

87

2ej.

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
IZTACALA**

**“EVALUACIÓN DE LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA,
DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA SUPERÓXIDO
DISMUTASA Y GLUTATION EN LA
PRESERVACIÓN PULMONAR”**

T E S I S

Que para obtener el título de

BIOLOGA

P R E S E N T A:

ANA MARÍA PEDRAZA MARTÍNEZ

Tutor: M.en C. Avelina Sotres Vega

Cotutor: M.V.Z. Raúl Olmos Zúñiga

Iztacala, México, 1998.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

268072



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Con todo mi amor y agradecimiento a mis padres:

ANASTACIO Y MARÍA INES

Porque este es el fruto de su esfuerzo y confianza, porque no podría agradecer de otra forma todo lo que me han dado. Gracias por su amor, confianza y apoyo brindado en todo momento. Por darme la oportunidad de tener una formación profesional.

De manera muy especial a mi esposo:

ROBERTO

Un gran hombre, amigo y compañero. Deseando que no sea este el único triunfo que comparta contigo, sino que haya muchos mas que compartir y no tuyos, ni míos, sino nuestros.

A mis dos amores:

MARÍA FERNANDA Y ROBERTO CARLOS

Que con su sola presencia me impulsan a superarme día a día.

Con cariño a mis hermanos:

SILVANO, CARLOS, CELIA ANGELINA Y MARIA LETICIA

Por todo lo que hemos compartido juntos, porque en ustedes encuentro a mis mejores amigos .

Con mi mas profundo agradecimiento a la familia:

ESCOBAR SAUCEDO.

Por brindarme su apoyo incondicional en todo momento. Gracias.

Por sus comentarios y sugerencias a mis sinodales:

M. en C. Ignacio Peñalosa, M.C. Rafael Jiménez Flores, M.C. Eduardo Barrera Escorcia, Biol. Josefina Vázquez Medrano y la M. en C. Avelina Sotres Vega.

Deseo manifestar mi mas profundo agradecimiento a mi directora de tesis la M. en C. Avelina Sotres Vega por su ayuda, paciencia y amistad brindada durante la elaboración del presente trabajo, así como por sus valiosos consejos, sin los cuales la elaboración de este trabajo no hubiera sido posible.

Al jefe del Departamento de Cirugía Experimental M.C. Rogelio Jasso V. y al M.V.Z. Juan Raúl Olmos por sus sugerencias y apoyo recibido.

A los integrantes del laboratorio por su compañerismo.

**El presente trabajo se desarrollo en el Departamento de Cirugia Experimental
del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias
de la Secretaria de Salubridad y Asistencia.**

INDICE

RESUMEN	i
1.-INTRODUCCIÓN.....	1
2.- ANTECEDENTES.....	5
3.- OBJETIVO.....	8
4.- MATERIAL Y MÉTODOS.....	8
4.1.- MODELO EXPERIMENTAL.....	8
4.2.- CRITERIOS DE INCLUSIÓN.....	8
4.3.- CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	9
4.4.- TÉCNICAS QUIRÚRGICAS.....	9
4.4.1.-TRAQUEOTOMÍA.	9
4.4.2.-ESTERNOTOMÍA.....	9
4.5.- GRUPOS EXPERIMENTALES.....	10
4.6.- OBTENCIÓN DE MUESTRAS.....	11
4.6.1.- LÍQUIDO DE PERFUSIÓN.....	11
4.6.2.- HOMOGENEIZADO PULMONAR.....	12
4.7.-CUANTIFICACIÓN BIOQUÍMICA.....	12
4.7.1.-SUPERÓXIDO DISMUTASA.....	12
4.7.2.- GLUTATION	13
4.7.3.- PEROXIDACIÓN LIPÍDICA	15

5.- RESULTADOS.....	17
5.1.- GENERALES.....	17
5.1.1.- LÍQUIDO DE PERFUSIÓN.....	17
5.1.2.- HOMOGENEIZADO PULMONAR.....	17
5.2.- SUPERÓXIDO DISMUTASA	21
5.2.1.- LÍQUIDO DE PERFUSIÓN.....	21
5.2.2.- HOMOGENEIZADO TISULAR PULMONAR.....	23
5.2.3.- GRÁFICAS DE SUPERÓXIDO DISMUTASA.....	25
5.3.- GLUTATION.....	30
5.3.1.- LÍQUIDO DE PERFUSIÓN.....	30
5.3.2.- HOMOGENEIZADO TISULAR PULMONAR.....	32
5.3.3.- GRÁFICAS DE GLUTATION.....	33
5.4.- PEROXIDACIÓN LIPÍDICA.....	38
5.4.1.- LÍQUIDO DE PERFUSIÓN.....	38
5.4.2.- HOMOGENEIZADO TISULAR PULMONAR.....	39
5.4.3.- GRÁFICAS DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA.....	41
6.- DISCUSIÓN	48
7.- CONCLUSIONES.....	56
8.- REFERENCIAS.....	57

RESUMEN

A diferencia de los llamados órganos sólidos, el pulmón muestra una marcada sensibilidad a la isquemia, dada la presencia de la membrana alvéolo capilar. Durante la isquemia pulmonar, el metabolismo aeróbico continúa, dada la presencia del oxígeno remanente en los alveolos. Este elemento es indispensable para el mantenimiento energético celular, ya que es necesario para oxidar la glucosa, y aunque bajo condiciones de isquemia fría, disminuye el consumo energético celular, la presencia de oxígeno molecular genera la producción de radicales libres procedentes de su utilización. Estas especies oxidantes, bajo condiciones fisiológicas normales, se neutralizan por los llamados receptores endógenos de radicales libres de oxígeno, entre los que se encuentran la enzima superóxido dismutasa y el glutatión. Si los mecanismos de las reacciones de oxidación celular se alteran, ya sea por deficiencia en las capacidades receptoras de la enzima superóxido dismutasa o del glutatión, o por un aumento excesivo del aporte de oxígeno, se acumulan las especies oxidantes cuyas reacciones en cadena son letales para la célula. La peroxidación lipídica de la membrana celular puede considerarse como el daño más importante causado por la acción de los radicales libres. El malonaldehído que es un producto final derivado del rompimiento de los ácidos grasos y de los ésteres relacionados con este proceso. El malonaldehído puede entonces, utilizarse como un indicador del daño celular por la acción de los radicales oxidantes. Utilizando un modelo experimental murino de procuración pulmonar que incluyó perfusión y reperfusión a través de la arteria pulmonar con solución de Krebs-Henseleit así como una preservación prolongada bajo condiciones de hipotermia, en esta investigación de trabajo de tesis, decidimos evaluar la actividad de la enzima superóxido dismutasa y las concentraciones de glutatión y malonaldehído tanto en las soluciones de perfusión y de reperfusión pulmonar, como en el homogeneizado tisular de pulmón procedentes de tres grupos de bloques pulmonares que fueron: a) perfundidos en forma inmediata y continua únicamente durante el tiempo necesario para exanguinarlos, b) perfundidos en forma inmediata y continua durante 30' y c) perfundidos en forma inmediata y continua únicamente durante el tiempo necesario para exanguinarlos, concluida la exanguinación, los bloques pulmonares fueron preservados durante 24 horas a 4°C, y transcurrido el tiempo de preservación, fueron reperfundidos durante 30' bajo las mismas condiciones dadas para la perfusión. Inmediatamente después de realizadas las perfusiones y las reperfusiones pulmonares de acuerdo con el grupo de estudio, se realizó una disección del bloque pulmonar para la preparación de los homogeneizados tisulares. Los líquidos de perfusión, y de reperfusión recolectados así como los homogeneizados fueron centrifugados, filtrados a través de una gasa y almacenados a -35°C hasta el momento de realizar las determinaciones. La actividad de la enzima superóxido dismutasa así como las concentraciones de glutatión y malonaldehído se determinaron mediante espectrofotometría utilizando estuches comerciales. En los resultados de este proyecto encontramos una disminución en la actividad enzimática de la superóxido dismutasa al igual que en la concentración de glutatión por efecto del tiempo de perfusión y más aún por efecto de la reperfusión pulmonar aunada a una preservación prolongada al cuantificar estos parámetros en los líquidos de perfusión y de reperfusión recolectados. En los homogeneizados pulmonares, la actividad de la enzima superóxido dismutasa así como la concentración de glutatión obtenidas fueron mayores que las detectadas en los líquidos de perfusión y de reperfusión pulmonar. La concentración de malonaldehído tanto en las soluciones de perfusión y de reperfusión como en los homogeneizados, también disminuyó por efecto del tiempo de perfusión, del periodo de isquemia y por el tiempo de reperfusión. Utilizando un modelo experimental murino de procuración pulmonar que incluyó perfusión y reperfusión a través de la arteria pulmonar con solución de Krebs-Henseleit así como una preservación prolongada bajo condiciones de hipotermia, se concluye:

- 1.- La actividad enzimática de la enzima superóxido dismutasa y las concentraciones de malonaldehído y de glutatión fueron menores en las soluciones de perfusión y de reperfusión pulmonar y mayores en los homogeneizados tisulares pulmonares.
- 2.- Tanto en las muestras procedentes de las soluciones de perfusión y de reperfusión pulmonar como en los homogeneizados tisulares, la actividad enzimática de la superóxido dismutasa y las concentraciones de glutatión y malonaldehído fueron mayores en las muestras procedentes de los bloques pulmonares que fueron perfundidos únicamente durante el tiempo necesario para exanguinarlos, conforme avanzó el tiempo de perfusión estas disminuyeron, presentándose los valores mas bajos en los bloques pulmonares que fueron preservados y reperfundidos.
- 3.- Al parecer, bajo las condiciones experimentales dadas en esta investigación, la actividad enzimática de la enzima superóxido dismutasa y las concentraciones de glutatión y de malonaldehído disminuyen al eliminar el aporte sanguíneo, al incrementar el tiempo de perfusión pulmonar y por efecto de una preservación prolongada aunada a una reperfusión realizada con solución Krebs-Henseleit.

**EVALUACION DE LA PEROXIDACION LIPIDICA, DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA
 SUPEROXIDO DISMUTASA Y DE LA CONCENTRACION DE GLUTATION EN LA
 PRESERVACION PULMONAR**

1.- INTRODUCCIÓN

El trasplante pulmonar ha sido estudiado con considerable interés durante las últimas tres décadas dada su aplicación terapéutica en pacientes con enfermedades pulmonares terminales (1,8,41). Sin embargo, en la clínica existen dos factores que limitan la aplicación de este procedimiento, el primero es la falta de donadores (34,35,40), ya que sólo del 10 al 15% de los posibles donadores tienen pulmones aceptables para la realización del trasplante debido a que los pacientes con muerte cerebral tienen largos periodos de intubación orotraqueal lo que predispone a complicaciones como edema pulmonar neurogénico o infección pulmonar activa (8,27,34,35), además de que el donador debe cumplir con los siguientes criterios clínicos:

- 1.- Grupo sanguíneo compatible con el receptor.
- 2.- Radiografía de tórax normal.
- 3.- Dimensión torácica vertical, horizontal y circunferencial de tamaño apropiado para el receptor.
- 4.- Estructura del hilio pulmonar (principalmente del bronquio) de tamaño compatible con el receptor.
- 5.- Broncoscopia normal.
- 6.- Intercambio gaseoso normal.
- 7.- No tener antecedentes de alteración pulmonar y/o infección pulmonar activa.

El segundo factor que limita la realización de un trasplante pulmonar en forma clínica y que tiene la misma importancia que el anterior es que no se han desarrollado ni un método, ni una solución de preservación adecuados a las características y necesidades del órgano, con los que se permita la conservación de los pulmones durante su transporte sin que se dañe su funcionalidad (1,15,24, 38,40). Esto se debe principalmente a que el pulmón, a diferencia de los llamados órganos sólidos

(hígado, páncreas, riñón etc.) es el encargado de realizar el intercambio gaseoso en la sangre, ya que posee una membrana alveolo-capilar (conjunto de capilares pulmonares que son los encargados de llevar la sangre a los alvéolos en donde ésta, contacta con el aire respirado y se realiza el intercambio de bióxido de carbono por oxígeno). Durante la preservación, la membrana alveolo capilar carece de flujo sanguíneo (también llamado periodo de isquemia) y por ende sufre alteraciones en el metabolismo y en la integridad celular, lo cual se refleja en una función pulmonar deficiente cuando el pulmón es reperfundido al concluir la técnica quirúrgica del trasplante.

Está bien establecido que periodos cortos de isquemia entre 5 y 7 horas son compatibles con una buena función pulmonar independientemente de la técnica o solución utilizada para la preservación del pulmón a trasplantar (8,13).

Se han utilizado una amplia variedad de métodos y soluciones para tratar de proteger el pulmón de la isquemia con fines de trasplante. Estos métodos incluyen la aplicación de soluciones de concentración intracelular o extracelular, con o sin glucosa, administradas mediante enfriamiento tópico o por perfusión a través de la arteria pulmonar, variando la temperatura, administración de oxígeno y las condiciones de almacenamiento, todos estos intentos de preservación pulmonar, con resultados contradictorios además que únicamente funcionan en la fase experimental y no en la aplicación clínica (8,13,14,38,44).

Durante la fase de procuración, el pulmón muestra una marcada sensibilidad a la isquemia dada la presencia de la membrana alveolo-capilar. La solución de preservación permanece en la cámara alveolo-capilar provocando cambios en la vasculatura y se difunde a la fase alveolar afectando principalmente a las células alveolares tipo II responsables de la producción y almacenamiento del surfactante pulmonar indispensable para el mantenimiento de la distensibilidad. A menor distensibilidad la resistencia vascular pulmonar se incrementa en forma importante, con lo que se eleva la presión media de la arteria pulmonar, el gasto cardiaco disminuye y se induce la formación de edema afectando la calidad del intercambio gaseoso (11,23). Estos hallazgos son consecuencia

de una serie de alteraciones en el metabolismo e integridad celular durante las fases de isquemia-preservación e isquemia-reperfusión (17,43).

Bajo condiciones normales, el pulmón consume glucosa y mantiene la energía almacenada en forma de ATP. Durante la isquemia el pulmón mantiene un metabolismo aeróbico en el que utiliza la glucosa adicionada en la solución de preservación y el oxígeno remanente en los alvéolos.

Después de 120 y 180 minutos de isquemia a 37°C la concentración de glucosa disminuye mucho más rápido que cualquier otro indicador bioquímico y los niveles de ATP disminuyen aproximadamente en un 90%, lo que sugiere que el tejido pulmonar metaboliza glucosa como principal fuente de energía. La glucosa extracelular constituye un factor importante para la salida de sodio intracelular en su intercambio por potasio (18,36).

En la isquemia, los efectos metabólicos son los primeros en aparecer, inhibiéndose la fosforilación oxidativa y por lo tanto la formación de ATP. También aumenta el fósforo inorgánico y otros productos de la hidrólisis de los nucleótidos de adenina del ATP como consecuencia de ello, se altera la permeabilidad celular, posiblemente con la colaboración de radicales libres de oxígeno, generando la pérdida de potasio y un aumento en la entrada de sodio y calcio a favor del gradiente de concentración. El acúmulo intracelular de calcio ocasiona un déficit energético importante ya que por una parte, se presenta un aumento excesivo de la actividad de las ATP-etas dependientes de calcio con lo que se acelera hasta niveles incompatibles el consumo de ATP mitocondrial, además de que estos organelos pierden la capacidad de fosforilación y consecuentemente la síntesis de ATP por efecto de la calcificación (38).

La solución de Krebs-Henseleit (KH) cubre los requerimientos metabólicos pulmonares mencionados anteriormente, es una solución electrolítica adicionada con 2000 mg de glucosa / L y no contiene calcio por lo que en esta investigación decidimos utilizarla como solución de preservación, perfusión y perfusión pulmonar.

La magnitud del daño ocasionado por efecto de la isquemia asociada a la procuración no puede evaluarse sino hasta que ocurre la reperfusión. La fase de isquemia-reperfusión es un fenómeno complicado que involucra la producción de radicales libres.

Durante la isquemia, el pulmón mantiene su metabolismo aeróbico utilizando el oxígeno remanente en los alvéolos con la consecuente producción de radicales libres derivados del oxígeno (33,43).

Bajo estas circunstancias, el exceso de oxígeno tiene que eliminarse mediante los mecanismos receptores endógenos, en donde es utilizado como aceptor de electrones por la xantina oxidasa tisular generando la formación de aniones superóxido ($O_2^{\cdot -}$), estos aniones se dismutan en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) por acción de la enzima superóxido dismutasa y son eliminados mediante la formación de agua cuando actúan las enzimas glutatión peroxidasa o catalasa. Si estos mecanismos enzimáticos no funcionan correctamente, ($O_2^{\cdot -}$), (H_2O_2) y los radicales (OH^{\cdot}) se acumulan. Estas especies son muy reactivas y citotóxicas y pueden dar inicio a la peroxidación lipídica, que está bien caracterizada como un mecanismo de daño celular que involucra la destrucción química y configuracional de los lípidos de la membrana, alterando la permeabilidad y funcionalidad de los sistemas enzimáticos y de transporte dada la producción de peroxidases lipídicas y de sus productos como aldehídos (26,29,33,43). El Malonaldehído y es uno de los productos finales derivados del rompimiento de los ácidos grasos polinsaturados y ésteres relacionados, la medición de este compuesto proporciona un índice conveniente de la peroxidación lipídica reflejando el daño celular por oxidantes (26).

En el organismo existen también defensas antioxidantes no enzimáticas, que pueden actuar como basureros de radicales y como apaciguadores de las reacciones de peroxidación lipídica inducida por radicales libres, entre los que se encuentra el glutatión (GLU), también actúa como basurero de radicales, además de servir como sustrato para las reacciones mediadas por la glutatión peroxidasa (5).

2.- ANTECEDENTES

La posibilidad de realizar un trasplante de pulmón se remonta a inicios del presente siglo. El antecedente más antiguo se encuentra en las descripciones de técnicas vasculares que hiciera Alexis Carrel; sin embargo, los trabajos experimentales se iniciaron con Metras (1950), Juvenelle (1951) y Hardin (1954) (2,15).

El primer trasplante pulmonar en humanos se realizó en la Universidad de Mississippi en 1963 por el Dr. Hardy. El paciente del Dr. Hardy logró sobrevivir 18 días, indicando la factibilidad de lograr un injerto pulmonar funcional (2,12,13,24).

Entre 1963 y 1980, 39 pacientes habían recibido un alotrasplante pulmonar (Nellems:1980) desgraciadamente, los resultados no fueron satisfactorios ya que únicamente dos pacientes lograron sobrevividas relativamente prolongadas, a saber el paciente del Dr. Derom 1971 en Bélgica sobrevivió 10 meses, mientras que el paciente del Dr. Veith en Nueva York sobrevivió 6 meses (2,9,12,13,15,24).

Los principales problemas relacionados con este desalentador panorama fueron por un lado biológicos, los inmunosupresores disponibles en ese entonces no eran capaces de modificar sustancialmente el fenómeno de rechazo y por otro lado los relacionados con la técnica quirúrgica, principalmente en la anastomosis bronquial (2,9,12,13,15,24).

A partir de 1980, la introducción de la ciclosporina A como principal agente inmunosupresor (12,13,15) permitió un nuevo auge internacional en el trasplante pulmonar clínico así como su inicio en nuestro país.

Actualmente ya se han superado los problemas relacionados con la técnica quirúrgica y con la terapia inmunosupresora, sin embargo la experiencia mundial demuestra que realizar un trasplante de pulmón, es más difícil que trasplantar otros órganos (2). Aunado a la escasez de donadores, no se ha desarrollado un método de preservación adecuado que permita la conservación de los pulmones durante su transporte sin dañar su funcionalidad por periodos de tiempo prolongados (1, 6,8,15,19,21). Numerosos estudios han demostrado que los métodos de preservación adecuados

para los llamados órganos sólidos no funcionan en la preservación pulmonar, ya que el pulmón es el órgano encargado del intercambio gaseoso, esta función ha retrasado y limitado el desarrollo de una metodología de preservación adecuada pues el más ligero daño isquémico repercute en su funcionamiento (6,10,20).

En un inicio y dado que se desconocía cual era el tiempo máximo de isquemia fría tolerado por el pulmón, los trasplantes clínicos implicaban el traslado del donador al mismo centro hospitalario del receptor ubicándolos en quirófanos adyacentes, con el fin de minimizar el tiempo de isquemia; sin embargo transferir el donador implicaba ciertas dificultades, ya que se aumentaba el deterioro del donador complicando el procedimiento, se limitaba el acceso a los demás órganos útiles para la donación, y se restringía el acceso de todo el personal que interviene en la procuración, además de que cuando los familiares autorizan la donación de órganos, no permiten el traslado del cuerpo a otra localidad (2,15).

Se han utilizado una amplia variedad de métodos y soluciones para tratar de proteger el pulmón con fines de trasplante. Estos métodos han incluido la aplicación de soluciones de tipo intracelular o de tipo extracelular, mediante enfriamiento tópico o perfusión a través de la arteria pulmonar, variando principalmente la temperatura, la administración de oxígeno y las condiciones de almacenamiento (2,3,4,6,15,18).

Los resultados de estos experimentos han sido un tanto diferentes y contradictorios, y aunque esporádicamente aparecen en la literatura avances en preservación pulmonar, estos reportes resultan útiles únicamente en la fase experimental y desgraciadamente no han sido lo suficientemente consistentes o reproducibles para permitir su aplicación clínica, y con ninguno de ellos ha sido posible realizar procuraciones rutinarias distantes (6,15,23).

Después de 28 años de investigación en preservación pulmonar, actualmente está bien establecido que periodos cortos de isquemia entre 5 y 7 horas son compatibles con una buena función pulmonar y no ha sido posible realizar procuraciones rutinarias distantes debido a ciertos factores, entre los que se pueden mencionar: el daño celular y metabólico por efecto de la isquemia, la generación de

radicales libres que se presenta principalmente durante la reperfusión inmediatamente después de colocar el injerto, el incremento en la resistencia vascular pulmonar y la disminución en la presión parcial de oxígeno, así como la formación de edema. (2,3,4,11,15,20).

Dado que la generación de radicales libres continúa siendo un problema trascendental que repercute en la funcionalidad del injerto pulmonar, en este protocolo experimental, decidimos evaluar el comportamiento de los radicales libres a través de la peroxidación lipídica, así como el de dos de los mecanismos receptores de los mismos, uno de carácter enzimático (superóxido dismutasa) y no enzimático (glutathione) en un modelo de preservación pulmonar, que incluye perfusión y reperfusión, con periodos de isquemia inmediata y prolongada.

3.- OBJETIVO

Utilizando un modelo experimental murino de perfusión pulmonar realizada a través de la arteria pulmonar con solución de Krebs-Henseleit (KH), el objetivo de esta tesis consistió en determinar la actividad de la enzima superóxido dismutasa y la concentración de glutatión, así como evaluar la peroxidación lipídica a través de la cuantificación de glutatión, tanto en las soluciones de perfusión y de reperfusión, así como en el homogeneizado tisular procedentes de tres grupos de bloques pulmonares, que fueron :

- a) Perfundidos "in situ" en forma inmediata y continua unicamente durante el tiempo necesario para exanguinarlos.
- b) Perfundidos "in situ" en forma inmediata y continua durante 30'.
- c) Perfundidos "in situ" en forma inmediata y continua para exanguinarlos, e inmediatamente después, preservados durante 24 horas a 4°C y transcurrido el tiempo de preservación, reperfundidos "ex vivo" durante 30' bajo las mismas condiciones dadas para la perfusión.

4.- MATERIAL Y METODOS

4.1.- MODELO EXPERIMENTAL

Se utilizaron 21 ratones adultos de la cepa Balb-c sin importar el sexo, con edad variable y con un peso promedio entre 25 y 30 g. Los animales se manejaron de acuerdo con los lineamientos para el uso de animales de investigación de la Ley General de Salud en México (45) y con la Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (46).

4.2.- CRITERIOS DE INCLUSION

Se incluyeron en el estudio ratones clinicamente sanos, sin antecedentes de cualquier enfermedad y sin deformaciones torácicas.

3.- OBJETIVO

Utilizando un modelo experimental murino de perfusión pulmonar realizada a través de la arteria pulmonar con solución de Krebs-Henseleit (KH), el objetivo de esta tesis consistió en determinar la actividad de la enzima superóxido dismutasa y la concentración de glutatión, así como evaluar la peroxidación lipídica a través de la cuantificación de glutatión, tanto en las soluciones de perfusión y de reperfusión, así como en el homogeneizado tisular procedentes de tres grupos de bloques pulmonares, que fueron :

- a) Perfundidos "in situ" en forma inmediata y continua unicamente durante el tiempo necesario para exanguinarlos.
- b) Perfundidos "in situ" en forma inmediata y continua durante 30'.
- c) Perfundidos "in situ" en forma inmediata y continua para exanguinarlos, e inmediatamente después, preservados durante 24 horas a 4°C y transcurrido el tiempo de preservación, reperfundidos "ex vivo" durante 30' bajo las mismas condiciones dadas para la perfusión.

4.- MATERIAL Y METODOS

4.1.- MODELO EXPERIMENTAL

Se utilizaron 21 ratones adultos de la cepa Balb-c sin importar el sexo, con edad variable y con un peso promedio entre 25 y 30 g. Los animales se manejaron de acuerdo con los lineamientos para el uso de animales de investigación de la Ley General de Salud en México (45) y con la Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (46).

4.2.- CRITERIOS DE INCLUSION

Se incluyeron en el estudio ratones clinicamente sanos, sin antecedentes de cualquier enfermedad y sin deformaciones torácicas.

4.3.- CRITERIOS DE EXCLUSION

Los animales con datos clínicamente patológicos previos al procedimiento quirúrgico, con alteraciones sugestivas de patología pulmonar o con deformidades torácicas fueron excluidos del estudio.

4.4.- TECNICAS QUIRURGICAS

Los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico a una dosis de 28 mg/Kg vía intraperitoneal y fueron intubados con una sonda orotraqueal de acuerdo con el siguiente procedimiento.

4.4.1.- TRAQUEOTOMIA: Una vez anestesiado, el animal fue colocado sobre la mesa de cirugía en posición decúbito dorsal, se realizó una incisión de aproximadamente 1 cm en la línea media del cuello a partir del cartilago cricoides. Posteriormente con ayuda de unos separadores (blefarostatos) se retrajo la piel y el tejido subcutáneo, se realizó una incisión en la fascia cervical y se separaron los músculos esternohioideo y esternotiroideo hasta hacer aparente la fascia traqueal. Se identificó el tercer anillo traqueal, el cual fue incidido en forma transversal y se introdujo una cánula orotraqueal de polietileno, la cual se conectó a un ventilador de volumen (Harvard Rodent) con una fracción inspirada de oxígeno al 21%. Los animales fueron ventilados con un volumen tidal de 1 ml/min y con una frecuencia de 55 respiraciones por minuto, con el fin de evitar posibles atelectasias.

4.4.2.- ESTERNOTOMIA: Se realizó una incisión media con límite superior en el hueso supraesternal y límite inferior en el cartilago xifoideo, inmediatamente después de realizada la esternotomía se cortaron los ligamentos suspensorios de ambos pulmones y se procedió a disecar las venas cava craneal y cava caudal, así como del tronco de la aorta, los cuales fueron referidos con seda 7-0. Inmediatamente después, se ligaron y se cortaron los vasos disecados. Posteriormente, se insertó un catéter (Intravenoso JelcoTH 226, 1N. 25 mm) en el ventrículo derecho con el fin de realizar la perfusión del bloque pulmonar a través de la arteria pulmonar y seguir la

circulación cardiopulmonar, el otro extremo de este catéter se conectó a una bomba peristáltica (Microperperx LKB-Bromma) para perfundir la solución de KH (Sigma Chemical Co) a una temperatura de 4°C y con un flujo de perfusión constante de 0.2 ml/min. Una vez colocado dicho catéter en el ventrículo derecho, se colocó otro catéter en el ventrículo izquierdo, con el fin de recolectar la solución de perfusión procedente de las venas pulmonares. Una vez colocados ambos catéteres, éstos se fijaron al corazón con un punto de sutura utilizando seda 7-0. En forma previa a la utilización de ambos catéteres éstos fueron lavados con 300 UI de heparina.

4.5.- GRUPOS EXPERIMENTALES

Los bloques pulmonares obtenidos para evaluar la actividad de la enzima superóxido dismutasa y de glutatión, así como de la peroxidación lipídica en homogeneizado de pulmón y en el líquido de perfusión, se dividieron en 3 grupos de estudio de acuerdo con los tiempos de perfusión e isquemia previamente establecidos.

Los ratones fueron divididos al azar en tres grupos de estudio:

Grupo 1 : (n=7). Grupo control: Inmediatamente después de colocar los catéteres, el bloque pulmonar se perfundió "in situ" con solución de KH (Sigma Chemical Co.) a una temperatura de 4°C y con un flujo de perfusión de 0.2 ml/min únicamente durante el tiempo necesario para exanguinar el bloque pulmonar.

Grupo 2 : (n=7). Inmediatamente después de colocar los catéteres, el bloque pulmonar se perfundió "in situ" en forma continua durante 30' con solución de KH a una temperatura de 4°C y con un flujo de perfusión de 0.2 ml/min, recolectando el líquido de perfusión cada 15'.

Grupo 3 : (n=7). Inmediatamente después de colocar los catéteres, el bloque pulmonar se perfundió "in situ" con solución de KH a una temperatura de 4° y con un flujo de perfusión de 0.2 ml/min durante el tiempo necesario para su exanguinación. Inmediatamente después, el bloque pulmonar, fue extraído de la cavidad torácica para preservarlo sumergido en solución de KH durante 24 horas a 4°C suspendido por la tráquea. Transcurrido el tiempo de preservación, el bloque pulmonar se conectó a un ventilador (Harvard Rodent) a través de la tráquea, manteniendo una fracción inspirada

de oxígeno al 21%, un volumen tidal de 1 ml/min y 55 respiraciones / minuto y fue reperfundido "ex vivo" durante 30' con solución de KH a una temperatura de 4°C y con un flujo de perfusión de 0.2 ml/min recolectando el líquido de reperfusión cada 15'.

4.6.- OBTENCION DE MUESTRAS

4.6.1.- LIQUIDO DE PERFUSION: La solución de KH perfundida a través del catéter colocado en el ventrículo derecho y obtenida a través del catéter insertado en el ventrículo izquierdo se recolectó de la siguiente manera:

En el grupo 1, se recolectó el líquido de perfusión en forma inmediata, únicamente durante el tiempo que fue necesario para exanguinar los pulmones, es decir hasta que los pulmones quedaron completamente limpios.

En el grupo 2, se perfundió el bloque pulmonar en forma inmediata y continua durante 30' y se procedió a recolectar en un tubo de ensaye el líquido de perfusión de los primeros 15' y en otro tubo de ensaye el líquido de perfusión de los segundos 15'.

En el grupo 3, se perfundió el bloque pulmonar en forma inmediata únicamente durante el tiempo que fue necesario para exanguinar los pulmones hasta que quedaron completamente limpios. Inmediatamente después, los pulmones, se preservaron suspendidos por la tráquea durante 24 horas a 4°C sumergidos en solución de KH, transcurrido el tiempo de preservación, se procedió a reperfundir el bloque pulmonar con la misma solución en forma continua durante 30', recolectando en un tubo de ensaye el líquido de reperfusión de los primeros 15' y en otro tubo de ensaye el líquido de reperfusión de los segundos 15'.

Los líquidos de perfusión y de reperfusión procedentes de todos los grupos de estudio se centrifugaron durante 30' a 4°C con ayuda de una centrifuga refrigerada (Beckman GS-6R) a una velocidad de 2500 r.p.m., e inmediatamente después, los sobrenadantes se almacenaron en viales criogénicos a -35°C hasta el momento de realizar las cuantificaciones de la actividad de la enzima superóxido dismutasa y de las concentraciones de glutatión y malonaldehído.

4.6.2.- HOMOGENEIZADO TISULAR: Concluidas las maniobras de perfusión y la obtención del líquido de perfusión, el bloque cardiopulmonar fue extraído de la cavidad torácica para la preparación de los homogeneizados tisulares en los grupos 1 y 2. En el grupo 3, los homogeneizados tisulares se prepararon una vez concluida la reperfusión, previa preservación prolongada. Los bloques cardiopulmonares se colocaron sobre una caja de petri para su disección, separando el corazón de los pulmones y de la tráquea. Con ayuda de un bisturí se prepararon macerados finos de los pulmones adicionando 1ml de solución de KH. Una vez obtenido el macerado, los pulmones fueron homogeneizados utilizando un homogeneizador (Polytron, Brikmann Instruments Co.). Posteriormente, estos se filtraron a través de una gasa estéril y fueron centrifugados a 4°C durante 30' a 2500 r.p.m. (Centrífuga Beckman GS-6R). Los sobrenadantes así obtenidos, se almacenaron en viales criogénicos a una temperatura de -35°C hasta el momento de realizar las determinaciones de la actividad enzimática de superóxido dismutasa, concentración de glutatión y de la peroxidación lipídica.

4.7.- CUANTIFICACION BIOQUIMICA

4.7.1.- SUPEROXIDO DISMUTASA: La cuantificación de la actividad de superóxido dismutasa presente en los líquidos de perfusión y de reperfusión, así como en las muestras de los homogeneizados pulmonares se realizó mediante un ensayo colorimétrico. Se utilizó un estuche comercial (BIOXYTECH SOD-525, Oxis-International Co) que contenía los reactivos necesarios para montar el ensayo de acuerdo con el siguiente esquema:

1).- Se utilizaron tubos de ensayo de cristal (12x75), nuevos y estériles. Estos tubos fueron colocados en una gradilla y fueron numerados consecutivamente a partir del número 1 con el fin de identificar su contenido. Todas las muestras, de los líquidos de perfusión, reperfusión y homogeneizado pulmonar se procesaron por duplicado.

2).- Cada uno de los tubos contenía 40 μ l de cada una de las muestras de líquido de perfusión u homogeneizado pulmonar. Se utilizó el número de tubos que fue necesario de acuerdo al número de muestras por procesar, y una serie de 4 tubos con 40 μ l de agua como control.

3).- A todos los tubos se les adicionaron 900 μ l de solución amortiguadora.

4).- Posteriormente se adicionaron 30 μ l de receptor mercaptano dimetil sulfóxido diluido en etilen glicol al 25% en todos los tubos. Estos se agitaron vigorosamente durante 4 segundos con ayuda de un vortex.

5).- Después de 1 minuto de incubación a 37°C se adicionaron 30 μ l de la solución cromógena y se agitaron vigorosamente durante 4 segundos.

6).- Se procedió a leer la absorbancia de cada uno de los tubos utilizando un espectrofotómetro (Beckman Du-6) ajustado a una longitud de onda de 525nm.

7).- Se obtuvo el promedio de las lecturas de absorbancia de los tubos control.

8).- Una vez obtenidas las lecturas de absorbancia de todas las muestras, se calculó la actividad de superóxido dismutasa en cada uno de ellas utilizando la siguiente relación:

$$(U / ml SOD) = 0.93 (Vs/Vc) - 1 / 1.073 - 0.073 (Vs/Vc)$$

SOD = actividad de superóxido dismutasa expresada en unidades por mililitro de extracto.

Vs = absorbancia de la muestra problema

Vc = promedio de absorbancia del control

4.7.2.-GLUTATION: La concentración de glutation presente en los líquidos de perfusión y de reperfusión, así como en las muestras de los homogeneizados pulmonares se realizó mediante un ensayo colorimétrico. Se utilizó un estuche comercial (BIOXYTECH GSH-400, Oxis-International Co) que contenía los reactivos necesarios para montar el ensayo de acuerdo con el siguiente esquema:

1).- Se utilizaron tubos de ensayo de cristal (12x75) nuevos y estériles. Estos tubos fueron colocados en una gradilla y se numeraron consecutivamente a partir del número 1 con el fin de identificar su contenido.

- 2).- Justo antes de iniciar la determinación de glutation y con el objeto de preparar una curva estándar, se procedió a preparar una serie de estándares a partir de una solución de glutation 0.5 mmol/l diluída en ácido metafosfórico al 5% cuyas concentraciones finales fueron de (0, 20.0, 40.0, 60.0, 80.0 y 100.0) μ M.
- 3).- Todas los líquidos de perfusión y de reperfusión, al igual que los homogeneizados pulmonares, y la curva estándar se procesaron por duplicado. Se utilizó el número de tubos necesario de acuerdo al número de muestras por procesar, cada uno de estos tubos contenía 50 μ l de cada una de las muestras problema o de los estándares correspondientes.
- 4).- A todos los tubos se les adicionaron 850 μ l de solución amortiguadora seguida de una agitación vigorosa utilizando un vortex.
- 5).- Posteriormente se adicionaron 50 μ l de 4-cloro-1-metil-7-trifluorometil quinolina metil sulfato en todos los tubos y se agitaron vigorosamente con ayuda de un vortex.
- 6).- Acto seguido, se adicionaron 50 μ l de hidróxido de sodio al 30% y se procedió a agitarlos nuevamente.
- 7).- Después de 10 minutos de incubación a $(25\pm 3)^{\circ}\text{C}$ bajo condiciones de obscuridad, se procedió a leer la absorbancia de cada uno de los tubos utilizando un espectrofotómetro (Beckman Du-6) ajustado a una longitud de onda de 400nm.
- 8).- Se incluyó un tubo con blanco de reactivo, éste contenía solución amortiguadora y la lectura de su absorbancia se restó a las lecturas obtenidas de todos los tubos.
- 9).- Una vez obtenidas las lecturas de absorbancia correspondientes a los estándares, éstas se relacionaron con la concentración de cada uno de ellos a través de la creación de una gráfica cuyo eje de las abscisas correspondió a la concentración de glutation expresada en $\mu\text{M/L}$ y el eje de las ordenadas correspondió a las unidades de absorbancia.

10).- La concentración de glutatión en las muestras procesadas se obtuvo interpolando la absorbancia de cada una de las muestras problema sobre la gráfica además de relacionar la ecuación de la recta obtenida en dicha gráfica con las lecturas de absorbancia.

4.7.3.- PEROXIDACION LIPIDICA: La evaluación de la peroxidación lipídica se realizó a través de la cuantificación del malonaldehído presente en los líquidos de perfusión y de reperfusión, así como en las muestras de los homogeneizados pulmonares. Se utilizó un estuche comercial (BIOXYTECH LPO-586, Oxis-International Co.) que contenía los reactivos necesarios para montar el ensayo colorimétrico de acuerdo con el siguiente esquema:

- 1).- Se utilizaron tubos de ensayo de cristal (12x75) nuevos y estériles. Estos tubos fueron colocados en una gradilla y se numeraron consecutivamente a partir del número 1 con el fin de identificar correctamente el contenido de cada uno de los tubos.
- 2).- Justo antes de iniciar la cuantificación de malonaldehído y con el objeto de preparar una curva estándar se procedió a preparar una serie de estándares cuyas concentraciones finales fueron de (0, 2.5, 5.0, 10.0, 15.0 y 20.0) μM a partir de una solución de 1,1,3,3-tetrametoxipropano 10mM.
- 3).- Cada uno de los tubos contenía 200 μl de cada uno de los estándares, líquido de perfusión u homogeneizado pulmonar. Se utilizó el número de tubos necesario de acuerdo al número de muestras que fueron procesadas por duplicado.
- 4).- A todos los tubos se les adicionaron 650 μl de N-metil-2-fenil indol (10.3mM) en acetonitrilo previamente diluido en metanol seguido de una agitación vigorosa utilizando un vortex.
- 5).- Posteriormente se adicionaron 150 μl de ácido metanosulfónico (15.4M) en todos los tubos, se agitaron vigorosamente con ayuda de un vortex y se taparon con tapones de plástico.
- 6).- Después de 40 minutos de incubación a 45°C, las muestras se enfriaron sobre una cámara de hielo y se procedió a leer la absorbancia de cada uno de los tubos utilizando un espectrofotómetro (Beckman Du-6) ajustado a una longitud de onda de 586nm.

7).- Se incluyó un tubo con blanco de reactivo que contenía solución amortiguadora. La lectura de su absorbancia fue restada a las lecturas obtenidas de los tubos que contenían muestra para la realización de los cálculos.

8).- Una vez obtenidas las lecturas de absorbancia de los estándares, éstas se relacionaron con la concentración de cada uno de ellos a través de la creación de una gráfica cuyo eje de las abscisas correspondió a la concentración de malonaldehído (peroxidación lipídica) expresada en $\mu\text{M/L}$ y el eje de las ordenadas correspondió a las unidades de absorbancia .

9).- La concentración de malonaldehído en las muestras procesadas se obtuvo interpolando la absorbancia de cada una de las muestras problema sobre la gráfica, además de relacionar la ecuación de la recta obtenida en dicha gráfica con las lecturas de absorbancia.

5.- RESULTADOS

5.1.- GENERALES

Los resultados se presentan como valor promedio \pm error estándar. No se presentó ninguna complicación quirúrgica, ni al realizar las perfusiones y reperfusiones de los bloques pulmonares. En el grupo 1, el tiempo promedio de perfusión pulmonar requerido para exanguinar los pulmones fue (7.90 ± 0.63) min. El tiempo promedio de perfusión continua en el grupo 2 fue de (30.0 ± 0.0) min.

En el grupo 3, el tiempo de perfusión necesario para exanguinar los pulmones antes de preservarlos durante un tiempo de isquemia promedio de (24.81 ± 0.43) hrs fue (7.46 ± 1.12) min, y una vez transcurrido el periodo de isquemia, el tiempo de reperfusión promedio fue (30.0 ± 0.0) min.

El análisis estadístico de los datos incluyó las pruebas de análisis de varianza (ANDEVA) y t-student. Valores de $p < 0.05$ fueron considerados como significativos.

5.1.1.- LIQUIDO DE PERFUSION

La determinación de la actividad de la enzima superóxido dismutasa y de las concentraciones de glutatión y malonaldehído detectadas en el líquido de perfusión y obtenidas en forma individual para cada uno de los bloques pulmonares perfundidos y reperfundidos de acuerdo con el grupo de estudio, así como los valores promedio con su desviación y error estándar se muestran en las tablas 1, 2 y 3 respectivamente.

SOD (U/ml)	LIQUIDOS DE PERFUSION Y REPERFUSION					
Ratón #	Gpo 1 (inm)	Gpo 2 (15')	Gpo 2 (30')	Gpo 3 (inm)	Gpo 3 (15')	Gpo 3 (30')
1	2.75	4.89	3.57	2.72	2.41	0.22
2	1.72	4.69	1.45	1.86	1.40	0.42
3	6.44	1.07	2.44	3.43	2.55	0.22
4	6.94	3.57	2.44	6.58	2.28	0.52
5	3.23	1.19	4.69	6.0	3.42	0.02
6	4.89	5.52	2.59	4.3	2.55	0.22
7	3.57	2.29	2.75	4.3	2.41	0.84
Promedio	4.22	3.31	2.84	4.17	2.43	0.35
\pm DE	1.94	1.82	1.02	1.69	0.59	0.26
\pm EE	0.73	0.68	0.38	0.63	0.22	0.10

Tabla 1. Actividad de superóxido dismutasa expresadas en (U/ml). Valores promedio \pm desviación y error estándar

GLUTATION ($\mu\text{mol/L}$)	LIQUIDOS DE PERFUSION Y REPERFUSION						
	Ratón #	Gpo 1 (inm)	Gpo 2 (15')	Gpo 2 (30')	Gpo 3 (inm)	Gpo 3 (15')	Gpo 3 (30')
	1	5.20	3.54	2.46	2.80	2.17	2.17
	2	6.69	5.09	2.29	9.09	2.17	2.46
	3	9.49	3.09	2.06	9.77	2.34	2.00
	4	12.74	6.57	2.11	10.80	2.06	2.20
	5	9.54	2.06	2.40	8.46	2.17	2.23
	6	8.23	4.74	2.80	4.51	2.23	2.06
	7	8.23	5.09	2.69	4.51	2.06	2.29
	Promedio	8.58	4.31	2.40	7.13	2.17	2.20
	$\pm\text{DE}$	2.39	1.50	0.27	3.12	0.09	0.15
	$\pm\text{EE}$	0.94	0.57	0.10	1.18	0.03	0.05

Tabla 2. Concentración del glutation expresada en ($\mu\text{mol/L}$) . Valores promedio \pm desviación y error estándar.

MALONALDEHIDO ($\mu\text{mol/L}$)	LIQUIDOS DE PERFUSION Y REPERFUSION						
	Ratón #	Gpo 1 (inm)	Gpo 2 (15')	Gpo 2 (30')	Gpo 3 (inm)	Gpo 3 (15')	Gpo 3 (30')
	1	1.34	0.46	0.54	1.34	0.41	0.28
	2	1.34	0.22	0.38	1.34	0.18	0.16
	3	1.42	0.21	0.79	1.38	0.31	0.25
	4	1.54	0.72	0.23	1.58	0.26	0.25
	5	1.15	0.30	0.18	1.05	0.33	0.28
	6	1.35	0.63	0.46	1.38	0.29	0.27
	7	1.28	0.43	0.29	1.27	0.36	0.13
	Promedio	1.34	0.42	0.41	1.33	0.30	0.23
	$\pm\text{DE}$	0.12	0.19	0.21	0.15	0.07	0.06
	$\pm\text{EE}$	0.04	0.07	0.07	0.05	0.02	0.02

Tabla 3. Evaluación de la peroxidación lipídica a través de la concentración de malonaldehido, expresado en ($\mu\text{mol/L}$) .Valores promedio \pm desviación y error estándar.

El cuadro que resume los valores promedio \pm error estándar de la actividad de la enzima superóxido dismutasa y las concentraciones de glutatión y malonaldehído cuantificadas en el líquido de la solución de perfusión, obtenidas al perfundir el bloque pulmonar en forma inmediata únicamente durante el tiempo necesario para exanguinarlo (Grupo 1), durante 15' y 30' en forma inmediata sin haber utilizado ningún tipo de preservación (Grupo 2), así como después de reperfundir durante 15' y 30' post-24 horas de preservación (Grupo 3) corresponde a la tabla 4.

	Gpo 1 (inm)	Gpo 2 (15')	Gpo 2 (30')	Gpo 3 (inm)	Gpo 3 (15')	Gpo 3 (30')
SOD (U/ml)	4.22 \pm 0.73	3.31 \pm 0.68	2.84 \pm 0.38	4.17 \pm 0.63	2.43 \pm 0.22	0.35 \pm 0.10
GLUTATIÓN (μ Ml)	8.58 \pm 0.94	4.31 \pm 0.57	2.40 \pm 0.10	7.13 \pm 1.18	2.17 \pm 0.03	2.20 \pm 0.05
MALONALDEHIDO (μ Ml)	1.34 \pm 0.04	0.42 \pm 0.07	0.41 \pm 0.07	1.33 \pm 0.05	0.30 \pm 0.02	0.23 \pm 0.02

Tabla 4.- Valores promedio \pm error estándar de la actividad de la enzima superóxido dismutasa y concentraciones de glutatión, y malonaldehído detectadas en el líquido de perfusión al exanguinar los pulmones en forma inmediata (Gpo 1), al perfundirlos en forma inmediata y continua durante 15' y 30' (Grupo 2) y al exanguinarlos en forma inmediata previa preservación prolongada (24 horas) así como al reperfundirlos transcurrido dicho tiempo de preservación durante 15' y 30' (Grupo 3).

5.1.2.- HOMOGENEIZADO PULMONAR

Concluidas la perfusión y/o reperfusión del bloque pulmonar de acuerdo con cada uno de los tres grupos de estudio, se procedió a la preparación de los homogeneizados tisulares, en cuyos sobrenadantes se determinaron la actividad de la enzima superóxido dismutasa y las concentraciones de glutatión y malonaldehído inmediatamente después de: a) exanguinar el bloque pulmonar (Grupo 1), b) perfundir el bloque pulmonar en forma inmediata y continua durante 30' (Grupo 2) y c) reperfundir el bloque pulmonar durante 30' post 24 de preservación a 4°C (Grupo 3).

La actividad de la enzima superóxido dismutasa, las concentraciones de glutatión y malonaldehído detectadas en el homogeneizado pulmonar, obtenidas en forma individual en cada uno de los bloques

pulmonares de acuerdo con el grupo de estudio, así como los valores promedio con desviación estándar y error estándar se muestran en las tablas 5, 6 y 7 respectivamente.

SOD (U/ml)	HOMOGENEIZADO PULMONAR		
Ratón #	Gpo 1	Gpo 2	Gpo 3
1	120.39	24.81	11.27
2	72.57	16.44	30.84
3	120.39	19.79	12.69
4	29.13	19.18	25.40
5	31.74	24.85	35.78
6	50.03	24.85	16.93
7	58.38	24.85	14.30
Promedio	68.94	22.11	21.03
±DE	38.17	3.55	9.65
±EE	14.43	1.34	3.65

Tabla 5. Actividad de superóxido dismutasa expresada en (U/ml) .
Valores promedio ± desviación y error estándar.

GLUTATION (µmol/L)	HOMOGENEIZADO PULMONAR		
Ratón #	Gpo 1	Gpo 2	Gpo 3
1	22.00	19.03	11.20
2	19.49	18.74	12.91
3	20.97	18.46	10.57
4	22.86	19.37	11.14
5	15.60	27.66	10.06
6	15.43	14.00	10.69
7	39.26	16.23	11.83
Promedio	22.23	19.07	11.20
±DE	8.06	4.24	0.93
±EE	3.04	1.60	0.35

Tabla 6. Concentración de glutatión expresada en (µmol/L) .
Valores promedio ± desviación y error estándar.

MALONALDEHIDO (µmol/L)	HOMOGENEIZADO PULMONAR		
Ratón #	Gpo 1	Gpo 2	Gpo 3
1	6.98	10.75	7.46
2	6.19	10.33	4.49
3	6.13	11.59	4.79
4	5.97	10.91	6.29
5	4.65	10.33	7.46
6	6.31	8.09	7.46
7	5.69	10.33	4.86
Promedio	5.98	10.33	6.11
±DE	0.71	1.08	1.38
±EE	0.26	0.41	0.52

Tabla 7. Evaluación de la peroxidación lipídica. Concentración de malonaldehído expresada en (µmol/L). Valores promedio ± desviación y error estándar.

La tabla 8 resume los valores promedio \pm error estándar de las cuantificaciones de la actividad de la enzima superóxido dismutasa así como las concentraciones de glutation y malonaldehído en los homogeneizados pulmonares.

HOMOGENEIZADO PULMONAR	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Superóxido Dismutasa (U/ml)	68.94 \pm 14.43	22.11 \pm 1.34	21.03 \pm 3.65
Glutation (μ M/l)	22.23 \pm 3.04	19.07 \pm 1.60	11.20 \pm 0.35
Malonaldehído (μ M/l)	5.98 \pm 0.26	10.33 \pm 0.41	6.11 \pm 0.52

Tabla 8.- Valores promedio \pm error estándar de la actividad de la enzima superóxido dismutasa, concentraciones de glutation y de malonaldehído detectadas en el homogeneizado tisular obtenido después de exanguinar los pulmones en forma inmediata (Gpo 1), al perfundirlos en forma inmediata y continua durante 30' (Grupo 2) y durante 30' post 24 hrs de preservación a 4° C

5.2.- SUPEROXIDO DISMUTASA

5.2.1.- LIQUIDO DE PERFUSION

Los datos promedio (\pm error estándar) de la actividad de la enzima superóxido dismutasa expresadas en U/ml y cuantificadas en el líquido de perfusión pulmonar obtenidas al exanguinar los pulmones en forma inmediata fueron (4.22 \pm 0.73) y (4.17 \pm 0.63) U/ml en los grupos de estudio 1 y 3 respectivamente, sin diferencia estadísticamente significativa entre ambas actividades ($p=0.95$). Dado que la perfusión de los bloques pulmonares con fines de exanguinación inmediata en los grupos 1 y 3 se realizó bajo las mismas condiciones en ambos grupos de estudio, además de que no encontramos diferencias importantes al comparar los promedios de estas concentraciones (4.22 \pm 0.73 y 4.17 \pm 0.63) U/ml, decidimos obtener el promedio de ambas actividades (4.19 \pm 0.68) U/ml y unificar el resultado para su manejo posterior como la actividad de superóxido dismutasa obtenida al perfundir los bloques pulmonares en forma inmediata únicamente durante el tiempo necesario para su exanguinación. Esta actividad enzimática representó el valor basal o control y se comparó con las actividades obtenidas al perfundir o reperfundir los bloques pulmonares de acuerdo con el grupo de estudio del que se trató.

En el grupo 2, encontramos que al perfundir el bloque pulmonar durante los primeros 15', la actividad de superóxido dismutasa en el líquido de perfusión (3.31 ± 0.68) U/ml disminuyó aproximadamente (19.26%) al compararla con la actividad basal registrada al exanguinar los pulmones en forma inmediata (4.19 ± 0.68) U/ml.

En este mismo grupo de estudio, al continuar la perfusión del bloque pulmonar de los minutos 16' al 30', la actividad de superóxido dismutasa fue (2.84 ± 0.38) U/ml con una disminución del (32.2%) con respecto a la concentración basal (4.19 ± 0.68) U/ml. Aunque las actividades de superóxido dismutasa al perfundir el bloque pulmonar en forma inmediata y continua durante 15' y 30' disminuyeron con respecto a la concentración basal, estas disminuciones no fueron estadísticamente significativas [15' ($p=0.38$) y 30' ($p=0.12$)]. Tampoco encontramos diferencias importantes al comparar dichas actividades enzimáticas entre sí ($p=0.56$). Estos resultados se ilustran en la gráfica # 1.

La actividad de superóxido dismutasa en el grupo 3, en donde los bloques pulmonares fueron reperfundidos, después de haber sido exanguinados y preservados durante 24 horas a 4°C sumergidos en solución de KH. Al perfundir el bloque pulmonar durante media hora, la actividad de superóxido dismutasa durante los primeros 15' fue (2.43 ± 0.22) U/ml con una disminución del (42.00)% con respecto a la actividad enzimática basal (4.19 ± 0.68) U/ml, al continuar con la reperfusión del bloque pulmonar de los minutos 16 al 30, la actividad de superóxido dismutasa fue (0.35 ± 0.10) U/ml con una disminución del (91.64)% con respecto al valor basal (4.19 ± 0.68) U/ml. Estas disminuciones fueron estadísticamente significativas ($p = 0.029$ y $p = 0.001$) respectivamente. Al comparar ambos tiempos de reperfusión, se observó una disminución significativa (85.8%, p) al minuto 30 de reperfusión con respecto al minuto 15, tal y como se muestra en la gráfica número 2. Cuando comparamos la actividad de superóxido dismutasa al perfundir los bloques pulmonares durante 15' (3.31 ± 0.68) U/ml, (grupo 2) con la actividad de superóxido dismutasa al reperfundir los bloques pulmonares post-preservación prolongada también durante 15' (2.43 ± 0.102) U/ml, (grupo

3), observamos que la actividad enzimática disminuyó en un (26.50)% post-reperusión pulmonar, esta disminución no fue estadísticamente significativa ($p = 0.37$) con respecto al valor obtenido en la perfusión a los 15'. Al comparar estas mismas actividades enzimáticas obtenidas al perfundir (3.31 ± 0.68) U/ml y al reperfundir (2.43 ± 0.10) U/ml los bloques pulmonares durante 15', con la actividad basal de superóxido dismutasa (4.19 ± 0.68) U/ml, no encontramos una disminución estadísticamente significativa ($p=0.38$) al comparar las actividades enzimáticas basal y perfusión 15', sin embargo, si se presentó una disminución estadísticamente significativa ($p = 0.02$) al comparar las actividades enzimáticas basal y 15' reperusión. Estos resultados se ilustran en la gráfica número 3.

En los líquidos de perfusión y de reperusión recolectados de los minutos 16 al 30 en los grupos 2 y 3, las actividades de superóxido dismutasa observadas fueron (2.84 ± 0.38) U/ml y (0.35 ± 0.10) U/ml respectivamente, al comparar entre si ambas actividades enzimáticas, encontramos una disminución del (87.76)% en la actividad enzimática durante la reperusión, esta disminución fue estadísticamente significativa ($p = 0.0001$). Al comparar dichas actividades con la actividad enzimática basal, se observó una disminución importante de la actividad enzimática como consecuencia de la reperusión ($p = 0.001$) (0.35 ± 0.10 vs 4.19 ± 0.68) U/ml no siendo así al comparar los pulmones perfundidos vs la basal ($p = 0.12$) (2.84 ± 0.38 vs 4.19 ± 0.68) U/ml. Estos resultados se ilustran en la gráfica número 4.

5.2.2.- HOMOGENEIZADO TISULAR PULMONAR

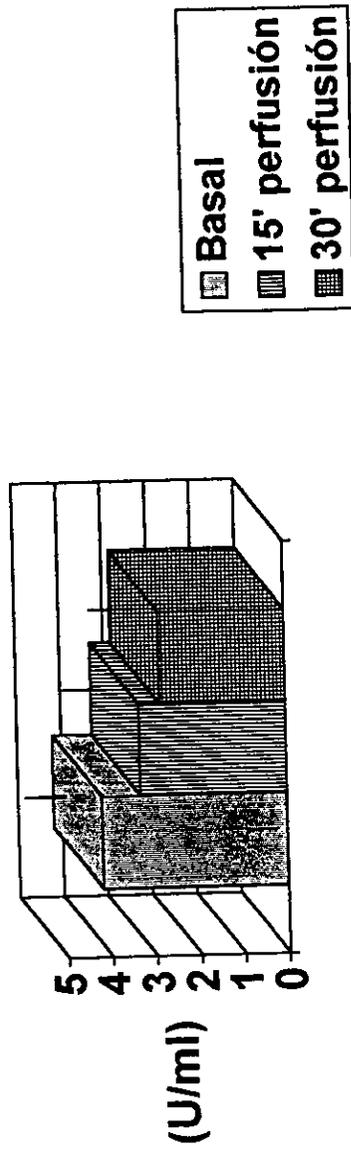
Las actividades promedio (\pm error estándar) de la enzima superóxido dismutasa expresadas en U/ml, obtenidas en los homogeneizados pulmonares en los grupos de estudio 1, 2 y 3 fueron: (68.94 ± 14.43 , 22.11 ± 1.34 y 21.03 ± 3.65) U/ml respectivamente.

La actividad de la enzima superóxido dismutasa tisular correspondiente al grupo 1 representó la actividad basal de esta parte del estudio (68.94 ± 14.43) U/ml, dado que dicha actividad correspondió al homogeneizado pulmonar preparado a partir de los bloques pulmonares que fueron perfundidos

unicamente durante el tiempo necesario para su exanguinación (aproximadamente 8') y fue significativamente mayor (67.93%, $p = 0.007$) que la actividad detectada en el grupo 2 (22.11 ± 1.34) U/ml en el que los bloques pulmonares se perfundieron en forma inmediata y continua durante un tiempo total de 30', así mismo, al comparar la actividad tisular basal de la superóxido dismutasa (68.94 ± 14.43) U/ml con la actividad de la superóxido dismutasa detectada en el grupo 3 (21.03 ± 3.65) U/ml, en donde los pulmones fueron reperfundidos durante un tiempo total de 30' después de que se preservaron durante 24 horas a 4°C, se presentó una disminución estadísticamente significativa del (69.50%, $p = 0.007$). No encontramos diferencias importantes al comparar la actividad de superóxido dismutasa tisular entre los grupos de estudio 2 y 3 ($p = 0.78$).

Gráfica número 5.

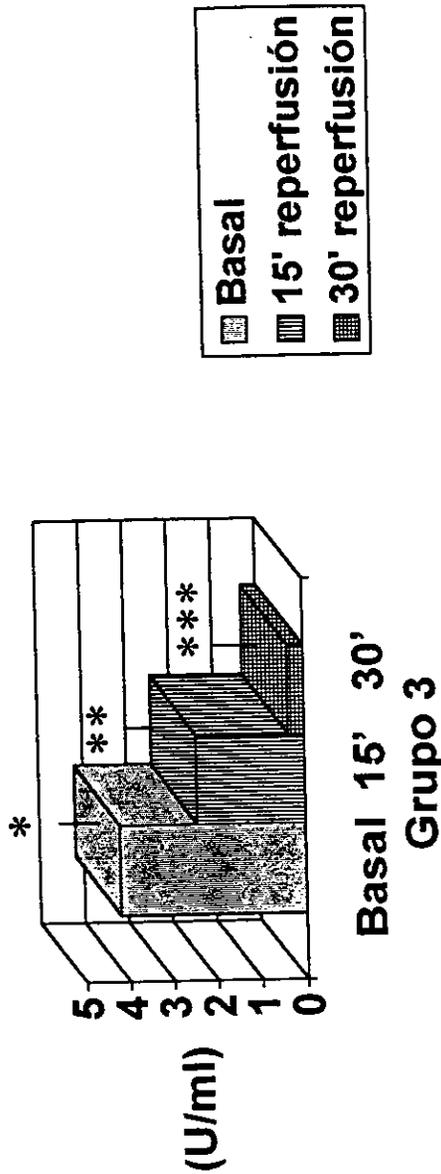
Superóxido Dismutasa



Basal 15' 30'
Grupo 2

Gráfica 1.- Superóxido Dismutasa en el grupo 2.
Actividad promedio \pm error estándar.
Basal: Perfusión inmediata 8' para exanguinación.
15' y 30' de perfusión continua. ANDEVA = ns

Superóxido Dismutasa



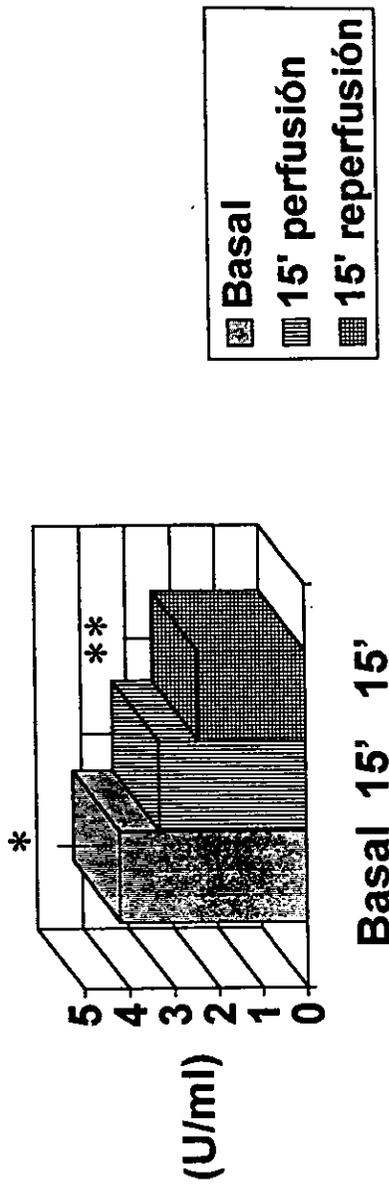
Gráfica 2.- Superóxido Dismutasa en el grupo 3.

Actividad promedio \pm error estándar.

Basal: Perfusion inmediata 8' para exanguinación.
15' y 30' de perfusión continua post-24 horas de preservación.

*vs**, *vs***, **vs*** : $p < 0.05$ (ANDEVA)

Superóxido Dismutasa



Gráfica 3.- Superóxido Dismutasa en los líquidos de perfusión y de reperusión. Actividad promedio +/- error estándar.

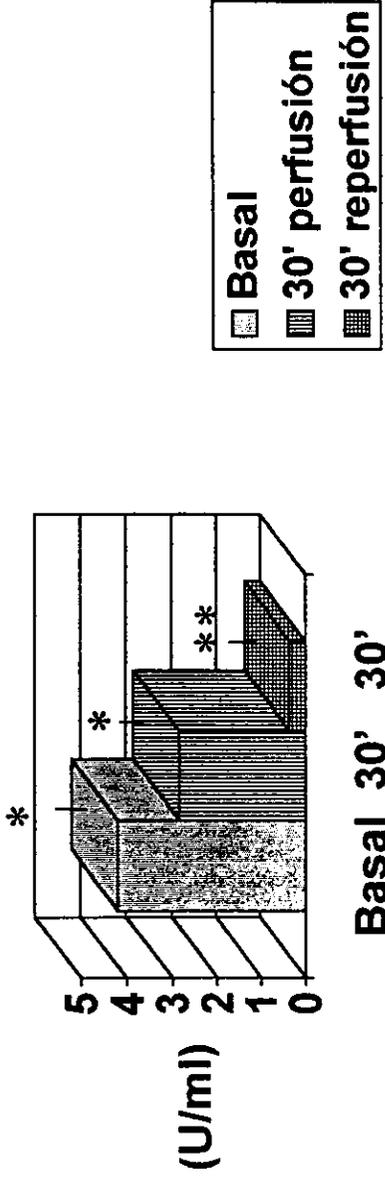
Basal:Perfusión inmediata 8' para exanguinación.

15' Perfusión inmediata y continua.

15' Reperusión post-24 horas de preservación.

* vs ** : $p < 0.05$ (t-Student).

Superóxido Dismutasa

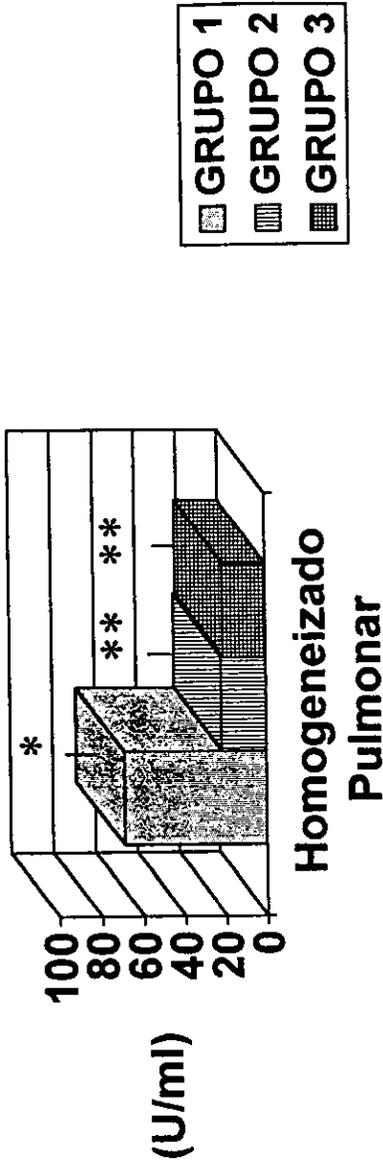


Gráfica 4.- Superóxido Dismutasa en los líquidos de perfusión y de reperusión. Actividad promedio +/- error estándar.

Basal:Perfusión inmediata 8' para exanguinación.
30' Perfusión inmediata y continua.

30' Reperusión post-24 horas de preservación.
* vs ** : $p < 0.05$ (t-Student).

Superóxido Dismutasa



Gráfica 5.- Superóxido Dismutasa. Actividad promedio +/- error estándar. Grupo 1: Perfusión inmediata 8' para exanguinación.

Grupo 2: Perfusión inmediata y continua durante 30'.

Grupo 3: 30' Reperfusión post- 24 horas de preservación.

* vs ** : $p < 0.05$ (t-Student).

5.3.- GLUTATION

5.3.1.- LIQUIDO DE PERFUSION

Las concentraciones promedio (\pm error estándar) de glutation expresadas en $\mu\text{M/l}$ y cuantificadas en el líquido de perfusión pulmonar, obtenidas al exanguinar los pulmones en forma inmediata fueron $(8.58 \pm 0.94) \mu\text{M/l}$ y $(7.13 \pm 1.18) \mu\text{M/l}$ en los grupos 1 y 3 respectivamente, sin diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos de estudio ($p = 0.34$). Dado que la perfusión de los bloques pulmonares con fines de exanguinación inmediata en los grupos 1 y 3 fueron las mismas en ambos grupos de estudio, además de que no encontramos diferencias importantes al comparar los promedios en las concentraciones de glutation $(8.58 \pm 0.94$ y $7.13 \pm 1.18) \mu\text{M/l}$ decidimos obtener el promedio de dichas concentraciones $(7.85 \pm 1.06) \mu\text{M/l}$ y unificar el resultado para su manejo posterior como la concentración de glutation basal o control en este estudio, para posteriormente compararlo con las concentraciones obtenidas al perfundir o reperfundir los bloques pulmonares de acuerdo con el grupo de estudio del que se trató.

En el grupo 2, el bloque pulmonar se perfundió en forma inmediata y continua durante 30', encontramos que durante los primeros 15' de perfusión, la concentración de glutation en el líquido de perfusión fue $(4.31 \pm 0.57) \mu\text{M/l}$ y disminuyó significativamente ($p = 0.01$) con respecto a la concentración basal $(7.85 \pm 1.06) \mu\text{M/l}$. Al continuar con la perfusión del bloque pulmonar del minuto 16 al 30, la concentración de glutation fue $(2.40 \pm 0.10) \mu\text{M/l}$ con una disminución estadísticamente significativa del 69.00% ($p = 0.0003$) con respecto a la concentración basal $(7.85 \pm 1.06) \mu\text{M/l}$. Al comparar las concentraciones obtenidas a los minutos 15' y 30' de perfusión se observa que existe una diferencia significativa ($p = 0.006$) entre estos, presentándose una concentración de glutation menor al minuto 30 de perfusión. Gráfica número 6.

La concentración de glutation en el grupo 3, en el que los bloques pulmonares fueron perfundidos para exanguinarlos e inmediatamente después se preservaron durante 24 horas a 4°C sumergidos en solución de KH antes de reperfundirlos con la misma solución durante 30', se observó que

durante los primeros 15', la concentración de glutatión en el líquido de reperfusión fue (2.17 ± 0.03) μM , presentándose una disminución del 72.00% con respecto a la concentración basal de glutatión (7.85 ± 1.06) μM . Al continuar con la reperfusión del bloque pulmonar del (16' al 30'), la concentración de glutatión fue (2.20 ± 0.05) μM , muy similar a la reportada para los primeros 15', lo que representó una disminución del 72.00% con respecto a la concentración basal (7.85 ± 1.06) μM . Ambas disminuciones fueron estadísticamente significativas con respecto a la concentración basal ($p = 0.0002$). No encontramos diferencia estadísticamente significativa al comparar las concentraciones de glutatión obtenidas al reperfundir los bloques pulmonares durante 15' y 30' ($p = 0.66$). Gráfica número 7.

Cuando comparamos las concentraciones de glutatión al perfundir durante 15' (grupo 2) y al reperfundir durante 15' (grupo 3) los bloques pulmonares, encontramos que la concentración de glutatión en el líquido de reperfusión (grupo 3) fue (2.17 ± 0.03) μM , 49.6% menor ($p = 0.002$) que la encontrada para los bloques pulmonares que fueron perfundidos en forma inmediata y continua y que no fueron preservados (4.31 ± 0.57) μM . Así mismo al comparar ambas concentraciones con respecto al valor obtenido en la concentración basal (7.85 ± 1.06) μM , se observa una disminución estadísticamente significativa ($p < 0.05$) de ambos tiempos, con respecto a dicho valor, estos resultados se ilustran en la gráfica número 8.

Las concentraciones de glutatión fueron (2.40 ± 0.10) y (2.20 ± 0.05) μM al perfundir (Gpo 2) y al reperfundir (Gpo 3) los bloques pulmonares del minuto 16 al 30 respectivamente y aunque hubo una disminución del 8%, cuando los bloques pulmonares fueron reperfundidos esta disminución no fue estadísticamente significativa ($p = 0.12$). Los valores obtenidos tanto para el tiempo de perfusión, como para el de reperfusión al minuto 30', resultaron ser significativamente ($p < 0.05$) menores al obtenido en el valor basal. Gráfica número 9.

5.3.2.- HOMOGENEIZADO TISULAR PULMONAR

Las concentraciones de glutatión promedio (\pm error estándar) expresadas en $\mu\text{M/l}$ y obtenidas en los homogeneizados pulmonares de los grupos 1, 2 y 3 fueron : $(22.23 \pm 3.04, 19.07 \pm 1.60$ y $11.20 \pm 0.35)$ respectivamente.

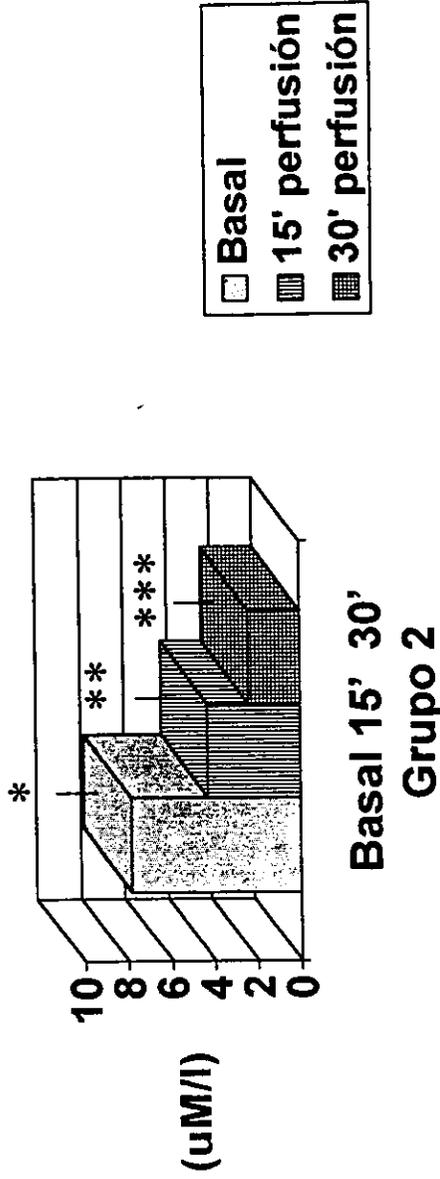
La concentración de glutatión tisular correspondiente al grupo 1, representó la concentración basal en esta parte del estudio $(22.23 \pm 3.04) \mu\text{M/l}$, dado que dicha concentración correspondió al homogeneizado pulmonar preparado a partir de los bloques pulmonares que fueron perfundidos únicamente durante el tiempo necesario para su exanguinación (aproximadamente 8').

Al perfundir los bloques pulmonares en forma inmediata y continua durante 30' sin utilizar ningún tipo de preservación (grupo 2), la concentración de glutatión tisular fue $(19.07 \pm 1.60) \mu\text{M/l}$, con una disminución que no fue significativa (14.20%, $p = 0.37$) con respecto a la concentración de glutatión tisular basal $(22.23 \pm 3.04) \mu\text{M/l}$.

La concentración de glutatión tisular en el grupo 3 en el que los bloques pulmonares fueron reperfundidos durante un tiempo total de 30' post-24 horas de preservación a 4° en solución de KH fue $(11.20 \pm 0.35) \mu\text{M/l}$, con una disminución estadísticamente significativa (49.60)% con respecto a la concentración basal ($p = 0.003$) $(22.23 \pm 3.04) \mu\text{M/l}$.

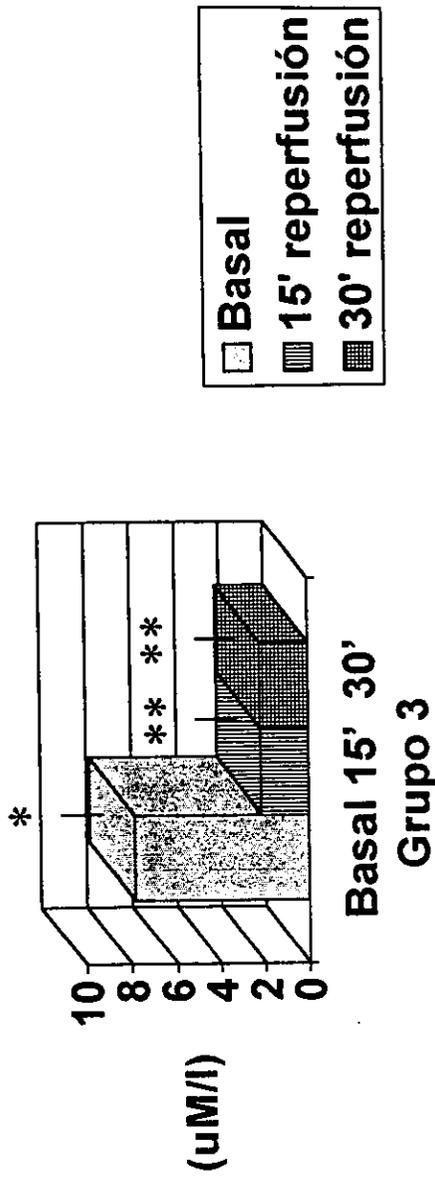
Al comparar las concentraciones de glutatión tisular obtenidas al perfundir y al reperfundir los bloques pulmonares (grupos 2 y 3 respectivamente) encontramos que la concentración de glutatión en el grupo 3 fue $(11.20 \pm 0.35) \mu\text{M/l}$ y disminuyó en un 41.00% con respecto a la concentración encontrada en el grupo 2 $(19.07 \pm 1.60) \mu\text{M/l}$ siendo dicha disminución estadísticamente significativa ($p = 0.0004$). Gráfica número 10.

Glutation



Gráfica 6.- Glutathione. Concentraciones promedio +/- error estándar.
Basal: Perfusion inmediata 8' para exanguinación.
15' y 30' de perfusion inmediata y continua.
*vs**, *vs***, **vs*** : $p < 0.05$ (ANDEVA)

Glutation

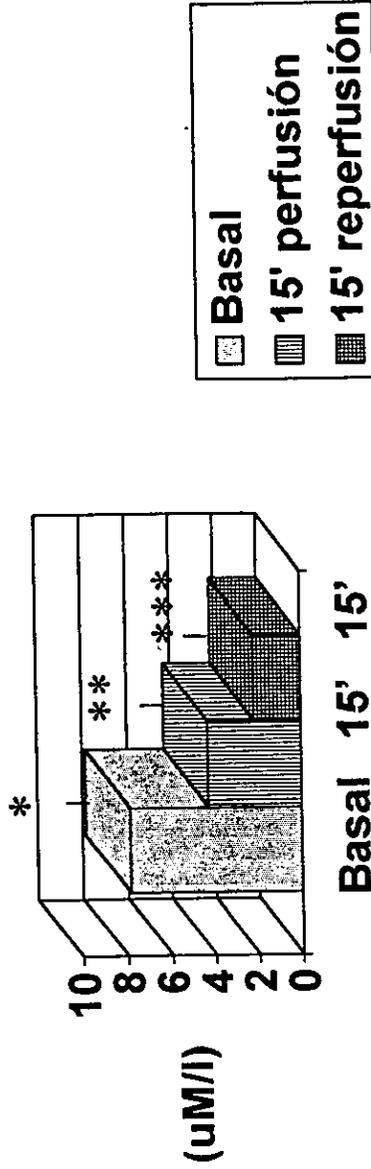


Gráfica 7.- Glutation. Concentraciones promedio +/- error estándar.
Basal: Perfusion inmediata 8' para exanguinación.

15' y 30' de reperfusion continua post-24 horas de preservación.

*vs** : $p < 0.05$ (ANDEVA)

Glutation



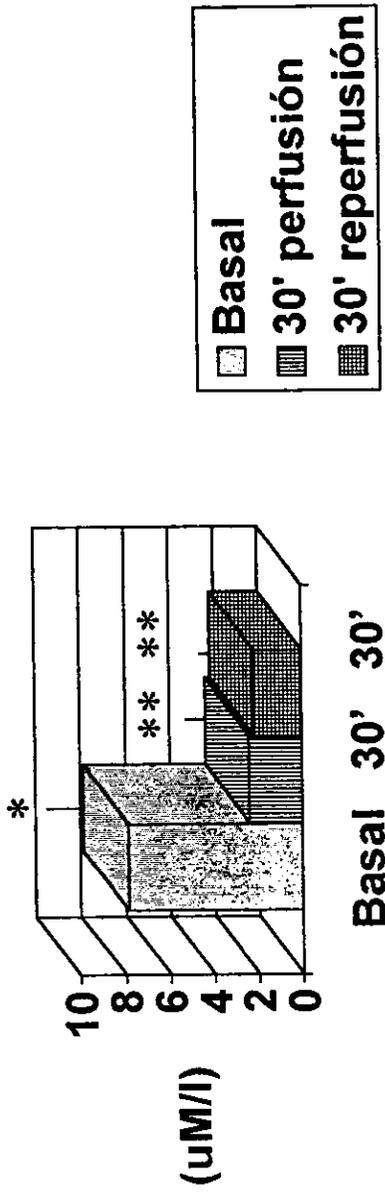
Gráfica 8.- Glutathione. Concentraciones promedio +/- error estándar.

Basal: Perfusion inmediata 8' para exanguinación.

15' perfusion inmediata y continua. 15' reperfusion post-24 horas de preservación.

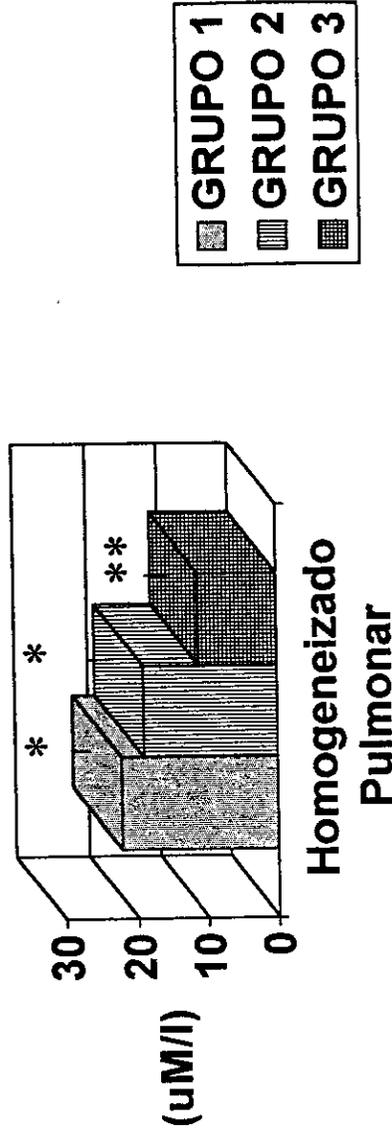
*vs**, *vs***, **vs*** : p<0.05 (t-Student).

Glutathion



Gráfica 9.- Glutathion. Concentraciones promedio +/- error estándar. Basal:Perfusión inmediata 8' para exanguinación. 30' perfusión inmediata y continua. 30' reperfusion post-24 horas de preservación. * vs ** : $p < 0.05$ (t-Student)

Glutation



Gráfica 10.- Glutathione. Concentraciones promedio +/- error estándar. Grupo 1: Perfusion inmediata 8' para exanguinación.

Grupo 2: Perfusion inmediata y continua durante 30'.

Grupo 3: 30' Reperfusion post- 24 horas de preservación.

* vs ** : $p < 0.05$ (t-Student).

5.4.- PEROXIDACION LIPIDICA.

5.4.1.- LIQUIDO DE PERFUSION

Las concentraciones promedio (\pm error estándar) de malonaldehído expresadas en $\mu\text{M/l}$ y cuantificadas en el líquido de perfusión pulmonar obtenidas en forma inmediata fueron (1.34 ± 0.04) y (1.33 ± 0.05) en los grupos de estudio 1 y 3 respectivamente, sin diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos de estudio ($p = 0.878$). Dado que la perfusión de los bloques pulmonares con fines de exanguinación inmediata en los grupos 1 y 3 fueron las mismas en ambos grupos de estudio, además de que no encontramos diferencia estadística importantes al comparar las concentraciones promedios de malonaldehído (1.34 ± 0.04) y (1.33 ± 0.05) $\mu\text{M/l}$ decidimos obtener el promedio de dichas concentraciones (1.33 ± 0.04) $\mu\text{M/l}$ y unificar el resultado para su manejo como la concentración de malonaldehído basal o control, como indicador de la peroxidación lipídica en este estudio.

La concentración de malonaldehído en el grupo 2 (en el que se perfundieron los bloques pulmonares en forma inmediata y continua durante 30') fue (0.42 ± 0.07) $\mu\text{M/l}$ en el líquido obtenido durante los primeros 15' de perfusión y (0.41 ± 0.07) $\mu\text{M/l}$ en el líquido de perfusión recolectado de los minutos 16 al 30. Presentándose una disminución importante ($p = 0.0001$) en la concentración de malonaldehído al perfundir los bloques pulmonares en forma inmediata durante 15' (0.42 ± 0.07) $\mu\text{M/l}$ y 30' (0.41 ± 0.07) $\mu\text{M/l}$ alrededor del 68% en ambos casos cuando se compararon con la concentración basal de malonaldehído (1.33 ± 0.04) $\mu\text{M/l}$. Sin embargo no encontramos diferencias significativas entre ambas concentraciones para los dos tiempos de perfusión en este grupo de estudio ($p = 0.81$). Gráfica número 11.

En los bloques pulmonares del grupo tres, que fueron reperfundidos durante 30' después de que fueron preservados en solución de KH por 24 hrs a 4°C, se observó que la concentración de malonaldehído en el líquido de reperfusión durante los primeros 15' post-preservación prolongada fue (0.30 ± 0.02) $\mu\text{M/l}$, con una disminución del (77.50)% cuando se comparó con la concentración

de malonaldehído basal (1.33 ± 0.04) $\mu\text{M/l}$. Al continuar con la reperfusión del bloque pulmonar hasta el minuto 30, también se presentó una disminución (82.70%) en la concentración de malonaldehído (0.23 ± 0.02) $\mu\text{M/l}$ con respecto a la concentración basal (1.33 ± 0.04) $\mu\text{M/l}$, ambas disminuciones fueron estadísticamente significativas ($p = 0.0001$). No encontramos diferencias importantes al comparar entre sí las concentraciones obtenidas al reperfundir los pulmones a los minutos 15 y 30 post-24 de preservación ($p = 0.06$). Dichos resultados se muestra en la gráfica número 12.

Al comparar las concentraciones de malonaldehído entre los grupos de estudio 2 y 3 obtenidas al perfundir y al reperfundir los bloques pulmonares durante 15' respectivamente, la concentración de malonaldehído disminuyó un (28.5)% en los bloques pulmonares que fueron reperfundidos (0.30 ± 0.02) $\mu\text{M/l}$ con respecto a los pulmones que no se preservaron (0.42 ± 0.07) $\mu\text{M/l}$. Esta disminución no fue estadísticamente significativa ($p = 0.166$). Ambas cuantificaciones para los minutos 15, presentaron una disminución significativa ($p = 0.0001$), con respecto a la concentración basal de malonaldehído. Gráfica número 13.

En los líquidos de perfusión y de reperfusión recolectados del minuto 16 al 30, tanto para los bloques pulmonares preservados, como los no preservados, las concentraciones de malonaldehído fueron (0.23 ± 0.02) y (0.41 ± 0.07) $\mu\text{M/l}$ respectivamente, con una disminución del (43.00)% en la concentración de malonaldehído en el líquido de reperfusión ($p = 0.05$). Ambas cuantificaciones, presentaron una disminución significativa (82% y 69 %, $p = 0.0001$) con respecto a la concentración basal de malonaldehído. Gráfica número 14.

5.4.2.- HOMOGENEIZADO TISULAR PULMONAR

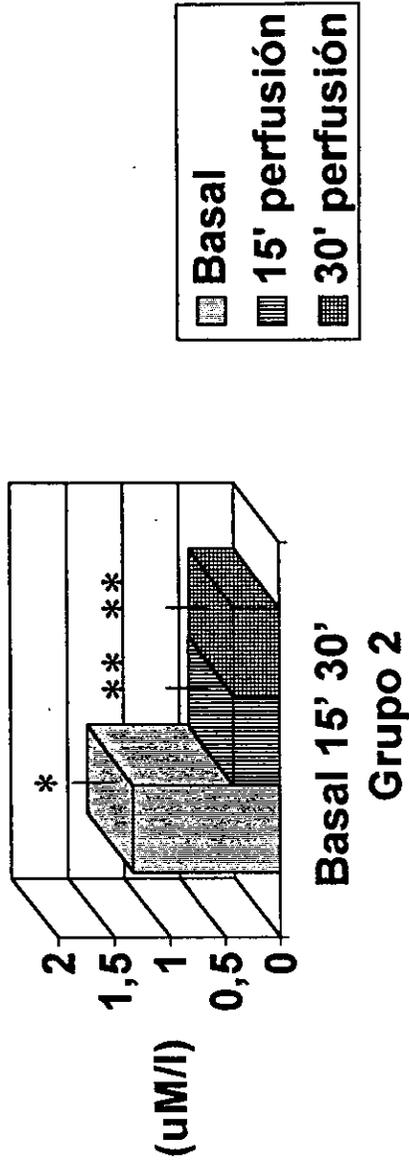
La concentración de la malonaldehído promedio \pm (error estándar) expresada en $\mu\text{M/l}$ y obtenida en los homogeneizados preparados a partir de los bloques pulmonares en los tres grupos de estudio fueron: (5.98 ± 0.26) $\mu\text{M/l}$ en el grupo de pulmones que fueron perfundidos de manera inmediata durante aproximadamente 8 minutos para exanguinarlos, considerando este valor como la

concentración de malonaldehído basal. Esta concentración fue de $(10.33 \pm 0.41) \mu\text{M/l}$ cuando los pulmones fueron perfundidos en forma continua durante 30', mostrándose un incremento (72.74)%, el cual fue estadísticamente significativo ($p=0.0001$). Cuando se comparo con la concentración basal, la concentración de malonaldehído tisular post-reperfusión fue $(6.11 \pm 0.52) \mu\text{M/l}$, sin diferencias importantes ($p = 0.83$), con respecto a la concentración basal $(5.98 \pm 0.26) \mu\text{M/l}$.

Al comparar las concentraciones de malonaldehído obtenidas entre los grupos de bloques pulmonares no preservados (perfundidos: $10.33 \pm 0.41) \mu\text{M/l}$ y los que fueron preservados (reperfundidos : $6.11 \pm 0.52) \mu\text{M/l}$, estos últimos presentaron una disminución significativa del (40.00)% ($p = 0.0001$). Gráfica número 15.

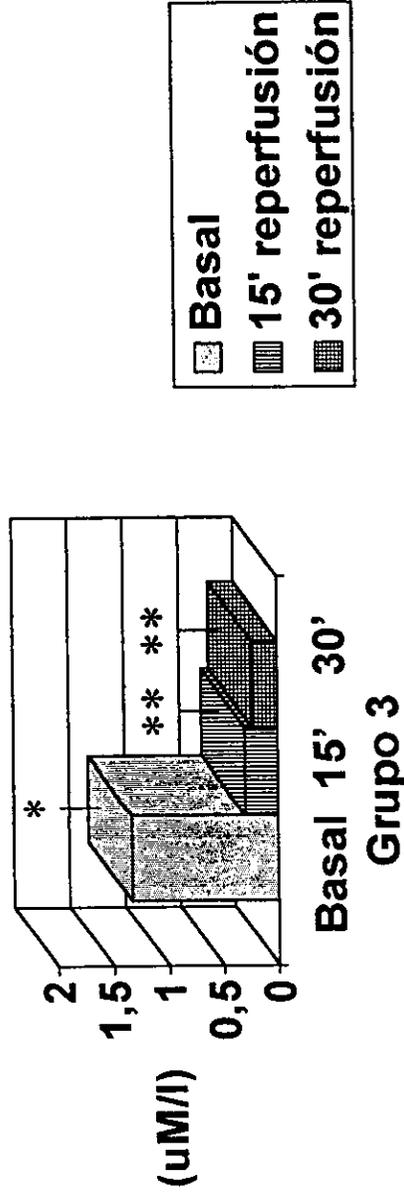
En resumen, los resultados de este proyecto muestran que la actividad de la enzima superóxido dismutasa así como las concentraciones de glutatión y malonaldehído en las soluciones de perfusión y de reperfusión pulmonar (gráfica 16), así como en el homogeneizado tisular (gráfica 17) siguen un comportamiento muy similar, ya que se observó una disminución en la actividad enzimática de SOD al igual que en las concentraciones de glutatión y malonaldehído por efecto del tiempo de perfusión y más aún por efecto de la reperfusión pulmonar aunada a una preservación prolongada, probablemente debido a las condiciones de hipotermia, ya que como se mencionó anteriormente, las actividades metabólicas y enzimáticas disminuyen al disminuir la temperatura de almacenamiento.

Peroxidación Lipídica



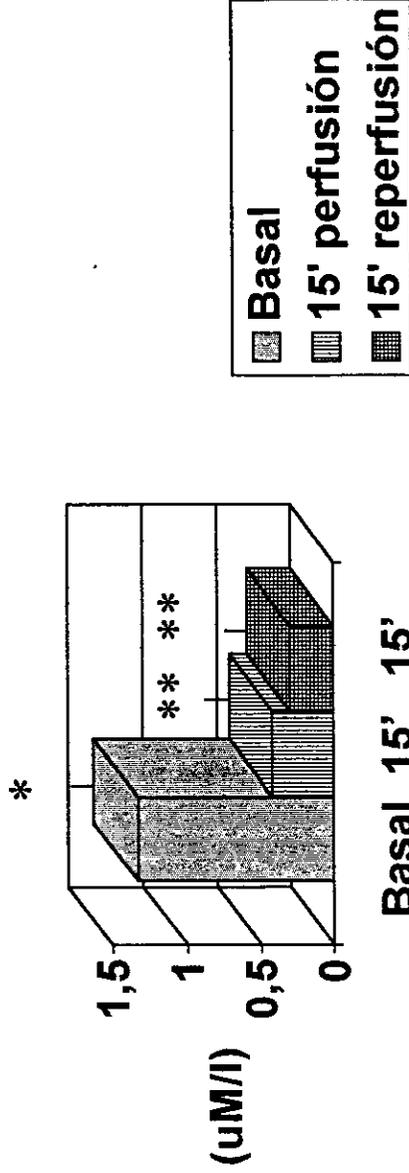
Gráfica 11.- Malonaldehído. Concentraciones promedio +/- error estándar. Basal: Perfusión inmediata 8' para exanguinación. 15' y 30' de perfusión inmediata y continua. *vs** : $p < 0.05$ (ANDEVA).

Peroxidación Lipídica



Gráfica 12.- Malonaldehido. Concentraciones promedio +/- error estándar. Basal: Perfusión inmediata 8' para exanguinación. 15' y 30' de perfusión continua post-24 horas de preservación. *vs** : $p < 0.05$ (ANDEVA)

Peroxidación Lipídica

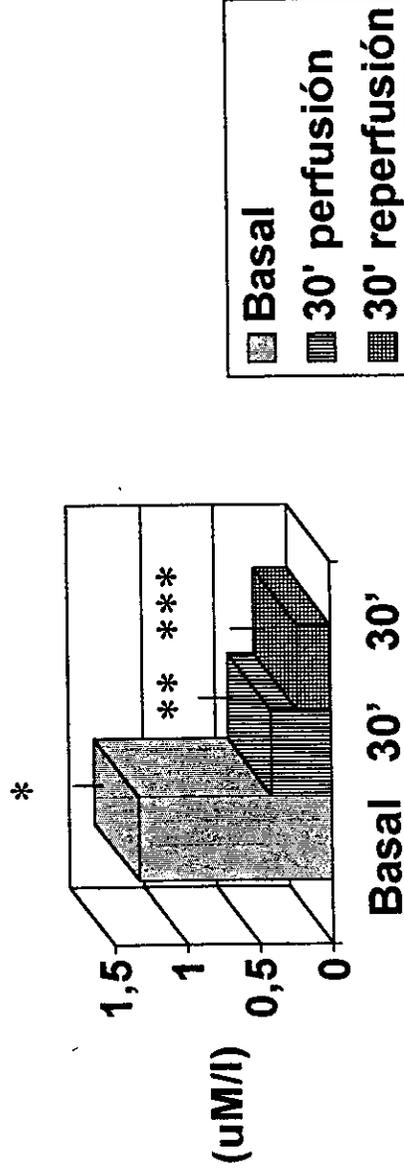


Gráfica 13- Malonaldehido. Concentraciones promedio +/- error estándar. Basal: Perfusión inmediata 8' para exanguinación. 15' perfusión inmediata y continua.

15' reperusión post-24 horas de preservación.

* vs ** : $p < 0.05$ (t-Student)

Peroxidación Lipídica



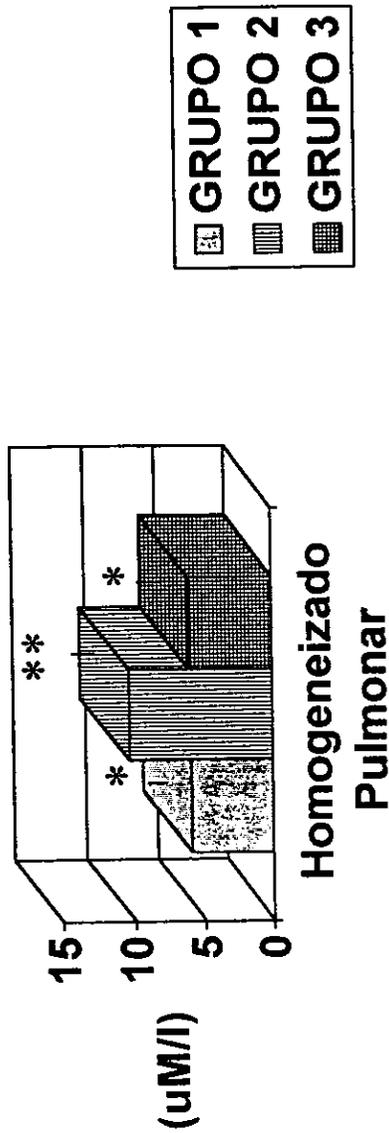
Gráfica 14.- Malonaldehido. Concentraciones promedio +/- error estándar. Basal:Perfusión inmediata 8' para exanguinación.

30' perfusión inmediata y continua.

30' reperusión post-24 horas de preservación.

* vs **, ; $p < 0.05$, ** vs *** : $p = 0.05$ (t-Student)

Peroxidación Lipídica



Gráfica 15.- Malonaldehído. Concentraciones promedio +/- error estándar. Grupo 1: Perusión inmediata 8' para exanguinación.

Grupo 2: Perusión inmediata y continúa durante 30'.

Grupo 3: 30' Reperusión post- 24 horas de preservación.

* vs ** : $p < 0.05$ (t-Student)

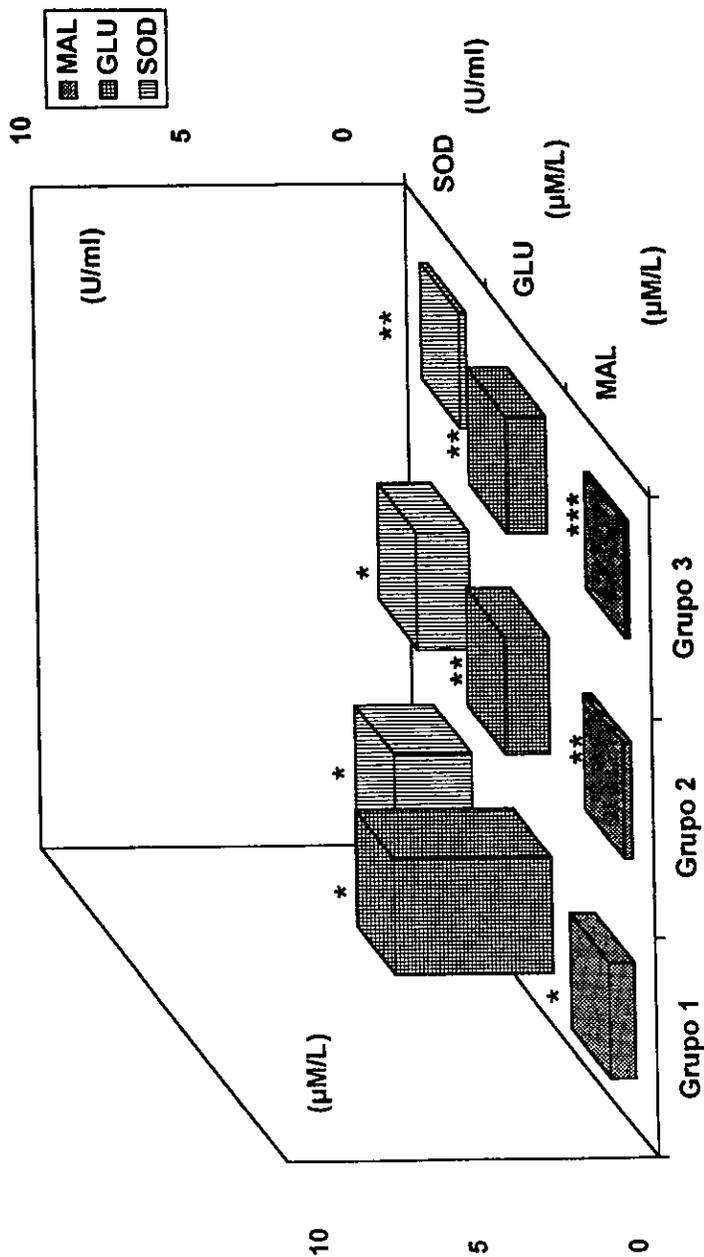


Figura 16.- Actividad de Superóxido Dismutasa (SOD) y concentraciones de Glutación (GLU) y Malonaldehído (MAL) en la solución de perfusión y reperfusion pulmonar. Grupo 1: Perfusión inmediata (8'), Grupo 2: Reperfusion (30') post-preservación prolongada. Grupo 3: Reperfusion (30') post-preservación prolongada. t-student: * vs **, ** vs ***, * vs *** : p < 0.05

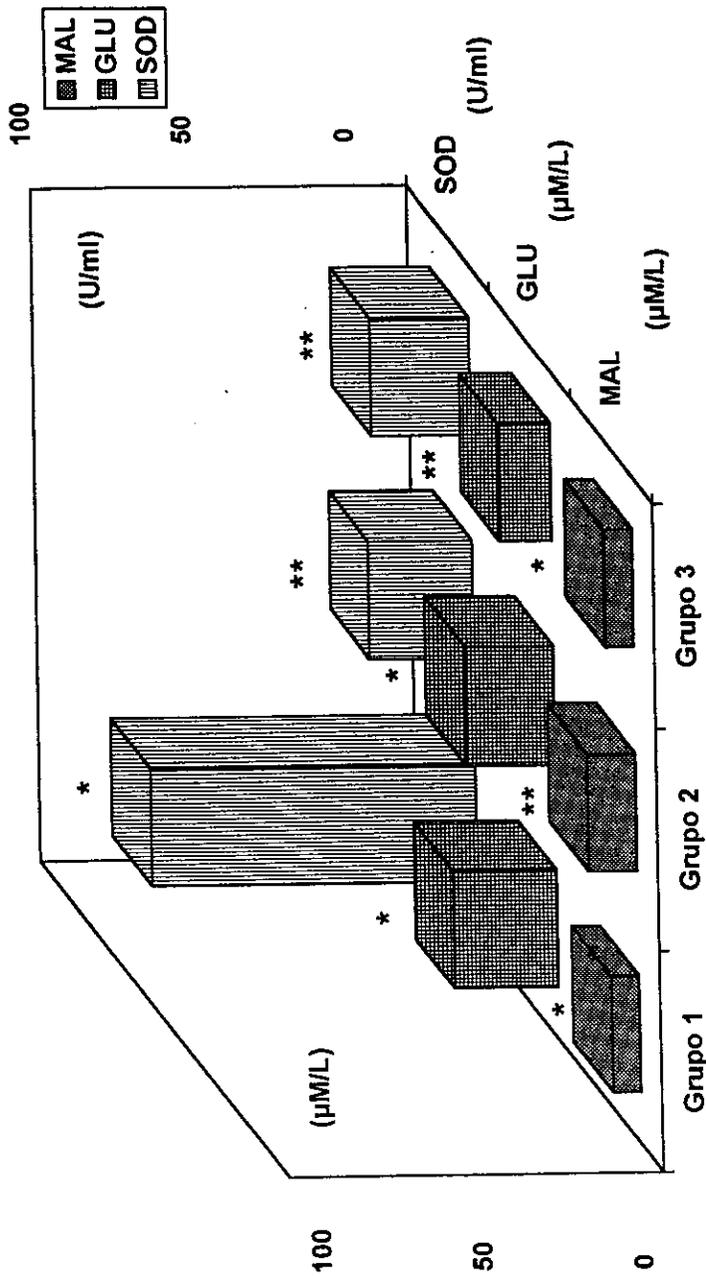


Figura 17.- Actividad de Superóxido Dismutasa (SOD) y concentraciones de Glutacion (GLU) y Malonaldehido (MAL) en homogeneizado tisular pulmonar. Grupo 1: Perfusión Inmediata (8'), Grupo 2: Perfusión inmediata (30'), Grupo 3: Reperfusión (30') post-preservación prolongada. t-student: * vs ** : p < 0.05

6.- DISCUSION

El trasplante pulmonar es una alternativa terapéutica para los pacientes con enfermedad pulmonar terminal y aunque actualmente se han superado los problemas relacionados con la técnica quirúrgica, el cuidado post-operatorio y la terapia inmunosupresora, su aplicación clínica es limitada.

El principal factor que limita la aplicación de un trasplante pulmonar es la escasez de donadores (2,41) dado que la complicación más relevante de la muerte cerebral es la formación de edema pulmonar neurogénico, además de que como consecuencia de los largos períodos de intubación traqueal y ventilación mecánica asistida a los que están sometidos los posibles donadores, es muy alta la posibilidad de encontrar una infección pulmonar activa (40,44).

Aunado a la escasez de donadores, no existe un método de preservación pulmonar adecuado a las características fisiológicas (manejo de aire e intercambio de gases) del órgano, hasta nuestros días y a pesar de innumerables investigaciones en las que se han implementado y utilizado una gran variedad de modelos experimentales de preservación pulmonar, modificando ampliamente las condiciones dadas para los métodos, técnicas y soluciones de preservación con el fin de proteger al pulmón durante la isquemia, los avances no han sido satisfactorios, ya que los resultados de estos experimentos han sido un tanto diferentes y conflictivos y con ninguno de ellos ha sido posible realizar procuraciones rutinarias distantes (20,44).

Actualmente, está bien establecido que periodos cortos de isquemia fría entre 5 y 7 horas son compatibles con una buena función pulmonar, independientemente de la técnica o solución utilizada para la preservación del pulmón a trasplantar (8,13,28,39).

A diferencia de los llamados órganos sólidos, el pulmón muestra una marcada sensibilidad a la isquemia, dada la presencia de la membrana alvéolo capilar. Durante el almacenamiento del pulmón, la solución de preservación permanece en la cámara capilar ocasionando cambios en la vasculatura y se difunde a la fase alveolar generando daño pulmonar irreversible.

Los daños ocasionados en el pulmón por efecto de la preservación, se reflejan en forma inmediata sobre la función pulmonar. La disfunción pulmonar seguida al trasplante, está bien caracterizada por una disminución en la presión parcial de oxígeno, un aumento en la resistencia vascular pulmonar y por la formación de edema. El reflejo de todo esto es una disminución en el intercambio gaseoso (7,28,30).

La técnica tradicional de preservación pulmonar consistía en la inmersión del pulmón en solución fría, sin embargo, no se obtenía un enfriamiento homogéneo del órgano, ya que el pulmón tiende a flotar en la solución (28), actualmente, el método de preservación más utilizado incluye una perfusión a través de la arteria pulmonar, con lo que se consigue un enfriamiento más uniforme.

Bajo condiciones normales, el pulmón consume carbohidratos como glucosa y mantiene la energía almacenada en forma de Adenosin-tri-Fosfato (ATP). Después de 120 a 180 minutos de isquemia a 37°C, la concentración de glucosa disminuye mucho más rápido que cualquier otro indicador bioquímico (12), y los niveles de ATP disminuyen aproximadamente en un 90% (30), lo que sugiere que el tejido pulmonar metaboliza glucosa como principal fuente de energía.

Por otro lado, las condiciones de hipotermia prolongan la preservación pulmonar, ya que se produce una disminución en la velocidad a la cual las enzimas intracelulares degradan los metabolitos necesarios para mantener la viabilidad del órgano, con lo que disminuye el consumo energético celular (4,28,30). Sin embargo, los periodos de hipotermia prolongada provocan una obstrucción vascular (28), afectan los mecanismos de transporte a través de la membrana celular e incrementan la concentración de calcio intracelular (13,28).

El acúmulo intracelular de calcio ocasiona un déficit energético importante ya que por una parte se presenta un aumento excesivo de la actividad de las ATP-etas dependientes de calcio, con lo que se acelera hasta niveles incompatibles el consumo de ATP mitocondrial además de que estos organelos pierden la capacidad de fosforilación y consecuentemente la síntesis de ATP por efecto de la calcificación (38).

Como se mencionó anteriormente, las condiciones elementales de la preservación pulmonar incluyen: mantenimiento del metabolismo celular, equilibrio electrolítico, hipotermia y perfusión a través de la arteria pulmonar.

La solución de KH cubre los requerimientos metabólicos mencionados anteriormente, es una solución electrolítica adicionada con 2000 mg de glucosa / L y no contiene calcio, por lo que en este estudio decidimos utilizarla como la solución de preservación, perfusión y reperfusión pulmonar suministrada a través de la arteria pulmonar y bajo condiciones de hipotermia.

Durante la isquemia pulmonar, el metabolismo aeróbico continúa, dada la presencia del oxígeno remanente en los alveolos. Este elemento es indispensable para el mantenimiento energético celular, ya que es necesario para oxidar la glucosa, y aunque bajo condiciones de isquemia fría, disminuye el consumo energético celular, la presencia de oxígeno molecular genera la producción de radicales libres procedentes de su utilización. Estas especies oxidantes, bajo condiciones fisiológicas normales, se neutralizan por los llamados receptores endógenos de radicales libres de oxígeno, los cuales pueden ser de tipo enzimático como la enzima superóxido dismutasa y de tipo no enzimático como el glutatión (43). Estas consideraciones indican que el daño pulmonar por la toxicidad celular generada como consecuencia del metabolismo aeróbico, depende del equilibrio entre la generación de los radicales oxidantes y los mecanismos intracelulares antioxidantes para eliminarlos (17).

Como ya se mencionó, la célula presenta defensas antioxidantes, que pueden ser de tipo enzimático o no enzimático. En los pulmones, el principal antioxidante de carácter enzimático es la enzima superóxido dismutasa (SOD). La SOD presenta actividad enzimática bajo dos formas distintas caracterizadas por el tipo de cofactor metálico, siendo éste cobre o zinc en la enzima predominantemente citoplasmática y manganeso en la enzima mitocondrial. Ambos tipos de la enzima, catalizan la dismutación del radical anión superóxido en oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno, el cual es degradado en agua y oxígeno molecular por la acción de otras enzimas antioxidantes como la catalasa o la glutatión peroxidasa (16,22,29).

Entre las defensas antioxidantes no enzimáticas que pueden actuar como receptores de los radicales oxidantes y como atenuantes de las reacciones de peroxidación lipídica inducidas por los radicales libres, se encuentra el glutatión (gamma-glutamil-cistein-glicina) el cual es un tripéptido con diferentes acciones celulares, algunas de ellas sustentadas en el grupo sulfhidrilo que posee propiedades antioxidantes; entre éstas se encuentran el evitar la autooxidación de los lípidos, los cuales son indispensables para mantener la integridad de la membrana celular, también participa como activador o cofactor enzimático de algunas enzimas incluyendo la glutatión peroxidasa, la glutatión transferasa y la tiol-transferasa, además de que interviene en el transporte de aminoácidos, y constituye un importante mecanismo celular receptor de las especies oxidantes (42). El glutatión, también interviene en el metabolismo de algunos fármacos, en el metabolismo del calcio, en el ciclo gamma-glutamil, plaquetas y funciones membranales (16). En resumen, la acción del glutatión es crucial en diferentes procesos vivos, y actúa en forma conjunta con la enzima SOD en la protección celular del daño causado por el acúmulo de oxidantes ya que ambos receptores poseen propiedades antioxidantes.

Si los mecanismos de las reacciones de oxidación celular se alteran, ya sea por deficiencia en las capacidades receptoras de la enzima superóxido dismutasa o del glutatión, o por un aumento excesivo del aporte de oxígeno, se acumulan las especies oxidantes cuyas reacciones en cadena son letales para la célula. Prácticamente, todos los componentes celulares son capaces de interactuar con los radicales libres derivados del oxígeno, variando la lesión metabólica particular según los diferentes tipos de células, por ejemplo, los lípidos que contienen ácidos grasos insaturados son particularmente sensibles a la oxidación con la consecuente formación de peróxidos lipídicos, los carbohidratos, los ácidos nucleicos y los cofactores metabólicos, como el NADH, son también sensibles a la oxidación (37).

Los fosfolípidos de las membranas celulares contienen gran cantidad de ácidos grasos polinsaturados, los cuales son muy vulnerables a la peroxidación, ya que los enlaces dobles carbono-carbono debilitan la unión carbono-hidrógeno del átomo de carbono vecino. Los cambios

químicos y configuracionales de los lípidos provocan alteraciones en la membrana, alterando las enzimas membranales, la permeabilidad celular y con ello, los sistemas de transporte. La peroxidación lipídica de la membrana celular puede considerarse como el daño más importante causado por la acción de los radicales libres (5,32).

La peroxidación lipídica como un mecanismo de daño celular, involucra la destrucción de los lípidos de la membrana con la consecuente producción de peróxidos lipídicos y de sus productos como aldehídos, entre los que se encuentra el malonaldehído que es un producto final derivado del rompimiento de los ácidos grasos y de los ésteres relacionados con este proceso. El malonaldehído puede entonces, utilizarse como un indicador del daño celular por la acción de los radicales oxidantes y a través de su cuantificación es posible evaluar la peroxidación lipídica (26,30).

El resultado final consecuencia de todas estas interacciones ocasionan daño celular irreversible y con ello, muerte tisular.

