evite o retrase al máximo posible la acidificación. Esto permitiría prolongar el tiempo de isquemia al retrasar al final de la glucólisis anaeróbica, que es la responsable de proporcionar la energía necesaria a la célula durante la anoxia, y evitar o retrasar la aparición de lesiones irreparables de la estructura celular que impidan un normal funcionamiento del órgano después del trasplante.

El papel principal del triptofano es el de proteger a las membranas celulares impidiendo que las sustancias con gran poder osmótico y que se hallan en cantidades importantes en la solución, como es el caso de la histidina y el clorhidrato de histidina, puedan penetrar a la célula y alterar su osmolaridad.

El cetoglutarato es uno de los sustratos claves en el ciclo del ácido cítrico (ciclo de Krebs), ya que su descomposición en ácido succínico es el único paso de dicho ciclo en el que se obtiene energía en forma de ATP. Es también precursor del ácido glutámico, aminoácido protector de membranas celulares. En la solución HTK la cantidad utilizada proporciona el sustrato necesario para producir más energía durante el comienzo de la perfusión, antes de que la anaerobiosis se haya instaurado por completo; con ello la célula dispondrá de una cantidad extra de ATP, la que puede ser necesaria tanto para sobrevivir durante la isquemia como para empezar a funcionar de nuevo al final de la procuración.

Como es posible que no todo el cetoglutarato sea utilizado por las células antes que se instaure la anaerobiosis, el cetoglutarato sobrante puede incorporarse de nuevo ciclo de Krebs y proporcionar una energía extra que puede ser necesaria si el órgano ha consumido más de la debida durante la isquemia.

#### Solución de la Universidad de Wisconsin

Cantidad en 1000 ml	Componente	Concentración (mmol/L)
35.83 g	Lactobionato de potasio	100mM
3.4 g	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	25 mM
0.60 g	$\text{MgSO}_4$	5mM
5 ml	NaOH	5N
20 ml	KOH	5N
17.83 g	Rafinosa	30mM
1.3 g	Adenosina	5 mM
0.92g	Glutación	3 mM
0.136 g	Alopurinol	1 mM
50 g/L	Almidón	
pH 7.4, osmolaridad $320 \pm 10$ mOsm/L		

La solución de Wisconsin pretende no sólo prevenir el edema celular (con lactobionato y rafinosa, que mantienen el agua fuera de la célula), sino intentando minimizar las consecuencias de la reperusión (contiene glutatión y alopurinol para inhibir la formación de radicales libres de oxígeno) y ayudando a regenerar los ATPs perdidos (mediante fosfatos). De esta solución clásica se han propuesto diversas modificaciones. Se ha demostrado más efectiva en el hígado, páncreas y riñón (aunque con este también se puede usar, si el proceso va a ser rápido en el tiempo, la solución de Eurocollins, que es más asequible y económica). La solución de la universidad de Wisconsin se puede considerar como la solución estándar para la mayoría de los órganos.

**Solución salina**

Cantidad en 1000 ml	Componente	Concentración (mmol/L)
9 g	NaCl	150
<i>pH 7.4, osmolaridad 308 mOsm/L.</i>		



## Evaluation of the Vascular Permeability After 12-Hour Preservation of Rabbit Lungs in HTK Solution

J.L. Arreola, P. Segura, B. Vanda, and M.H. Vargas

**A**LTHOUGH LUNG transplantation has become an increasingly used therapeutic measure for end-stage pulmonary diseases, the shortage of donors is still a limiting factor in most countries. This problem is worsened by the fact that lungs are more susceptible to damage during the ischemic period than solid organs, and thus require a shorter preservation time to maintain its viability.<sup>1</sup> The development of solutions aimed to protect the pulmonary endothelial and pneumocyte cell functions and to extend the ischemic period has gained growing interest during the past decade. Among the most frequently used solutions for this purpose is the EuroCollins and the University of Wisconsin (UW) solutions.<sup>2</sup> Traditionally, single-flush perfusion and cold storage of donor lungs using EuroCollins or UW solution, with or without additives such as PGE<sub>2</sub> or calcium channel antagonists, have been the accepted standard procedure for pulmonary preservation.<sup>3</sup> By contrast, organs other than lungs a total perfusion medium is the Bretz-Schneider's histidine-tryptophan-ketoglutarate (HTK) solution.<sup>4</sup> With the use of this solution, preservation times for liver transplantation varies from 12 to 20 hours, while in kidney transplantation it is up to 48 to 72 hours.<sup>5</sup>

In this study we evaluated whether HTK solution represents a good alternative for maintaining the pulmonary endothelial function. For this purpose, the vascular permeability of rabbit lungs after 12-hour preservation was measured in the isolated perfused lung preparation.<sup>6</sup>

### MATERIALS AND METHODS

Male New Zealand white rabbits weighing 2.5 to 3.5 kg were purchased from farms belonging to the Faculty of Veterinary Medicine of the National Autonomous University of Mexico. They were kept in conventional conditions in our laboratory animal facilities for at least 20 days, where they were fed with Harlan pellets. Five groups of animals were used: control group ( $n = 7$ ), saline solution group (SS;  $n = 6$ ), intravascular blood group (IVB;  $n = 6$ ), University of Wisconsin solution group (UW;  $n = 6$ ), and histidine-tryptophan-ketoglutarate solution group (HTK;  $n = 7$ ). Protocol was approved by our institutional Scientific and Bioethics Committees.

