



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

## **POSGRADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCION ANIMAL Y DE LA SALUD ANIMAL**

Cuantificación del ácido siálico como indicador de la integridad de la barrera endotelial pulmonar en perfusión pulmonar *ex vivo* al comparar solución Steen® y solución dextrán baja en potasio enriquecida con albúmina (Cirex).

### **TESIS**

#### **QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCION ANIMAL Y DE LA SALUD ANIMAL**

##### **Presenta**

Javier Martínez Cortés

##### **Director de Tesis:**

Claudia Hernández Jiménez

**INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS “ISMAEL COSIO VILLEGAS”**

##### **Comité Tutorial:**

Juan Raúl Olmos Zúñiga

Sara del Carmen Caballero Chacón

Posgrado en Ciencias de la Producción Animal y de la Salud Animal

Ciudad Universitaria, CD. MX. Diciembre 2020



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

## **I. Agradecimientos.**

Dr. Rogelio Jasso Victoria, Dr. Juan Raúl Olmos Zúñiga quienes participaron en el desarrollo del modelo de PPEV.

La Dra. Matilde Baltazares Lipp, por su asesoría en la cuantificación y análisis del ácido siálico.

Roberto Rueda Juárez, quien ayudó en la AMV.

Al Dr. Miguel O. Gaxiola Gaxiola, por su participación en el análisis histológico.

A la Dra. Adriana Méndez Bernal, por su apoyo en el análisis de microscopía de transmisión.

## II. Resumen.

**Introducción.** El trasplante pulmonar es la alternativa de tratamiento en pacientes con enfermedad pulmonar grave. Sin embargo, el 50% de los pacientes muere a la espera de uno, entre otras razones por lesión del tejido pulmonar por complicaciones que sufre el donador, lo cual deriva en edema. La función de la barrera endotelial es un proceso esencial que garantiza la homeostasis del espacio vascular e intersticial. El ácido sílico (AS), es un componente estructural del endotelio, compuesto por sacáridos unidos a proteínas de membrana, y cuya participación en la permeabilidad puede darse a través de la liberación del AS. La Perfusión Pulmonar *ex vivo* (PPEV) es una alternativa para evaluar y reacondicionar pulmones no aptos para trasplante a través del uso de Solución Steen®, aunque el alto costo limita su uso. Por lo que en este trabajo se evaluó y comparó el efecto de la solución Steen® y solución dextrans baja en potasio enriquecida con albumina (Cirex) (realizada en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias) en pulmones porcinos sometidos a dos horas de perfusión *ex vivo*, a través de los cambios fisiológicos, y estructurales, así como el daño del GE a través de los niveles de ácido sílico (AS). **Material y Métodos.** Estudio prospectivo longitudinal en el que se utilizaron diez cerdos Landrace divididos en dos grupos: grupo I (n=5) perfusión con solución Steen®, y grupo II (n=5) perfusión con solución Cirex; se evaluaron durante 2 horas de PPEV. **Resultados.** Todos los bloques pulmonares fueron sometidos a PPEV sin complicaciones durante el tiempo de estudio. En ambos grupos los valores hemodinámicos y gasométricos se mantuvieron dentro de límites de referencia (ANDEVA MR p=NS). La distensibilidad estática (ANDEVA MR p = 0.017), Ppic, Raw, Paw (ANDEVA MR p<0.05), mostraron cambios en ambos grupos, sin rebasar rangos de referencia. Los dos grupos tuvieron el mismo grado de edema microscópico y cambios en la presencia del glicocálix endotelial, pero el grupo II tuvo mayor peso en el análisis gravimétrico (TS p=0.559). Los dos grupos mostraron incremento en las concentraciones de AS el cual fue únicamente significativo a la basal (p<0.05 T-Student) en el perfusato. **Conclusiones.** La PPEV de dos horas en un modelo porcino con solución de Steen o con solución Cirex no evitan la degradación del AS y GE, así como la presencia de edema radiológico y gravimétrico, sin embargo, no deterioran la histología, ni la función pulmonar.

**Palabras Clave:** perfusión pulmonar *ex vivo*, glicocálix endotelial, ácido sílico.

**Abstract.** Lung transplantation is the treatment alternative in patients with severe lung disease. However, 50% of patients die waiting for one, among other reasons for lung tissue injury due to complications suffered by the donor, which results in lung edema. The function of the endothelial barrier is an essential process that guarantees homeostasis of the vascular and interstitial space. The function of the endothelial barrier is an essential process that guarantees homeostasis of the vascular and interstitial space. Salic acid (SA), is a structural component of the endothelium, composed of saccharides bound to membrane proteins, and whose participation in permeability can occur through the release of SA. *Ex Vivo Lung Perfusion* (EVLP) is an alternative to evaluate and recondition unviable lungs for transplantation through the use of Steen® Solution, although its high cost limits its use. In this experimental trial, were evaluated and compared the STEEN® solution's and low potassium dextrán solution enriched with albumin (Cirex) effects in porcine lungs during two hours in ex vivo lung perfusion (performed at the National Institute of Respiratory Diseases) evaluated through pulmonary physiological parameters and concentration of SA. **Material and methods.** Longitudinal prospective study in which ten Landrace pigs were divided into two groups: group I (n = 5) infusion with Steen® solution, and group II (n = 5) perfusion with Cirex solution; were evaluated during 2 hours of EVLP. **Results.** All lung blocks underwent EVLP without complications during the study time. In both groups hemodynamic and gasometric values were kept within reference limits (ANDEVA MR p = NS). The static distensibility (ANDEVA MR p = 0.017), Ppic, Raw and Paw (ANDEVA MR p <0.05), showed changes in both groups, without exceeding reference ranges. Both groups had the same degree of microscopic edema and changes in the presence of endothelial glycocalix, but group II had a greater weight in the gravimetric analysis (TS p = 0.559). The two groups showed an increase in AS concentrations which was only significant in comparison with baseline (p <0.05 T-Student) in perfusate. **Conclusions.** The PPEV during two-hour in a porcine model with Steen's solution or with Cirex's solution does not prevent the degradation of AS and GE, as well as the presence of radiological and gravimetric edema, however, it does not deteriorate the histology or lung function.

**Keywords:** *ex vivo* pulmonary perfusion, endothelial glycocalix, sialic acids.

### III. Contenido

<b>I.</b>	<b>Agradecimientos</b> .....	<b>II</b>
<b>II.</b>	<b>Resumen</b> .....	<b>III</b>
<b>III.</b>	<b>Contenido</b> .....	<b>V</b>
<b>IV.</b>	<b>Índice de Abreviaturas</b> .....	<b>8</b>
<b>1</b>	<b>Introducción</b> .....	<b>11</b>
1.1.	Trasplante pulmonar .....	11
1.1.1.	Antecedentes históricos. ....	11
1.1.2.	Enfermedades pulmonares que predisponen al trasplante pulmonar .....	11
1.1.3.	Factores que limitan el trasplante pulmonar .....	12
1.1.4.	Endotelio vascular .....	13
1.1.5.	Glicocálix endotelial. ....	14
1.1.5.1.	Estructura .....	15
1.1.6.	Ácidos siálicos .....	17
1.2.	Estrategias para incrementar el éxito del trasplante pulmonar .....	18
1.2.1.	Perfusión pulmonar ex-vivo (PPEV) .....	20
1.2.2.	Soluciones del sistema PPEV .....	22
1.2.3.	Solución Steen® .....	23
2.	Justificación. ....	26
3.	Hipótesis. ....	27
4.	Objetivo General. ....	27
5.	Objetivos específicos .....	27
6.	Material y Métodos .....	28
6.1.1.	Tipo de Estudio .....	28
6.1.2.	Animales de Experimentación. ....	28
6.1.3.	Criterios de inclusión .....	28
6.1.4.	Criterios de exclusión. ....	28
6.1.5.	Criterios de terminación .....	29
6.1.6.	Grupos de Estudio. ....	29
7.	Protocolo de Estudio .....	29
7.1.	Modelo Experimental. ....	29

7.1.1.	Anestesia. ....	29
7.2.	Técnicas quirúrgicas en el donador.....	30
7.2.1.	Cateterismo arterial y venoso. ....	30
7.3.	Procuración del bloque cardio-pulmonar. ....	31
7.4.	Perfusión pulmonar ex vivo técnica de Toronto. ....	33
8.	Evaluaciones. ....	36
8.1.	Hemodinámica.....	36
8.2.	Gasométrica. ....	37
8.3.	Mecánica Pulmonar. ....	37
8.4.	Radiológica. ....	37
8.5.	Microscópica.....	38
8.6.	Microscopía Electrónica. ....	38
8.7.	Cuantificación de edema pulmonar. ....	39
8.8.	Evaluación inmunohistoquímica. ....	40
8.9.	Cuantificación de ácido siálico en tejido pulmonar. ....	41
8.10.	Cuantificación de ácido siálico en lavado bronquioalveolar (LBA). ....	41
8.11.	Cuantificación de ácido siálico libre en perfusato. ....	41
8.12.	Análisis de Datos. ....	42
9.	Resultados.....	43
9.1.	Hemodinámicos.....	43
9.2.	Gasométricos. ....	44
9.2.1.	Cociente PaO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub> .....	44
9.2.2.	PaO <sub>2</sub> . ....	44
9.2.3.	PaCO <sub>2</sub> . ....	44
9.2.4.	pH arterial. ....	45
9.2.5.	pH Venoso. ....	45
9.2.6.	PaO <sub>2</sub> . ....	45
9.2.7.	PaCO <sub>2</sub> . ....	45
9.2.8.	PvO <sub>2</sub> . ....	46
9.2.9.	PVCO <sub>2</sub> . ....	46

9.2.10.	Glucosa.....	46
9.2.11.	Lactato. ....	46
9.2.12.	HCO <sub>3</sub> . ....	47
9.3.	Hallazgos en la mecánica pulmonar. ....	48
9.3.1.	Distensibilidad estática (Cstat).....	48
9.3.2.	Distensibilidad dinámica (Cdyn). ....	48
9.3.3.	Resistencia de la vía aérea (Raw).....	49
9.3.4.	Presión Pico (Ppic).....	50
9.3.5.	La presión media en la vía aérea. ....	50
9.4.	Hallazgos radiológicos.....	51
9.4.1.	Hallazgos microscopía de luz. ....	52
9.4.2.	Microscopía electrónica.....	54
9.4.3.	Hallazgos gravimétricos. ....	57
9.5.	Expresión <i>in situ</i> de AS por IHQ.....	57
9.6.	Cuantificación de ácido siálico presente en el tejido. ....	59
<b>V.</b>	<b>Discusión.....</b>	<b>61</b>
<b>VI.</b>	<b>Conclusión.....</b>	<b>68</b>
<b>VII.</b>	<b>Referencias.....</b>	<b>69</b>

#### **IV. Índice de Abreviaturas**

**ISHLT**- International Society Heart and Lung Transplantation.

**CENATRA**- Centro Nacional de Trasplantes.

**EPOC** - Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica.

**D $\alpha$ -1<sup>a</sup>**- Deficiencia de  $\alpha$ -1 antitripsina.

**VEF1** - Volumen Espiratorio forzado del primer segundo.

**DLCO** - Capacidad de Difusión de Monóxido de Carbono.

**NYHA** - New York Heart Association.

**PEEP**- Presión Positiva al Final de la Expiración

**PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>**- Cociente Presión Arterial de Oxígeno / Fracción Inspirada de Oxígeno

**PPEV**- Perfusión pulmonar *Ex vivo*

**NHBD**- non heart beating donors.

**SCCM**- Society of Critical Care Medicine.

**GC**- Gasto cardiaco

**PMAP**- presión media de la arteria pulmonar

**OCS**- Organ Care System

**mmHg**- milímetros de mercurio

**ROS**- Reactive Oxygen Species

**Da**- Daltones

**nm**- nanómetros

**VCAM**-Vascular Cell Adhesion Molecule.

**ICAM**-Intercellular Adhesion Molecule.

**LPS**-Lipopolisacarido.

**I/R**- Isquemia Re perfusión.

**TNF- $\alpha$** -Factor de Necrosis Tumoral Alfa.

**IL**- Interleucina.

**PECAM**- Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule.

**MMs**- Metalo Proteasas.

**Neu5Ac**- Acido N-acetilneuramínico.

**Neu5Gc**- Acido N-Gluconeuramínico.

**Kdn**- Acido 2-ceto-3-desoxy-D-glicero-D-Galacto-nononic.

**NOM**- Norma Oficial Mexicana.

**INER**- Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.

**FC**- Frecuencia Cardiaca.

**GC**- Gasto Cardiaco.

**IC**- Índice Cardiaco.

**PAM**- Presión Arterial Media.

**PMAP**- Presión Media de Arteria Pulmonar.

**PCP**- Presión de Oclusión.

**PVC**- Presión Venosa Central.

**RVP**- Resistencia Vascular Pulmonar.

**iRVP**- Índice de Resistencia Vascular Pulmonar.

**RVS**- Resistencia Vascular Sistémica.

**iRVS**- Índice de Resistencia Vascular Sistémica.

**Qs-Qt**- Corto Circuitos.

**PaO<sub>2</sub>** - Presión Parcial Arterial de Oxígeno.

**PaCO<sub>2</sub>**- Presión Parcial arterial de Dióxido de Carbono.

**SaO<sub>2</sub>**- Saturación Arterial de Oxígeno.

**SvO<sub>2</sub>**-Saturación Venosa de Oxígeno.

**PvO<sub>2</sub>**-Presión Venosa de Oxígeno.

**PvCO<sub>2</sub>**-Presión Venosa de Dióxido de Carbono.

**DavO<sub>2</sub>**-Diferencia Arterio-Venosa de Oxígeno.

**Cstat**- Distensibilidad Estática.

**Raw**- Resistencia de la Vía Aérea.

**PPlat**- Presión Plateau.

**Paw**- Presión media de la vía aérea.

**Ppic** Presión pico.

**LBA**- Lavado Bronquioalveolar.

**IHC-P**- Inmuno Histo Chemistry-Parafin.

**ANDEVA**- Análisis de Varianza.

**EVLP**- Ex Vivo Lung Perfusiom

## **1 Introducción**

### **1.1. Trasplante pulmonar.**

#### **1.1.1. Antecedentes históricos.**

El trasplante pulmonar es un tratamiento efectivo para pacientes que cursan con enfermedad pulmonar terminal que conduce a la pérdida de la función ventilatoria del paciente. En el año de 1963 el Dr. Hardy de la Universidad de Mississippi realizó el primer trasplante pulmonar humano, adquiriendo el pulmón post-mortem de un paciente fallecido por falla cardíaca y cuya sobrevivencia del paciente fue de 18 días (1). En el año de 1981 se realizó el primer trasplante cardio-pulmonar exitoso realizado en la universidad de Stanford, y utilizaron ciclosporina como agente inmunosupresor (2). Posteriormente el equipo de la universidad de Toronto, en el año 1983 realizó el primer trasplante unilateral en un paciente con fibrosis pulmonar idiopática, el cual tuvo una sobrevivencia de 6.5 años (3). En el año de 1988 se realizó el primer trasplante pulmonar doble sin trasplantar el corazón y para el año de 1989 se realizó el primer trasplante bilateral, dando inicio a una nueva etapa en el trasplante pulmonar. La situación mundial actual de trasplante pulmonar de acuerdo al reporte emitido por la Sociedad Internacional de Trasplante de Corazón y Pulmón (por sus siglas en inglés, ISHLT) en el año 2019 se realizaron un total de 4128 trasplantes pulmonares, de los cuales en su mayoría fueron doble o bilateral secuencial (4). En México el primer trasplante pulmonar se realizó en 1989 en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorio, en un paciente con fibrosis pulmonar, quien tuvo una sobrevivencia de 9 años. De acuerdo con el Centro Nacional para Trasplantes (CENATRA) desde la instauración del trasplante pulmonar en México se han reportado un total de 9 trasplantes pulmonares y solo uno en el 2019. (5)

#### **1.1.2. Enfermedades pulmonares que predisponen al trasplante pulmonar**

Existen diferentes enfermedades capaces de producir insuficiencia respiratoria terminal, y se clasifican de acuerdo a su fisiopatología en obstructivas, restrictivas, hipertensivas e infecciosas (3). Las guías emitidas por la ISHLT establecen que el trasplante pulmonar está indicado para pacientes que cursan con una enfermedad pulmonar terminal no neoplásica que conllevará a la pérdida de la función respiratoria de manera irreversible y cuya sobrevivencia no sea mayor de 12-18 meses (6). Y de acuerdo al porcentaje de casos presentados a nivel mundial, la indicación primaria para el trasplante pulmonar es: enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) 34 %, fibrosis pulmonar idiopática 24%,

fibrosis cística 17%, deficiencia de alfa 1 antitripsina 6%, lo cual deriva en la formación de enfisema, hipertensión pulmonar idiopática 3%, fibrosis pulmonar no idiopática 4%, bronquectasia 3%, trasplante 2.6% y sarcoidosis 2.5%. Además de existir otras indicaciones para el trasplante están incluidas enfermedades del tejido conectivo (enfermedad pulmonar intersticial), bronquiolitis constrictiva, hipertensión secundaria a cardiopatías congénitas (3,7). Cuadro 1.

**Cuadro 1.-Clasificación de enfermedades pulmonares, de acuerdo al diagnóstico y guía de selección de candidatos a trasplante pulmonar.**

I.- Neumopatía de origen obstructivo	II.- Neumopatía de origen intersticial	III.- Neumopatía de origen infeccioso	IV.- Neumopatía de origen vascular
Enfisema / EPOC	Fibrosis pulmonar idiopática	Fibrosis quística	Hipertensión pulmonar primaria
Enfisema / D $\alpha$ -1-A	Sarcoidosis	Bronquectasias	Hipertensión pulmonar secundaria con cardiopatía congénita.
Bronquiolitis obliterante (retasplante)	Enfermedades del tejido conectivo	VEF1 $\neq$ 30% predicho o VEF1 > 30 predicho L/min/m <sup>2</sup> con internamientos, frecuentes, descenso rápido.	PaO <sub>2</sub> < 55 mm Hg Índice cardiaco < 2 Presión aurícula derecha > 15 mm Hg
VEF1 < 25% predicho no reversible y/o PaCO <sub>2</sub> $\geq$ 55 mmHg y/o cor pulmonale.	Granuloma eosinofílico	VEF1, hemoptisis masiva o caquexia.	Presión arterial pulmonar media > 55 mm Hg
Preferencia sobre tratamiento con CO <sub>2</sub>	Enfermedad pulmonar ocupacional	PaCO <sub>2</sub> > 50 mm Hg	
	Neumonitis por hipersensibilidad	PaO <sub>2</sub> < 55 mm Hg	
	Toxicidad por drogas		
	Linfangioleiomatosis		
	Enfermedad sintomática y progresiva		
	Función pulmonar anormal sin síntomas. Capacidad vital <60-70 % predicho.		
	DLCO < 50-60% predicho		

EPOC = Enfermedad pulmonar obstructiva crónica. D $\alpha$ -1A= Deficiencia de  $\alpha$ -1 antitripsina. VEF1 = Volumen espiratorio forzado del primer segundo. DLCO = Capacidad de difusión de monóxido de carbono. NYHA = Clasificación funcional de la New York Heart Association. (Tomado de Santillán D. 2005) (3) .

### 1.1.3. Factores que limitan el trasplante pulmonar

Aunque el trasplante pulmonar es una alternativa terapéutica que incrementa la supervivencia de los pacientes con enfermedad pulmonar terminal, éste no se encuentra exento de complicaciones tanto pre trasplante como pos trasplante que interfieren con el éxito del procedimiento. Dentro de los problemas que pueden presentarse pre trasplante se encuentran la escasez de donadores, lo cual en México es un gran problema que limita la

consolidación de este procedimiento, ya que dos tercios de los pulmones de donadores se descartan por no cumplir con los criterios de selección. Mientras que después del trasplante puede ocurrir disfunción temprana del injerto, secundaria al daño por isquemia reperusión (DIRP), y así como también pueden presentarse problemas con la inmunosupresión, cicatrización bronquial, y la presencia de infecciones (8).

Todos estos factores conllevan a la lesión del endotelio vascular, principalmente el glicocálix (proteoglicanos, glicosaminoglicanos y ácido siálico), lo cual puede provocar la formación edema pulmonar.

#### **1.1.4. Endotelio vascular.**

El endotelio vascular es uno de los primeros sitios que se dañan durante los procesos inflamatorios. La pérdida y el daño directo al glicocálix se ha identificado en diversos procesos patológicos como el daño por isquemia-reperusión (9), siendo el endotelio el órgano clave en la formación de edema y además de ser una barrera física entre la sangre y la capa media de los vasos o los tejidos en el caso de los capilares, tiene un papel fundamental en el mantenimiento del homeostasis vascular (10,11). El endotelio vascular es una capa unicelular que recubre en su cara luminal a todas las venas, arterias y capilares, donde por sí solo forma su pared. Las células endoteliales producen óxido nítrico (NO) el cual mantiene el tono basal de vasodilatación de arterias y venas, y la prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) que también tiene acción vasodilatadora; el equilibrio sobre el diámetro de los vasos se mantiene con la producción de sustancias vasoconstrictoras como la endotelina, el tromboxano A<sub>2</sub> y el anión superóxido. Estas células producen sustancias antitrombóticas que se encuentran en la superficie (en el glicocálix) como el heparán sulfato y el proteoglicano trombomodulina, que regulan la fibrinólisis ya que producen el factor activador tisular del plasminógeno y su inhibidor (PAI-1), regulando la proliferación celular a través de la producción de sustancias estimulantes del crecimiento (factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento básico derivado de fibroblastos y endotelina-1) y de inhibidores del crecimiento (factor de crecimiento transformador  $\beta$ , NO y PGI<sub>2</sub>) (12).

La pérdida de las propiedades fisiológicas del endotelio o disfunción endotelial, como la producida por aumento o distorsión de la presión tangencial de la sangre sobre las paredes vasculares (fuerzas de tensión o *shear stress*), disminuye la capacidad

vasodilatadora dependiente del endotelio y afecta otras funciones endoteliales como las que regulan la coagulación y la capacidad antioxidante, mucha de estas alteraciones endoteliales comienza con cambios en el glicocálix (13).

Cabe mencionar que la barrera endotelial es una barrera continua y semipermeable que forma el endotelio vascular, puede variar en grosor de acuerdo al órgano en el cual se localice e incluso podemos encontrar diferencias en diferentes segmentos del endotelio de un mismo órgano (14) y puede ser susceptible a estímulos ocasionados por agentes infecciosos o componentes bacterianos, citocinas inflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-6, IL-8), especies reactivas de oxígeno, la ventilación mecánica y factores químicos externos o el decremento de la presión atmosférica, que dañen o provoquen eventos inflamatorios en el mismo, con la consecuente disfunción endotelial y la pérdida de la capacidad de la barrera endotelial para evitar la extravasación de líquidos y el edema pulmonar para el cual no existe una terapia específica para su disminución. (15, 16).

#### 1.1.5. Glicocálix endotelial.

El glicocálix endotelial (GE) tiene diversas funciones y la pérdida de su integridad por daño al endotelio vascular repercute en la homeostasis con respuestas inflamatorias que pueden conducir a la formación de edema (14, 17). Cuadro 2.

**Cuadro 2.-Principales funciones del glicocálix endotelial.**

<b>Funciones del glicocálix endotelial</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Protector, sensor y transductor de las fuerzas mecánicas de torrente sanguíneo.</li><li>• Regulación de la permeabilidad de agua y solutos.</li><li>• Regulación de filtración glomerular.</li><li>• Regulación de la permeabilidad de macromoléculas.</li><li>• Regulación de hematocrito capilar y del flujo sanguíneo.</li><li>• Barrera de la filtración de lipoproteínas.</li><li>• Prevención de adhesión de plaquetas y leucocitos al endotelio.</li><li>• Regulación local de coagulación (prevención de trombosis, activación de fibrinólisis).</li></ul>

(Tomado de Frati-Munari AC, 2013) (18)

#### **1.1.5.1. Estructura.**

El glicocálix endotelial es una capa que recubre la cara luminal del endotelio de arterias, venas y capilares. Su espesor es variable y dependiendo del método de medición, así como del tipo vaso sanguíneo del que se trate, este puede medir entre 20 a 500nm y está formado por: componentes solubles, proteoglicanos, glucosaminoglicanos (GAG) y glicoproteínas, las cuales poseen ácido siálico que interviene en la señalización celular (19). Los proteoglicanos son moléculas formadas por un núcleo proteico, generalmente se encuentra constituido de sindecan, glipican y perlacan, al que se unen cadenas de glucosaminoglicanos. Se han identificado cinco tipos de proteoglicanos hidrosolubles en el glicocálix, los cuales son: heparán sulfato, condroitin sulfato, dermatán sulfato, queratán sulfato y ácido hialurónico, los cuales están compuestos de polímeros lineales de disacáridos cuya longitud es dependiente de acuerdo al grado de acetilación y sulfatación y que llevan oligosacáridos ácidos y ácidos siálicos terminales (AS) (11).

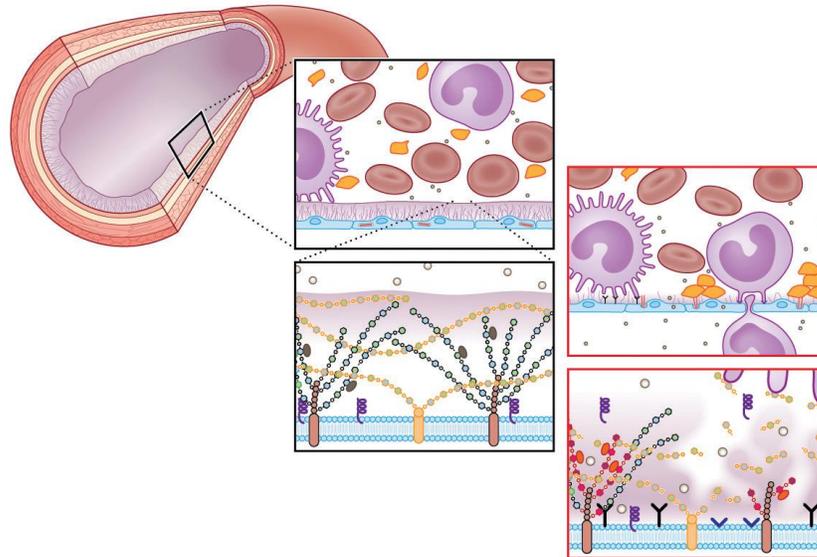
La proporción con la que se encuentran distribuidos estos proteoglicanos en el glicocálix, varía de acuerdo a su localización, pero se ha estimado que el heparán sulfato constituye el 50-90%, el segundo proteoglicano más común en la composición del glicocálix es el condroitin sulfato. El ácido hialurónico representa un proteoglicano componente del glicocálix que tiene la característica principal de no estar unido a una proteína central. De tal manera que los glucosaminoglicanos contienen diferentes sitios de unión para proteínas derivadas del plasma. Junto con los diversos patrones de sulfatación observados en los glucosaminoglicanos, los cuales modularán el espesor del glicocálix y por lo tanto las propiedades de permeabilidad vascular y capacidad de unión a proteínas específicas (14).

Dentro de las principales funciones de las glicoproteínas se encuentra la señalización celular y el reclutamiento celular desde el torrente sanguíneo y está compuesta por tres familias de moléculas las cuales son las selectinas, integrinas e inmunoglobulinas (11, 20).

La función de las glicoproteínas está determinada básicamente por dos componentes de la estructura de glicocálix, los cuales son 1) el residuo o los residuos de azúcar terminales en la cadena o cadenas de oligosacáridos y 2) el sitio de unión del residuo de aminoácido

(N- vs. O-) para la cadena de oligosacáridos a la proteína. El ácido siálico es un carbohidrato cargado negativamente que se encuentra en oligosacáridos, polisacáridos, glicoproteínas, gangliósidos y lipopolisacáridos y tiene una función determinante para mantener la integridad de la barrera endotelial (21, 22).

**Figura 1.-** Esquema del estado fisiológico del glicocálix.

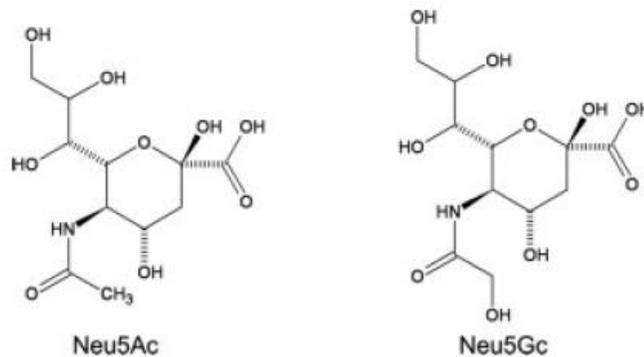


Resumen esquemático del glicocálix endotelial en una condición sana y enferma. Izquierda: en un estado fisiológico, el glicocálix endotelial protege contra la fuga de proteínas, inflamación y coagulación. Heparán sulfato, unido a una proteína núcleo de heparán sulfato, y hialuronano, obligado por ej. CD44, son los principales componentes del glicocálix endotelial (EG). El orden y la modificación de las repeticiones de disacárido dentro de HS determinan el sitio de unión para proteínas específicas. Derecha: tras la activación endotelial, se produce la modificación del disacárido de heparán sulfato, lo que resulta en un cambio en los sitios de unión a proteínas. Durante una enfermedad crónica, el EG se daña, principalmente debido a la regulación ascendente de enzimas degradantes como hialuronidasa, heparanasa y proteinasas. Tanto la modificación de HS como la degradación de EG provocan inflamación, coagulación y pérdida de proteínas. (Tomado de Dane, Martijn. 2015). (23)

### 1.1.6. Ácidos siálicos.

Los ácidos siálicos son una familia de ácidos 2-ceto-3-deoxinonulosinico, compuestos de nueve carbonos, normalmente terminan en una cadena de glicano ya sea N-glicano (unidos a residuos de asparagina) u O-glicano (unidos a residuos de serina o treonina), son expresados y secretados en la superficie celular y unidos a glicoproteínas, gangliosidos y glicosaminoglicanos a través de una variedad de enzimas del tipo sialiltransferasas (23). Actualmente se han identificado más de 50 miembros en la familia de ácidos siálicos con características estructurales específicas entre ellos, en mamíferos se han identificado en mayor proporción al ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac) y su forma hidroxilada el ácido N-Gluconeuramínico (Neu5Gc). (24, 25) Figura 2

**Figura 2.** Estructura química de dos formas de ácido siálico.



Estructura de los dos tipos de ácidos siálicos más comunes: ácido N-Acetilneuramínico (Neu5Ac) y ácido N-Gluconeuramínico (Neu5Gc) (Tomado de Karin Ortner. W. 2007) (25).

Además de las formas de ácidos siálicos Neu5Ac y Neu5Gc, existen otros miembros bien identificados en esta familia como el ácido 2-ceto-3-desoxy-D-glicero-D-Galacto-nononic (Kdn) y el ácido 5,7-diamino-3,5,7,9-tetr-desoxi-D-glicero-D-galacto-nonulosonico (ácido pseudoamínico); sin embargo, el ácido Neu5Ac se expresa en mayor proporción (26).

Como se ha descrito el endotelio vascular forma una barrera semipermeable entre la sangre y el tejido subyacente que a su vez tiene un recubrimiento en su superficie compuesto por glicoproteínas, glucolípidos, glucosaminoglicanos y proteoglicanos los cuales en conjunto forman el glicocáliz. Los ácidos siálicos están implicados en brindar

diversas de estas propiedades mostradas por el endotelio (10).

Dentro de las diversas propiedades que los ácidos siálicos confieren a las superficies celulares se encuentra el aportar una carga negativa a los glicoconjugados, lo cual promueve la repulsión electrostática de células que participan en los procesos inflamatorios principalmente en moléculas altamente sializadas, dando como resultado una protección de las glicoproteínas de los efectos proteolíticos de las enzimas producidas por las células inflamatorias. Otra importante propiedad que presentan los ácidos siálicos son la susceptibilidad a la acción hidrolítica de las sialidasas, sobre todo en los ácidos siálicos que contienen grupos O-acetilos que impiden la acción enzimática (27). Los ácidos siálicos Neu5Ac y Kdn son los principales precursores en mamíferos para la síntesis de otras formas de ácidos siálicos y en otros vertebrados.

La célula endotelial, al ser altamente sializada (aproximadamente 10 millones de moléculas en eritrocitos y células endoteliales) median y modulan mecanismos intermoleculares de adhesión, migración e interacción de células inflamatorias, tanto con el endotelio como con la matriz extracelular, un aumento en su expresión puede por ejemplo incrementar la adhesión de linfocitos B en su región CD22 y en la LFA-1 de los linfocitos T, a través de los enlaces sialicados  $\alpha$ 2-6. De la misma forma el decremento o pérdida de los ácidos siálicos en la superficie celular puede ocasionar el incremento en la adhesividad y activación de los neutrófilos los cuales a su vez son generadores de sialidasas, siendo de esta manera una pieza fundamental en el estudio de procesos fisiopatológicos en el endotelio pulmonar (28).

Como ya se mencionó el trasplante de pulmón en la actualidad no ha tenido el éxito deseado porque existen diferentes factores como la ventilación mecánica, daño por isquemia reperfusión etc., que predisponen a que se lesione el endotelio pulmonar y se presente edema pulmonar; por esta razón el personal de la salud que se dedica a la realización de este tipo de trasplante ha desarrollado diferentes estrategias para incrementar la obtención de órganos, mejorar las técnicas de preservación, selección de donadores y recientemente se ha trabajado con la recuperación de órganos que no eran aptos para trasplante.

## **1.2. Estrategias para incrementar el éxito del trasplante pulmonar.**

Durante las últimas tres décadas se han generado diversos avances en la técnica quirúrgica, terapia inmuno-supresora y manejo post-operatorio de paciente, lo cual ha

llevado a un incremento en la realización de este tipo de trasplantes e implementación de programas para trasplante pulmonar en todo el mundo en el que se establecen nuevos criterios de selección tanto para donadores como receptores. El grupo de Toronto (29) para evitar la falta de donadores, estableció una nueva forma de evaluar a los posibles donadores, denominada escala de evaluación de criterios extendidos para donadores de pulmón, en la cual aparte de utilizar los principios de evaluación básica (estudios de imagen, morfo-funcionales, microbiológicos, compatibilidad, grupo sanguíneo), incrementaron una nueva serie de parámetros denominados extendidos, (los cuales se describen en el cuadro 3), así como el uso de órganos proveniente de pacientes con asistolia o paro cardíaco (parada cardíaca) (NHBD, del inglés, non heart beating donors).

**Cuadro 3.** Criterios de Selección de donador pulmonar sugeridos por el grupo de trasplantes de Toronto.

Criterios de selección	Criterios estándar (Donador ideal)	Criterios extendidos	Contraindicaciones (Donador marginal)
<b>Compatibilidad ABO</b>	Idéntica	Compatible	Incompatible
<b>Antecedentes del donador</b>			
Edad	< 55 años	> 55 años	
<b>Tabaquismo, paquetes años</b>	< 20	> 20	
<b>Traumatismo torácico</b>	Sin traumatismo	Traumatismo localizado	Politraumatizado
<b>Duración de ventilación mecánica</b>	< 48 horas	> 48 horas	
<b>Asma</b>	No	Si	
<b>Cáncer</b>	No (excepto cáncer de piel y carcinoma in situ)	Tumores primarios de SNC	Antecedente de cáncer
<b>Tinción gram de esputo</b>	Negativa	Positiva	
<b>Oxigenación</b>	> 300 mmHg	< 300 mmHg	
<b>Radiografía de tórax</b>	Limpia	Infiltrados localizados	Infiltrados difusos
<b>Broncoscopia</b>	Limpia	Secreciones en vías principales	Pus persistente, signos de broncoaspiración

Detalla los criterios de selección extendidos para un donador de pulmón utilizado por el grupo de trasplantes de Toronto, cuando existe limitación de órganos disponibles. Modificado de referencias. (Adaptado de Yeung JC, 2009)(29).

Los órganos provenientes de donadores por parada cardíaca también han sido clasificados de acuerdo a la Convención Internacional de Maastricht (30). Cuadro 4

#### **Cuadro 4.** Clasificación de Maastricht de donadores por parada cardiaca

Tipo I. Fallecido antes de llegar al hospital con tiempo de asistolia conocido	Donantes no controlados
Tipo II. Fallecido en el hospital tras maniobras de reanimación infructuosas	
Tipo III. Fallecido tras retirada de ventilación mecánica en situación vegetativa persistente o deterioro neurológico severo e irreversible	Donantes controlados
Tipo IV. Fallecido en muerte cerebral en el que la asistolia se produce antes de proceder a la extracción	

(Tomado de Rodríguez D.A. 2011) (31).

La diferencia principal de los órganos obtenidos de NHBD no controlados y los controlados es que los pacientes no controlados tienen un mayor riesgo de sufrir daños irreversibles por hipoxia e isquemia tras el tiempo de isquemia caliente, la cual se define como el tiempo de un órgano o tejido que permanece a la temperatura corporal posterior a que el aporte sanguíneo se ha visto reducido o interrumpido. Como ya se mencionó, esta condición puede predisponer a la presencia de DIRP, el cual es una complicación causada por la interrupción del flujo sanguíneo (isquemia) y por el re-establecimiento de la circulación, que ocasionan una respuesta inflamatoria que daña el endotelio vascular pulmonar, favoreciendo la extravasación de líquido, el edema pulmonar y la falla primaria del injerto (32,33).

##### **1.2.1. Perfusión pulmonar ex-vivo (PPEV)**

Como ya mencionamos anteriormente, parte de los esfuerzos para incrementar el número de pulmones disponibles llevó a los grupos de trasplante pulmonar alrededor del mundo a buscar alternativas para solucionar la problemática, y como consecuencia surgió la perfusión pulmonar *ex vivo* (PPEV).

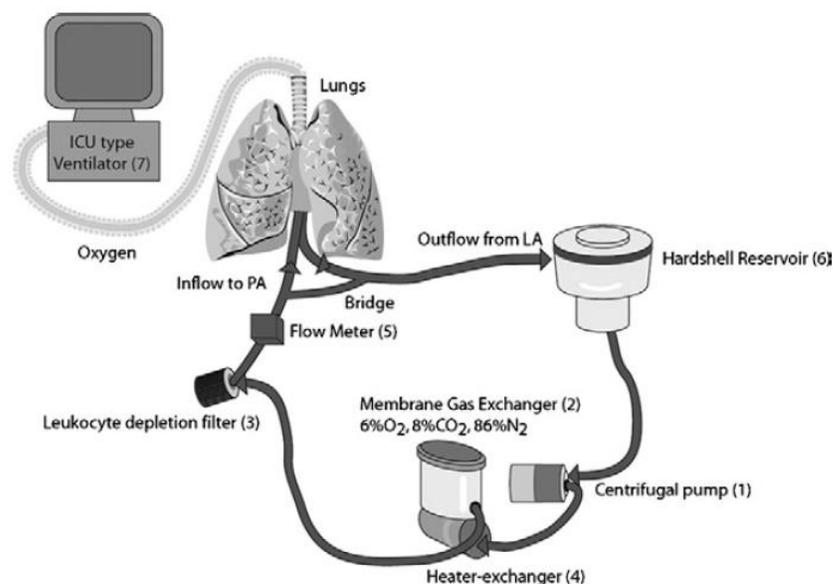
El sistema de PPEV es una técnica de reacondicionamiento pulmonar, la cual se ha ido refinando desde su implementación hasta la aplicación clínica realizada por Steen® et al. (34), en pulmones procedentes de donadores NHBD no controlados. Después de ser sometidos al sistema PPEV (35) los pulmones provenientes de donadores NHBD pueden ser trasplantados exitosamente después de un periodo de isquemia. El mantenimiento del órgano en el sistema de PPEV permite a las células pulmonares y tejidos mantenerse metabólicamente activos y viables durante varias horas, además, se pueden realizar

evaluaciones metabólicas, hemodinámicas, ventilatorias, capacidad de oxigenación y formación de edema, microbiológicas etc., para garantizar el reacondicionamiento del pulmón (36,37,38). Este sistema de PPEV está basado principalmente en los siguientes mecanismos:

1. Controlar de manera gradual la perfusión para evitar los cambios por estrés hemodinámico.
2. Utilizar soluciones para perfusión coloidal y acelular adicionada con dextrán 40 para garantizar una presión oncótica adecuada y otorgando un recubrimiento al endotelio vascular.

Ventilación controlada con un volumen tidal bajo y presión positiva al final de la espiración (PPEP) como medida de protección de daños inducidos por el ventilador (15, 39).

La PPEV hace funcionar a los pulmones fuera del cuerpo, mediante el uso de un sistema que consta de una bomba para circulación extracorpórea, ventilador, filtro de leucocitos, oxigenador, intercambiador de calor, cámara de perfusión *ex vivo* (XVIVO, Vitrolife), cánulas (XVIVO Lung Cannula Set™), una cámara de perfusión *ex vivo* (XVIVO Organ Chamber™) y solución Steen® (Steen Solution®™), la cual por sus componentes mantiene una presión oncótica igual o mayor a la presión oncótica ejercida por la sangre y favorece el “tapizado” endotelial que favorece el secuestro de tóxicos (38,40). Figura 3.



**Figura 3.** Circuito de perfusión pulmonar *ex vivo*. (tomado de Cypel M, 2008)(40).

Actualmente existen tres diferentes protocolos de PPEV: protocolo Toronto, protocolo Lund y Organ care system protocol (OCS). Las principales diferencias entre ellos son: la composición del líquido de perfusión, parámetros ventilatorios y equipo utilizado. Cuadro 3. Tanto el protocolo de Toronto como el protocolo Lund se basan en el uso de solución Steen®, mientras que el protocolo Lund permite el uso de un porcentaje de hematocrito. El protocolo OCS se basa en el uso de solución Perfadex® o solución OCS® mezclada con un porcentaje de hematocrito. Otra diferencia es el flujo de perfusión final durante la perfusión, en donde el protocolo Lund utiliza un 100 % del flujo cardiaco; el protocolo OCS utiliza de 2-2.5 L/min y el protocolo Toronto utiliza solo el 40% del gasto cardiaco (41).

**Cuadro 5.** Cuadro comparativo entre los diferentes protocolos establecidos de perfusión pulmonar *ex vivo*.

Parámetros	Toronto	Lund	OCS
<b>Perfusión</b>			
Flujo objetivo	40% GC	100%GC	2.0-2.5 L/min
PAP	10-15 mmHg	≤20 mmHg	≤20 mmHg
Atrio Izquierdo	Cerrado	Abierto	Abierto
Solución de perfusión	Solución STEEN®	Solución STEEN®+hematocrito 14%	Solución OCS®+hematocrito 15-25%
<b>Ventilación</b>			
Temperatura de inicio	32°C	32°C	34°C
Volumen Tidal	7 ml/kg peso	5-7 ml/kg peso	6 ml/kg peso
Respiraciones por minuto	7	20	10
PEEP	5 cm H <sub>2</sub> O	5 cm H <sub>2</sub> O	5-7 cm H <sub>2</sub> O
FiO <sub>2</sub> (%)	21	50	12

GC, Gasto cardiaco; PMAP, presión media de la arteria pulmonar, OCS, Organ Care System, PEEP, presión positiva al final de la expiración (del inglés positive end expiratory pressure). (Tomado de Van Raemdonck D, et al 2015) (41).

### 1.2.2. Soluciones del sistema PPEV.

El uso de soluciones para el reacondicionamiento y preservación de órganos destinados al trasplante debe de adaptarse a las características fisiológicas que cada órgano

demanda; así como a la técnica particular que utilice cada uno de ellos. Para esto se establecieron tres principios que deben cumplir las soluciones destinadas a la preservación y reacondicionamiento de órganos destinados para trasplante (42), los cuales son:

- 1) Mantener la concentración osmótica a través de sustratos metabólicamente inertes y no con el uso de glucosa para evitar la formación de un medio hiperosmolar y por ende el desarrollo de edema.
- 2) Los sustratos utilizados deben de proporcionar una presión coloidosmótica adecuada a cada tipo de órgano.
- 3) La solución también debe de tener acarreadores o captadores de especies reactivas de oxígeno.

En conjunto estos principios permiten mantener la homeostasis tanto en las presiones del lecho vascular como en el control de los factores que intervienen en el proceso inflamatorio. Las soluciones encaminadas a la preservación y reacondicionamiento pulmonar más utilizadas son la solución Steen® y solución Perfadex®, las cuales cuentan con características específicas para mantener una presión oncótica igual o mayor a la presión oncótica ejercida por la sangre. Sin embargo, cabe mencionar que dichas soluciones tienen la limitante de ser altamente especializadas, con restringidas políticas de comercialización y por lo tanto tienen un costo final elevado, lo cual crea limitación en el desarrollo e implementación del sistema de PPEV, por lo que es necesario tener una solución de características similares, pero de fácil adquisición, que permita la implementación del sistema (43).

### **1.2.3. Solución Steen®**

En el cuadro 6 se mencionan los componentes de la solución Steen®, la cual contiene principalmente albúmina sérica humana, glucosa, electrolitos y polímeros (dextrán 40) que como ya se mencionó, le proporcionan la capacidad oncótica y de “tapizado” endotelial lo cual favorece el secuestro de tóxicos. (40)

La presión oncótica en la solución Steen® está dada por la albúmina lo que les confiere una composición similar a los fluidos extracelulares con una presión de 25-30 mmHg, la cual se considera una presión oncótica ideal para la movilización del edema intersticial hacia la solución. Actualmente el uso de soluciones oncóticas tiene como base el uso de albúmina, la cual es una proteína hidrosoluble de alto peso molecular (69,000 Da)

cargada negativamente, y se rodea de iones de sodio, dificultando el paso de la albúmina a través de membranas celulares y del endotelio capilar. La concentración normal en la sangre de albúmina es de alrededor de 45 g/L y ésta proporciona alrededor del 70% de la presión oncótica de la microcirculación. El 30% de la presión oncótica restante está dado por las globulinas y otras proteínas presentes en el plasma sanguíneo (44).

Por lo tanto, una solución que contenga electrolitos con osmolaridad de 290 (sodio, potasio, calcio, magnesio, fosfatos, glucosa) y sustancias coloidosmóticas que mimeticen el plasma sanguíneo (sero-albúmina en un rango de 60-80 g/L, en donde la concentración óptima se ha identificado que es 70g/L) proporcionarán una presión de 25-30 mmHg la cual corresponde a una presión normal en los capilares pulmonares.

Otro componente de este tipo de solución es el dextrán, el cual es un polímero de carbohidratos con enlaces glucosídicos predominantemente del tipo  $\alpha$ -(1-6), y se conoce comercialmente como dextrán 40, dextrán 60 y dextrán 70 dependiendo de su peso molecular, 40,000 Da, 60,000 Da y 70,000 Daltons, respectivamente, de los cuales el dextrán 40 es el más usado como compuesto protector del endotelio vascular y como receptor de especies reactivas de oxígeno Cuadro 6. La capacidad del dextrán para proteger el endotelio vascular se debe a que los capilares pulmonares presentan poros con diámetros de alrededor de 30 nm, en donde proteínas de peso molecular aproximado al de la gammaglobulina (150,000 Da) son capaces de pasar a través de estos poros. El dextrán es una molécula eléctricamente no cargada que tiene la capacidad de pasar a través de estos poros, pero es su conformación tridimensional la que le confiere esta capacidad y no su peso molecular. Adicionalmente tiene otras propiedades como ser hidrosoluble, inerte en sistemas biológicos, interfiere con la adhesión de leucocitos al endotelio capilar por lo que clínicamente se ha usado en un rango de concentración de 2-20 g/L y 5 g/L es la concentración ideal para utilizar en pulmones que serán sometidos a sistemas de perfusión y reacondicionamiento pulmonar (45).

**Cuadro 6.-** Composición química de la solución Steen® y Cirex. (46)

Reactivo químico	1 Litro
Dextran 40 H(C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> ) <sub>x</sub> OH	5 g.
Cloruro de sodio (NaCl)	5.684 g.
Cloruro de potasio (KCL)	36.5 mg
Cloruro de calcio (CaCL <sub>2</sub> )	155.3 mg
Sulfato de magnesio (MgSO <sub>4</sub> )	1.2 mg
Fosfato de potasio di hidrogenado (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	5.715 mg
Fosfato di potásico hidrogenado anhidro (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	146.3 mg
Fosfato disódico anhidro hidrogenado (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	0.029 mg
Bicarbonato de sodio (NaHCO <sub>3</sub> )	1.1760 g
Acetato de potasio (CH <sub>3</sub> C <sub>2</sub> K)	284.6 mg
Glucosa monohidratada	1.9818 g
Albúmina 20%	320 ml Albúmina 20% por cada Lt.
pH 7.4	Hidróxido de sodio (NaOH)1 M.

## **2. Justificación.**

Los pacientes con enfermedad pulmonar terminal tienen como última alternativa de tratamiento el trasplante pulmonar. Sin embargo, en México la realización de este procedimiento se complica por la escasez de donadores, originada por la falta de cultura de donación de órganos y el daño que sufre el pulmón del donador (infecciones, daños por ventilación mecánica etc.) en las terapias intensivas, que favorecen el daño del endotelio pulmonar y sus componentes, así como el edema pulmonar. El sistema de perfusión pulmonar *ex vivo* (PPEV) permite reacondicionar la arquitectura y fisiología de pulmones dañados que han sido rechazados para trasplante o el uso de órganos procedentes de pacientes con parada cardíaca, pero se requiere de una solución especial, la cual es difícil de importar a nuestro país y es de muy alto costo. En el laboratorio de Cirugía Experimental del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas se ha desarrollado una solución de perfusión genérica (solución extracelular con electrolitos y enriquecida con albúmina), la cual se denominó Cirex para la PPEV, pero no se ha evaluado su funcionamiento; por esta razón en este estudio se propone estudiar en un modelo experimental, el efecto de la solución Cirex sobre la arquitectura, expresión de ácido siálico y la fisiología pulmonar y poder comparar su efectividad con la solución de Steen®.

### **3. Hipótesis.**

La PPEV con solución Cirex o solución de Steen® mantendrán la arquitectura, parámetros fisiológicos y niveles de ácido siálico del tejido del bloque pulmonar preparado para trasplante, similares a las del tejido pulmonar sano.

### **4. Objetivo General.**

Evaluar y comparar el efecto de la solución Steen® y solución dextrán baja en potasio enriquecida con albumina (Cirex) (realizada en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias) en pulmones porcinos sometidos a dos horas de perfusión *ex vivo*, a través de los cambios fisiológicos, y estructurales, así como el daño del GE a través de los niveles de ácido siálico (AS).

### **5. Objetivos específicos.**

En los grupos de estudio I (Solución Steen) y II (solución dextran baja en potasio alta en albúmina) se realizará lo siguiente:

- a. Determinar el efecto de las dos soluciones en el sistema de EVPL, sobre la fisiología pulmonar (hemodinámica, gasometría, mecánica ventilatoria).
- b. Evaluar los cambios radiográficos pulmonares durante la evolución de la perfusión pulmonar *ex vivo*.
- c. Evaluar mediante microscopia de luz la formación de edema e infiltrado de polimorfonucleares.
- d. Visualizar el glicocalix endotelial por microscopía de transmisión.
- e. Cuantificar mediante análisis gravimétrico la presencia de edema en los pulmones sometidos a perfusión pulmonar *ex vivo* al término del estudio.
- f. Evaluar la expresión *in situ* de AS en tejido pulmonar a través de inmunohistoquímica.
- g. Determinar los niveles de ácido siálico en tejido pulmonar, LBA y perfusato.

## **Material y Métodos.**

### **6.1.1. Tipo de Estudio**

Es un estudio prospectivo, longitudinal y aleatorizado, realizado en las instalaciones del Departamento de Cirugía Experimental del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) "Ismael Cosío Villegas", el cual fue aprobado por el comité de ética en investigación del INER número de proyecto B09-17 y del subcomité interno para el cuidado y uso de animales de experimentación (SICUAE) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México (FMVZ- UNAM).

### **6.1.2. Animales de Experimentación.**

Se utilizaron 10 cerdos Landrace sanos, adultos, sin importar el sexo, con un peso entre 15 y 20 Kg. Todos los animales se mantuvieron en las mismas condiciones ambientales. Estuvieron confinados en jaulas individuales con un área de piso de 90 cm de ancho x 3.5 m de largo y una altura de 2.70 m alto con comederos y bebederos individuales localizados en la puerta frontal a una distancia del piso de 40 cm para evitar contaminación con excretas, con disposición de agua y alimento *ad libitum*. Asimismo, se encontraban protegidos de las condiciones climáticas extremas. Los animales fueron tratados de acuerdo a las Especificaciones Técnicas para la Producción, Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 (47) y la Guide for the Care and Use of Laboratory Animals de los Estados Unidos (National Institutes of Health U.S. (48) Los animales se mantuvieron en el bioterio de la Unidad de Investigación del INER, bajo condiciones adecuadas de temperatura y humedad. El número de animales por grupo "n" se calculó de acuerdo a una muestra finita y se ajustó de acuerdo a los Principios de Técnicas Experimentales propuesta por Balls M. y Kilkenny C. (49,50)

### **6.1.3. Criterios de inclusión.**

Se incluyeron sujetos clínicamente sanos, con ausencia de cualquier signo de enfermedad durante su estancia en el bioterio del INER y previo al estudio.

### **6.1.4. Criterios de exclusión.**

Los animales con datos clínicamente patológicos durante la procuración del bloque cardiopulmonar, estos datos no serán considerados para el análisis estadístico.

### **6.1.5. Criterios de terminación.**

Bloques pulmonares que desarrollen edema pulmonar conjuntamente con un cociente PaFi < 300 mmHG, durante la PPEV presiones mayores al 20% de la arteria pulmonar y de la aurícula izquierda no serán considerados para el análisis estadístico.

### **6.1.6. Grupos de Estudio.**

Los animales se dividieron al azar en 2 grupos de estudio y los bloques pulmonares se conectaron a un circuito de PPEV y fueron perfundidos con 2 diferentes soluciones de la siguiente forma:

**Grupo I** (n=5): PPVE con solución Steen®.

**Grupo II** (n=5): PPEV con solución Cirex.

## **7. Protocolo de Estudio.**

### **7.1. Modelo Experimental.**

#### **7.1.1. Anestesia.**

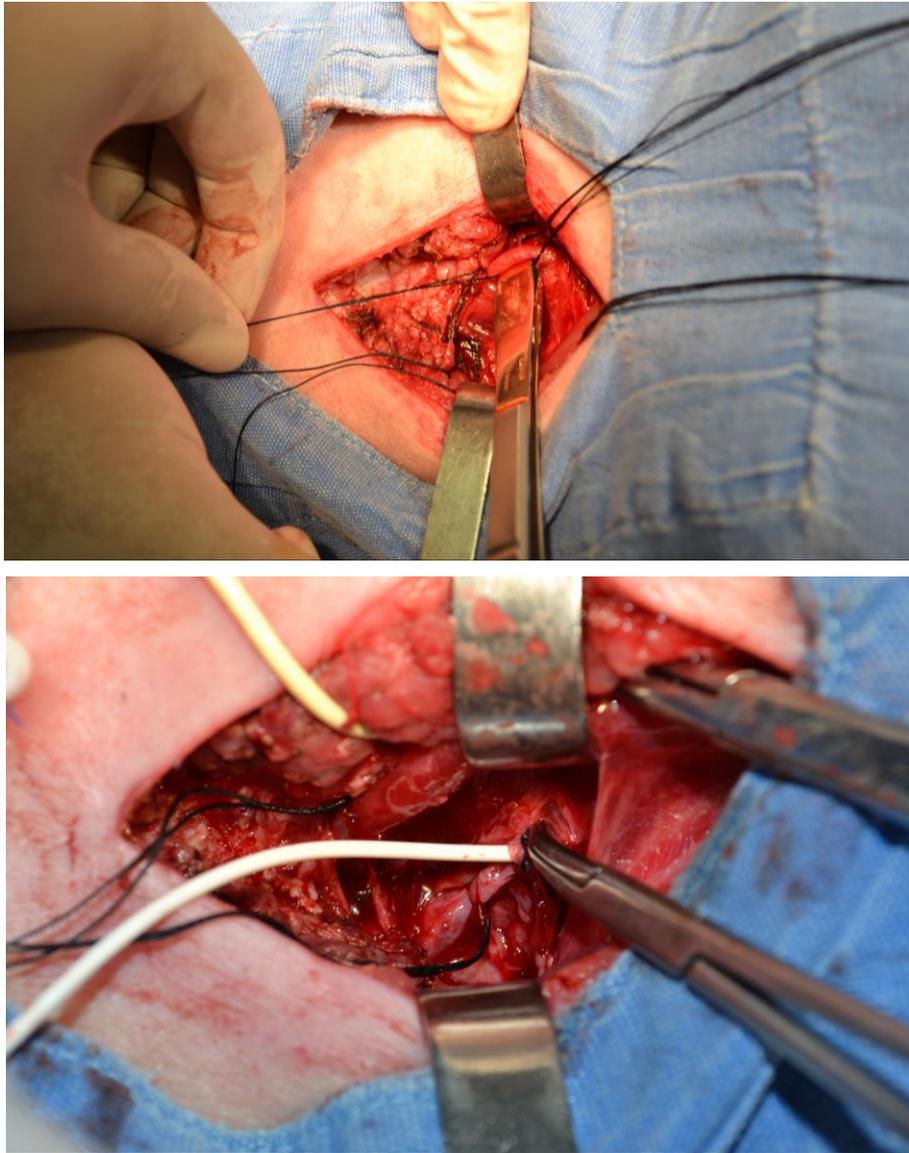
Cada experimento se inició con ayuno de 24 horas para sólidos y 12 horas líquidos y con el pesaje de los animales. Se utilizó como pre-anestésico Tiletamina/Zolacepam (Zoletil®, Virbac, Carros Cedex, Francia) a 15mg/Kg vía intramuscular (IM), además de Fentanilo 6-10 µg/Kg IV (FENTANEST® Janssen Cilag, Ciudad de México, México); previa asepsia de la zona se canalizó la vena auricular lateral de la oreja izquierda con un catéter endovenoso del #22 (BD Insyte®, EUA), al que se le conectó una venoclisis con normogotero (Flebotek®Vet Pisa®, Guadalajara, Jalisco, México) por la que se administró la terapia de líquidos con solución de cloruro de sodio (Solución CS, Pisa®, Morelos, México)) a razón de 10 ml/kg/hr. Posteriormente se indujo anestesia quirúrgica a plano quirúrgico con Propofol al 1% (Diprivan® Corden Pharma, Caponago, Italia) a 3 mg/Kg IV, posteriormente el animal se colocó en posición de decúbito dorsal, se intubó con cánula endotraqueal calibre 8fr (RÜSCH®, Perak, Malasia) con ayuda de un laringoscopio (Greenline/D™ WelchAllyn®, EUA) y finalmente a través de un circuito (RT340 EVAQUA™ Fisher & Paykel HEALTHCARE, Auckland, Nueva Zelanda) se conectó al ventilador (Avea™VIASYS™ Healthcare, Höchberg, Alemania) para proporcionar asistencia mecánica ventilatoria con volumen corriente de 6-7 ml/Kg de peso corporal,

frecuencia respiratoria de 16-18 respiraciones por minuto (RPM), relación inspiración/expiración de 1:2 con PEEP (Presión positiva al final de la espiración) de 2 cm de agua y una fracción inspiratoria de oxígeno ( $FiO_2\%$ ) del 50% para mantener la saturación capilar periférica de oxígeno ( $SpO_2$ ) en más del 90% y niveles normales de  $paO_2$  y  $paCO_2$  (35 y 40 mmHg). (41) También se colocaron las derivaciones para la monitorización por medio del electrocardiograma, oximetría de pulso y termómetro, para el monitoreo de frecuencia cardíaca, saturación de  $O_2$  y temperatura corporal.

## **7.2. Técnicas quirúrgicas en el donador.**

### **7.2.1. Cateterismo arterial y venoso.**

Bajo condiciones de anestesia general y con el animal en posición decúbito dorsal, se realizó una incisión paramedial ventral derecha en la región cervical, se expuso y disecó la vena yugular externa derecha, en la cual se insertó un catéter de termodilución 5F de diámetro (Swan Ganz, Standard Thermodilution Balloon Catheter, Edwards Lifesciences, Quebec, Canadá) y se conectó al monitor de signos vitales (CARESCAPE B650, General Electric Company©, Helsinki, Finlandia), posteriormente se dirigió hasta la arteria pulmonar (AP) para la medición de los parámetros hemodinámicos pulmonares y el gasto cardíaco, así como para la toma de muestras para gasometría. Posteriormente se disecó la arteria carótida común derecha y se le colocó de la misma forma, otro catéter para la medición de parámetros hemodinámicos sistémicos y toma de muestras de gases arteriales. Figura 4.

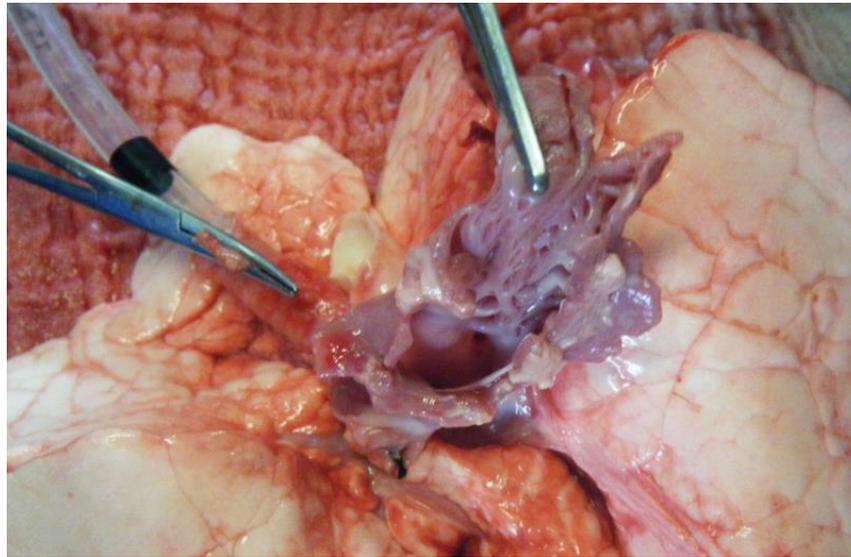


**Figura 4.** Colocación de catéteres arterial y venoso para la evaluación hemodinámica.

### **7.3. Procuración del bloque cardio-pulmonar.**

Por medio de esternotomía y bajo condiciones de asepsia se accedió a la cavidad torácica del modelo animal e incidieron pleuras, los ligamentos pulmonares caudales se desprendieron de su inserción en el diafragma; se disecaron la vena cava craneal y caudal, vena ácigos y vena hemiacigos izquierda. Por medio de una ventana pericárdica, se disecó y se refirieron las arterias pulmonares y aorta ascendente con seda quirúrgica sin aguja de 2-0 (Atramat®, Ciudad de México, México). Se realizó patrón de sutura de jareta en la base de la arteria pulmonar con polipropileno cardiovascular 5-0 (Prolene®,

São José dos Campos, Brasil); se administraron 300UI/Kg de Heparina (Pisa®, Guadalajara, Jalisco, México) IV(62), se ligaron las venas ácigos izquierda y hemiácigos derecha, después se realizó punción con bisturí de plastía en el centro de la jareta y se introdujo una cánula de acceso vascular 18 fr (Rigid Suction Tubes, Medtronic Cardial Surgical, Minneapolis, EUA) el cual se conectó en el extremo opuesto a una venoclisis con normogotero (Flebotek®VetPisa®, Guadalajara, Jalisco, México), a través de la cual se dejó fluir solución Perfadex® (XVIVO, Göteborg, Suecia) a 4°C ( 20ml/Kg para lavar el pulmón), manteniendo una altura con respecto de la mesa de cirugía de 20 cm para mantener una presión de perfusión no mayor a la presión media de la arteria pulmonar (10-15 mm de Hg). Posteriormente tras asegurar que el animal se mantenía bajo anestesia quirúrgica, se dejó fluir la solución y se ligaron ambas venas cavas. Posteriormente se realizó una incisión en la aurícula izquierda por dónde se hizo circular la solución de lavado mezclada con sangre, la cual se recolectó con un aspirador de Yankauer (Kendall, Ciudad México, México) conectado a un sistema de aspiración. A continuación se realizó la eutanasia del modelo animal con sobredosis de pentobarbital sódico al 6.3% (Pisapental®, Pisa®, Guadalajara, Jalisco, México) con apego de las especificaciones de la NOM-062-ZOO, 1999; acto seguido se ligó y cortó la arteria aorta ascendente en la salida del corazón, se separó la tráquea del esófago, se aplicó una maniobra de reclutamiento alveolar, se ligó la tráquea con cinta umbilical estéril (Protec®, Morelos, México), se seccionó lo más próximo a la laringe para retirar el bloque cardiopulmonar. Una vez fuera del tórax, en cirugía de banco se realizó la disección de venas y arteria pulmonar, se retiró el corazón y se conservó un rodete de la aurícula izquierda en los pulmones. Figura 5



**Figura 5.** Rodete de la aurícula izquierda en el bloque pulmonar.

#### **7.4. Perfusión pulmonar ex vivo técnica de Toronto.**

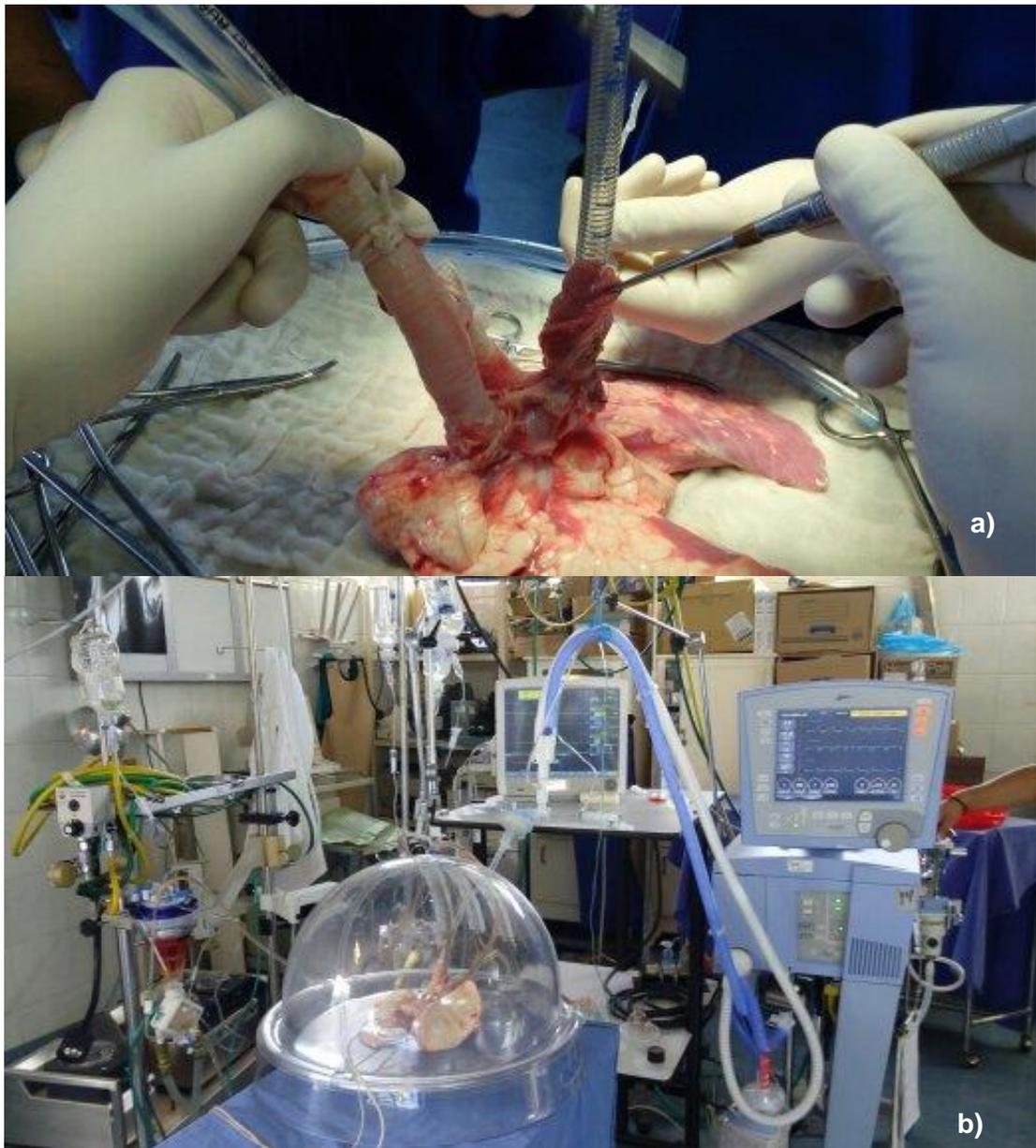
El bloque pulmonar se colocó dentro de la cámara de perfusión *ex vivo* (Organ Chamber, XVIVO Göteborg, Suecia), se conectó una cánula a la arteria pulmonar y otra en el rodete del atrio izquierdo y se fijaron las cánulas con sutura para evitar fuga. Ambas cánulas se conectaron a un oxigenador y reservorio neonatal mediante conectores de 3/8 con Luer y sensor de presión, (Terumo Capiiox® Baby-RX, Maryland, EUA) los cuales se conectaron a una bomba de circulación extracorpórea de rodillos (CDL-10140 GAMBRO, Lund, Suecia). Una vez conectado el sistema, los sensores de presión se conectaron al monitor de signos vitales para el registro de la hemodinamia. Figura 6

Previo a la colocación del bloque pulmonar en la campana de perfusión, el reservorio fue cebado (llenado) con 500 ml de solución Steen® (XVIVO, Göteborg, Suecia) a 4°C, la cual fue desoxigenada mediante una mezcla de gases 86% N<sub>2</sub>, 6% O<sub>2</sub>, 8% CO<sub>2</sub> con un flujo de 1000 ml/min para mantener una PCO<sub>2</sub> entre 35-45 mmHg (43). Una vez purgado el sistema, se colocaron dos sensores de temperatura y se conectaron las cánulas para comenzar a perfundir y ventilar los pulmones, durante dos horas, que fue el tiempo que duró el estudio. La ventilación mecánica se proporcionó con el ventilador Avea™ y el mantenimiento de la temperatura de perfusión se realizó con el Intercambiador de temperatura HYP 10-200 (GAMBRO, Lund, Suecia) de la bomba de perfusión. Cuadro 7

**Cuadro 7.** Estrategia ventilatoria y de perfusión utilizada durante el ensayo EVLP.

<b>Perfusión Pulmonar Exvivo con base a Protocolo Toronto</b>										
	0	10	20	30	40	50	60	90	120	
° C	20	30	32	37	37	37	37	37	37	
Flujo %GC	4	4	8	12	20	32	40	40	40	
PMAP				10-15	mmHg					
PMAI				3-5	mmHg					
	Se inicia la ventilación a los 32 ° C / 20 min									
RPM				7-20	RPM					
VT				7	ml/kg					
PEEP				5	cmH <sub>2</sub> O					
FIO <sub>2</sub>				21%						
Mezcla gas (L/min)				0.5	2 Lts/min					

Tomado de Cypel M. et al, 2008 (40).



**Figura 6.** a) Colocación de cánulas en la arteria pulmonar y atrio izquierdo; b) Sistema de PPEV montado en el departameto de Cirex. En el que se observa el bloque pulmonar dentro de la campana de perfusión, conectado al ventilador para asistencia mecanica ventilatoria y a la bomba de perfusión.

## 8. Evaluaciones.

### 8.1. Hemodinámica.

Posterior a la colocación de los catéteres en la vena yugular externa y arteria carótida común se realizó la evaluación para el funcionamiento del bloque pulmonar, en el tiempo basal en el cerdo donador; se registró el valor basal del gasto cardiaco (GC), presión arterial media (PAM), presión media de arteria pulmonar (PMAP), resistencia vascular pulmonar (RVP). Una vez que el bloque pulmonar se encontraba en el sistema de perfusión pulmonar *ex vivo*, la evaluación hemodinámica se realizó cada 30 min, esta vez, solo se registró el valor de la presión media de la arteria pulmonar (PMAP) y la presión del atrio izquierdo (PAI) cada 30 minutos durante dos horas de estudio. Cuadro 8.

**Cuadro 8.** Tipo de muestras y parámetros a evaluar previo y durante la conducción del estudio de perfusión pulmonar *ex vivo* con base al protocolo Toronto. Cypel M. et al. 2008 (40).

	<b>Parámetro evaluados</b>	<b>Tiempo de toma de muestra</b>
<b>Hemodinamia</b>	PMAP, PAI, RVP	Medición basal y cada 30 min. Durante 2 horas. De PPEV. (5 mediciones).
<b>Gasometría</b>	PaO <sub>2</sub> , PaCO <sub>2</sub> , PvO <sub>2</sub> , PvCO <sub>2</sub> , pH arterial, pH venoso, HCO <sub>3</sub> , PaO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub> , lactato, Glucosa	Medición basal y cada 30 min. Durante 2 horas. De PPEV. (5 mediciones).
<b>Ventilación</b>	C stat, C dyn, Raw, Pplat, Paw y Ppic	Medición basal y cada 30 min. Durante 2 horas. De PPEV. (5 mediciones).
<b>RX</b>	Proyección dorso ventral	Medición basal y cada hora. Durante 2 horas. De PPEV. (3 mediciones).
<b>LBA</b>	100 mL/9 jeringas de 20 cc	Medición basal y final.
<b>Microscópico</b>	Biopsia	Medición basal y cada hora. Durante 2 horas. De PPEV. (3 mediciones).
<b>Gravimétrico</b>	100 g de pulmón izquierdo y derecho	Colectar muestra al finalizar el estudio.
<b>Ac siálico</b>	Cuantificación de AS libre	Tejido pulmonar, LBA y perfusato en medición basal y final

## **8.2. Gasométrica.**

La evaluación gasométrica en el donador se realizó en el donador tomando 0.5 ml de sangre arterial y 0.5 ml de sangre venosa con jeringas heparinizadas y se obtuvieron los valores basales de presión parcial arterial de oxígeno ( $PaO_2$ ), presión parcial arterial de dióxido de carbono ( $PaCO_2$ ), presión venosa de oxígeno ( $PvO_2$ ), presión venosa de dióxido de carbono ( $PvCO_2$ ), pH arterial, pH venoso,  $HCO_3$ , lactato y glucosa; para la evaluación en el bloque pulmonar, se realizó cada 30 min tomando 0.5 ml de la solución de perfusión, proveniente de la cánula de la arteria pulmonar y de la cánula del atrio izquierdo durante las dos horas EVLP. Todas las muestras se procesaron en el analizador de gases (AVL Compact 2, Blood gas analyzer, Graz, Australia).

## **8.3. Mecánica Pulmonar.**

A través del ventilador Avea™ se obtuvieron valores basales en el donador. En el bloque pulmonar se registraron cada 30 minutos durante dos horas de estudio y se evaluó la distensibilidad estática ( $C_{stat}$ ), distensibilidad dinámica ( $C_{dyn}$ ), resistencia de la vía aérea ( $R_{aw}$ ), presión media de la vía aérea ( $P_{aw}$ ) y Presión pico ( $P_{pic}$ ).

## **8.4. Radiológica.**

Se realizaron radiografías simples de tórax en proyección ventro-dorsal una basal en el donador y dos más del bloque pulmonar, una por cada hora en el sistema de PPEV, (Acoma Super 80, Industry Co, LTD, Tokyo, Japón), y se evaluó la presencia de edema. Para esto se dividió la radiografía en cuatro cuadrantes: una línea vertical por la mitad de la radiografía y una línea horizontal sobre el parénquima pulmonar, lo que da como resultado cuatro cuadrantes; craneal izquierdo, craneal derecho, caudal izquierdo y caudal derecho (51). La evaluación se realizó de forma ciega y cada cuadrante se calificó de acuerdo al grado de edema y se obtuvo un puntaje para cada pulmón como se muestra en el Cuadro 9.

**Cuadro 9.** Escala del grado de edema pulmonar evaluado en la radiografía (51).

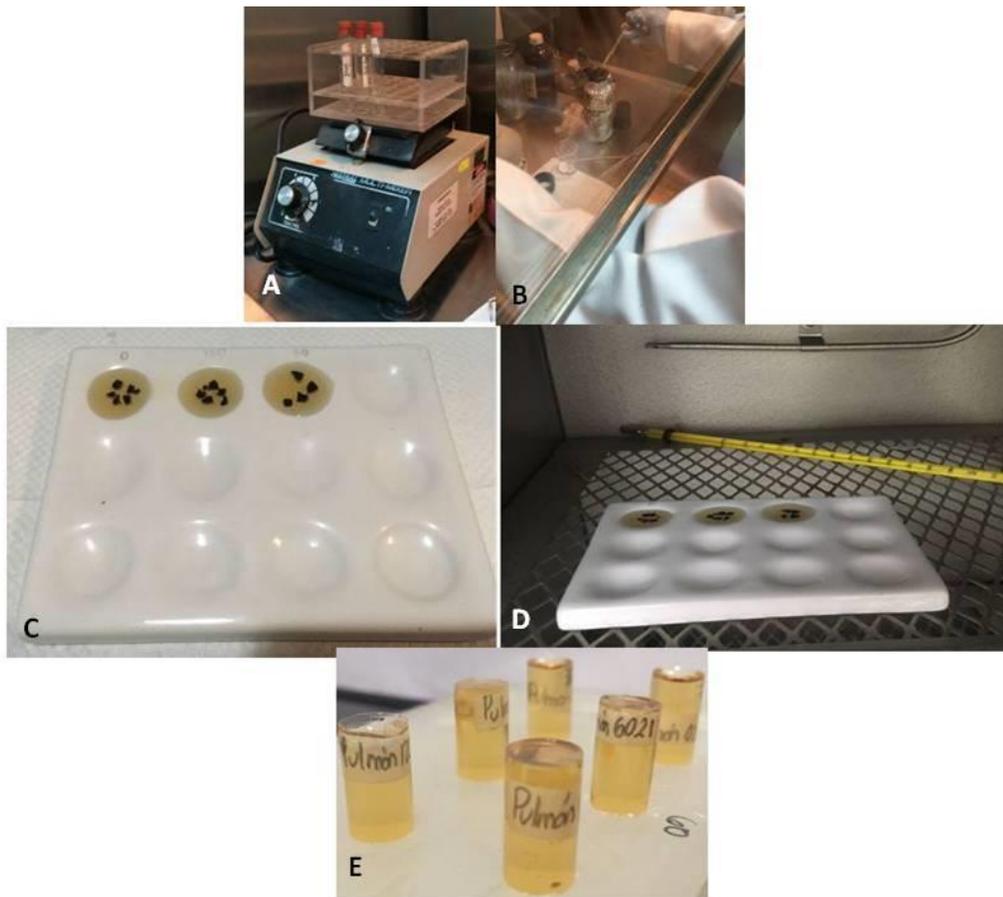
Valor asignado de acuerdo a la escala establecida.	Porcentaje de opacidad pulmonar por cuadrante.	Grado de edema
0	Sin opacidad	Sin alteraciones
1	Opacidad 0-25 %	leve
2	Opacidad 26-50 %	moderado
3	Opacidad 51-75 %	grave
4	Opacidad 76-100 %	severo

### **8.5. Microscópica.**

Se realizó tomando una biopsia basal en el cerdo donador y otra antes de realizar la circulación en el sistema de PPEV y cada hora una vez conectado al sistema de PPEV , cada biopsia tuvo un peso de un gramo y se fijaron en formalina acuosa al 10% durante 24 horas, se incluyeron en parafina, se les realizaron cortes de 4µm, se tiñeron con hematoxilina-eosina (H&E) y se analizaron en el microscopio óptico binocular (DM750 ©Leica Microsystems GmbH, Alemania) para evaluar la formación de edema, daño alveolar, infiltrado de neutrófilos, macrófagos. Se utilizó una escala con valores de uno a cuatro para determinar el grado de afección, en dónde I = ausente, II = ligero, III = moderado y IV = severo (52).

### **8.6. Microscopía Electrónica.**

La evaluación para microscopía electrónica se realizó en un animal de cada grupo, tomando una biopsia basal antes de realizar la circulación en el sistema de PPEV y una biopsia durante cada hora una vez conectado al sistema de PPEV, cada biopsia tuvo un tamaño aproximado de 0.5 cm y se fijó en una mezcla de formaldehído al 4%, glutaraldehído al 2.5%, buffer PBS (Técnica de Karnosky). Se realizó la inclusión en resina epóxica (EPON-812® ELECTRON MICROSCOPY SCIENCES®, Suiza), se realizaron cortes finos de 60 nm y se utilizó tinción negativa para brindar contraste a la imagen. Se analizaron en el microscopio electrónico de transmisión (JEOL modelo JEM-2010, Massachussets, EUA) con la finalidad de evaluar la presencia del glicocálix. Figura 7



**Figura 7.** Procesamiento del tejido pulmonar obtenido en la biopsia pulmonar para su análisis de microscopía electrónica. a) Deshidratación del tejido; b) contraste con tetraóxido de osmio; c) fijación con resina epóxica; d) polimerización de resina; e) pulmón embebido en bloque.

### 8.7. Cuantificación de edema pulmonar.

Se determinó por medio de análisis gravimétrico, una vez concluidas las dos horas de Perfusión Pulmonar *ex vivo*, se pesaron 1000 gr de tejido pulmonar, los cuales se desecaron durante 15 días en estufa de calentamiento Isotemp™ Standard Lab Incubator (Fisher Scientific™, Massachusetts, EUA) a temperatura constante (60-65°C) y la relación de peso pulmón húmedo/pulmón seco (H/S) se obtuvo a través de la siguiente fórmula:  $(PH-PS) / PS$ , como resultado final (53).

### **8.8. Evaluación inmunohistoquímica.**

Mediante inmunohistoquímica (IHQ) se evaluó la expresión in situ del ácido siálico en las muestras de tejido pulmonar tomadas a los mismos tiempos que para los estudios histológicos. Las muestras fueron tomadas del bloque de tejido pulmonar incluido en parafina y se realizaron cortes de 3 micras. Se montaron en laminillas silanizadas y se desparafinaron durante 20 minutos a 80 °C. Se deshidrataron mediante transferencia en xilol 5 minutos a alcohol absoluto durante 1 minuto. Se colocaron en la cámara de recuperación de antígenos con buffer de citratos pH 6 en DECLOAKING CHAMBER™ NXGEN, durante 30 minutos, una vez que se enfriaron se lavaron con TBST 3 veces 3 minutos, la peroxidasa endógena se removió con peróxido al 30% durante 10 minutos y se lavó con TBST nuevamente. La reacción inespecífica se bloqueó con suero bloqueador (Vectastain Universal Quick Kit, Burlingame, CA) durante 15 minutos y se lavó al terminar el tiempo con TBST. El tejido se incubó con el anticuerpo primario (Polyclonal Antibody to Sialic Acid, abx 100414, abbexa Ltd. Cambridge, UK) diluido en suero bloqueador y se incubó durante 48 horas a 4°C, posteriormente se lavó 3 veces con TBST, 3 minutos y se incubó con el polímero MACH 2 Double Stain 1 (Biocare Medical MRCT523, CA, EUA) durante 30 minutos y se lavó al finalizar con TBST. Para revelar se utilizó Diaminobenzidina DAB (Biocare medical, CA, EUA) durante 20 min y finalmente, las laminillas se trataron con hematoxilina (Biocare Medical, CA, EUA) y para virar el contraste se utiliza una solución saturada de carbonato de litio (Fisher chemical, NY, EUA). En todos los grupos se realizó control negativo, el cual no tenía anticuerpo primario, y como tejido testigo se utilizó tejido de glándula salival. La cuantificación IHQ del ácido siálico se realizó con el Software Image J (<http://rsbweb.nih.gov/ij>) desarrollado por el National Institute of Health (NIH), con ayuda del pluggin IHC Profiler for the quantitative analysis of immunohistochemistry samples. Para esto se tomaron imágenes de microscopía en formato digital y a través de un microscopio con cámara fotográfica digital (Hitachi Digital) y una computadora con el software necesario para tomar imágenes. Se realizó la selección de áreas representativas, previa valoración de los resultados de la técnica inmunohistoquímica (controles), mediante la identificación de las zonas de mayor densidad de células positivas, evitando focos desvitalizados o con artefacto y se obtuvieron aleatoriamente 10 fotografías por tejido. (54)

### **8.9. Cuantificación de ácido siálico en tejido pulmonar.**

Se utilizó el Kit Sialic acid (NANA) Colorimetric Assay Kit BioVision, K566-100 (Mountain View, CA, EUA) para cuantificar los niveles de ácido siálico libre en tejido pulmonar, LBA y perfusato. Para evaluar en el tejido, se tomaron biopsias de aproximadamente 1cm<sup>2</sup> del bloque pulmonar antes de someterlo a la PPEV (basal) y al concluir esta (final del estudio). Posteriormente la biopsia se maceró en un mortero con 3 ml de buffer PBS y se homogenizó a 6500 rpm en el polytron® pt 2500 e (kinematica, lucerna, suiza). se centrifugó en tubos (ependorf safe lock®, CA, EUA) a 13500 rpm/10 min/4°C, se transfirió el sobrenadante en crioviales de polipropileno estéril, rosca externa (nalgene®, Massachusetts, EUA) y fue conservada a -80°C, hasta su evaluación.

### **8.10. Cuantificación de ácido siálico en lavado bronquioalveolar (LBA).**

Se tomó en ambos grupos a través de un broncoscopio flexible 6 mm bftype1t20d (Olympus®, Japón) se realizó broncoscopia y LBA del lóbulo craneal derecho, un lavado basal y final en el sistema PPEV, instilando cinco alícuotas de 20 ml de solución salina fisiológica (SSF) estéril a temperatura ambiente y tras un tiempo de 20 a 40 segundos se recolectó la solución por medio de aspiración de forma manual mediante una llave de 3 vías; se recuperó aproximadamente 80 ml de volumen. Figura 8.

### **8.11. Cuantificación de ácido siálico libre en perfusato.**

La muestra de perfusato, se tomó directamente de la cánula que se encontraba colocada en el atrio izquierdo al inicia la PPEV ya al concluir esta. Para la cuantificación de AS libre en tejido pulmonar, LBA y perfusato se utilizó para la cuantificación del AS se utilizó el kit sialic acid (NANA) colorimetric assay kit biovision, k566-100 (mountain view, CA, EUA).



**Figura 8.** Muestra el proceso de obtención del LBA. A) Inserción del broncoscopio flexible; B) instilación y recuperación de las alicuotas de SSF y C) cadena fría de las alicuotas para su correcto procesamiento.

#### **8.12. Análisis de Datos.**

El análisis estadístico de los datos paramétricos se realizó mediante análisis de varianza de medidas repetidas para muestras consecutivas (ANDEVA MR), Dunnett y Bonferroni, mientras que para los datos no paramétricos se utilizó U de Mann Whitney para muestras independientes y Friedman para muestras relacionadas, con el programa estadístico

SPSS 18.0 (Chicago: SPSS Inc.). Se consideraron como significativos valores de  $p < 0.05$ .

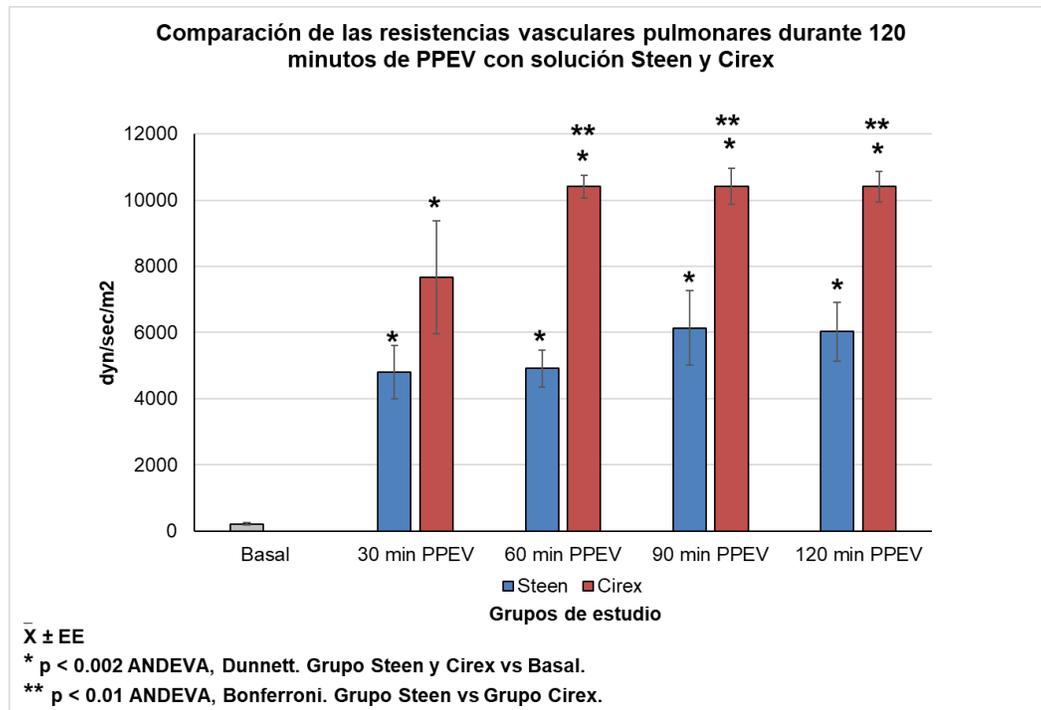
## 9. Resultados.

Todos los bloques cumplieron con los 120 min de perfusión pulmonar *ex vivo*.

### 9.1. Hemodinámicos.

La PAI y PMAP se mantuvieron dentro de los valores recomendados por el grupo de Toronto para realizar la PPEV.

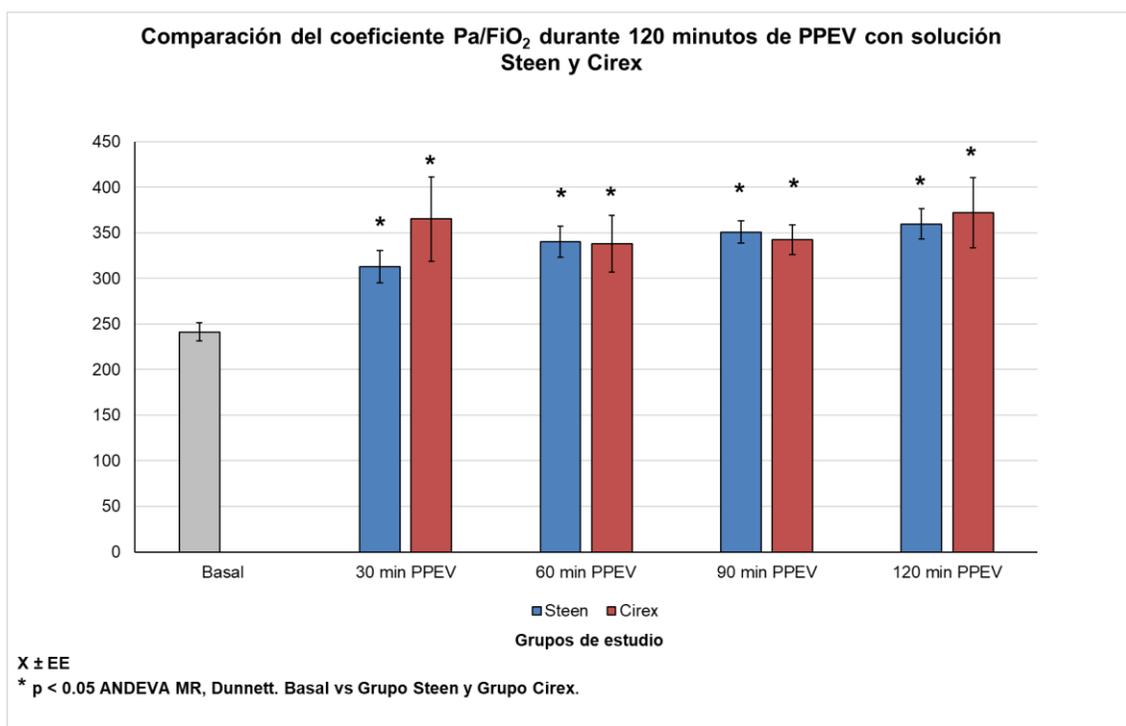
La RVP se incrementó a los 30 minutos de haber iniciado la PPEV en ambos grupos de estudio en comparación con sus valores basales ( $p < 0.05$ , ANDEVA MR, Dunnett) y así se mantuvo durante todo el estudio. Al comparar entre grupos, el incremento mostrado por el grupo Cirex fue mayor al mostrado por el grupo de solución de Steen durante todo el tiempo de perfusión. ( $p < 0.005$ , ANDEVA MR, Bonferroni). Gráfica 1



## 9.2. Gasométricos.

### 9.2.1. Cociente PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>.

Al comparar el cociente PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> durante la PPEV, se observó que en ambos grupos se incrementó de manera similar y significativa ( $p < 0.05$  ANDEVA MR, Dunnett) a partir de los 30 minutos de haber iniciado la PPEV y así se mantuvo durante todo el tiempo de estudio en comparación con sus valores basales. Al comparar entre grupos no se observaron diferencias significativas ( $p > 0.05$  ANDEVA MR, Bonferroni). Gráfica 2



### 9.2.2. PaO<sub>2</sub>.

En ambos grupos disminuyó de manera significativa la PaO<sub>2</sub> a los 30 minutos de iniciar la PPEV y así se mantuvo durante el tiempo restante del estudio en comparación con sus valores basales ( $p < 0.05$  ANDEVA MR, Dunnett). Al comparar entre grupos no se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ , ANDEVA MR, Bonferroni) Cuadro 10

### 9.2.3. PaCO<sub>2</sub>.

La PaCO<sub>2</sub> en el grupo de solución de Steen® disminuyó durante toda la PPEV en comparación con sus valores basales ( $p < 0.05$  ANDEVA MR, Dunnett); mientras que en el

grupo perfundido con solución Cirex se incrementó, pero este incremento solo fue significativo a los 30 minutos de iniciada la PPEV ( $p < 0.05$  ANDEVA MR, Dunnett). Al comparar entre grupos la disminución de la  $\text{PaCO}_2$  mostrada por el grupo de solución de Steen®, fue significativamente diferente a la mostrada por el grupo Cirex en todos los tiempos del estudio ( $p < 0.05$ , ANDEVA MR, Bonferroni). Cuadro 10.

#### **9.2.4. pH arterial.**

El pH arterial también disminuyó a los 30 minutos de iniciar la PPEV y así se mantuvo durante el tiempo restante del estudio en comparación con sus valores basales ( $p < 0.05$  ANDEVA MR, Dunnett); sin embargo, esta disminución fue mayor en el grupo perfundido con solución de Steen®, la cual fue significativamente diferente en todos los tiempos de PPEV en comparación con el grupo perfundido con solución Cirex ( $p < 0.05$ , ANDEVA MR, Boferroni). Cuadro 10.

#### **9.2.5. pH Venoso.**

En ambos grupos disminuyó el pH venoso en comparación con sus valores basales durante toda la PPEV ( $p < 0.05$  ANDEVA MR, Dunnett). Al comparar entre grupos la disminución mostrada por el grupo perfundido con solución de Steen fue superior a la del grupo Cirex en todos los tiempos del estudio ( $p < 0.05$  ANDEVA MR, Bonferroni). Cuadro 10.

#### **9.2.6. PaO<sub>2</sub>.**

En ambos grupos disminuyó de manera significativa la  $\text{PaO}_2$  a los 30 minutos de iniciar la PPEV y así se mantuvo durante el tiempo restante del estudio en comparación con sus valores basales ( $p < 0.05$  ANDEVA MR, Dunnett). Al comparar entre grupos no se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ , ANDEVA MR, Bonferroni) Cuadro 10.

#### **9.2.7. PaCO<sub>2</sub>.**

La  $\text{PaCO}_2$  en el grupo de solución de Steen disminuyó durante toda la PPEV en comparación con sus valores basales ( $p < 0.05$  ANDEVA MR, Dunnett); mientras que en el grupo perfundido con solución Cirex se incrementó, pero este incremento solo fue

significativo a los 30 minutos de iniciada la PPEV ( $p < 0.05$  ANDEVA MR, Dunnett). Al comparar entre grupos la disminución de la  $\text{PaCO}_2$  mostrada por el grupo de solución de Steen®, fue significativamente diferente a la mostrada por el grupo Cirex en todos los tiempos del estudio ( $p < 0.05$ , ANDEVA MR, Bonferroni). Cuadro 10.

#### **9.2.8. PvO<sub>2</sub>.**

La  $\text{PvO}_2$  se incrementó durante toda la PPEV vs sus valores basales en ambos grupos de estudio; pero solo el aumento mostrado por el grupo Cirex ( $p < 0.01$  ANDEVA MR, Dunnett) fue significativo. Al comparar entre grupos no se observaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ , ANDEVA MR, Boferroni). Cuadro 10.

#### **9.2.9. PVCO<sub>2</sub>.**

La  $\text{PVCO}_2$  disminuyó vs sus valores basales en ambos grupos de estudio durante toda la PPEV, con excepción de los 30 minutos de la misma en el grupo de Cirex; sin embargo, en ningún caso se observó diferencia significativa ( $p > 0.05$  ANDEVA MR, Dunnett). Al comparar entre grupos, el incremento mostrado por el grupo de Cirex a los 30 minutos de la PPEV fue significativamente diferente a los valores mostrados por el grupo de Steen® durante todo el estudio ( $p < 0.05$  ANDEVA MR, Bonferroni). Cuadro 10.

#### **9.2.10. Glucosa.**

La glucosa durante toda la PPEV disminuyó en ambos grupos en comparación con sus valores basales ( $p < 0.05$  Andeva MR, Dunnett). Al comparar entre grupos la disminución mostrada por el grupo de Steen fue significativa en comparación con el grupo Cirex en todos los tiempos del estudio ( $p < 0.05$  Andeva MR, Bonferroni). Cuadro 10.

#### **9.2.11. Lactato.**

El lactato se incrementó en ambos grupos durante toda la perfusión PPEV en comparación con sus valores basales. Sin embargo, este incremento fue significativo en el grupo perfundido con solución de Steen® a los 60, 90 y 120 minutos de PPEV ( $p < 0.05$  ANDEVA MR, Dunnett); mientras que el grupo Cirex solo fue a los 120 minutos de PPEV

( $p < 0.05$  ANDEVA MR, Dunnett). Al comparar entre grupos el grupo de Steen® mostró mayor incremento que el grupo Cirex, pero solo fue significativo a los 30, 60 y 90 minutos del estudio ( $p < 0.05$ , ANDEVA MR, Bonferroni). Cuadro 10.

### 9.2.12.HCO<sub>3</sub>.

Durante toda la PPEV, en los dos grupos disminuyó el HCO<sub>3</sub> en comparación con sus valores basales ( $p < 0.05$  ANDEVA MR, Dunnett). Al comparar entre grupos la disminución mostrada por el grupo perfundido con solución de Steen fue mayor que la del grupo Cirex en todos los tiempos del estudio ( $p < 0.05$  ANDEVA MR, Bonferroni). Cuadro 10

**Cuadro 10.** Comparativo de los promedios de los valores gasométricos obtenidos a lo largo de 120 minutos entre ambos grupos.

Principales hallazgos gasométricos durante la perfusión pulmonar ex vivo del bloque pulmonar con solución Steen® y solución Cirex						
Tiempos de evaluación del bloque pulmonar						
Parámetro evaluado	Grupo de estudio	Basal	30 min	60 min	90 min	120 min
PaO <sub>2</sub>	I	158.00 ± 7.60	82.12 ± 4.89 *	93.60 ± 4.65 *	96.52 ± 3.35 *	90.00 ± 4.58 *
	II	158.00 ± 7.60	100.46 ± 12.69 *	93.05 ± 8.53 *	91.50 ± 4.51 *	102.30 ± 10.60 *
PaCO <sub>2</sub>	I	28.75 ± 2.0	18.8 ± 3.1 °	20.4 ± 4.7 °	19.0 ± 5.1 °	18.4 ± 4.9 *
	II	28.75 ± 2.0	42.1 ± 8.9 *	32.2 ± 4.2	21.8 ± 8.4	30.5 ± 2.1 °
pH Arterial	I	6.9 ± 0.1	6.8 ± 0.1 *	6.7 ± 0.1 *	6.7 ± 0.2 *	6.7 ± 0.1 *
	II	6.9 ± 0.2	7.0 ± 0.0 *	7.0 ± 0.0 *	7.0 ± 0.1 *	6.9 ± 0.1 *
PvO <sub>2</sub>	I	54.50 ± 9.19	72.3 ± 2.49	72.58 ± 2.09	77.48 ± 4.41	64.6 ± 9.39
	II	54.50 ± 9.19	89.9 ± 10.93 *	89.48 ± 3.84 *	100.6 ± 10.70 *	87.48 ± 7.43 *
pH Venoso	I	7.40 ± 0.01	6.78 ± 0.04 °	6.67 ± 0.05 °	6.61 ± 0.06 °	6.64 ± 0.02 °
	II	7.40 ± 0.01	7.04 ± 0.21 *	7.04 ± 0.21 *	7.02 ± 0.26 *	6.98 ± 0.38 *
Glucosa mg/dL	I	5.66 ± 0.39	3.66 ± 0.5 *	2.64 ± 0.5 *	1.76 ± 0.6 *	1.66 ± 0.5 *
	II	10.25 ± 0.3	8.64 ± 1.4 °	7.78 ± 1.9 °	7.12 ± 2.6 °	5.66 ± 1.9 °
Lactato mmol/L	I	3.78 ± 1.31	6.0 ± 0.37	7.40 ± 0.50 °	8.62 ± 0.78 °	9.56 ± 0.92 °
	II	3.78 ± 1.31	2.30 ± 0.58	4.84 ± 1.05	5.42 ± 0.56	7.22 ± 0.90 *
HCO <sub>3</sub> mmol/L	I	20.28 ± 0.91	3.54 ± 0.32 °	2.86 ± 0.34 °	2.36 ± 0.34 °	2.64 ± 0.32 °
	II	20.28 ± 0.91	10.02 ± 0.82 *	7.98 ± 0.62 *	7.38 ± 0.91 *	6.72 ± 0.73 *

Promedios ± EE.

\* $p < 0.05$  ANDEVA MR Dunnett. Basal Vs grupo Steen® y grupo Cirex.

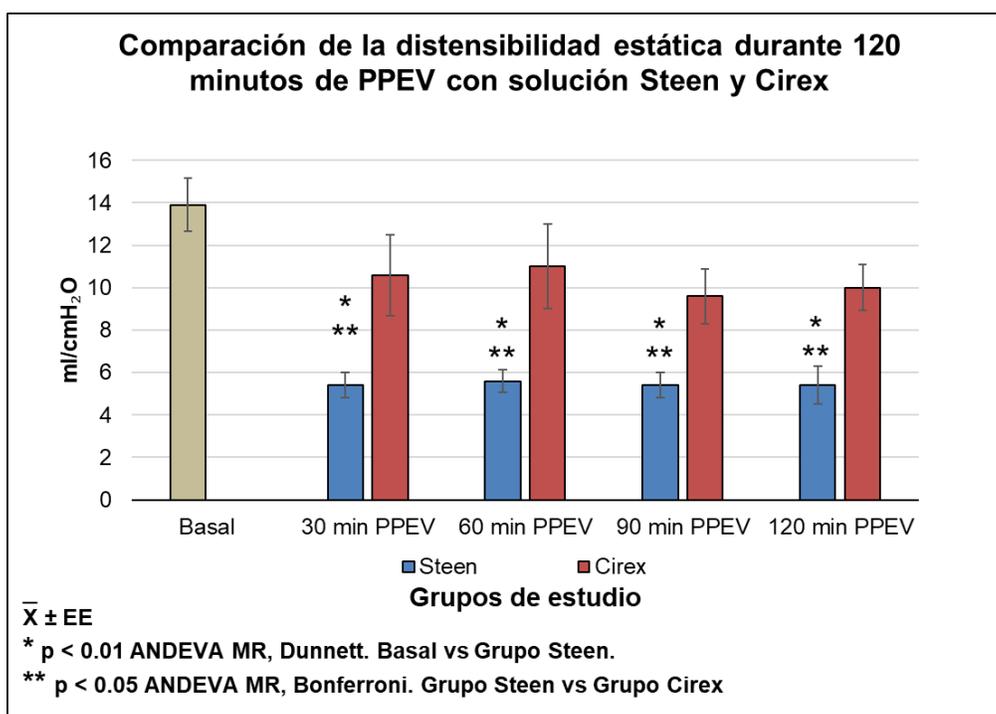
° $p < 0.05$  ANDEVA MR Bonferroni. Grupo Steen® vs grupo Cirex

### 9.3. Hallazgos en la mecánica pulmonar.

Todas las variables evaluadas se mantuvieron dentro de parámetros de referencia durante todo el tiempo de estudio; solo se observaron cambios en la Cstat, Cdyn, mientras que las Raw, Pplat, Ppic y Pmed se mantuvieron similares a sus valores basales.

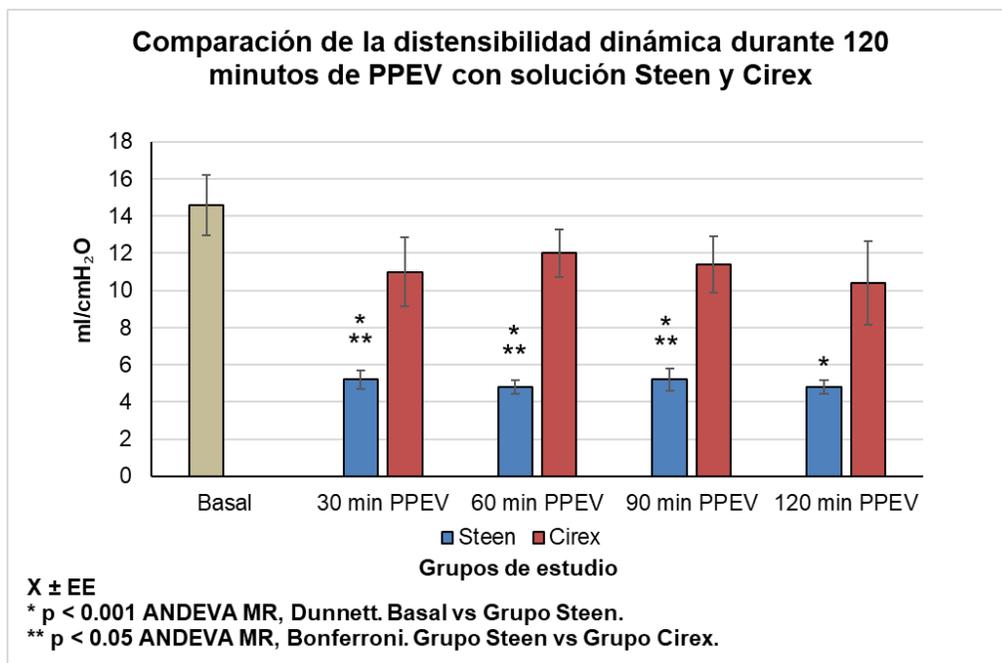
#### 9.3.1. Distensibilidad estática (Cstat).

La Cstat disminuyó en los dos grupos de estudio durante la PPEV en comparación con sus valores basales, pero esta disminución solo fue significativa en el grupo de solución de Steen en todos los tiempos de la PPEV ( $p < 0.01$ , ANDEVA MR, Dunnett). Al comparar entre grupos, también la disminución mostrada por el grupo de Steen fue significativa vs el grupo Cirex durante toda la PPEV ( $p < 0.05$ , ANDEVA MR, Bonferroni). Gráfica 3



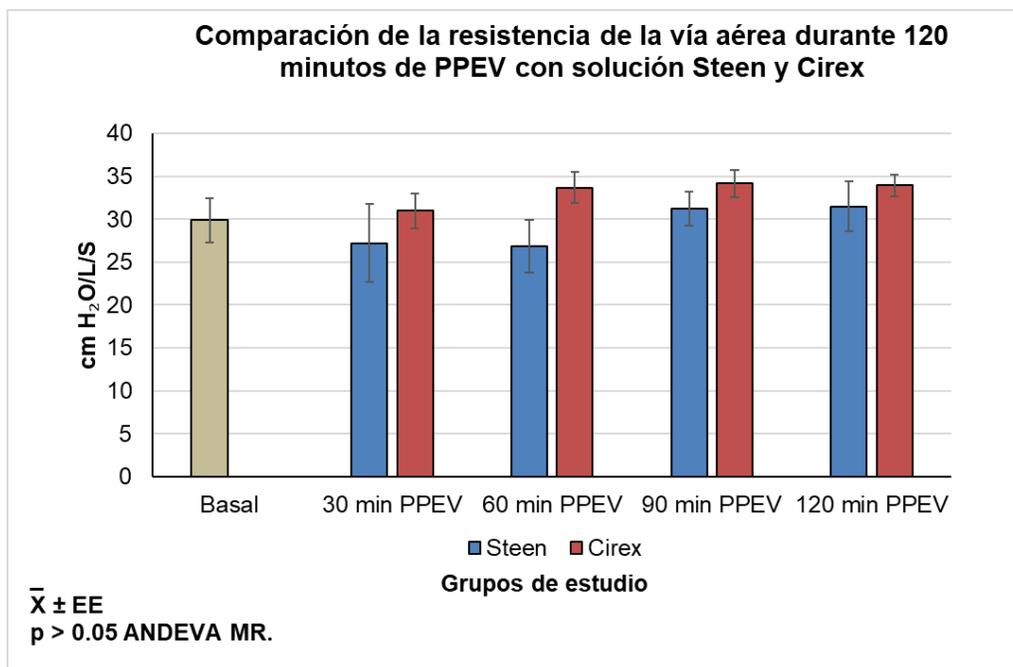
#### 9.3.2. Distensibilidad dinámica (Cdyn).

La Cdyn disminuyó en los 2 grupos de estudio durante toda la PPEV en comparación con sus valores basales, sin embargo, solo la disminución mostrada por el grupo perfundido con solución de Steen fue significativamente diferente tanto con sus valores basales ( $p < 0.001$ , ANDEVA MR, Dunnett) como con el grupo perfundido con solución Cirex a los 30, 60 y 90 minutos de perfusión ( $p < 0.05$ , ANDEVA MR, Dunnett). Gráfica 4



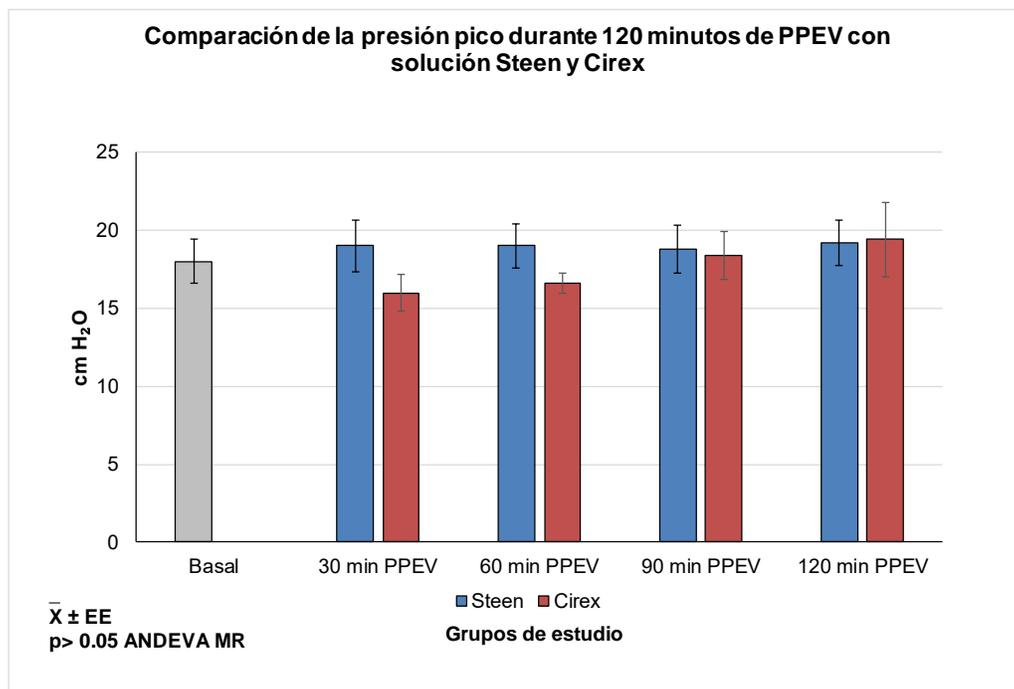
### 9.3.3. Resistencia de la vía aérea (Raw).

La Raw se mantuvieron similares a sus valores basales durante todo el estudio ( $p = 0.081$ , ANDEVA MR, Dunnett); mientras que en el grupo de Steen se mantuvo similar a la de sus valores basales. Al comparar entre grupos, no se observaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ , ANDEVA MR. Bonferroni). Gráfica 5.



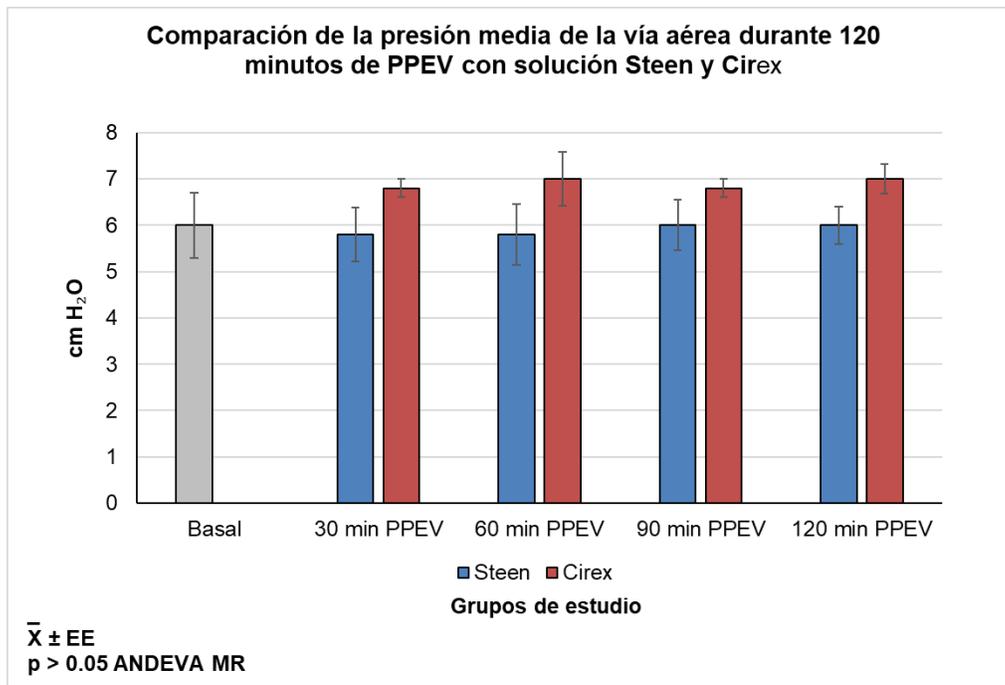
### 9.3.4. Presión Pico (Ppic).

La Ppic en ambos grupos de estudio, se mantuvo similar a sus valores basales durante todo el tiempo de estudio ( $p > 0.05$ , ANDEVA MR, Dunnett). Tampoco se observaron diferencias al comparar su comportamiento entre grupos ( $p > 0.05$ , ANDEVA MR, Bonferroni). Gráfica 6.



### 9.3.5. La presión media en la vía aérea.

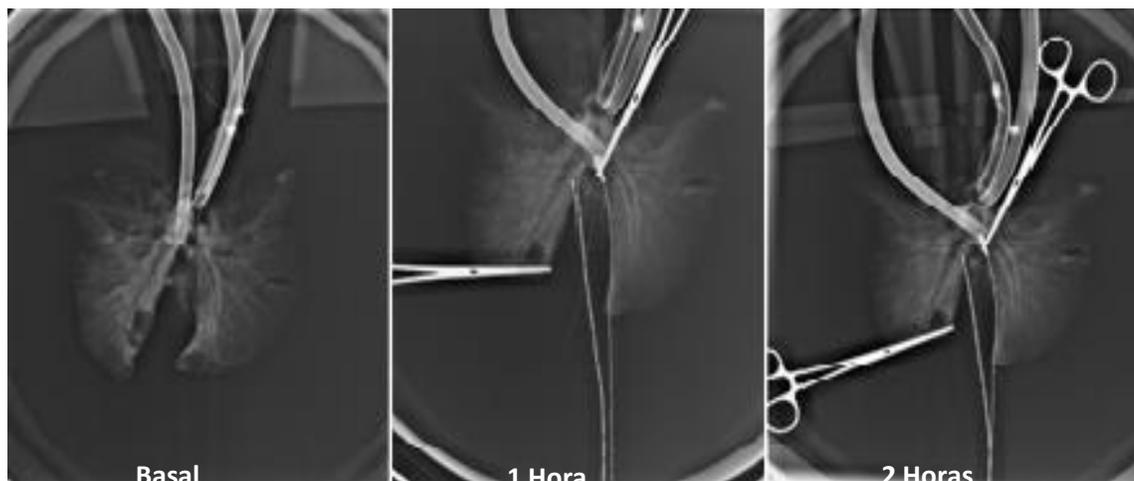
La Paw en el grupo perfundido con solución de Steen, se mantuvo similar a sus valores basales durante todo el estudio; mientras que en el grupo de Cirex se incrementó de forma leve vs sus valores basales, pero este incremento no fue significativo ( $p > 0.05$  ANDEVA MR, Dunnett); al comparar entre grupos, no se observaron diferencias significativas ( $p > 0.05$  ANDEVA MR, Bonferroni). Gráfica 7



#### 9.4. Hallazgos radiológicos.

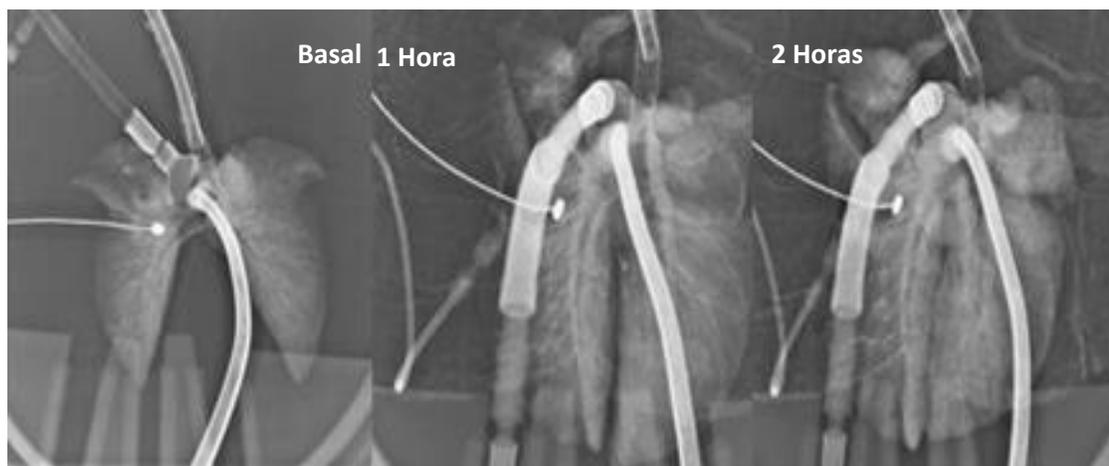
En ambos grupos las radiografías basales no mostraron ninguna anomalía. Sin embargo, los estudios radiológicos realizados después de la procuración mostraron edema leve y al final del estudio todos los animales mostraron edema moderado. Al comparar entre grupos, durante todo el estudio no se observaron diferencias estadísticas ( $p > 0.05$ , U de Mann-Whitney, Friedman). Figuras 9 y 10

#### Grupo I- Solución Steen®



**Figura 9.** Cambios radiográficos correspondientes al bloque pulmonar del grupo perfundido con solución Steen®, durante un periodo de 2 horas.

#### Grupo II- Solución Cirex.

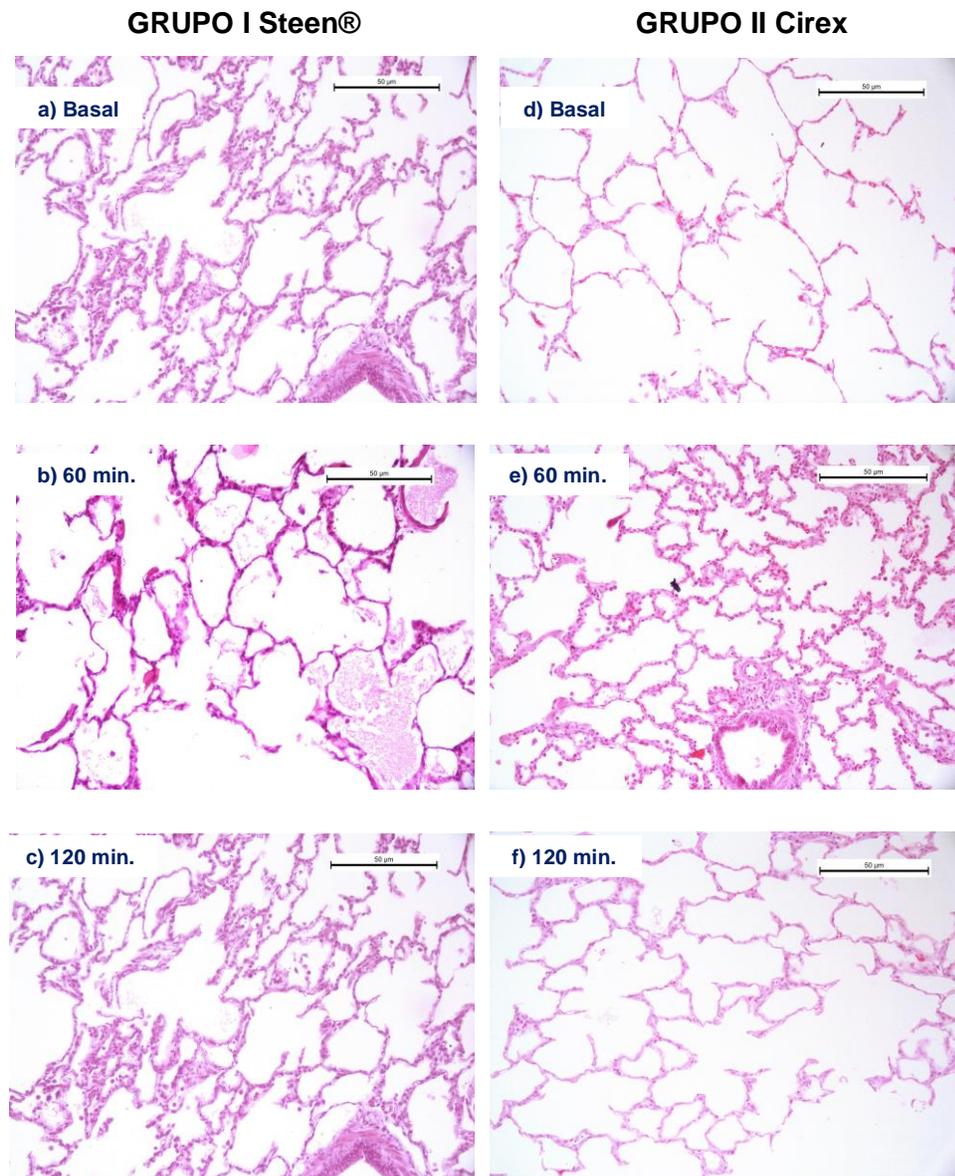


**Figura 10.** Cambios radiográficos correspondientes al bloque pulmonar del grupo perfundido con solución Cirex. Basal sin cambios sugerentes de edema; una hora presencia de edema leve; y dos horas edema moderado.

#### 9.4.1. Hallazgos microscopía de luz.

Los cortes histológicos basales de todos los animales previos a la PPEV en ambos grupos mostraron moderada presencia de neutrófilos y macrófagos, así como leve infiltrado linfocítico, y en ningún caso se observó edema. A los 60 minutos de PPEV el grupo de

Steen mostró edema y los dos grupos presentaron leve infiltrado de PMN. Al final del estudio ningún grupo presentó edema, pero si mostraron el leve infiltrado inflamatorio. Al comparar entre grupos, solo la presencia de edema leve mostrado por el grupo de solución de Steen fue significativo ( $p < 0.05$  U de Mann Whitney). Además, durante todo el estudio, la estructura del alveólo se mantuvo de apariencia normal. Figura 11 y Cuadro 11



**Figura 11.** Cambios histológicos presentados en el tejido pulmonar obtenido de biopsias durante la PPEV. Tinción H&E 20µm. Micrografías de tejido pulmonar en el grupo de solución Steen® (H&E) 20 µm: A) Histología pulmonar normal B) presencia

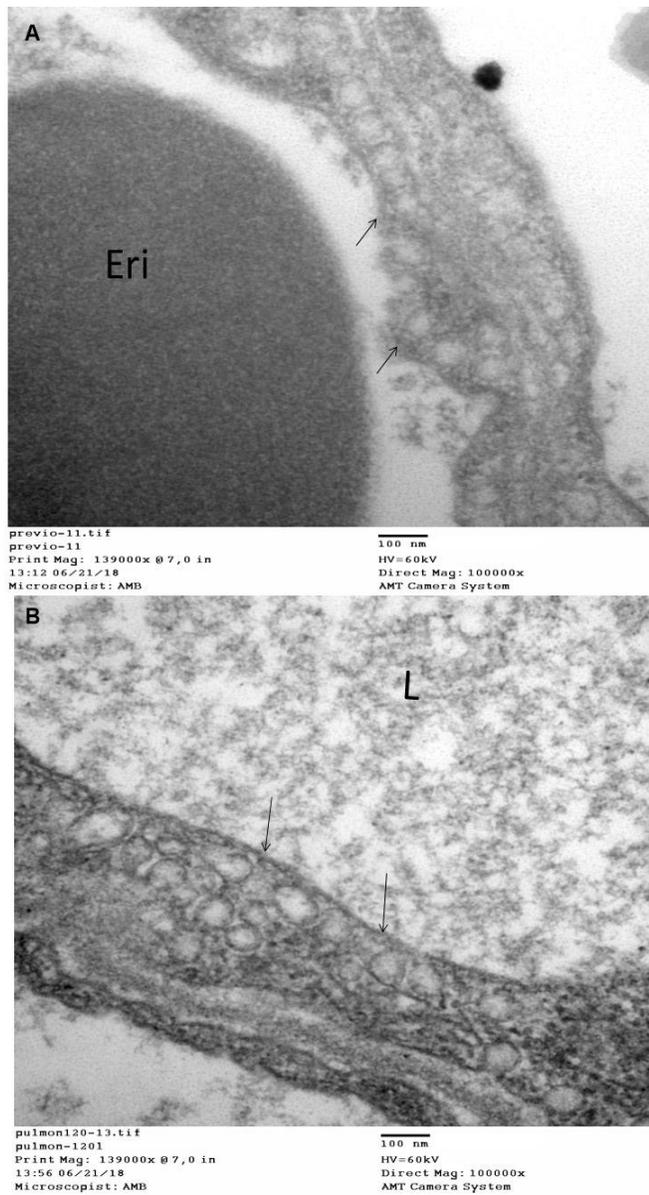
de material proteináceo dentro de los espacios alveolares. C) infiltrado inflamatorio Micrografías de tejido pulmonar en el grupo de solución Cirex (H&E) 20 µm: D) Lumen alveolar, E) Infiltrado inflamatorio leve F) Histología pulmonar normal.

**Cuadro 11.** Hallazgos microscópicos en ambos grupos de estudio.

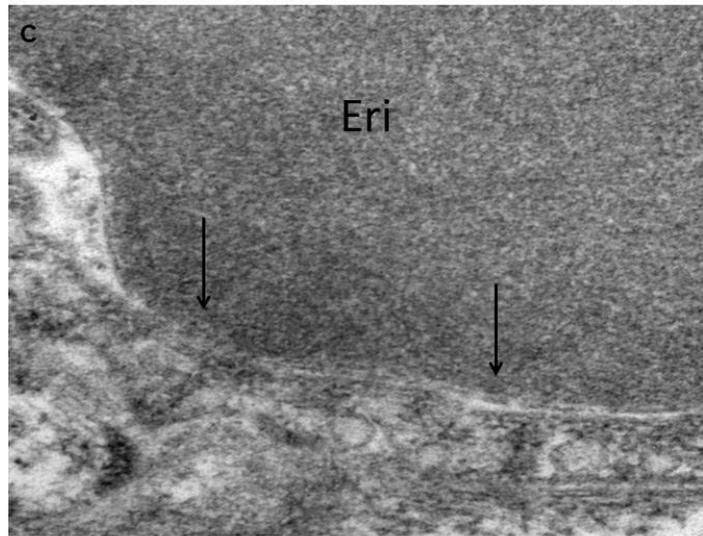
	Donador		Basal		60 minutos		120 minutos	
	I	II	I	II	I	II	I	II
<b>Edema</b>	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Leve	Ausente	Ausente	Ausente
<b>Significancia U de Mann Whitney</b>		1.00		1.00		1.00		0.69
<b>Infiltrado neutrofílico</b>	Ausente	Moderado	Ausente	Leve	Ausente	Leve	Ausente	Leve
<b>Significancia U de Mann Whitney</b>		0.016		0.548		0.421		0.151
<b>Macrófagosa</b>	Ausente	Moderado	Ausente	Leve	Ausente	Leve	Ausente	Leve
<b>Significancia U de Mann Whitney</b>		0.151		0.548		0.548		0.016
<b>Linfocitos</b>	Ausente	Leve	Ausente	Leve	Ausente	Leve	Ausente	Leve
<b>Significancia U de Mann Whitney</b>		0.151		0.548		0.548		0.302

#### 9.4.2. Microscopía electrónica.

Después de teñir con técnica de contraste con acetato de uranilo y citrato de plomo, en ambos grupos la superficie de la célula endotelial mostró discretas proyecciones cortas electro densas sugerentes del GE, al final del tiempo de estudio en ambos grupos, la superficie de la célula endotelial se observó lisa por la pérdida de esas proyecciones figura 12 y con presencia leve de material proteináceo que sugería la degradación del GE. Figura 13

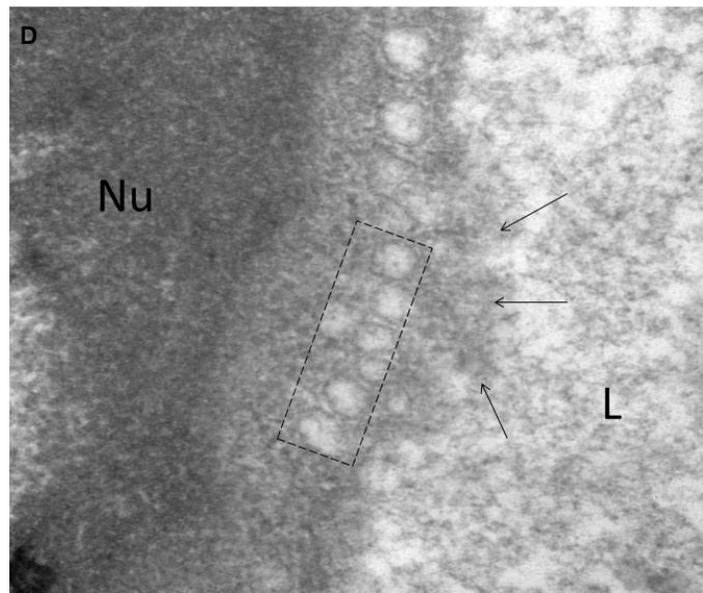


**Figura 12.** Fotografía electrónica de transmisión. Acercamiento de un capilar alveolar en el grupo de solución Steen®. A) Nótese en el lumen un eritrocito Eri. Superficie de la célula endotelial muestra discretas proyecciones cortas electrodensoas flechas sugerentes de la presencia de GE. B) Nótese el lumen ocupado por material proteináceo ligeramente electrodenso L. En el citoplasma se aprecian vacuolas pinocíticas recuadro (flechas). Técnica de contraste con acetato de uranilo y citrato de plomo.



previo-7.tif  
previo8  
Print Mag: 166000x @ 7,0 in  
13:07 06/21/18  
Microscopist: AMB

100 nm  
HV=60kV  
Direct Mag: 120000x  
AMT Camera System



pulmon120-4.tif  
pulmon-120c  
Print Mag: 166000x @ 7,0 in  
13:41 06/21/18  
Microscopist: AMB

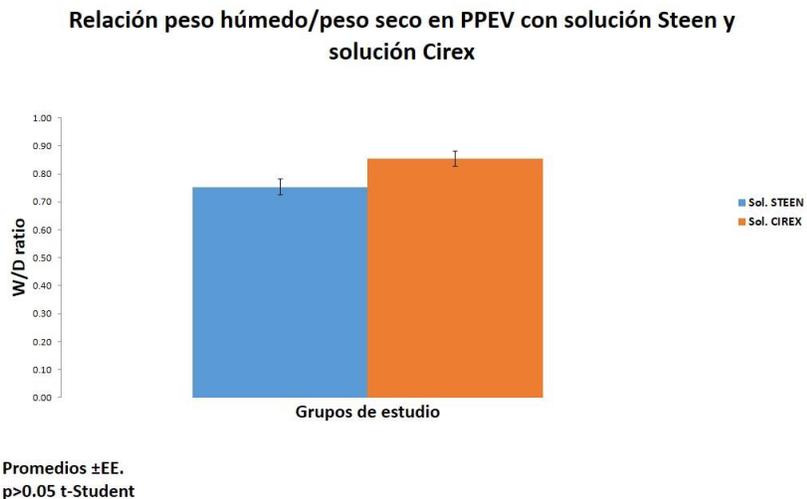
100 nm  
HV=60kV  
Direct Mag: 120000x  
AMT Camera System

**Figura 13.** Fotografía electrónica de transmisión de un capilar pulmonar en el grupo de solución Cirex C) Nótese el puente entre un eritrocito Eri y la superficie de una célula endotelial, la cual está completamente lisa. D) Acercamiento de una célula endotelial. Nótese el lumen ocupado por material proteináceo ligeramente electrodensos L. Superficie de la célula endotelial muestra discretas proyecciones cortas electrodensas flechas sugerentes de la presencia de GE. Citoplasma de la célula endotelial con

numerosas vacuolas pinocíticas recuadro. Núcleo de célula endotelial Nu. Técnica de contraste con acetato de uranilo y citrato de plomo.

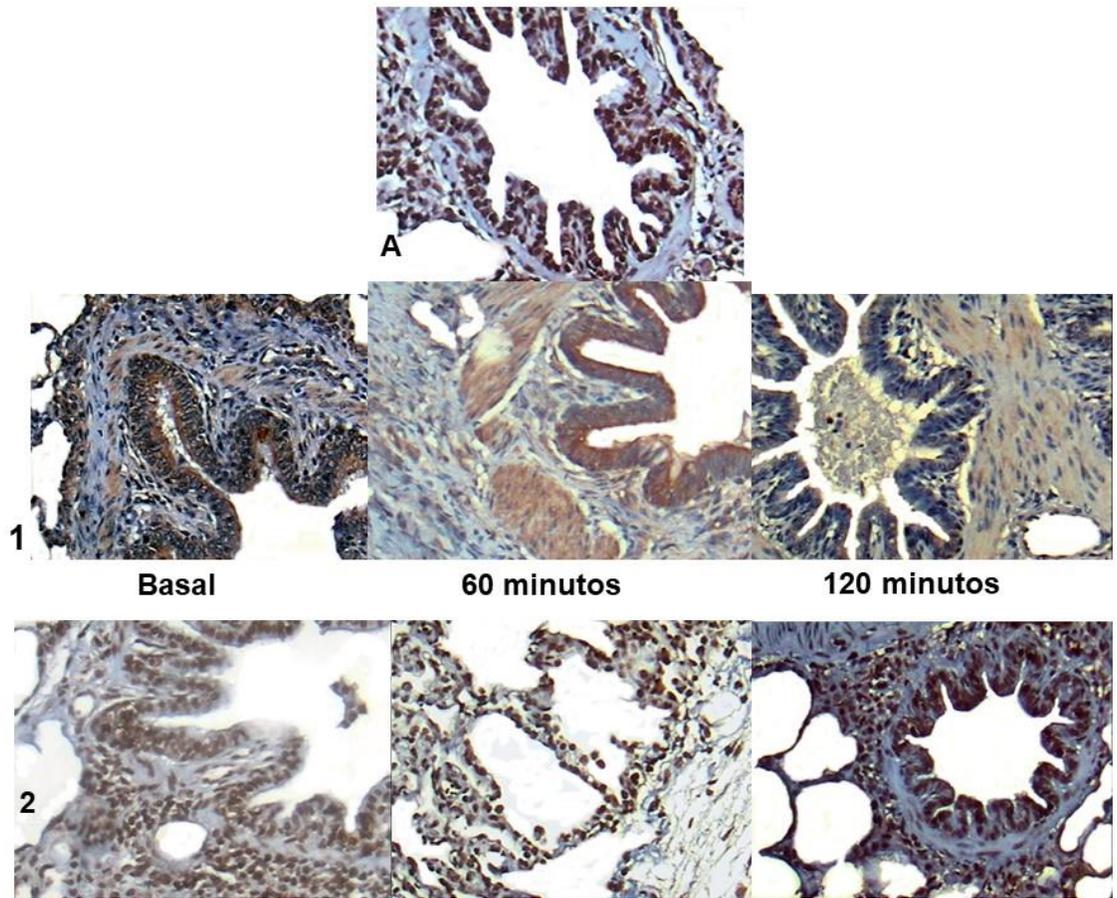
#### 9.4.3. Hallazgos gravimétricos.

La gravimetría mostró que los bloques perfundidos con solución Cirex, desarrollaron mayor edema, el cual se observó con el promedio de la ganancia de peso de la muestra de pulmón sometida a desecación. Sin embargo, durante la comparación por medio de la prueba T de Student no se encontró diferencia significativa entre ambos grupos ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.559$ ). Gráfica 8

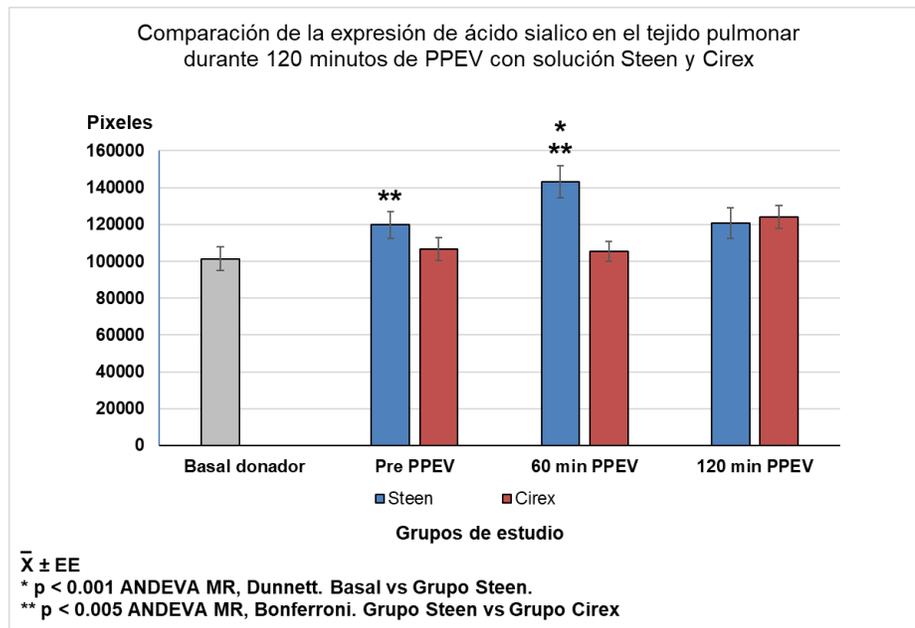


#### 9.5. Expresión *in situ* de AS por IHQ.

En ambos grupos durante todo el estudio, el 100% cerdos sometidos a PPEV mostraron expresión de AS en un patrón citoplasmático difuso en la superficie luminal de los vasos sanguíneos, lámina propia de la mucosa, submucosa de los bronquiolos y en las células epiteliales alveolares. Sin embargo, esta expresión fue mayor en el grupo perfundido con solución de Steen, pero solo fue significativa vs sus valores basales a los 60 minutos de PPEV ( $p < 0.005$  ANDEVA MR, Dunnett); mientras que en el grupo Cirex fue similar a sus valores basales. Al comparar entre grupos esta la expresión del grupo Steen® fue significativamente mayor previo a la PPEV y a 60 minutos de PPEV vs el grupo Cirex ( $p < 0.005$  ANDEVA MR, Bonferroni). Figura 14 y Gráfica 9



**Figura 14.** Tejido pulmonar 20x con Inmunomarcaje con diaminobencidina (DAB). A) basal con inmunomarcaje positivo en epitelio respiratorio. 1) cinética de dos horas de perfusión pulmonar *ex vivo* en el tejido pulmonar del grupo I solución Steen® donde se aprecia inmunomarcaje positivo en citoplasma del epitelio respiratorio y 2) solución Cirex.

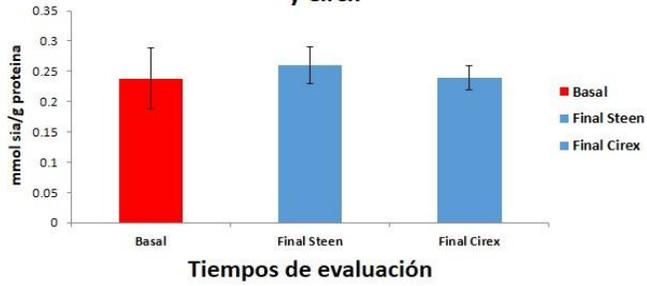


**Gráfica 9.** Muestra el número de pixeles positivos a AS en ambos grupos de estudio.

### 9.6. Cuantificación de ácido siálico presente en el tejido.

La comparación de AS en tejido pulmonar muestra un incremento no significativo únicamente respecto a la basal en ambos grupos de estudio ( $p > 0.05$  T-Student). Así como también se presentó un incremento en el LBA más pronunciado en el grupo de solución Cirex, sin que fuera estadísticamente significativo ( $p > 0.05$  T-Student). El comportamiento en el perfusato igualmente incrementó con diferencia significativa en ambos grupos respecto a la basal ( $p < 0.05$  T-Student). Gráfica 10

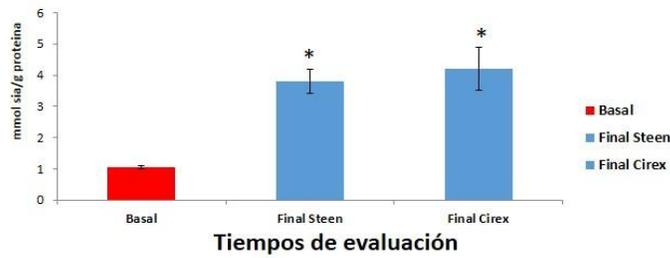
**AS en tejido durante la PPEV con solución Steen y Cirex**



**AS en lavado bronquioalveolar durante la PPEV con solución Steen y Cirex**



**AS en perfusato durante la PPEV con solución Steen y Cirex**



Promedios ± EE .

\*p<0.05 T-Student

**Gráfica 10.** Muestra comparación de AS en tejido pulmonar, LBA y perfusato.

## V. Discusión.

En pacientes con enfermedad respiratoria terminal, el trasplante pulmonar constituye la única opción terapéutica para incrementar su sobrevivencia. Sin embargo, solo se logra beneficiar a un escaso porcentaje de ellos. En la actualidad se han superado determinados problemas relacionados con la técnica quirúrgica y la inmunosupresión, a pesar de esto, existen varios factores que influyen en el éxito, como son la cicatrización bronquial, la falta de donadores y la falla primaria del injerto. Para solucionar estos problemas se han establecido varias estrategias como la PPEV, que es una técnica de reacondicionamiento pulmonar que tiene una serie de ventajas tales como que puede ser utilizada para evaluar los órganos en condiciones similares a las que estarían en el organismo receptor; posibilita tratar pulmones que en el momento de la extracción no serían válidos, y permite aplicarles en la máquina tratamientos con antibióticos o inmunosupresores para disminuir el rechazo y "optimizarlos". No obstante, durante este proceso los pulmones pueden presentar lesión de la membrana alveolocapilar, en la cual la disfunción microvascular es un componente principal (55,56 ) debido a que durante la isquemia las células endoteliales sufren un aumento del estrés oxidativo, presentan hinchazón y desprendimiento de la membrana basal (57 kurose) y por consiguiente, los leucocitos se adhieren y transmigran (58) aumentando la permeabilidad vascular (59).y finalmente se manifiesta como daño pulmonar estructural, dando como resultado la formación de edema que lleva a insuficiencia de la función pulmonar. (58, 59, 60, 61). En este proceso de lesión endotelial participa el GE, que es una capa dinámica de macromoléculas en la superficie luminal del endotelio vascular, la cual está involucrada en la homeostasis y regulación de líquidos (62, 63). El GE ha sido objeto de múltiples investigaciones desde su descubrimiento, sin embargo, a pesar de su importancia biológica, su participación en la perfusión pulmonar *ex vivo* no ha sido bien definida. Por lo que en este trabajo se evaluó y comparó el efecto de la solución Steen® y solución dextrán baja en potasio enriquecida con albumina (Cirex) (realizada en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias) en pulmones porcinos sometidos a dos horas de perfusión *ex vivo*, a través de los cambios fisiológicos, y estructurales, así como el daño del GE a través de los niveles de ácido siálico (AS).

En este estudio, los incrementos observados en la RVP en ambos grupos durante toda la PPEV posiblemente porque la perfusión post-isquemia pulmonar ocasiona daño

endotelial, edema (el cual se observó radiográfica y gravimétricamente), el cual a su vez provocó vasoconstricción que dificultó el paso de la solución de perfusión al lecho vascular del pulmón (64,65). Aunque también pudo ser originado porque se presentaron la disminución en la PaO<sub>2</sub> y el pH arterial, así como el incremento en la PaCO<sub>2</sub> ocasionan vasoconstricción precapilar hipóxica, que a su vez provoca un incremento local de las RVP (a nivel de las arterias pequeñas y arteriolas), para derivar la sangre a áreas mejor ventiladas como lo describió Murthy et al (66) y concuerda con lo observado en este estudio. Nuestros hallazgos también concuerdan con lo descrito por Meers et al (67), quienes en pulmones porcinos provocaron daño pulmonar con jugo gástrico y posteriormente los sometieron a PPEV y observaron que durante esta se presenta edema pulmonar e incremento en la PVR. Por otro lado, no encontramos una explicación el porque el grupo sometido a PPEV con solución Cirex mostro un incremento mayor que el de la solución de Steen®, ya que tiene los mismos componentes.

La relación PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> en los 3 grupos de estudio se incrementó durante la reperfusión posiblemente porque durante la isquemia se presentó hipoventilación e incremento en el cortocircuito intrapulmonar (Qs-Qt), sin embargo al restablecer la perfusión la entrada de O<sub>2</sub> favoreció el incremento de esta y estos hallazgo coinciden con los descritos por otros autores que han estudiado la ventilación mecánica así como los cuidados intensivos en diferentes tipos de pacientes (68,69,70,71) y mencionan que la relación PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> aunque no necesariamente refleja la gravedad de la lesión pulmonar, es un índice aceptable para observar el intercambio anormal de gas. También en este estudio se debe de tomar en cuenta que a pesar del edema radiológico y gravimétrico e histológico, ambas soluciones favorecieron el incremento en la PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> durante todo el estudio, posiblemente porque se presentó una vasoconstricción pulmonar hipóxica, ocasionada por la hipoxemia (provocada por el edema), la cual ocasiono en el lecho vascular pulmonar (principalmente en las arteriolas precapilares que se encuentra muy próximas al alveólo) una reacción para que se incrementara su tono muscular en respuesta a la disminución de la presión alveolar de O<sub>2</sub> (PAO<sub>2</sub>), lo cual desvía flujo sanguíneo o en este caso, la solución de perfusión de las zonas pulmonares no ventiladas a las ventiladas, para reducir el porcentaje de cortocircuito intrapulmonar. (72) Por otro lado, cabe mencionar que esto permitió que los pulmones sometidos a PPEV con las dos diferentes soluciones de perfusión, alcanzaran coeficientes PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> por arriba de 300 como lo han reportado varios autores por Cypel et al (73) y Stanzi et al (74), quienes han trabajado con

la PPEV clínica, así como experimentalmente y mencionan que este favorece el incremento de la  $PaO_2/FiO_2$ .

La  $PvO_2$  es una variable de gran trascendencia debido a que es la presión de oxígeno en la arteria pulmonar y representa el oxígeno que le sobró al organismo después de extraerle a la arteria lo que necesitó. Normalmente su valor es de 35 mm Hg a 45 mm Hg y es tal vez el parámetro aislado que mejor nos informa sobre el ajuste de aporte y consumo de oxígeno celular. Y aunque en este trabajo el grupo Steen® presentó una ligera disminución, los valores siempre se mantuvieron por arriba de los parámetros de referencia, lo cual puede reflejar de forma indirecta, déficit de oxigenación tisular, probablemente por un descenso del consumo celular. (75)

El pH arterial y venoso fueron inferiores a lo normal en ambos grupos, muestra que hubo un déficit en su ajuste desde el inicio de la PPEV, aunado al incremento en lactato y carencia de un sistema regulador. Asimismo, la disminución en las concentraciones de glucosa en ambas soluciones de estudio se debió al consumo celular, ya que aunque es recomendable realizar un recambio de 250 ml de solución cada hora para mantener los niveles de glucosa y proporcionar componentes de la solución frescos, en este estudio no se realizaron; por esta razón se puede explicar el incremento en las concentraciones de lactato, aunado a que al mantenerse los pulmones en un sistema *ex vivo*, hay ausencia de órganos depuradores, como es el caso de los riñones quienes son los responsables del aclaramiento del lactato. Sin embargo, los niveles de lactato no fueron superiores a los 10 y 8 mmol/L lo cual es un referente junto con la presión parcial de oxígeno de que el injerto se mantuvo con un metabolismo predominantemente aeróbico. Ya que de acuerdo a lo descrito por Koike T (76) a nivel clínico los pulmones destinados a trasplante con niveles menores de 12 mmol/L pueden tener buen pronóstico postrasplante.

En ambos grupos y aunque se mantuvieron dentro de sus valores de referencia, la  $C_{stat}$  y la  $C_{dyn}$  disminuyeron posiblemente porque durante la reperfusión con las dos diferentes soluciones de perfusión, se degradó el GE, incrementó la permeabilidad de la barrera alveolo capilar y facilitó que el líquido del edema y las proteínas plasmáticas se escaparan de la vasculatura hacia los espacios alveolares (33,77) que impidieron la expansión del tejido pulmonar, como lo han descrito varios autores que han estudiado la preservación pulmonar y sus efectos sobre la función endotelial (78,79) así como el síndrome de dificultad respiratoria. (80) No obstante, también pudo haber sido provocado porque durante la PPEV, la ausencia de presiones auriculares izquierdas positivas puede dar

lugar a una forma alveolar irregular y ocasionar disminución de la distensibilidad pulmonar como lo describió Yeung et al, al estudiar la preservación y recuperación de órganos de la cavidad torácica. (81) Nuestros hallazgos concuerdan con lo descrito por otros autores que observaron disminución de la Cstat y Cdyn en pulmones porcinos con lesión pulmonar aguda que fueron sometidos a PPEV, (82) así como en pulmones sometidos a diferentes tiempos de isquemia caliente y posteriormente a esta técnica para recuperar pulmones no aptos para trasplante. (83) Con respecto a porqué el grupo de solución de Steen® desarrolló mayor deterioro de la distensibilidad, no se ha reportado nada en la literatura. En ambos grupos, aunque las distensibilidades disminuyeron, las Raw, Pplat, Ppic y Pmed se mantuvieron similares a sus valores basales porque los pulmones durante la PPEV se ventilaron con medidas de protección pulmonar y concuerda con lo descrito por Young et al (84) que han trabajado con la PPEV tanto en forma clínica como experimental y han observado que las presiones resultantes de las vías respiratorias, así como las Cstat y Cdyn dependen del volumen pulmonar y, por lo tanto, pueden caer dentro de una amplia gama de valores. Nuestros hallazgos coinciden con lo descrito por otros autores que han estudiado el comportamiento pulmonar en la PPEV después de varios tiempos de isquemia y mencionan que las presiones de la vía aérea y mantienen similares a las basales. (83) Sin embargo, nuestros resultados no concuerdan con lo reportado por Iskender et al (85) quienes evaluaron pulmones preservados de donadores con isquemia fría prolongada y los compararon con pulmones que sufrieron de isquemia caliente corta, y observaron que ambos producen edema pulmonar e incremento en la Ppic. En ambos grupos el leve edema mostrado radiológicamente después de realizar la procuración pudo ser ocasionado porque la perfusión repentina del bloque pulmonar con la solución de preservación fría ocasiono un aumento de la presión hidrostática microvascular, traumatismo mecánico en el endotelio vascular y edema hidrostático. (34) Sin embargo, el edema moderado mostrado al final del estudio pudo deberse a que se presentó un daño por isquemia reperfusión leve ya que los parámetros de oxigenación, hemodinamia y de mecánica pulmonar se mantuvieron dentro de los rangos normales, pero se observó edema radiográfico leve y concuerda con la clasificación de la Sociedad Internacional de Trasplante de Corazón y Pulmón (86) quienes correlacionan la función pulmonar con los hallazgos radiológicos. Lo observado en este estudio también se correlaciona con lo descrito por Steinmeyer et al (87) quienes mencionan que el desarrollo de edema, es el evento clave durante la manifestación de LIRI y durante su formación, se

puede observar acumulación de líquido generalmente que comienza en el compartimento peribroncovascular, luego se extiende hacia los tabiques alveolares y un mayor agravamiento conduce a la lesión del espacio aéreo intraalveolar.

En nuestro estudio, la gravimetría mostró valores similares en ambos grupos, con una relación peso húmedo/peso seco ligeramente mayor en el grupo II, posiblemente porque la degradación del GE provocó la formación de edema pulmonar, el cual se asocia con la disminución de la distensibilidad pulmonar y un aumento correspondiente en la proporción de peso húmedo: seco como lo han observado varios autores que han estudiado el GE durante la PPEV (33) y postrasplante pulmonar. (88) Sin embargo, creemos que vale la pena mencionar que, aunque los resultados radiológicos de este estudio mostraron que ambos pulmones desarrollaron este leve, el uso de solución de Steen y Cirex, permitieron la adecuada oxigenación.

Histológicamente los pulmones perfundidos con solución de Steen desarrollaron edema al inicio de la PPEV porque desarrollaron daño por isquemia reperfusión. (86) Aunque, este desapareció a los 120 minutos de la PPEV probablemente porque la solución de Steen® permitió la movilización y eliminación del líquido intersticial y alveolar por su alta presión osmótica (34, 41) esto también puede explicar porque en el grupo de solución Cirex no se observaron estos hallazgos (ya que la solución está formada por los mismos componentes) y coincide con lo observado en nuestro estudio. No obstante, nuestros hallazgos no concuerdan con lo observado por Steinmeyer et al (87) quienes evaluaron en pulmones de cerdo, si la PPEV con soluciones de perfusión celulares y acelulares preservan la estructura, así como la función pulmonar y observaron que ambas soluciones promueven la presencia de edema intraalveolar en algunas regiones pulmonares porque la PPEV también promueve el desarrollo de lesión por isquemia reperfusión. Por otro lado, cabe mencionar que Wierup et al (34) menciona que la interpretación y cuantificación de los cambios histológicos en el parénquima pulmonar son difíciles y siempre deben correlacionarse con la capacidad de intercambio de gases, ya que es cuestionable si las partes del pulmón examinadas (en cada caso) son representativas de todo el pulmón, y quizá pueda explicar porque la falta de edema histológico no correlaciona con el edema radiológico, ni gravimétrico de este estudio. Esto también concuerda con lo reportado por Den Hengst et al (89) quienes mencionan que hasta la fecha, no se ha establecido ningún esquema de clasificación para los cambios histológicos durante LIRI. Con respecto a la presencia de macrófagos en las muestras basales de los animales perfundidos con

solución Cirex, se debió a que los macrófagos forman el mayor porcentaje de la población celular del pulmón y se localizan de manera normal en el espacio alveolar para realizar la fagocitosis y eliminación de los patógenos. Mientras que la presencia de linfocitos fue originada porque el pulmón hospeda un depósito sustancial de linfocitos y diversos subconjuntos de estas células (CD4, CD8, NK), las cuales mantienen la homeostasis pulmonar y la eliminación de partículas o bacterias que entren por el tracto respiratorio; mientras que la leve presencia de neutrófilos se debió a que en el pulmón sano los neutrófilos y eosinófilos por lo general constituyen menos del 1% o son escasos a nulos neutrófilos (90) Sin embargo, la presencia de estos durante todo el estudio probablemente también fue provocado porque estas células se adhirieron al endotelio pulmonar durante la preservación durante la procuración como lo observó Kakishita et al (15) al estudiar la supresión de citocinas inflamatorias con una membrana adsorbente durante la perfusión pulmonar *ex vivo*. Por otro lado, nuestros hallazgos no concuerdan con lo observado por Medeiros et al (52) quienes evaluaron los cambios histológicos y funcionales en pulmones reacondicionados por perfusión pulmonar *ex vivo* y mencionan que las células desaparecen durante la PPEV porque durante esta se presenta un efecto de lavado con el paso de la solución por la vasculatura pulmonar.

En ambos grupos, las muestras de microscopía electrónica tomadas al final del estudio mostraron el desprendimiento del GE, el cual pudo ser ocasionado porque los macrófagos, linfocitos y neutrófilos observados en la muestras histológicas de este estudio y que permanecieron durante toda la PPEV, promovieron la formación de radicales libres oxígeno, expresión de metaloproteinasas y neuraminidasa que originaron la ruptura enzimática de las proteínas centrales de los proteoglicanos y las cadenas de glucosaminoglicanos del GE como lo han descrito varios autores que han estudiado el papel del GE en el daño por isquemia reperfusión en diferentes patologías pulmonares (89,91,92) trasplante pulmonar experimental (88), preservación de órganos (93), y en un modelo porcino en que se sometió a PPEV pulmones perfundidos por 12 horas con solución de Steen (33) Sin embargo, la pérdida del GE también pudo ser ocasionada porque el flujo de la PPEV produjo el cizallamiento de la pared endotelial.(33,94) Por otro lado, la presencia leve de material proteínáceo cerca de la célula endotelial se pudo deber a la presencia de AS, con todo, pensamos que se requieren de otra técnica para poder evaluarlo, ya que esta técnica no permite definir si este material corresponde a la presencia de las glucoproteínas, proteoglicanos o AS del GE, por esta razón creemos que

el uso de microscopía confocal para poder identificarlo podría ser una buena opción como lo describió Betteridge et al (95) al estudiar como los AS regulan la permeabilidad en microvasos de rata perfundidos con membranas de células endoteliales fluorescentes y marcadores de glucocalix. También pensamos que otra técnica que se puede utilizar es la microscopía intravital, la cual es considerada como el estándar de oro para la obtención de imágenes de GE ya que utiliza moléculas de dextrano marcadas con fluorescencia de tamaño variable que contrasta los diferentes componentes del mismo y además permite obtener sus imágenes en tiempo real (33) En este estudio todas las muestras basales mostraron presencia de AS porque las células epiteliales de la mucosa nasal, los senos paranasales, la faringe, la tráquea, bronquios y células que recubren las paredes alveolares expresan AS en condiciones normales. (96) Nuestros hallazgos también concuerdan con lo observado por (97) Cerná A et al quienes estudiaron los cambios en la expresión del AS en fetos humanos y observaron por IHQ que, en los pulmones más maduros, el epitelio bronquial bien diferenciado, así como el endotelio vascular muestran fuerte expresión de AS. Los hallazgos de este estudio también concuerdan con lo descrito por Varki et al (98) quienes reportaron que los AS se expresan a lo largo de todo el borde epitelial que recubre las vías respiratorias y en el moco secretado en las mismas. Por otro lado, el incremento en la expresión de AS a los 60 y 120 minutos de iniciada PPEV en el grupo de Steen pudo ser originado porque el estrés oxidativo inflamación (96) y los linfocitos presentes en el bloque pulmonar ocasionaron un aumento de la expresión y actividad de la sialidasa endógena (neuraminidasa), la cual provocó la sialilación del mismo en la superficie celular y su incremento en el tejido. (99) Así mismo, la degradación de los AS en el grupo de Steen pudo ser lo que originó la presencia de edema en los cortes histológico de este grupo a los 60 minutos de PPEV y de la presencia de material proteináceo en ambos grupos al final del estudio, como lo describió Yang et al (100) quienes estudiaron la importancia del GE como barrera vascular pulmonar. Cabe mencionar que hasta la fecha en la literatura no se ha reportado en ningún estudio el efecto de la sialilación durante la PPEV.

En este estudio el incremento en la producción de AS libre en el tejido, LBA y perfusato indican que probablemente durante la PPEV hubo un incremento en la expresión de metaloproteinasas y neuraminidasas que provocaron la presencia de este producto de degradación del GE (89, 91, 92 ) en el trasplante pulmonar experimental (88) lo cual coincide con lo reportado por Abassi et al (91) quienes estudiaron la isquemia pulmonar y

mencionan que después de esta los componentes de degradación del GE, se elevan en la circulación después del daño por isquemia reperfusión Así mismo, los hallazgos de este trabajo concuerdan con lo observado por Sladden et al (33) quienes observaron que durante la PPEV los productos de degradación del GE tanto de humanos como de cerdos, se acumulan en el perfundido pulmonar. Sin embargo, en estos estudios evaluaron la presencia de sindecán-1, hialuronano y heparán sulfato, por lo que nuestro estudio es el primero en evaluar la presencia de AS libre en el tejido, LBA, así como en el perfusato y los datos observados proporcionan evidencia de que durante la PPEV con solución de Steen y con solución Cirex promueven el desprendimiento del AS, pero no afecta la función pulmonar.

## **VI. Conclusión**

La PPEV de dos horas en un modelo porcino con solución de Steen o con solución Cirex no evitan la degradación del AS y GE, así como la presencia de edema radiológico y gravimétrico, sin embargo, no deterioran la histología, ni la función pulmonar.

## VII. Referencias

1. Hardy J, Eraslan S, et al; Transplantation of the Lung. *Annals of Surgery*. 1964; 160: (3) 440-448.
2. Davis RD, Pasque M. Pulmonary Transplantation. *Ann Surg* 1995; 221: 14-28.
3. Santillán-Doherty P, Jasso-Victoria R, Olmos-Zúñiga R, Sotres-Vega A, Argote-Greene LM, Escalante-Tattersfield T, et al. Trasplante de pulmón. *Rev Investig Clin*. 2005; 57(2):350–357.
4. Chambers C Daniel, MD, FRACP, Wida S., For the International Society for Heart and Lung Transplantation The International Thoracic Organ Transplant Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirty-sixth adult lung and heart–lung transplantation Report—2019; Focus theme: Donor and recipient size match, *The Journal of Heart and Lung Transplantation*;2019; (38), 10.
5. Estado actual de Receptores, donación y Trasplantes de México, tercer trimestre 2019. Centro Nacional de Trasplantes.  
<https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/500964/3erTrimestre2019.pdf>
6. Mehra MR, Canter CE, Hannan MM, Semigran MJ, Uber PA, Baran DA, et al. The 2016 International Society for Heart Lung Transplantation listing criteria for heart transplantation: A 10-year update. *J Hear Lung Transplant*. 2016; 35(1):1–23. doi.org/10.1016/j.healun.2015.10.023.
7. Taylor DO, Edwards LB, Boucek MM, Trulock EP, Aurora P, Christie J, et al. Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Twenty-fourth Official Adult Heart Transplant Report, 2007. *J Hear Lung Transplant*. 2007;26(8):769–781.
8. Niels P van der Kaaij, Jolanda Kluin, Jack J Haitsma, Michael A den Bakker, Bart N Lambrecht, Burkhard Lachmann, Ron WF de Bruin, and Ad JJC Bogers. Ischemia of the lung causes extensive long-term pulmonary injury: an experimental study. *Respir Res*. 2008; 9(1). doi: 10.1186/1465-9921-9-28.
9. Becker BF, Chappell D, Bruegger D, Annecke T, Jacob M. Therapeutic strategies targeting the endothelial glycocalyx: Acute deficits, but great potential. *Cardiovasc Res*. 2010;87(2):300–310.
10. Lennon FE, Singleton PA. Hyaluronan regulation of vascular integrity. *Am J Cardiovasc Dis*. 2011; 1: 200–213.

11. Reitsma S, Slaaf DW, Vink H, van Zandvoort MA, Oude Egbrink MG. The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization. *Pflügers Arch* 2007; 454: 345–359.
12. Deanfield J, Donald A, Ferri C, et al. Endothelial function and dysfunction. Part I. Methodological issues for assessment in the different vascular beds: A statement by Working Group on Endothelin and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension. *J Hyperten*. 2005; 23:7-17.
13. Weinbaum S, Tarbell JM, Damiano ER. The structure and function of the endothelial glycocalyx layer. *Annu Rev Biomed Eng*. 2007; 9:121–167. PMID: 17373886].
14. Yang Y, Schmidt EP. The endothelial glycocalyx an important regulator of the pulmonary vascular barrier. *Tissue Barriers* 2013; 1:1
15. Kakishita T, Oto T, Hori S, Miyoshi K, Otani S, Yamamoto S, et al. Suppression of Inflammatory Cytokines During *Ex vivo* Lung Perfusion With an Adsorbent Membrane. *Ann Thorac Surg*. 2010;89(6):1773–1779. doi.org/10.1016/j.athoracsur.2010.02.077.
16. Parker JC, Yoshikawa S. Vascular segmental permeabilities at high peak inflation pressure in isolated rat lungs. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002;283: L1203–L1209,. 10.1152/ajplung.00488.2001. J.
17. Kolářová H, Ambrůzová B, Švihálková Šindlerová L, Klinke A, Kubala L. Modulation of endothelial glycocalyx structure under inflammatory conditions. *Mediators of Inflammation*. 2014: Article ID 694312, 17 pages.
18. Frati-Munari AC, Importancia médica del glucocáliz endotelial. *Arch Cardiol Mex*. 2013; 83(4):303-312.
19. Broekhuizen LN, Mooij HL, Kastelein JJ, Stroes ES, Vink H, Nieuwdorp M. Endothelial glycocalyx as potential diagnostic and therapeutic target in cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol*. 2009; 20(1):57–62.
20. Alphonse CS, Rodseth RN. The endothelial glycocalyx: A review of the vascular barrier. *Anaesthesia*. 2014;69(7):777–784.
21. Bertoz Carolyn R i and David Rabuka. *Essentials of Glycobiology*. Woodbury, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009; 784.
22. Cioffi Donna L, Subha Pandey, Diego F. Alvarez, and Eugene A. Cioffi<sup>1,3</sup> Terminal sialic acids are an important determinant of pulmonary endothelial barrier integrity. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2012 15; 302(10): L1067–L1077.

23. Dane, Martijn Title: Structure and function of the endothelial glycocalyx in the microcirculation. Laiden University. Issue Date: 2015-06-02
24. Aamelfot M, Dale OB, Weli SC, Koppang EO, Falk K. The in situ distribution of glycoprotein-bound 4-O-Acetylated sialic acids in vertebrates. *Glycoconj J*. 2014; 31(4): 327–335.
25. Karin Ortner Wolfgang Buchberger, et al. 2007. Determination of sialic acids released from glycoproteins using capillary zone electrophoresis/electrospray ionization mass.. *Electrophoresis*. 2008, 29, 2233-2237.
26. Nguyen DH, Tangvoranuntakul P, Varki A. Effects of natural human antibodies against a nonhuman sialic acid that metabolically incorporates into activated and malignant immune cells. *J Immunol*. 2005; 175(1):228–236.
27. Kelm S, Schauer R. Sialic acids in molecular and cellular interactions. *Int Rev Cytol*. 1997;175:137–240.
28. Sakarya S. Rifat S, Zhou J, Bannerman DD, Stamatou NM, Cross AS. Mobilization of neutrophil sialidase activity desialylates the pulmonary vascular endothelial surface and increases resting neutrophil adhesion to and migration across the endothelium. *Glycobiology*. 2004;14(6):481–494.
29. Yeung JC, Cypel M, Waddell TK, van Raemdonck D, Keshavjee S. Update on Donor Assessment, Resuscitation, and Acceptance Criteria, Including Novel Techniques- Non-Heart-Beating Donor Lung Retrieval and *Ex vivo* Donor Lung Perfusion. *Thorac Surg Clin*. 2009;19(2):261–274.
30. Chaib E. Non heart-beating donors in England. *Clinics (Sao Paulo)*. 2008;63(1):121–134.
31. Rodríguez A Diego, Francisco Del Río, Manuel E. Fuentes, Sara Naranjo, Javier Moradiellos, David Gómez, Juan José Rubio, Elpidio Calvo y Andrés Varela. Trasplante de pulmón con donantes no controlados a corazón parado. Factores pronósticos dependientes del donante y evolución inmediata postrasplante. *Arch Bronconeumol*. 2011; 47(8):403–409.
32. Alexander Arthur, McCall Phillip J, Jolly Lisa, Kinsella John, Kirk Alan & Shelley Ben G. Endothelial glycocalyx layer shedding following lung resection. *Biomark. Med*. 10.2217/bmm-2016-0163.
33. Sladden M Timothy, Stephanie Yerkovich, Douglas Wall, Maxine Tan, William Hunt, Jonathan Hill, Ian Smith, Peter Hopkins, and Daniel C. Chambers. Endothelial

- Glycocalyx Shedding Occurs during *Ex vivo* Lung Perfusion: A Pilot Study. *Journal of Transplantation*. 2019, Article ID 6748242, 12 pages. doi.org/10.1155/2019/6748242.
34. Wierup P, Haraldsson A, Nilsson F, Pierre L, Scherstén H, Silverborn M, Sjöberg T, Westfeldt U, Steen S. *Ex vivo* evaluation of nonacceptable donor lungs. *Ann Thorac Surg*. 2006 Feb; 81(2):460-466.
  35. Cypel M, Rubacha M, Yeung J, Hirayama S, Torbicki K, Madonik M, Fischer S, Hwang D, Pierre A, Waddell TK, de Perrot M, Liu M, Keshavjee S. Normothermic *ex vivo* perfusion prevents lung injury compared to extended cold preservation for transplantation. *Am J Transplant*. 2009; 9(10):2262-2269.
  36. Cypel M, Liu M, Rubacha M, Yeung JC, Hirayama S, Anraku M, et al. Functional repair of human donor lungs by IL-10 gene therapy. *Sci Transl Med*. 2009;1(4):4ra9.
  37. Valenza F, Rosso L, Pizzocri M, Salice V, Umbrello M, Conte G, et al. The consumption of glucose during *ex vivo* lung perfusion correlates with lung edema. *Transplant Proc*. 2011;43(4):993–996. doi.org/10.1016/j.transproceed.2011.01.122.
  38. Machuca TN, Cypel M, Yeung JC, Bonato R, Zamel R, Chen M, et al. Protein Expression Profiling Predicts Graft Performance in Clinical *Ex vivo* Lung Perfusion. *Ann Surg*. 2014;00(00):1–7.
  39. Tane S, Noda K, Shigemura N. *Ex vivo* Lung Perfusion: A Key Tool for Translational Science in the Lungs. *Chest*. 2017;151(6):1220–1228.
  40. Cypel M, Yeung JC, Hirayama S, Rubacha M, Fischer S, Anraku M, et al. *J Hear Lung Transplant*.2008;27(12):1319–25. doi.org/10.1016/j.healun.2008.09.003.
  41. Van Raemdonck D, Neyrinck A, Cypel M, Keshavjee S. *Ex-vivo* lung perfusion. *Transplant Int*. 2015;28(6):643–656.
  42. Lei Jing, Leeann Yao, Michael Zhao,2 Li-ping Peng, and Mingyao Liu, Organ preservation: from the past to the future. *Acta Pharmacol Sin*. 2018 May; 39(5): 845–857.doi: 10.1038/aps.2017.182.
  43. Fernandes LM, Mariani AW, de Medeiros IL, Samano MN, Abdalla LG, Correia AT, et al. Alternative solution for *ex vivo* lung perfusion, experimental study on donated human lungs non-accepted for transplantation. *Acta Cir Bras*. 2015;30(5):359–365.
  44. Murray J. F.. Pulmonary edema: pathophysiology and diagnosis. *Int J Tuber Lung Dis*. 15(2):155–160.
  45. Porfire AS, Tomuța I, Irache JM, Leucuța SE. The influence of the formulation factors on physico-chemical properties of dextran associated Gantrez® an nanoparticles.

- Farmacia. 2009;57(4):463–472.
46. Vanysek P, Us IL, Ricco HS. (12) United States Patent. Committee for Medical Products for Humane Use. Consultation procedure Public Assessment Report. 2005; 2(12). 62.
  47. SAGARPA (Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación) (1999) Especificaciones Técnicas para la Producción, Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. México City. Diario Oficial de la Federación. 58 pp
  48. NIH (National Institutes of Health U.S.A) (2011) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Washington, D.C. The National Academies Press. 246 pp.
  49. Balls M. Replacement of animal procedures: alternatives in research, education and testing. *Lab Anim.* 1994;28(1994):193–211.
  50. Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG (2010) Improving Bioscience Research Reporting: The ARRIVE Guidelines for Reporting Animal Research. *PLoS Biol* 8: e1000412. doi:10.1371/journal.pbio.100041
  51. Johnson E, Calfee CS, Matthay M a, Transplant C. Quantitative Index of Pulmonary Edema in Organ Donors. 2013;26(5):665–671.
  52. Medeiros IL, Pêgo-Fernandes PM, Mariani AW, Fernandes FG, do Vale Unterperntinger F, Canzian M, et al. Histologic and functional evaluation of lungs reconditioned by ex vivo lung perfusion. *The Journal of heart and lung transplantation: the official publication of the International Society for Heart Transplantation.* 2012. p. 305–309.
  53. Staub NC. The measurement of lung water content. *J Microw Power.* 1983;18(3):259–263.
  54. Varghese F, Bukhari AB, Malhotra R, De A. IHC profiler: An open source plugin for the quantitative evaluation and automated scoring of immunohistochemistry images of human tissue samples. *PLoS One.* 2014;9(5).
  55. Granger DN: Ischemia-reperfusion: mechanisms of microvascular dysfunction and the influence of risk factors for cardiovascular disease. *Microcirculation* 1999; 6: 167–178.
  56. Seal JB, Gewertz BL: Vascular dysfunction in ischemia-reperfusion injury. *Ann Vasc Surg* 2005; 19: 572–584.
  57. Kurose I, Argenbright LW, Wolf R, Lianxi L, Granger DN: Ischemia/reperfusion-induced microvascular dysfunction: role of oxidants and lipid mediators. *Am J Physiol* 1997; 272:H2976–H2982.

58. Oliver MG, Specian RD, Perry MA, and Granger DN: Morphologic assessment of leukocyte-endothelial cell interactions in mesenteric venules subjected to ischemia and reperfusion. *Inflammation* 1991; 15: 331–346.
59. Beuk RJ, Heineman E, Tangelder GJ, Quaedackers JS, Marks WH, Lieberman JM, et al: Total warm ischemia and reperfusion impairs flow in all rat gut layers but increases leukocyte-vessel wall interactions in the submucosa only. *Ann Surg* 2000; 231: 296–104.
60. Koedam JA, Cramer EM, Briend E, Furie B, Furie BC, and Wagner DD: P-selectin, a granule membrane protein of platelets and endothelial cells, follows the regulated secretory pathway in AtT-20 cells. *J Cell Biol* 1992; 116: 617–625.
61. De Perrot M, Liu M, Waddell TK, Keshavjee S. Ischemia-reperfusion-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003; 167:490–511.
62. Mühlfeld C, Schaefer IM, Becker L, Bussinger C, Vollroth M, Bosch A, et al. Pre-ischaemic exogenous surfactant reduces pulmonary injury in rat ischaemia/reperfusion. *Eur Respir J*. 2009; 33:625–633.
63. Knudsen L, Boxler L, Mühlfeld C, Schaefer IM, Becker L, Bussinger C, et al. Lung preservation in experimental ischemia/reperfusion injury and lung transplantation: a comparison of natural and synthetic surfactants. *J Heart Lung Transplant*. 2012; 31:85–93.
64. Ovechkin AV, Lominadze D, Sedoris KC. Lung ischemia-reperfusion injury: implications of oxidative stress and platelet-arteriolar wall interactions. *Arch Physiol Biochem*. 2007; 113:1- 12.
65. Colombat M, Castier Y, Leseche G, et al. Early expression of adhesion molecules after lung transplantation: evidence for a role of aggregated P-selectin-positive platelets in human primary graft failure. *J Heart Lung Transplant*. 2004; 23:1087-92.
66. Murthy R. Chamorthy, Asha Kandathil, Sanjeeva P. Kalva. Pulmonary vascular pathophysiology. *Cardiovasc Diagn Ther* 2018; 8(3):208-213.
67. Meers CM, Tsagkaropoulos S, Wauters S, Verbeken E, Vanaudenaerde B, Scheers H, et al. A model of *ex vivo* perfusion of porcine donor lungs injured by gastric aspiration: A step towards pretransplant reconditioning. *J Surg Res* 2011;170(1):e159–167. doi.org/10.1016/j.jss.2011.05.015.
68. Montes de Oca MA, Xóchitl MA, Olvera C, Franco J. Ajuste de la relación PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> a la presión barométrica: Presión barométrica-PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>. *Rev Asoc Mex Med Crit y*

- Ter Int. 2010; 24: 8-12.).
69. Rodríguez OB, Malberty J. Arterial oxygenation rate in ventilated patients with breathing sepsis. *Medisan*. 2010; 14: 225-231.
  70. Randolph AG, Meert KL, O'Neil ME, Hanson JH, Lueckett PM, Arnold JH et al. The feasibility of conducting clinical trials in infants and children with acute respiratory failure. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003; 167: 13234-1340.
  71. Behringer EC. Técnicas posoperatorias de ventilación mecánica y cuidados respiratorios. En: Hoffman WJ, Wasnick JD, Kofke WA, Levy JH. *Procedimientos de cuidados intensivos posoperatorios del Massachusetts General Hospital*. 2 ed. Masson-Little, Brown. Barcelona, España. 2005:35-66.
  72. Patricia Piñero Otero. Estudio de la respuesta inflamatoria pulmonar y sistémica secundaria a cirugía de resección pulmonar con anestesia intravenosa versus anestesia inhalatoria. Tesis Doctoral Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid. Madrid 2015.
  73. Cypel M, Yeung JC, Liu M, Anraku M, Chen F, Karolak W, et al, Normothermic ex vivo lung perfusion in clinical lung transplantation. *N Engl J Med*. 2011; 364 (15): 1431-1440), Machuca et al (Machuca TN, Cypel M. Ex vivo lung perfusión. *J Thorac Dis*. 2014; 6 (8): 1054-1062. doi: 10.3978/j.issn.2072-1439.2014.07.12.
  74. Stanzi A, Neyrinck A, Somers J, Cauwenberghs H, Verbeken E, Santambrogio L, et al. Do we need to cool the lung graft after *ex vivo* lung perfusion ? A preliminary study. *J Surg Res*. 2014; 192 (2): 647-655.
  75. Reinhart K, Kersting T, Föhring U, Schäfer M. Can central-venous replace mixed-venous oxygen saturation measurements during anesthesia? *Adv Exp Med Biol*. 1986; 200:67-72.
  76. Koike T, Yeung JC, Cypel M, Rubacha M, Matsuda Y, Sato M, et al. Kinetics of lactate metabolism during acellular normothermic *ex vivo* lung perfusion. *J Hear Lung Transplant*. 2011; 30(12):1312–9. doi.org/10.1016/j.healun.2011.07.014.
  77. Sharma AK, Stone ML, Lau CL, Laubach VE. Pulmonary Trasplantation and Ischemia-Reperfusion Injury. *Topics in Thoracic Surgery*. 2012:377–401. doi: 10.5772/26358.
  78. Rabanal JM, Mons R, Zurbano F. Edema de reimplantación en el trasplante pulmonar. ¿Isquemia-reperfusión o edema hidrostático? *Rev Esp Anesthesiol*. 2001; 48:146-50.

79. Paik HC, Hoffmann SC, Egan TM. Pulmonary preservation studies: effects on endothelial function and pulmonary adenine nucleotides. *Transplantation*. 2003; 75, 439–444.
80. Malhotra A. Low-tidal-volume ventilation in the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med*. 2007; 357:1113-1120.
81. Yeung JC, Cypel M, Craig JM, Keshavjee S. Thoracic organ preservation and resuscitation. In: Krik AD, Kenechtle SJ, eds. *Textbook of organ transplantation*. 1st ed. Oxford, UK: Wiley Blackwell; 2014: 334-342. doi:10.1002/9781118873434.ch26.
82. Meers CM, Tsagkaropoulos S, Wauters S, Verbeken E, Vanaudenaerde B, Scheers H, et al. A model of ex vivo perfusion of porcine donor lungs injured by gastric aspiration: A step towards pretransplant reconditioning. *J Surg Res* 2011; 170(1): 159-167. doi.org/10.1016/j.jss.2011.05.015.
83. Charles EJ, Hunter Mehaffey J, Huerter ME, Sharma AK, Stoler MH, Roeser ME et al. Ex Vivo Assessment of Porcine Donation After Circulatory Death Lungs That Undergo Increasing Warm Ischemia Times. *Transplantation Direct*. 2018; 1. doi: 10.1097/txd.0000000000000845.)
84. Young JC, Cypel M, Craig JM, Keshavjee S. Thoracic organ preservation and resuscitation. In: Krik AD, Kenechtle SJ, eds. *Textbook of organ transplantation*. 1st ed. Oxford, UK: Wiley Blackwell; 2014: 334–342. doi:10.1002/9781118873434.ch26.
85. Iskender I, Cypel M, Martinu T, et al. Effects of warm versus cold ischemic donor lung preservation on the underlying mechanisms of injuries during ischemia and reperfusion. *Transplantation*. 2018; 102(5):760–768. doi:10.1097/TP.0000000000002140.)
86. Christie JD, Carby M, Bag R, Corris P, Hertz M, Weill D. Report of the ISHLT Working Group on Primary Lung Graft Dysfunction Part II: Definition. A Consensus Statement of the International Society for Heart and Lung Transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2005; 24 (10): 1454-1459. doi:10.1016/j.healun.2004.11.049.
87. Steinmeyer J., Simon Becker, Murat Avsar, Jawad Salman, Klaus Höffler, Axel Haverich, Gregor Warnecke, Christian Mühlfeld, Matthias Ochs, and Anke Schnapper-Isl. Cellular and acellular *ex vivo* lung perfusion preserve functional lung ultrastructure in a large animal model: a stereological study. *Respiratory Research*. 2018; 19:238 doi.org/10.1186/s12931-018-0942-5.

88. Rancan L, Simón C, Sánchez Pedrosa G, Aymonnier K, Shahani PM, et al. Glycocalyx degradation after pulmonary transplantation surgery. *Eur Surg Res.* 2018; 59: 115-125. doi:10.1159/000489492.
89. Den Hengst WA, Gielis JF, Lin JY, Van Schil PE, De Windt LJ, Moens AL. Lung ischemia-reperfusion injury: a molecular and clinical view on a complex pathophysiological process. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2010; 299 (5): H1283-1299. doi: 10.1152/ajpheart.00251.2010. Epub 2010 Sep 10.
90. Luna Flores A. Efecto de la asistencia mecánica ventilatoria y preservación pulmonar prolongada sobre la producción y expresión de IL-8 en el trasplante pulmonar experimental. Tesis de Maestría en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, Ciudad de México, Febrero del 2014.
91. Abassi Z, Armaly Z, Heyman SN. Glycocalyx degradation in ischemia-reperfusion injury. *Am J Pathol.* 2020; 190: 752-767. doi:10.1016/j.ajpath.2019.08.019.
92. Benatti MA, Todorovic Fabro A, Miranda CH. Endothelial glycocalyx shedding in the acute respiratory distress syndrome after flu syndrome. *J Intensive Care.* 2020; 8: 72. doi: 10.1099 / jgv.0.001319.
93. Petrenkoa A, Carnevaleb M, Somova A, Osorio J, Rodríguez J, Guibert E, Fuller B, Froghid F. Organ Preservation into the 2020s: The Era of Dynamic Intervention. *Transfus Med Hemother* 2019; 46 (3): 151-172- doi: 10.1159/000499610. Epub 2019 May 3.
94. Schött U, Solomon C, Fries D, Bentzer P. The endothelial glycocalyx and its disruption, protection and regeneration: a narrative review. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med.* 2016; 24(1). doi: 10.1186/s13049-016-0239-y.
95. Betteridge KB, Arkill KP, Neal CR, Harper SJ, Foster RR, Satchell SC, et al. Sialic acids regulate microvessel permeability, revealed by novel in vivo studies of endothelial glycocalyx structure and function. *J Physiol.* 2017; 595(15):5015–5035.
96. Pourrajab F, Zare-Khormizi MR, Sheikhha MH. Molecular Basis for Pathogenicity of Human Coronaviruses. *Infect Drug Resist.* 2020; 13: 2385–2405. doi: 10.2147/IDR.S255156.
97. Cerná A, Janega P, Martanovic P, Lisý M, Babál P. Changes in sialic acid expression in the lung during intrauterine development of the human fetus. *Acta Histochem.* 2002; 104 (4): 339-342. doi: 10.1078/0065-1281-00669.

98. Varki A. Sialic acids in human health and disease. *Trends Mol Med*. 2008; 14 (8): 351-360. doi: 10.1016/j.molmed.2008.06.002.
99. Bi S, Baum L G. Sialic acids in T cell development and function. *Biochim Biophys Acta*. 2009; 1790 (12):1599-1610. doi: 10.1016/j.bbagen.2009.07.027.
100. Yang Y, Schmidt EP. The endothelial glycocalyx. An important regulator of the pulmonary vascular barrier. *Tissue Barriers*. 2013; 1 (1): e23494. doi:10.4161/tisb.23494.