Los daños ocasionados en el pulmón por efecto de la preservación, se reflejan en forma inmediata sobre la función pulmonar. La disfunción pulmonar seguida al trasplante, está bien caracterizada por una disminución en la presión parcial de oxígeno, un aumento en la resistencia vascular pulmonar y por la formación de edema. El reflejo de todo esto es una disminución en el intercambio gaseoso (7, 28,30).

La magnitud del daño ocasionado por la isquemia asociada a la procuración pulmonar, no puede evaluarse sino hasta que ocurre la reperfusión. La fase de isquemia-reperfusión es un fenómeno complicado que involucra la producción de radicales libres (10,17,43).

Utilizando un modelo experimental murino de procuración pulmonar que incluyó perfusión y reperfusión a través de la arteria pulmonar con solución de Krebs-Henseleit así como una preservación prolongada bajo condiciones de hipotermia, en esta investigación, decidimos evaluar la actividad de la enzima superóxido dismutasa y las concentraciones de glutatión y malonaldehído tanto en las soluciones de perfusión y de reperfusión pulmonar, como en el homogeneizado tisular de pulmón procedentes de tres grupos de bloques pulmonares que fueron: a) perfundidos en forma

inmediata y continua unicamente durante el tiempo necesario para exanguinarlos, b) perfundidos en forma inmediata y continua durante 30' y c) perfundidos en forma inmediata y continua unicamente durante el tiempo necesario para exanguinarlos, concluida la exanguinación, los bloques pulmonares fueron preservados durante 24 horas a 4°C, y transcurrido el tiempo de preservación, fueron reperfundidos durante 30' bajo las mismas condiciones dadas para la perfusión.

Entre los resultados de este proyecto encontramos que la actividad de la enzima superóxido dismutasa así como las concentraciones de glutatión y malonaldehído en las soluciones de perfusión y de reperfusión pulmonar siguen un comportamiento muy similar, ya que se observó una disminución en la actividad enzimática de SOD al igual que en las concentraciones de glutatión y malonaldehído por efecto del tiempo de perfusión y más aún por efecto de la reperfusión pulmonar aunada a una preservación prolongada tal y como se muestra en la gráfica 16, probablemente debido a las condiciones de hipotermia, ya que como se mencionó anteriormente, las actividades metabólicas y enzimáticas disminuyen al disminuir la temperatura de almacenamiento. Por otra parte, las muestras de la solución de perfusión procedentes de los bloques que fueron perfundidos unicamente durante el tiempo necesario para exanguinarlos (grupo 1), contenían mayor concentración de oxígeno molecular por aporte sanguíneo, al concluir con la exanguinación de los pulmones y continuar con las perfusiones en forma continua durante 30' (grupo 2), disminuyó la presencia de oxígeno molecular por aporte sanguíneo conforme se fue incrementando el tiempo de perfusión. En los bloques pulmonares que fueron preservados durante 24 horas a 4°C y reperfundidos durante 30' (grupo 3), se presentó una disminución mas acentuada tanto en la actividad de SOD como en las concentraciones de glutatión y malonaldehído con respecto a los grupos 1 y 2. Al disminuir el aporte de oxígeno molecular por vía sanguínea (debido al tiempo de perfusión, al periodo de isquemia prolongada y a la reperfusión con solución de KH), también la generación de radicales oxidantes se ve afectada, por lo que la concentración de malonaldehído generado a través de la peroxidación lipídica se ve también disminuida.

En los homogeneizados pulmonares, la actividad de la enzima SOD así como las concentraciones de glutatión y de malonaldehído obtenidas fueron mayores que las detectadas en los líquidos de perfusión y de reperfusión pulmonar. Sin embargo, estas cuantificaciones muestran el mismo comportamiento observado en los líquidos de perfusión y de reperfusión pulmonar, con una marcada disminución tanto en la actividad enzimática como en las concentraciones evaluadas al incrementar el tiempo de perfusión así como por el efecto de la preservación prolongada aunada a la reperfusión pulmonar, ya que tanto la enzima superóxido dismutasa y el glutatión actúan en respuesta a la generación y acúmulo de radicales oxidantes cuya producción parece ser mayor al exanguinar los bloques pulmonares y disminuir conforme transcurre la perfusión y la reperfusión pulmonar en las que se elimina por completo el aporte de oxígeno molecular y con ello disminuye la generación de los radicales oxidantes con la consecuente disminución en la concentración de malonaldehído tal y como ya se mencionó. Estos resultados se muestran en la gráfica 17.

En nuestro experimento encontramos que la concentración de malonaldehído tanto en las soluciones de perfusión y de reperfusión como en los homogeneizados, disminuye por efecto del tiempo de perfusión, del periodo de isquemia y por el tiempo de reperfusión, con lo que se interpreta que disminuye el daño por peroxidación lipídica, lo que pudiera explicarse por las condiciones experimentales establecidas en este estudio, ya que los bloques pulmonares no fueron perfundidos ni reperfundidos con sangre además de que la solución de perfusión y de reperfusión pulmonar, no estaba oxigenada, así mismo, los animales tampoco fueron ventilados con oxígeno al 100%, tratando con todo esto, de mantener las condiciones ambientales de la fracción inspirada de oxígeno al 21% y con ello evitar un aporte extra de oxígeno molecular, lo que propiciaría un incremento en la producción de radicales libres que se vería reflejado en un aumento en la concentración de malonaldehído por efecto de la peroxidación lipídica.

La importancia clínica de los resultados experimentales obtenidos en este campo de la investigación, ha agenerado el uso de algunos receptores de radicales libres de oxígeno (superóxido dismutasa, glutatión, alopurinol, manitol, etc. adicionados a la solución de perfusión) con el fin de

disminuir el daño cardiopulmonar generado por acción de las especies oxidantes, además de que como ya se mencionó, la peroxidación lipídica constituye un parámetro indicador importante del daño tisular consecuente.

7.- CONCLUSIONES

Utilizando un modelo experimental murino de procuración pulmonar que incluyó perfusión y reperfusión a través de la arteria pulmonar con solución de Krebs-Henseleit así como una preservación prolongada bajo condiciones de hipotermia, se concluye:

1.- La actividad enzimática de la enzima superóxido dismutasa y las concentraciones de malonaldehído y de glutatión fueron menores en las soluciones de perfusión y de reperfusión pulmonar y mayores en los homogeneizados tisulares pulmonares.

2.- Tanto en las muestras procedentes de las soluciones de perfusión y de reperfusión pulmonar como en los homogeneizados tisulares, la actividad enzimática de la SOD y las concentraciones de glutatión y malonaldehído fueron mayores en las muestras procedentes de los bloques pulmonares que fueron perfundidos únicamente durante el tiempo necesario para exanguinarlos, conforme avanzó el tiempo de perfusión estas disminuyeron, presentándose los valores mas bajos en los bloques pulmonares que fueron preservados y reperfundidos.

3.- Al parecer, bajo las condiciones experimentales dadas en esta investigación, la actividad enzimática de la enzima SOD y las concentraciones de glutatión y de malonaldehído disminuyen al eliminar el aporte sanguíneo, al incrementar el tiempo de perfusión pulmonar y por efecto de una preservación prolongada aunada a una reperfusión realizada con solución Krebs-Henseleit.

8.- REFERENCIAS

1. - Baile, E.M., Jasso-Victoria, R., Sotres-Vega, A., Selman, M., Villalba, J., Arreola, J., Olmos, R., Pare, P., and Santillán-Doherty, P.: Measurement of tracheal and bronchial blood after lung autograft in dogs with and without omentopexy. *Transplantation Proceedings*. 24:2024-2029.1992.
2. - Baldwin, J.C., Frist, W.H., Starkey, T.D., Harjula, A., Starnes, V.A., Stinson, E.B., Oyer, P.E. and Shumway, N.E.: Distant graft procurement for combined heart and lung transplantation using pulmonary artery flush and simple topical hypothermia for graft preservation. *Ann Thorac Surg*. 43:670-673.1987.
3. - Bando, K., Teramoto, S., Tago, M., Seno, S., Teraoka, H., Murakami, T. and Senoo, Y.: Core-cooling, heart perfusion, lung immersion technique provides succesful cardiopulmonary preservation for heart-lung transplantation. *Ann thorac Surg*. 46:625-630.1988.
4. - Belzer, F.O. and Southard, J.H.: Principles of solid organ preservation by cold storage. *Transplantation*. 45:673-676.1988.
5. - B. Essman, Walter., K. Das. Dipak K. Oxigen Radicals: Sistemic events and disease process. Dipak K. 1ª. ISBN. Swerzerland.N. 196 pgs. 1990.
6. - Calva E., Mujica A., Bisteni A., and Sodi Pallares D. Oxidative phosphorylation in cardiac infarct: Effect of glucose-KCl- insuline solution. *American J. Phisiol*. 2: 371-375.1965.
7. - Conte, J., Katz, N., Wallace, R. and Foegh, M.: Long term lung preservation with the PAF antagonist BN 52021. *Transplantation*. 51:1152-1156.1991.
8. - Cooper, J.D., Egan, T.M. and Kaiser, L.R.: Lung transplantation. Current problems in surgery. Board. Chicago, Illinois. U.S.A. 1989.
9. - Cott R. : Active transport of sodium across epithelial monolayers. In Efron Richard and Chang H. (Ed.), *Fluid and solute transport in airspaces of the lung*, Dekker Inc., New York, 101-118. 1994.
- 10.- Derom, F., Barbier, F. and Ringoim, S.: Ten month survival after lung homotransplantation in man. *J Thorac and Cardiovasc Surg*. 61:835-846.1971.
- 11.- Doring U. et al.: Lost ischemic recovery of of the lung-biochemical and morphological studies of long term preserved lung. *Transplantation proceedings*. 23(5):2347.1991.
- 12.- Hachida, M., Hoon, D. and Morton, D.: A comparison of solutions for lung preservation using pulmonary alveolar type II cell viability. *Ann Thorac Surg*. 45:643-646.1988.
- 13.- Hachida, M. and Morton, D.: The protection of ischemic lung with verapamil and hydralazine. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 95:178-183.1988.
- 14.- Hachida, M. and Morton D.: A new solution (UCLA formula) for lung preservation.: *J Thorac Cardiovasc Surg*. 97:513-520.1989.
- 15.- Hardesty, R.L. and Griffith, B.P.: Autoperfusion of the heart and lung for preservation during distant procurement. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 93:11-18.1987.

- 16.- Harper, Harold Anthony. Bioquímica de Harper. 9 edición. ISBN. México. 775 pgs. 1984.
- 17.- Hirata T. et al.: Effects of trehalosa in preservation of canine lung for transplant. *Thorac. Cardiovasc. Surg.* 41: 59-63.1993.
- 18.- Hiroshi D. Akihidem et al.: Evaluación del metabolismo pulmonar durante la preservación 24 hrs en perros. *J. of thoracic and Cardiovasc. Surg.* 105 (3): 480-491.1993.
- 19.- Jones, M.T., Heshieh, C., Yoshikawa, K., Patterson, G.A. and Cooper, J.D.: A new model for assesment of lung preservation. : *J Thoracic Surg.* 96:608-614.1988.
- 20.- Keshaujee, S.H., Yamazaki, F., Cardoso, P.F., Mc Ritchie, D.I., Patterson, G.A. and Cooper, J.D.: A method for save twelve-hour pulmonary preservation. *J. Thorac Cardiovasc Surg.* 98:529-534.1989.
- 21.- Kim, J., and Crandall, E.: Specialized alveolar epithelial transport process. Fluid and solute transport in airspaces of the lung. Dekker Inc., New York. 219-39. 1994.
- 22.- Lehninger Albert. Bioquímica: Las bases moleculares de la estructura celular. 2da edición. Barcelona. Omega. pag 1117. 1985.
- 23.- Levitzky G. Michael. Fisiología pulmonar. 2da edición. Noriega Editores. México. pag 337. 1997.
- 24.- Locke, T., Hopper, T., Flecknell, P. and Mc Gregor, G.: Preservation of the lung. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 96:786-795.1988.
- 25.- Lossniitzer K., Pfennissdorf G., and Brauer H. Miocardio, vasos sanguíneos, calcio. Knoll A.G. Ludwischafen. Munchen. 1983.
- 26.- Neil A. Christie and Thomas K. Wadell. Preservación Pulmonar. *Chest Surgery Clinics of North America.* 3(1). 29-47. 1993.
- 27.- Nellems, J.M., Rebeck, A.S. and Cooper, J.D.: Human lung transplant. *Chest.* 78:569-573.1980.
- 28.- Novick, R.L. Menkis, A.H. and Mc Keinze, F.: New trends in lung preservation:A collective review. *J Heart and Lung Transplantation.* 11:377-392.1992.
- 29.- Oury Tim D., Brian J. Day and Jones D. Crapo. Extracelular Superoxide. A regulator of Nitric Oxide Bioavailability. *Laboratory Investigation.* 75(5). 617. 1996.
- 30.- Patterson, A. and Cooper, J.: Lung Transplantation. *Chest Surg Clinics of North America.* 3:29-48.1993.
- 31.- Paull E.D. Blair A.K., Kron J. E. Reperfusion injury in the Lung Preserved for 24 hours. *Ann Thorac Surg .,* 47: 187-192. 1989.
- 32.- Repine E. Jhon. Cherosis C. John. et al. Pilmonary Oxigen Tixicity and Iscahemia-Reperfusion Injury a Mechanism in Common Involving Xantine oxidase and Neutrophils. *Am. Rev. Respir. Dis.* 136: 483-485.1987.
- 33.- Sabido F. Milazzo V. et al. Skeletal muscle isq-rep injury a review of endothelial cell-leucocyte interactions.*J. of investigature surgery.* Vol 7 (1): 39-47. 1994.

- 34.- Santillán-Doherty, P., Jasso, R., Sotres, A. Grupo de trasplante pulmonar del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.: Trasplante pulmonar. Rev INER. 3:148-153. 1990.
- 35.- Santillán-Doherty, P.: Transplante unilateral de pulmón en un caso de fibrosis pulmonar terminal. Rev Invest Clin. 42:127-134.1990.
- 36.- Santillán-Doherty, P., Jasso-Victoria, R., Diliz, H., .: Lung procurement in Mexico. Transplantation Proceedings. 25:3139-3140.1993.
- 37.- Timothy C. Rodell, John C. Cheronis.: Xantine Oxidase (XO) Mediates Elastase Induced Injury to Isolated Lung and Endotelium. Appl. Physiol 63(5): 2159-2163. 1987.
- 38.-Toledo, L. and Condie, R.: Lung transplantation. Hypothermic storage for 24 hours in a colloid hyperosmolar solution. J Thorac Cardiovasc Surg. 76:846-852.1978.
- 39.- Veith, F.J., Crane, R., Torres, M., Colon, I., Jack, W., Hagstrom, C., Pinsker, K. and Koemer, S.K.: Effective preservation and transportation of lung transplant. J Thorac Cardiovasc Surg. 72:97-105.1976.
- 40.- Wang, L.S., Yoshikawa, K., Miyoshi, S., Nakamoto, K., Hshie, C., Yamazaky, F., Guerreiro, P., Schaeters, H., Brito, J., Keshavjee, S., Paterson, A. and Cooper, J.: The effect of ischemic time and temperature on lung preservation in a simple exvivo rabbit model used for functional assesment. J Thorac Cardiovasc Surg. 98:333-342.1989.
- 41.- Yamazaki, F., Yokomise, H., Keshavjee, S.H., Miyoshi, S., Cardoso, P.F., Slutsky, A.S. and Patterson, G.A.: The superiority of an extracellular fluid solution over Eurocollins solution for pulmonary preservation. Transplantation. 49:690-694.1990.
- 42.- Zagoya Hicks. Bioquímica . 2a. Interamericana. México. 720 pgs. 1995.
- 43.- Zarco G. Pedro. Bases Moleculares de la Cardiología Clínica. 1a. Panamericana. España. 374 pgs. 1996.
- 44.- Zenati, M., Dowling, R.D., Armitage, J.M., Kormos, R.L., Dummer, S., Hardesty, R.L. and Griffith, B.P.: Organ procurement for pulmonary transplantation. Ann Thorac Surg. 48:882-886.1989.
- 45.- Reglamento de la Ley Federal de Salud en Materia de Investigación para la Salud. Título séptimo, capítulo único, Secretaría de Salud, México, 1987.
- 46.- Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. U.S.A. Department of Health and Human Services., Public Health Service., National Institutes of Health Rev 1985.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**