Animals were premedicated with 1 mg/kg xylazine hydrochloride (Bayer de Mexico), followed by 28 mg/kg sodium pentobarbital (Salud y Bienestar Animal, Mexico) as anesthetics. The trachea of each animal was intubated and ventilated with a small-animal respirator (Harvard Apparatus, England). The chest was opened by

midsternal incision and 2000 U/kg heparin (Laboratorios Pesa, Mexico) was injected into the right ventricle before exsanguination. The heart-lungs block was rapidly removed from the chest, both ventricles were opened, and two glass cannulas were secured into the pulmonary artery and the left atrium, respectively. In these conditions, the whole heart-lungs block was weighed. At the end of the experiment the heart, great vessels and cannulas were weighed to know the initial weight of both lungs.

All isolated perfused lung preparations, except those from the IVB group, were flushed with the tested solution at 4°C until the blood remaining into the vascular bed was completely removed. Afterward, lungs were insufflated with three tidal volumes and tracheal cannula was clamped. In these conditions, the lungs were submerged into the tested solution and stored at 4°C until study. In the IVB group, lungs were left with their intravascular blood by clamping both pulmonary artery and left atrium cannulas, and stored at 4°C until saline solution for 12 hours. Control lungs were studied immediately after procurement.

According to the manufacturer, composition of HTK solution (Custodiol) was (mg/mL): NaCl 0.877, KCl 0.671, CaCl<sub>2</sub> 0.0422, potassium ketoglutarate 0.184, MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 0.833, histidine HCl · H<sub>2</sub>O 3.773, histidine 27.929, tryptophan 0.409, mannitol 5.465.

Every isolated perfused lung preparation was put in a Muller hamcock that was hung in a Grass FHO force displacement transducer (Grass, USA), so as to detect weight changes in a Grass model 7D polygraph. The pulmonary artery and left atrium cannulas were connected to a recirculating circuit to perfuse the lungs with a constant flow of 20 mL/min through an electronic roller pump (model NY-7550-62, Masterflex, USA). During the first minutes this flow was slightly modified to adjust the pulmonary artery pressure to a value around 20 to 25 cmH<sub>2</sub>O. The circuit included an opened reservoir containing 200 mL of perfusate and a bubble trap (Bentley 5 Oxygenator, Baxter, USA) and a heat exchanger. Care was taken to avoid introduction of air into the perfusate. Perfusate was a Krebs-Ringer-bicarbonate buffer containing (g/L): glucose 0.98, NaCl 6.90, KCl 0.354, CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O 0.1373,

From the Unidad de Investigación, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (J.L.A., P.S., M.H.V.), Departamento de Patología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México (B.V.), and Hospital de Pediatría, Centro Médico del Seguro Social, Instituto Mexicano del Seguro Social (M.H.V.), México DF, México.

Address reprint requests to Dr. Mano H. Vargas Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias CP 14080 México DF, México E-mail: mhvargas@conacyt.mx

46  
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

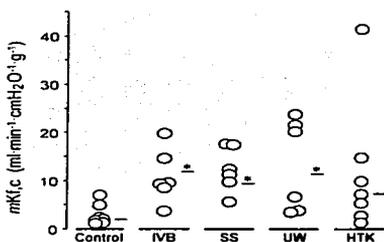


Fig. 1. Effect of different lung-preservation conditions on the modified capillary permeability coefficient (mKfC). Horizontal bars represent the median of each group. \* $P < .05$ .

MgSO<sub>4</sub> 0.293, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.162, NaHCO<sub>3</sub> 2.1, and 2.5% bovine albumin (Sigma Chemical Co, USA).

Arterial (Pa) and venous (Pv) pressures were measured by mean of two catheters connected to side ports of the pulmonary artery and left atrium cannulas, respectively, and to pressure transducers (P23A; Gould Statham, Grass, USA). Pressures were zero-referenced at the level of the lung hilus. Liquid in the venous reservoir was continually aerated with 95% carbon dioxide and 5% oxygen. Perturbate (pH 7.4) was frequently monitored and maintained within physiological ranges (7.4 to 7.5) by adding 1 N NaHCO<sub>3</sub> or by increasing the flow of the carbon dioxide oxygen mixture. Perturbate temperature was maintained at 37°C to 38°C.

