



Universidad Nacional de Rosario
Facultad de Ciencias Bioquímicas y
Farmacéuticas

Tesis de doctorado

“El sulfuro de hidrógeno en la preservación hipotérmica
de hígados de rata como estrategia de rescate de órganos
de donantes a corazón parado”.

Presentada por la Lic. Cecilia Lucía Balaban

Director: Dr. Edgardo E. Guibert

Rosario – Argentina

2013

**El sulfuro de hidrógeno en la preservación hipotérmica de hígados de
rata como estrategia de rescate de órganos de donantes a corazón
parado.**

Cecilia Lucía Balaban

Licenciada en Biotecnología, UNR.

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Centro Binacional (Argentina-Italia) de Investigaciones en Criobiología Clínica y Aplicada (CAIC), UNR, durante el período comprendido entre el 1 de abril de 2009 y el 1 de diciembre de 2013, bajo la dirección del Dr. Edgardo E. Guibert.

Director Dr. Edgardo E. Guibert.....

Jurado.....

Jurado.....

Jurado.....

Defendida.....

Los resultados y experiencia obtenidos durante el desarrollo de este trabajo de Tesis Doctoral fueron dados a conocer en distintas presentaciones en Congresos Científicos y publicaciones, como se detalla a continuación:

PUBLICACIONES:

- **Delivery of the bioactive gas H₂S during cold preservation of rat liver. Effects on hepatic function in an ex-vivo model (2011).** Balaban CL, Rodríguez JV, Guibert EE. *Artificial Organs*, **35(5)**:508–515. DOI: 10.1111/j.1525-1594.2011.01256.x.
- **Organ preservation: current Concepts and New Strategies for the Next Decade (2011).** Guibert EE, Petrenko AY, Balaban CL, Somov AY, Rodríguez JV, Fuller BJ. *Transfus Med Hemother*, **38**:125-142. DOI: 10.1159/000327033.
- **Biopreservation of liver cells: current concepts on hypothermic preservation, cryopreservation, and vitrification (2013).** Fuller BJ, Petrenko AY, Rodríguez JV, Somov AY, Balaban CL, Guibert EE. *Cryo Letters*, **34(4)**:432-52.
- **Hypothermic Machine Perfusion versus Cold Storage on the rescuing of livers from non-heart beating donor rats (2013).** Carnevale EM, Balaban CL, Guibert EE, Bottai H, Rodríguez JV. *Artificial Organs*, **37(11)**:985–991.

CONGRESOS:

- **3^{er} Taller de Órganos Artificiales, Biomateriales e Ingeniería de Tejidos, OBI 2013.** Organizado por la Sociedad Latino Americana de Biomateriales, Ingeniería de Tejidos y Órganos Artificiales SLABO. Viña del Mar, Chile. Septiembre 2013. Trabajo aceptado para la presentación en modalidad POSTER: “Graft protection mediated by sodium disulfide during hypothermic preservation in a non-heart beating donor model in rat.” BALABAN CL, Espejo MS, Rodríguez JV, and Guibert EE.
- **VI Jornada de Ciencia y Tecnología, 2012.** Organizado por Secretaría de Ciencia y Tecnología UNR. Sede de Gobierno de la UNR, Rosario. Noviembre 2012. **Presentación de poster:** “Recuperación de hígados de rata donados a corazón no batiente mediada por disulfuro de dialilo durante la preservación hipotérmica”. BALABAN CL, Rodríguez JV, Guibert EE. Y “Rescate de hígados provenientes de ratas donantes a corazón no batiente (NHBD). Perfusion hipotérmica vs. preservación estática”. Carnevale M, Méjico G, BALABAN CL, Guibert EE, Bottai H, Rodríguez JV.
- **VII Congreso Latino Americano de Órganos Artificiales y Biomateriales, COLAOB 2012.** Organizado por la Sociedad Latino Americana de Biomateriales, Ingeniería de

- Tejidos y Órganos Artificiales SLABO. Natal, Rio Grande do Norte, Brasil, Agosto 2012. **presentación de poster:** "Graft recovery mediated by diallyl disulfide during cold storage in a non-heart beating rat liver donation model". BALABAN CL, Rodríguez JV, Guibert EE. **Trabajo extendido 07-049.docx publicado** en <http://www.colaob.com.br/anais>. **Comunicación oral:** "Hypothermic Machine Perfusion versus Cold Storage on the rescuing of livers from non-heart beating donor rats". Carnevale EM, BALABAN CL, Guibert EE, Bottai H, Rodríguez JV. **Trabajo extendido 10-012.doc publicado** en <http://www.colaob.com.br/anais>.
- **49th Annual Meeting of the Society for Cryobiology.** Organizado por el Centro Binacional (Argentina-Italia) de Investigaciones en Criobiología Clínica y Aplicada (CAIC) – UNR. Rosario, Argentina, Junio 3-6, 2012. Miembro del comité organizador local y participante. **Comunicación oral:** "Tissue protection mediated by diallyl disulfide in rat liver hypothermic preservation". BALABAN CL, Méjico G, Rodríguez JV, Guibert EE. **Resumen publicado en: Cryobiology, Dic 2012, 65(3):350. Presentaciones poster:** "Evaluation of a new solution for Hypothermic Machine Perfusion (HMP) of the liver. I - Composition and physicochemical parameters". Pascucci F, Carnevale ME, BALABAN CL, Mamprin ME, Guibert EE, Rodríguez JV. **Resumen publicado en: Cryobiology, dec 2012, 65(3):357** y "Evaluation of a new solution for Hypothermic Machine Perfusion (HMP) of the liver. II - A study in the perfused rat liver *in vitro*". Carnevale ME, BALABAN CL, Guibert EE, Bottai H, Rodríguez JV. **Resumen publicado en: Cryobiology, Dic 2012, 65(3):357.**
- **V Jornada de Ciencia y Tecnología, 2011.** Organizado por Secretaría de Ciencia y Tecnología UNR. Sede de Gobierno de la UNR, Rosario. Noviembre 2011. **Presentación de poster y publicación de trabajo extendido:** "Efectos de un compuesto dador de H₂S derivado del ajo en la preservación hipotérmica de hígados de rata. BALABAN CL, Rodríguez JV, Guibert EE. V Jornadas de Ciencia y Tecnología 2011: Divulgación de la producción científica y tecnológica de la UNR. UNR editora. ISBN 978-950-673-987-4, pp 44-46.
- **VI Congreso Latino Americano de Órganos Artificiales y Biomateriales, COLAOB 2010.** Organizado por la Sociedad Latino Americana de Biomateriales, Ingeniería de Tejidos y Órganos Artificiales SLABO. Gramado, Rio Grande do Sul, Brasil, Agosto 2010. **Presentación de Poster:** "Delivery of the bioactive gas H₂S during cold preservation of rat liver. Effects on hepatic function in an ex-vivo model" BALABAN,

- CL, Rodríguez, JV, Guibert, EE trabajo completo en: <http://www.slabo.org.br/site/downloads/colaob2010.rar>.
- **Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Clínica.** Mar del Plata, Noviembre 2009. **Presentación de Poster:** “Efectos de los gases bioactivos en la preservación hipotérmica de hígados de rata”. BALABAN C, Rodríguez J, Fuller B, Mann B, Motterlini R, Guibert E. Resumen publicado en la revista MEDICINA, Buenos Aires, VOL. 69 SUPL. I -2009.
- **3^{er} Taller de Criobiología Aplicada a las Ciencias Biomédicas.** Organizado por Centro Binacional (Argentina – Italia) de Investigaciones en Criobiología Clínica y Aplicada (CAIC), UNR. Bolsa de Comercio Italiana de Rosario, Mayo 2009. **Presentación de Poster:** “Effects of bioactive gases on rat liver cold preservation” BALABAN CECILIA; Navone Laura, Rodríguez Joaquín, Fuller Barry, Mann Brian, Motterlini Roberto and Guibert Edgardo.

AGRADECIMIENTOS

Mi jefe fue testigo y consejero de mis múltiples crisis, se hizo amigo de todas mis personalidades, me acompañó y me dejó libre cuando me hizo falta. Con mi jefe, la confianza y el trabajo en equipo fueron una lección y una constante. Con él pude ser sincera, compartir mis preocupaciones y también relajarme (muchas veces siguiendo su consejo). Por eso quiero agradecer a Edgardo, por ser el jefe que necesité.

Joaquín en pocas palabras es inspiración, perseverancia, trabajo y buen humor. Me encontré muchas veces disfrutando de sus palabras e identificándome con su pensamiento respecto de la forma de hacer ciencia y también otras filosofías de vida. Joaquín es un personaje clave en mi historia científica pero el mejor regalo que me hizo fue su amistad.

Gracias infinitas para mis amigas y compañeras de trabajo Valeria y Celeste, quienes me honraron con sus opiniones y consejos, aportaron calidez y alegría a mis recuerdos del CAIC y compartieron conmigo su experiencia profesional y personal, enriqueciéndome de la manera más dulce. Las admiro mucho y les deseo, de todo corazón, lo mejor de esta vida para ustedes y sus hermosas familias.

Los *crioniños* fueron mi grupo de apoyo, un refugio para relajarse y el recuerdo feliz de esos días para el olvido. Cele, Guadi, Leo, Mati, Meli y Pau volvieron a hacerme sentir parte de un grupo y me mostraron junto a Cami y Sofi lo lindo de poder sonreír en el trabajo, todos los días.

Mis amigas licenciadas, mujeres que admiro profundamente y que incondicionalmente estuvieron para sostenerme, para retarme, para divertirme y para inspirarme. Gracias por todas las sesiones de terapia, gracias por crecer conmigo, gracias por prestarme sus ojos para verme mejor cuando dudé de mí. Todo lo que las apasiona las vuelve únicas y bellas, dignas de un futuro brillante en cualquier cosa que emprendan. Lo mejor para ustedes, responsables por hacer de mí, una loca más feliz.

Mi familia es mi bien máspreciado, el lugar donde nada puede lastimarme y soy la persona que siempre quise ser. Me dieron todo lo que soy y la fe para creer que puedo ser más y es para compartir con ellos, todo lo que me hace feliz y todo lo que me ilusiona. Gracias a mis padres y mi hermano, por ser los mejores amigos que tengo en la vida. Gracias a mi tía y primos por el regalo de su amor constante y la dulzura inmensa de Alfonsina, Delfi, Francisco y

Luz. Gracias eternas para mi abuela, mi profesora, que aun me llena de ternura y emoción desde cada recuerdo que me dejó.

A la persona que me cuida y me quiere de la forma más sincera y comprometida, al amor de mi vida y compañero de viaje, quiero darle las gracias por esperar siempre lo mejor de mí, alentándome y ayudándome para cumplir mis objetivos y mis sueños. Gracias Esteban, por construir conmigo el proyecto más lindo: el de nuestra vida juntos.

Cuando el hígado era la casa del alma

*En otros tiempos, mucho antes de que nacieran los cardiólogos y los letristas de boleros,
las revistas del corazón bien pudieron llamarse revistas del hígado.*

El hígado era el centro de todo.

Según la tradición china, el hígado era el lugar donde el alma dormía y soñaba.

*En Egipto, la custodia del hígado estaba a cargo de Amset, hijo del dios Horus, y en Roma
quien se ocupaba de cuidarlo era nada menos que Júpiter, el padre de los dioses.*

Los etruscos leían el destino en el hígado de los animales que sacrificaban.

*Según la tradición griega, Prometeo robó para nosotros, los humanos, el fuego de los
dioses. Y Zeus, el mandamás del Olimpo, lo castigó encadenándolo a una roca, donde un buitre
le comía el hígado cada día. No el corazón: el hígado. Pero cada día el hígado de Prometeo
renacía, y ésa era la prueba de su inmortalidad.*

Eduardo Galeano.

Espejos. Una historia casi universal.

ÍNDICE

ÍNDICE.....	1
ABREVIATURAS.....	3
ANGLICISMOS.....	4
RESUMEN.....	5
1. INTRODUCCIÓN.....	7
1.1 El hígado y sus funciones.....	8
1.2 Trasplante hepático.....	10
1.2.1 Definición e indicaciones.....	10
1.2.2 Evolución histórica.....	11
1.2.3 Procuración y preservación.....	11
1.3 Problemática asociada a la terapia de trasplante.....	16
1.3.1 Víctima de su propio éxito.....	16
1.3.2 Donantes a corazón no batiente (DCNB).....	16
1.3.3 Estrategias para el reacondicionamiento.....	18
1.4 El Sulfuro de hidrógeno.....	18
1.4.1 Miembro de la familia de los gasotransmisores.....	18
1.4.2 Funciones biológicas del H ₂ S.....	20
1.4.3 Suministro exógeno de H ₂ S.....	23
1.5 Hipótesis de trabajo.....	24
2. OBJETIVOS.....	25
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
3.1 Reactivos y equipamiento.....	28
3.2 Animales.....	30
3.3 Procedimientos quirúrgicos.....	30
3.3.1 Ablación a corazón batiente “donante clásico”.....	30
3.3.2 Ablación a corazón parado “donante marginal”.....	31
3.4 Preservación hipotérmica estática.....	31
3.5 Soluciones de preservación en frío.....	32
3.5.1 Solución de la Universidad de Wisconsin (UW) VIASPAN®.....	32
3.5.2 Solución Histidina, Triptófano y Cetoglutarato (HTK) CUSTODIOL®.....	32
3.5.3 Dadores de sulfuro de hidrógeno (H ₂ S).....	33
3.6 Sistema de perfusión de hígado de rata aislado (IPRL).....	34
3.7 Parámetros estudiados durante la reperfusión.....	36
3.7.1 Resistencia intrahepática (RI).....	36
3.7.2 Producción de bilis (PB).....	36

3.7.3	Consumo de oxígeno (ConsO ₂).....	36
3.7.4	Síntesis de urea.	37
3.7.5	Excreción de Bromosulfoftaleína (%BSF).	37
3.7.6	Conjugación de BSF a GSH.....	38
3.7.7	Liberación de enzimas intracelulares (LDH, AST y ALT).....	38
3.8	Contenido de glucógeno.	39
3.9	Contenido de Malondialdehído.....	39
3.10	Contenido de Glutación total y relación GSHreducido/GSHoxidado.	41
3.11	Actividad enzimática antioxidante.	42
3.11.1	Actividad Catalasa.	42
3.11.2	Actividad Superóxido Dismutasa.....	43
3.12	Estudios de expresión génica.	44
3.12.1	Extracción de ARN.	44
3.12.2	Integridad y concentración del ARN.....	45
3.12.3	Retrotranscripción y PCR en tiempo real.	45
3.13	Estudios histológicos.	46
3.14	Soluciones y buffers	47
3.15	Análisis estadístico.	49
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	50
4.1	El disulfuro de dialilo (DADS) en la preservación hipotérmica.....	51
4.1.1	Experiencias con la solución de la Universidad de Wisconsin (UW).	51
4.1.2	Experiencias con la solución HTK.	58
4.2	Modelo de donante a corazón parado en la rata.....	65
4.3	El H ₂ S en el rescate de hígados de donantes a corazón parado.	71
5.	CONCLUSIONES FINALES.	89
6.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	93

ABREVIATURAS.

- **ABS:** absorbancia
- **ALT:** Alanina Transaminasa
- **AST:** Aspartato transaminasa
- **ATP:** Adenina Trifosfato
- **Bcl-2:** Linfoma de célula B-2
- **BSF:** Bromosulfoftaleína
- **CAT:** Catalasa
- **C_t:** número de ciclos a partir del cual se supera la línea del umbral de la fluorescencia.
- **DADS:** disulfuro de dialilo
- **DATS:** trisulfuro de dialilo
- **EROs:** Especies reactivas del oxígeno
- **GSH:** glutatión
- **GSR:** glutatión reductasa
- **GSSG:** glutatión disulfuro
- **H₂O_d:** agua destilada
- **H₂S:** sulfuro de hidrógeno
- **HO-1:** Hemo oxigenasa- 1
- **LDH:** Lactato deshidrogenasa
- **MAPK:** proteín quinasas activadas por mitógenos
- **mARN:** ácido ribonucleico mensajero
- **MDA:** malondialdehído
- **LN₂:** Nitrógeno líquido
- **Na₂S:** sulfuro de sodio
- **NADH:** Nicotinamida Adenina Dinucleótido
- **NADPH:** Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato
- **NQO-1:** NAD(P)H:quinona oxidoreductasa-1
- **Nrf-2:** factor nuclear relacionado a E2
- **O₂^{•-}:** anión superóxido
- **PCR:** reacción en cadena de la polimerasa
- **PH:** preservación hipotérmica
- **SOD:** Superoxido dismutasa
- **TNF- α :** Factor de necrosis tumoral α
- **U:** cantidad de enzima que en una reacción enzimática, cataliza la conversión de 1 μ mol de sustrato por minuto.

ANGLICISMOS.

- **Blebs:** protuberancias o burbujas en la superficie celular.
- **Buffer:** Es un sistema constituido por un ácido débil y su base conjugada o por una base y su ácido conjugado que tiene capacidad "tamponante", es decir, que puede oponerse a grandes cambios de pH (en un margen concreto) en una disolución acuosa.
- **High performance liquid chromatography (HPLC):** Cromatografía líquida de alta resolución.
- **Isolated perfused rat liver (IPRL):** Sistema de perfusión de hígado de rata aislado.
- **Kit:** conjunto de reactivos para llevar a cabo una determinación.
- **Pool:** mezcla que reúne un grupo de muestras.

RESUMEN

El mejoramiento de las técnicas quirúrgicas, tratamientos inmunosupresores y logística de la procuración de órganos, han convertido a la terapia de trasplante hepático en víctima de su propio éxito. En la actualidad, este procedimiento representa la solución terapéutica predilecta en pacientes con falla hepática terminal, incrementando el número de personas en listas de espera por un órgano sano (estadísticas en Argentina, disponibles en: <http://www.incucai.gov.ar>). Desde el surgimiento de un criterio unificado de muerte cerebral en los 80, los órganos para trasplante son procurados casi exclusivamente a partir de pacientes cuya función cardiopulmonar es sostenida artificialmente hasta el momento de la ablación. Sin embargo, el constante aumento en la demanda de órganos para trasplante ha dado inicio a la expansión del criterio de selección de potenciales donantes. Los donantes a corazón no batiente son usualmente desestimados debido al alto riesgo de disfunción primaria asociado a ellos como consecuencia del tiempo variable de isquemia normotérmica que atraviesan antes de la procuración.

La utilización de gasotransmisores como maniobra farmacológica para proteger a los tejidos de la injuria por isquemia - reperfusión se presenta como una alternativa prometedora con un creciente número de publicaciones al respecto, éste constituye un enfoque sencillo y seguro por lo que resulta de gran interés. Sin embargo, la incorporación de los mismos como componentes de una solución de preservación para trasplantes es una estrategia pocas veces planteada en la bibliografía.

En la presente tesis doctoral se estableció un modelo de donante a corazón parado en ratas de laboratorio con el objetivo de juzgar el potencial efecto citoprotector de un gas como el sulfuro de hidrógeno, en una solución comercial de preservación hipotérmica para hígados. Para ello, se suministraron dadores reconocidos de H₂S en solución, como el disulfuro de sodio (Na₂S, 10 µM) y el disulfuro de dialilo (DADS, 5 µM) en la etapa de almacenamiento en hipotermia. Posteriormente, los hígados fueron reperfundidos en un sistema de perfusión *ex vivo* donde se monitorearon los efectos del dador de H₂S a través de parámetros de funcionalidad y viabilidad del órgano. Además, se estudiaron parámetros relacionados al estado metabólico, estrés oxidativo y expresión relativa de genes relacionados con la respuesta hepática al estrés por isquemia/reperfusión.

La presencia de dadores de H₂S en la solución que se utilizó para la preservación de órganos con 45 min de isquemia caliente se asoció con una mejora en la mayoría de los parámetros evaluados durante la reperfusión aislada (Resistencia Intrahepática, Producción biliar, Consumo de O₂, liberación de enzimas al perfusato). Por otra parte, las variables

asociadas al estrés metabólico (reservas de glucógeno) y oxidativo (contenido de MDA y GSH) no mostraron cambios ante el tratamiento propuesto. La regulación de las defensas antioxidantes y la expresión de genes relacionados al estrés por isquemia, con excepción del gen que codifica para la enzima Hemo oxigenasa-1, tampoco resultaron estar sujetas a la administración de estos compuestos en las condiciones experimentales planteadas,.

En resumen, los hígados ablacionados a corazón parado mostraron la reversión del cuadro de injuria a niveles comparables con los de hígados de donantes convencionales al contrastarlos en un sistema de reperfusión *ex vivo*. Sin embargo, no se hallaron evidencias experimentales respecto de los mecanismos de acción a través de los cuales se ejerció el efecto citoprotector.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 El hígado y sus funciones.

El hígado es el más voluminoso de los órganos y uno de los más importantes debido a sus múltiples funciones metabólicas en humanos y otros vertebrados. Constituye un desarrollo evolucionario relativamente tardío, emergiendo casi en simultáneo con la columna vertebral. Aunque las funciones desempeñadas por las células que conforman el parénquima hepático no son exclusivas del grupo de los vertebrados, sí lo es la organización en un solo órgano. El desarrollo de una circulación portal pudo haber sido el evento crucial que permitió la formación del hígado en los vertebrados.

Situado en la parte superior derecha de la cavidad abdominal, justo bajo el diafragma, presenta una coloración pardo rojiza y una consistencia esponjosa debido a la alta cantidad de ramificaciones del sistema microvascular. A diferencia de cualquier otro órgano, el hígado posee una doble irrigación sanguínea: el sistema porta y la arteria hepática. El sistema porta (irrigación funcional) constituye el 70-75 por ciento del flujo sanguíneo y contiene sangre pobremente oxigenada pero rica en nutrientes proveniente del tracto gastrointestinal y del bazo. La circulación general depende de la arteria hepática, rama del tronco celíaco que contiene sangre oxigenada (irrigación nutricia). Estos vasos sanguíneos penetran en el tejido hepático y se dividen hasta formar capilares diminutos.

El lobulillo hepático constituye la unidad morfológica clásica del hígado, su forma hexagonal se estructura alrededor de una vena central a partir de la cual se organizan los cordones de hepatocitos en forma radial, en medio de dos cordones hepatocitarios se localizan los sinusoides hepáticos, cuya pared está compuesta por una capa discontinua de células endoteliales fenestradas (ver figura 1.1 B). En tres de los seis vértices del lobulillo hepático se localizan los espacios porta, compuestos por una rama de la arteria hepática, una rama de la vena porta, un vaso linfático y un conductillo biliar; las ramas laterales de estos vasos convergen a los sinusoides hepáticos donde la sangre arterial y venosa se mezcla y entra en contacto con los hepatocitos en el espacio de Disse. Los canalículos biliares formados entre dos hepatocitos adyacentes se extienden a lo largo de los cordones de hepatocitos hasta desembocar en el conductillo biliar de algún espacio porta (ver figura 1.1 A) (Grisham JW, 2006).

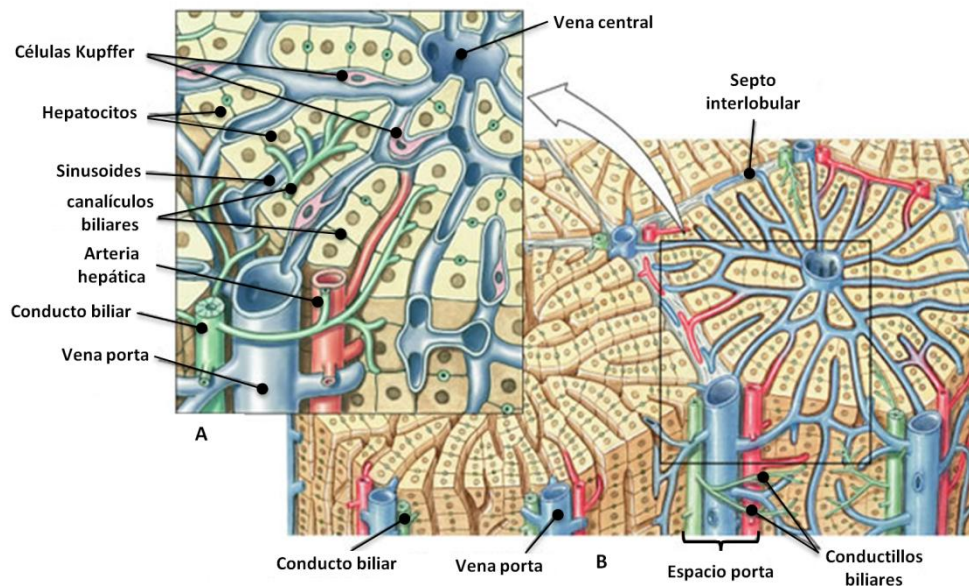


Figura 1.1 – Esquema de la arquitectura hepática: lobulillos hepáticos y espacios porta. Adaptado de Pearson education Inc.

Los hepatocitos, responsables de la mayor parte de las funciones de síntesis y metabólicas del hígado, son células de gran tamaño (sección transversal promedio: 25-30 μm) y aspecto poligonal, conformando cerca del 80 % de la masa hepática. Los hepatocitos muestran tres tipos de superficies diferentes: superficies con microvellosidades que se extienden hacia el espacio de Disse, superficies que delimitan los canaliculos biliares y superficies de contacto con hepatocitos adyacentes que pueden presentar uniones estrechas y desmosomas.

Las células de Kupffer son macrófagos fijos que se encuentran en gran número en los sinusoides y que emiten sus prolongaciones hacia el espacio de Disse. Además de la fagocitosis, las células de Kupffer intervienen en la modulación de la respuesta inmune y la respuesta inflamatoria mediante la elaboración de mediadores químicos.

Las células de Pit residen normalmente en el espacio sinusoidal asociadas a las células endoteliales, corresponden a una clase única de células “natural killer” encontradas en el hígado. Son linfocitos granulares grandes con actividad citotóxica sobre algunas células tumorales.

El espacio entre las placas celulares y los sinusoides, denominado espacio perisinusoidal o de Disse, contiene componentes de matriz extracelular, algunos fibroblastos y células de Ito o estelares. Estas células almacenan lípidos y vitamina A y cuentan con prolongaciones citoplasmáticas ricas en filamentos de actina que rodean el epitelio del sinusoides ejerciendo un efecto regulador sobre el flujo sanguíneo (Grisham JW, 2006).

El hígado desempeña múltiples funciones en el organismo:

- **Producción de bilis:** los hepatocitos secretan la bilis hacia la vía biliar, y de allí al duodeno, donde facilita la digestión de los alimentos.
- **Metabolismo de los carbohidratos:**
 - la gluconeogénesis es la formación de glucosa a partir de ciertos aminoácidos, lactato y glicerol;
 - la glucogenólisis es la fragmentación de glucógeno para liberar glucosa en la sangre;
 - la glucogenogénesis o glucogénesis es la síntesis de glucógeno a partir de glucosa.
- **Metabolismo de los lípidos:**
 - síntesis de colesterol;
 - producción de triglicéridos.
- **Síntesis de proteínas, como la albúmina y las lipoproteínas.**
- **Síntesis de factores de coagulación** como el fibrinógeno (I), la protrombina (II), la globulina aceleradora (V), proconvertina (VII), el factor antihemofílico B (IX) y el factor Stuart-Prower (X).
- **Desintoxicación de la sangre:**
 - neutralización de toxinas, la mayor parte de los fármacos y de la hemoglobina.
- **Transformación del amonio en urea.**
- **Depósito de múltiples sustancias:**
 - glucosa en forma de glucógeno;
 - vitamina B12, hierro, cobre, etc.
- En el primer trimestre del embarazo, el hígado es el principal órgano de **producción de glóbulos rojos en el feto**. A partir de la semana 12 de la gestación, la médula ósea asume esta función.

1.2 Trasplante hepático.

1.2.1 Definición e indicaciones.

El trasplante hepático consiste, básicamente, en un proceso quirúrgico mediante el cual el hígado enfermo del paciente es reemplazado por un hígado sano proveniente de un donante cadavérico ó un donante vivo. En el primero de los casos, suele tratarse de donantes con muerte encefálica, cuya actividad respiratoria y flujo sanguíneo se mantienen con asistencia mecánica hasta el momento de la ablación, mientras que el donante en vida cede una porción

de su hígado al receptor, evidenciando esto, la extraordinaria capacidad regenerativa de este órgano.

De una manera simplista, la implantación del órgano involucra la anastomosis (conexión) de la vena cava inferior, la vena porta y la arteria hepática en el cuerpo del receptor y una vez restaurado el flujo sanguíneo, se reconstruye el conducto biliar.

El trasplante de hígado es potencialmente aplicable a cualquier patología hepática, ya sea aguda o crónica, en donde exista una potencial pérdida de las funciones vitales del hígado (que puedan comprometer la vida del paciente), siempre y cuando además no existan otras condiciones que puedan resultar perjudiciales para el trasplante como por ejemplo, cáncer extrahepático metastásico, consumo de drogas o alcohol o infecciones sépticas graves. La mayoría de los trasplantados son pacientes con enfermedades crónicas e irreversibles del hígado (secundario a infección, toxinas, enfermedades autoinmunes, metabólicas, atresia biliar, etc.) o pacientes con un nivel considerado de cirrosis (término que hace referencia a características histológicas del tejido hepático necrosado e inflamado) (<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/003006.htm>).

1.2.2 Evolución histórica.

Interesantes descripciones en la literatura mitológica, religiosa e histórica así como registros arqueológicos de milenios de antigüedad, hacen referencia al concepto de trasplante de tejidos. Textos hindúes datados en 2500-3000 años A.C. brindan descripciones detalladas de la utilización de injertos de piel extraídos del mentón o nalgas del paciente para la reconstrucción de nariz mutilada en castigos de la época.

El primer intento de trasplante hepático fue llevado a cabo por Starzl en la Universidad de Colorado en 1963, pero el paciente falleció durante la cirugía debido a complicaciones técnicas y hemorrágicas. No fue sino hasta 1967 cuando se obtuvo el primer trasplante hepático con un año de sobrevida. Al ir acumulando experiencia y mejoras en tratamientos inmunosupresores se logró la prolongación de la sobrevida de pacientes trasplantados.

La estandarización del criterio médico-legal de muerte cerebral, en conjunto con la tecnología necesaria para mantener la perfusión y oxigenación de los tejidos en pacientes con muerte encefálica, proporcionó una fuente de órganos cadavéricos con un alto potencial de viabilidad post-trasplante (Linden PK, 2009).

1.2.3 Procuración y preservación.

La remoción del órgano del cuerpo del donante desencadena una serie de fenómenos deletéreos para el tejido como consecuencia de la isquemia (falta de irrigación sanguínea) y

posterior restauración del flujo sanguíneo en el cuerpo del receptor (reperfusión) (figura 1.2). Las secuelas de la injuria por Isquemia/Reperfusión (I/R) pueden asociarse frecuentemente con la dilación del funcionamiento o fallo primario del injerto. La preservación de órganos para trasplante constituye un aspecto fundamental en el proceso de procuración, permitiendo el desarrollo de tareas de logística como el transporte del órgano, organización de los equipos de cirugía, operativos multiorgánicos, etc. En este sentido, el descenso de la temperatura es un factor clave en la prevención del daño por isquemia, ya que el frío disminuye el metabolismo celular y los requerimientos de oxígeno, prolongando la viabilidad del tejido. Por otro lado, aunque fundamentalmente necesaria, la hipotermia también presenta repercusiones negativas en los tejidos que contribuyen a la injuria por I/R. Los dos tipos celulares más afectados durante la I/R hepática son los hepatocitos y las células endoteliales. Los hepatocitos son más sensibles al daño por isquemia caliente (37°C), mientras que, las células endoteliales son mayormente afectadas por la isquemia fría (4°C) durante el almacenamiento previo al trasplante (Guibert EE y col., 2011).

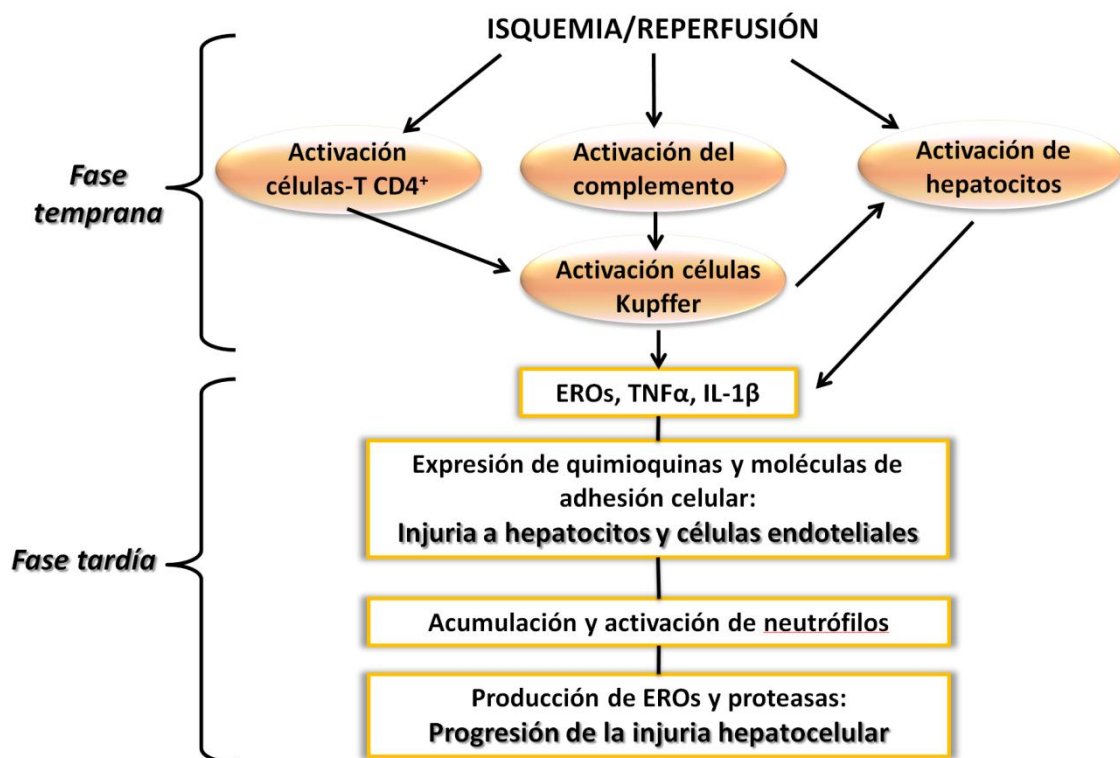


Figura 1.2 – Fases de la injuria por isquemia/reperfusión hepática. La activación de las células de Kupffer y hepatocitos en la fase temprana promueve la liberación de EROS (especies reactivas del O₂) y citoquinas inflamatorias que aumentarán la respuesta inflamatoria y el estrés oxidativo, provocando la progresión del daño hepatocelular.

Los mecanismos intracelulares de injuria por I/R se esquematizan en la figura 1.3 e involucran los siguientes eventos principales:

- **Depleción de ATP:** La interrupción de la producción aeróbica de ATP por fosforilación oxidativa es uno de los factores centrales en el estrés por isquemia. Aunque el descenso de la temperatura reduce el consumo de las reservas energéticas celulares, el ATP y ADP, son gradualmente consumidos durante la hipotermia. La vía glicolítica es desviada hacia la producción anaeróbica de lactato y H^+ con la generación de 2 moléculas de ATP, pero el consumo residual de compuestos energéticos excede a la capacidad de las células de poder restaurarlos (Guibert EE y col., 2011).
- **Desbalance iónico:** La bomba sodio-potasio ATPasa en funcionamiento mantiene la composición iónica del medio intracelular. La carencia de ATP y excesiva producción de iones H^+ producto del metabolismo anaeróbico, provocan la disfunción de la bomba Na-K ATPasa. El desbalance iónico promueve la entrada de agua a la célula generando la hinchazón de los hepatocitos, células de Kupffer y células endoteliales; esto genera el estrechamiento de los sinusoides propiciando la alteración microcirculatoria. El incremento de la concentración intracelular del ión Ca^{2+} es otra consecuencia de la depleción de fosfatos de alta energía, este fenómeno desencadena mecanismos de injuria a través de la activación de enzimas hidrolíticas involucradas en la conversión de la xantina deshidrogenasa en xantina oxidasa y la disrupción de las membranas celulares (formación de blebs); y la transición de permeabilidad mitocondrial que puede llevar a la muerte celular (Guibert EE y col., 2011).
- **Generación de especies reactivas del oxígeno (EROs):** La reoxigenación de un hígado isquémico promueve la generación de EROs como el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Las principales fuentes productoras de EROs incluyen la xantina oxidasa, cuyo sustrato es la hipoxantina producto del catabolismo del ATP durante la isquemia; la NADPH oxidasa de las células de Kupffer activadas en respuesta al estrés por isquemia; y la cadena respiratoria de la mitocondria en estado reducido. Las EROs tienen como blanco las proteínas, los lípidos y los ácidos nucleicos; están implicados en la formación de poros de permeabilidad en la membrana mitocondrial; y participan en la transducción de señales que coordinan la respuesta inflamatoria (Glantzounis GK y col., 2005).
- **Desestabilización de las membranas celulares:** El frío altera el estado físico-químico de las membranas, modificando la viscosidad y alterando las funciones y permeabilidad de la misma. Además, alteraciones a nivel del citoesqueleto debido a la

depleción de sustratos energéticos en conjunto con la activación de lipasas y proteasas, contribuyen a la desestabilización de la superficie celular.

- Inducción de la transcripción génica:** Durante el período de isquemia (caliente/fría) las células sobrevivientes reprograman la expresión de sus genes. Uno de los factores de transcripción más importantes involucrados en la respuesta es el factor nuclear κB (NF- κB). Ante estrés oxidativo este factor migra al núcleo e induce la transcripción de genes de citoquinas (IL-1 β , IL-6 y TNF- α) y moléculas de adhesión (ICAM-1) que promueven la respuesta inflamatoria reclutando neutrófilos y plaquetas, con la consiguiente congestión y deterioro del tejido. Por otro lado, las células también son capaces de inducir una respuesta adaptativa al estrés generado mediante la activación de factores de transcripción como el Nrf-2 y el HIF (Ke B y col., 2013). HIF media la defensa en condiciones de hipoxia estimulando la expresión de genes relacionados con la angiogénesis, metabolismo de la glucosa, proliferación/supervivencia celular, en tanto que, Nrf-2 activa la transcripción de genes antioxidantes como la hemoxigenasa-1 (HO-1), NADPH-oxidoreductasa-1 (NQO-1), glutatión peroxidasas, superóxido dismutasas, etc. (Miyata T y col., 2011).

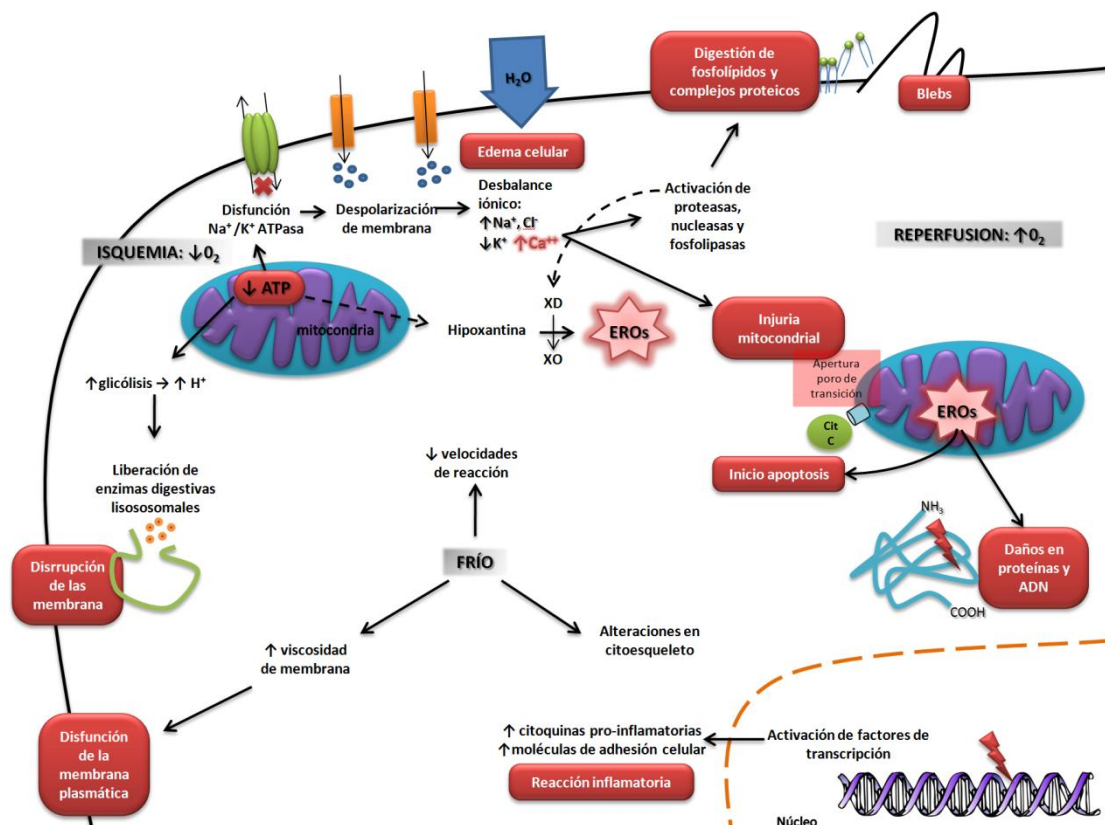


Figura 1.3 – Mecanismos de daño y activación celular en la injuria por I/R. La privación de O_2 resulta en la depleción del ATP provocando un desbalance iónico como consecuencia de la disfunción de las bombas Na/K ATPasas. Este desbalance iónico genera el edema celular y la activación dependiente de Ca^{2+} de enzimas digestivas y vías de injuria mitocondrial. El aumento de iones H^+ y EROs contribuyen al daño celular atacando membranas, proteínas y Ac. Nucleicos. Además, se activa la respuesta inflamatoria (NF- κB) y posibles mecanismos de respuesta al estrés (Nrf-2, HIF-1). El frío disminuye el metabolismo, demorando los mecanismos de injuria, pero también produce alteraciones a nivel de las membranas biológicas.

El almacenamiento en frío, utilizando soluciones especialmente diseñadas a tal fin, es actualmente la técnica estándar dominante en la clínica del trasplante hepático. Una variedad de soluciones de preservación han sido formuladas, sin embargo, todas ellas cuentan con componentes para: 1) minimizar el edema tisular y celular, (2) mantener un balance iónico apropiado, (3) prevenir la acidosis, (4) remover o prevenir la formación de radicales libres, y (5) proveer sustratos para la regeneración de compuestos de alta energía que promuevan la recuperación durante la reperfusión normotérmica (Guibert EE y col., 2011).

La **solución de la Universidad de Wisconsin (UW)** ha tenido una alta aceptación en la preservación hipotérmica de hígados desde 1989. La introducción de sustratos metabólicamente inertes como el lactobionato y la rafinosa convirtieron a la UW en una solución universal aplicable en la preservación de múltiples órganos. La estrategia de preservación de esta solución se basa en los siguientes puntos clave: prevención del edema celular (rafinosa, lactobionato); provisión de precursores de ATP (adenosina); y defensa antioxidante (alopurinol, glutatión reducido). La utilización de la solución UW produjo importantes mejoras en el trasplante hepático, brindando una mayor protección a las células endoteliales, particularmente susceptibles a la isquemia fría, extendiendo el límite de preservación hasta 24 h.

La **solución Histidina-Triptófano-Cetoglutarato (HTK)**, desarrollada por Bretschneider, fue diseñada originalmente para cirugías cardíacas pero en la actualidad compite con la solución UW en la preservación hepática y renal, experimental y clínica (Rayya F y col., 2008). La Solución Custodiol[®] HTK se considera una solución intracelular, es decir, que contiene bajas concentraciones de los electrolitos sodio, calcio, potasio y magnesio. La misma, cuenta con el sistema de amortiguamiento histidina/clorhidrato de histidina que brinda una osmolaridad normal y mejora la capacidad amortiguadora de la solución durante la acidosis inducida por isquemia; además, la histidina también es un protector de membrana eficaz y mejora la restitución del ATP. El aminoácido triptófano protege membranas celulares, mientras que, el α -cetoglutarato ayuda a estabilizar las membranas celulares y es un sustrato para el metabolismo anaeróbico. El manitol, mantiene una osmolalidad fisiológica o ligeramente aumentada y, de esta forma, contrarresta la presión osmótica coloidal de la proteína intracelular para reducir el edema celular. El manitol también actúa como neutralizador de radicales libres. A excepción del manitol, todos los componentes se encuentran normalmente en el cuerpo. La baja concentración de electrolitos de esta solución implica que no se requiere de un lavado previo del sistema vascular del órgano a trasplantar. Además, su baja viscosidad (similar a la del agua) permite un lavado de mayor penetración mejorando la eficiencia del enfriamiento inicial (<http://www.custodiol.com/about-custodiol.php>). Debido a que el costo se

ve reducido al utilizar Custodiol[®] HTK, esta solución ha ganado bastante popularidad en los últimos 20 años, sobretodo, en países en desarrollo (Bellamy CA y col., 2008).

1.3 Problemática asociada a la terapia de trasplante.

1.3.1 Víctima de su propio éxito.

El trasplante es en la actualidad un procedimiento de muy alta aceptación para patologías crónicas y agudas en el hígado. Debido al refinamiento de la técnica y de las terapias inmunosupresoras, las tasas de supervivencia post-trasplante han aumentado significativamente en los últimos años (5 años de funcionamiento del órgano trasplantado e índices de sobrevida del 60-90 %) (Monbaliu D y col., 2008). Como resultado, cada vez son más los pacientes que ingresan en la lista de espera por un hígado que salve o mejore su calidad de vida, mientras que, la cantidad de órganos aptos para trasplantar permanece estática.

Esta problemática se ha enfrentado desde distintos ángulos (Monbaliu D y col., 2012):

- Intensificación de los esfuerzos en la identificación de todos los potenciales donantes con muerte cerebral para tratar el tema de la donación de órganos con sus familias.
- En lo posible, los hígados en mejores condiciones (pacientes jóvenes con muerte cerebral) serán destinados a la técnica de partición, donde dos receptores serán beneficiados.
- Donación en vida, aplicable sobretodo en trasplantes pediátricos.
- Utilización de hígados “marginales” o subóptimos: donantes de edad avanzada, hígados esteatóticos y donantes con muerte por arresto cardíaco o *donantes a corazón no batiente*.

1.3.2 Donantes a corazón no batiente (DCNB).

Mucho antes de la definición unificada de muerte encefálica, los primeros trasplantes hepáticos se realizaban con órganos de donantes a corazón parado con pobres tasas de sobrevida de los pacientes (Starzl TE y col., 1963). A partir de principios de los noventa, en plena vigencia del concepto de muerte cerebral, hubo escasos intentos de trasplantes con hígados ablacionados post-cese cardíaco y sus resultados fueron desfavorables. Sin embargo, ante la escasez crítica de donantes cadavéricos para satisfacer la demanda de las listas de espera, las perspectivas comenzaron a reevaluarse. Además, las unidades de trasplantes renales, las cuales debieron afrontar una brecha mucho mayor entre donantes y pacientes a la espera de un riñón, habían comenzado a utilizar DCNB y obtenido buenos resultados.

En la conferencia de Maastricht de 1995 se llevó a cabo una clasificación de donantes a corazón no batiente:

Categoría	Estado del potencial donante	Situación hospitalaria
I	Muerte en camino	emergencias
II	Resucitación fallida	emergencias
III	En espera del cese cardíaco	Terapia intensiva
IV	Cese cardíaco luego de la muerte encefálica	Terapia intensiva

Tabla 1.1 – Clasificación de Maastricht de donantes a corazón no batiente. Las categorías I y II son denominadas “no controladas” y las categorías III y V “controladas” según el poder de control sobre el lapso de isquemia en normotermia. Monbaliu D y col., 2012.

Los DCNB controlados suelen ser aquellos pacientes cuya muerte se efectiviza al prescindir de los medios mecánicos que mantienen sus órganos en funcionamiento cuando ya no tiene sentido prolongar ese estado. En ese caso, la unidad de trasplante puede estar presente en el momento del deceso y así minimizar el tiempo de isquemia caliente. En un reporte de la conferencia nacional de donación a corazón parado realizada en Estados Unidos en 2005 se estableció que el período de isquemia caliente no debe superar los 30 min en hígado y los 60 min en riñón y páncreas (Bernat JI y col., 2006).

Cada país cuenta con un marco médico-legal propio, por ejemplo, en España sólo se utilizan DCNB no controlados, mientras que, en Bélgica, Holanda y Reino Unido utilizan DCNB controlados y en EEUU se utilizan ambos (Monbaliu D y col., 2012). En Argentina no se utilizan este tipo de donantes en la actualidad (<http://www.incucai.gov.ar/comunidad/index.jsp>).

Los hígados provenientes de DCNB soportan un período de isquemia en normotermia o caliente (en oposición a la isquemia fría durante el almacenamiento en hipotermia), durante el cual no existe ningún tipo de intervención para contrarrestar la injuria por hipoxia. Este insulto previo a la procuración, es la razón por la cual los porcentajes de disfunción primaria de estos órganos superan en un factor de 4 a 5 veces los de órganos de donantes con muerte encefálica (corazón batiente). La formación de coágulos post-mortem que bloquean la vasculatura hepática generando inconvenientes en la perfusión y daños en la vía biliar son las complicaciones más frecuentes asociadas a este tipo de trasplantes (Thamara M y col., 2011).

1.3.3 Estrategias para el reacondicionamiento.

La técnica de preservación utilizada hasta el momento de la implantación, tiene un gran impacto en la potencial recuperación de hígados con un período de isquemia caliente subyacente. Actualmente, existen dos métodos de preservación en uso clínico: el *almacenamiento en hipotermia (método estático)* para la mayoría de los órganos y la *perfusión hipotérmica (método dinámico)* únicamente en riñón. Ambos métodos presentan características atractivas para el reacondicionamiento isquémico. El almacenamiento en frío demora la progresión de la injuria a través de un rápido descenso en la temperatura y permite el tratamiento farmacológico del órgano previo a la reoxigenación. La perfusión hipotérmica, en cambio, provee oxígeno y nutrientes en todo momento facilitando la recuperación del ATP.

La principal ventaja teórica en la utilización del método estático reside en el oportuno suministro de compuestos terapéuticos como antioxidantes y mediadores de la respuesta anti estrés antes de la reintroducción de oxígeno. Es importante destacar que la practicidad de la técnica también otorga una ventaja importante en la logística de distribución de órganos.

El diseño de las soluciones de preservación con el objetivo de acondicionar a los órganos y protegerlos de las injurias por I/R constituye un punto crucial para promover una expansión en el criterio de selección de hígados para trasplante.

Muchas de las estrategias abordadas consisten en la administración de metabolitos antioxidantes como el glutatión, alopurinol o α -tocoferol para evitar los daños por especies reactivas de oxígeno. También se ha buscado utilizar drogas anti-factor de necrosis tumoral (TNF- α) que inhiban la acción proinflamatoria desencadenada por esta citoquina y anticuerpos que inhiban la adhesión de los neutrófilos, entre otras. Incluso la terapia génica podría proteger a los órganos ya que se podría incrementar la expresión de enzimas involucradas en la defensa antioxidante (ej.: superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa), de proteínas antiapoptóticas como Bcl-2 y citoprotectoras como HO-1, sin embargo, este tipo de técnicas conlleva cierto nivel de complejidad a nivel de seguridad biológica.

1.4 El Sulfuro de hidrógeno.

1.4.1 Miembro de la familia de los gasotransmisores.

El óxido nítrico (NO), monóxido de carbono (CO) y sulfuro de hidrógeno (H₂S) son moléculas gaseosas generadas de forma endógena en el organismo. Estos pequeños mediadores liposolubles, logran atravesar las membranas celulares y transmitir la señal directamente a los blancos intracelulares correspondientes. Históricamente, estos gases han sido considerados tóxicos para la salud y el medio ambiente, pero en las últimas décadas se

han acumulado numerosas evidencias a favor de su rol como mediadores fisiológicos en los tejidos de mamíferos. A través de diversos estudios se lograron identificar los sistemas enzimáticos que generan estos mediadores gaseosos y, en particular, se observó que la deficiencia en alguno de estos sistemas exagera la injuria por isquemia/reperfusión, mientras que, la sobreexpresión genética de dichas enzimas induce citoprotección.

El NO fue el primer transmisor gaseoso identificado en estudios de finales del 1700, no obstante, su verdadero potencial e importancia en el campo de la medicina fue descubierto recién en 1980, cuando Furchgott y Zawadzki (1980) demostraron sus propiedades vasorelajantes. El NO es generado por las óxido nítrico sintasas a partir de L-Arginina en presencia de O₂ y NADPH, ante un estímulo Ca-calmodulina dependiente.

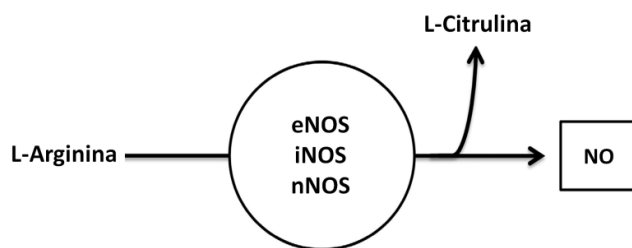


Figura 1.4 - Síntesis enzimática del NO. Isoformas de NO sintasa: NOS endotelial (eNOS), NOS neuronal (nNOS), y NOS inducible (iNOS).

En la década del 90 se identificó al CO como el segundo gasotransmisor con propiedades vasoactivas. El CO es generado en la reacción de descomposición del grupo hemo catalizada por las hemo oxigenasas. Además de su función vasorelajante, el CO parece cumplir un papel crucial en la respuesta adaptativa al estrés. En muchos estudios se ha demostrado que la inducción de HO-1 y la producción de CO son antiinflamatorias, antiapoptóticas, antiproliferativas y citoprotectoras. (Ryter SW y col., 2006).

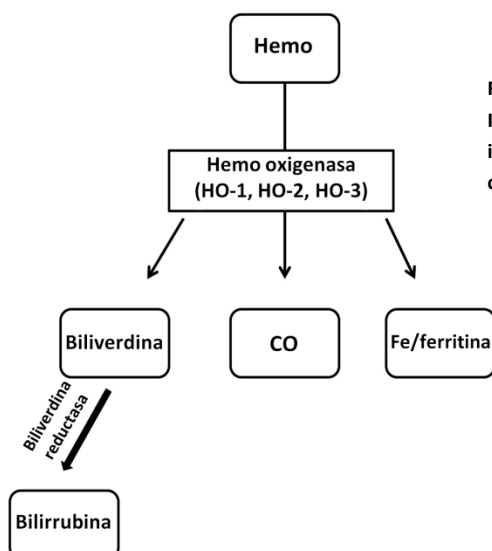


Figura 1.5 - Síntesis enzimática del CO. Isoformas de Hemo oxigenasas: HO-1 es inducible, en tanto que, HO-2 y 3 son constitutivas.

El H₂S, fue identificado en tercer lugar como miembro de la familia de los gasotransmisores. Hosoki y colaboradores reportaron el hallazgo de una enzima productora de H₂S presente en el íleon, vena porta, y aorta torácica; y atribuyeron a este gas una capacidad

relajante del músculo liso (1997). La producción enzimática de H_2S ocurre a través de tres variantes enzimáticas: Cistationina γ -liasa (CGL ó CSE); cistationina β -sintasa (CBS) y 3-mercaptopiruvatosulfurtransferasa (3-MST). CBS predomina en cerebro, sistema nervioso e hígado, CGL es mayoritaria en sistema vascular e hígado y 3-MST en cerebro y sistema vascular.

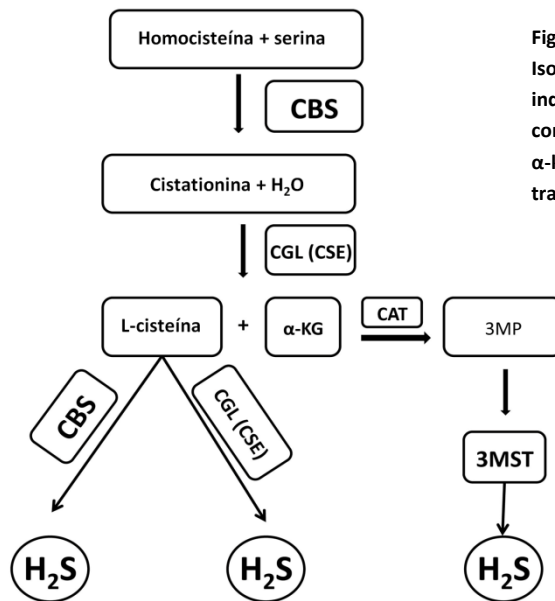


Figura 1.6 - Síntesis enzimática del H_2S . Isoformas de Hemo oxigenasas: HO-1 es inducible, en tanto que, HO-2 y 3 son constitutivas. 3MP= 3-mercaptopiruvato; α -KG= α -ketoglutarato; CAT= cisteína amino transferasa.

La distribución y estado de oxidación del sulfuro varía en función de la temperatura y el pH. A $37^\circ C$ y pH fisiológico (7.4), 20% del sulfuro existe como la especie gaseosa H_2S ; mientras que, a $25^\circ C$ y pH 7.4, 40% del sulfuro existe como H_2S gas. A pHs alcalinos (ej: 9.5) el sulfuro existe predominantemente como anión HS^- . *In vivo*, el sulfuro libre se encuentra disponible en la forma gaseosa y en forma de anión altamente reactivo HS^- . El O_2 es otro factor regulador de la estabilidad y producción del sulfuro en solución, cuanto menor es la tensión de O_2 en el medio, mayor la estabilidad y producción del H_2S (Kolluru y col., 2013).

1.4.2 Funciones biológicas del H_2S .

Muchos estudios en la literatura indican que el H_2S ejerce efectos fisiológicos en un amplio rango de concentraciones que va desde los 10 a los 300 μM . Los mecanismos de acción del H_2S involucran la regulación de la respuesta inflamatoria, reducción del estrés oxidativo, vasoregulación, regulación de vías de apoptosis, protección de la mitocondria, neuromodulación, etc. La comprensión del perfil citoprotector del H_2S es un factor fundamental para su aplicación terapéutica en condiciones de estrés como la injuria por isquemia/reperfusión.

- **Vasodilatación y efecto anti-hipertensión:** la evidencia experimental sugiere que el efecto hipotensor del H₂S es el resultado de la relajación de células de músculo liso ante la apertura de canales de potasio dependientes de ATP (K_{ATP}). En concordancia, la delección genética de la enzima generadora de H₂S CSE, produjo un cuadro de hipertensión. El tratamiento con dadores exógenos de H₂S, como el NaHS, generó la relajación del músculo liso vascular, de anillos aórticos aislados, arteria mesentérica y microvasculatura hepática (Li L y col., 2008). Asimismo, Benavides y col. (2007) demostraron un efecto vasorelajante mediado por polisulfuros orgánicos derivados del ajo, estos compuestos liberan H₂S a través de un mecanismo glucosa y tiol-dependiente.
- **Efectos anti-inflamatorios:** la reacción inflamatoria es un componente muy importante en la injuria por I/R. En ratas tratadas con lipopolisacáridos bacterianos pro-inflamatorios se observó que la administración de un dador de H₂S lograba disminuir la acumulación de citoquinas pro-inflamatorias como el TNF- α y la interleuquina-1 β (IL-1 β) al mismo tiempo que aumentaba la presencia de citoquinas anti-inflamatorias como la interleuquina-10 (IL-10). Otros estudios indicaron que el tratamiento con Na₂S ó NaHS es capaz de prevenir la adhesión de leucocitos a las células endoteliales y que dicha propiedad involucra la activación de canales K_{ATP}. Por último, el preconditionamiento con dadores de H₂S induce un estado anti-inflamatorio como resultado de la activación de eNOS y la vía p38 MAPK (Nicholson CK y col., 2010).
- **Efectos anti-apoptóticos:** El tratamiento con H₂S activa varias de las vías de señalización de supervivencia como la PKC/ERK1/2 y PI3K/Akt. Además, experimentos más recientes indicaron la activación de la vía PKC ϵ /STAT3, que aumenta la expresión de algunas HSPs (proteínas del choque térmico), Bcl-2 y bcl-xL y también la inactivación de pro-apoptógenos como Bad. Otro de los mecanismos antipoptóticos del H₂S involucra la activación de eNOS. El NO ejerce efectos anti-apoptóticos inhibiendo la actividad caspasa-3 (Calvert JW y col., 2010).
- **Efectos antioxidantes:** Jha S y col. (2008) mostraron que el H₂S protege a los hepatocitos de la injuria por I/R a través de la inducción de antioxidantes intracelulares. Asimismo, Calvert y col. (2009) reportaron que el tratamiento con H₂S confiere cardioprotección en la I/R a través de la inducción de Nrf-2, un factor de transcripción que aumenta la expresión de genes de la defensa antioxidante.

Además, se ha informado que este mediador gaseoso es capaz de incrementar la actividad de los transportadores de cisteína, substrato para la producción del GSH; inducir los niveles de la glutamilsteína sintasa perteneciente a la vía de biosíntesis del GSH; y aumentar la actividad superóxido dismutasa. Por último, se sabe que el H₂S es capaz de proteger la función mitocondrial, reduciendo los niveles de EROs y el desacoplamiento mitocondrial (Kolluru GK y col., 2013).

• **Protección mitocondrial:** Durante la I/R, las mitocondrias se enfrentan a la privación de O₂, sobreproducción de EROs y despolarización del potencial de membrana. En los trabajos realizados por Elrod JW y col. (2007) se observó que mitocondrias aisladas, tratadas con 10 μM Na₂S y sometidas a 30 minutos de hipoxia, mostraban una mejor recuperación de la respiración. El H₂S es un potente inhibidor reversible de la citocromo c oxidasa (complejo IV de la cadena respiratoria mitocondrial). La modulación de la respiración celular protege a la mitocondria ante el estrés oxidativo inherente a la I/R. El H₂S ejerce una influencia tal sobre el metabolismo, que ha demostrado tener la habilidad de inducir un estado de animación suspendida en modelos murinos como el de Blackstone E y col., (2005). La reducción del metabolismo es una estrategia prometedora para el campo de la medicina y, en particular, para la terapia de reemplazo de órganos, sin embargo, aun quedan muchos interrogantes por responder al respecto.

Por otro lado, el H₂S activa las cascadas de kinasas pro-supervivencia (también llamadas vías RISK: kinasas de salvataje de la injuria por reperfusión) que previenen la acumulación de Ca²⁺ intracelular y la formación del poro mitocondrial (Kolluru GK y col., 2013).

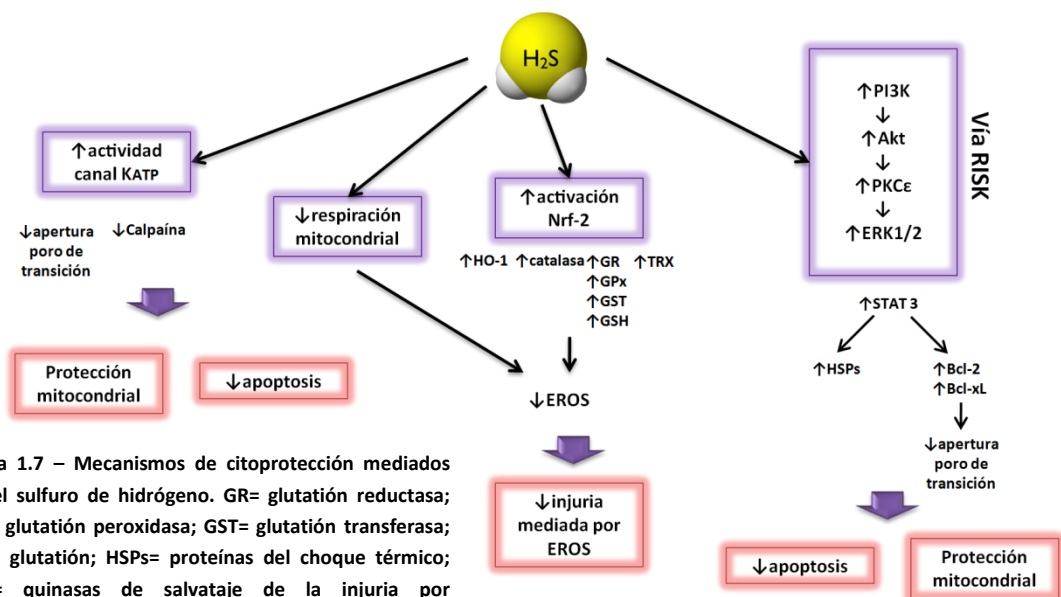


Figura 1.7 – Mecanismos de citoprotección mediados por el sulfuro de hidrógeno. GR= glutatión reductasa; GPx= glutatión peroxidasa; GST= glutatión transferasa; GSH= glutatión; HSPs= proteínas del choque térmico; RISK= quinazas de salvataje de la injuria por reperfusión.

1.4.3 Suministro exógeno de H₂S.

La investigación farmacológica en relación al H₂S es una disciplina que avanza rápidamente ante la promesa de un compuesto terapéutico aplicable en diversas patologías y condiciones de estrés inducidas por isquemia/reperfusión.

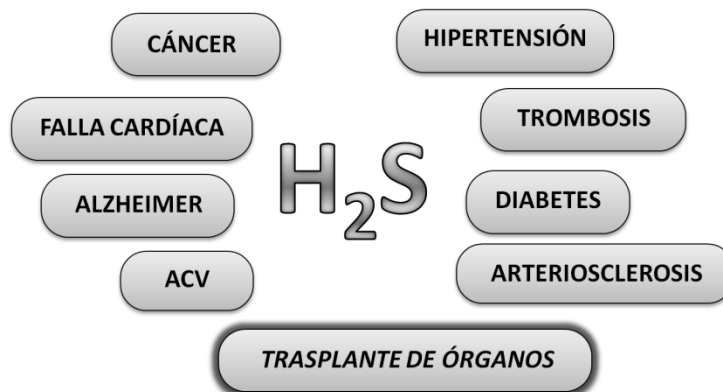


Figura 1.8 – Enfermedades que podrían tratarse con los efectos terapéuticos del H₂S.

Existen diferentes métodos para suministrar H₂S en solución:

- **Burbujeo con el gas H₂S:** La fuente más pura de H₂S es el propio gas. El gas liberado desde el cilindro contenedor atraviesa una serie de compartimentos en serie hasta llegar a la solución que se desea tratar (Hughes MN y col., 2009).
- **Sales de sulfuro:** El hidrosulfuro de sodio (NaHS) y sulfuro de sodio (Na₂S) se han utilizado por un largo tiempo en la generación de H₂S. Al suministrar estas sales en solución, ocurre la disociación y subsecuente generación de H₂S de manera casi instantánea.
- **Derivados naturales:** El consumo de ajo (*Allium sativum*) como parte de la dieta, ha sido considerado beneficioso para la salud humana durante siglos. En particular, se lo ha podido relacionar con la reducción de múltiples factores asociados a enfermedades cardiovasculares y recientemente, se ha demostrado que el sulfuro de hidrógeno (H₂S) es quien estaría mediando esta actividad citoprotectora del ajo (Benavides G y col., 2007). La Alicina es un compuesto derivado del extracto de ajo que al descomponerse en solución acuosa da origen a sustancias generadoras de H₂S como el Disulfuro de dialilo (DADS) y trisulfuro de dialilo (DATS).
- **Drogas de diseño:** un gran número de compuestos se han estado desarrollando con el fin de lograr una liberación controlada de H₂S en solución, ofreciendo una ventaja sobre las sales de sulfuro. Un ejemplo de este tipo de drogas es GYY4137, caracterizada en trabajos de Li L y col. (2008).

1.5 Hipótesis de trabajo.

El trasplante de hígado actualmente es el tratamiento de elección para la gran mayoría de las patologías hepáticas, sin embargo, la injuria por isquemia/reperfusión inherente al procedimiento constituye la principal causa de fracaso en este tipo de intervenciones. La escasez de órganos a nivel mundial, ha impulsado la expansión del criterio de selección de órganos “trasplantables”. En este sentido, muchos centros de trasplantes han comenzado a reevaluar la utilización de hígados provenientes de donantes a corazón no batiente. La desventaja principal de este tipo de donación radica en el período de isquemia caliente ineludible que pesa sobre los órganos antes que éstos deban afrontar la etapa de isquemia fría y la reperfusión en el cuerpo del receptor. No obstante, la calidad de un órgano a trasplantar depende, esencialmente, de la eficiencia de la técnica de preservación utilizada para protegerlo durante el tiempo que deba permanecer fuera del organismo. Así, la etapa de almacenamiento en frío puede contribuir al daño iniciado durante la isquemia caliente; o bien, puede representar la oportunidad para re-acondicionar órganos marginales. En este sentido, el Sulfuro de hidrógeno con su perfil vasodilatador, antioxidante y mediador en la respuesta al estrés por hipoxia, resulta de gran interés como agente farmacológico citoprotector y pre-acondicionador del tejido, durante el almacenamiento en hipotermia de hígados extraídos luego del cese cardio-respiratorio.

2. OBJETIVOS

➤ **Objetivo General.**

Introducción de mejoras en el sistema de preservación hipotérmica de hígados para un mejor aprovechamiento de hígados para trasplante y expansión del criterio de admisión de donantes marginales (donantes a corazón no batiente), para lo cual se propone incorporar una fuente de Sulfuro de Hidrógeno a la solución de preservación hipotérmica y estudiar sus efectos y mecanismos moleculares de acción en un modelo de procuración a corazón no batiente en ratas de laboratorio, utilizando la técnica perfusión de hígado aislada como herramienta básica.

➤ **Objetivos Particulares.**

- Desarrollo de técnicas que permitan evaluar el estado de funcionalidad y viabilidad de los hígados sometidos al sistema de preservación hipotérmica.
- Establecer un modelo experimental de donante a corazón no batiente.
- Elección de compuestos dadores de H₂S: establecimiento de la dosis adecuada a utilizar en el sistema de preservación hipotérmica.
- Evaluar la capacidad protectora de la presencia de fuentes de H₂S en la preservación de órganos provenientes de donantes a corazón parado.
- Indagar en los mecanismos moleculares de las injurias por isquemia (caliente-fría)/Reperfusión y mecanismos en ausencia y presencia de dadores de H₂S.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Reactivos y equipamiento.

Drogas sólidas
1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP), Sigma
2-vinilpiridina, Aldrich
5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoic ácido) (DTNB), Sigma
Ácido Cítrico, Cicarelli
Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), Sigma
Acrilamida, Sigma
Agarosa de bajo punto de fusión, Sigma
Albúmina sérica bovina (BSA), Sigma
Azul de Bromofenol, Zubizarreta
Azul de Coomasie brillante R-250, MP
Bicarbonato de sodio (NaHCO ₃), Merck
Bisacrilamida, Promega
Bromosulfoftaleína, Merck
Carbonato de potasio (K ₂ CO ₃), Anedra
Cianuro de potasio (KCN), Anedra
Citrato de sodio, M&B
Cloruro de Calcio (CaCl ₂), Cicarelli
Cloruro de potasio, Mallinckrodt
Cloruro de Sodio (NaCl), Anedra
Cloruro férrico hexahidratado (FeCl ₃ · 6H ₂ O), Anedra
Dextrán 70, Applichem
Diacetil monoxima, MP
Fosfato de potasio diácido (KH ₂ PO ₄), Merck
Fosfato de potasio dibásico (K ₂ HPO ₄), Merck
Glicina, US Biological
Glucógeno, Merck
Glucosa, Biopack
Glutación oxidado, Sigma
Hidrato de Cloral, Parafarm
Hidróxido de potasio (KOH), Merck
Nicotinamida adenina dinucleótido (NADH), Sigma
Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), Sigma
NitroBlue tetrazolio (NBT), Sigma
Persulfato de amonio (APS), Anedra
Piruvato de sodio, ICN
Riboflavina, Sigma
Sulfato de magnesio (MgSO ₄), Anedra
Sulfuro de sodio (Na ₂ S), Aldrich
Taurocolato de Sodio, Sigma
Tiosemicarbazida, ICN
Tris base, Sigma
Urea, Anedra
Drogas líquidas
Ácido acético glacial, Sintorgan
Ácido clorhídrico (HCl), Anedra
Ácido fosfórico (H ₃ PO ₄), Sintorgan
Ácido perclórico (HClO ₄), Cicarelli

Ácido sulfúrico 95-98% (H ₂ SO ₄), Cicarelli
Bromuro de Etidio, Sigma
Butanol, Sintorgan
Cloroformo, Sintorgan
Disulfuro de dialilo (DADS), Aldrich
Etanol, Sintorgan
Formaldehído 37%, Anedra
Glicerina, Merck
Heparina, Sobrius
Metanol, Sintorgan
N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED), Merck
Peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂), Cicarelli
Solución HTK, Custodiol®
Solución UW, ViaSpan®
TriPure, Roche
Tritón X-100, Anedra
Kits Comerciales Wiener Lab.
Alanina aminotransferasa GPT (ALT)
Aspartato aminotransferasa GOT (AST)
Glicemia enzimática
Enzimas, SIGMA.
Catalasa
Glutación reductasa
superóxido dismutasa
α-amiloglucosidasa
Equipamiento
Baño ultrasónico: Cleanson
Baños termostatizados: Dubnoff, Lab-Line; Memmert y PolyScience.
Bomba peristáltica, Masterflex
Cámara Cannon PowerShot A 620
Celda para electroforesis de Ac. Nucleicos ENDURO™, LabNet
Celda para electroforesis de proteínas Mini-PROTEAN™ 3 Cell, BIO RAD
Equipo HPLC, Gilson
Espectrofotómetro Libra S22, Biochrom
Inyector de taurocolato, Sage Instruments
Microcentrífugas Universal 32 R ,Hettich y Minispin, Eppendorf.
Microscopio zeiss, Axiolab
Osmómetro crioscópico Osmomat030, Gonotec
pHmetros, Denver Instruments
Biological Oxygen Monitor 5300 y oxygen probe 5331, Yellow Spring Instruments
Transiluminador UV Labnet DyNA light, TM-26
Triturador de tejido Ultraturrax t-25 basic + UT-dispersible tool T25. IKA® Works

3.2 Animales.

Se utilizaron ratas adultas macho de la cepa Wistar cuyo peso corporal rondaba los 250-300 g. Todos los animales de laboratorio fueron obtenidos del Bioterio central de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas (FBioyF), UNR. Las ratas se mantenían en las instalaciones del Centro Binacional (Argentina – Italia) de Criobiología Clínica y Aplicada (CAIC) hasta el momento de la cirugía, en un ambiente climatizado (25 °C) con ciclos controlados de luz/oscuridad de 12 h. El agua y los alimentos fueron suministrados *ad libitum*. Los experimentos que involucraron estos animales se realizaron de acuerdo a las reglamentaciones internacionales para el cuidado y manejo de animales de laboratorio, y con protocolos aprobados por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y la comisión de bioética para el manejo y uso de animales de laboratorio de FBioyF, UNR (RESOLUCIÓN N° 899/2011). En el desarrollo de esta tesis se procuró utilizar el menor número de animales posibles y se tomaron las medidas para evitar, en el mayor grado posible, el sufrimiento de los mismos en todo momento.

3.3 Procedimientos quirúrgicos.

Todos los procedimientos fueron llevados a cabo en una sala diseñada específicamente para procedimientos quirúrgicos en animales de laboratorio, la cual cuenta con el mobiliario y material de cirugía necesarios como ser: mesa de cirugía, tabla adaptada como área de cirugía para animales pequeños con orificios para que escurra la sangre y sujetadores para el posicionamiento del animal, lámpara con lupa, lámpara infrarroja, material de cirugía, descartadores de material cortopunzante, llaves de suministro de carbógeno, aire acondicionado split, extractor de aire, etc.

3.3.1 Ablación a corazón batiente “donante clásico”.

Se realizó la ablación como se describe en Balaban y Col. (2011). Cada animal es previamente anestesiado mediante una inyección de hidrato de cloral (50 mg/100 g peso corporal, i.p.). Al comprobar que el animal ya no responde a los estímulos, el mismo es sujetado sobre el área de cirugía donde se lleva a cabo la apertura de la cavidad abdominal en forma de T invertida y se hepariniza vía vena femoral (100 µL de heparina 1000 UI/mL). El esófago es aislado mediante ligaduras y seccionado con el fin de facilitar la posterior remoción del hígado. Posteriormente, un catéter PE-50 (Intramedic USA) es fijado en el interior del conducto biliar (colédoco) y se procede con la cateterización de la vena porta con un catéter 14 G (Jelco® I.V., 2.10 mm de diámetro interno). El hígado comienza a perfundirse a través del catéter en porta con una solución Krebs-Henseleit oxigenada que se impulsa con una bomba

peristáltica (Masterflex, USA) a 15 mL/min para remover la sangre del órgano. La vena cava inferior abdominal es seccionada para liberar la presión dentro del órgano y luego ligada firmemente. Por último, se introduce un catéter de acero (3 mm de diámetro interno) en la vena suprahepática y se extrae el hígado, cuidadosamente, sin interrumpir la perfusión.

3.3.2 Ablación a corazón parado “donante marginal”.

Dicho procedimiento fue desarrollado como parte de la presente tesis y reportado en el Congreso Latino Americano de Órganos Artificiales y Biomateriales, COLAOB 2012 (Balaban y col., 2012). Cada uno de los animales es anestesiado y sujetado en el área de cirugía como se explicó anteriormente. Tras la apertura de la cavidad abdominal se procede con el aislamiento del esófago, cateterización de colédoco e introducción del catéter en porta; sin embargo, en lugar de iniciar la perfusión, se lleva a cabo inmediatamente la inyección por vía femoral de 300 μ L de heparina 500 UI/mL + KCl 1 M. El ión K^+ en altas concentraciones despolariza las membranas celulares del músculo cardíaco generando, en consecuencia, el arresto cardíaco dentro de los 30 segundos. Una vez detectado el cese del latido con estetoscopio se cronometran 45 minutos de duración de la isquemia caliente. Transcurrido este tiempo, se inicia la perfusión (10 mL/min) a través del catéter en porta con solución Krebs-Henseleit y se procede como se describió anteriormente hasta la remoción del hígado de la rata.

3.4 Preservación hipotérmica estática.

La técnica de preservación hipotérmica (PH) consiste, brevemente, en la inyección de una solución de preservación enfriada a través de los catéteres colocados en los vasos sanguíneos del órgano a ser ablacionado y la subsiguiente inmersión del mismo en un recipiente conteniendo medio de preservación y situado en un contenedor con hielo. La PH se basa en los efectos beneficiosos del descenso rápido de la temperatura y en la utilización de soluciones de preservación especialmente diseñadas con el fin de atenuar las injurias inherentes al proceso de ablación, conservación y trasplante del injerto. La baja complejidad de esta técnica sumada a las facilidades para el transporte, la convierten en la estrategia de elección para la práctica clínica (McAnulty J F, 2010).

Al finalizar la extracción del hígado del cuerpo del animal se interrumpe la perfusión con buffer Krebs-Henseleit para realizar un enjuague rápido con 20 mL de solución de preservación enfriada (4°C). Luego, el hígado es sumergido en 80 mL del medio de preservación, en un frasco de vidrio (Boeco 100 mL, Alemania). El frasco es cerrado y almacenado en una conservadora de que se mantiene en la heladera (4°C) durante 24 ó 48 horas dependiendo del grupo experimental en desarrollo.



Fig. 3.1 - Preservación hipotérmica estática de hígado de rata.

3.5 Soluciones de preservación en frío.

El éxito de un trasplante depende en gran parte del grado de conservación del órgano durante el tiempo que éste permanece fuera del organismo para que pueda recuperar rápidamente la función al restablecer el flujo sanguíneo en el cuerpo del receptor. Para ello, existen dos factores fundamentales:

- ❖ *Bajas temperaturas (0-4°C)*: permiten disminuir las demandas metabólicas del tejido durante su almacenamiento y/o transporte.
- ❖ *Composición del medio de preservación*: Las soluciones de preservación están especialmente diseñadas con el fin de disminuir, en el mayor grado posible, todos aquellos mecanismos de injuria generados por la isquemia fría (depleción de ATP, desbalance iónico, estrés oxidativo, inflamación, etc.)

Durante los experimentos llevados a cabo en el marco de la presente tesis doctoral se emplearon dos soluciones de preservación diferentes:

3.5.1 Solución de la Universidad de Wisconsin (UW) VIASPAN®.

Esta solución ha sido considerada el estándar de las soluciones de preservación para hígado desde 1989. Clasificada como una solución del tipo intracelular sus puntos estratégicos podrían resumirse en: prevención del edema celular (raffinosa, lactobionato), suplementación con precursores de ATP (Adenosina) y defensa antioxidante (Allopurinol, Glutatió reducido) (Guibert EE y col., 2011).

3.5.2 Solución Histidina, Triptófano y Cetoglutarato (HTK) CUSTODIOL®.

Desarrollada por Bretschneider fue diseñada originalmente para cirugías cardíacas pero en la actualidad compite con la solución UW en la preservación hepática y renal, experimental

y clínica (Meine MH y col., 2006). Se caracteriza por su bajo contenido en iones (Na^+ , K^+ , y Mg^{2+}) y baja viscosidad que la convierten en una solución segura para la liberación directa en el sistema circulatorio del receptor y de enfriamiento y lavado más rápidos. Sus componentes principales son la Histidina (alto poder amortiguador), Manitol (barrera osmótica), aminoácidos de baja permeabilidad (triptófano y ácido α -cetoglutámico) que estabilizan las membranas plasmáticas y son substratos para el metabolismo anaeróbico (Guibert EE y col., 2011).

Componente	UW (Viaspan®)	Custodiol®
Na^+	25	15
K^+	125	10
Mg^{2+}	5	4
Ca^{2+}	-	0.015
Cl^-	-	51.03
Gluconato	-	4.0
Fosfato	25	-
Sulfato	5	-
Bicarbonato	-	-
Glucosa	-	-
Glutación	3	-
Adenosina	5	-
Alopurinol	1	-
Rafinosa	30	-
Lactobionato	100	-
HES (g/L)	5%	-
Histidina	-	180
Triptófano	-	2
Cetoglutarato	-	1
Manitol	-	30
Ácido glutámico	-	-
Insulina (U/L)	40.0	-
Dexametasona (mg/L)	16.0	-
Penicilina G (UI/L)	200000.0	-
pH	7.40 (25°C)	7.02-7.20 (25°C)
Osmolalidad (mOsm/kg H_2O)	320	310

Tabla III.1 - Composición de las soluciones de preservación UW y HTK. Las concentraciones se expresan en mmol/L excepto cuando se especifica otra unidad. (Lee CY y col., 2009).

3.5.3 Dadores de sulfuro de hidrógeno (H_2S).

El período durante el cual el hígado ablacionado es almacenado hasta su reperusión puede ser empleado estratégicamente para la aplicación de maniobras farmacológicas destinadas a contener las injurias por isquemia/reperusión.

El H_2S , un miembro de la familia de los gasotransmisores con propiedades de citoprotección frente al estrés por isquemia/reperfusión (Nicholson CK y col., 2010), es suministrado a la solución de preservación (HTK ó UW) a través de dos compuestos dadores diferentes:

❖ Disulfuro de Dialilo (DADS).

El consumo de ajo (*Allium sativum*) como parte de la dieta, ha sido considerado beneficioso para la salud humana durante siglos. En particular, se lo ha podido relacionar con la reducción de múltiples factores asociados a enfermedades cardiovasculares y recientemente, se ha demostrado que el sulfuro de hidrógeno (H_2S) es quien estaría mediando esta actividad citoprotectora del ajo. El DADS es uno de los compuestos organosulfurados que pueden encontrarse en extractos de ajo y de acuerdo a los trabajos de Benavides GA y col. (2007) el mismo genera H_2S a través de una vía dependiente de grupos tioles.

La solución oleosa de DADS fue previamente diluida en Etanol absoluto para aumentar su solubilidad en soluciones acuosas y luego suministrada en distintas dosis a la solución de preservación comercial de elección momentos antes de almacenar el hígado extirpado.

- Solución UW Viaspan[®]: **3.4 mM**
- Solución HTK Custodiol[®]: **1, 5, 50 y 500 μ M**

❖ Sulfuro de Sodio (Na_2S).

El Na_2S se relaciona con el H_2S a través de un equilibrio ácido – base en solución. El Na_2S es un electrolito fuerte que libera el anión sulfuro S^{2-} y éste en medio acuoso se combina para formar HS^- y H_2S . Estas dos especies son las que contribuyen a la acción biológica del gasotransmisor H_2S .

El Na_2S fue disuelto en solución fisiológica y luego suministrado a la solución de preservación Custodiol en una concentración final de **10 μ M** momentos antes de almacenar el hígado extirpado. La elección de la dosis fue empírica, utilizando como guía los reportes de la concentración fisiológica del H_2S en sangre y datos de las experiencias en diferentes patologías y modelos de administración (Nicholson CK y col., 2010).

3.6 Sistema de perfusión de hígado de rata aislado (IPRL)

La técnica de perfusión *ex vivo* cuenta con una larga trayectoria dedicada a reproducir, con la mayor exactitud posible, las condiciones bajo las cuales se encuentra el órgano en el cuerpo del animal. Aunque es un enfoque limitado en comparación con el trasplante experimental, presenta como ventajas la posibilidad de monitorear el daño celular y la función

hepática durante todo el experimento, evitando procedimientos invasivos en otro animal de laboratorio (Bessems M y col., 2006; Rodríguez JV y col., 1999).

Una vez retirado el hígado del medio de preservación es situado en el soporte del sistema (fig. 3.2) para dar comienzo a una perfusión de estabilización con buffer Krebs-Henseleit de aproximadamente 15 minutos en un circuito no recirculante. Parámetros como la presión portal, temperatura y el pH son llevados gradualmente hacia la condición fisiológica: 100-140 mmH₂O de presión hidrostática, 37°C y pH=7.40. Posteriormente, el medio de perfusión se reemplaza por Krebs-Henseleit+Dextrán (2 %) constantemente oxigenado a través de un oxigenador tipo Hamilton presurizado (atmósfera de Carbógeno 90-120 mm Hg). Los hígados son reperfundidos durante 90 min en un circuito cerrado con una presión portal constante, regulada a través de una bomba de perfusión peristáltica. Una solución de taurocolato de sodio 300 µM es inyectada al medio de perfusión a una velocidad de 0.2 mL/min a lo largo del experimento con el fin de sostener la producción biliar. La temperatura del órgano se mantiene en 37°C con una lámpara infrarroja y al mismo tiempo el perfusato es mantenido a temperatura por la acción de un baño que recircula agua a una camisa de intercambio de calor. Periódicamente se toman muestras del perfusato para analizar parámetros de integridad y funcionalidad celular (ej. Liberación de enzimas citosólicas, consumo de oxígeno, excreción de un colorante en bilis, producción de urea). Además, se determina la velocidad de secreción de bilis y se registran los cambios en el flujo de perfusión con los cuales se calcula el nivel de resistencia intrahepática.

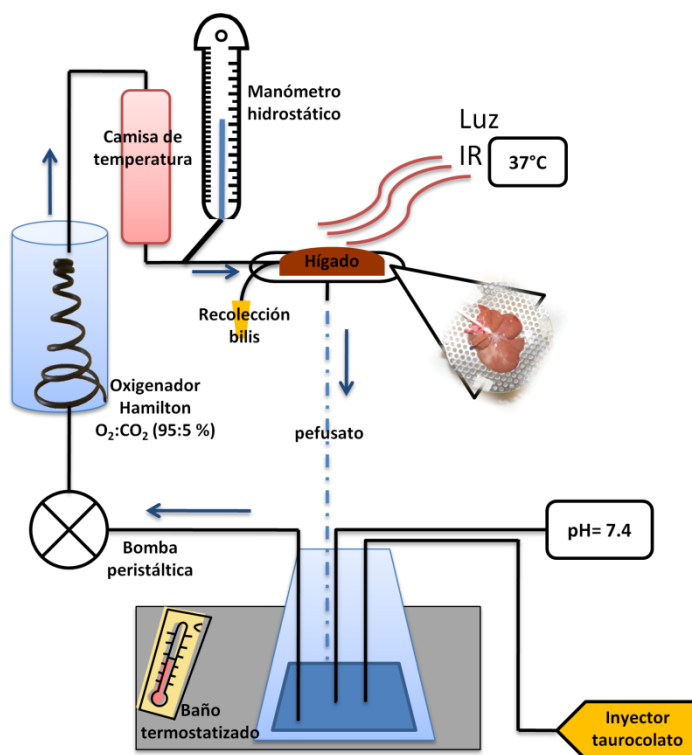
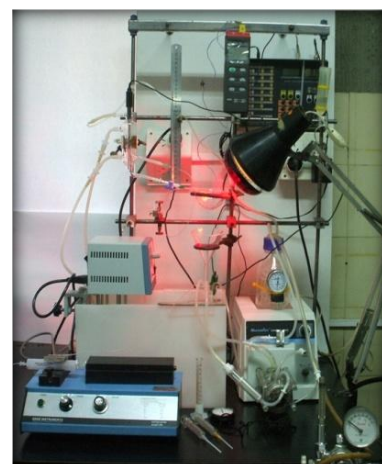


Fig. 3.2 - Sistema de perfusión de hígado de rata aislado (IPRL). Esquema del circuito con sus componentes (las flechas azules indican el sentido de la perfusión) y fotografía del equipo.



3.7 Parámetros estudiados durante la reperfusión.

3.7.1 Resistencia intrahepática (RI).

El IPRL puede funcionar a presión o flujo controlados según cual es el parámetro que se mantendrá constante y cual varía según la respuesta del órgano. En estos experimentos la presión de perfusión se mantuvo constante y cercana a los 8 mmHg y el flujo de perfusión resultó ser una variable sujeta a la resistencia intrahepática, evitando así el daño extensivo a las células endoteliales. El parámetro resistencia intrahepática constituye un reflejo del estado de la microvasculatura: la resistencia aumenta en respuesta a la vasoconstricción y obstrucciones producto de la injuria por isquemia/reperfusión en células endoteliales de los sinusoides (Rodríguez JV y col., 1999).

La RI se calculó a través del flujo de perfusión (FP), el cual fue determinado cada 15 min con un cronómetro y midiendo el volumen de fluido en una probeta:

$$RI \text{ (mmHg.min.g hig.mL}^{-1}\text{)} = \text{presión portal (mmHg)} \div \text{FP (mL.min}^{-1}\text{.g hig}^{-1}\text{)}$$

3.7.2 Producción de bilis (PB).

Una apropiada producción biliar durante los experimentos de perfusión de hígado aislado indica que el órgano conserva en buen estado la red de conductillos biliares que nacen entre los hepatocitos y desembocan en el colédoco y además, cuenta con las reservas energéticas que se requiere para el transporte activo de sales biliares a través de la membrana de los hepatocitos. El volumen de bilis en los tubos de recolección se estimó gravimétricamente asumiendo una densidad igual a la del agua (1 g/ml) con una frecuencia de 15 min.

$$PB \text{ (}\mu\text{L.min}^{-1}\text{.g hig}^{-1}\text{)} = \mu\text{L de bilis} / (15 \text{ min} * \text{g hig})$$

3.7.3 Consumo de oxígeno (ConsO₂).

La captación de O₂ del medio de perfusión es, en primera instancia, un indicador de viabilidad celular ya que sólo las células vivas podrán consumir O₂. Además, brinda información acerca del estado metabólico del hígado y funcionamiento de las mitocondrias.

Para el cálculo del ConsO₂ se utilizó un dispositivo sensor de oxígeno (Biological Oxygen Monitor YSI, modelo 5300, equipado con una sonda para Oxígeno YSI 5331, Yellow Springs, Ohio, USA) en muestras de perfusato tomadas previo a la entrada al hígado y en la salida del mismo cada 30 min.

$$\text{ConsO}_2 \text{ (}\mu\text{mol O}_2\text{.min}^{-1}\text{.g hig}^{-1}\text{)} = (C_e - C_s) * \text{FP (mL.min}^{-1}\text{.g hig}^{-1}\text{)}$$

Con C_e y C_s como las concentraciones de oxígeno en el perfusato al entrar al hígado y al salir de él respectivamente.

$$C_{e/s} (\mu\text{mol O}_2 \cdot \text{mL}^{-1}) = p\text{O}_2 (\text{kPa}) * S_{\text{O}_2} \text{ a } 37^\circ\text{C} (0,01056 \mu\text{mol O}_2 \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{kPa}^{-1})$$

Se calculó la $p\text{O}_2$ asociada conociendo la presión atmosférica del día en que se llevó a cabo el experimento (<http://espanol.weather.com/weather/almanac-Rosario-ARXX5294:1:AR>), según los cálculos de Gnaiger E (2010).

3.7.4 Síntesis de urea.

La síntesis de urea en el hígado es la principal ruta de eliminación del Nitrógeno del organismo. Las enzimas del ciclo de la urea comienzan a disminuir su actividad cuando el hígado entra en disfunción por alguna patología, por lo tanto, este parámetro es un buen indicador de funcionalidad metabólica del hígado (Butterworth RF y Vaquero J, 2009). La concentración de urea en perfusato fue determinada cada 30 min mediante una técnica colorimétrica con diacetil monoxima (Rahmatullah M y col., 1980; Butler AR y col., 1981). Brevemente, las muestras de perfusato fueron desproteinizadas con ácido perclórico (5 %), centrifugadas 3 min a 14000 g e incubadas 10 minutos a 100°C con el reactivo de trabajo para urea (ver soluciones y buffers sección 3.14). Luego, se leyó absorbancia a $\lambda=525$ nm utilizando una curva de calibración Urea vs. ABS_{525} (50-1000 μM) para obtener la concentración en la muestra. Los resultados se expresaron en $\mu\text{M urea} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g hig}^{-1}$.

3.7.5 Excreción de Bromosulfoftaleína (%BSF).

La función hepática también puede evaluarse a través de la capacidad de eliminación de sustancias extrañas de la circulación. La eliminación de BSF de la circulación consiste en la captación de este colorante a través de transportadores en las membranas de los hepatocitos, conjugación a la molécula de glutatión reducido y transporte activo al canalículo biliar para su excreción. El porcentaje de excreción de BSF se verá disminuido cuando alguno de los mecanismos mencionados se encuentre alterado (Talwar GP y col., 2003).

Al comenzar el experimento de reperfusión aislada se administró una única dosis de 5 mg de BSF al medio de perfusión y se recolectó bilis tal como se informó anteriormente. Para la determinación de BSF, las muestras de bilis fueron diluídas (1/240) en NaOH 0.1 N para leer absorbancia a $\lambda=580$ nm; la concentración de BSF en bilis fue calculada en base a una curva de calibración BSF vs. ABS_{580} (0.5-10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Los resultados se expresaron en % de BSF excretado en bilis a los 90 min de reperfusión.

3.7.6 Conjugación de BSF a GSH.

Una de las fases más importantes en la eliminación de BSF consiste en la conjugación de ésta a la molécula de Glutati6n (GSH) dentro del hepatocito, de 6sta manera el xenobi6tico es reconocido por complejos proteicos transportadores para su eliminaci6n en bilis. La presencia de conjugados BSF-GSH en muestras biliares estaría indicando el funcionamiento adecuado de la maquinaria de conjugaci6n y transporte transmembrana, la presencia de los sustratos necesarios y una morfología conservada de los tejidos.

Para evaluar el grado de conjugaci6n BSF-GSH, las muestras de bilis fueron analizadas por cromatografía en capa delgada donde pudieron observarse 4 especies: BSF libre, BSF-GSH, BSF-Cys y BSF-Cys-Gly; las dos últimas son producto de la hidrólisis del tripéptido GSH en la muestra. Las muestras se sembraron en placas de vidrio recubiertas de celulosa (CEL 300-10, MN, Alemania) y se separaron en fase móvil butanol:ácido acético (40:8 %). A continuaci6n, se nebulizó una soluci6n KOH (2.5 N) en etanol bajo campana para el revelado de las bandas y, finalmente, se digitalizaron las placas para ser analizadas con el programa Image J 1.44p (National Institutes of Health, USA). Los resultados se expresan en porcentaje de BSF-GSH (incluyendo sus productos de degradaci6n) respecto de la cantidad total de BSF sembrada.

3.7.7 Liberaci6n de enzimas intracelulares (LDH, AST y ALT).

Los hepatocitos constituyen cerca del 70 % de la masa total del hígado, por lo tanto, cuando se generan daños en la membrana plasmática o la lisis celular, las enzimas hepatocelulares se liberan y su actividad puede ser fácilmente detectada en el medio de perfusi6n. Aunque la Aspartato transaminasa (AST) no es una enzima específica de hígado es un buen marcador de daño en el IPR. AST se encuentra tanto en citoplasma como en mitocondrias, su incremento en el perfusato es seña de un daño severo ($AST/ALT > 1$). La enzima Alanina transaminasa (ALT) se localiza mayormente en citoplasma y su liberaci6n se produce incluso ante injurias leves ($AST/ALT < 1$). La enzima Lactato deshidrogenasa (LDH) se localiza en citoplasma de hepatocitos y células no parenquimatosas del hígado por lo cual constituye un buen marcador general de daño en el tejido (Bessemis M y col., 2006).

Las actividades de las enzimas ALT y AST se determinaron con kits comerciales (Método UV optimizado (IFCC) UV AA, Wiener Lab.). Muestras de perfusato de 0, 30, 60 y 90 min fueron incubadas con el reactivo según las instrucciones del fabricante y se siguió la cinética de desaparici6n del NADH durante 3 minutos (lectura cada 45 seg) a $\lambda = 340 \text{ nm}$ y 37°C .

La actividad LDH se determinó con un kit elaborado en el laboratorio (ver secci6n 3.14) y se procedió de la misma forma que con las otras dos enzimas.

La pendiente de la curva ABS vs. tiempo ($\Delta\text{Abs}/\text{min}$) se utilizó para el cálculo de la concentración enzimática:

$$[\text{enzima}] \text{ U/L} = (\Delta\text{Abs}/\text{min}) * V / (b * \epsilon^{\text{NADH}} * v)$$

V, v = volumen de reacción, volumen de muestra.
 b = paso óptico (1 cm)
 $\epsilon^{\text{NADH}} = 6,22 \text{ mL. moles}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

3.8 Contenido de glucógeno.

La reserva hepática de glucógeno es importante como fuente de ATP durante el período de preservación hipotérmica y reperfusión del órgano (Quintana y col., 2005). Aquellos hígados que mantengan sus depósitos de glucógeno, cuentan con una importante fuente de energía para enfrentar los daños asociados a la isquemia/reperfusión.

Luego de la reperfusión de los hígados se tomaron muestras de tejido para la determinación de glucógeno, las mismas fueron almacenadas a -20°C hasta el momento de la determinación. Las reservas de glucógeno fueron determinadas según Carr S y col. (1984). Las porciones de tejido se disgregaron en buffer citrato (0.1 M, pH=5.00) utilizando la herramienta Ultraturax[®]. El extracto hepático fue alicuotado en 2 fracciones y se efectuó una inactivación enzimática por calentamiento a 100°C . Una de las alícuotas fue tratada con la enzima α -amiloglucosidasa (0,5 % α -amiloglucosidasa en buffer citrato) por 2 horas en un baño a 55°C y la otra fue utilizada como blanco de la reacción de digestión del glucógeno. Finalmente, las muestras fueron centrifugadas durante 5 min a 14000 g y se determinó el contenido de glucosa libre (proveniente de la digestión del glucógeno) en el sobrenadante con un kit de glicemia enzimática AA Wiener Lab.

Para el cálculo del contenido de glucógeno se construyeron 2 curvas de calibración:

1. Glucosa (glu) vs. ABS_{505} (5-40 μg) $\rightarrow \text{ABS}_{505} = m_1 * \mu\text{g glu} + y_1$
2. Glucógeno (gno) vs. ABS_{505} (5-40 μg) $\rightarrow \text{ABS}_{505} = m_2 * \mu\text{g gno} + y_2$

$$\text{Glucógeno (mg/g hig)} = R_m * (\text{mg glucosa/g hig})$$

$$R_m = m_1/m_2 = \mu\text{g gno}/\mu\text{g glu}$$

3.9 Contenido de Malondialdehído.

Las especies reactivas del oxígeno (ERO) se encuentran involucradas en varios desórdenes patológicos asociados a la preservación de órganos para trasplante.

Uno de los fenómenos principales de injuria celular mediado por las ERO es la lipoperoxidación lipídica, este proceso comienza con la descomposición del peróxido de hidrógeno mediada por hierro (Fe^{2+}) que resulta en la generación del radical hidroxilo (HO^\cdot)

(reacción de Fenton) el cual da inicio a una reacción en cadena que lleva a la destrucción de los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares (Jaeschke H y col., 2012).

El malondialdehído (MDA) es un di-aldehído de tres carbonos, producto de la fragmentación espontánea de los lipoperóxidos generados, por lo que su concentración en el tejido constituye un marcador de daño por estrés oxidativo.

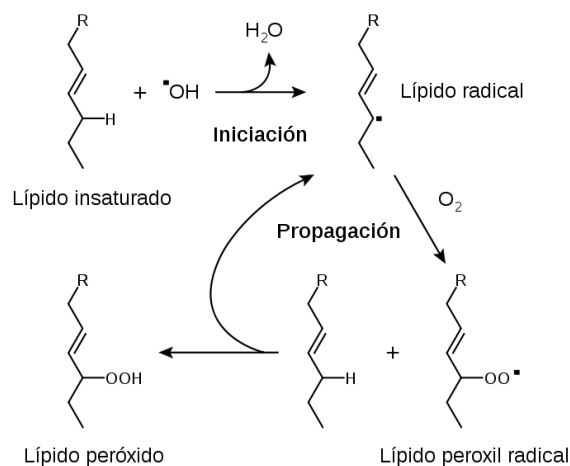


Fig. 3.2 - Lipoperoxidación lipídica.

La estimación del contenido de MDA se realizó mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC), una técnica que ofrece alta sensibilidad y especificidad (Karatat F y col., 2002). El equipo de HPLC Gilson utilizado para estas determinaciones de MDA consta de una bomba Gilson 307, una pre-columna (Phenomenex - AJO 4287), una columna Luna 5 μ C18(2) column (250 mm \times 4,6 mm) (Phenomenex - 00G-4252-E0) y un detector UV-VIS Gilson 151 para la lectura a una longitud de onda de 254 nm.

Las muestras de tejido post-reperfusión fueron almacenadas en LN_2 hasta el momento de la determinación. Las porciones de tejido se disgregaron en buffer KPET (ver sección 3.14) utilizando la herramienta Ultraturax[®]. Los extractos hepáticos fueron desproteinizados con HClO_4 (2 %) y se obtuvieron los sobrenadantes por centrifugación (4°C, 20000 g). Los sobrenadantes diluidos 3:10 en H_2O se filtraron con filtros PES de 0.2 μm (Nalge, cat. 0001801320) antes de ser inyectados en el sistema (volumen de inyección: 20 μL). La elución de las muestras se realiza de forma isocrática con una fase móvil KH_2PO_4 (30 mM):Metanol (65:35 %) pH 4,00 y se trabaja a un flujo de 0,80 mL/min. Al inyectar una solución testigo de MDA (ver sección 3.14) se obtuvo un tiempo de retención de 10.60 ± 0.33 [min].

El contenido de MDA en el tejido se expresó como **nmol/g hig.**

3.10 Contenido de Glutación total y relación GSHreducido/GSHoxidado.

Dentro de las células el tripéptido glutación (γ -glutamil cisteinil glicina) existe en dos formas: la forma mayoritaria, que es la reducida (GSH), y la forma oxidada (GSSG). El GSH es capaz de neutralizar las ERO que se generan en el desarrollo de diferentes cuadros patológicos. El estrés oxidativo tiene un efecto profundo en el balance de estas dos especies ya que dicha molécula es el principal compuesto antioxidante de la célula.

La determinación del contenido de glutación se llevó a cabo por el “método enzimático de reciclado” (Griffith OW, 1980), basado en la oxidación del GSH por el reactivo de Ellman, ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB), para dar un producto de color amarillo 2-nitro-5-tiobenzoato (TNB) que es detectable espectrofotométricamente a una $\lambda = 412$ nm. Durante la reacción la enzima Glutación Reductasa (GR) y su cofactor NADPH, vuelven a reducir al glutación reciclándolo constantemente.

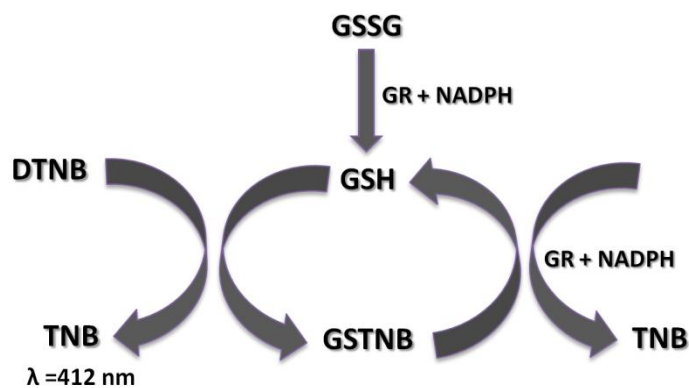


Fig. 3.3 - Reacci3n de reciclado del Glutati3n.

Las muestras de tejido post-reperfusi3n fueron almacenadas en LN2 hasta el momento de la determinaci3n. Las porciones de tejido se disgregaron en buffer KPET (ver secci3n 3.14) utilizando la herramienta Ultraturax[®]. Los extractos hepáticos fueron desproteinizados con HClO₄ (2 %) y se obtuvieron los sobrenadantes por centrifugaci3n (4°C, 20000 g). El sobrenadante se neutraliz3 con el agregado de K₂CO_{3(s)} y se fraccion3 en 2 tubos para determinar glutati3n total y glutati3n oxidado respectivamente. El tubo de la determinaci3n de GSSG, se incub3 con 2-vinilpiridina (2 μ L/100 μ L de sobrenadante) 1 h a temperatura ambiente para enmascarar el glutati3n reducido impidiendo que participe de la reacci3n de reciclado. La velocidad a la cual se genera el TNB es monitoreada en una cubeta durante 3 min (lectura cada 30 seg) a $\lambda = 412$ nm y 32°C (ver mezcla de reacci3n en secci3n 3.14). La cantidad de GSH presente en la muestra se obtiene a trav3s de una curva de calibraci3n Δ ABS₄₁₂/min vs. GSH (0.5-4 nmol). El resultado se expres3 de la siguiente forma:

$$\mu\text{mol GSH/g hig} = (\Delta\text{ABS}_{412}/\text{min}) * F / (v * \text{ghig/mL})$$

F= pendiente de la curva de calibración y factores de dilución

v= volumen de muestra

g hig/mL= concentración extracto hepático

$$GSH/GSSG = (GSH_{total} - GSH_{oxidado}) / GSH_{oxidado}.$$

3.11 Actividad enzimática antioxidante.

Las enzimas Superóxido Dismutasa (SOD, EC 1.15.1.1) y Catalasa (CAT, EC 1.11.1.6) forman parte de los principales sistemas antioxidantes en células de mamíferos. Mediante las reacciones que catalizan (fig 3.4), dos especies peligrosas ($O_2^{\cdot -}$ y H_2O_2) son transformadas en dos especies seguras para la célula (H_2O y O_2).

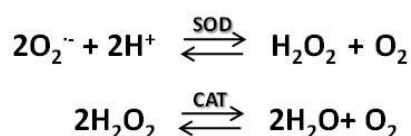


Fig. 3.4 - Reacciones de neutralización de EROs catalizadas por SOD y CAT.

Las muestras de tejido post-reperfusión fueron almacenadas en LN2 hasta el momento de la determinación. Las porciones de tejido se disgregaron en buffer fosfato (ver sección 3.14) utilizando la herramienta Ultraturax[®]. Los extractos fueron sometidos a sonicación en 2 períodos de 30 s y se obtuvieron los sobrenadantes por centrifugación (4°C, 20000 g). Estas preparaciones fueron utilizadas para las siguientes determinaciones.

3.11.1 Actividad Catalasa.

El ensayo consiste en seguir espectrofotométricamente la cinética de descomposición del H_2O_2 por la catálisis enzimática de la CAT como se describe en Aebi (1984). La descomposición enzimática del H_2O_2 es una reacción de pseudo-primer orden, donde la velocidad depende de la concentración del sustrato. A través del ensayo de cinética enzimática se obtuvo la constante de velocidad de la reacción (k), parámetro directamente relacionado al nivel de actividad de esta enzima en el tejido.

La reacción se desarrolló a temperatura ambiente (20-25°C) en una cubeta de cuarzo conteniendo la muestra y mezcla de reacción (ver sección 3.14), se leyó ABS a $\lambda = 240$ nm durante 1 min (lectura cada 10 s). Se confeccionó, en paralelo, un blanco de reacción sin H_2O_2 . A partir de los datos obtenidos se procedió a graficar el $\ln ABS_{240}$ vs. tiempo de donde se obtuvieron los parámetros de la siguiente ecuación: $\ln abs_t = -k \cdot t + \ln abs_0$

En la figura 7 se observan las curvas obtenidas durante la puesta a punto de la reacción con un testigo de Catalasa bovina de Sigma. Una vez obtenido los valores de k para cada muestra, la actividad Catalasa se expresó como: **k/g hig.**

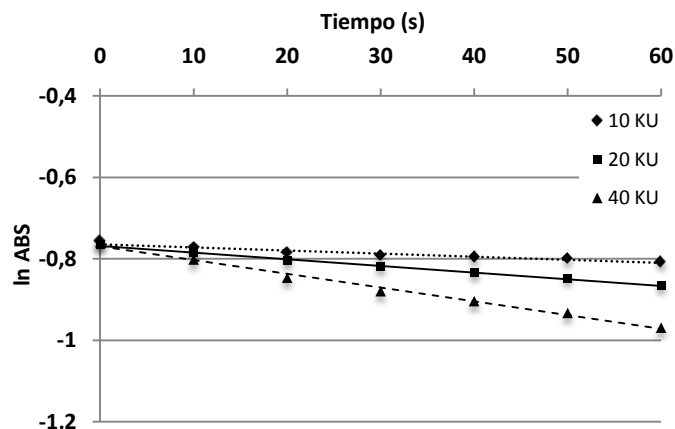


Fig. 3.5 - Curvas $\ln \text{ABS}_{240}$ vs tiempo para cantidades crecientes de Catalasa Bovina en el medio de reacción. $k^{10\text{KU}}=8.10^{-4}$, $k^{20\text{KU}}=16.10^{-4}$ y $k^{40\text{KU}}=34.10^{-4}$.

3.11.2 Actividad Superóxido Dismutasa.

La actividad SOD se estudió en geles de actividad, los cuales requieren una menor cantidad de proteína que el método bioquímico y permiten una buena apreciación visual de los resultados. La técnica se basa en la interacción del anión $\text{O}_2^{\bullet-}$ con el NBT en la que el tetrazolio amarillo es reducido para dar un precipitado azul dentro del gel, áreas acromáticas aparecen donde se encuentra la SOD activa compitiendo con el NBT por el $\text{O}_2^{\bullet-}$. Las enzimas MnSOD y CuZnSOD pueden ser diferenciadas por la presencia de Cianuro (KCN) en la solución de tinción, el cual inhibirá la actividad CuZnSOD (Weydert CJ y col., 2010).

La concentración de proteína de los extractos hepáticos se determinó por el método de Biuret (Olson BJ y col., 2007). Las muestras (50 μg de proteínas totales) fueron sembradas en geles de poliacrilamida/bisacrilamida al 12 % y separadas por electroforesis (80 V gel concentrador, 120 V gel de resolución) en condiciones no desnaturizantes. Posteriormente, los geles fueron incubados en oscuridad con la solución de tinción para actividad SOD y MnSOD específica durante 20 min con agitación (ver sección 3.14). El revelado se llevó a cabo bajo luz fluorescente directa hasta la aparición de una coloración violeta intensa (5-10 min), luego se digitalizaron las imágenes para poder analizarlas con el programa ImageJ 1.44p (National Institutes of Health, USA). Este programa transforma la intensidad de las bandas en picos cuyas áreas puede integrarse como se observa en la fig 3.6 La actividad enzimática se expresó como el cambio relativo entre las diferentes muestras sembradas dándole el valor arbitrario de 1 a la muestra del grupo Control (hígados recién ablacionados).

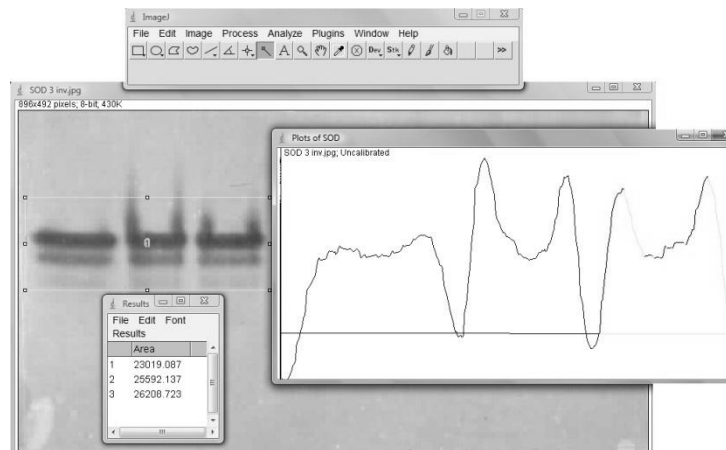


Fig. 3.6 - Análisis de las imágenes digitalizadas con el programa Image J.

3.12 Estudios de expresión génica.

Mediante la técnica de retrotranscripción seguida de PCR en tiempo real se llevaron a cabo los estudios de expresión de genes relacionados con la respuesta al estrés por hipoxia e implicados en la actividad citoprotectora del H₂S. Estos estudios fueron realizados en el marco de una pasantía en el exterior con una beca de Boheringer Ingelheim Fonds, en el Centro Studi Fegato de la ciudad de Trieste-Italia.

3.12.1 Extracción de ARN.

El ARN total fue extraído de tejido hepático almacenado en LN2 utilizando el reactivo TriPure (Roche, Alemania) según las instrucciones del fabricante. Aproximadamente 10 mg de tejido hepático fueron homogeneizados con 1 mL de TriPure en un cilindro de vidrio con pilón de teflón (Potter-Elvehjem). El homogenado fue transferido a un tubo de microcentrifuga y se centrifugó durante 10 min a 4°C y 12000 g. Luego, se llevó a cabo una primera extracción con 200 µL de cloroformo seguida de 15 min de centrifugación a 4°C y 12000 g de la cual se recuperó la fase superior acuosa. El segundo agregado de cloroformo fue de 80 µL, luego de la centrifugación se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo y se agregaron 500 µL de Etanol absoluto. Llegado este punto en la extracción, los tubos con todas las muestras a estudiar fueron preparados para su envío postal a la ciudad de Trieste-Italia, donde finalmente se procedió con la retrotranscripción y PCR en tiempo real. El envío demoró 72 h y las muestras fueron almacenadas en freezer de -70°C hasta continuar con la extracción. En el laboratorio del Centro Studi Fegato las muestras fueron centrifugadas 10 min a 12000 g y 4°C y, a continuación, se realizó un lavado del ARN precipitado con etanol al 75 %. El ARN precipitado se dejó secar durante 5-10 min y luego se resuspendió en 50 µL de agua destilada estéril. Las preparaciones de ARN fueron almacenadas a -70°C.

3.12.2 Integridad y concentración del ARN.

La integridad del ARN aislado fue analizada en geles de agarosa al 1.5 % con Bromuro de Etidio (0.3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) como el de la figura 3.7. Se sembraron 2 μg de ARN de cada muestra en el gel y se llevó a cabo una corrida electroforética de 15 min a 100 V.

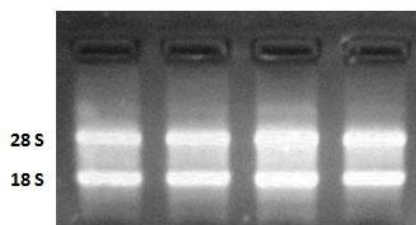


Fig. 3.7 - Extracciones de ARN en gel de agarosa con EBr.

La concentración de ARN de cada muestra se determinó espectrofotométricamente considerando que una solución de concentración 40 mg/mL de ARN genera 1 U de Absorbancia a 260 nm. A su vez, para estimar la pureza de las preparaciones, se constató que las relaciones A260/A280 y A260/A230 fueran mayores a 1.

3.12.3 Retrotranscripción y PCR en tiempo real.

El ADNc fue sintetizado a partir de 1 μg de RNA total con el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (oligos al azar + retrotranscriptasa multiScribe[®], Applied Biosystems, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. La transcripción reversa fue llevada a cabo en un termociclador (Gene Amp PCR System 2400, Perkin-Elmer, Boston, MA, USA) con el siguiente protocolo: 10 min a 25°C, 120 min a 37 °C y 5 min a 85 °C. El ADNc se almacenó a -20 °C.

La RT-PCR se realizó en un equipo iCycler IQ (Bio Rad laboratories, Hercules, CA, USA). Los transcriptos de β -actina y 18S se utilizaron como controles endógenos para la normalización de los niveles de expresión de los genes blanco. Los oligonucleótidos se diseñaron mediante el programa Beacon Designer 2.0 (PREMIER Biosoft International, Palo Alto, CA, USA) y sintetizados por Sigma Life Science, USA. 30 ng de ADNc fueron amplificados con los oligos específicos para los genes: HO-1, TNF- α , GSR, Bcl-2, Nrf-2, NQO-1, β -actin, y 18S. Cada reacción llevó 1x iQ SYBR Green Supermix (100 mM KCl; 40 mM Tris-HCl, pH 8.4; 0.4 mM cada dNTP; 50 U/mL iTaq DNA polimerasa; 6 mM MgCl₂; SYBR Green I; 20 nM fluoresceína; y estabilizadores) volumen final: 15 μL . Cada muestra fue amplificada por duplicado y para cada gen analizado se incluyó un control negativo sin molde. El protocolo utilizado por el termociclador consistió en una primera etapa de 3 min a 95 °C seguida de 40 ciclos de 20 s a 95°C, 20 s a 60°C y 30 s a 72°C.

La especificidad de la amplificación con cada par de oligonucleótidos se analizó mediante la construcción de curvas de fusión de acuerdo al siguiente termociclado: 1 minuto a 95 °C + 1 min a 55 °C, seguidos de 80 ciclos (10 s cada uno) con incrementos de 0.5°C partiendo de 55°C. No se hallaron productos inespecíficos de PCR en ningún caso.

A partir de un pool de los ADNc se generó una dilución seriada de 5 puntos (125, 25, 5, 1 y 0.2 ng) y se construyeron las curvas estándares log ng ADNc vs. Ct, para cada par de oligonucleótidos. La pendiente de dichas gráficas (p) se utilizó en el cálculo de la Eficiencia de amplificación (E) de cada par de oligos según: $E = 100 \times (10^{\frac{-1}{p}} - 1)$

Gen blanco	N° de acceso	Tamaño del amplicón	cebador directo	cebador reverso
18S	X_01117	150 pb	TAACCCGTTGAACCCATT	CCATCCAATCGGTAGTAGCG
B-actin	NM_031144	79 pb	CAACCTTCTTGCAGCTCCTC	GACGAGCGCAGCGATATC
HO-1	NM_012580	76 pb	GGTGATGGCCTCCTTGTA	ATAGACTGGGTTCTGCTTGT
TNF- α	NM_012675	139 pb	TGTCTACTGAACTTCGGGGTGATC	CGTGGGCTACGGGCTTGTC
GSR	NM_053906	125 pb	CGTGGATTACGGCTTTCA	CGATGTGGGACTTGGTTA
Bcl-2	L_14680	123 pb	TCTGTGGATGACTGAGTA	AGCCAGGAGAAATCAAAC
Nrf-2	NM_031789	133 pb	AGCACAGCCAACACATTCTTC	TTGATGACCAGGACTCACAGG
NQO-1	NM_017000	122 pb	TGCTTTCAGTTTTCGCCTTT	GAGGCCCTAATCTGACCTC

Tabla 3.II - Listado de cebadores diseñados para la PCR en tiempo real.

Los resultados se normalizaron con los genes constitutivos seleccionados: β -actina y 18S. La cantidad inicial del transcripto de interés se informó como el cambio relativo en la expresión respecto de la muestra de referencia (Grupo control, hígados recién ablacionados) a la cual se le asigna el valor 1. Para el cálculo de la expresión relativa se utilizó el programa iCycler™IQ Optical system, versión 3.1 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) el cual aplica la modificación de Pfaffl en la fórmula del $\Delta\Delta C_t$ que considera las eficiencias individuales de cada par de oligonucleótidos (Pfaffl, 2001; Tichopad y col., 2004).

3.13 Estudios histológicos.

Para el análisis histológico luego de la reperusión ex vivo se utilizó la tinción de Hematoxilina/Eosina. Para ello, las muestras de tejido de los distintos grupos experimentales se fijaron en una solución de formaldehído al 10 % en PBS, se procedió a deshidratarlas y embeberlas en parafina para luego generar secciones de 5 μ m que se montaron en portaobjetos para la tinción. El método consistió en una fase inicial de coloración de los

núcleos en color violáceo, con hematoxilina y una segunda fase de contraste citoplasmático y componentes extracelulares en tonalidades rosadas, con eosina. Las observaciones están enfocadas tanto en el estado de la morfología de los sinusoides, como en el nivel de daño presentado por los hepatocitos. Para la semi-cuantificación de las observaciones se examinan, mediante microscopía de campo claro, al menos 30 campos elegidos al azar de 3 biopsias fijadas para cada grupo experimental. Las imágenes tomadas (objetivo 40X) son procesadas con el programa de computación Image J (NIH) que permite la superposición de grillas de 80 puntos sobre la imagen facilitando la contabilización de los siguientes signos de injuria: Dilatación sinusoidal, Vacuolas y daño en cel. endoteliales (Pizarro y col., 2009).

Para el estudio morfométrico se eligieron tres signos de injuria que comúnmente se hallan en la histología de un hígado sometido a isquemia/reperfusión:

- **Dilatación sinusoidal:** ensanchamiento del espacio delimitado por 2 cordones hepatocitarios, producto de la alteración en la microcirculación.
- **Vacuolización:** las vacuolas intracitoplasmáticas pueden asociarse a la extensión del daño hepatocelular.
- **Células endoteliales sueltas:** redondeo y desprendimiento de las células endoteliales que conforman el revestimiento de los sinusoides como consecuencia de la pérdida de viabilidad y alteraciones en la microcirculación.

3.14 Soluciones y buffers

- ❖ **Krebs-Henseleit (KH):** Este buffer es de uso estándar para la perfusión del hígado aislado (Bessemers M y col., 2006). En los experimentos realizados, se utilizó durante la perfusión en la cirugía y en la primera etapa de la reperfusión.

Componente	Concentración (mM)
NaCl	118.00
KCl	4.80
KPO ₄ H ₂	1.20
CaCl ₂	1.50
MgSO ₄	1.20
NaCO ₃ H	25.0
Glucosa	5.00
Heparina	2.00 UI/mL
Saturación con carbógeno (O ₂ :CO ₂ , 95:5%) durante 20 min	
Osmolalidad= 300-310 mOsm/Kg H ₂ O, pH final= 7.40.	
Filtración previa utilización.	

Tabla 3.III - Composición del buffer KH.

- ❖ **Krebs-Henseleit + Dextrán (KHD):** Fue utilizado como perfusato durante la perfusión del hígado en el sistema recirculante. El Dextrán (PM promedio 64-74 kDa) al 2 % proporciona las propiedades osmóticas coloidales adecuadas.
- ❖ **Mezcla de reacción para determinación de H_2S :**
 - Buffer fosfato de potasio 0.1 M
 - 0.1 mM DTNB
- ❖ **Reactivo de trabajo para urea:** 2 partes sol. 1 + 1 parte sol. 2
 - Sol. 1: 10 % H_3PO_4 , 30 % H_2SO_4 , 0.37 mM $FeCl_3 \cdot 6H_2O$
 - Sol. 2: 0.5 % diacetil monoxima, 0.01 % tiosemicarbazida
- ❖ **Kit para actividad LDH:**
 - 50 mM fosfato de potasio + 0.63 mM piruvato de Na, pH=7.50
 - Solución NADH 13.1 mM: 0.3 M NADH + 1.2 M $NaHCO_3$
- ❖ **Buffer fosfato para extractos hepáticos (KPET):** Buffer fosfato de potasio 0.1 M + EDTA 5 mM + 0.1% de Tritón X-100 (1%), pH= 7.50.
- ❖ **Solución testigo MDA:** El compuesto 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP) diluido 1:1000 en HCl 0.1 M, es llevado a ebullición durante 5 min. Se determinó espectrofotométricamente la concentración exacta de MDA a $\lambda = 245$ nm (coeficiente de extinción molar $\epsilon = 13.7 M^{-1}cm^{-1}$).
- ❖ **Mezcla de reacción para determinación de GSH ($V_{reacción}$: 1 mL):**
 - KPE: Buffer fosfato de potasio 0.1 M + 5 mM EDTA, pH=7.50
 - 6 mM DTNB
 - 2 mM NADPH
 - 50 U/mL Glutathion reductasa
- ❖ **Mezcla de reacción para determinación de actividad CAT ($V_{reacción}$: 3 mL):**
 - KP: Buffer fosfato de potasio 0.1 M
 - 10 mM H_2O_2
- ❖ **Geles de actividad SOD:**
 - Buffer gel de resolución: 1.5 M tris-base + 8 mM EDTA, pH=8.80
 - Buffer gel de concentración: 0.5 M tris-base + 8 mM EDTA, pH=6.80
 - Acrilamida:bisacrilamida: 30:0.8 %
 - 10 % APS
 - Buffer de corrida: 25 mM tris-base + 192 mM Glicina + 1.8 mM EDTA, pH=8.50

- Buffer de siembra no desnaturante (2X): 50 % tris 0.5 M + 40 % Glicerol + 10 % Azul de Bromofenol (1 %)
- Solución de tinción: Buffer fosfato de potasio 50 mM + 0.5 mM NBT (disuelto en DMF) + 0.5 mM Riboflavina + 28 mM TEMED.
- Solución de tinción específica MnSOD: Solución de tinción + 8 mM KCN.
- Armado de geles:

RVO	Resolución 12 % (10 mL)	Concentración 5 % (5 mL)
H ₂ O	4.70 mL	3.45 mL
ACRIL/BIS	4.04 mL	0.85 mL
TRIS 1.5/0.5 M	1.25 mL 1.5 M	0.625 mL 0.5 M
TEMED	10 µL	10 µL
APS	80 µL	80 µL

Tabla 3.IV - Armado de geles de poliacrilamida.

❖ **Buffer PBS:** 137 mM NaCl + 2.7 mM KCl + 10 mM Na₂HPO₄ + 1.8 mM KH₂PO₄

❖ **Electroforesis en gel de agarosa:**

- Buffer TAE: 40 mM tris base + 1mM EDTA + 0.11 % ác. Acético.
- Buffer de siembra: 10 mM EDTA + 0.25 % Azul de bromofenol + 50 % glycerol.

3.15 Análisis estadístico.

Los resultados fueron analizados con el programa GraphPad Prism 5.04. Con esta herramienta informática se realizaron los test estadísticos de análisis de la variancia (ANOVA) para las muestras que cumpliesen el supuesto de distribución normal e igualdad de variancias, en caso contrario se aplicó un test no paramétrico como el de Kruskal-Wallis. Las comparaciones múltiples se realizaron a través del test de Bonferroni y de Tukey. Se consideró una $p < 0.05$ una diferencia estadísticamente significativa. Los datos se expresaron como la media de las observaciones \pm la desviación estándar (SD) ó error estándar de la media (SEM). El número de observaciones es indicada en cada caso: $n=3/n=4$.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 El disulfuro de dialilo (DADS) en la preservación hipotérmica.

4.1.1 Experiencias con la solución de la Universidad de Wisconsin (UW).

4.1.1.1 Fundamentos

Este primer capítulo de la tesis abarca las primeras pruebas que se realizaron con el dador de H₂S (DADS) en el medio de preservación de hígados de rata. En la bibliografía consultada se reportan alentadoras experiencias acerca de la utilización de dadores de H₂S en la protección del tejido hepático frente a injurias por isquemia/reperfusión (Shaik H y col., 2008; Kang K y col., 2009). En base a esto, se planteó la estrategia de optimizar las soluciones de preservación hipotérmica mediante el agregado de sustancias capaces de liberar H₂S al medio. Sin embargo, al prescindir de antecedentes respecto a este modelo en particular, se comenzaron las experiencias con una concentración final de DADS en solución UW del orden de magnitud (mM) utilizado en los tratamientos *in vivo* como el de Shaik H y col. (2008).

El objetivo principal de esta serie de experimentos consistió en obtener datos preliminares y orientativos respecto de la utilización del DADS como agente protector en la solución de preservación UW.

4.1.1.2 Protocolo experimental

Básicamente, los hígados fueron ablacionados mediante la técnica quirúrgica a corazón batiente descrita en la sección 3.3.1 de materiales y métodos. Luego, 2 grupos de hígados fueron sometidos a preservación hipotérmica estática durante 48 h (tiempo en exceso para intensificar el cuadro de injuria) en UW con y sin DADS (UW+DADS y UW). Un tercer grupo de hígados (CON) fue evaluado inmediatamente luego del aislamiento en el sistema de perfusión *ex vivo*, como un control del funcionamiento hepático en nuestras condiciones experimentales.

Grupo experimental	Descripción
CON	Hígados aislados y reperfundidos <i>ex vivo</i> .
UW	Hígados aislados, preservados 48 h en solución UW y reperfundidos <i>ex vivo</i> .
UW + DADS	Hígados aislados, preservados 48 h en solución UW + 3.4 mM DADS y reperfundidos <i>ex vivo</i> .

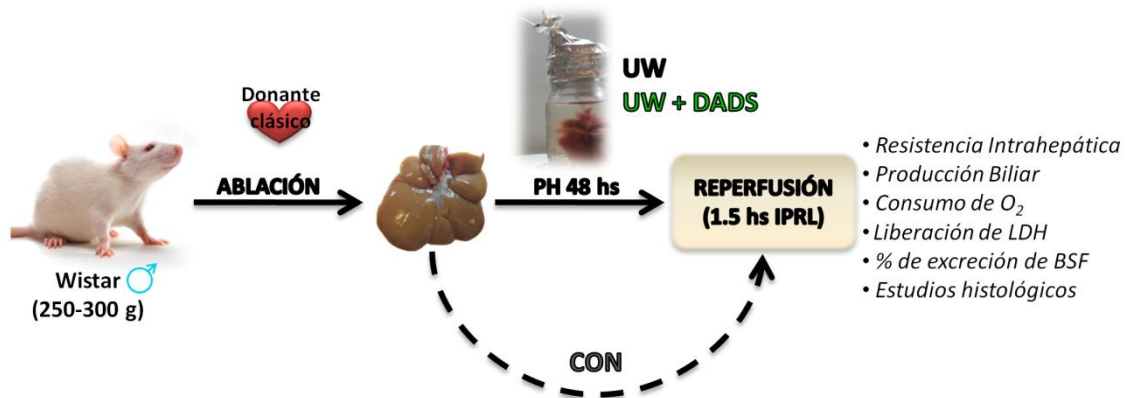


Fig. 4.1 - Esquema del protocolo experimental sección 4.1.1. PH= preservación hipotérmica.

4.1.1.3 Resultados y discusión.

➤ Resistencia Intrahepática.

En la figura 4.2 se representa la evolución de la Resistencia intrahepática en el tiempo de reperfusión del órgano aislado. Durante los 90 min de perfusión de hígados controles se registró una RI constante de aproximadamente 2.25 mmHg.min.g hig/ml. Por el contrario, los hígados preservados en hipotermia (UW) mostraron valores elevados de resistencia al flujo al comenzar la perfusión, luego éstos son parcialmente estabilizados al cumplirse la hora de recirculación y, finalmente, la resistencia incrementa hasta concluir el experimento. En cuanto al grupo de hígados preservados en solución UW suplementada con DADS, se observó un comportamiento similar al del grupo UW, sugiriendo la ausencia de un efecto por parte del dador utilizado. Incluso, a partir de los 60 min, la RI de estos hígados se vio ligeramente aumentada, descartando un efecto positivo sobre el estado de la vasculatura. Es importante destacar que los valores para la RI de los distintos grupos experimentales no fueron estadísticamente diferentes unos de otros, indicando que aun luego de 48 h de almacenamiento en isquemia fría, la circulación hepática posee un alto grado de conservación.

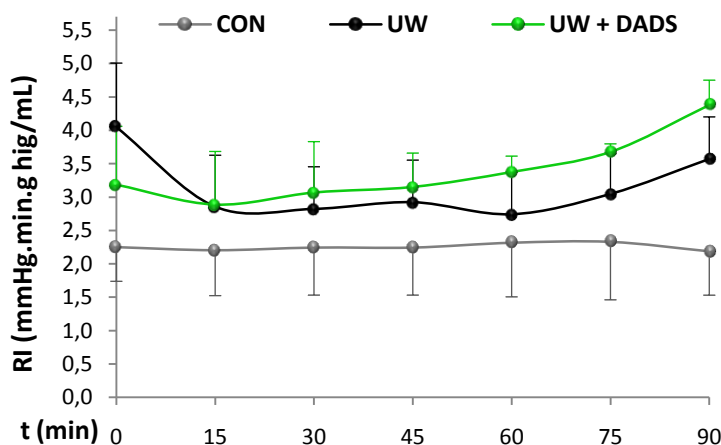


Fig. 4.2 - Evolución de la RI en función del tiempo de perfusión en un sistema aislado. Cada punto denota la media \pm SD de 3 experimentos. No se hallaron diferencias estadísticamente significativas.

➤ **Producción de bilis.**

La producción de bilis (PB) se evaluó a través del cálculo del flujo de la secreción biliar en función del tiempo, como se observa en la figura 4.3. Los hígados perfundidos inmediatamente luego de la cirugía de ablación mostraron una alta capacidad de secreción biliar, alcanzando un flujo máximo de 1.37 ± 0.30 [$\mu\text{L}/\text{min. ghig}$], a los 45 min de perfusión. La situación fue completamente distinta para los hígados sometidos a preservación hipotérmica, tanto los hígados sumergidos en UW estándar ($\text{PB}^{45\text{min}} = 0.39 \pm 0.19$ [$\mu\text{L}/\text{min. ghig}$]) como los que se almacenaron en UW con 3.4 mM de DADS ($\text{PB}^{45\text{min}} = 0.54 \pm 0.25$ [$\mu\text{L}/\text{min. ghig}$]) produjeron bilis a una tasa significativamente menor (^a $p < 0.05$, ^b $p < 0.01$).

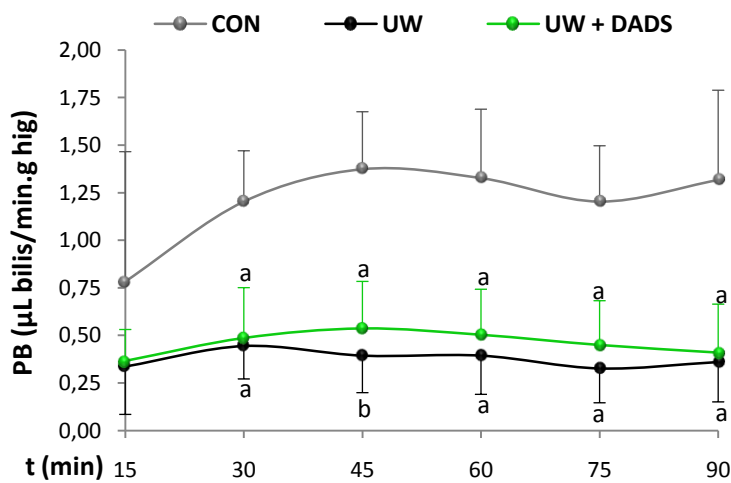


Fig. 4.3 - Evolución de la PB en función del tiempo de perfusión en un sistema aislado. Cada punto denota la media \pm SD de 3 experimentos. "a" y "b" indican diferencia estadísticamente significativa respecto del grupo CON con: ^a $p < 0.05$, ^b $p < 0.01$.

➤ **Consumo de oxígeno.**

La capacidad del tejido hepático para extraer O_2 del medio de perfusión se graficó en la figura 4.4 en función del tiempo de reperfusión transcurrido. Allí puede observarse que los hígados controles tuvieron un mayor éxito en el mantenimiento del consumo de O_2 que los hígados preservados independientemente de la presencia del dador de H_2S . Esto podría deberse a que, durante la preservación en frío muchas células sufrieron daños a nivel de la función mitocondrial, o bien el daño fue tal que muchas de estas células murieron provocando la caída en el consumo de O_2 .

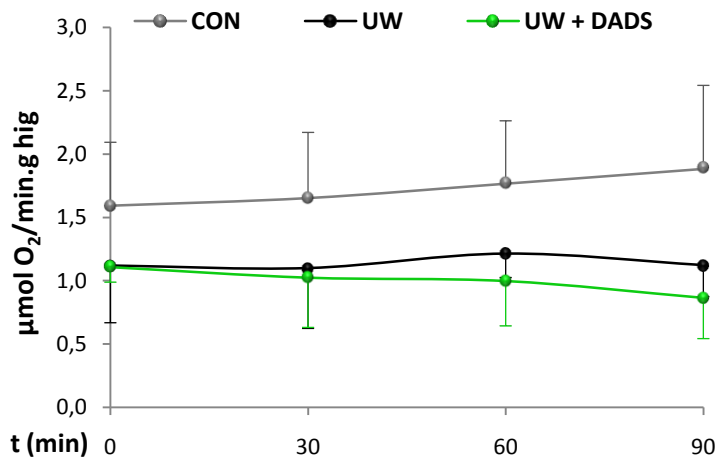


Fig. 4.4 - Evolución del Consumo de O₂ en función del tiempo de perfusión en un sistema aislado. Cada punto denota la media \pm SD de 3 experimentos. No se hallaron diferencias estadísticamente significativas.

➤ Liberación de LDH.

La acumulación de enzima LDH en el perfusato fue esquematizada en la figura 4.5. Al transcurrir el tiempo de reperfusión se fue ampliando la diferencia entre los hígados controles y los preservados, indicando que estos últimos se encontraban más vulnerables a la injuria por reperfusión. En el muestreo de perfusato de 60 min de hígados previamente almacenados en frío (UW y UW + DADS), se halló un aumento promedio de la liberación de LDH de 3.5 veces respecto del control (^ap<0.05). Nuevamente, la presencia del compuesto en estudio no redujo los efectos de la isquemia fría/reperfusión.

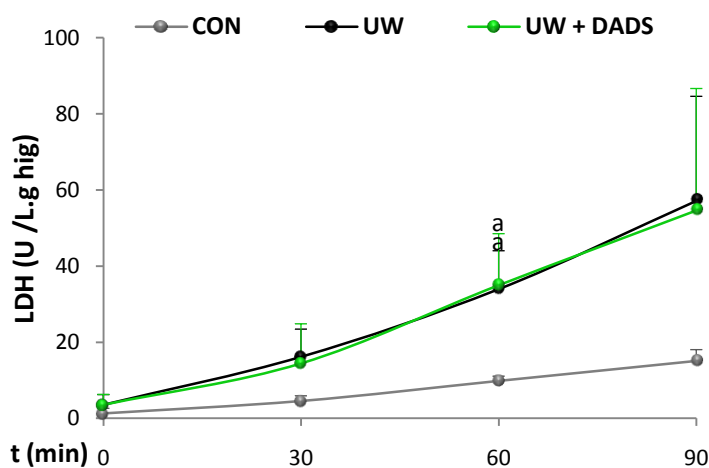


Fig. 4.5 - Evolución de la liberación de LDH en función del tiempo de perfusión en un sistema aislado. Cada punto denota la media \pm SD de 3 experimentos. "a" indica diferencia estadísticamente significativa respecto del grupo CON con: ^ap<0.05.

➤ Excreción de Bromosulfoftaleína (BSF).

La figura 4.6 indica los porcentajes de eliminación de una dosis única de BSF a través de la vía de secreción biliar a los 90 min de reperfusión. La presencia de DADS durante el almacenamiento de los hígados no elevó significativamente los porcentajes de excreción

respecto del grupo preservado sin tratar (UW); sin embargo, sí se halló una diferencia significativa entre estos últimos e hígados controles.

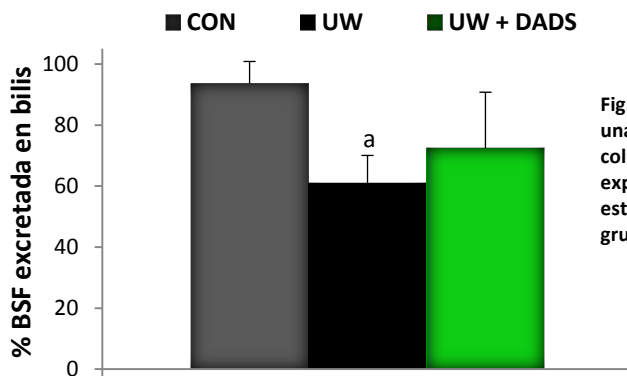


Fig. 4.6 - Porcentaje de excreción en bilis de una dosis única de BSF (5 mg). Cada columna denota la media \pm SD de 3 experimentos. "a" indica diferencia estadísticamente significativa respecto del grupo CON con: ^ap<0.05.

➤ Estudios histológicos post-reperusión.

En la figura 4.7 se observan imágenes representativas del estado de la morfología hepática post-reperusión para los distintos grupos experimentales. Además, en la figura 4.8, se graficaron los resultados del análisis morfométrico realizado. En primer lugar, se observó a simple vista una arquitectura mejor conservada en los hígados controles. Éstos, fueron reperfundidos apenas se aislaron del cuerpo del animal, mostrando un menor índice de daño en comparación con los grupos UW y UW+DADS, donde los órganos son enfrentados a la injuria por isquemia fría. Esta injuria se reflejó en un mayor porcentaje de vacuolización citoplasmática, dilatación sinusoidal y desprendimiento de células endoteliales. Vale la pena mencionar que, si bien no se hallaron efectos sobre la Resistencia Intrahepática debido al tratamiento con DADS, los porcentajes de dilatación sinusoidal fueron significativamente disminuidos en presencia del dador de H₂S.

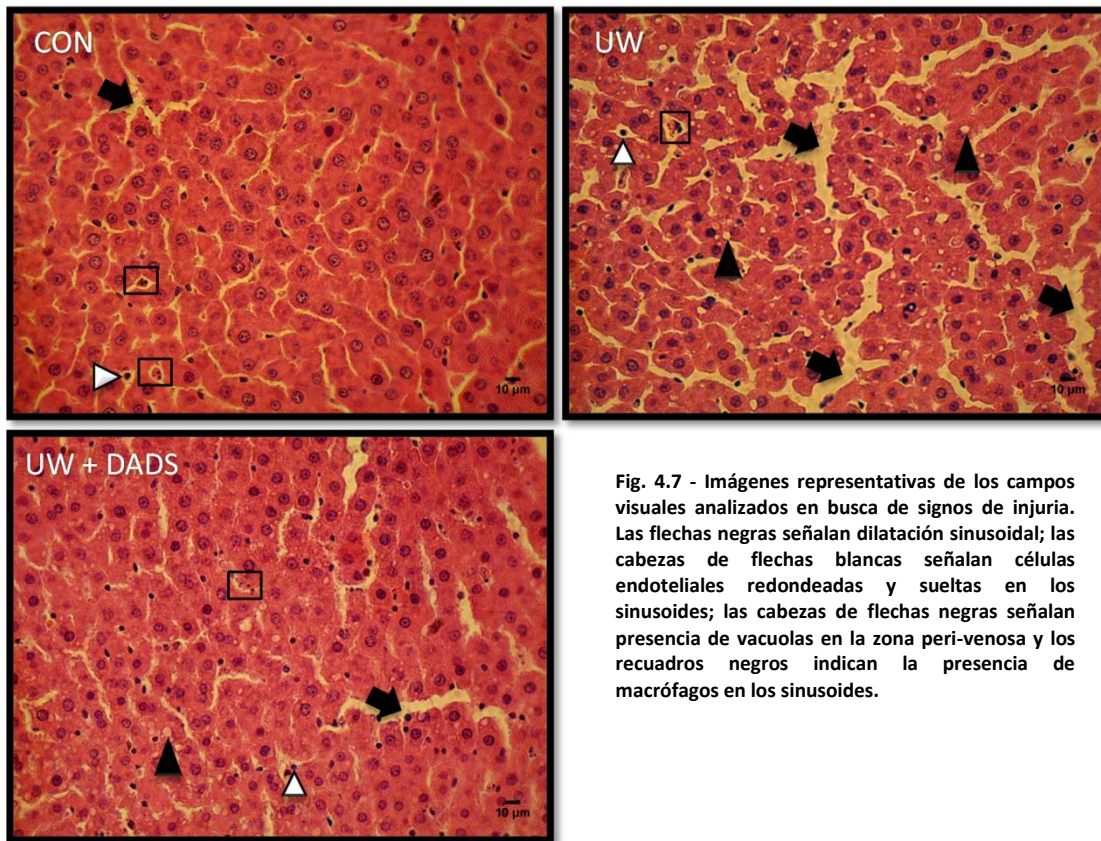


Fig. 4.7 - Imágenes representativas de los campos visuales analizados en busca de signos de injuria. Las flechas negras señalan dilatación sinusoidal; las cabezas de flechas blancas señalan células endoteliales redondeadas y sueltas en los sinusoides; las cabezas de flechas negras señalan presencia de vacuolas en la zona peri-venosa y los recuadros negros indican la presencia de macrófagos en los sinusoides.

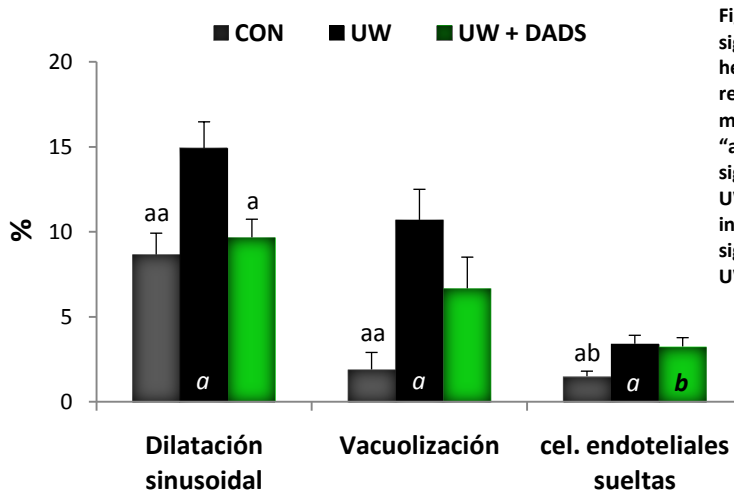


Fig. 4.8 - Porcentaje de aparición de signos de injuria en la morfología hepática en cortes procesados post-reperfusion. Cada columna denota la media y SEM de 15 campos visuales. "a" indica diferencia estadísticamente significativa respecto del grupo UW(a), con: ^ap<0.05 y ^{aa}p<0.01. "b" indica diferencia estadísticamente significativa respecto del grupo UW+DADS (b), con: ^bp<0.05.

4.1.1.4 Conclusión parcial de la experiencia con la solución UW.

El propósito de la preservación de órganos en el contexto del trasplante es poder suministrar órganos viables que comiencen a funcionar inmediatamente luego de su implante en el receptor. El tiempo necesario para realizar el traslado del órgano y organizar los equipos de cirugía, es proporcionado a través de la técnica de preservación hipotérmica. Sin embargo, hoy en día, la preservación estática convencional se ha estancado en su desarrollo limitando

los tiempos de procuración, el número de órganos viables para implantar y el éxito en sí de la terapia del trasplante.

En este capítulo inicial se exponen los primeros resultados obtenidos al agregar un dador natural de H₂S derivado de extracto de ajo. Los hígados fueron sumergidos 48 h en solución UW sin intervención alguna hasta la reperfusión de los mismos en un sistema aislado que permitió el estudio de diversos parámetros que reflejan el estado de la fisiología hepática. Este modelo *in vitro*, ampliamente utilizado en la investigación de la fisiopatología del hígado, constituye una alternativa al trasplante hepático experimental muy interesante. Si bien se trata de un sistema aislado y controlado, al mismo tiempo, conserva la complejidad del órgano con sus diferentes tipos celulares interaccionando entre sí y su arquitectura tridimensional intacta. Además, vale la pena destacar que el número de animales para experimentación se reduce a la mitad. No obstante, son numerosas las variables que intervienen en los resultados: temperatura, pH, presión de O₂, funcionamiento de la bomba, posicionamiento de los catéteres, elección del perfusato y tiempo de análisis son algunas de las más importantes. Por esta razón, el entrenamiento manual y estandarización de la práctica, resultan fundamentales y se van desarrollando con el tiempo. Lo expuesto anteriormente explica, en parte, la variabilidad experimental observada en esta serie de ensayos.

Los resultados obtenidos señalaron que el compuesto dador suministrado en una concentración final de 3.4 mM al inicio de las 48 h de almacenamiento hipotérmico no ejerce efectos citoprotectores sobre el estado de preservación de los hígados.

Como se hace mención en la sección de fundamentos de este capítulo, con estos datos se comenzó la búsqueda empírica de una forma de aplicación de este tratamiento basado en dadores H₂S. Teniendo en cuenta que por encima de ciertas concentraciones, el gas H₂S comienza a mostrar efectos nocivos para la salud, el ajuste de la dosis resulta de suma importancia en este tipo de tratamientos.

4.1.2 Experiencias con la solución HTK.

4.1.2.1 Fundamentos.

La solución de Bretschneider ó HTK fue inicialmente diseñada para cardioplegia durante las cirugías cardíacas pero ha demostrado ser efectiva también en la preservación de riñón, corazón e hígado (Meine MH y col., 2006). Un beneficio muy atractivo de la solución Custodiol® es su bajo costo respecto de la solución UW. Este beneficio y la imposibilidad de abastecernos de solución UW por cuestiones relacionadas al suministro comercial de esta solución (la solución UW es comercializada por Bristol-Myers Squibb Argentina en paquetes de 10 L y únicamente a centros autorizados por el INCUCAI) nos impulsaron a continuar los experimentos en solución HTK.

Esta serie de experimentos tuvo como objetivo la evaluación de distintas concentraciones finales de DADS en la solución HTK, utilizada para preservación hipotérmica de hígados de rata. La colección de los resultados obtenidos mediante el modelo de reperfusión *ex vivo* previamente descrito, se utilizó como indicador de la dosis de DADS con mejores probabilidades de proteger al órgano de la injuria por isquemia fría/reperfusión.

4.1.2.2 Protocolo experimental.

Los hígados fueron ablacionados mediante la técnica quirúrgica a corazón batiente descrita en la sección 3.3.1 de materiales y métodos. Luego, los hígados fueron sometidos a preservación hipotérmica estática durante 48 h en HTK estándar ó en HTK suplementada con DADS en tres concentraciones distintas (1, 5 y 50 μM). Finalmente, los hígados fueron conectados al sistema recirculante (IPRL) para diagnosticar su grado de daño y funcionalidad.

Grupo	descripción
HTK	Hígados preservados 48 h en solución HTK y reperfundidos <i>ex vivo</i> .
HTK + DADS 1 μM	Hígados preservados 48 h en solución HTK+ DADS 1 μM y reperfundidos
HTK + DADS 5 μM	Hígados preservados 48 h en solución HTK+ DADS 5 μM y reperfundidos
HTK + DADS 50 μM	Hígados preservados 48 h en solución HTK+ DADS 50 μM y reperfundidos

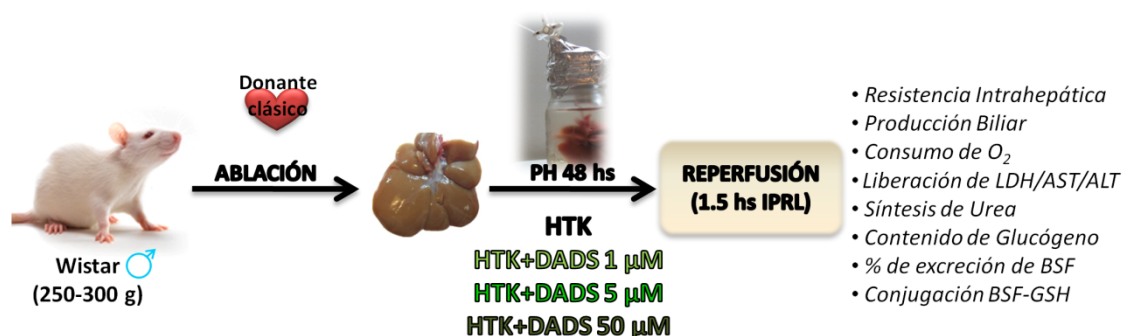


Fig. 4.7 - Esquema del protocolo experimental sección 4.1.2. PH= preservación hipotérmica.

4.1.2.3 Resultados y discusión.

➤ Resistencia Intrahepática.

En la figura 4.8 se esquematiza el cambio en la RI a medida que avanza el tiempo de reperfusión de los hígados previamente almacenados en solución HTK durante 48 h. Se puede observar, en negro, el comportamiento de este parámetro para hígados que no tuvieron contacto con el dador de H₂S y, en verde, el comportamiento en hígados almacenados en solución de preservación con concentraciones crecientes de DADS. De acuerdo a los datos reunidos, ninguna de las dosis evaluadas tuvo éxito en reducir los niveles de resistencia al flujo de perfusión de manera apreciable. Sin embargo, la dosis de 5 μ M registró valores cuyas medias se encontraron por debajo de las demás durante todo el experimento.

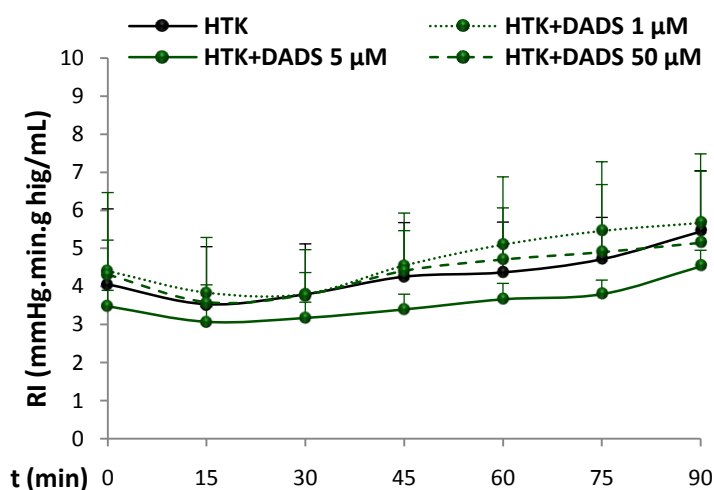


Fig. 4.8 - Evolución de la RI en función del tiempo de perfusión en un sistema aislado. Cada punto denota la media \pm SD de 4 experimentos. No se hallaron diferencias estadísticamente significativas.

➤ Producción de bilis.

La figura 4.9 refleja el comportamiento de la función secretora biliar en función del tiempo de perfusión aislada. Es notable como al comienzo de la perfusión, todos los grupos mostraron un flujo biliar disminuido y luego éste aumenta notablemente, posiblemente, debido a que los hígados requieren un cierto tiempo de re-oxigenación y adaptación en el sistema *in vitro*. Los datos señalaron una recuperación del flujo biliar marcadamente superior (60 %) en los hígados preservados en presencia de DADS 5 μ M.

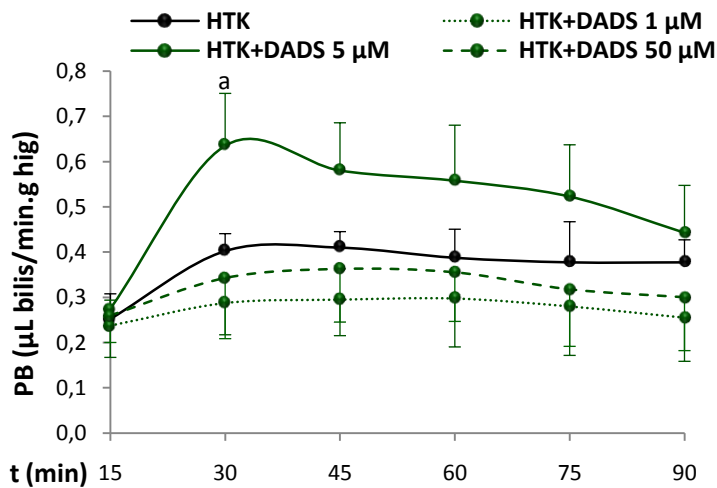


Fig. 4.9 - Evolución de la PB en función del tiempo de perfusión en un sistema aislado. Cada punto denota la media \pm SD de 4 experimentos. "a" indica diferencia estadísticamente significativa respecto del grupo HTK con: $^a p < 0.05$.

➤ Consumo de Oxígeno.

La figura 4.10 muestra el consumo de O_2 durante los experimentos de reperfusión aislada. Aunque no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas, se observó una mayor capacidad de extracción de O_2 del medio por parte del grupo HTK+DADS 5 μ M. Esto estaría señalando que el dador del gas ejerce algún tipo de protección durante la preservación de los hígados.

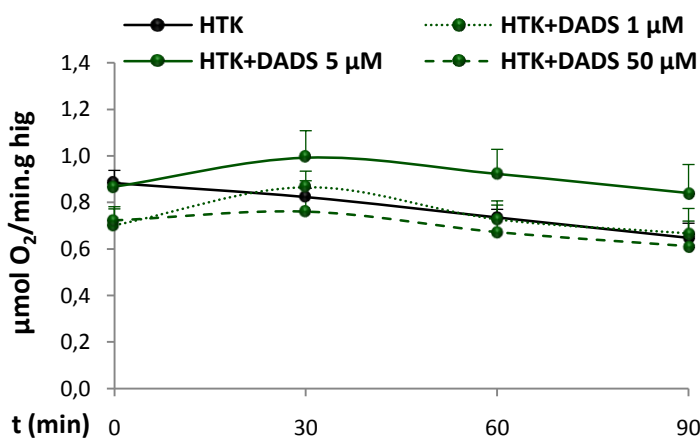


Fig. 4.10 - Evolución del Consumo de O_2 en función del tiempo de perfusión en un sistema aislado. Cada punto denota la media \pm SD de 4 experimentos. No se hallaron diferencias estadísticamente significativas.

➤ Liberación de enzimas citoplasmáticas: LDH, AST y ALT.

La figura 4.11 muestra las concentraciones de enzimas citoplasmáticas en el perfusato durante el desarrollo de los ensayos de reperfusión aislada. La injuria celular ocasionada por daños al endotelio durante la reperfusión y la activación de vías de muerte celular por apoptosis/necrosis es comúnmente evaluada a través de la liberación de enzimas como la LDH y las transaminasas. Todas las enzimas intracelulares fueron liberadas en grandes cantidades independientemente de la presencia del compuesto DADS en cualquiera de sus concentraciones. Al relacionar los datos de liberación de LDH de estos grupos experimentales

con los de un control sin almacenamiento en frío ($LDH^{90min}=15.1 \pm 6.7$ [U/L.g hig]) resulta evidente que las 48 h de isquemia fría tuvieron como consecuencia un alto grado de daño tisular. Probablemente, 48 h de PH sea un punto de no retorno para el tejido en relación a un potencial efecto citoprotector por parte del H_2S .

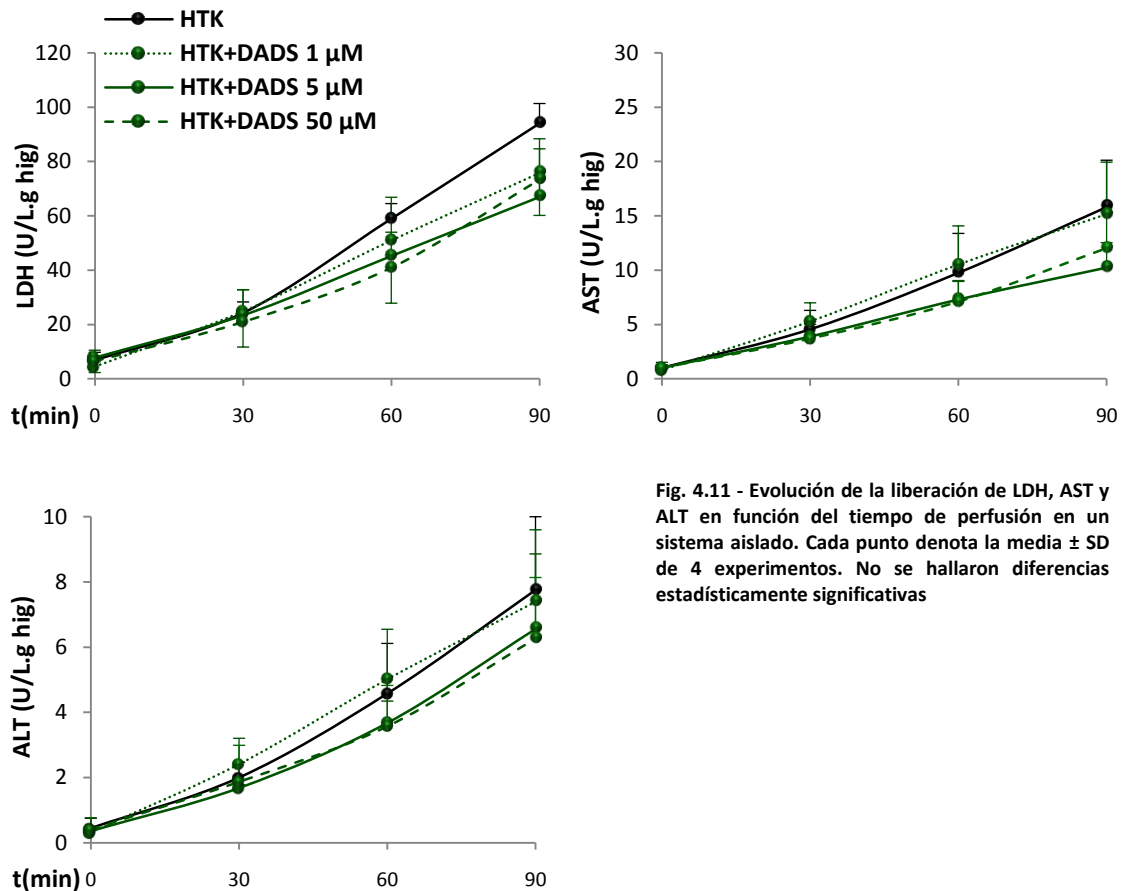


Fig. 4.11 - Evolución de la liberación de LDH, AST y ALT en función del tiempo de perfusión en un sistema aislado. Cada punto denota la media \pm SD de 4 experimentos. No se hallaron diferencias estadísticamente significativas

➤ Síntesis de Urea.

La figura 4.12 esquematiza la capacidad de síntesis de urea en los 90 min de perfusión. Siendo una de las funciones principales del hígado, la síntesis de este metabolito indica el estado funcional hepático durante la reperfusión post-preservación hipotérmica. Habiendo transcurrido una hora desde la reconexión del hígado al sistema recirculante, se halló un aumento significativo respecto del grupo HTK, producto del tratamiento con DADS 5 μ M.

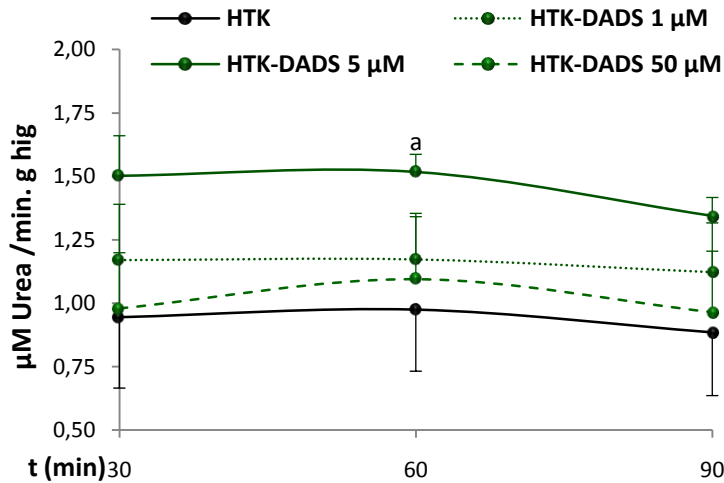


Fig. 4.12 - Evolución de la tasa de síntesis de urea en función del tiempo de perfusión en un sistema aislado. Cada punto denota la media \pm SD de 4 experimentos. "a" indica diferencia estadísticamente significativa respecto del grupo HTK con: $^a p < 0.05$.

➤ Contenido de Glucógeno.

La figura 4.13 muestra el contenido de glucógeno, la principal reserva energética del hígado, al final de la reperfusión. El proceso de almacenamiento en frío seguido de reperfusión tiene un costo energético elevado para los hígados, esto puede observarse fácilmente al comparar los valores de glucógeno presentados en esta figura con los de hígados recién extraídos del animal 36.9 ± 8.3 [mg/g hig] y con los de hígados ablacionados y reperfundidos *ex vivo* (sin almacenamiento hipotérmico previo) 16.8 ± 3.8 [mg/g hig] (estos valores no se muestran en la fig 4.13). No obstante, se ha detectado un mejor mantenimiento de las reservas de glucógeno en hígados preservados en presencia de DADS, especialmente con las dosis de 5 y 50 μ M.

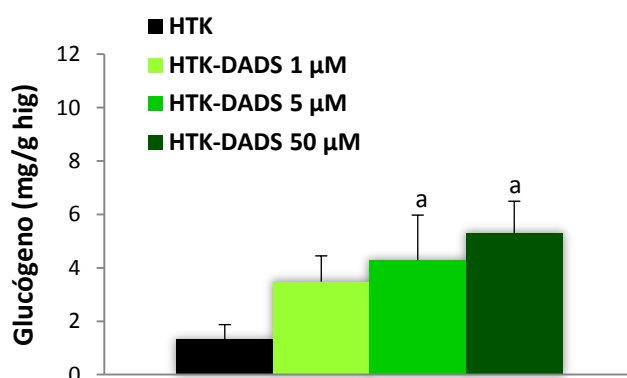


Fig. 4.13 - Contenido de glucógeno determinado en extractos hepáticos post-reperfusion. Cada columna denota la media \pm SD de 4 experimentos. "a" indica diferencia estadísticamente significativa respecto del grupo HTK con: $^a p < 0.05$.

➤ Excreción de Bromosulfoftaleína (BSF) y Conjugación a GSH.

La figura 4.14 indica el porcentaje de colorante depurado a través de la vía de excreción biliar a los 90 min de reperfusión *ex vivo*. Dado que el mecanismo de eliminación de este tipo de compuestos implica una vía compleja de reacciones de conjugación y transporte a través de

membranas, este parámetro constituye una buena herramienta para evaluar la función hepática. Estos resultados indicaron que la isquemia fría de 48 h afecta marcadamente la función depuradora del hígado, generando una diferencia en el porcentaje de excreción del colorante del 52 % entre hígados preservados (UW= 42 ± 10 [%]) e hígados controles sin preservar (94 ± 7 [%], no se muestra en la figura 4.14). Por otro lado, se observó que la presencia de $5 \mu\text{M}$ de DADS en la solución HTK aumentó significativamente el porcentaje de colorante eliminado del perfusato (HTK-DADS $5 \mu\text{M}$ = 66 ± 8 [%]).

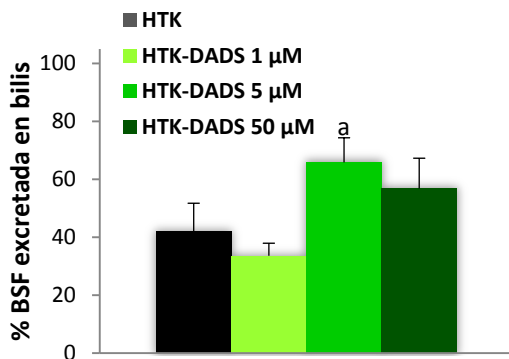


Fig. 4.14 - Porcentaje de excreción en bilis de una dosis única de BSF (5 mg). Cada columna denota la media \pm SD de 4 experimentos. "a" indica diferencia estadísticamente significativa respecto del grupo HTK con: $^*p < 0.05$.

En la figura 4.15 se observa el porcentaje de BSF excretado en la forma conjugada a Glutación. El alto porcentaje hallado para todos los grupos experimentales muestra que efectivamente el colorante ha sido eliminado a través de la vía de conjugación a la molécula de GSH, señalando que el conjunto de enzimas que interviene en el proceso permanece funcional luego de 48 h de PH. Según trabajos originales realizados por Combes B (1965), la presencia del sustrato GSH es un factor limitante en la reacción de conjugación a BSF y esta última, a su vez, determina la eficiencia del transporte del colorante hacia la bilis. Es factible que las reservas de GSH de hígados almacenados en hipotermia se encuentren disminuidas, producto del estrés oxidativo que experimentan durante la fase de reperfusión, generando la caída en los porcentajes de BSF excretada en bilis en hígados preservados y reperfundidos.

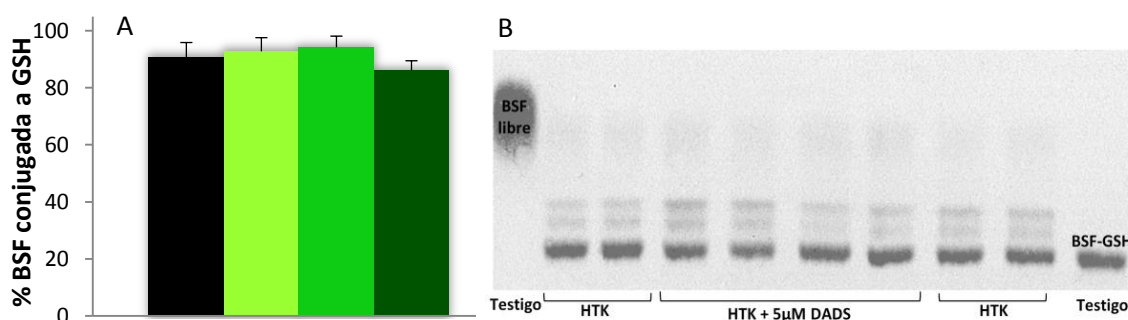


Fig. 4.15 - (A) Porcentaje de BSF excretada en la forma conjugada BSF-GSH. Cada columna denota la media \pm SD de 4 experimentos. No se hallaron diferencias estadísticamente significativas. (B) Imagen representativa de una placa de TLC en la cual se corrieron muestras de bilis de los grupos HTK y HTK + $5 \mu\text{M}$ DADS.

4.1.2.4 Conclusión parcial de la experiencia con la solución HTK.

Esta serie experimental se diseñó con el objeto de juzgar el efecto ejercido por diferentes concentraciones de DADS (1, 5 y 50 μM) en la solución de preservación HTK, sobre el grado de conservación de la integridad y funcionalidad hepática, en la etapa de reperfusión en un sistema aislado.

El daño provocado al tejido hepático tiene una estrecha relación con la duración del período de isquemia al cual se somete el órgano. El almacenamiento estático en hipotermia durante el extenso período de 48 h desencadena, de forma inevitable, fenómenos de daño que se manifiestan en los resultados obtenidos para todos los parámetros en general. No obstante, a los fines de evaluar la relevancia de un compuesto en la supervivencia celular, es conveniente un diseño experimental asociado a un alto grado de daño (Mendes-Braz M y col., 2012).

De acuerdo a los trabajos de Benavides GA y col. (2007) los efectos citoprotectores del ajo son mediados por el H_2S que se libera como resultado de la interacción de compuestos polisulfurados como el DADS o el DATS, con grupos tioles o el GSH dentro del tejido.

La dosis de 5 μM del compuesto DADS, resultó ser la que mejores perspectivas ofrece como tratamiento citoprotector al aplicarse durante la etapa de PH.

4.2 Modelo de donante a corazón parado en la rata.

4.2.1.1 Fundamentos.

El trasplante hepático ha evolucionado y se ha perfeccionado aceleradamente desde sus primeras experiencias en la década del 60. Como resultado de la creciente aceptación del trasplante como la terapia de elección para un sinnúmero de patologías hepáticas, la disponibilidad de órganos aptos para trasplante se convierte en una gran limitación y, por ende, en el problema de mayor preocupación reflejado en las largas listas de espera por un hígado sano.

La donación a corazón no batiente (DCNB) fue utilizada en la etapa temprana del trasplante de órganos cuando aún no existía el concepto de muerte cerebral. Los órganos DCNB son desestimados en la actualidad debido al período de isquemia caliente (IC) que invariablemente atraviesan antes de la perfusión con solución de preservación helada. La IC profundiza el daño por isquemia/reperfusión inherente al proceso del trasplante, aumentando el riesgo de fracaso de la cirugía. No obstante, la escasez de donantes clásicos (diagnóstico de muerte cerebral) ha llevado a reconsiderar el uso de órganos “marginales” como los DCNB cuyas desventajas demandan la optimización de los protocolos de preservación mediante el desarrollo de nuevas estrategias.

En particular, nos propusimos poner a punto un modelo de donante a corazón no batiente en ratas, como herramienta para la evaluación de maniobras destinadas a mejorar la técnica de preservación estática en frío.

4.2.1.2 Protocolo experimental.

Para dicho objetivo, en primer lugar debimos seleccionar el método desencadenante del arresto cardíaco. Entre las opciones consideradas, la sobrecarga de potasio aplicada en un trabajo de García-Valdecasas JC y col. (1998) nos resultó la de mayor practicidad y rapidez. Brevemente, tras haber cateterizado el hígado como se describe en la sección 3.3.2, se inyectan 300 μ L de una solución de heparina 500 UI/mL + KCl 1 M vía vena femoral. El ión K^+ en altas concentraciones despolariza las membranas celulares del músculo cardíaco generando, en consecuencia, el arresto cardíaco dentro de los 30 segundos.

La duración del tiempo de isquemia caliente (IC) fue uno de los parámetros a determinar para la construcción del modelo, puesto que, el nivel de injuria tiene una relación directa con el tiempo transcurrido entre el arresto cardíaco y la vuelta a la reoxigenación. Tres grupos de hígados fueron sometidos a tiempos de isquemia caliente diferentes (0, 30 y 45 min) y una vez extraídos del cuerpo del animal se los reperfundió en el sistema IPRL para evaluar el grado de daño producto del tratamiento recibido.

Grupo experimental	descripción
IC 0 min	Hígados aislados sin IC y reperfundidos ex vivo. (Control)
IC 30 min	Hígados aislados tras 30 min de IC y reperfundidos ex vivo.
IC 45 min	Hígados aislados tras 45 min de IC y reperfundidos ex vivo.

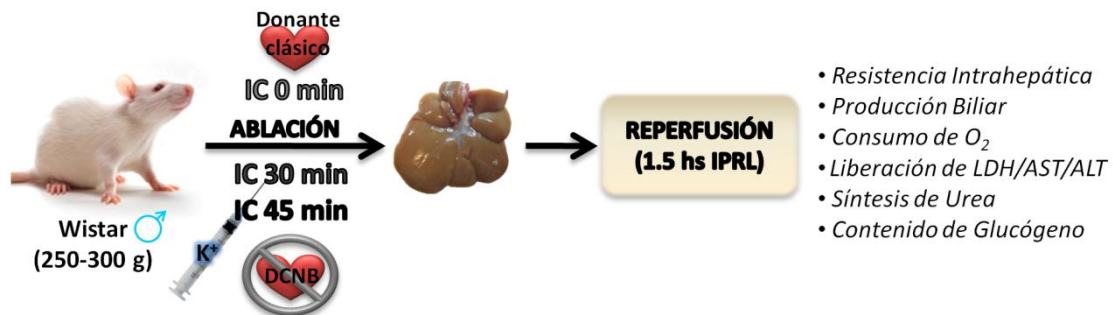


Fig. 4.16 - Esquema del protocolo experimental sección 4.2. IC= isquemia caliente.

4.2.1.3 Resultados y discusión.

➤ Resistencia Intrahepática.

La figura 4.17 grafica el comportamiento de la RI durante el desarrollo del experimento. Como puede observarse, no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre las medias de RI de los diferentes grupos experimentales; no obstante, la apreciación del efecto de la IC en el estado de la microvasculatura hepática pudo verse afectada por la variabilidad experimental. La extensión del período de almacenamiento hipotérmico es un factor que influye en la condición de hígados de DCNB (Monbaliu D y col., 2012); por lo tanto, vale la pena resaltar que al no incluir una fase de PH en este diseño experimental, se excluyó el efecto de la isquemia fría.

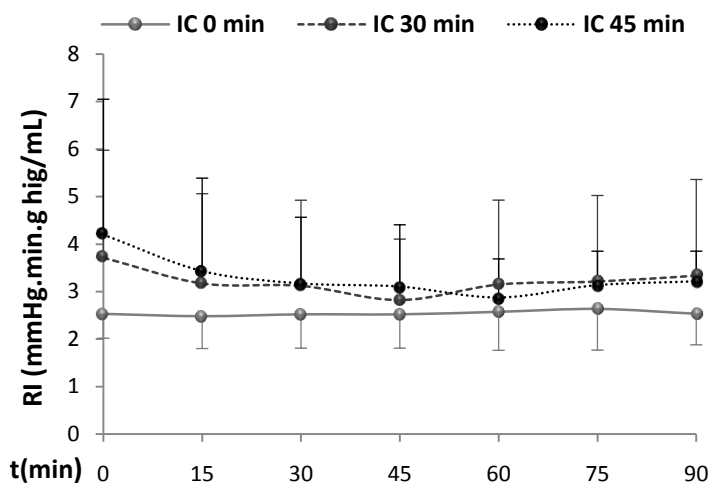


Fig. 4.17 - Evolución de la RI en función del tiempo de perfusión en un sistema aislado. Cada punto denota la media \pm SD de 4 experimentos. No se hallaron diferencias estadísticamente significativas.

➤ Producción de bilis.

La figura 4.18 muestra la capacidad productora de bilis de los hígados en estudio. Se observó frecuentemente un cierto retraso en la recuperación del flujo biliar para el grupo de 45 min de IC. Sin embargo, todos los grupos experimentales presentaron valores comparables de excreción biliar a partir de los 30 min de recirculación, indicando que la función secretora no se ve afectada en gran medida cuando la IC se extiende hasta los 45 min.

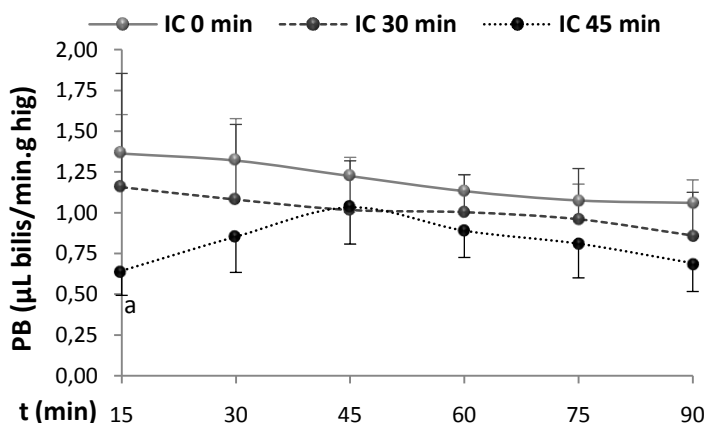


Fig. 4.18 - Evolución de la PB en función del tiempo de perfusión en un sistema aislado. Cada punto denota la media \pm SD de 4 experimentos. "a" indica diferencia estadísticamente significativa respecto del grupo IC 0 min con: $^a p < 0.05$.

➤ Consumo de Oxígeno.

La evolución del Consumo de O_2 en el tiempo de reperfusión se muestra en la figura 4.19. Aquí se observa claramente una caída significativa en la extracción de O_2 del medio de perfusión cuando el tiempo de isquemia caliente alcanza los 45 minutos. La interrupción del flujo sanguíneo sin ningún tipo de intervención, desencadena eventos nocivos para las células (acidosis, depleción energética, inflamación, etc.) que pueden llevar rápidamente a la pérdida de función o la muerte celular. En este caso, la disminución del consumo tisular de O_2 podría estar indicando que existe una amplia proporción de células metabólicamente inactivas post-isquemia caliente.

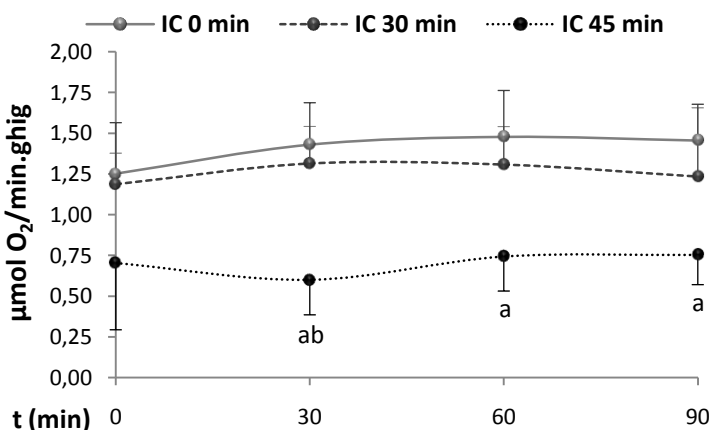


Fig. 4.19 - Evolución del Consumo de O_2 en función del tiempo de perfusión en un sistema aislado. Cada punto denota la media \pm SD de 4 experimentos. "a" indica diferencia estadísticamente significativa respecto del grupo IC 0 min con: $^a p < 0.05$. "b" indica diferencia estadísticamente significativa respecto del grupo IC 30 min con: $^b p < 0.05$.

➤ **Liberación de enzimas citoplasmáticas: LDH, AST y ALT.**

La figura 4.20 revela la injuria celular a través del aumento de la concentración de enzimas transaminasas y la LDH en el perfusato. Los resultados obtenidos indicaron que los hígados con 45 min de IC muestran un incremento significativo en la liberación de estas enzimas respecto de los grupos con menor tiempo de isquemia. En particular, el aumento respecto del grupo sin IC fue de más del 200 % para LDH, 180 % para AST y 86 % para ALT. Estos datos señalaron que el tiempo de 45 min podría ser adecuado para un modelo de injuria agravada por isquemia caliente.

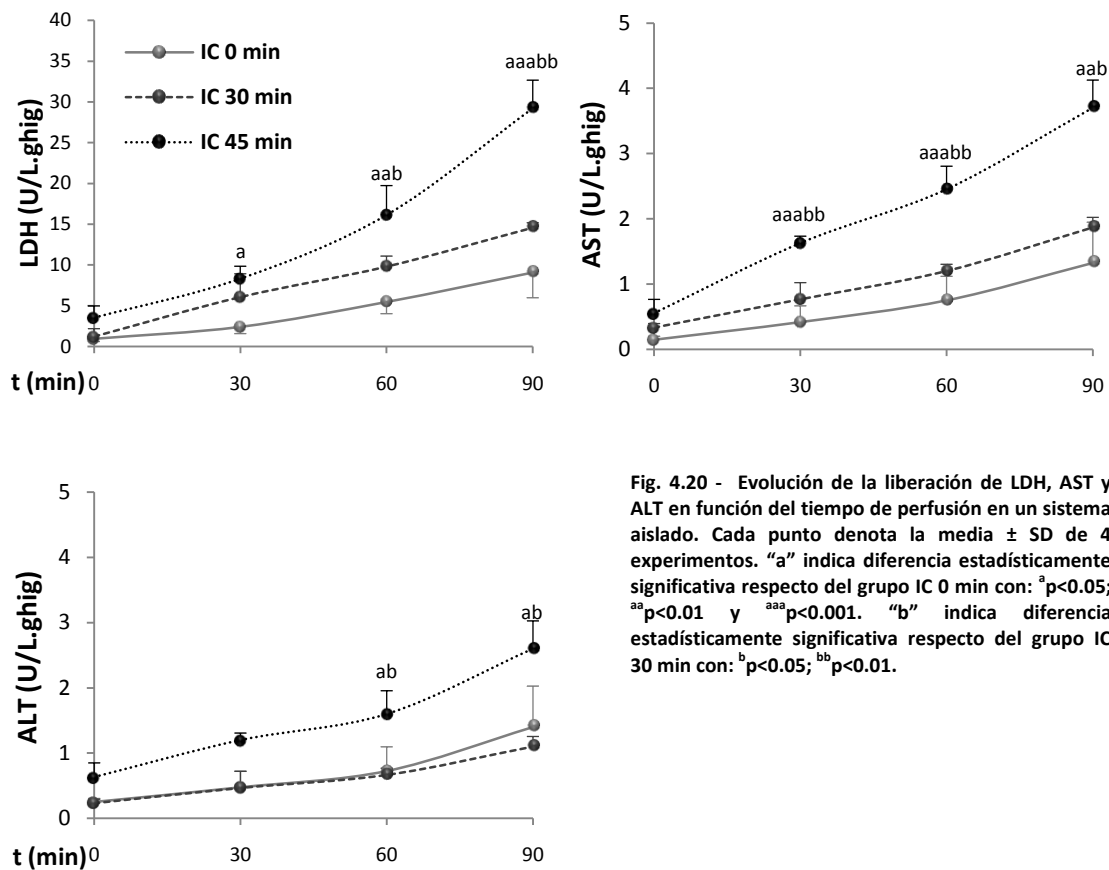


Fig. 4.20 - Evolución de la liberación de LDH, AST y ALT en función del tiempo de perfusión en un sistema aislado. Cada punto denota la media \pm SD de 4 experimentos. "a" indica diferencia estadísticamente significativa respecto del grupo IC 0 min con: ^ap<0.05; ^{aa}p<0.01 y ^{aaa}p<0.001. "b" indica diferencia estadísticamente significativa respecto del grupo IC 30 min con: ^bp<0.05; ^{bb}p<0.01.

➤ **Contenido de glucógeno.**

El contenido de las reservas de Glucógeno luego de los 90 min de reperusión se mostró afectado por la isquemia caliente tanto si ésta fue de 30 o de 45 min de duración. Durante el lapso que el órgano es privado de oxígeno en normotermia, el metabolismo continúa activo consumiendo rápidamente las reservas energéticas. La glicólisis anaeróbica se convierte entonces en la principal vía de generación de ATP y el contenido de glucógeno disminuye apreciablemente.

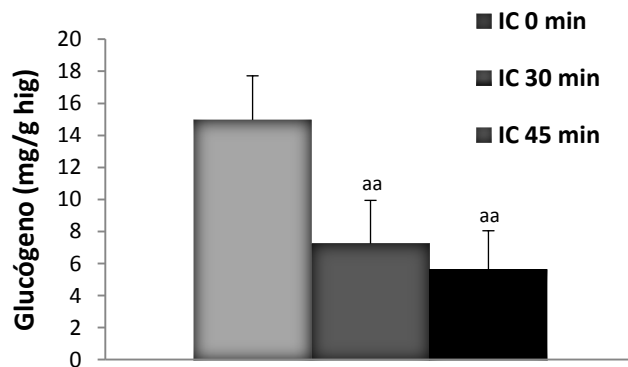


Fig. 4.21 - Contenido de glucógeno determinado en extractos hepáticos post-reperusión. Cada columna denota la media \pm SD de 4 experimentos. "a" indica diferencia estadísticamente significativa respecto del grupo IC 0 min con: ^{aa} $p < 0.01$.

4.2.1.4 Conclusión parcial del modelo de donante a corazón parado en la rata.

Los hígados provenientes de la donación a corazón no batiente, una importante fuente de órganos cadavéricos, son actualmente excluidos del criterio de selección, debido al alto riesgo de disfunción temprana, demoras en el restablecimiento de la función hepática y daño severo en el tracto biliar. Sin embargo, resultan ser la solución de mayor potencial para la expansión del pool de órganos para trasplante.

La desestimación de este tipo de órganos se basa en la deficiente performance mostrada en aquellos casos en los que se los ha trasplantado (Abt PL y col., 2004), no obstante, debe considerarse que dichas experiencias se obtuvieron en base a la técnica de preservación de órganos disponible a la fecha. Por lo tanto, el desarrollo de nuevas estrategias de preservación que permitan subsanar el daño ocasionado durante la isquemia caliente, es un blanco indispensable en la resolución del problema de las largas listas de espera para un trasplante.

El eje principal de esta fase del trabajo consistió en la puesta en práctica de un modelo en ratas, de ablación a corazón parado, a partir del cual se pudieran obtener órganos de mayor susceptibilidad a la injuria por isquemia/reperusión; tal como sucede en la clínica, cuando el paciente entra en paro cardio-respiratorio antes de la procuración. A partir de la construcción de este modelo animal, la introducción de compuestos dadores de H₂S en la solución de preservación, se planteó como estrategia para la recuperación de hígados de donantes a corazón parado.

De acuerdo a los parámetros evaluados, se juzgó el tiempo de isquemia caliente requerido para la manifestación de signos de injuria que luego se intentarán revertir con el tratamiento propuesto. Aunque no se produjeron distorsiones en la microcirculación (RI) si pudo observarse una recuperación más lenta de la producción biliar en hígados con 45 min de IC, en comparación con los hígados controles y los sometidos a una isquemia caliente de tan solo 30 min. De igual manera, el consumo de Oxígeno se vio afectado en mayor medida cuando la

isquemia se prolongó hasta los 45 min. Los datos referentes a la liberación de enzimas intracelulares al medio, también indicaron que 45 min de IC son suficientes para inducir daños a nivel celular. No existieron diferencias significativas para el contenido de glucógeno post-perfusión entre los hígados isquémicos pero si se observó una marcada disminución respecto de los controles, lo cual indicaría un rol crucial de las reservas de glucógeno en el abastecimiento energético del tejido durante períodos de isquemia normotérmica.

Teniendo en cuenta los resultados de estos experimentos se estableció un lapso de isquemia caliente de 45 min para el modelo en rata de donación de hígado a corazón no batiente. Esta extensión de tiempo previa al almacenamiento en frío se encuentra dentro de los límites de reversibilidad del daño según datos hallados en la bibliografía (He XS y col., 2004) pero, al mismo tiempo, induce una mayor injuria por isquemia/reperfusión respecto de los hígados controles de donantes a corazón batiente.

4.3 El H₂S en el rescate de hígados de donantes a corazón parado.

4.3.1.1 Fundamentos.

En este capítulo de las tesis se describen los resultados obtenidos a partir de las experiencias con el modelo de donante a corazón parado y el suministro de compuestos dadores de H₂S (Na₂S y DADS) para la recuperación de hígados con isquemia caliente.

Los efectos terapéuticos de la regulación de cascadas de señalización a bajas temperaturas han sido previamente reportados (Chan EY y col., 1999). Esto implica que la manipulación de ciertas vías de señalización durante el almacenamiento hipotérmico de órganos para trasplante, podría ofrecer una respuesta al desafío de la recuperación de órganos marginales. En este sentido, la presencia del efector gaseoso H₂S, conocido por mediar respuestas antioxidantes, anti-inflamatorias, anti-apoptóticas y vasodilatadoras, podría resultar beneficiosa para la restauración de hígados de donantes con arresto cardiopulmonar.

Se trabajó con un dador natural de H₂S, como el DADS, en una concentración que demostró prevenir, en parte, la pérdida de la función hepática. También, se utilizó Na₂S, un compuesto que libera H₂S, directamente, en un equilibrio acido-base en solución acuosa. Debido a los efectos tóxicos del H₂S en altas concentraciones, seleccionamos una dosis cercana a la cota inferior del rango de dosis halladas en la bibliografía (Szabó C, 2007).

4.3.1.2 Protocolo experimental.

La serie de hígados ablacionados a corazón batiente (C, PC y PRC) proporcionó información en cada una de las etapas del protocolo para hígados extraídos de donantes a corazón batiente, mientras que, la serie hígados ablacionados a corazón no batiente (CI, PI y PRI) hizo lo propio para hígados de donantes a corazón parado con un tiempo de isquemia en normotermia de 45 minutos. Por otro lado, los grupos Preservados y reperfundidos con tratamiento (PRIT) fueron contrastados con los diferentes controles en búsqueda de efectos citoprotectores y mecanismos de acción.

Grupos	Descripción
C	Hígados recién extraídos del animal
PC	Hígados preservados
PRC	Hígados preservados y reperfundidos.
CI	Hígados con 45 min de IC recién extraídos del animal
PI	Hígados con 45 min de IC preservados
PRI	Hígados con 45 min de IC preservados y reperfundidos
PRIT-Na ₂ S	Hígados con 45 min de IC, tratados con 10 μM Na ₂ S durante la PH y reperfundidos
PRIT-DADS	Hígados con 45 min de IC, tratados con 5 μM DADS durante la PH y reperfundidos

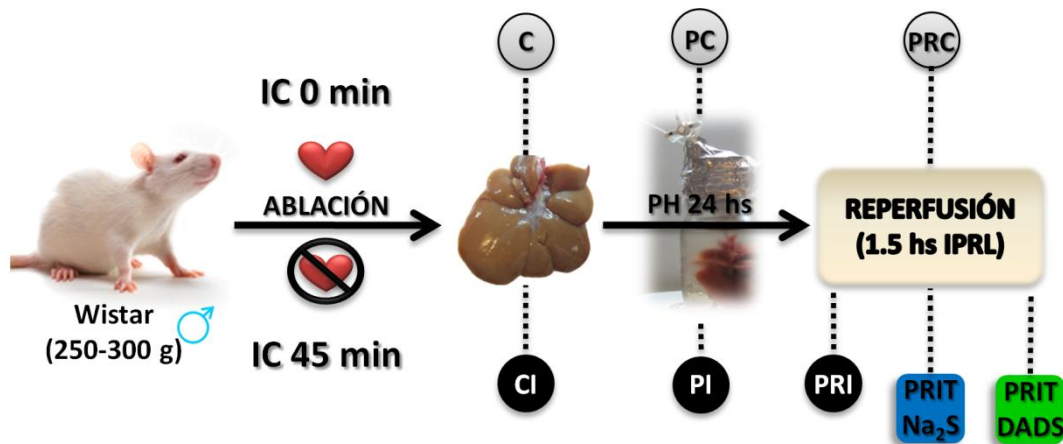


Fig. 4.22 - Esquema del protocolo experimental sección 4.3. PH= preservación hipotérmica.

4.3.1.3 Resultados y discusión.

➤ Concentración H_2S en la solución de preservación.

La concentración de H_2S en la solución HTK se determinó en el momento del agregado de Na_2S y tras 24 h de almacenamiento en frío ($0-4^{\circ}C$), utilizando una modificación de la técnica de Ellman (Nashef A y col., 1977) (ver sección 3.14). En la figura 4.23 se observan los valores de concentración de H_2S en solución HTK a partir del agregado de 25, 50 y 100 μM de Na_2S . A través de la extrapolación de las líneas de tendencia se especula que el agregado de Na_2S en una concentración de 10 μM resultará en una concentración inicial de H_2S de 9.7 μM y una concentración de 7.9 μM luego de 24 h de almacenamiento en frío.

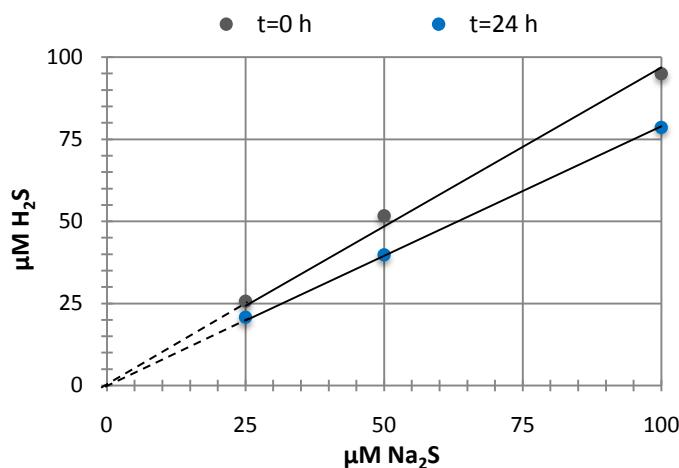


Fig. 4.23 - Concentración de H_2S en solución HTK suplementada con Na_2S .

➤ Resistencia Intrahepática.

La figura 4.24 muestra la evolución de la RI en función del tiempo de reperfusión en el sistema IPRL. Los hígados con IC preservados en la solución HTK convencional, presentaron un incremento del 40 % ($p < 0.05$, vs. PRC) en la resistencia al flujo de perfusión hasta el final del

experimento. Las alteraciones en la microcirculación hepática constituyen un factor determinante en el fallo primario post-trasplante, en experiencias con procuraciones a corazón parado (Monbaliu D y col., 2008). Durante el fenómeno de isquemia la depleción de sustratos energéticos produce edema en cél. de Kupffer y endoteliales; además, la pérdida del delicado equilibrio entre el óxido nítrico y la endotelina induce la vasoconstricción comprometiendo el flujo intrahepático y favoreciendo el reclutamiento de leucocitos (Montalvo-Jave EE y col., 2008). En estos experimentos, la presencia de compuestos dadores de H₂S ejerció un efecto restaurador en el medio de preservación de hígados sometidos a IC, equiparando los valores de RI entre éstos y los del grupo PRC (sin IC). Fiorucci S y col. (2005) demostraron en un sistema de perfusión de hígado aislado, que el agregado de NaHS al perfusato inducía la vasodilatación y, como resultado, la reducción de la resistencia intrahepática. Además, vieron que el efecto hipotensor del H₂S era antagonizado por glibenclamida, sugiriendo que la apertura de canales de K_{ATP} mediaba el efecto dilatador del gasotransmisor.

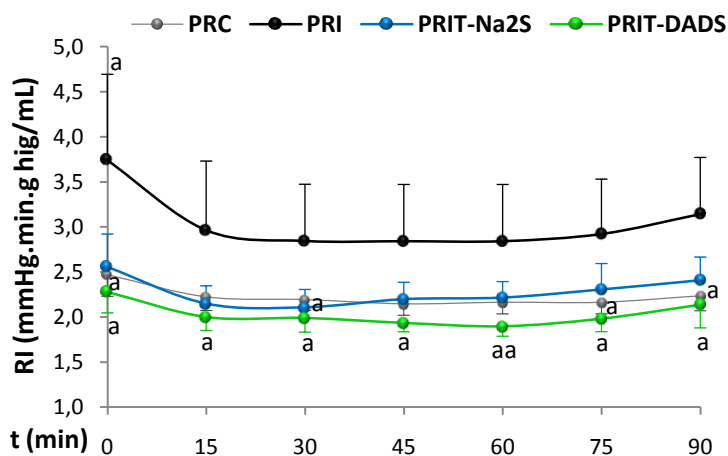


Fig. 4.24 - Evolución de la RI en función del tiempo de perfusión en un sistema aislado. Cada punto denota la media \pm SD de 4 experimentos. "a" indica diferencia estadísticamente significativa respecto del grupo PRI con: ^ap<0.05 y ^{aa}p<0.01

➤ Producción Biliar.

La evolución del flujo biliar en el tiempo se encuentra graficada en la figura 4.25. Así como la microcirculación, la función secretora biliar también es severamente afectada por el efecto combinado de la isquemia caliente y fría (Accatino L y col., 2003). Entre los 30 y 45 min de reperfusión, el grupo de hígados con 45 min de IC mostró una caída en la función secretora de más del 40 % respecto del grupo PRC (p<0.01). Por otro lado, el suministro de sustancias liberadoras de H₂S a la solución de preservación propició la conservación de esta función hepática. En particular, los hígados que habían sido preservados con el agregado de Na₂S, a los 30 min presentaron un aumento significativo en la cantidad de bilis secretada (p<0.05 vs. PRI).

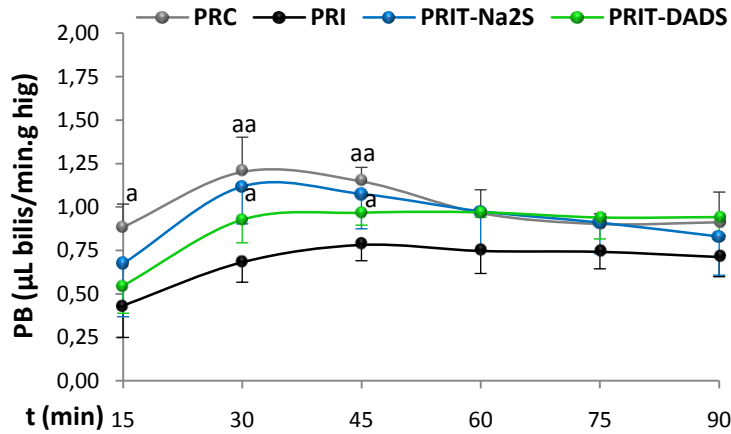


Fig. 4.25 - Evolución de la PB en función del tiempo de perfusión en un sistema aislado. Cada punto denota la media \pm SD de 4 experimentos. "a" indica diferencia estadísticamente significativa respecto del grupo PRI con: ^ap<0.05 y ^{aa}p<0.01.

➤ Consumo de O₂.

La figura 4.26 muestra el consumo de O₂ a lo largo de la perfusión *ex vivo*. Puede apreciarse una disminución significativa en la captación de O₂ del medio para hígados pertenecientes al grupo con IC previa. Transcurridos 90 min de perfusión los hígados del grupo PRI presentaron un consumo de 0.84 ± 0.17 [$\mu\text{mol O}_2/\text{min.g hig}$] en contraste con 1.37 ± 0.16 [$\mu\text{mol O}_2/\text{min.g hig}$] para el grupo PRC ($p<0.05$). Esta caída puede relacionarse con el daño celular inducido durante la isquemia caliente seguida de 24 h en isquemia fría o, incluso, ser una consecuencia del colapso en la microcirculación hepática que impide la perfusión de ciertas áreas del parénquima. El tratamiento con sustancias liberadoras de H₂S generó una leve recuperación del consumo de O₂ respecto del grupo PRI. Elrod JW y col. (2007) trató mitocondrias aisladas de miocardio con H₂S previo a un período de hipoxia. Durante estos experimentos se observó una inhibición del 65 % de la respiración mitocondrial seguida de una recuperación significativa de esta función al retornar el suministro de O₂. La presencia de H₂S, en concentraciones determinadas, produce la inhibición reversible de la citocromo c oxidasa, el complejo VI de la cadena respiratoria mitocondrial, lo cual disminuye los requerimientos de O₂ del tejido protegiéndolo en situaciones de hipoxia (Kolluru GK y col., 2013).

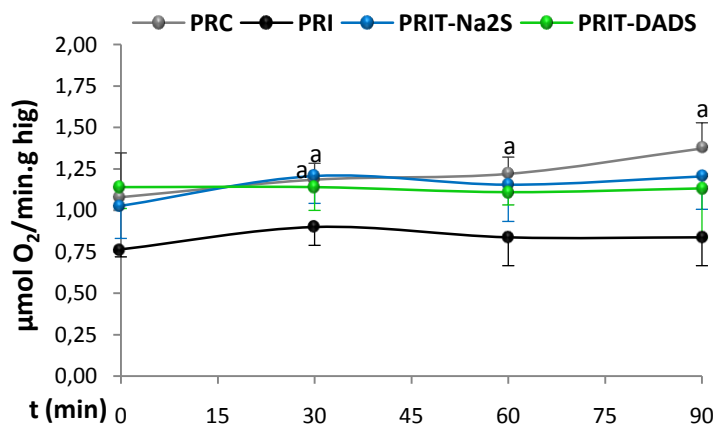
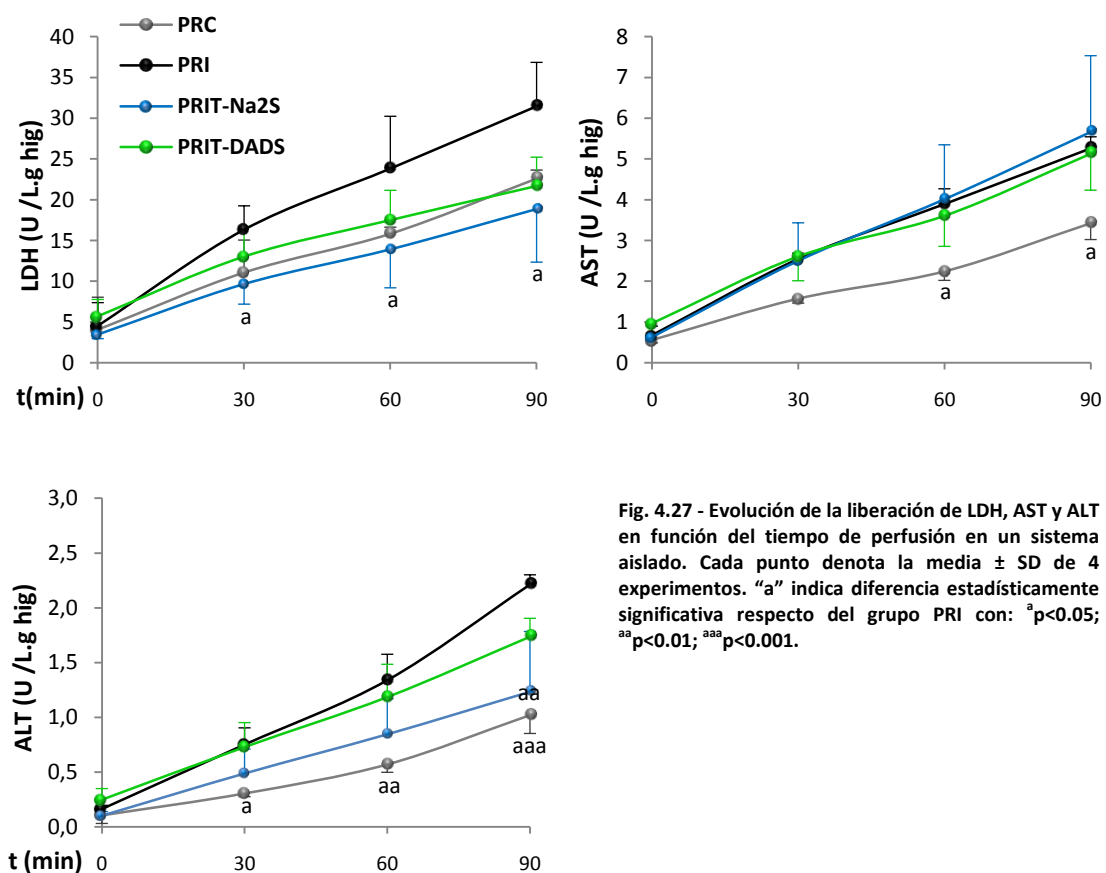


Fig. 4.26 - Evolución del Consumo de O₂ en función del tiempo de perfusión en un sistema aislado. Cada punto denota la media \pm SD de 4 experimentos. "a" indica diferencia estadísticamente significativa respecto del grupo PRI con: ^ap<0.05.

➤ Liberación de LDH/AST/ALT.

En la figura 4.27 se puede observar la evolución de la liberación de enzimas intracelulares al medio de perfusión. El aumento de la concentración de estas enzimas en el perfusato refleja el nivel de daño hepatocelular durante la etapa de reperfusión de los órganos preservados. La presencia del compuesto Na₂S en la solución de preservación de hígados con IC se asoció con una disminución significativa en la liberación de LDH (40 %) y de ALT (44 %) con respecto al grupo sin tratamiento (PRI). Sin embargo, las concentraciones de AST en el medio de perfusión se encontraron elevadas luego de la hora de perfusión en los 3 grupos sometidos a 45 min de IC (PRI, PRIT-Na₂S y PRIT-DADS).



➤ Síntesis de Urea.

Como se observa en la figura 4.28, la capacidad de síntesis de los hígados fue evaluada a través de la tasa de producción de Urea durante la perfusión *ex vivo*. Sólo al final del experimento se detectó una diferencia significativa entre el grupo PRC y el grupo PRI, esto implicaría que la síntesis de urea no es un parámetro que se encuentre particularmente afectado en nuestro modelo experimental. No obstante, vale la pena destacar que la amplitud de los valores obtenidos podría estar enmascarando un resultado diferente.

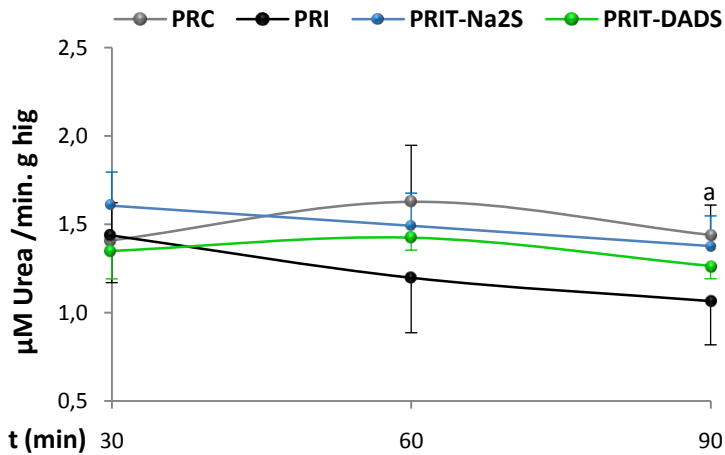


Fig. 4.28 - Evolución de la tasa de síntesis de urea en función del tiempo de perfusión en un sistema aislado. Cada punto denota la media \pm SD de 4 experimentos. "a" indica diferencia estadísticamente significativa respecto del grupo PRI con: ^ap<0.05.

➤ Excreción de Bromosulfoftaleína (BSF).

En la figura 4.29 se graficó el porcentaje de excreción de BSF en bilis. Aunque todos los grupos mostraron un buen desempeño en la tarea de eliminación del colorante a través de la vía biliar (arriba del 85 %), el valor de 97.65 ± 1.57 [%] del grupo PRC fue significativamente mayor al 85.80 ± 5.82 [%] del grupo PRI. Este dato indicaría que hígados de donantes a corazón parado podrían tener mayores problemas en la depuración de sustancias extrañas. Los tratamientos propuestos no propiciaron una diferencia significativa respecto del grupo sin tratar (PRI) aunque sí mostraron porcentajes algo más elevados.

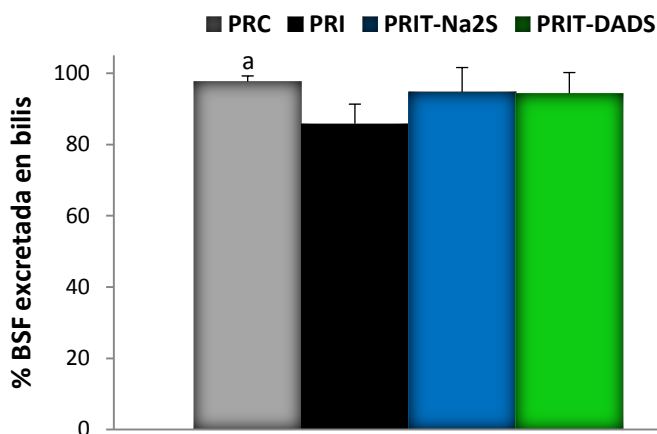


Fig. 4.29 - Porcentaje de excreción en bilis de una dosis única de BSF (5 mg). Cada columna denota la media \pm SD de 4 experimentos. "a" indica diferencia estadísticamente significativa respecto del grupo PRI con: ^ap<0.05.

➤ **Contenido de glucógeno.**

El contenido de glucógeno en el tejido hepático fue determinado para los controles (gris: donante a corazón batiente y negro: donante a corazón parado) en cada una de las etapas del protocolo experimental: post-ablación, post-preservación hipotérmica y post-reperfusión. Este diseño permitió obtener información respecto del gasto metabólico en cada una de las etapas de la procuración y cómo afecta un período previo de isquemia en normotermia de 45 minutos de duración. Además, los hígados con IC preservados en HTK suplementada y reperfundidos (PRIT-Na₂S/DADS) fueron contrastados con los controles pertinentes en busca de un efecto por parte de los dadores de H₂S (ver figura 4.30).

Se ha puesto de manifiesto que, aunque el metabolismo es desacelerado en un factor de 1.5-2 por cada 10°C de descenso en la temperatura, aún subsiste una actividad metabólica basal con el consecuente consumo de las reservas de glucógeno del hígado almacenado en hipotermia (0-4°C); durante la reperfusión, el consumo se intensifica y las reservas son rápidamente derivadas a la vía glicolítica. El contenido de glucógeno cae un 35.5 % ($p < 0.05$) luego de la PH y un 88.8 % ($p < 0.01$) al final de la reperfusión *ex vivo*. Esto concuerda con estudios previos mencionados en la revisión de Quintana AB y col. (2005). Por otro lado, se observó que durante el período de isquemia caliente hubo un gasto dramático de las reservas de glucógeno, el cual produjo una reducción del 54 % del grupo C al grupo CI ($p < 0.01$). Este hecho señala un rol fundamental de las reservas nutricionales en hígados provenientes de donantes a corazón parado y plantea la necesidad de recurrir a estrategias para prevenir la depleción energética en la procuración de dichos órganos. En lo que concierne a la utilización de compuestos liberadores de H₂S durante la PH, no se obtuvieron resultados que indiquen efecto alguno sobre el mantenimiento de las reservas nutricionales hepáticas.

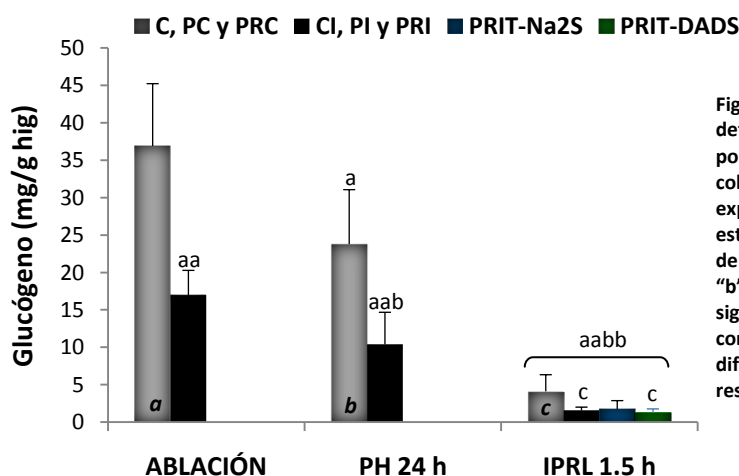
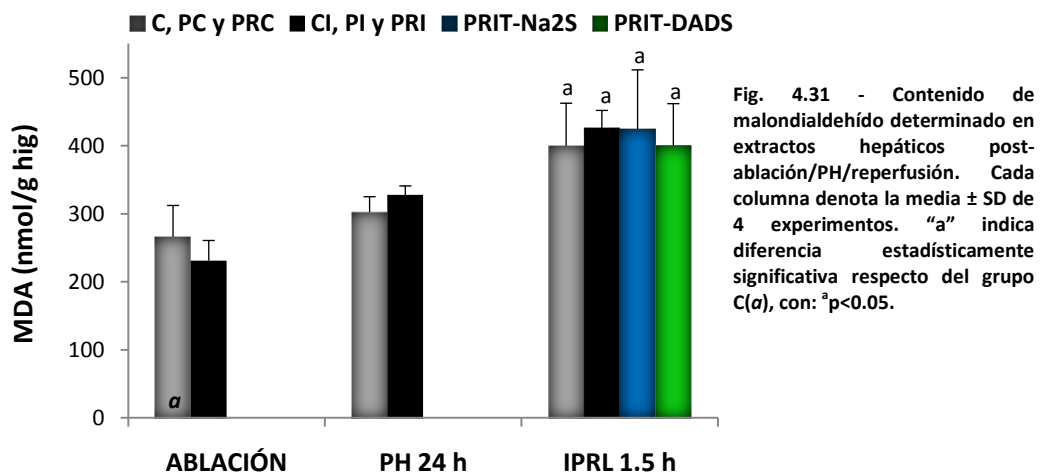


Fig. 4.30 - Contenido de glucógeno determinado en extractos hepáticos post-ablación/PH/reperfusión. Cada columna denota la media \pm SD de 4 experimentos. "a" indica diferencia estadísticamente significativa respecto del grupo C(a), con: ^a $p < 0.05$ ^{aa} $p < 0.01$. "b" indica diferencia estadísticamente significativa respecto del grupo PC(b), con: ^b $p < 0.05$ ^{bb} $p < 0.01$. "c" indica diferencia estadísticamente significativa respecto del grupo PRC(c), con: ^c $p < 0.05$.

➤ **Contenido de MDA.**

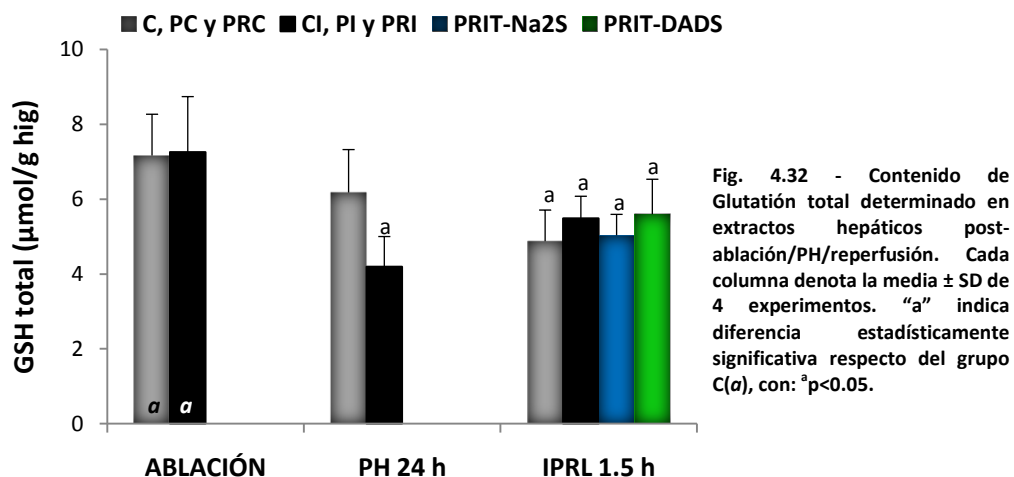
El contenido de malondialdehído se determinó en muestras de hígados de los grupos controles 0 min IC (gris) /45 min IC (negro) en las diferentes etapas del protocolo experimental y en los grupos tratados al final de la reperfusión (figura 4.31). Este aldehído es uno de los productos de la descomposición de lípidos como consecuencia del ataque de especies reactivas del oxígeno (EROs) y, por lo tanto, refleja el daño inducido por estrés oxidativo. El aumento en el contenido de MDA fue detectable únicamente en hígados post-reperfusión, lo cual implicaría que dicho mecanismo de injuria actúa principalmente durante la restauración de la microcirculación hepática. En efecto, se ha reportado que durante la reperfusión post isquemia caliente/fría, la activación de células de kupffer en el espacio vascular es causante de una alta producción de EROs (Jaeschke H y col., 2012). Respecto del efecto de la isquemia caliente en superposición con la isquemia fría, en nuestro modelo experimental no obtuvimos resultados que señalen que la peroxidación lipídica se vea agravada por este tipo de condición. Jha S y col. (2008) probaron que hígados sometidos a isquemia/reperfusión *in vivo* mostraban una disminución en los niveles de peroxidación de lípidos al inyectar Na₂S (1mg/kg) 5 min antes de la reperfusión. No obstante, el tratamiento basado en Na₂S ó DADS que se aplicó en estos experimentos, no produjo cambios en los niveles de MDA.



➤ **Contenido GSH y GSH/GSSG.**

El contenido de Glutathión total intracelular y la relación de Glutathión reducido/oxidado se determinaron en muestras de hígados de los grupos controles 0 min IC (gris) /45 min IC (negro) en las diferentes etapas del protocolo experimental y en los grupos tratados al final de la reperfusión.

Este compuesto es el mayor antioxidante endógeno producido por las células, participando directamente en la neutralización de radicales libres, así como en el mantenimiento de los antioxidantes exógenos, como las vitaminas C y E en sus formas reducidas (activas). La síntesis del GSH es catalizada por la γ -glutamylcisteína sintetasa y la GSH sintetasa y, a su vez, el mismo es regenerado a partir del GSSG mediante la reducción catalizada por la Glutación reductasa. Cuando el daño oxidativo es severo, las células no dan a basto en la reconversión de GSSG a GSH, resultando en el transporte de GSSG al espacio extracelular con la consecuente depleción del glutati6n intracelular. En la figura 4.32 se observan los resultados de la determinaci6n de GSH total en el tejido hepático, los hígados con isquemia caliente mostraron una reducci6n en el contenido de este metabolito post-PH (grupo PI). En lo que concierne a las concentraciones de GSH post-reperfusi6n, se observ6 una disminuci6n respecto de los valores de los grupos C y CI ($p < 0.05$), independientemente de las condiciones de ablaci6n y preservaci6n. Dichas observaciones concuerdan con la descripci6n del rol patofisiol6gico de las especies reactivas del O_2 durante la isquemia/reperfusi6n: la mitocondria, el sistema xantina/xantina oxidoreductasa y las NADPH oxidasas en cel. de Kupffer activadas; son fuentes de generaci6n de EROs que contribuyen a inclinar la balanza redox hacia el estado oxidado (Montalvo-Jave EE y col., 2008).



En la figura 4.33 se observan los valores para la relaci6n GSH/GSSG, allí se observa que si bien esta relaci6n se ve alterada durante el almacenamiento en frío de hígados de donantes a coraz6n parado, la misma parece recuperarse luego de la reperfusi6n, contrario a lo que se esperarí debido a la naturaleza de este tipo de 6rganos. Este aumento observado en la proporci6n de GSH respecto de su especie oxidada podrí tener fundamento en el transporte selectivo del GSSG al espacio extracelular al verse sobrepasada la capacidad buffer antioxidante de las células hepáticas (Denno R y col., 1995). Por otro lado, es importante

señalar que en circunstancias fisiológicas normales la relación GSH/GSSG debería ser superior a 100 (Derick H y col., 2006); sin embargo, según las determinaciones efectuadas en hígados del grupo Control (recién extirpados de donantes a corazón batiente), este índice se encuentra por debajo de 20. Según Sastre J y col. (2005) un 2 % de oxidación en la fracción de GSH de un fluido biológico resulta en un aumento del 100 % en la cantidad de GSSG. Uno de los mayores problemas asociados a la técnica utilizada es la oxidación espontánea de los grupos tioles durante el procesamiento de las muestras y es, quizás, la razón por la cual la cantidad de GSSG presente fue sobreestimada.

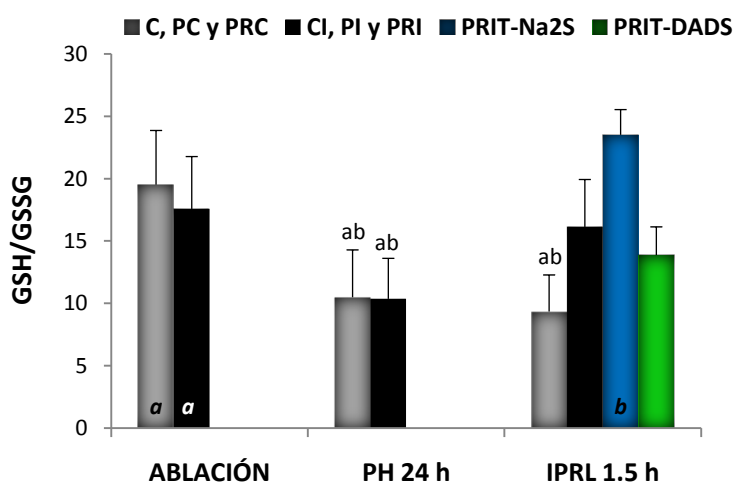


Fig. 4.33 - Índice de glutatión reducido/oxidado determinado en extractos hepáticos post-ablación/PH/reperfusión. Cada columna denota la media \pm SD de 4 experimentos. "a" indica diferencia estadísticamente significativa respecto del grupo C(a), con: $^a p < 0.05$. "b" indica diferencia estadísticamente significativa respecto del grupo PRIT-Na₂S (b), con: $^a p < 0.05$.

➤ Actividad Catalasa y Superóxido Dismutasa.

Los hepatocitos muestran una particular resistencia a la injuria por EROs debido al alto contenido intracelular de catalasa, superóxido dismutasa, GSH y antioxidantes liposolubles.

En la figura 4.34 se muestra la actividad catalasa en el tejido hepático de hígados ablacionados a corazón batiente (gris) y a corazón parado (negro) en cada una de las etapas del proceso y en extractos hepáticos post-reperfusión de hígados con 45 min de IC y preservados en HTK modificada (PRIT-Na₂S/DADS).

La actividad catalasa disminuyó como consecuencia de los 45 min de isquemia en normotermia luego de la inducción del arresto cardíaco (C vs. CI) y como resultado de la isquemia fría de 24 h de duración (C vs. PC y PI). No obstante, en la etapa de reperfusión, todos los grupos experimentales mostraron una recuperación de la actividad catalasa al nivel del control fresco (C), señalando que el sistema de detoxificación de H₂O₂ se halla en funcionamiento tanto en hígados de donantes a corazón batiente como en los que se extrajeron a corazón parado. Es de destacar que la presencia de H₂S en la solución de preservación no produjo incrementos en la actividad de esta enzima.

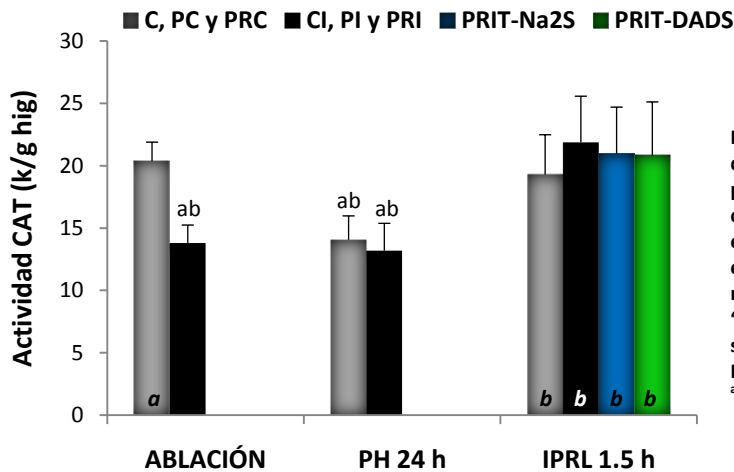


Fig. 4.34 - Actividad catalasa determinada en extractos hepáticos post-ablación/PH/reperfusion. Cada columna denota la media \pm SD de 4 experimentos. "a" indica diferencia estadísticamente significativa respecto del grupo C(a), con: $^a p < 0.05$. "b" indica diferencia estadísticamente significativa respecto de los grupos PRC, PRI y PRIT-Na₂S/DADS(b), con: $^a p < 0.05$.

En la figura 4.35 se graficó la actividad superóxido dismutasa post-reperfusion, aunque no se hallaron diferencias estadísticamente significativas, los hígados de donantes a corazón no batiente preservados en HTK suplementada con DADS (PRIT-DADS), mostraron una moderada inducción de la actividad SOD respecto de los hígados del grupo PRI.

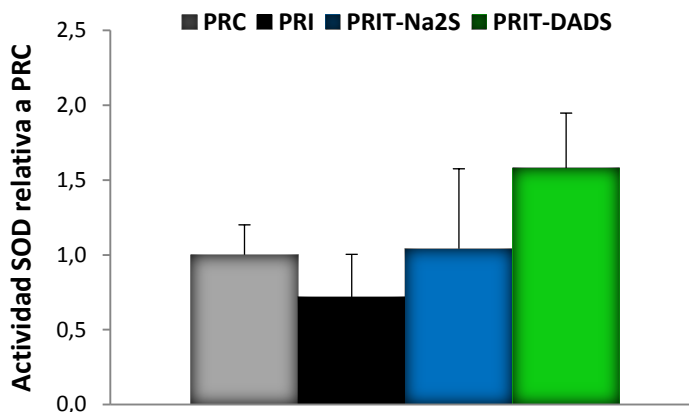


Fig. 4.35 - Actividad superóxido dismutasa determinada en extractos hepáticos post-reperfusion. Cada columna denota la media \pm SD de 3 experimentos. No se hallaron diferencias estadísticamente significativas.

➤ Estudios histológicos post-reperfusion.

Al transcurrir los 90 minutos de perfusión normotérmica *ex vivo*, los hígados son desconectados del sistema para la toma de muestra de diferentes porciones del tejido. Tres de estas muestras son fijadas en formol al 10 % en PBS para luego ser procesadas y fijadas en un portaobjetos donde se llevó a cabo la tinción con Hematoxilina/Eosina. Este protocolo de tinción involucra una primera tinción con hematoxilina, que tiñe los núcleos celulares en tonos azul-violáceos debido a su fuerte interacción con los ácidos nucleicos; y una segunda tinción de contraste con eosina que tiñe, en distintos tonos de color rosa, componentes del citoplasma y de la matriz extracelular.

En general, se observó un buen estado del parénquima hepático para todos los hígados post-reperfusión normotérmica. Es posible apreciar la estructura conservada de los cordones hepatocitarios (CH) delineando los canales sinusoidales entre ellos; por otra parte, no se observó la presencia de núcleos picnóticos indicadores de muerte celular. Las venas centrales (VC) y espacios porta (EP) mostraron un alto grado de conservación en su morfología. Es de destacar, sin embargo, la gran cantidad de células endoteliales de morfología alterada (redondeadas) y parcialmente desprendidas en la luz sinusoidal. Esto concuerda con trabajos previos donde se reportó que las células no parenquimatosas son el principal blanco de injuria durante la fase de isquemia fría (Ikeda T y col., 1992). Las células de Kupffer se hallaron en todos los grupos reperfundidos, éstas mostraron cierta hipertrofia y la presencia de lo que aparenta ser restos apoptóticos. Ya que la activación de células de Kupffer y la injuria de las células endoteliales ocurren simultáneamente durante la reperfusión, es probable que los restos que se observan dentro de los macrófagos sean producto de la fagocitosis de las células endoteliales apoptóticas (Lemasters JJ, 2001).

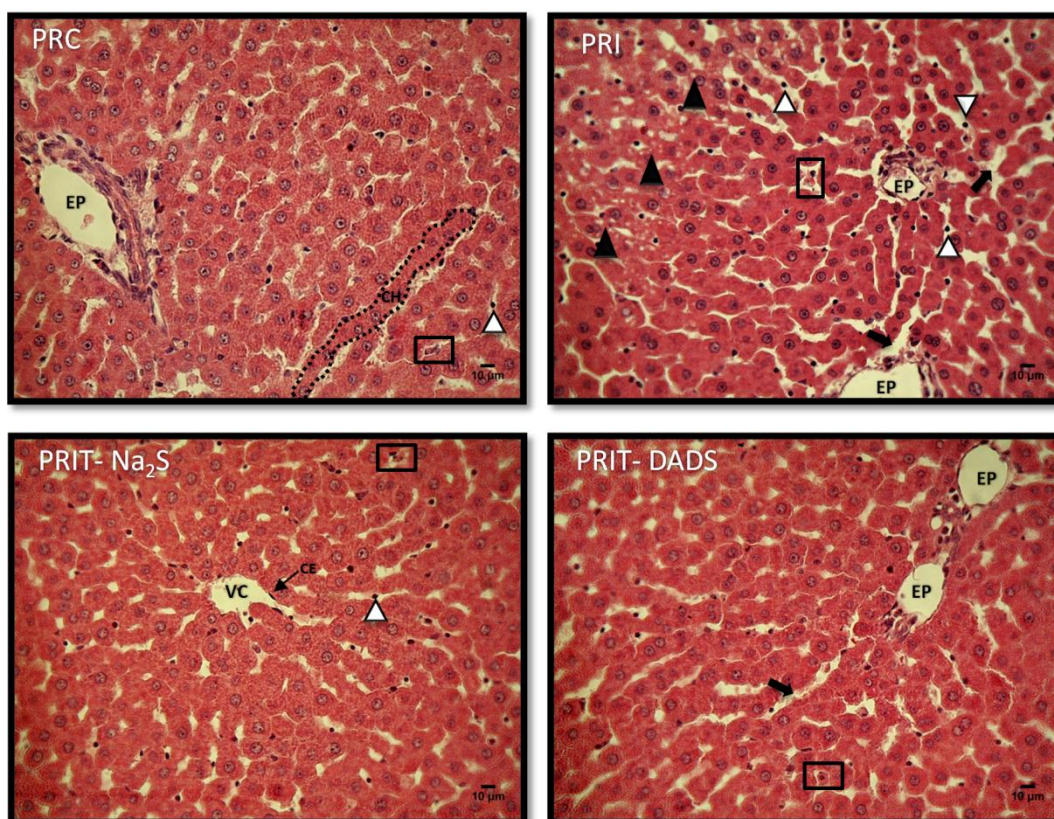


Fig. 4.36 - Imágenes representativas de los campos visuales analizados en busca de signos de injuria. Las flechas negras señalan dilatación sinusoidal; las cabezas de flechas blancas señalan células endoteliales redondeadas y sueltas en los sinusoides; las cabezas de flechas negras señalan presencia de vacuolas en la zona perivenosa y los recuadros negros indican la presencia de macrófagos en los sinusoides. CE= célula endotelial de morfología normal fusiforme; VC= vena central; EP= espacio porta; CH: cordón hepatocitario.

Para el estudio morfométrico (figura 4.37) se eligieron tres signos de injuria que comúnmente se hallan en la histología de un hígado sometido a isquemia/reperfusión: dilatación sinusoidal, vacuolización y presencia de células endoteliales sueltas en los sinusoides.

El tratamiento con dadores de H₂S, aplicado durante el almacenamiento en frío de hígados con isquemia caliente previa, pudo relacionarse con la prevención de la congestión sinusoidal, logrando revertir los porcentajes de dilatación al nivel del grupo control (PRC). Estas observaciones coinciden con el patrón de resistencia intrahepática reportado, señalando que el H₂S, podría estar impidiendo los fenómenos de bloqueo del flujo intrahepático.

Sorprendentemente, aunque no se hallaron diferencias significativas entre los grupos PRC y PRI, la presencia de Na₂S y de DADS en el medio de preservación, produjo una disminución significativa en la frecuencia de citoplasmas vacuolados. La hipoxia, en combinación con una presión hidrostática elevada dentro del hígado, genera el desarrollo de vacuolas como consecuencia del influjo intracitoplasmático del plasma sinusoidal (Li X y col., 2003). Si los dadores de H₂S son capaces de reducir la resistencia intrahepática y mejorar la llegada de O₂ a los hepatocitos, esto podría explicar la disminución en los porcentajes de vacuolización.

Como se menciona anteriormente, la incidencia de células endoteliales dañadas fue bastante elevada en todos los grupos reperfundidos, reflejando la predominancia de la injuria por isquemia fría en el efecto citotóxico.

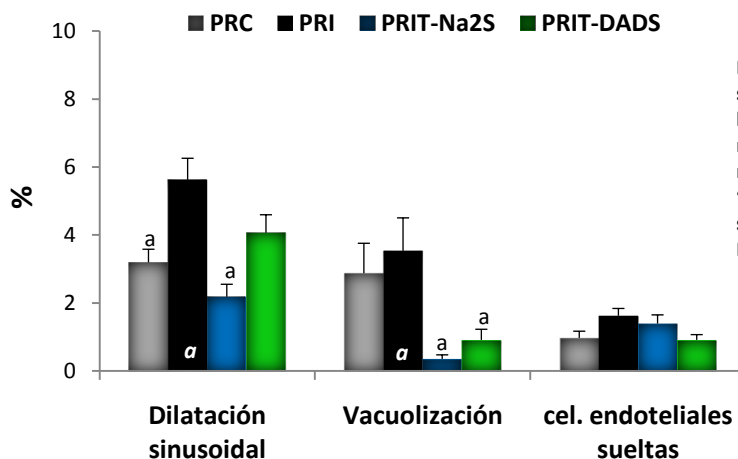


Fig. 4.37 - Porcentaje de aparición de signos de injuria en la morfología hepática en cortes procesados post-reperfundidos. Cada columna denota la media y SEM de 30 campos visuales. "a" indica diferencia estadísticamente significativa respecto del grupo PRI(a), con: ^ap<0.05.

➤ Estudios a nivel de la expresión génica.

Estos estudios fueron realizados en el marco de una pasantía en el exterior con una beca de Boheringer Ingelheim Fonds, en el Centro Studi Fegato de la ciudad de Trieste-Italia. Mediante la técnica de retrotranscripción seguida de PCR en tiempo real se estudió el cambio en el nivel de expresión de genes involucrados en la respuesta al estrés por

isquemia/reperfusión (figura 4.38). Los niveles de ARN mensajero de hígados preservados en frío y luego reperfundidos, fueron expresados en relación a los niveles hallados en hígados frescos (grupo C, no se muestra en la figura).

La enzima hemo oxigenasa (HO) cataliza la conversión del grupo hemo en biliverdina, Fe^{2+} y monóxido de carbono (CO). HO-1, la isoforma inducible de las hemo oxigenasas, se expresa en varios tejidos y es inducida por varios estímulos nocivos, incluyendo citoquinas pro-inflamatorias, hipoxia, metales pesados, choque térmico y otras respuestas patofisiológicas por estrés oxidativo. La biliverdina/bilirrubina es un potente antioxidante que elimina radicales peroxilos y el CO ejerce propiedades anti-inflamatorias y antiapoptóticas (Ryter SW y col., 2006). La inducción de HO-1 a través de la vía del factor Nrf-2 ha sido vinculada a los tratamientos citoprotectores con dadores de H_2S en modelos de isquemia cardíaca (Calvert JW y col., 2009).

En las presentes condiciones experimentales, hallamos un marcado incremento en la expresión de HO-1 en hígados de donantes a corazón parado respecto de los órganos ablacionados a corazón batiente ($p < 0.01$). Por otro lado, la presencia de compuestos liberadores de H_2S en la solución de preservación generó un efecto represor en la inducción de este gen ($p < 0.05$ vs. PRI). La inducción de la expresión de HO-1 es un claro indicio de la activación de respuestas endógenas frente al estrés generado por este modelo de isquemia al igual que lo reportado en otras experiencias (Yun N y col., 2010). Resulta de particular interés en estos resultados, el efecto del H_2S durante la fase de isquemia fría que, en lugar de inducir la expresión de HO-1, revirtió los niveles de mRNA a los de un órgano extraído a corazón batiente (PRC). Podría plantearse que el H_2S ejerció cierto poder de contención de la situación, modulando la cascada de señales que generan la inducción de marcadores de estrés como la HO-1.

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) es una citoquina pro-inflamatoria liberada por las células de Kupffer que se activan durante el fenómeno de isquemia/reperfusión. TNF- α promueve la muerte de los hepatocitos y el reclutamiento de neutrófilos agravando la injuria post-isquemia (Lemasters JJ, 2001). El gasotransmisor H_2S ha sido descrito como mediador anti-inflamatorio en diferentes modelos de isquemia/reperfusión (Kang K y col., 2009).

Los resultados indicaron que TNF- α se encuentra altamente expresado en todos los hígados preservados y reperfundidos con respecto al control fresco, con diferencias estadísticamente significativas en el caso de hígados extirpados 45 min después del paro cardio-respiratorio (grupos PRI, PRIT- Na_2S y PRIT-DADS). El tratamiento aplicado durante la isquemia fría no impidió la inducción de este mediador inflamatorio, desestimando el poder anti-inflamatorio del H_2S en las condiciones experimentales planteadas.

Uno de los mecanismos de defensa celular para lidiar con el estrés oxidativo es incrementar la expresión de genes que codifican para enzimas antioxidantes mediante la activación de factores de transcripción sensibles al estado redox intracelular como el Nrf-2. Este factor reconoce elementos de respuesta antioxidante (ARE) en la región promotora de genes relevantes para la respuesta redox (Zhu H y col., 2005). Algunos estudios sugieren que los efectos antioxidantes del H₂S podrían ser, en parte, resultado de la activación de la vía del Nrf-2 (Calvert JW y col., 2009).

El mRNA de Nrf-2 se halló aumentado en hígados con isquemia caliente previa en ausencia y en presencia del dador DADS. Sin embargo, cuando se trató la solución con Na₂S no se observaron cambios en la expresión. Estos resultados no permiten esclarecer el rol de los niveles de mRNA de Nrf-2 en nuestro modelo de procuración a corazón parado. Un estudio a nivel de la distribución subcelular de este factor de transcripción podría brindar información valiosa respecto de su activación y posterior migración al núcleo.

Tanto el gen de la Glutatión reductasa (GSR) como el de la NAD(P)H:quinona oxidoreductasa-1 (NQO-1) son blancos de la regulación mediada por Nrf-2 en situaciones de estrés oxidativo (Zhu H y col., 2005). La expresión de estos dos genes no se vio afectada en este protocolo de preservación hipotérmica seguida de reperfusión *ex vivo*, sin importar las condiciones de ablación ni la presencia de H₂S en la fase de isquemia fría. Aunque no contamos con evidencias experimentales respecto de la migración al núcleo de Nrf-2, podría plantearse que en estas circunstancias particulares, no está ocurriendo la activación de este factor.

La apoptosis celular es un mecanismo que ha demostrado tener una importante contribución en la injuria durante la reperfusión hepática. Por este motivo, la inhibición de las vías apoptóticas constituye un importante blanco de acción para atenuar la muerte celular en órganos a trasplantar. Estudios previos indican que el H₂S ejerce efectos antiapoptóticos mediante la inducción del gen que codifica para Bcl-2 (Calvert JW y col., 2009). Bcl-2 impide la liberación del citocromo c de la mitocondria a través de su interacción con Bax.

No se observaron cambios respecto de la expresión de Bcl-2 para ninguno de los grupos contrastados, el suministro de fuentes de H₂S no involucró la activación de mecanismos antiapoptóticos en las condiciones experimentales descriptas.

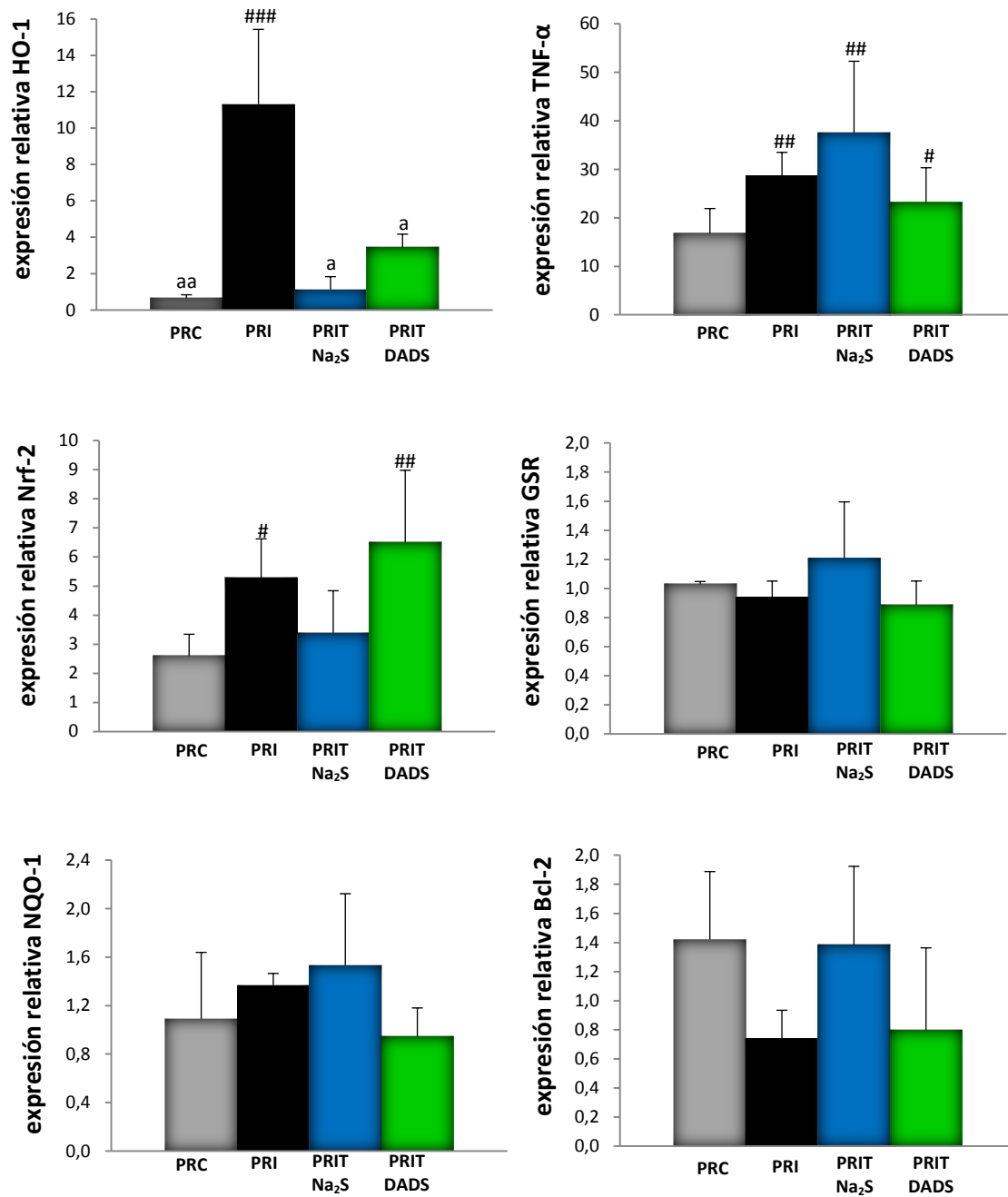


Fig. 4.38 - Expresión relativa de los genes HO-1, TNF- α , Nrf-2, Bcl-2, GSR y NQO-1, tras la PH y reperusión *ex vivo*. Se adjudicó el valor 1 al nivel de expresión en el grupo C (no se muestra en el gráfico) y a partir de éste se calcularon las expresiones relativas en los demás grupos. Cada columna denota la media \pm SD de 3 experimentos. "a" indica diferencia estadísticamente significativa respecto del grupo PRI con: ^ap<0.05 y ^{aa}p<0.01. "#" indica diferencia estadísticamente significativa respecto del grupo C con: #p<0.05, ##p<0.01 y ###p<0.001.

4.3.1.4 Conclusión parcial del H₂S en el rescate de hígados de donantes a corazón parado.

El reacondicionamiento de hígados provenientes de donantes a corazón no batiente ofrece la oportunidad de mejorar los resultados y también aumentar la disponibilidad de este tipo de órganos marginales. El avance en la comprensión de los fenómenos patofisiológicos asociados a la donación tras el cese cardíaco ha fomentado el desarrollo de estrategias farmacológicas en las distintas etapas de la procuración (en el donante, durante el almacenamiento del órgano ó en el receptor). En este sentido, las propiedades citoprotectoras asociadas al tratamiento con bajas dosis de H₂S, convierten a este gasotransmisor en un potencial agente “reanimador” de órganos marginales. En estos experimentos, se planteó la posibilidad de revertir el daño provocado durante la isquemia caliente en la fase de almacenamiento hipotérmico, una etapa generalmente ineludible del trasplante ante la necesidad de disponer de un tiempo para la preparación de la cirugía y transporte del órgano, de ser necesario.

El sistema de perfusión *ex vivo* constituyó una herramienta fundamental en la evaluación del estado funcional de los hígados. Las variables estudiadas durante la reperfusión revelaron una diferencia significativa entre hígados extirpados 45 minutos post-cese cardíaco (PRI) e hígados extraídos a corazón batiente (PRC), validando así, el modelo de donante a corazón parado utilizado. Sin embargo, vale la pena mencionar que en lo que concierne al estado redox (contenido de MDA, GSH y actividad enzimática antioxidante) no pudo establecerse una asociación entre ablación a corazón parado y estrés oxidativo. En este sentido, el trasplante experimental podría aportar un cuadro más completo de lo que sucede en durante la reperfusión de estos órganos.

Tanto la Resistencia intrahepática, producción de bilis, consumo de oxígeno y liberación de LDH y ALT reflejaron una cierta mejora en la preservación de la función y viabilidad hepática cuando hígados de donantes a corazón no batiente fueron almacenados en HTK suplementada con una fuente de H₂S (DADS ó Na₂S). A su vez, en los cortes histológicos teñidos con hematoxilina/eosina pudo apreciarse una disminución en la dilatación de los sinusoides cuando se utilizó Na₂S como dador de H₂S, y la presencia de vacuolas en el citoplasma se redujo sustancialmente cuando se utilizaron ambos compuestos dadores. Por último, la expresión del gen HO-1 fue significativamente mayor en la reperfusión de hígados con 45 min de isquemia caliente previa a la PH (PRI); en tanto que, cuando estos órganos marginales se almacenaron en frío con intervención farmacológica (PRIT-Na₂S/DADS), la inducción estuvo ausente.

En lo que concierne al estado de las reservas energéticas en forma de glucógeno, extensión del daño por peroxidación lipídica, estado redox (GSH/GSSG), actividad enzimática

antioxidante y regulación de la expresión génica de mediadores inflamatorios, reguladores de la apoptosis y enzimas antioxidantes; no se obtuvieron datos que avalen un efecto citoprotector por parte del tratamiento propuesto.

5. CONCLUSIONES FINALES.

- El sistema de perfusión de hígado aislado es la última fase del modelado *in vitro* antes de pasar al trasplante experimental. Este enfoque permite responder a los principales interrogantes de la pato-fisiología de la isquemia/reperfusión hepática dando lugar a una selección pre-clínica de potenciales desarrollos en el campo del trasplante hepático terapéutico. En el presente trabajo de tesis, el sistema de reperfusión *ex vivo* constituyó la herramienta central para la evaluación de hígados sometidos a protocolos de preservación hipotérmica. Parámetros como la producción de bilis, síntesis de urea y excreción de un colorante aniónico, reflejaron el nivel de preservación de la función hepática, en tanto que, la liberación de enzimas al perfusato, la resistencia intrahepática y consumo de O₂, fueron indicadores de la viabilidad y estado de la microcirculación.
- La donación de hígados a corazón parado es considerado, actualmente, el enfoque de mayor potencial para sostener la creciente demanda de hígados para trasplante. Sin embargo, la potencialidad de estos órganos depende del poder de reacondicionamiento de los mismos a través de distintas estrategias de preservación y/o la manipulación farmacológica. En el capítulo 4.2 de los Resultados y discusiones se describieron las condiciones experimentales ensayadas para el desarrollo de un modelo de donante a corazón parado con un tiempo de isquemia controlado, circunstancias que definen las categorías III y IV de la clasificación de donantes post-arresto cardíaco del criterio Maastricht (Monbaliu D y col., 2012). En suma, el animal sedado fue preparado en la tabla de operaciones tras lo cual se indujo el paro cardio-respiratorio mediante la inyección, vía vena femoral, de una solución 1 M KCl, 500 UI/mL heparina. De esta forma, la sobrecarga de K⁺ produce el cese del latido cardíaco mientras que, la infusión de heparina, facilita la perfusión post-isquemia caliente. El tiempo de isquemia caliente seleccionado fue de 45 min ya que mostró una injuria por isquemia/reperfusión agravada respecto de los hígados controles de donantes a corazón batiente, en tanto que, no fue lo suficientemente extremo como para llegar a la irreversibilidad del cuadro según reportes previos (He XS y col., 2004).
- El sulfuro de hidrógeno, considerado durante muchos años tan solo un gas nocivo para la salud, ha sido redescubierto en su identidad de mediador fisiológico relevante y miembro de la familia de los gasotransmisores junto con el óxido nítrico y monóxido de carbono. Sus funciones abarcan la vasodilatación, neutralización de

EROs, regulación anti-inflamatoria y antiapoptótica. Además de estas propiedades, uno de los más importantes descubrimientos respecto del H₂S en los últimos años fue su habilidad para inducir un estado hipometabólico reversible. El H₂S es capaz de reducir la demanda de O₂ del tejido mediante la unión a citocromo c oxidasa de la mitocondria. Estas propiedades resultan de particular interés en la situación de hipoxia ineludible que atraviesan los órganos durante un trasplante. En esta tesis se planteó la aplicación farmacológica de compuestos dadores de H₂S durante el almacenamiento en hipotermia de hígados marginales, para ello se seleccionaron dos fuentes liberadoras de H₂S para suplementar el medio de preservación. El disulfuro de dialilo es un derivado natural del ajo, capaz de liberar H₂S como resultado de su interacción con tioles celulares. En el capítulo 4.1.2 se preseleccionó la dosis de 5 µM para ser utilizada luego, en el rescate de hígados extirpados acorde al modelo de donante a corazón parado. Por otro lado, el disulfuro de sodio actúa como un electrolito fuerte que libera el anión sulfuro S⁻² y éste en medio acuoso se combina para formar HS⁻ y H₂S. A través del reactivo de Ellman (DTNB) se comprobó la presencia de H₂S en la solución de preservación, incluso luego de 24 h de almacenamiento en frío.

- La manipulación de ciertas vías de señalización durante el almacenamiento hipotérmico de órganos para trasplante, podría ofrecer una respuesta al desafío de la recuperación de órganos marginales. El agregado de compuestos dadores de H₂S a la solución de preservación mostró resultados alentadores para el reacondicionamiento de hígados sometidos a una isquemia caliente controlada de 45 minutos de duración. Los parámetros de funcionalidad y viabilidad que durante la reperfusión *ex vivo* de hígados de donantes a corazón parado reflejaron una injuria incrementada, mostraron importantes mejoras cuando se agregó DADS o Na₂S al medio de preservación hipotérmica. La expresión del gen HO-1 fue significativamente mayor en la reperfusión de hígados ablacionados post-cese cardíaco; en tanto que, cuando estos órganos marginales se almacenaron en frío en presencia de H₂S, se halló un efecto restrictivo de la inducción de este marcador de estrés. Por otro lado, los estudios destinados a indagar en los efectos antioxidantes del tratamiento propuesto no arrojaron resultados que sostengan este rol en el modelo experimental utilizado.

En resumen, los hígados ablacionados a corazón parado mostraron la reversión del cuadro de injuria a niveles comparables con los de hígados de donantes convencionales al contrastarlos en un sistema de reperfusión *ex vivo*. Sin embargo, no se hallaron evidencias experimentales respecto de los mecanismos de acción a través de los cuales se ejerció el efecto citoprotector.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Abt PL, Desai NM, Crawford MD, Forman LM, Markmann JW, Olthoff KM y Markmann JF (2004). Survival following liver transplantation from non-heart-beating donors. *Ann Surg*, 239: 87–92.
- Accatino L, Pizarro M, Solís N, Arrese M y S. Koenig CS (2003). Bile Secretory Function After Warm Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury in the Rat. *Liver Transplantation*, 9(11): 1199-1210.
- Aebi H (1984). Catalase *in Vitro*. En: *Methods in Enzymology*. Academic Press, New York. Cap. 105, pp. 121-126.
- Balaban CL, Rodríguez JV, and Guibert EE (2011). Delivery of the Bioactive Gas Hydrogen Sulfide During Cold Preservation of Rat Liver: Effects on Hepatic Function in an Ex vivo Model. *Artificial Organs*, 35(5): 508–515.
- Balaban CL, Rodríguez JV, Guibert EE. 7th Latin American Congress Of Artificial Organs And Biomaterials (COLAOB), Brasil, Agosto 2012. presentación de poster: “Graft recovery mediated by diallyl disulfide during cold storage in a non-heart beating rat liver donation model”. Trabajo extendido 07-049.docx publicado en <http://www.colaob.com.br/anais>.
- Bellamy CA, Nicely B, Mattice BJ, Teaster R (2008). Comparative analysis of clinical efficacy and cost between University of Wisconsin solution and histidine-tryptophan-ketoglutarate. *Prog Transplant*, 18: 166-171.
- Benavides G, Squadrito GL, Mills RW, Patel HD, Isbell TS, Patel RP, Darley-Usmar VR, Doeller JE y Krauss DW (2007). Hydrogen sulfide mediates the vasoactivity of garlic. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104: 17977–82.
- Bernat JL, D'Alessandro AM, Port FK, Bleck TP, Heard SO, Medina J, Rosenbaum SH, Devita MA, Gaston RS, Merion RM, Barr ML, Marks WH, Nathan H, O'connor K, Rudow DL, Leichtman AB, Schwab P, Ascher NL, Metzger RA, Mc Bride V, Graham W, Wagner D, Warren J, Delmonico FL (2006). Report of a National Conference on Donation after cardiac death. *Am J Transplant*, 6(2): 281-91.
- Bessems M, 't Hart NA, Tolba R, Doorschodt BM, Leuvenink HGD, Ploeg RJ, Minor T and van Gulik TM (2006). The isolated perfused rat liver: standardization of a time-honoured model. *Laboratory Animals*, 40: 236–246.
- Blackstone E, Morrison M y Roth MB (2005). H₂S Induces a Suspended Animation–Like State in Mice. *Science*, 308: 518.
- Butler AR, Hussain I and Leitch E (1981). The chemistry of the diacetyl monoxime assay of urea in biological fluids. *Clínica chimica Acta*, 112: 357-360.

- Butterworth RF y Vaquero J (2009). Hepatic Encephalopathy. En: *The liver: Biology and Pathobiology*, 5th ed.; editores: Arias, Alter, Boyer, Cohen, Fausto, Shafritz y Wolkoff, John Wiley & Sons Ltd., Chichester, UK. Cap. 39, pp. 599-617.
- Calvert JW, Coetzee WA y Lefer DJ (2010). Novel Insights Into Hydrogen Sulfide–Mediated Cytoprotection. *Antioxid Redox Signal*, 12: 1203–1217.
- Calvert JW, Jha S, Gundewar S, Elrod JW, Ramachandran A, Pattillo CB, Kevil CG y Lefer DJ (2009). Hydrogen sulfide mediates cardioprotection through Nrf2 signaling. *Circ Res*, 105: 365-374.
- Carr RS, Neff JM (1984). Quantitative semi-automated enzymatic assay for tissue glycogen. *Comp Biochem Physiol*, 77: 447–9.
- Chan EY, Stang SL, Bottorff DA y Stone JC (1999). Hypothermic stress leads to activation of Ras-Erk signaling. *J Clin Invest*, 103: 1337–1344.
- Combes B (1965). The Importance of Conjugation with Glutathione for Sulfobromophthalein Sodium (BSP) Transfer from Blood to Bile. *Journal of Clinical Investigation*, 44(7): 1214-24.
- Denno R, Takabayashi A, Sugano M, Awane M, Jin M, Morimoto T, Tanaka K, Yamaoka Y, Kobayashi N y Ozawa K (1995). The ratio of reduced glutathione/oxidized glutathione is maintained in the liver during short-term hepatic hypoxia. *J. Gastroenterology*, 30(3): 338-346.
- Elrod JW, Calvert JW, Morrison J, Doeller JE, Kraus DW, Tao L, Jiao X, Scalia R, Kiss L, Szabo C, Kimura H, Chow C-W, and Lefer DJ (2007). Hydrogen sulfide attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by preservation of mitochondrial function. *PNAS*, 104(39): 15560–15565.
- Furchgott RF, Zawadzki JV (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 288: 288-373.
- García Valdecasas JC, Tabet J, Valero R, Taurá P, Rull R, García F, Montserrat E, González F, Ordi J, Beltran J, López Boado M, Deulofeu R, Angás J, Cifuentes A y Visa J (1998). Liver conditioning after cardiac arrest: the use of normothermic recirculation in an experimental animal model. *Transpl Int*, 11: 424-432.
- Glantzounis GK, Salacinski HJ, Yang W, Davidson BR y Seifalian AM (2005). The Contemporary Role of Antioxidant Therapy in Attenuating Liver Ischemia-Reperfusion Injury: A Review. *Liver Transplantation*, 11(9): 1031-1047.
- Gnaiger E (2010). Oxygen solubility in experimental media. *OROBOROS bioenergetics newsletter*, 6.3: 1–6.

- Griffith OW (1980). Determination of Glutathione and Glutathione Disulfide Using Glutathione Reductase and 2-Vinylpyridine. *Analytical Biochemistry*, 106: 207–212.
- Grisham JW (2009). Organizational Principles of the Liver. En: *The liver: Biology and Pathobiology*, 5th ed.; editores: Arias, Alter, Boyer, Cohen, Fausto, Shafritz y Wolkoff, John Wiley & Sons Ltd., Chichester, UK. Cap. 1, pp. 3-15.
- Guibert EE, Petrenko AY, Balaban CL, Somov AY, Rodríguez JV & Fuller B J (2011). Organ Preservation: Current Concepts and New Strategies for the Next Decade. *Transfusion medicine and hemotherapy*, 38(2): 125–142.
- Han D, Hanawa N, Saberi B y Kaplowitz N (2006). Mechanisms of Liver Injury. III. Role of glutathione redox status in liver injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 291: G1–G7.
- He XS, Ma Y, Wu LW, Ju WQ, Wu JL, Hu RD, Chen GH, Huang JF (2004). Safe time to warm ischemia and posttransplant survival of liver graft from non-heart-beating donors. *World J Gastroenterol*, 10(21): 3157-3160.
- Hosoki R, Matsuki N, Kimura H (1997). The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun*, 237: 527–31.
- Hughes MN, Centelles MN, Moore KP (2009). Making and working with hydrogen sulfide. The chemistry and generation of hydrogen sulfide in vitro and its measurement in vivo: A review. *Free Radical Biology & Medicine*, 47: 1346–1353.
- Ikeda T, Yanaga K, Kishikawa K, Kakizoe S, Shimada M, Sugimachi K (1992). Ischemic injury in liver transplantation: difference in injury sites between warm and cold ischemia in rats. *Hepatology*, 16(2): 454-61.
- Jaeschke H y Woolbright BL (2012). Current strategies to minimize hepatic ischemia–reperfusion injury by targeting reactive oxygen species. *Transplant Rev (Orlando)*, 26(2): 103–114.
- Jha S, Calvert JW, Duranski MR, Ramachandran A y Lefer DJ (2008). Hydrogen sulfide attenuates hepatic ischemia-reperfusion injury: role of antioxidant and antiapoptotic signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 295: H801–H806.
- Kang K, Zhao M, Jiang H, Tan G, Pan y Sun X (2009). Role of Hydrogen Sulfide in Hepatic Ischemia-Reperfusion–Induced Injury In Rats. *Liver Transplantation*, 15: 1306-1314.
- Karatas F, Karatepe M y Baysar A (2002). Determination of free malondialdehyde in human serum by high-performance liquid chromatography. *Analytical Biochemistry*, 311: 76-79.

- Ke B, Shen XD, Zhang Y, Ji H, Gao F, Yue S, Kamo N, Zhai Y, Yamamoto M, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW (2013). KEAP1-NRF2 complex in ischemia-induced hepatocellular damage of mouse liver transplants. *J Hepatol*, 59(6): 1200-7.
- Kolluru GK, Shen X, Bir SC, Kevil CG (2013). Hydrogen sulfide chemical biology: Pathophysiological roles and detection. *Nitric Oxide*, 35: 5–20.
- Lee CY y Mangino MJ (2009). Preservation methods for kidney and liver. *Organogenesis*, 5(3): 105-112.
- Lemasters JJ (2001). Hypoxic, Ischemic and reperfusion injury to liver. En: *The liver: Biology and Pathobiology*, 4th ed.; editores: Arias, Boyer, Chisari, Fausto, Schachter, y Shafritz, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. Cap. 18, pp. 258-279.
- Li L, Whiteman M, Guan YY, Neo KL, Cheng Y, Lee SW, Zhao Y, Baskar R, Tan CH, Moore PK (2008). Characterization of a novel, water-soluble hydrogen sulfide-releasing molecule (GYY4137): new insights into the biology of hydrogen sulfide. *Circulation*, 117(18): 2351-60.
- Li X, Elwell MR, Ryan AM y Ochoa R (2003). Morphogenesis of Postmortem Hepatocyte Vacuolation and Liver Weight Increases in Sprague-Dawley Rats. *Toxicologic Pathology*, 31: 682–688.
- Linden PK (2009). History of Solid Organ Transplantation and Organ Donation. *Crit Care Clin* 25: 165–184.
- McAnulty J F (2010). Hypothermic organ preservation by static storage methods: Current status and a view to the future. *Cryobiology*, 60: S13–S19.
- Meine MH, Zanutelli ML, Neumann J, Kiss G, de Jesus Grezzana T, Leipnitz I, Schlindwein ES, Fleck A, Gleisner AL, de Mello Brandão A, Marroni CA, Cantisani GP (2006). Randomized clinical assay for hepatic grafts preservation with University of Wisconsin or histidine-tryptophan-ketoglutarate solutions in liver transplantation. *Transplantation proceedings*, 38(6): 1872-5.
- Mendes-Braz M, Elias-Miró M, Jiménez-Castro MB, Casillas-Ramírez A, Ramalho FS y Peralta C (2012). The Current State of Knowledge of Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury Based on Its Study in Experimental Models. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012: 1-20.
- Miyata T, Takizawa S, van Ypersele de Strihou C (2011). Hypoxia. 1. Intracellular sensors for oxygen and oxidative stress: novel therapeutic targets. *Am J Physiol Cell Physiol*, 300(2): C226-231.

- Monbaliu D, Pirenne J, Talbot D (2012). Liver transplantation using Donation after Cardiac Death donors. *Journal of Hepatology*, 56: 474–485.
- Monbaliu D, Vekemans K, Liu Q, Heedfeld V, Wylín T, Van Breussegem A, Pirenne J (2008). Liver Transplantation from Non-Heart-Beating Donors: Current Status and Future Prospects in an Experimental Model. *Acta chir bel.*, 108: 45-51.
- Montalvo-Jave EE, Escalante-Tattersfield T, Ortega-Salgado JA, Piña E y Geller DA (2008). Factors in the pathophysiology of the liver ischemia reperfusion injury. *J Surg Res.*, 147(1): 153–159.
- Nashef AS, Osuga DT, Feeney RE (1977). Determination of Hydrogen Sulfide with 5,5'-Dithiobis-(2-Nitrobenzoic Acid), N-Ethylmaleimide, and Parachloromercuribenzoate. *Analytical Biochemistry*, 79: 394-405.
- Nicholson CK, Calvert JW (2010). Hydrogen sulfide and ischemia–reperfusion injury. *Pharmacological Research*, 62: 289–297.
- Olson BJ y Markwell J (2007). Assays for Determination of Protein Concentration. *Current Protocols in Protein Science*, 48: 3.4.1–3.4.29.
- Pfaffl MW (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.*, 29: e45.
- Pizarro MD, Rodríguez JV, Mamprin ME, Fuller BJ, Mann B, Motterlini R y Guibert EE. (2009). Protective effects of a carbon monoxide-releasing molecule (CORM-3) during hepatic cold preservation. *Cryobiology*, 58(3): 248-255.
- Quintana AB, Guibert E E y Rodríguez J V (2005). Effect of cold preservation/reperfusion on glycogen content of liver. Concise review. *Annals of hepatology*, 4(1): 25–31.
- Rahmatullah M and Boyde T.C.R. Improvements in the determination of urea using diacetyl monoxime; methods with and without deproteinization (1980). *Clínica chimica Acta*, 107: 3-9.
- Rayya F, Harms J, Martin AP, Bartels M, Hauss J, Fangmann J (2008). Comparison of histidine-tryptophan-ketoglutarate solution and University of Wisconsin solution in adult liver transplantation. *Transplant Proc*, 40: 891-894.
- Rodríguez JV, Guibert EE, Quintana AB, Scandizzi AL, y Almada L (1999). Role of Sodium Nitroprusside in the Improvement of Rat Liver Preservation in University of Wisconsin Solution: A Study in the Isolated Perfused Liver Model. *J Surg Res*, 87: 201-208.
- Ryter SW, Alam J, And Choi MKA (2006). Heme Oxygenase-1/Carbon Monoxide: From Basic Science to Therapeutic Applications. *Physiol Rev*, 86: 583–650.

- Sastre J, Pallardo FV, Viña J (2005). Glutathione. *The Handbook of Environmental Chemistry*, 2(O): 91–108.
- Shaik H, George JM, Thekkumkara TJ y Mehvar R (2008). Protective Effects of Diallyl Sulfide, a Garlic Constituent, on the Warm Hepatic Ischemia–Reperfusion Injury in a Rat Model. *Pharmaceutical Research*, 25(10): 2231-2241.
- Starzl TE, Marchioro TL, Vonkaulla KN, Hermann G, Brittain RS, Waddell WR (1963). Homotransplantation of the liver in humans. *Surg Gynecol Obstet*, 117: 659-76.
- Szabó C (2007). Hydrogen sulphide and its therapeutic potential. *Nature reviews*, 6: 917-935.
- Talwar GP y Srivastava LM (2003). *Textbook of Biochemistry and Human Biology*, 3rd edition. Prentice-Hall of India Private Limited, New Delhi, India.
- Thamara M, Perera PR, Bramhall SR. Current status and recent advances of liver transplantation from donation after cardiac death. *World J Gastrointest Surg*, 3(11): 167-176.
- Tichopad A, Didier A, y Pfaffl MW (2004). Inhibition of real-time RT-PCR quantification due to tissue-specific contaminants. *Mol. Cell Probes*, 18: 45-50.
- Weydert CJ y Cullen JJ (2010). Measurement of superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. *Nat Protoc.*, 5(1): 51–66.
- Yun N, Eum H-A y Lee S-M (2010). Protective Role of Heme Oxygenase-Against Liver Damage Caused by Hepatic Ischemia and Reperfusion in Rats. *Antioxidants & Redox Signaling*, 13(10): 1503-1512.
- Zhu H, Itoh K, Yamamoto M, Zweier JL, Li Y. (2005). Role of Nrf2 signaling in regulation of antioxidants and phase 2 enzymes in cardiac fibroblasts: Protection against reactive oxygen and nitrogen species-induced cell injury. *FEBS Letters*, 579: 3029–3036.