The lungs were ventilated with humidified room air at a frequency of 45 strokes/min, 5 mL/kg tidal volume, and 2 cmH<sub>2</sub>O end expiratory pressure. They were also periodically hyperinflated to avoid atelectasis. Equilibrium of the preparation, obtained after 10 to 15 minutes, was characterized by an isovolumetric static, one in which no gain or loss of weight was observed, and by stability of arterial and left atrium pressures. All parameters were recorded on a 7D model Grass polygraph. Capillary pressure (Pc) was measured by using the double occlusion technique, in which a simultaneous clamping of both inflow and outflow pathways for up to 10 seconds induced an increase in Pv and a decrease in Pa, until these two pressures reached a steady state. In these conditions, pressure measured at the venous side was considered as a surrogate of Pc. Permeability of capillary bed was measured with a modified capillary titration coefficient (mKfC), as follows. A sudden increment of the Pv by 10 cmH<sub>2</sub>O was made through a partial obstruction of the venous side and maintained for 3 minutes. This causes a rapid increment of the lung weight due to vascular congestion for approximately 30 to 60 seconds, followed by a slower phase of lung weight gaining thereafter. This last phase is thought to represent fluid filtered across the capillary bed<sup>7</sup> and thus only lung weight increment occurring from 60 to 180 seconds after the beginning of the venous partial obstruction was considered for the mKfC measurement. At the end of the

3-minute period, and still with the venous obstruction, a second measurement of Pc was performed as described above. mKfC was expressed as mL · min<sup>-1</sup> · cmH<sub>2</sub>O<sup>-1</sup> · g<sup>-1</sup> (representing mL of fluid crossing the capillary bed (ie, lung weight gain, assuming that filtered fluid have a density of 1.0), per minute of venous obstruction, per Pc increment (before and during venous obstruction), and per g of lung tissue). To avoid the influence of ventilation on the weighing of the preparation, all measurements of mKfC were performed while the lungs were temporarily disconnected from the ventilator (3–4 minutes).

Data were assessed through nonparametric Kruskal-Wallis test, followed by pairwise Mann-Whitney's *U* tests. Multiple comparisons were corrected by the Bonferroni method. Statistical significance was set at one-tailed  $P < .05$ . Data in the text correspond to median and range.

## RESULTS

As can be seen in Fig 1, our results showed that compared with the mKfC measured immediately after lung procurement in the control group [1.96 (1.21 to 6.93) mL · min<sup>-1</sup> · cmH<sub>2</sub>O<sup>-1</sup> · g<sup>-1</sup>], those preparations preserved with IVB, SS, and UW solutions showed increased mKfC values 9.34 (3.59 to 19.82),  $P = .005$ ; 11.90 (5.49 to 17.55),  $P = .04$ ; and 13.34 (3.25 to 23.72),  $P = .009$ , respectively). By contrast, mKfC values found in preparations preserved with HTK solution [7.11 (1.32 to 41.18),  $P > .11$ ] did not differ from those observed in control group. This lack of difference persisted even if a possible outlier point was deleted.

## DISCUSSION

Lung transplantation is an increasingly performed therapeutic modality for terminal pulmonary diseases. Delineated preservation of donor lung is associated with endothelial cell damage, destabilization of mitochondrial and cell membranes, and proteolytic enzymes release.<sup>8</sup> Among conditions used with the aim to ameliorate such damage is the storage of donor lung in preservation solutions. In the present work we evaluated the permeability of pulmonary blood vessels after preservation with HTK solution and, though not optimal, we found that encouraging results were achieved by this solution. Our results are in line with a previous study<sup>9</sup> in primates, in which HTK solution was compared with UW solution for heart-lungs block transplantation in balloons. These authors found that preservation for up to 20 hours in either solution was equally effective for the success of the experimental heart-lung allotransplantation. However, from the morphological point of view the HTK solution seemed to yield better performance, since preservation in this solution was associated to less pulmonary ultrastructural derangement.

HTK solution has gained a well-established role into the therapeutic armamentarium for solid organ transplantation, along with its protective role as cardioplegic solution during open-heart surgery, but as far as we know it has not been employed in human lung transplantation, where other solutions such as UW and Eurocollins are often used. In the light of our results, further studies on the possible role of

17

TESIS CON  
FECHA DE OBTEN

HTK solution in the context of clinical lung transplantation are warranted.

REFERENCES

1. Snell GH, Rabinov M, Griffiths A, et al: J Heart Lung Transplant 15:160, 1996
2. Hopkinson DN, Dhabra MS, Hooper TL: J Heart Lung Transplant 17:525, 1998
3. Sasaki S, Yoneda K, Mc Cully JD, et al: J Heart Lung Transplant 18:127, 1999
4. Muhlbacher F, Langer F, Mittermayer C: Transplant Proc 31:2069, 1999
5. Bachida M: J Cardiovasc Surg 37:269, 1996
6. Delaunois A, Gustin P, Ansay M: Pulmonary Pharmacol 7:185, 1994
7. Gustin P, Urbain B, Delaunois A, et al: Vet Res Comm 16:69, 1992
8. Cooper JD, Vreim CE: Am Rev Respir Dis 146:803, 1992
9. Human PA, Hull J, Vosloo S, et al: Ann Thorac Surg 55:1123, 1993

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN