



Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud (D420)

**ESTUDIO EXPERIMENTAL ALEATORIZADO SOBRE
LA EFICACIA DE LA PRESERVACIÓN RENAL
HIPOTÉRMICA EN MÁQUINA CON
SUPLEMENTACIÓN DE OXÍGENO**

Tesis Doctoral presentada por:

VITAL HEVIA PALACIOS

Directores: V Gómez Dos Santos, FJ Burgos Revilla

Alcalá de Henares, 2022



Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud (D420)

**ESTUDIO EXPERIMENTAL ALEATORIZADO SOBRE
LA EFICACIA DE LA PRESERVACIÓN RENAL
HIPOTÉRMICA EN MÁQUINA CON
SUPLEMENTACIÓN DE OXÍGENO**

Tesis Doctoral presentada por:

VITAL HEVIA PALACIOS

Directores: V Gómez Dos Santos, FJ Burgos Revilla

Alcalá de Henares, 2022

Detrás de cada línea de llegada, hay una de partida.
Detrás de cada logro, hay otro desafío.
Mientras estés vivo, siéntete vivo.
Si extrañas lo que hacías, vuelve a hacerlo.
No vivas de fotos amarillas...

Sigue, aunque todos esperen que abandones.
No dejes que se oxide el hierro que hay en ti.
Haz que, en vez de lástima, te tengan respeto.

Cuando por los años no puedas correr, trota.
Cuando no puedas trotar, camina.
Cuando no puedas caminar, usa el bastón
¡Pero nunca te detengas!

Madre Teresa de Calcuta. 1910-1997



Dedicatoria

A mi mujer Bea y a mis hijos Guillermo y Gonzalo, el mayor regalo que me ha concedido la vida. Porque, como dijo Gistau, *“sacáis la mejor versión de mi mismo y sois cimiento sobre el cual proyectar cosas que perduren”*.

A la familia que me vio nacer y me ve crecer, admirados padres y hermanos, quienes me inculcasteis la buena educación e imprimisteis en mí muchos de los valores que me han hecho ser la persona que soy. Y en especial a la memoria de mi abuela Andrea: tu ejemplo imborrable en el final de la vida nunca dejará de inspirarme.

A la memoria de mi querido y añorado Santi Echevarría Chalbaud: el camino desde tu frágil vida hasta la eternidad no pudo tener mejores guías ni dejar mayor legado. Descansa en paz y que tu ejemplo no deje de guiarme.



Agradecimientos

A mis directores de Tesis Doctoral, la Dra. Victoria Gómez y El Dr. Javier Burgos, por empujarme a llevar a cabo este duro trabajo en el campo del trasplante renal, cuyo magnetismo me atrapó desde mis tiempos de estudiante de Medicina.

A tantos y tan diversos profesionales participantes en este proyecto experimental, cuya compleja infraestructura ha exigido grandes dosis de sincronización, colaboración y trabajo en equipo bajo la inagotable organización de la Dra. Victoria Gómez.

A mis compañeros médicos del Hospital Universitario Ramón y Cajal, adjuntos y residentes, quienes con vuestro ejemplo y buen hacer contribuís a que sea el profesional que soy. Y también a aquellos que me ayudaréis a ser aún mejor en este proceso de constante aprendizaje.

A Javier González, por su desinteresada colaboración con algunas ilustraciones claves en este texto.

Y por último y más importante a mi familia, por su incondicional apoyo y confianza en mis posibilidades. Os lo debo todo.



Códigos UNESCO

TÍTULO DE LA TESIS DOCTORAL:

ESTUDIO EXPERIMENTAL ALEATORIZADO SOBRE
LA EFICACIA DE LA PRESERVACIÓN RENAL
HIPOTÉRMICA EN MÁQUINA CON
SUPLEMENTACIÓN DE OXÍGENO

CÓDIGOS UNESCO

321306 – Cirugía Experimental
321314 – Cirugía de los Trasplantes
321316 – Cirugía Urológica



Abreviaturas y acrónimos

ACV: accidente cerebrovascular	FMNH2: flavín mononucleótido reducido
ADP: adenosín difosfato	FP: flujo de perfusión
ADN: ácido desoxirribonucleico	FRA: fracaso renal agudo
ADNc: ADN complementario	FRR: función renal retrasada
AMP: adenosín monofosfato	GST: alfa-glutación-S-transferasa
ATP: adenosín trifosfato	H₂O: agua
ARN: ácido ribonucleico	H-E: hematoxilina - eosina
AUC: área bajo la curva	HD: hemodiálisis
CTE: cadena transportadora de electrones	HIF-1α: factor inducible por hipoxia1 α
DA: donación en asistolia	HTA: hipertensión arterial
DAC: donación en asistolia controlada	IIA: infiltrado inflamatorio agudo
DANC: donación en asistolia no controlada	I/R: isquemia-reperfusión
DCE: donante de criterio expandido	IR: índice de resistencia
DCI: disfunción crónica del injerto	IRC: insuficiencia renal crónica
DCT: Differential Cross-Threshold	IRT: insuficiencia renal terminal
dl: decilitro	K: potasio
DP: diálisis peritoneal	Kcal: kilocalorías
ECMO: <i>extracorporeal membrane oxygenator</i>	Kg: kilogramo
FG: filtrado glomerular	KLF2: Krüppel like factor 2
FMN: flavín mononucleótido	LDH: lactato deshidrogenasa
	ME: muerte encefálica
	mg: miligramo
	miRNA: micro RNA

NAG: N-acetil-D-glucosaminidasa	pmp: por millón de población
Na: Sodio	pO₂: presión de oxígeno
NADH: nicotin adenin dinucleótido	PP: presión de perfusión
NFP: no función primaria	RLO: radicales libres de oxígeno
NI: necrosis isquémica	SEN: Sociedad Española de Nefrología
NTA: necrosis tubular aguda	SOD1: superóxido dismutasa 1
ONT: Organización Nacional de Trasplantes	SOD2: superóxido dismutasa 2
O₂: oxígeno	T-L: término-lateral
OCR: tasa de consumo de oxígeno	T-T: término-terminal
PCR: reacción en cadena de la polimerasa	TIC: tiempo de isquemia caliente
PHE: preservación hipotérmica estática	TIF: tiempo de isquemia fría
PHM: preservación hipotérmica en máquina	TR: trasplante renal
PHMO: preservación hipotérmica oxigenada	TRS: terapia renal sustitutiva
PNEV: perfusión normotérmica ex vivo	UNOS: <i>United Network for Organ Sharing</i>
	UW: Universidad de Wisconsin
	VP: velocidad de perfusión
	µm: micras
	°C: grados Celsius o centígrados



Glosario de Figuras

Figura 1: tabla de clasificación de la IRC según KDIGO, definida en sus guías clínicas del año 2012 (3).	18
Figura 2: incidencia de la insuficiencia renal terminal en España. Registro Español de Enfermos Renales (REER) 2020 (4).	19
Figura 3: prevalencia de la IRT en los diferentes países europeos. Datos procedentes del ERA-EDTA 2019 Annual Report.	20
Figura 4: gráfico de prevalencia de la IRT en España y su distribución según el tipo de TRS recibida. Registro Español de Enfermos Renales (REER) 2020 (4).	20
Figura 5: datos anuales de trasplantes realizados y pacientes en lista de espera a final de año en España durante el período 1991-2020. Fuente: REER 2020 (4).	21
Figura 6: número de donantes y tasa de donación en España en el período 1993-2020. Fuente: Informe anual de Actividad de Donación y Trasplante 2020 (6).	22
Figura 7: pacientes en lista de espera para un trasplante renal. A: datos procedentes del registro americano más reciente publicado en 2021 (Organ Procurement Transplant Network / Scientific Registry of Transplant Recipients) (8). B: datos de Eurotransplant en su informe anual 2020 (7).	23
Figura 8: porcentaje de donantes en asistolia (DA) sobre el total de donantes cadáver en España durante el periodo 2001-2020. Fuente: Informe anual de Actividad de Donación y Trasplante 2020 (6).	24
Figura 9: donantes en asistolia generados en España por Comunidad Autónoma durante el periodo 2015-2020. Fuente: Informe anual de Actividad de Donación y Trasplante 2020 de la ONT (6).	25
Figura 10: "clasificación de Maastricht modificada" consensuada en Madrid en 2011 (11).	26
Figura 11: evolución de los DA en España, total y según el tipo en la Clasificación de Maastricht modificada de Madrid. España 2010-2020. Fuente: Informe anual de Actividad de Donación y Trasplante 2020 de la ONT (6).	27
Figura 12: Grupos de edad de los donantes en España en el periodo 2010-2020. Fuente: Informe anual de Actividad de Donación y Trasplante 2020 de la ONT (6).	28
Figura 13: Causas de muerte de los donantes en España, periodo 2010-2020. ACVA: accidente cerebrovascular agudo. Fuente: Informe anual de Actividad de Donación y Trasplante 2020 de la ONT (6).	29
Figura 14: bomba de perfusión desarrollada por Lindbergh, capaz de mantener una presión de perfusión (PP) continua. Año 1931. Fuente: Minnesota Historical Society.	34
Figura 15: máquina de perfusión de Belzer transportada en una de las furgonetas que utilizaban para desplazar el órgano. Fuente: Stanford University, Transplant Department (https://web.stanford.edu)	36
Figura 16: dispositivos de perfusión renal en máquina utilizados en España. A: LifePort Kidney Transporter®. B: RM3 Renal Preservation System® (73).	43
Figura 17: metabolismo mitocondrial fisiológico. 1: cadena transportadora de electrones (CTE). 2: cadena transportadora de electrones (CTE) inversa, induciendo a la ATP sintetasa a producir ATP. CI-IV: complejos I-IV bomba de protones. Reproducido de Darius T et al (95).	46
Figura 18: metabolismo mitocondrial en isquemia, modo 1 de funcionamiento mitocondrial de Murphy (92). Interrupción de la CTE, produciendo un aumento del NADH (1) y del succinato (2). Liberación de FMN en el complejo I (3), disminución del ATP y ADP mitocondriales (4) y aumento de los metabolitos de la purina (5). Reproducido de Darius T et al (95).	47
Figura 19: metabolismo mitocondrial durante la PHMO o modo 3 de funcionamiento mitocondrial de Murphy (92). Se mitigan los cambios producidos por la isquemia, ocasionando una disminución del NADH y succinato (2), menor liberación de FMN (3) y aumento del ATP mitocondriales (4). Reproducido de Darius T et al (95).	48
Figura 20: metabolismo mitocondrial durante la reperusión del injerto in vivo. El acúmulo de succinato mitocondrial genera demasiado ubiquinol (QH2) en el Complejo II que perjudica a la	

CTE. Así, se produce una CTE inversa en el Complejo I (2), ocasionando la liberación de radicales libres de oxígeno (RLO) y de FMN (3). Reproducido de Darius T et al (95).....	49
Figura 21: área de estabulación del animal previa y posterior a la cirugía, con un área total de 1,35 m ² y acceso libre a líquidos y alimentos.....	78
Figura 22: cateterización venosa central mediante acceso percutáneo sobre vena yugular externa derecha.....	80
Figura 23: esquema resumen del diseño del estudio experimental.....	81
Figura 24: revisión en banco del riñón izquierdo inmediatamente después de su extracción, tras el tiempo de isquemia caliente (TIC) de 30 minutos.....	82
Figura 25: riñón izquierdo en el momento previo a su perfusión en máquina, una vez extraído y lavado en banco con Celsior, y con la biopsia pre-perfusión tomada en polo superior.....	83
Figura 26: cánula arterial en T de 3 mm (izquierda) y su conexión al injerto para perfusión (derecha).....	83
Figura 27: dispositivo LifePort conectado a oxigenador pediátrico de membrana (izquierda) y oxigenador de superficie mediante burbujeo (derecha).....	84
Figura 28: disección del riñón derecho previa a la nefrectomía. VCI: vena cava inferior.....	85
Figura 29: estado final tras el trasplante y le reperfusión. Anastomosis venosa T-T renal-renal, anastomosis arterial T-T renal-renal y anastomosis T-T uréter-uréter. IVC: vena cava inferior.....	86
Figura 30: postoperatorio del animal en curso, con acceso libre a alimentación (izquierda). Extracción seriada de analíticas a través del catéter venoso central (derecha).....	88
Figura 31: Perfil de la prueba SeaHorse XF Cell Mito Stress, reproducido de la web del fabricante (www.agilent.com).....	91
Figura 32: diagrama de flujo de los animales incluidos en el modelo experimental. TR: trasplante renal.....	97
Figura 33: curvas Kaplan-Meier de supervivencia de los animales de ambos grupos (PHM en azul y PHMO en verde).....	99
Figura 34: evolución de la pO ₂ durante la preservación en máquina. A: descenso lento de la pO ₂ en el grupo PHM. B: oxigenador pediátrico de membrana con niveles inconsistentes en los 5 primeros animales. C: incremento inicial de la pO ₂ durante los 30 min de precarga y paulatino descenso en el grupo PHMO con oxigenador de burbuja.....	101
Figura 35: la figura muestra la variabilidad en la pO ₂ durante la PHMO de los riñones en la primera fase del trabajo experimental (animales 1-12). Se comparan sus resultados individuales con los del animal 17, en el que se llevó a cabo la oxigenación mediante el empleo del oxigenador de burbuja integrado en el circuito de perfusión.....	102
Figura 36: evolución temporal de la pO ₂ de los animales asignados al grupo PHMO, una vez descartados los primeros 5 animales perfundidos con el oxigenador de membrana.....	103
Figura 37: parámetros de perfusión en máquina de sendos grupos PHMO y PHM, flujo (a) y resistencia (b).....	104
Figura 38: arriba, niveles de creatinina sérica al día 3 postrasplante según los grupos, sin diferencias estadísticamente significativas (p=0,4). Abajo, evolución de la creatinina sérica de los animales (PHMO vs PHM) en la primera semana post trasplante.....	106
Figura 39: niveles de LDH sérica (UI/L) post-trasplante en ambos grupos PHM y PHMO.....	107
Figura 40: niveles de LDH (a) y lactato (b) al final de la perfusión en máquina para sendos grupos.....	111
Figura 41: niveles de miRNA en la solución de preservación durante el período de perfusión en máquina (p ≤ 0.05). Barras azul oscuro grupo PHM (nOx-HMP) y barras azul claro grupo PHMO (Ox-HMP).....	112
Figura 42: cantidad de MDA (mmol/mg proteína) en las diferentes biopsias de los injertos tomadas tras la isquemia caliente, tras la perfusión y tras el trasplante.....	114
Figura 43: niveles de producción de ATP (a), fuga de protones (b) y capacidad respiratoria de reserva (c) medidos con la plataforma SeaHorse en las biopsias de los injertos.....	115
Figura 44: imágenes de microscopía de contraste de fase de los cultivos primarios de células tubulares proximales de la corteza renal. Se muestran las biopsias de los animales (A) 13 al 24 y señalados aquellos sometidos a oxigenación activa en máquina del grupo PHMO. El porcentaje de fibroblastos (morfología alargada) y células epiteliales del túbulo (células cúbicas y planas) varía según los animales.....	116
Figura 45: niveles de enzimas antioxidantes en las biopsias de injertos renales: SOD1 (a), SOD2 (b) y catalasa (c).....	117

<i>Figura 46: niveles de cadherina E (a), fibronectina (b), vimentina (c) y colágeno (d) tras los 30 min de isquemia caliente (barras blancas).</i>	118
<i>Figura 47: correlaciones de peroxidación lipídica y función renal post-TR. Se determinó una correlación significativa entre los niveles de peroxidación lipídica post-perfusión y la situación funcional post-TR representada por los niveles de creatinina en el día 1 (a) y la LDH al final del seguimiento (b).</i>	119
<i>Figura 48: estudios de correlación entre variables: A) peroxidación lipídica y supervivencia del animal. B) creatinina el día +1 y la supervivencia del animal. C) LDH el día +1 y supervivencia del animal. D) LDH al final del seguimiento y supervivencia del animal.</i>	120
<i>Figura 49: las biopsias parafinadas pre (A) y post (B) perfusión de los diferentes injertos fueron normales en su evaluación mediante microscopía óptica (H-E x 40).</i>	121
<i>Figura 50: resultados histológicos de las piezas de nefrectomía en sendos grupos PHM y PHMO representados en diagrama de sectores. IIA: infiltrado inflamatorio agudo. NTA: necrosis tubular aguda. NI: necrosis isquémica.</i>	121
<i>Figura 51: esquema metabolismo mitocondrial y las mediciones de éste realizadas en los distintos trabajos existentes en la literatura</i>	129
<i>Figura 52: distintas pO₂ alcanzadas en los estudios preclínicos de PHMO existentes en la literatura. Se observa una baja pO₂ de nuestro experimento en comparación con los existentes en la literatura (101, 107, 108). Fuente: elaboración propia.</i>	136
<i>Figura 53: (A) Modificación del circuito de perfusión de LifePort® para el empleo de un oxigenador pediátrico de membrana. (B) Oxigenador de membrana integrado en el conjunto de tubos estériles desechables de LifePort®. (C) El líquido de perfusión oxigenado entra en el circuito en su punto de retorno. (D) La línea de lavado entra en el oxigenador de membrana de fibra hueca para oxigenar continuamente el líquido.</i>	137



Glosario de Tablas

<i>Tabla 1: principales dispositivos de perfusión en máquina comercializados. Tabla adaptada de V Gómez (39) en European Textbook on Kidney Transplantation (ISBN 97894926710004).</i>	42
<i>Tabla 2: cebadores específicos para la PCR de los genes de oxidación y transición epitelio-mesenquimal (TEM). SOD: superóxido dismutasa.</i>	92
<i>Tabla 3: mediana de edad de los dos grupos (PHM y PHMO).</i>	98
<i>Tabla 4: mediana de peso de los dos grupos (PHM y PHMO).</i>	98
<i>Tabla 5: mediana de supervivencia de los animales en los dos grupos (PHM y PHMO).</i>	98
<i>Tabla 6: mediana y percentiles de creatinina sérica basal en ambos grupos.</i>	99
<i>Tabla 7: mediana y percentiles de creatinina sérica post nefrectomía izquierda en ambos grupos.</i>	100
<i>Tabla 8: diferencia de medianas de creatinina sérica pre y post nefrectomía izquierda en ambos grupos.</i>	100
<i>Tabla 9: parámetros de flujo (FP) en la máquina de perfusión en ambos grupos PHM y PHMO.</i>	104
<i>Tabla 10: parámetros de resistencia (IR) en la máquina en ambos grupos PHM y PHMO.</i>	105
<i>Tabla 11: composición de las soluciones de preservación KPS-1 y SPS-1 o solución de la Universidad de Wisconsin (UW). HES: hidroxietil almidón.</i>	108
<i>Tabla 12: evolución temporal de las concentraciones de sodio (Na) y potasio (K) en el líquido de perfusión durante la preservación en máquina.</i>	110
<i>Tabla 13: tabla resumen con los resultados histológicos de las piezas de nefrectomía en el momento del sacrificio del animal. Las columnas sombreadas corresponden a los animales aleatorizados al grupo PHMO.</i>	123
<i>Tabla 14: resumen de los estudios preclínicos en cerdos que investigan las diferentes concentraciones de oxígeno durante la PHM empleando modelos de PNEV o auto-TR. NA: no aplicable. Cr: creatinina. TIC: tiempo de isquemia caliente.</i>	132



Índice

Dedicatoria	7
Agradecimientos	9
Códigos UNESCO	11
Abreviaturas y acrónimos	1
Glosario de Figuras	3
Glosario de Tablas	7
Índice	9
1. INTRODUCCIÓN	17
1.1. Insuficiencia Renal Terminal	17
1.1.1. Definición	17
1.1.2. Epidemiología	18
1.2. Escenario actual de los órganos a preservar	21
1.2.1. Limitación de acceso al TR: magnitud del problema	21
1.2.2. Donantes en asistolia (DA)	24
1.2.3. Donantes de criterio expandido (DCE).	27
1.2.4. Limitaciones de los DCE y DA.....	29
1.3. Objetivo de la preservación renal	31
1.4. Historia de la preservación renal	33
1.5. Desarrollo actual de la preservación renal	38
1.6. Papel de la preservación hipotérmica en máquina	38
1.7. Tipos de preservación hipotérmica en máquina	41
1.8. Oxigenación en la preservación de órganos	44
1.8.1. Metabolismo mitocondrial.	45
1.8.2. Potencial del oxígeno.	49
1.8.3. Controversias.....	51
1.9. Evaluación de resultados de la preservación	52
1.9.1. Parámetros hemodinámicos y bioquímicos en máquina	53
1.9.2. Los miRNA como marcadores de función renal	53
1.10. Valoración del modelo porcino de autotrasplante	54
1.10.1. Edad y sexo del animal	56
1.10.2. Condiciones de estabulación. Respuesta al estrés.	56
1.10.3. Alimentación y ayuno	57
1.10.4. Anestesia	57
1.10.5. Consideraciones quirúrgicas.....	59
1.10.6. Limitaciones del modelo animal.....	62
2. HIPÓTESIS	67
3. OBJETIVOS	71
4. MATERIAL Y MÉTODOS	75
4.1. Diseño de Investigación	75
4.2. Ámbito del estudio	75

4.3. Metodología	75
4.3.1. Muestra de estudio. Cálculo del tamaño muestral	76
4.3.2. Muestreo y distribución de recogida	76
4.3.3. Fuentes y recogida de datos	77
4.3.4. Análisis estadístico	77
4.4. Protocolo de actuación	78
4.4.1. Selección del animal	78
4.4.2. Diseño experimental	79
4.4.3. Anestesia	79
4.4.4. Procedimiento quirúrgico: nefrectomía izquierda	80
4.4.5. Perfusión en máquina y autotrasplante	83
4.4.6. Cuantificación de miRNA	87
4.4.7. Evaluación bioquímica	87
4.4.8. Marcadores de estrés oxidativo. Peroxidación lipídica	88
4.4.9. Respiración mitocondrial	90
4.4.10. Expresión de genes de oxidación y transición epitelio-mesenquimal (TEM)	91
4.4.11. Análisis histológico. Microscopía de luz	92
5. RESULTADOS	97
5.1. Características basales	97
5.1.1. Edad	98
5.1.2. Peso de los animales	98
5.1.3. Supervivencia de los animales	98
5.1.4. Determinaciones analíticas basales	99
5.1.5. Determinaciones analíticas post nefrectomía izquierda	100
5.2. Los niveles de oxígeno	101
5.3. Parámetros de perfusión en máquina	103
5.4. Parámetros bioquímicos séricos	105
5.4.1. Función renal: creatinina	105
5.4.2. LDH sérica	107
5.5. Parámetros bioquímicos en solución de preservación	108
5.5.1. Composición iónica	108
5.5.2. Lesión celular. LDH y lactato	110
5.6. miRNA en la solución de perfusión	111
5.7. Peroxidación lipídica: marcador de estrés oxidativo	112
5.8. Respiración mitocondrial	114
5.9. Sistemas antioxidantes. Expresión génica de la TEM.	117
5.10. Correlación funcional y de peroxidación lipídica	118
5.12. Análisis histológico: microscopía de luz	120
6. DISCUSIÓN	126
7. CONCLUSIONES	160
7.1. Respecto a los objetivos primarios	160
7.2. Respecto a los objetivos secundarios	160
8. BIBLIOGRAFÍA	164
9. ANEXOS	186
9.1. Anexo 1: aprobación del CEEA (2011 y 2015)	186
9.3. Anexo 2: acreditación para experimentación animal	190
9.3. Anexo 3: concesión beca Mutua Madrileña	191

Introducción

Hasta la fecha, la eficacia y la seguridad del empleo de altas concentraciones de oxígeno (O₂) durante la perfusión hipotérmica en máquina (PHM) no han sido establecidos. En este estudio se investiga el impacto de la administración de altas concentraciones de O₂ durante la PHM en un modelo porcino de donación en asistolia (DA), tanto en términos de función renal como sus efectos metabólicos y bioquímicos.

Material y Métodos

Estudio de cohorte prospectivo aleatorizado y no ciego en un modelo porcino de autotrasplante que imita las condiciones de la DA de tipo III de Maastricht, en condiciones de PHM con suplemento de oxígeno (PHMO) comparadas con la PHM sin oxígeno (PHM) en el dispositivo *LifePort*®. El objetivo primario fue la función renal post-trasplante, mientras que los objetivos secundarios fueron los cambios en la dinámica de la perfusión, la lesión celular medida por los niveles de lactato deshidrogenasa (LDH) y lactato en el líquido de preservación, la peroxidación lipídica en las biopsias renales, la transición epitelio-mesenquimal (TEM) y la expresión de genes oxidativos en los cultivos celulares, la generación de ATP medida por el test *SeaHorse* en los cultivos celulares, la expresión de miRNA en la solución de preservación y por último el examen histológico.

Resultados

La generación de ATP y el estrés oxidativo, medidos por la peroxidación lipídica, aumentaron simultáneamente tras la isquemia caliente en el grupo

PHMO. La PHMO no mostró un efecto beneficioso significativo sobre la función renal o la supervivencia de los animales. Se observó un claro aumento de la peroxidación lipídica en el grupo PHMO, que también dio lugar a una mayor expresión de los genes responsables de las enzimas antioxidantes superóxido-dismutasa-1 (SOD-1) y catalasa. La disfunción de la cadena respiratoria se mantuvo en el grupo PHMO con una disminución de la producción de ATP, un aumento de la fuga de protones y una disminución de la reserva respiratoria. En cuanto a la TEM, también se observó un aumento de la expresión de los genes de vimentina, fibronectina y colágeno en el grupo PHMO. Por último, se modificaron significativamente los niveles de expresión de miR-101 y miR-126, relacionados con las funciones características del epitelio tubular.

Conclusiones

Aunque se observó una tendencia hacia una mejor función renal y supervivencia en el grupo PHMO, su estudio metabólico reveló una menor eficiencia de la cadena respiratoria y un incremento del estrés oxidativo que se tradujeron en un aumento de la expresión de genes de TEM, lo que podría conducir a un aumento de la fibrosis renal. El diferente perfil de miRNA asociado a la PHMO podría ser expresión de un diferente metabolismo celular subyacente. Todo ello hace que, en la actualidad, la PHMO no pueda ser considerada una práctica estándar y su papel en la preservación renal deba ser aclarado.

Introduction

The efficacy and safety of employing high concentrations of oxygen during hypothermic machine perfusion (HMP) has not been fully elucidated to date. This study investigates the impact on renal function of administering high concentrations of oxygen during HMP in a porcine model of donation after circulatory death, as well as its metabolic and biochemical effects.

Methods

A randomized non-blinded prospective cohort study was established in a porcine transplant model mimicking Maastricht type III DCD under oxygen-supplemented HMP (Ox-HMP) compared with non-supplemented (nOx-HMP) (*LifePort® kidney transporter*) conditions. Primary endpoint was post-KT renal function, meanwhile secondary endpoints included changes in perfusion dynamics, cellular lesion measured by LDH and lactate levels in perfusate, lipid peroxidation in kidney biopsies, epithelial mesenchymal transition (EMT) and oxidative gene expression in cell cultures, ATP generation measured by *SeaHorse* assays in cell cultures, miRNA expression in preservation solution and finally histology assessment.

Results

ATP generation and oxidative stress, as measured by lipid peroxidation, both increased simultaneously after warm ischemia in the Ox-HMP group. Ox-HMP did not exhibit a significant effect on kidney function or animal survival. It was observed a clear increase of lipid peroxidation in the Ox-HMP group which also resulted in a greater expression of the genes responsible for superoxide

dismutase 1 (SOD-1) and catalase antioxidant enzymes. Respiratory chain dysfunction was maintained in the Ox-HMP group with a decrease in ATP production, increased proton leakage and a decrease in respiratory reserve. Regarding EMT, an increase in the expression of vimentin, fibronectin and collagen genes was also observed in the Ox-HMP group. Finally, the expression levels of miR-101 and miR-126, related to characteristic functions of the tubular epithelium, were significantly modified.

Conclusions

Although a trend towards better renal function and survival was observed in the Ox-HMP group, its metabolic assessment revealed lower respiratory chain efficiency and increased oxidative stress that resulted into increased expression of EMT genes, which could lead to renal fibrosis. The different miRNA profile associated with Ox-HMP could be an expression of a different underlying cellular metabolism. Therefore, Ox-HMP cannot be considered a standard practice at present and its role in renal preservation needs to be clarified.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Insuficiencia Renal Terminal

1.1.1. Definición

La insuficiencia renal crónica (IRC) se define como la pérdida progresiva, permanente e irreversible del filtrado glomerular (FG). Esta IRC se presenta asociada a cuatro patologías de alta prevalencia, como son la diabetes mellitus (DM), la hipertensión arterial (HTA), la insuficiencia cardiaca y la cardiopatía isquémica. Además, se ha convertido en un problema médico y de salud pública que ha adquirido proporciones epidémicas, además de ocasionar elevados costes sanitarios, los cuales llegan a alcanzar los 87.600 € anuales para cada paciente en hemodiálisis (1).

Según el *Documento de Consenso de la Sociedad Española de Nefrología* para la definición y clasificación de la IRC, cuando los pacientes llegan a la fase terminal de la enfermedad, denominada Insuficiencia Renal Terminal (IRT) y definida como la existencia de una tasa de filtrado glomerular (TFG) < 15 ml/min, se hace necesario iniciar un tratamiento renal sustitutivo (TRS) (2). La asociación *Kidney Diseases Improving for Global Outcomes (KDIGO)* establece una clasificación pronóstica de la ERC (3) basada en 5 estadios de TFG y en 3 de albuminuria, y que se representa en la Figura 1.

INTRODUCCIÓN

Prognosis of CKD by GFR and Albuminuria Categories: KDIGO 2012				Persistent albuminuria categories Description and range		
				A1	A2	A3
				Normal to mildly increased	Moderately increased	Severely increased
				<30 mg/g <3 mg/mmol	30-300 mg/g 3-30 mg/mmol	>300 mg/g >30 mg/mmol
GFR categories (ml/min/ 1.73 m²) Description and range	G1	Normal or high	≥90			
	G2	Mildly decreased	60-89			
	G3a	Mildly to moderately decreased	45-59			
	G3b	Moderately to severely decreased	30-44			
	G4	Severely decreased	15-29			
	G5	Kidney failure	<15			

Figura 1: tabla de clasificación de la IRC según KDIGO, definida en sus guías clínicas del año 2012 (3).

En la actualidad, más de 6.000 personas al año entran en situación de IRT en España y acceden a una de las 3 formas principales de TRS (4): la hemodiálisis (HD), la diálisis peritoneal (DP) y el trasplante renal (TR).

1.1.2. Epidemiología

El informe anual de la *Organización Nacional de Trasplantes (ONT)* y la *Sociedad Española de Nefrología (SEN)*, denominado *Registro Español de Enfermos Renales 2020* (4), arroja una incidencia de 141,5 casos nuevos por

INTRODUCCIÓN

millón de población (pmp) en situación de IRT, lo que supone un total de 6.708 nuevos casos, con un claro predominio de las edades avanzadas: así, del total de casos incidentes, el 60% son mayores de 65 años (Figura 2).

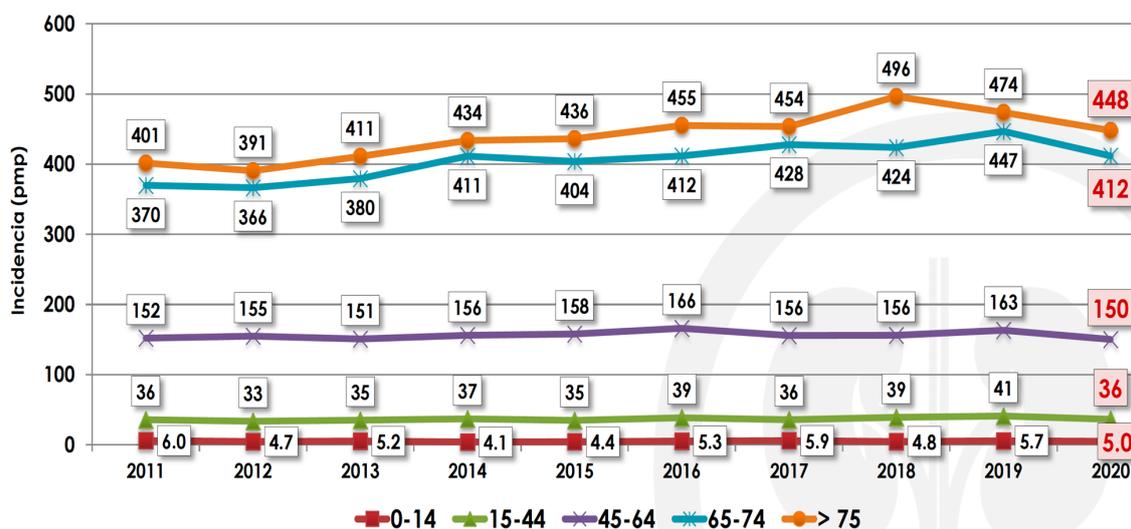


Figura 2: incidencia de la insuficiencia renal terminal en España. Registro Español de Enfermos Renales (REER) 2020 (4).

La prevalencia global de la IRT en España se sitúa en 1.362,8 casos pmp, lo que supone un total de 64.666 casos. Esta situación de alta y creciente prevalencia sitúa a España, si se compara con otros países europeos, como uno de los países como mayor prevalencia de IRT (4) (Figura 3). Tal y como ocurre con la incidencia, existe un claro predominio de las edades avanzadas, siendo un 43% de los casos mayores de 65 años y hasta un 82% mayores de 45 años.

INTRODUCCIÓN

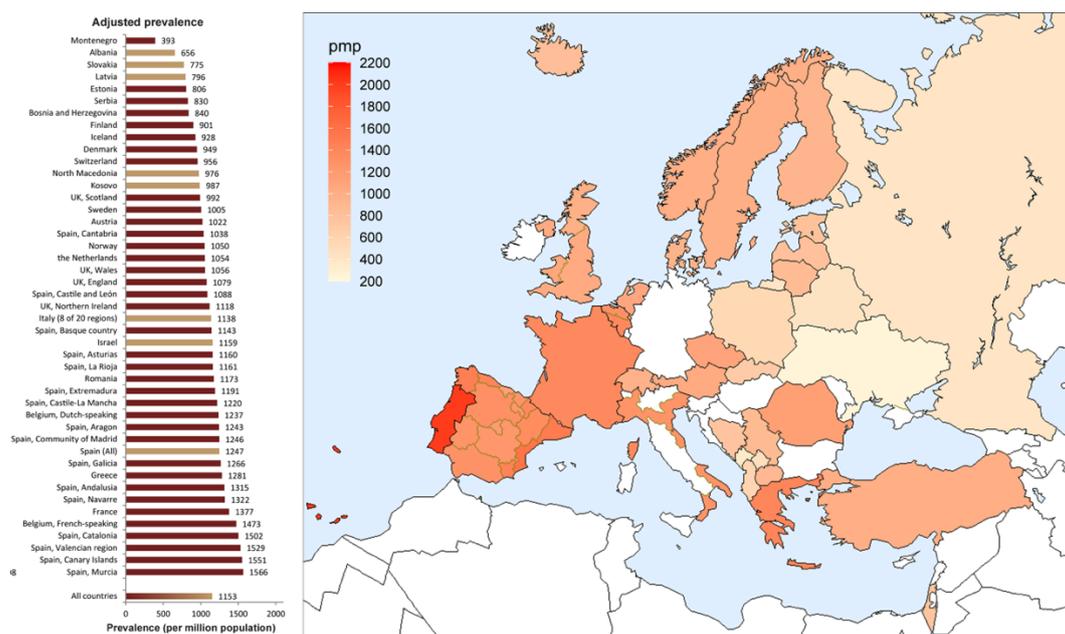


Figura 3: prevalencia de la IRT en los diferentes países europeos. Datos procedentes del ERA-EDTA 2019 Annual Report.

Clasificados en función del tipo de TRS recibida, tal y como se representa en la Figura 4, un 54,6% del total tienen un trasplante funcionante, el 40,4% reciben tratamiento con HD y el 5% con DP.

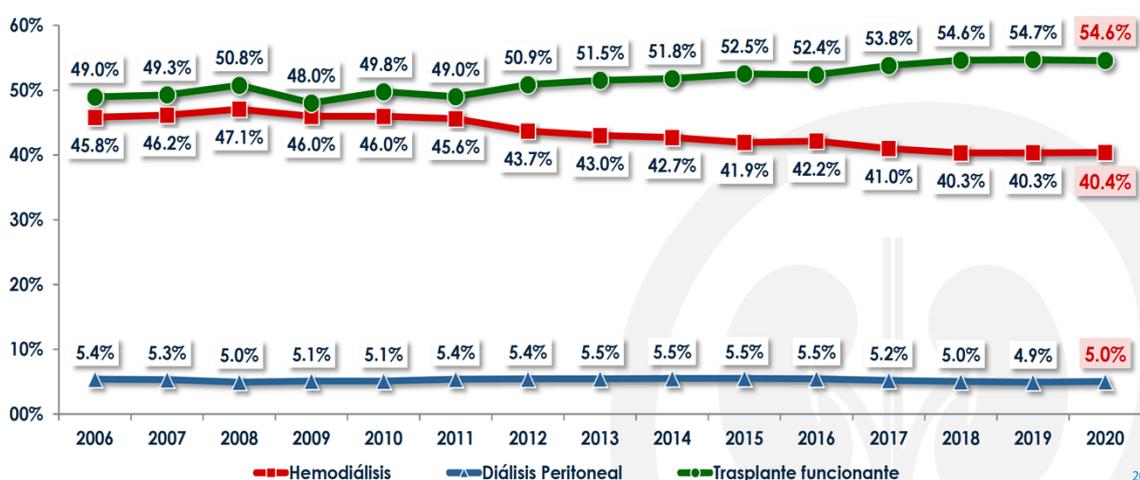


Figura 4: gráfico de prevalencia de la IRT en España y su distribución según el tipo de TRS recibida. Registro Español de Enfermos Renales (REER) 2020 (4).

1.2. Escenario actual de los órganos a preservar

1.2.1. Limitación de acceso al TR: magnitud del problema

El papel del TR dentro de las distintas formas de TRS se encuentra sobradamente demostrado desde hace años, posicionándose claramente como el tratamiento que mejor supervivencia y calidad de vida ofrece a los pacientes con IRT (5). Sin embargo, a pesar del continuo incremento en la incidencia y prevalencia de la IRT, y debido en gran medida a la expansión de las indicaciones del TR, existe un importante desequilibrio entre el número de personas que necesitan un riñón y la disponibilidad de éstos, generando por tanto un acceso limitado de los pacientes al trasplante. Según cifras oficiales de la ONT en el *Registro Español de Enfermos Renales (REER) 2020*, la desproporción fue de 3.864 pacientes en lista de espera frente a un total de 2.702 trasplantes realizados (4), la cual ha visto incrementada sustancialmente su magnitud por los efectos de la pandemia COVID-19 en la actividad de trasplante en España (Figura 5).

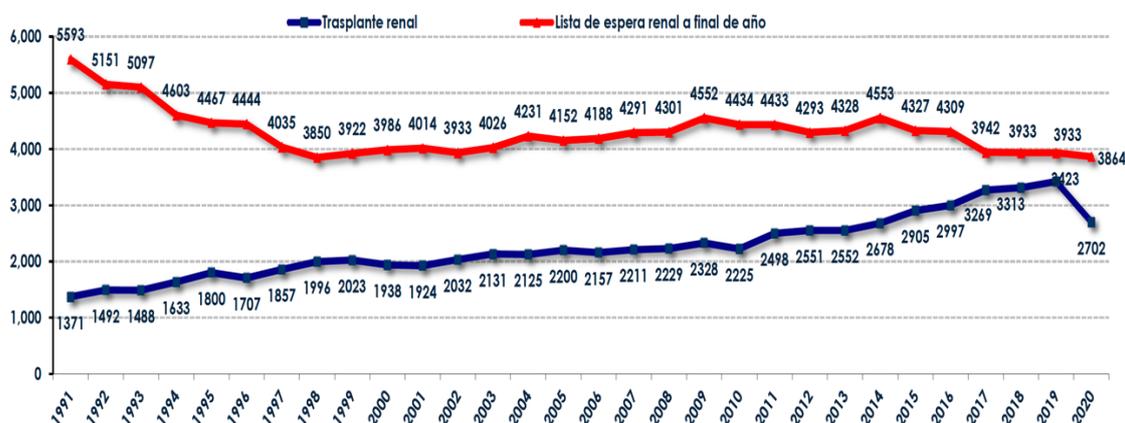


Figura 5: datos anuales de trasplantes realizados y pacientes en lista de espera a final de año en España durante el período 1991-2020. Fuente: REER 2020 (4).

INTRODUCCIÓN

Y esto es así a pesar del constante esfuerzo e incremento del número de donantes en nuestro país, acentuado en la última década tal y como refleja la Figura 6. España, situado hace años como líder mundial en donación, superó nuevamente su propio récord en 2019, alcanzando un total de 2.302 donantes y una tasa de 49 donantes pmp, sufriendo al año siguiente una drástica reducción de esta actividad como consecuencia de la pandemia COVID-19 (6).

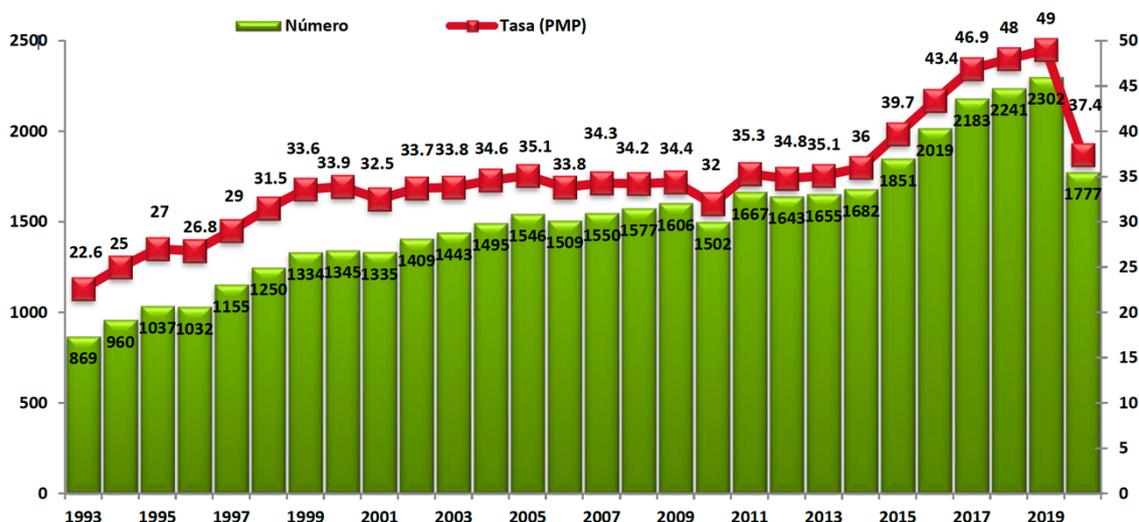
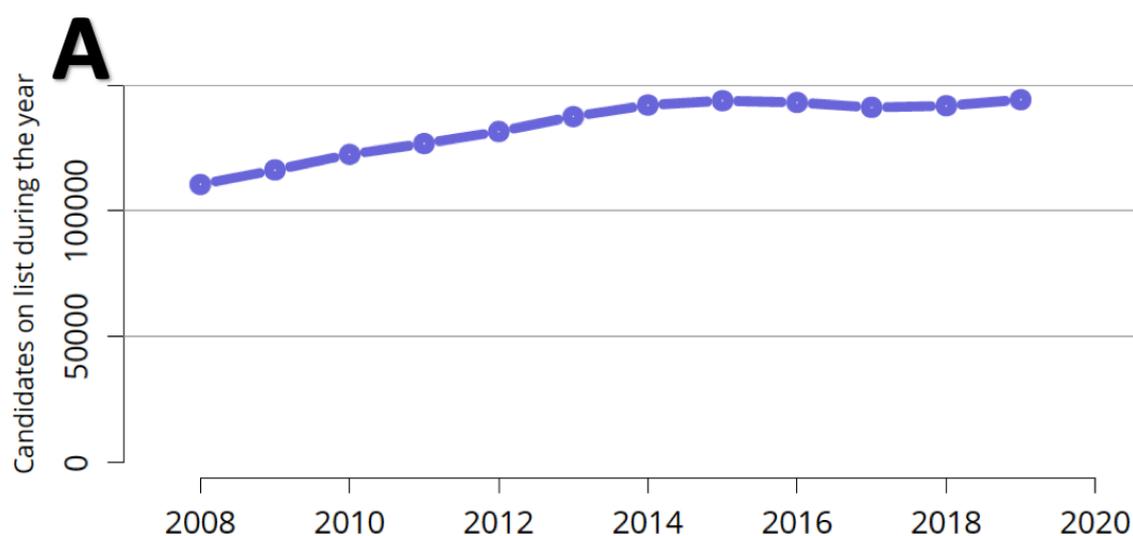


Figura 6: número de donantes y tasa de donación en España en el período 1993-2020. Fuente: Informe anual de Actividad de Donación y Trasplante 2020 (6).

Esta escasez y desproporción no son exclusivas de España y también ocurren fuera de nuestras fronteras. Así, tal y como se refleja en la Figura 7, la lista de espera para un TR alcanzó los 10.827 registros en el ámbito centroeuropeo (*Eurotransplant*) en 2020 (7) y los 101.353 en el norteamericano *OPTN / SRTR* (*Organ Procurement Transplant Network / Scientific Registry of Transplant Recipients*) en su informe más reciente (8), remarcando así la alta demanda de injertos renales para trasplante (9).

INTRODUCCIÓN



Waiting list state	2017	2018	2019
Patients at start of year	104,145	101,348	100,998
Patients added during year	36,725	40,157	42,934
Patients removed during year	39,451	40,439	42,579
Patients at end of year	101,419	101,066	101,353

B

2.9.2 Active waiting lists in Eurotransplant at year-end 2020, by country

Waiting list type	A	B	D	H	HR	NL	SLO	Total
Kidney	588	952	7338	842	225	828	54	10827
Heart	42	110	700	69	27	133	34	1115
Lung	41	106	279	8		161	4	599
Liver	81	181	891	87	115	111	15	1481
Pancreas	5	48	265	29	7	47		401
Intestine	1	4	4					9
Total	758	1401	9477	1035	374	1280	107	14432
Patients	753	1350	9193	998	364	1257	107	14022

Figura 7: pacientes en lista de espera para un trasplante renal. A: datos procedentes del registro americano más reciente publicado en 2021 (Organ Procurement Transplant Network / Scientific Registry of Transplant Recipients) (8). B: datos de Eurotransplant en su informe anual 2020 (7).

Esta limitada disponibilidad de órganos ha conducido a la expansión de los criterios de selección de aquellos donantes considerados subóptimos, y que incluyen a los donantes en asistolia (DA) y a los donantes de muerte encefálica con criterio expandido (DCE). Estos injertos constituyen una fuente potencial

INTRODUCCIÓN

de órganos válidos para trasplante que incrementarían el número disponible, pero presentan evidentes desventajas funcionales que limitan su uso.

1.2.2. Donantes en asistolia (DA)

En un intento de incrementar el número de órganos disponibles para trasplante, la donación en asistolia (DA) ha sufrido un importante impulso en el país en los últimos años. Así, tras alcanzar en 2019 un máximo histórico neto de 745 DA, en 2020 en España el 34,9% del total de donantes cadáver fueron DA, en parte por la caída del número total de donantes en muerte encefálica (6) (Figura 8).

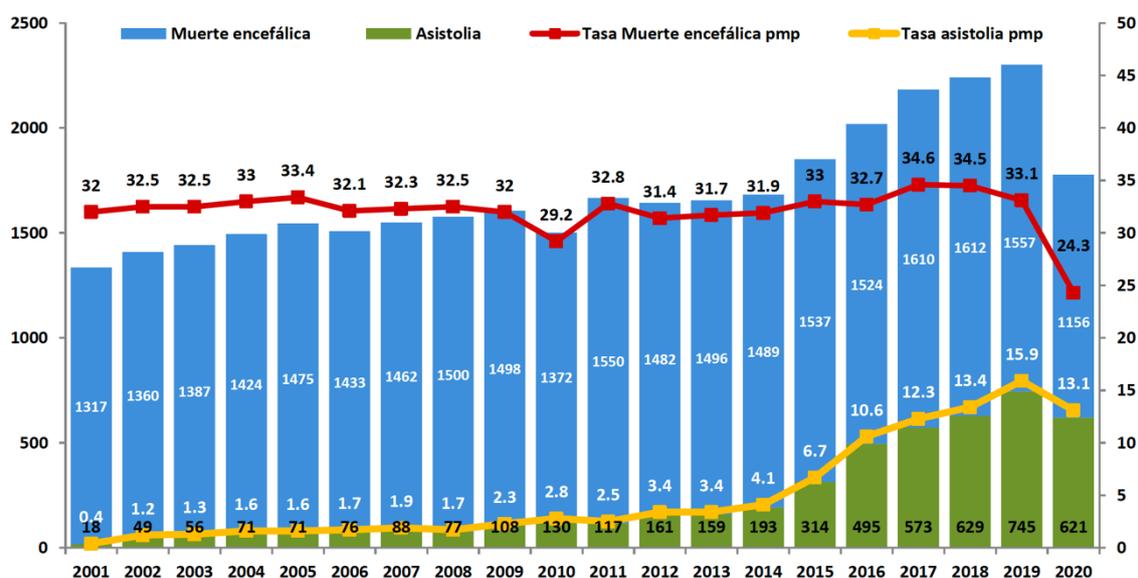


Figura 8: porcentaje de donantes en asistolia (DA) sobre el total de donantes cadáver en España durante el periodo 2001-2020. Fuente: Informe anual de Actividad de Donación y Trasplante 2020 (6).

No en vano, España ocupa también el primer lugar en el mundo en asistolia, con una tasa de 13,3 DA pmp según los datos recientes del *Global*

INTRODUCCIÓN

Observatory on Donation and Transplantation (10). A nivel nacional, la Comunidad de Madrid ocupa el cuarto lugar en número absoluto de DA en España (Figura 9), por detrás de Cataluña, Andalucía y Comunidad Valenciana (6).

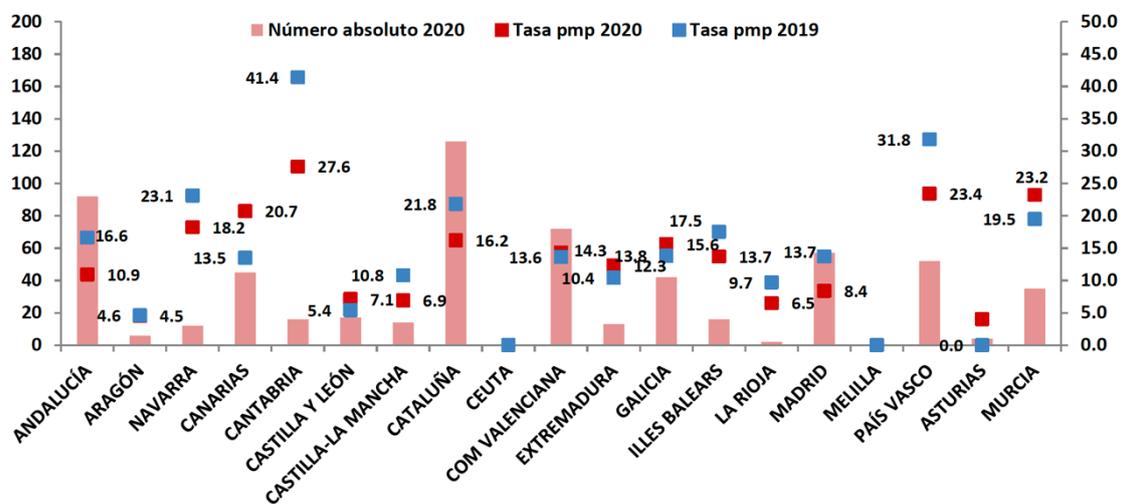


Figura 9: donantes en asistolia generados en España por Comunidad Autónoma durante el período 2015-2020. Fuente: Informe anual de Actividad de Donación y Trasplante 2020 de la ONT (6).

Este incremento progresivo de la asistolia en los últimos años ha venido determinado por el crecimiento de la donación en asistolia controlada (DAC), que engloba los tipos III y IV de la Clasificación de Maastricht modificada en Madrid en 2011 (11) (Figura 10). La última versión de esta clasificación, consensuada en París en 2013, incluye el tipo V que hace referencia a la eutanasia (12).

INTRODUCCIÓN

DA	Categorías	Descripción
(Clasificación de Maastricht modificada, 2011)	I	Paciente fallecido fuera del hospital
	II	Parada cardíaca con resucitación infructuosa extrahospitalaria (tipo IIa) o intrahospitalaria (tipo IIb)
	III	A la espera de la asistolia irreversible. Incluye pacientes a los que se aplica limitación del tratamiento de soporte vital tras el acuerdo entre el equipo sanitario y éste con los familiares o representantes del paciente
	IV	Asistolia irreversible en donantes de órganos en muerte encefálica

Figura 10: "clasificación de Maastricht modificada" consensuada en Madrid en 2011 (11).

La DA no controlada (DANC), característica de España y tan sólo compartida con Francia, fue predominante en nuestro país hasta el año 2014 (13). Desde entonces, el despegue de la DAC y en especial del tipo III ha sido imparable hasta alcanzar un total de 664 donantes en 2019, que representaron el 89% del total de la asistolia (6) (Figura 11). Este incremento exponencial de la DAC ha sido posible gracias a la apertura progresiva de nuevos programas en el país, entre los cuales se encuentra nuestro centro, el *Hospital Universitario Ramón y Cajal*, que se incorporó al grupo de centros con actividad de DAC en agosto del año 2016 (13).

INTRODUCCIÓN

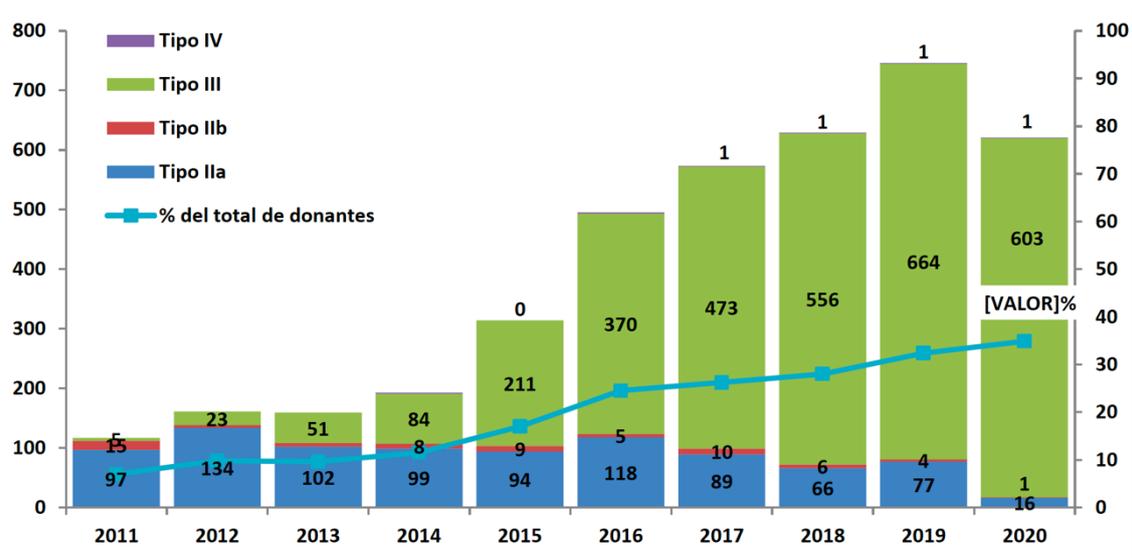


Figura 11: evolución de los DA en España, total y según el tipo en la Clasificación de Maastricht modificada de Madrid. España 2010-2020. Fuente: Informe anual de Actividad de Donación y Trasplante 2020 de la ONT (6).

1.2.3. Donantes de criterio expandido (DCE).

Los DCE son aquellos que presentan factores de riesgo para la pérdida del injerto, y se definen como todos aquellos donantes en muerte encefálica que cumplan los siguientes criterios definidos por la UNOS (*United Network for Organ Sharing*) en el año 2001:

1. Donante > 60 años
2. Donante > 50 años con al menos 2 de los siguientes criterios:
 - a) hipertensión arterial (HTA)
 - b) muerte por accidente cerebrovascular (ACV)
 - c) Creatinina terminal > 1,5 mg/dl

INTRODUCCIÓN

Durante el año 2020 la edad media del donante fue de 60,1 años, siendo en la actualidad el 53,9% de los donantes mayores de 60 (6) (Figura 12).

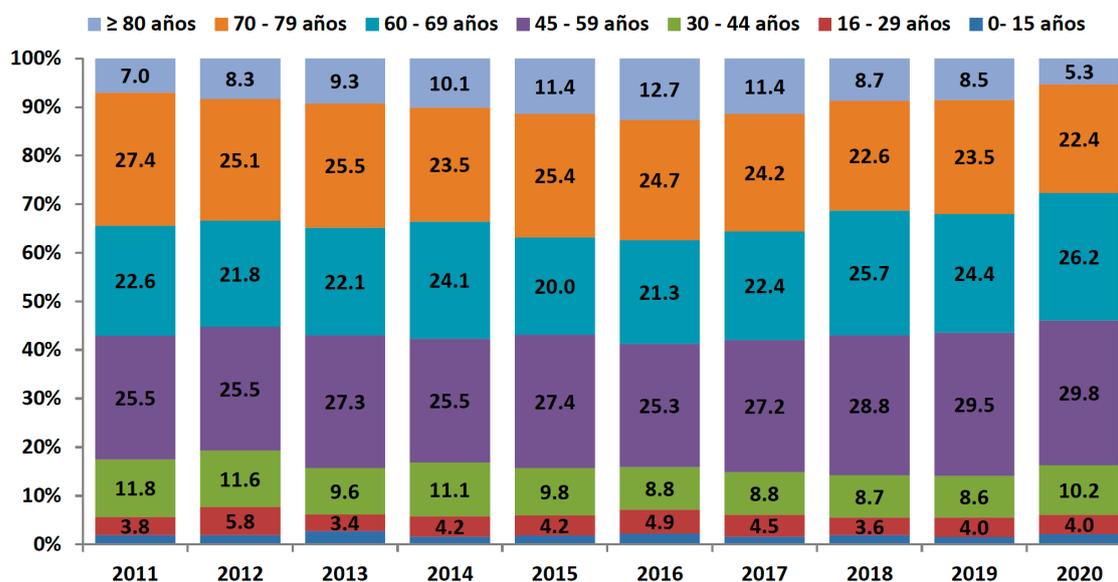


Figura 12: Grupos de edad de los donantes en España en el periodo 2010-2020. Fuente: Informe anual de Actividad de Donación y Trasplante 2020 de la ONT (6).

Además, desde hace décadas, la causa más frecuente de muerte entre los donantes es el accidente cerebrovascular (ACV), que constituye en la actualidad el 59,8% del total (Figura 13). Estos dos factores, edad > 60 años y ACV como causa de donación constituyen en sí mismos criterios de pertenencia al grupo de DCE.

INTRODUCCIÓN

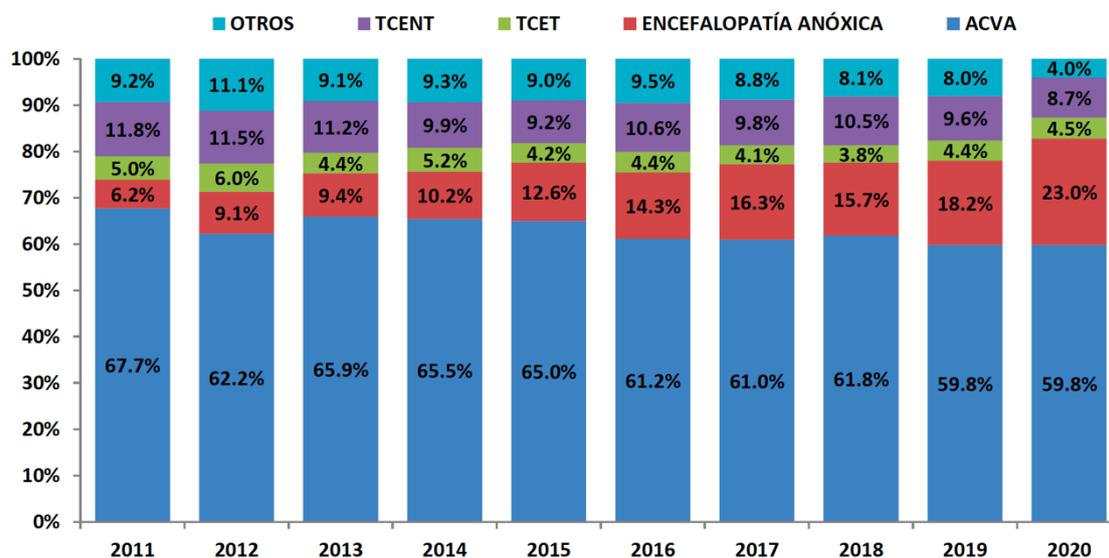


Figura 13: Causas de muerte de los donantes en España, periodo 2010-2020. ACVA: accidente cerebrovascular agudo. Fuente: Informe anual de Actividad de Donación y Trasplante 2020 de la ONT (6).

1.2.4. Limitaciones de los DCE y DA.

La diferencia esencial entre los DCE y los DA es la duración del tiempo de isquemia caliente (TIC). Este periodo, comprendido entre el clampaje y el inicio de la perfusión fría del órgano, tiene indudables efectos deletéreos sobre los órganos destinados a trasplante. En los DCE este tiempo es mínimo, mientras que se incrementa sustancialmente y tiene gran trascendencia en los DA. Se define el tiempo de isquemia fría (TIF) como el periodo desde el inicio de la perfusión fría durante la extracción del órgano hasta que éste es implantado en el receptor, e incluye por tanto todo el periodo de preservación. Ambos periodos de isquemia, caliente y fría, generan un daño sobre el órgano, aunque la hipotermia reduce el metabolismo y por tanto mitiga la velocidad de daño celular. Estos hechos tienen su traducción histológica en la necrosis tubular aguda (NTA) producida principalmente por la isquemia, así como daño endotelial, inflamación

INTRODUCCIÓN

y trombosis producidos por la reperfusión y liberación de radicales libres de oxígeno (RLO) (14). Ambos tipos de injertos, procedentes tanto de DA como de DCE, presentan una peor tolerancia y menor capacidad de recuperación del daño por isquemia-reperfusión, lo que se traduce en peores resultados funcionales que limitan su uso para el trasplante.

Centrándonos en los injertos procedentes de DA, y específicamente en la DAC (tipo III) que es la predominante en nuestro país y la responsable de la expansión de la asistolia, sus resultados desgranados revelan:

- a) Función renal retrasada (FRR): según datos del último informe de la ONT sobre la DAC, la incidencia global de FRR fue del 42% (13).
- b) No función primaria (NFP): la incidencia global de NFP en España en 2019 fue del 4,8 % según el informe de la ONT (13). Registros similares como el británico (15) o el europeo (16) arrojan cifras similares.
- c) Función renal: si bien se observa una TFG a 1 año discretamente inferior en los injertos de DAC, estas diferencias no mantienen a 5 años (15).
- d) Supervivencia del injerto: según los datos del informe de la ONT (13), se han encontrado diferencias en la supervivencia del injerto a 1 año entre DANC y DAC (86 vs 92%, $p < 0,001$). Sin embargo, estas diferencias no han sido observadas en otros estudios en el corto y medio plazo (15, 17). No obstante, sí se ha observado una relación entre el TIF y la supervivencia del injerto, con una proporción de riesgo (*hazard ratio*) de 2,36 (IC 95%: 1,39- 4,02,

$p=0,04$) para la pérdida del injerto cuando el TIF es mayor de 24 horas, evidenciando su sensibilidad a la isquemia fría (18). Por eso se intenta que los injertos procedentes de DA se trasplanten localmente, lo que ocasiona un TIF menor al habitual de los DCE y que podría explicar en parte la similitud de resultados entre ambos grupos (15, 18).

- e) Supervivencia del receptor: no se han encontrado diferencias en la supervivencia del receptor a 1 y 3 años, tanto en los datos nacionales de la ONT como en otros países (13, 18).

En lo que respecta a nuestro centro, y comparados con los procedentes de DCE, los injertos trasplantados procedentes de DA presentaron tanto mayores tasas de FRR (47,8% vs 18,0%) como una menor supervivencia a 1 año (65,0% vs 83,3%), alcanzando estas diferencias la significación estadística (19). Por tanto, la adecuada optimización y preservación de estos órganos se hacen hoy en día muy relevantes.

1.3. Objetivo de la preservación renal

El objetivo principal de la preservación de los órganos destinados al trasplante es el mantenimiento de la integridad de los sistemas celulares durante el inevitable período de isquemia previo al implante. Por tanto, su interés radica tanto en minimizar la posibilidad de lesión que conduce a la disfunción del injerto como en optimizar la función del órgano una vez se restablezca la perfusión (20, 21). La preservación se ha basado en el mantenimiento de la energía celular

INTRODUCCIÓN

reduciendo la demanda metabólica gracias a la hipotermia (22). A medida que la temperatura disminuye, se reduce la utilización de ATP y el funcionamiento de la bomba de sodio (Na^+) – potasio (K^+), la cual mantiene bajos en condiciones normales los niveles de Na^+ intracelular. Cuando su función disminuye, se producen aumento del Na^+ intracelular y el consecuente flujo de agua (H_2O) al interior de la célula ocasionando edema, el cual se intenta compensar mediante el empleo de soluciones de preservación que constan con impermeabilizantes celulares. Así, aunque la preservación hipotérmica prolonga el tiempo en el que el órgano puede ser privado de oxígeno (isquemia) sin perder su viabilidad, resulta inexorablemente en un acúmulo de productos finales como los RLO que, en el momento de la reperfusión del órgano con sangre oxigenada, iniciarán una compleja cascada de eventos conocidos como isquemia-reperfusión (I/R). Éstos son causa de lesión celular por diferentes mecanismos: peroxidación de lípidos de membrana, alteraciones del citoesqueleto, del microtúbulo y de la membrana mitocondrial (23). Por tanto, la preservación hipotérmica ocasiona la lesión del injerto por 2 mecanismos: uno relacionado directamente con el tiempo de preservación y otro con el enfriamiento.

En los últimos años, y en especial a raíz de la publicación de un ensayo clínico con buenos resultados, la perfusión hipotérmica en máquina (PHM) ha recobrado interés en la preservación de órganos (24). Este método de preservación ofrece algunas ventajas respecto a la clásica preservación estática como: reducción de los procesos de lesión celular que acontecen durante la hipotermia (25), recirculación continua de la solución de perfusión a través del riñón, permite aportar soporte nutricional al órgano, proporciona valores

hemodinámicos durante la perfusión y ofrece la posibilidad de medir parámetros bioquímicos en el líquido de perfusión. Y este interés recuperado por la PHM supone volver a un pasado donde, como veremos a continuación, la investigación en preservación de órganos alcanzó su momento más álgido gracias a los descubrimientos de pioneros como *Belzer* o *Collins* durante la segunda mitad del siglo XX.

1.4. Historia de la preservación renal

El fisiólogo francés *Le Gallois*, en el siglo XIX, llegó a la idea de que “*si se lograra sustituir el corazón por algún sistema de bombeo de sangre arterial, bien natural o bien artificialmente, se podría mantener viva fácilmente cualquier parte del cuerpo*” (26), marcando el inicio del concepto de preservación de órganos ex-vivo. Algunos intentos se llevaron a cabo utilizando sangre desfibrinada en normotermia, pero los dispositivos no alcanzaban una presión de perfusión suficiente y el crecimiento bacteriano suponía un severo problema, habida cuenta de que la penicilina no estuvo disponible hasta 1940 tras una década de ostracismo desde que fuera descubierta en 1928 por *Sir Alexander Fleming* (27). Esta preservación en normotermia todavía experimentaría algunas mejoras tecnológicas por aquel entonces, como el desarrollo por parte de *Lindbergh* de una bomba de perfusión mecánica (28) que era capaz de mantener una presión de perfusión (PP) continua, permitía la adición de oxígeno (O₂) y mantenía la esterilidad (Figura 14), tres elementos clave que siguen vigentes hoy en día.

INTRODUCCIÓN



Figura 14: bomba de perfusión desarrollada por Lindbergh, capaz de mantener una presión de perfusión (PP) continua. Año 1931. Fuente: Minnesota Historical Society.

Sin embargo, las desventajas y la complejidad de la preservación normotérmica eran evidentes, lo cual condujo a la investigación y descubrimiento del efecto beneficioso de la hipotermia (4°C) en la supervivencia de los injertos preservados (29, 30). La investigación en este campo puso de manifiesto la necesidad de emplear soluciones diferentes a la sangre con las que perfundir el riñón y evitar, entre otros fenómenos, la formación de coágulos en el interior del órgano (31-33). En la década de los 60, los avances en la preservación vinieron de la mano del descubrimiento de las soluciones de plasma diluido con adición de coloides, con el fin de contrarrestar el edema celular resultante de la hipoosmolaridad de la solución de preservación (34, 35).

INTRODUCCIÓN

A *Folkert Belzer*, gracias a su experiencia con la preservación de órganos en la *Universidad de California en San Francisco*, le fue encargado el cometido de desarrollar un programa de TR con DA a mediados de la década de los 60. Pronto se dio cuenta de que el programa sólo podría tener éxito si las técnicas de preservación de los riñones pudieran simplificarse. Su fortuito descubrimiento en 1967 del plasma crioprecipitado de los perros como un adecuado líquido de perfusión para su máquina permitió la experimentación animal y la conservación de riñones caninos en condiciones de hipotermia por un plazo de hasta 72 horas (36). Un año más tarde, en 1968, comunica al mundo la realización del primer trasplante renal en humanos tras la preservación hipotérmica del injerto en la “*máquina de Belzer*” durante un total de 17 horas (37). Durante los años posteriores, *Belzer* y su grupo realizaron la primera serie de trasplantes renales en humanos procedentes de DA utilizando su famosa máquina, transportándola en una furgoneta, recorriendo decenas de miles de kilómetros a lo largo de América y poniendo así la primera piedra de la larga historia de la perfusión hipotérmica de riñones humanos (38). Su máquina portátil permitía preservar riñones en hipotermia utilizando plasma crioprecipitado como solución de perfusión y obteniendo buenas tasas de supervivencia de los injertos (Figura 15). Esta es la primera constancia que se tiene en la historia de la preservación renal y el trasplante del uso de una máquina portátil para conservar riñones durante largos periodos de tiempo previos al implante.

INTRODUCCIÓN



Figura 15: máquina de perfusión de Belzer transportada en una de las furgonetas que utilizaban para desplazar el órgano. Fuente: Stanford University, Transplant Department (<https://web.stanford.edu>)

El éxito de este grupo con la máquina de preservación alcanzó uno de sus mayores hitos cuando, en 1971, el propio *Belzer* viajó con la máquina en un vuelo comercial desde San Francisco hasta Ámsterdam, haciendo escala en Nueva York, y transportando un riñón hasta la *Universidad de Leiden*, donde fue implantado en un receptor de 42 años tras 37 horas de preservación hipotérmica en máquina (PHM). El trasplante tuvo éxito y el riñón presentó buena función renal postoperatoria, falleciendo el paciente 17 años después debido a la ruptura de un aneurisma cerebral (39).

De forma paralela, *Geoffrey Collins* desarrolló en su laboratorio de investigación de la *Universidad de California de Los Ángeles* una solución electrolítica que permitía preservar los riñones caninos en hipotermia durante 30

INTRODUCCIÓN

horas, dentro de una bolsa estéril y bañados en el líquido de preservación (solución de Collins o Euro-Collins), siendo su ventaja principal que no necesitaba del uso de una máquina de perfusión (40). Gracias a esta sencillez frente al método y la solución de *Belzer*, que empleaba plasma crioprecipitado, se implementó rápidamente en los centros trasplantadores del mundo. La década que siguió a estos descubrimientos, la de los años 70, fue muy prolífica en investigación de la preservación de órganos. Así, la solución de *Collins* tendría su réplica procedente nuevamente del grupo de *Belzer*, por aquel entonces ya instalado en la *Universidad de Wisconsin (UW)* como Jefe de Departamento. Allí centró sus esfuerzos en crear un líquido de preservación alternativo al plasma crioprecipitado que fuera capaz de sostener el metabolismo celular y minimizar el daño celular. Así, en 1982, presentan a la comunidad científica una solución sencilla, barata y capaz de prevenir el edema celular gracias a la acción del gluconato y del lactobionato, que no penetraban en el interior de la célula y mantenían la solución isoosmolar (41, 42). Nace así la solución de Wisconsin (UW), usada ampliamente y hasta la actualidad en la preservación de órganos. Tras esta sucesión de acontecimientos, culminados con la publicación de un ensayo clínico multicéntrico donde la solución UW se demostró superior a Euro-Collins en términos de función y supervivencia del injerto (43), ésta se convirtió en el nuevo estándar de la preservación estática de órganos, aunque sufriría pequeñas modificaciones posteriores como la adición de adenosina y fosfato como precursores de adenosíntrifosfato (ATP). Sorprendentemente, en los últimos 30 años, no se ha producido avance tan importante en la preservación de órganos, manteniéndose similar hasta nuestros

días, si bien la DA y los DCE como fuente de órganos para el TR ha inspirado un renacimiento de la investigación en el ámbito de la preservación de órganos.

1.5. Desarrollo actual de la preservación renal

La preservación hipotérmica estática (PHE) clásica o hipotérmica de superficie ha servido a las necesidades del trasplante durante muchos años. Sin embargo, en la actualidad, se considera un factor limitante en la futura expansión del trasplante, ya que contribuye al desarrollo de la disfunción crónica del injerto, no permite la evaluación de la viabilidad pre-trasplante del injerto y condiciona un daño mayor a los injertos subóptimos, más susceptibles a la isquemia fría (22, 23, 44).

En este escenario, la PHM ha recuperado el interés clínico que perdió desde los tiempos de *Belzer*, sobre todo a raíz de la publicación de un ensayo clínico que demostró su eficacia disminuyendo las tasas de FRR en riñones procedentes de DA (24). Sin embargo, y a pesar del beneficio de la PHM, el efecto perjudicial de la hipotermia se mantiene cuando el órgano recupera las condiciones de normotermia tras el desclampaje y su consecuente reperfusión en el receptor (45), desencadenando el fenómeno conocido como *isquemia-reperfusión (I/R)*.

1.6. Papel de la preservación hipotérmica en máquina

En la práctica clínica actual, los 2 métodos fundamentales de conservación renal en frío son la PHE y las distintas formas de preservación

INTRODUCCIÓN

dinámica o en máquina (PHM). La expansión de las indicaciones de donación incorporando a los DA permitió recuperar el uso de la PHM y las ventajas que puede ofrecer, que son principalmente la evaluación de la viabilidad del órgano (46, 47) y la atenuación de los efectos de la isquemia caliente sobre el epitelio tubular y el endotelio vascular. La PHE es el método de preservación más utilizado, con ventajas como una amplia disponibilidad y gran sencillez de transporte. Sin embargo, se cuestiona si este método es capaz de prevenir el deterioro de los órganos procedentes de DCE y DA usando como argumento las ventajas de la PHM (48). En primer lugar, la PHM permitiría disminuir la incidencia de FRR y por lo tanto la necesidad de diálisis en el postoperatorio, disminuyendo así la estancia hospitalaria y los costes económicos (48-51). En segundo lugar, permitiría valorar la viabilidad del injerto mediante la evaluación de los parámetros hemodinámicos de la perfusión. Por último, proporcionaría soporte metabólico o farmacológico al injerto durante el tiempo de preservación (52).

Los métodos tradicionales de evaluación de la viabilidad renal han sido la inspección visual y la biopsia. Adicionalmente, se han propuesto en la actualidad la inclusión de parámetros hemodinámicos de la PHM y de marcadores bioquímicos en el líquido de perfusión para construir modelos predictivos de función del injerto que ayuden a la toma de decisiones (52-54). Las determinaciones bioquímicas se basan en la liberación de contenido citoplasmático de las células lesionadas al espacio intersticial e intravascular durante la isquemia-reperfusión (I/R). Entre ellos se han propuesto la determinación de lactato deshidrogenasa (LDH), lactato, alfa-glutación-S-

INTRODUCCIÓN

transferasa (GST), oxihemoglobina o la actividad REDOX del hierro. Como parámetros hemodinámicos se han considerado la presión de perfusión (PP), el flujo de perfusión (FP) y el índice de resistencia (IR) intrarrenal, los cuales han constituido hasta el 56% de las causas de desestimación de los injertos (53), al hallar algunos autores el IR como factor de riesgo independiente para el desarrollo de FRR (55, 56). Por el contrario, el riesgo de desestimar erróneamente injertos únicamente en base a estos parámetros hemodinámicos de la PHM ha sido remarcado por algunos autores (57). En nuestra experiencia clínica (58, 59), no se ha encontrado relación alguna entre el IR y el riesgo de FRR, además de presentar este IR un pobre valor predictivo positivo (VPP), en consonancia con los hallazgos de otros grupos investigadores relevantes (60). Por tanto, aunque los parámetros hemodinámicos de PHM puedan tener relación con los resultados funcionales del injerto, ésta es de una potencia insuficiente como para ser considerada una causa de desestimarlos para el trasplante (61).

A pesar de las potenciales ventajas de la PHM, la literatura arroja resultados algo controvertidos. Múltiples estudios bien diseñados proporcionan suficiente evidencia científica sobre la disminución en la tasa de FRR para todos los tipos de donantes (21, 24, 48, 49, 62, 63). Sin embargo, sus resultados con los injertos procedentes de DA son más discretos: aunque produce menores tasas de FRR (64-67), no ha demostrado beneficio en términos de NFP (66, 68, 69) ni de supervivencia a 1 año del injerto (64, 70).

Por tanto, injertos procedentes de DCE y DA se consideran actualmente candidatos a la PHM, teniendo siempre como objetivo prioritario la disminución del tiempo de isquemia fría aún en condiciones de PHM, la cual es factor

independiente para el desarrollo de FRR y en ningún caso debe utilizarse como un medio que permita la prolongación de este tiempo (66, 71). En cuanto a la lesión de isquemia caliente propia de los DA, no existe conocimiento profundo respecto a la capacidad de la PHM para revertir la lesión producida durante el TIC, aunque algún trabajo reciente haya observado una recuperación parcial de este daño durante la PHMO (72).

1.7. Tipos de preservación hipotérmica en máquina

Todos los dispositivos de PHM presentan una serie de elementos comunes: una bomba de circulación para la solución de preservación, un sistema de refrigeración y un sistema de control de los parámetros del propio dispositivo. El componente diferenciador entre ellos es la bomba de impulso, que puede proporcionar 2 patrones diferentes de flujo: pulsátil o continuo. En la actualidad existen 6 dispositivos diferentes para la PHM (39) que se reflejan en la Tabla 1:

INTRODUCCIÓN

Nombre del sistema	Compañía	Órgano	Descripción	Regulación
LifePort Kidney Transporter®	Organ Recovery System Inc.	Riñón	Portátil, solo un riñón. Perfusión hipotérmica pulsátil.	Aprobación por FDA en 2003. Marca CE 2004
Sherpa Perfusion®	Paragonix Technologies Inc.	Riñón Corazón	Perfusión hipotérmica oxigenada	Aprobación FDA 2014.
WAVES® RM3®	IGL-group	Riñón	Portátil, Perfusión hipotérmica pulsátil de 1 o 2 riñones.	Marca CE Aprobación FDA 2012
Kidney Assist®	Organ Assist	Riñón	Portátil, perfusión pulsátil, oxigenada.	Marca CE
Airdrive®	Portable Organ Perfusion	Riñón Hígado	Pulsátil, Portátil.	Marca CE
VASOWAVE®	Smart Perfusion	Riñón Hígado	Estudios preclínicos.	No aprobado en humanos.
VIVIAN®	TRANSPLANT BIOMEDICAL	Riñón Hígado Corazón.	Hipotérmica ultrasónica. Estudios clínicos	Marca CE
OrganOx®	Organox® Limited	Riñón* Hígado	Normotermia Estudios clínicos.	Marca CE solo para perfusión hepática.
Ark Kidney®	Ebers	Riñón Hígado	Normotermia Estudios preclínicos	No aprobado en humanos

Tabla 1: principales dispositivos de perfusión en máquina comercializados. Tabla adaptada de V Gómez (39) en *European Textbook on Kidney Transplantation* (ISBN 97894926710004).

En España se utilizan dos tipos principales de máquinas de PHM, cuyos modelos y diferencias fundamentales son:

- **LifePort Kidney Transporter®**: sistema portátil que perfunde 1 injerto y no requiere supervisión. Controlada por presión, la mantiene constante a 30 mmHg realizando ajustes en el flujo. El

INTRODUCCIÓN

líquido de perfusión se enfría pasivamente gracias al hielo y es la más frecuentemente utilizada.

- RM3 Renal Preservation System®: sistema no portátil que permite la perfusión simultánea de hasta 2 injertos y requiere supervisión. Controlado por flujo, que se ajusta continuamente para mantener una presión sistólica pico de 45 mmHg.

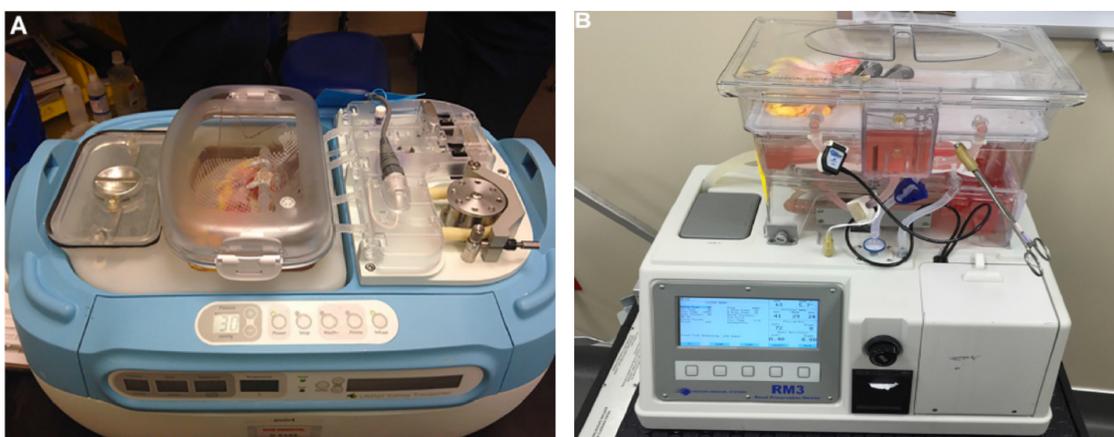


Figura 16: dispositivos de perfusión renal en máquina utilizados en España. A: LifePort Kidney Transporter®. B: RM3 Renal Preservation System® (73).

La literatura científica arroja datos contradictorios acerca de la superioridad de uno de los dos sistemas frente al otro (62, 74). Ambos utilizan la solución de preservación UW modificada para la máquina o Belzer MPS, siendo esta última comercializada bajo diferentes nombres comerciales (*KPS-1*, *Mapersol*, *Perf-Gen*).

A pesar de los buenos resultados clínicos de la PHM, los mecanismos por los que consigue una mejora en la calidad del injerto siguen sin conocerse con exactitud. Algunos estudios experimentales sugieren que el flujo pulsátil es más

beneficioso que el continuo, ya que preserva la regulación de factores de transcripción antiinflamatorios de las células endoteliales como el *Krüppel-like-factor 2* (KLF2) (75, 76) y reduce la apoptosis de células del túbulo renal mediada por la menor expresión del factor inducible por hipoxia-1 α (77). Se han sugerido también la disminución del vasoespasmo, una mayor vasodilatación que mejoraría la perfusión cortical tras la reperfusión (78), un mayor equilibrio del tejido con el líquido de preservación, una regulación a la baja de la reacción inflamatoria que se produce en el injerto tras el trasplante (79), un mayor intercambio de electrolitos con la solución de preservación (80), un efecto protector de la perfusión sobre el óxido nítrico (NO) de la célula endotelial (81) y la evitación de la lesión por cizallamiento o “*shear stress*”, que finalmente conducirían a una regulación a la baja de la cascada de señales y citocinas que se producen durante la reperfusión (82).

En nuestro centro se dispone del sistema *LifePort® Kidney Transporter* para su uso en la clínica, el cual se utiliza de forma rutinaria para la perfusión de los injertos procedentes de DCE y DA. Por este motivo fue el dispositivo empleado en el estudio experimental.

1.8. Oxigenación en la preservación de órganos

La creciente utilización de la PHM ha sido beneficiosa mejorando las tasas de FRR, en particular en el caso de los riñones procedentes de DA (66). Es sabido que el metabolismo celular en hipotermia se mantiene en torno al 10% (25, 83), lo que sugiere que se mantiene un cierto consumo de oxígeno (O₂) en

INTRODUCCIÓN

tales circunstancias. La hipotermia no sólo reduce drásticamente el metabolismo mitocondrial y por tanto su demanda de oxígeno, sino que también reduce significativamente la capacidad de ésta de eliminar RLO (84). No obstante, a pesar de que el O₂ ha demostrado su capacidad para ser nutriente del metabolismo celular renal incluso en hipotermia (85), existe cierta incertidumbre sobre la necesidad de éste durante la preservación en máquina.

La PHMO incluye la circulación activa del O₂ disuelto en el líquido de perfusión, permitiendo oxigenar al riñón. La solución de perfusión utilizada habitualmente es un líquido hipertónico y acelular, que tiene la capacidad de proporcionar la adecuada oxigenación de los tejidos incluso en ausencia de un portador de oxígeno. Toda oxigenación durante la perfusión es el resultado de la difusión y solubilidad del O₂ en el líquido de preservación, la cual es mayor cuanto más baja sea la temperatura, favoreciendo así a la preservación hipotérmica (86). Aunque no es el objeto de este estudio, el avance en este campo es importante, y se está ensayando la PHMO con transportadores de oxígeno en modelos experimentales (87-89). Incluso alguno como el M10, una hemoglobina extracelular derivada de un gusano marino, ha sido ya probado en humanos demostrando su seguridad y prometedores resultados de eficacia (90).

1.8.1. Metabolismo mitocondrial.

La fosforilación oxidativa mitocondrial es la fuente principal de energía (ATP) y metabolismo celular, y su rentabilidad proporcionando energía es directamente dependiente del O₂ como aceptador final de electrones (91-93). Este metabolismo mitocondrial y sus cambios según el momento y método de preservación de los riñones se resumen en:

INTRODUCCIÓN

- A) **Condiciones fisiológicas in vivo:** la cadena transportadora de electrones (CTE), representada por la línea de puntos 1 de la Figura 17, genera un flujo anterógrado de estos electrones impulsando a las bombas de protones (Complejos I, III y IV) contra un gradiente de carga en la cadena de fosforilación oxidativa que impulsa a la ATP sintetasa (Figura 17, línea de puntos 2) a generar ATP (91, 94).

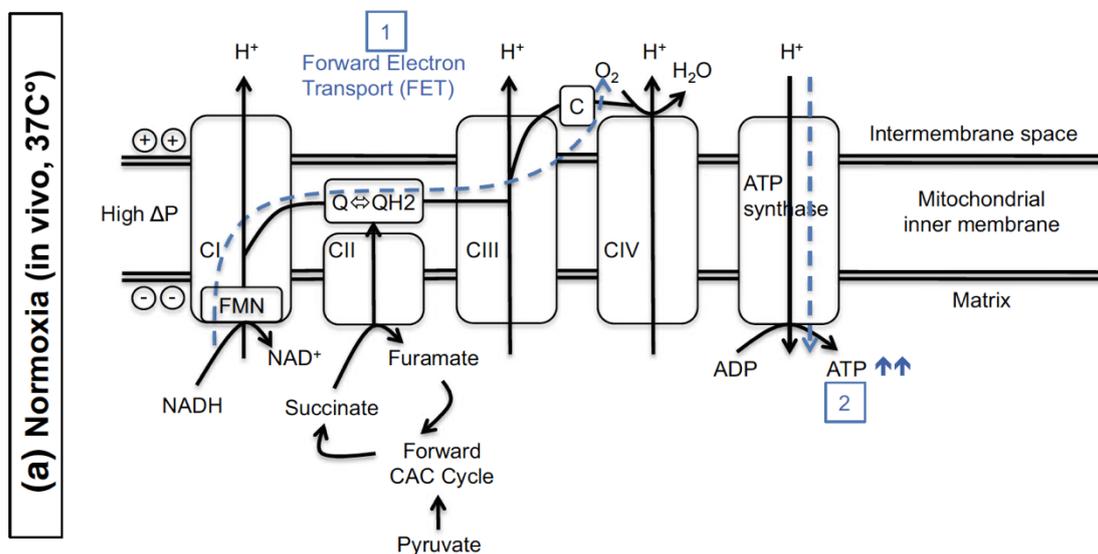


Figura 17: metabolismo mitocondrial fisiológico. 1: cadena transportadora de electrones (CTE). 2: cadena transportadora de electrones (CTE) inversa, induciendo a la ATP sintetasa a producir ATP. CI-IV: complejos I-IV bomba de protones. Reproducido de Darius T et al (95).

- B) **Isquemia:** la isquemia produce importantes alteraciones metabólicas a nivel mitocondrial (91, 94), descritas en el modo 1 de Murphy (92). En ausencia de O_2 , la CTE anterógrada se interrumpe y produce un flujo retrógrado o inverso de electrones, produciendo un aumento del nicotín-adenín-dinucleótido (NADH) (Figura 18-1), del succinato y del piruvato (Figura 18-2). Se produce también la liberación de flavín

INTRODUCCIÓN

mononucleótido (FMN) en el Complejo I (Figura 18-3), resultante de la reducción de la flavina por medio de la CTE inversa (96) . En consecuencia, el ATP y el ADP disminuyen (Figura 18-4) y los metabolitos de purina aumentan (Figura 18-5).

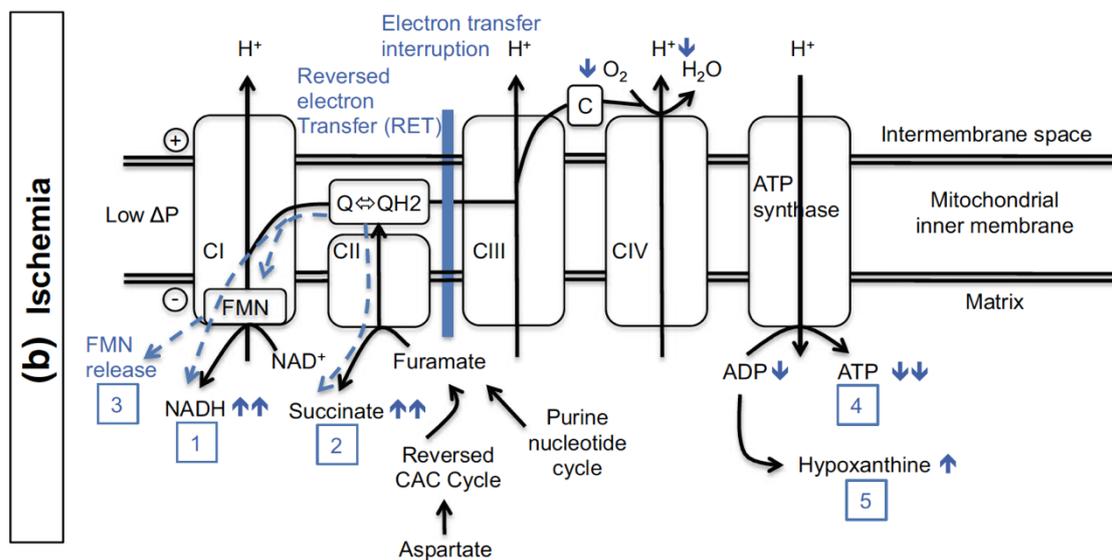


Figura 18: metabolismo mitocondrial en isquemia, modo 1 de funcionamiento mitocondrial de Murphy (92). Interrupción de la CTE, produciendo un aumento del NADH (1) y del succinato (2). Liberación de FMN en el complejo I (3), disminución del ATP y ADP mitocondriales (4) y aumento de los metabolitos de la purina (5). Reproducido de Darius T et al (95).

C) **PHMO:** durante la perfusión en máquina la función respiratoria mitocondrial se ralentiza significativamente, si bien mantiene el flujo anterógrado de electrones. Así, impide la acumulación de electrones en los Complejos I y II. El grado de actividad de la CTE durante la perfusión dependerá de la concentración de O₂ en el líquido (Figura 19-1), que se conoce como Modo 3 de Murphy (92) y consigue mitigar

INTRODUCCIÓN

los cambios producidos durante la isquemia: disminución del succinato y la NADH (Figura 19-2), menor liberación de FMN (Figura 19-3) y aumento de la regeneración de ADP/ATP (Figura 19-4).

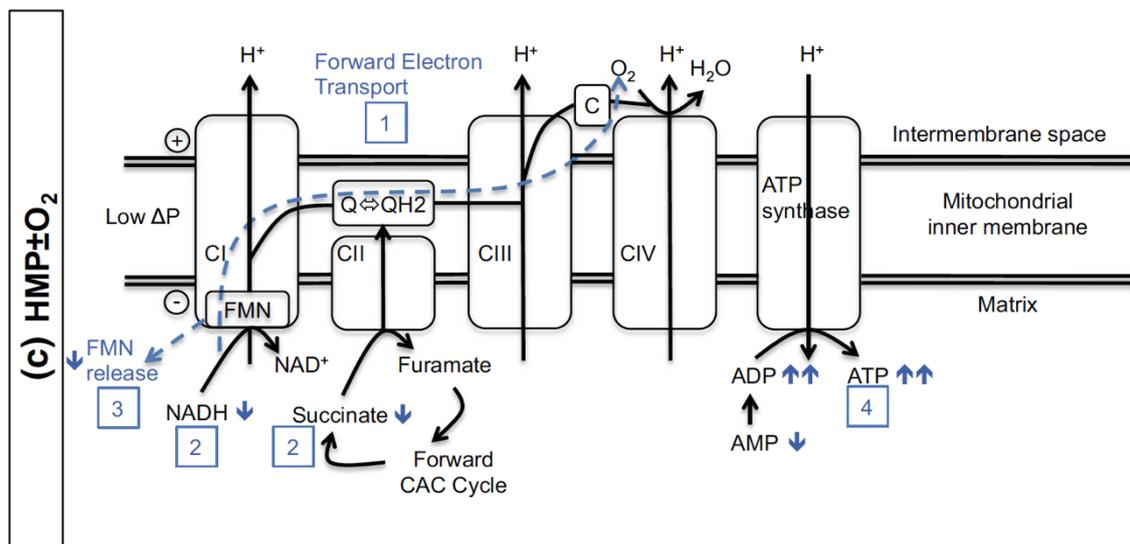


Figura 19: metabolismo mitocondrial durante la PHMO o modo 3 de funcionamiento mitocondrial de Murphy (92). Se mitigan los cambios producidos por la isquemia, ocasionando una disminución del NADH y succinato (2), menor liberación de FMN (3) y aumento del ATP mitocondriales (4). Reproducido de Darius T et al (95).

- D) **Reperusión del injerto in vivo:** durante la reperusión in vivo, la CTE genera ATP (Figura 20-1). Sin embargo, cuando existe demasiado succinato mitocondrial acumulado, su rápido consumo genera demasiado ubiquinol (QH₂) en el Complejo II, lo que perjudica a la CTE. Este hecho, junto con el pH ácido de la isquemia, dan lugar a una CTE inversa en el Complejo I (Figura 20-2) (91), ocasionando liberación de FMN/FMNH₂ (Figura 20.3) y producción de RLO (96).

INTRODUCCIÓN

Este acúmulo mitocondrial de succinato y FMN/FMNH₂ originado durante la isquemia, y que contribuye a la liberación de RLO durante la reperfusión del órgano, es común tanto al riñón (91) como al hígado (97, 98). La determinación por fluorescencia del FMN/FMNH₂ durante la PHMO es fácil y rápida, y se ha propuesto como marcador en tiempo real del estado metabólico y como predictor del daño por I/R en el injerto, tal y como se ha hecho en preservación hepática (99).

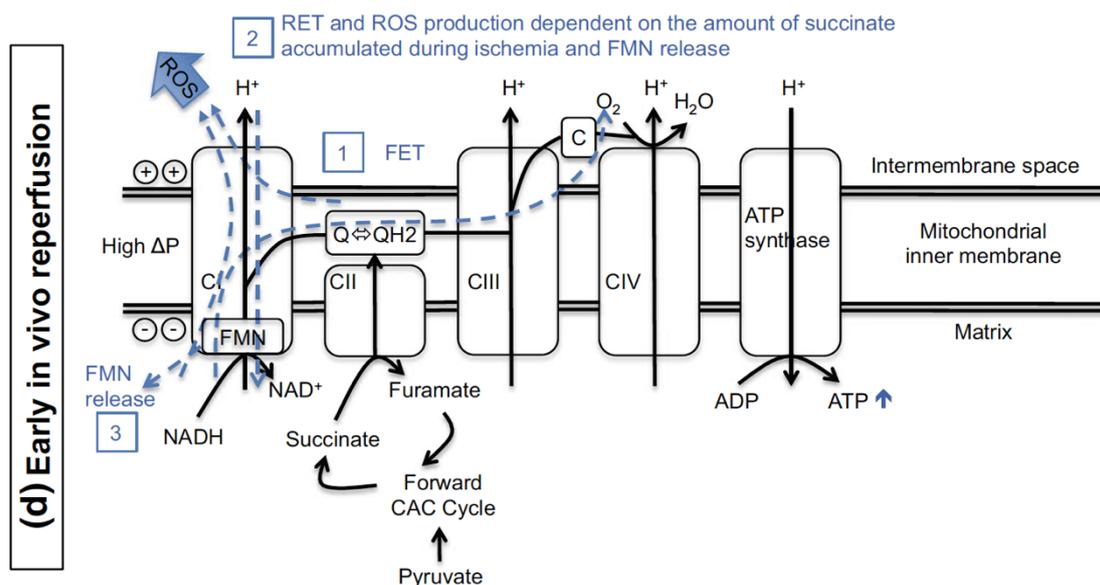


Figura 20: metabolismo mitocondrial durante la reperfusión del injerto in vivo. El acúmulo de succinato mitocondrial genera demasiado ubiquinol (QH₂) en el Complejo II que perjudica a la CTE. Así, se produce una CTE inversa en el Complejo I (2), ocasionando la liberación de radicales libres de oxígeno (RLO) y de FMN (3). Reproducido de Darius T et al (95).

1.8.2. Potencial del oxígeno.

Por un lado, una mayor exposición del riñón a elevadas concentraciones de O₂ puede incrementar el daño oxidativo al aumentar la producción de RLO

INTRODUCCIÓN

durante su preservación (100), sumado a la menor capacidad de eliminación de estos radicales que confiere la hipotermia (84). Así, los resultados de algunos estudios experimentales en cerdos no arrojaron claros beneficios que justificasen la PHMO, más allá de alguna diferencia molecular como la mayor producción de EPO y la mayor liberación de RLO en el grupo de la PHMO (101).

Sin embargo, atendiendo a los posibles efectos beneficiosos de la PHMO, se sabe que la adición de O_2 podría contribuir a la síntesis mitocondrial de ATP (85), dada la elevada tasa metabólica de la corteza renal en normotermia y su mantenimiento de cierto consumo de O_2 incluso en hipotermia (102). Algunos estudios experimentales han descubierto que la PHMO es particularmente beneficiosa en el acondicionamiento de riñones con lesión isquémica caliente (102, 103) y, además, se ha propuesto un nuevo mecanismo basado en la inhibición farmacológica del succinato acumulado durante la isquemia y que atenúa los efectos deletéreos de la lesión por I/R (91). Se ha sugerido también que un corto período de reanimación utilizando PHMO después de la PHE e inmediatamente antes del trasplante puede reponer parcialmente el ATP, reducir los niveles de estrés oxidativo y mejorar la recuperación de los riñones dañados (104), mientras que otros trabajos logran una mejora en el rendimiento de injertos obtenidos de DA tras la isquemia caliente sometiéndolos de inmediato a PHMO (105, 106). Otros estudios preclínicos han demostrado el efecto beneficioso del O_2 , tanto en pruebas metabólicas del líquido de perfusión como en el análisis histológico de los injertos perfundidos. Empleando altas concentraciones de O_2 (107-109) lograron un mejor flujo sanguíneo, una mejor función renal y menor inflamación crónica a los 3 meses, mayor producción de ATP y menor daño

INTRODUCCIÓN

mitocondrial tras la reperfusión *ex vivo* (72). Así, la PHMO parece ejercer el papel de optimizador metabólico previo al implante que podría ayudar a minimizar los efectos nocivos de la I/R (95, 101, 108-110).

Sin embargo, el protocolo, el momento y la duración óptimos para añadir el O₂ siguen sin estar claros (105, 108, 111, 112). Atendiendo a su concentración, ésta debe ser preferentemente alta (113). En cuanto al tiempo, la oxigenación constante durante todo el tiempo de PHMO es la pauta habitual y más beneficiosa (107). Sin embargo, reducir la duración de la oxigenación a un plazo limitado, ya sea inmediatamente tras la extracción del órgano o como reacondicionamiento justo antes del implante, podría conferir importantes beneficios logísticos, en especial cuando se requiere transportar el órgano a otro hospital. Así, la PHMO limitada a las primeras 2 horas parece ser igual de eficaz que la oxigenación continua, mientras que el beneficio del reacondicionamiento de injertos sometidos a PHM estándar con PHMO en las 2 horas finales antes del implante es menos claro (95).

Por último, y desde un punto de vista clínico y no meramente experimental, un ensayo clínico aleatorizado y multicéntrico británico con riñones de DA tratados con PHM (sin oxígeno) no consiguió mejorar los resultados funcionales de los injertos (69).

1.8.3. Controversias.

Todos estos hallazgos preclínicos y en ocasiones relativamente contradictorios han impulsado la ejecución de dos ensayos en humanos que buscan arrojar algo de luz a este escenario clínico de la oxigenación: el europeo

INTRODUCCIÓN

COPE-Compare (ISRCTN 32967928), que compara PHMO frente a PHM en riñones de DA mayores de 50 años, y el *COPE-POMP* (ISRCTN 63852508), que trata de evaluar los efectos de un período de PHMO tras PHE frente a la PHE y utilizando el dispositivo *Kidney Assist®* en ambos casos, inmediatamente antes del trasplante de riñones procedentes de DCE. El reclutamiento de ambos estudios ha finalizado y los resultados del *COPE-Compare* han sido recientemente publicados: tanto en sus resultados preliminares presentados en 2019 (114) como su publicación definitiva en 2020 (115), no presentaron beneficio alguno para el grupo PHMO en términos de función renal ni supervivencia a 1 año.

En resumen, el papel de la PHMO se ha convertido en un aspecto fundamental de debate en la actualidad, ya que diversos estudios en humanos y animales con distintas metodologías arrojan resultados prometedores en cuanto a resultados funcionales (111), aunque un tanto incoherentes. Hoy en día, tal y como se utiliza en la práctica clínica, la PHM no incluye la oxigenación activa del injerto. Sin embargo, cualquier potencial beneficio metabólico de la PHMO deberá equilibrarse con los efectos deletéreos de los RLO (91, 100).

1.9. Evaluación de resultados de la preservación

Existen un buen número de métodos capaces de evaluar la función del órgano a nivel molecular. Desde los parámetros analíticos serológicos clásicos hasta los innovadores estudios de transcripción, pasando por el estudio del ambiente de perfusión en la máquina, estos métodos ayudan a comprender

mejor los mecanismos de lesión por isquemia-reperfusión y los procesos inmunológicos o inflamatorios que acontecen en el riñón a trasplantar (116).

1.9.1. Parámetros hemodinámicos y bioquímicos en máquina

Es necesaria una evaluación fiable y precisa de la calidad del riñón antes de su implante, para poder predecir los resultados en el receptor y optimizar el manejo y la asignación de los injertos en las listas de espera. En la actualidad, el FP y el IR son los indicadores hemodinámicos de la viabilidad renal durante la PHM (58, 60, 117, 118), aunque su valor predictivo positivo es pobre y, como ya se ha comentado, no deben ser considerados como criterio único para desestimar un injerto.

La medición no invasiva de biomarcadores a partir de la solución de preservación podría permitir la evaluación en el tiempo de la lesión renal inducida por la isquemia, otorgando además una ventaja adicional de rapidez e inmediatez superiores a la convencional biopsia. Esta medición de biomarcadores en la solución de preservación ha cobrado interés clínico durante la PHM (119). Varios parámetros bioquímicos y marcadores de lesión isquémica han sido cuantificados en el efluente renal; sin embargo, no están completamente establecidos y su papel en la predicción de la función renal in-vivo todavía es controvertido (117, 119-122).

1.9.2. Los miRNA como marcadores de función renal

Los miRNA son reguladores postranscripcionales de casi todos los procesos celulares. Se han desvelado como un afinador de información genética,

INTRODUCCIÓN

y la evidencia científica acumulada hasta la fecha ha demostrado que se encuentran en los cimientos del mecanismo fisiopatológico de una amplia gama de trastornos, incluidas las nefropatías (123). Recientemente, un grupo investigador de nuestro centro ha identificado y caracterizado varios miRNA como mediadores clave de la respuesta del túbulo proximal a la lesión por isquemia-reperfusión (124, 125). Además, se han señalado estos miRNA como biomarcadores del diagnóstico, pronóstico y la predisposición de insuficiencia renal aguda (124, 126, 127). Esta combinación de miRNA incluye a los siguientes: miR-210, miR-126, miR-127, miR146, miR-10a, miR-101 miR-93, miR-27a, miR-26b y miR-29a. Concretamente, miR-127 se ha demostrado como marcador de la lesión por I/R de las células tubulares (126) (127), mientras que miR-29a se asocia con la regulación de la fibrosis renal y la progresión de la IRC (128) y miR-210-3p predecía la supervivencia de pacientes críticos con FRA (129). Por último, la expresión de miR-21, aislado por otros autores y no incluido en el panel de nuestro grupo investigador, se ha correlacionado con la TFGe a los 6 y 12 meses tras el TR de injertos sometidos a PHM (130), además de haberse relacionado con la lesión isquémica en un modelo murino experimental de I/R (127).

1.10. Valoración del modelo porcino de autotrasplante

Como ya se ha comentado, la constante búsqueda de riñones ha conducido a la utilización de injertos procedentes de DA, con sus consabidas

INTRODUCCIÓN

mayores tasas de FRR y de NFP, fruto de los prolongados tiempos de isquemia y del daño producido por la isquemia-reperfusión (131-133).

Por tanto, es en este escenario donde se hace necesario un modelo animal de TR, clínicamente relevante, que trate de reproducir las condiciones de los riñones procedentes de los DA, con el fin de investigar y mejorar las estrategias de intervención y poder así desbloquear completamente todo el potencial clínico que estos órganos puedan tener (134). El modelo de autotrasplante es especialmente adecuado en estas circunstancias, ya que permite excluir los posibles efectos de un rechazo inmunológico y/o la inmunosupresión, que sin duda sesgarían los resultados. No en vano, la investigación animal ha sido el primer paso de muchos de los grandes progresos obtenidos en la historia del TR. Pioneros del pasado siglo XX como *Alexis Carrel* (135), *Emerich Ullman* (136), *Folkert Belzer* (36), *René Küss* (137) o *José María Gil-Vernet* se sirvieron de ella para poner la primera piedra en la construcción de grandes avances que posteriormente pudieron trasladar con éxito al campo de los humanos.

A la hora de crear un modelo animal de experimentación, es crucial la existencia de una correcta extrapolación al ser humano, que en el caso de animales pequeños como los modelos murinos suele ser precaria. El cerdo es el animal más empleado en la investigación animal relacionada con el TR. A pesar de diferencias en la micro-anatomía renal, el menor tamaño de sus vasos, las diferentes dosis y metabolismos, o la diferente farmacocinética de estos animales, éstas son en su mayoría pequeñas y salvables. Así, el modelo porcino mantiene su aptitud e idoneidad para investigación en TR (134). Todo ello con el

fin de crear un modelo experimental reproducible, de bajo coste, disponible y con una configuración próxima a la humana.

1.10.1. Edad y sexo del animal

El desarrollo de los riñones porcinos difiere del humano. Mientras que los riñones humanos son maduros durante la edad gestacional, los porcinos alcanzan su madurez a los 2-3 meses, cuando el animal pesa unos 20 - 30 kg. Además, a partir de los 7 - 8 meses (100 - 120 kg) alcanzan la pubertad, durante la cual los andrógenos pueden influir en su función renal (138). Por tanto, lo idóneo en un modelo porcino es el empleo de animales comprendidos entre los 3 - 6 meses.

Además, la uretra del cerdo macho posee una morfología especial que hace extremadamente difícil su cateterización y sobreexpone a riesgos infecciosos innecesarios. Es por este motivo por el que generalmente, en experimentación, son utilizadas las hembras.

1.10.2. Condiciones de estabulación. Respuesta al estrés.

El cerdo es un animal social y curioso, que necesita estar alojado en recintos que les permitan la interacción social y la estimulación de su comportamiento natural con el fin de reducir el estrés. El área recomendada para un animal de 50 kg es de 1,35 m², y toda reducción de esta área resultará en un peor desarrollo y crecimiento secundarios a los altos niveles de estrés (139). Este estrés genera un detrimento en el bienestar del animal y en el resultado del

trasplante, puesto que el animal estresado tiende a deshidratarse, perder peso y sufrir cambios metabólicos e inmunológicos.

1.10.3. Alimentación y ayuno

El ayuno de 6 - 8 horas es suficiente en el cerdo como para vaciar el tracto gastrointestinal alto, debido a su rápido tránsito. La alta demanda calórica del animal (8.000 kcal/día para un cerdo de 50 kg) obliga a mantener un ayuno lo más corto posible. Durante este ayuno, el empleo de bebidas dulces ayuda a prevenir la hipoglucemia del animal (140). Por tanto, cerdos hembra de 50 kg son favorables para la realización de un modelo de autotrasplante, minimizando así la influencia de los andrógenos y empleando riñones maduros desde un punto de vista anatómico y funcional.

1.10.4. Anestesia

Un adecuado y robusto protocolo anestésico debe basarse en un mantenimiento anestésico profundo garante de unas adecuadas constantes vitales, en el confort del animal y en la minimización de los efectos adversos del procedimiento. El acto anestésico se divide asimismo en 4 partes principales:

- *Premedicación:* disminuye la ansiedad, estabiliza el sistema nervioso autónomo, facilita el manejo del animal y permite reducir la dosis de anestésico durante la inducción. La asociación de benzodiazepinas (intramusculares o intravenosas) y de un anestésico disociativo (ketamina) ofrece una premedicación óptima y cardiovascularmente estable (141).

INTRODUCCIÓN

- *Inducción:* el acceso intravenoso continuo se realiza habitualmente a través de un catéter venoso central, si bien la inducción puede realizarse mediante el uso de anestésicos inhalatorios (*halotano*, *sevoflurano*) o intravenosos (*propofol*, *tiopental*) inyectados a través de una vía periférica que generalmente se canaliza en la oreja del animal. Tras la correcta relajación neuromuscular (anula los reflejos deglutorios y la tensión muscular de mordida) se procede a la intubación orotraqueal, que en el cerdo es ardua debido a su característica configuración de la orofaringe: largo paladar blando, divertículo faríngeo y morfología en hendidura de las cuerdas vocales (142).
- *Mantenimiento anestésico:* el mantenimiento anestésico se realiza con anestésicos inhalados (*sevoflurano*, *halotano*), que han demostrado ejercer efectos antiinflamatorios y antinecróticos in vitro en las células tubulares proximales (143), o con anestésicos intravenosos (*propofol*, *opiáceos*), así como la asociación de relajantes neuromusculares. El propofol posee un efecto antiinflamatorio y protector superior al sevoflurano (144). La profundidad de la anestesia debe ser cuidadosamente monitorizada con el fin de salvaguardar una adecuada presión de perfusión renal de 40 - 60 mmHg.
- *Recuperación y despertar:* la adecuada temperatura corporal, el óptimo equilibrio ácido-base y la adecuada reposición de las fuentes de energía del animal son esenciales para una rápida y correcta

recuperación post anestésica. Los sedantes a bajas dosis y la correcta analgesia garantizan una recuperación libre de estrés.

1.10.5. Consideraciones quirúrgicas

El procedimiento de autotrasplante incluye la extracción del riñón de un lado, la extirpación del riñón contralateral y la consiguiente implantación del injerto previamente extraído, seguido de la potencial supervivencia del injerto y del animal.

Los experimentos quirúrgicos en animales presentarán inevitables variaciones con respecto a los utilizados en la práctica clínica humana. En este sentido, la práctica clínica habitual con los DA es la extracción multiorgánica a través de un acceso transperitoneal abierto. De igual modo, el implante del injerto se realiza en la fosa iliaca a través de un acceso pararrectal extraperitoneal, utilizando para las anastomosis vasculares los vasos iliacos. En cambio, en los modelos porcinos se utiliza el acceso transperitoneal frecuentemente, y las anastomosis vasculares utilizadas con más frecuencia son las arterias aorta y renal y las venas cava y renal. Además, la susceptibilidad porcina a las complicaciones intestinales es mayor, lo que requiere un adecuado manejo de éstas y un correcto cuidado y elección de las anastomosis vasculares.

- **Pre – Nefrectomía:** las invaginaciones intestinales son comunes en el cerdo, por lo que la inspección de la cavidad abdominal es importante antes de proceder a la nefrectomía. La manipulación del intestino durante el procedimiento debe ser extremadamente

INTRODUCCIÓN

cuidadosa, evitando la exteriorización del paquete intestinal, debido a una mayor susceptibilidad a la isquemia y al edema (145).

- **Nefrectomía y trasplante:** el implante en fosa iliaca está desaconsejado debido a que limita la movilidad del animal durante el postoperatorio. Se prefiere el implante en la fosa renal contralateral y utilizando el riñón izquierdo, ya que tiene mayor longitud de la vena y permite la disección de la arteria en su ostium a nivel aórtico. El acceso al retroperitoneo y la fosa renal utilizando el electrocauterio evita en cierta medida el acúmulo linfático postoperatorio, dado que el cerdo presenta un flujo linfático mayor que el humano (146). El retroperitoneo es abierto a la altura del hilio renal, lo que permitirá la creación de un reservorio retroperitoneal donde ubicar posteriormente el injerto, disminuyendo la probabilidad de linfocele y de adherencias intestinales al riñón trasplantado (147). La nefrectomía contralateral (derecha) se realiza de forma similar a la nefrectomía izquierda, proporcionando espacio para la posterior colocación del injerto renal en la bolsa retroperitoneal. La disección distal de la arteria renal derecha facilitará la posterior anastomosis con la arteria renal del injerto (148). El lavado del muñón arterial con heparina antes de completar la anastomosis es obligado, dada la mayor tendencia del cerdo a la trombosis en comparación con el humano (149). Las anastomosis vasculares se realizan habitualmente a los vasos renales nativos derechos o a la cava y aorta. La derivación urinaria

INTRODUCCIÓN

empleada va desde la convencional a la vía urinaria derecha nativa (uréter o pelvis renal) hasta una derivación externa mediante ureterostomía cutánea, la cual permite el estrecho control de la diuresis postoperatoria (150).

- **Post – Trasplante:** en los casos de ureterostomía cutánea, la recolección de orina postoperatoria es posible usando una "chaqueta de cerdo" KARUNO®, diseñada para contener una bolsa urinaria de 4 litros (151-153). La sonda vesical permite la monitorización del volumen de diuresis en aquellos casos de derivación urinaria interna. En cuanto a la analgesia postoperatoria, el uso de opiáceos sistémicos es eficaz en el cerdo, aunque se necesitan dosis altas para obtener los efectos analgésicos adecuados. Es importante destacar que los efectos secundarios gastrointestinales como el estreñimiento o el íleo pueden interferir durante este período, especialmente porque los cerdos parecen ser muy susceptibles a las complicaciones gastrointestinales después de la cirugía abdominal.
- **Mantenimiento del animal:** el mantenimiento de una adecuada salud del animal es indispensable en los procedimientos de experimentación de trasplante para así minimizar la variación en los resultados. El cerdo es un animal que no está acostumbrado a la restricción y aislamiento necesarios antes de cada experimento. La correcta aclimatación y la minimización del número de cuidadores facilitarán el manejo postoperatorio, ya que es

INTRODUCCIÓN

necesario enfatizar que los cerdos son generalmente muy susceptibles a los cambios en su entorno. La movilización en el corral o en un área grande estimulará el movimiento intestinal y mejorará el bienestar. Los sonidos (por ejemplo, radio, cuidadores) ayudan a filtrar los ruidos del exterior y reducen el estrés (154).

1.10.6. Limitaciones del modelo animal.

A pesar de su probada utilidad y extendida práctica en investigación, los modelos animales de experimentación presentan evidentes factores limitantes operativos y éticos.

Desde un punto de vista puramente organizativo, el modelo porcino de autotrasplante requiere una importante infraestructura material, física y personal para garantizar el correcto proceder quirúrgico y anestésico, así como el cuidado postoperatorio del animal. Además, lograr la supervivencia de estos animales no es una tarea sencilla, ya que requieren de constantes cuidados y atención diaria. Y es por esto que su validez suele limitarse al corto plazo, evitando supervivencias largas en los experimentos para minimizar el sufrimiento animal.

En cuanto a la ética, “*el principio de las 3R: reemplazo, reducción y refinamiento*” (155) ha de regir cualquier planteamiento de experimentación con animales. Frente a estos modelos de experimentación animal que contemplan la supervivencia de éste, existen modelos de preservación del órgano *ex situ* o extracorpórea, con medición de parámetros en el líquido de perfusión y omitiendo la parte del resultado funcional postoperatorio. Estos modelos, de indudables ventajas éticas, han demostrado su utilidad para responder a muchas

INTRODUCCIÓN

preguntas de investigación en materia de preservación y trasplante de órganos, así como su fisiopatología y farmacología (156). Asimismo, pueden servir como enlace entre la investigación clínica básica y la aplicada, además de llevarse a cabo en un entorno relativamente fisiológico. Gracias a que no requieren la supervivencia del animal, cumplen firmemente con *“el principio de las 3R”* reduciendo, refinando y reemplazando los ensayos con animales vivos (155). Y en el caso concreto del riñón, por su condición de órgano par, permitiría obtener un mayor número de injertos empleando menos animales (44). Sin embargo, no permiten observar la viabilidad del experimento en un entorno de mayor realismo como el trasplante, midiendo la verdadera función del órgano una vez implantado.

HIPÓTESIS

2. HIPÓTESIS

El TR es la forma óptima de tratamiento para el paciente con IRT. La disponibilidad limitada de órganos ha conducido a la utilización de fuentes alternativas de donantes, incluidos los DA, cuyos órganos muestran un aumento en la tasa de FRR y NFP. Los esfuerzos deben dirigirse no sólo a la mejora en los criterios de selección de donantes, sino también a la optimización de la viabilidad de los órganos durante su preservación. Durante el periodo de isquemia se asiste a una disminución de la fosforilación oxidativa y la síntesis final de ATP responsables de la disrupción de la homeostasis celular, proceso que se atenúa en condiciones de hipotermia. La reducción de la temperatura por debajo de los 10° C reduce el metabolismo celular y el consumo de oxígeno.

La adición de oxígeno durante la PHM (PHMO) puede fomentar la generación de ATP, colaborando al mantenimiento de la homeostasis energética y la integridad celular. Por el contrario, la oxigenación en condiciones de hipotermia puede favorecer la generación de RLO y potenciar la lesión por isquemia-reperfusión (I/R).

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo primario

Determinar la supervivencia de los animales y su función renal post-TR, medida como niveles de creatinina, atendiendo a la adición activa de O₂ durante la PHMO en un modelo animal experimental de DAC.

3.2. Objetivos secundarios

Determinar en biopsias del injerto renal, las funciones celulares de respiración mitocondrial y glucólisis medidas como tasa de consumo de oxígeno y tasa de acidificación extracelular en una plataforma *SeaHorse* de análisis metabólico en tiempo real, atendiendo a la adición activa de O₂ durante la PHMO en un modelo de DAC.

Determinar, en biopsias del injerto renal, los niveles de estrés oxidativo medido como peroxidación lipídica mediante la cuantificación de su producto final, el malondialdehído (MDA), atendiendo a la adición activa de O₂ durante la PHMO en un modelo de DAC.

Determinar, en biopsias del injerto renal, la expresión de genes de oxidación (SOD1, SOD2, catalasa) atendiendo a la adición activa de O₂ durante la PHMO en un modelo de DAC.

OBJETIVOS

Determinar, en biopsias del injerto renal, la expresión de genes de transición epitelio-mesenquimal (TEM) - cadherina-E, fibronectina, vimentina y colágeno - atendiendo a la adición activa de O₂ durante la PHMO en un modelo de DAC.

Determinar la expresión de miRNA en la solución de preservación, atendiendo a la adición activa de O₂ durante la PHMO en un modelo de DAC.

MATERIAL Y MÉTODOS

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Diseño de Investigación

La investigación se lleva a cabo mediante un estudio experimental, prospectivo y aleatorizado, sobre un modelo porcino de autotrasplante renal, con el fin de comparar la eficacia de la preservación hipotérmica en máquina con suplementación de O₂ (PHMO) en un grupo índice frente a la eficacia de la preservación en máquina convencional (PHM) en un grupo control.

4.2. Ámbito del estudio

Desarrollado en el Hospital Universitario Ramón y Cajal, con la implicación de los Servicios de Urología, Anestesiología - Coordinación de Trasplante, Cirugía Experimental, Bioquímica Clínica, Investigación, Anatomía Patológica y del Grupo de Respuesta Celular a la Isquemia del Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS).

Para su realización se obtuvo aprobación del *Comité Ético de Experimentación Animal (CEEAA)* del Hospital Ramón y Cajal (*Exp 14/2014, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, España*) recogido en el Anexo 1, además de obtener la acreditación legal de los investigadores para trabajar con animales de experimentación (Anexo 2).

4.3. Metodología

4.3.1. Muestra de estudio. Cálculo del tamaño muestral

El cálculo del tamaño muestral tiene en cuenta la utilización de 2 grupos de tratamiento: el grupo de intervención PHMO, en el que se lleva a cabo la oxigenación del circuito de perfusión en el dispositivo *LifePort*®, y el grupo control PHM, constituido por la preservación convencional hipotérmica en máquina sin oxigenación. Se utilizó como método de estimación del tamaño muestral la *Ecuación de Recursos de Mead* con la principal justificación de reducir el número de animales por tratarse de un experimento moderado-severo, y ya que el objetivo principal es la comprobación de la hipótesis de que la oxigenación activa del circuito de perfusión (PHMO) mejora los resultados del injerto. Atendiendo a la fórmula de la ecuación de recursos ($E = N - T$) en un diseño sin bloques con 2 grupos de tratamiento (PHM y PHMO), y después de la revisión de la literatura (donde los estudios oscilan entre 4 y 6 animales por grupo), el tamaño muestral se estimó con un nivel de confianza del 95% en 24 animales.

4.3.2. Muestreo y distribución de recogida

La asignación a cada grupo de perfusión se basó en un esquema de aleatorización total generada por ordenador. Los miembros del equipo quirúrgico fueron conocedores de la asignación antes de iniciar la cirugía. El observador y el analista de los datos estuvieron cegados en la fase de seguimiento postoperatoria. A cada animal se le asignó un número código y sus datos fueron analizados con esta única identificación, que se encuentra almacenada en una hoja de cálculo de Microsoft Excel. La

evaluación de los resultados postoperatorios se llevó a cabo de forma diferida por los miembros del equipo investigador.

4.3.3. Fuentes y recogida de datos

Las fuentes de recogida fueron: la máquina de preservación, el líquido de preservación, muestras biológicas de los animales de experimentación, las biopsias de los injertos antes y después de la preservación y las piezas de nefrectomía tras el sacrificio del animal.

Las variables recogidas y analizadas fueron:

- Del animal: edad, peso, parámetros bioquímicos basales (función renal y LDH)
- De la preservación: parámetros hemodinámicos en la máquina, determinaciones bioquímicas (LDH, lactato, pO₂) y análisis de miRNA del líquido de preservación.
- Del post-trasplante: función renal (creatinina sérica), LDH, hematimetría y supervivencia del animal.

4.3.4. Análisis estadístico

Todo el análisis estadístico se realizó utilizando los programas *SPSS v15.0 (IBM©)* y *GraphPad Prism v8.0 (GraphPad Software©, La Jolla, California)*. Los datos se expresaron como media y desviación estándar (SD) o medianas y rango. La significación estadística se evaluó mediante la prueba *t de Student* no emparejada en casos de datos de distribución normal y mediante la prueba *U de Mann-Whitney* en casos en los que no se cumplía esta norma. Se consideró significación estadística una $p < 0,05$.

4.4. Protocolo de actuación

4.4.1. Selección del animal

Los protocolos quirúrgicos se realizaron de acuerdo con el *Real Decreto de 1 de febrero (RD53/2013)*, por el que se establecen las normas básicas para la protección de los animales utilizados en la experimentación y otros fines científicos, incluida la docencia (157). Se seleccionaron cerdas hembra de 3,5 - 6,5 meses y un peso comprendido entre 40-50 Kg (*Agropardal S.L., Cuenca, España*), porque presentan una función renal comparable a la de los humanos adultos, para minimizar las influencias androgénicas sobre la función renal del animal y para poder lograr un cateterismo vesical sencillo.

Las condiciones de la estabulación abarcan un área de 1,35 m² para cada animal (Figura 21). La aclimatación para reducir el estrés perioperatorio fue de 3 días y el ayuno preoperatorio de 6-8 horas de alimento sólido.



Figura 21: área de estabulación del animal previa y posterior a la cirugía, con un área total de 1,35 m² y acceso libre a líquidos y alimentos.

4.4.2. Diseño experimental

Se desarrolló un modelo de autotrasplante renal ortotópico que simula las condiciones de los DA tipo III de Maastricht, también denominada asistolia controlada (DAC) intrahospitalaria, con un TIC constante de 30 minutos.

4.4.3. Anestesia

La premedicación se realizó con el anestésico disociativo *Ketamine*® (10 mg/kg) mediante inyección intramuscular. Adicionalmente se usó atropina intramuscular por su efecto anticolinérgico para minimizar la bronco-secreción y la salivación del animal, facilitando así la intubación orotraqueal. La inducción de la anestesia general se realizó con sevoflurano 2% (*Sevorane*®) y, tras una adecuada relajación muscular con rocuronio (*Esmeron*®) se completa la intubación. A continuación, se canaliza la yugular externa con un catéter venoso central (abierto o percutáneo) para un acceso intravenoso sostenible durante todo el procedimiento quirúrgico y el postoperatorio (Figura 22).

MATERIAL Y MÉTODOS

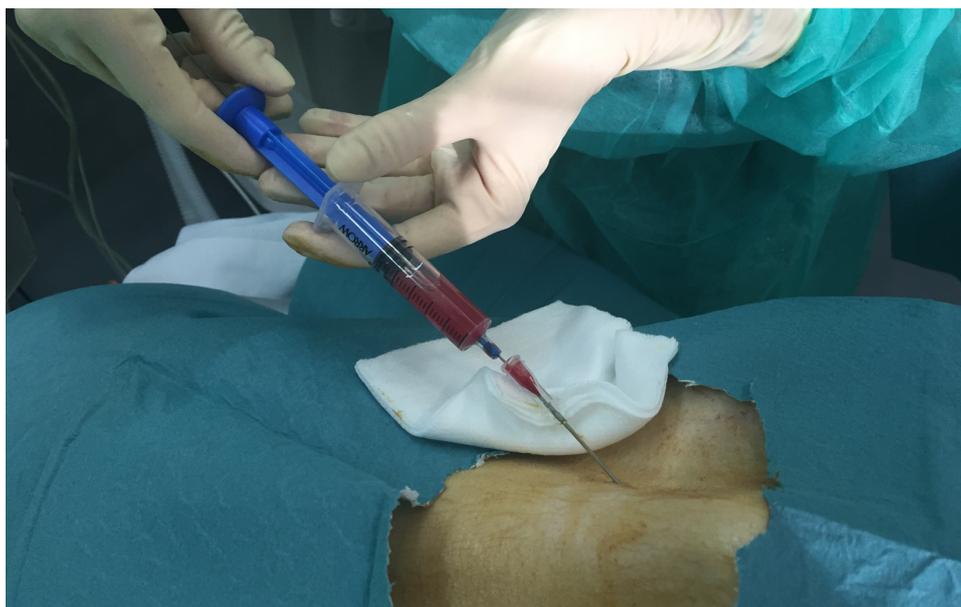


Figura 22: cateterización venosa central mediante acceso percutáneo sobre vena yugular externa derecha.

El mantenimiento anestésico se realiza mediante un protocolo intravenoso que emplea opioides como fentanilo (*Fentanyl*®) o remifentanilo (*Ultiva*®) y relajantes musculares (*Esmeron*®). Para la profilaxis antibiótica se emplea tulatromicina (*Tulatromycin*®), un antibiótico de acción prolongada de la familia de los macrólidos. Por último, la analgesia postoperatoria se proporciona mediante parches de fentanilo transdérmico (50 mcg/h).

4.4.4. Procedimiento quirúrgico: nefrectomía izquierda

El autotrasplante renal implica la inicial extracción unilateral del riñón izquierdo (injerto), la extracción del riñón contralateral (derecho) y el posterior implante del injerto perfundido, seguidos de la supervivencia del animal. El esquema resumen del estudio experimental se muestra en la Figura 23.

MATERIAL Y MÉTODOS

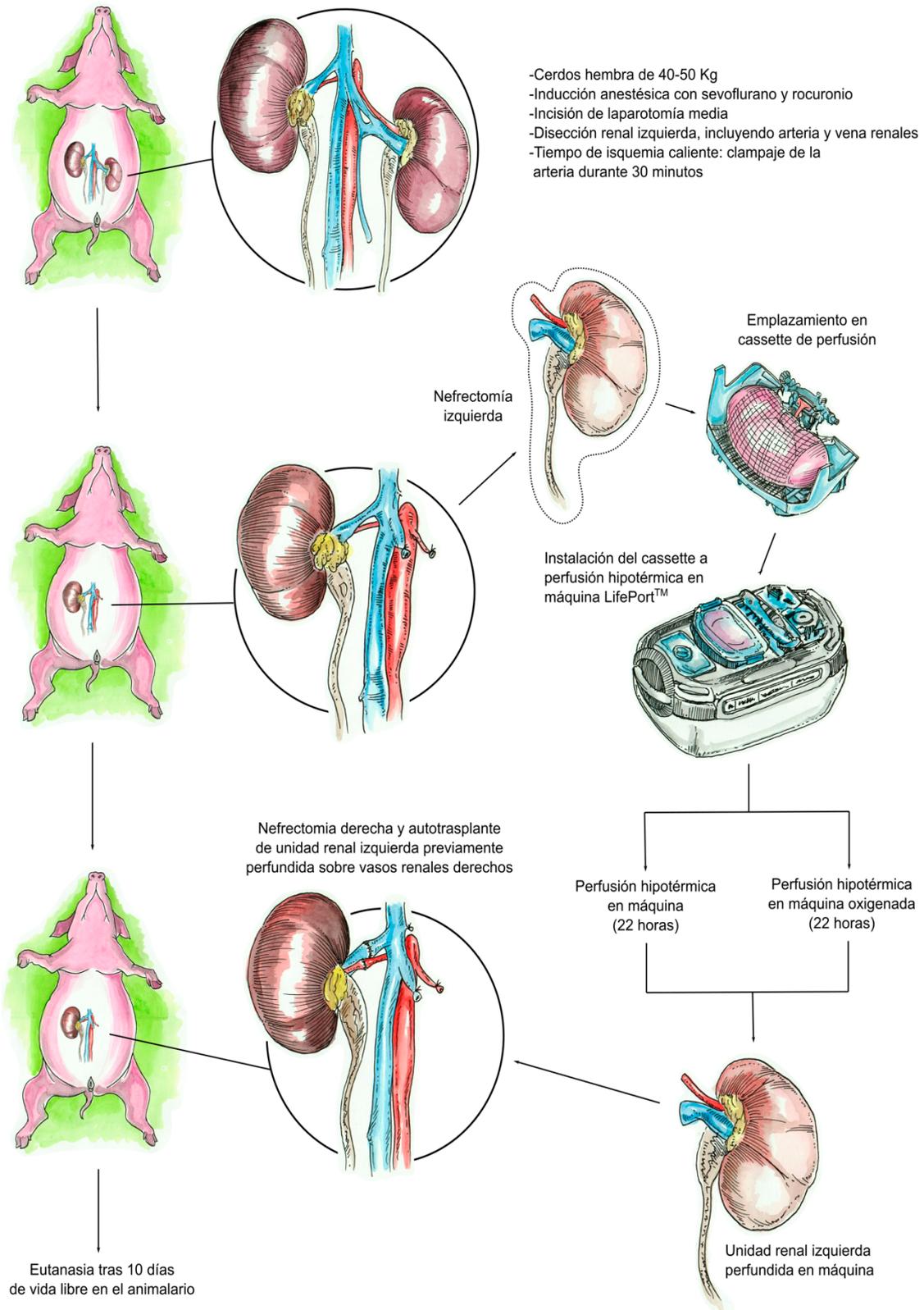


Figura 23: esquema resumen del diseño del estudio experimental.

MATERIAL Y MÉTODOS

En el día 1 se expone el retroperitoneo izquierdo a través de una laparotomía media. El riñón izquierdo se extrae tras clampaje de la arteria renal durante un total de 30 minutos (TIC). Inmediatamente se revisa su correcto estado en banco, se extraen las biopsias pre-perfusión y el órgano es lavado con *Celsior*® a 4°C (*Genzyme*®, Cambridge, MA, USA), solución utilizada en nuestro programa de trasplante clínico (Figura 24 y Figura 25).

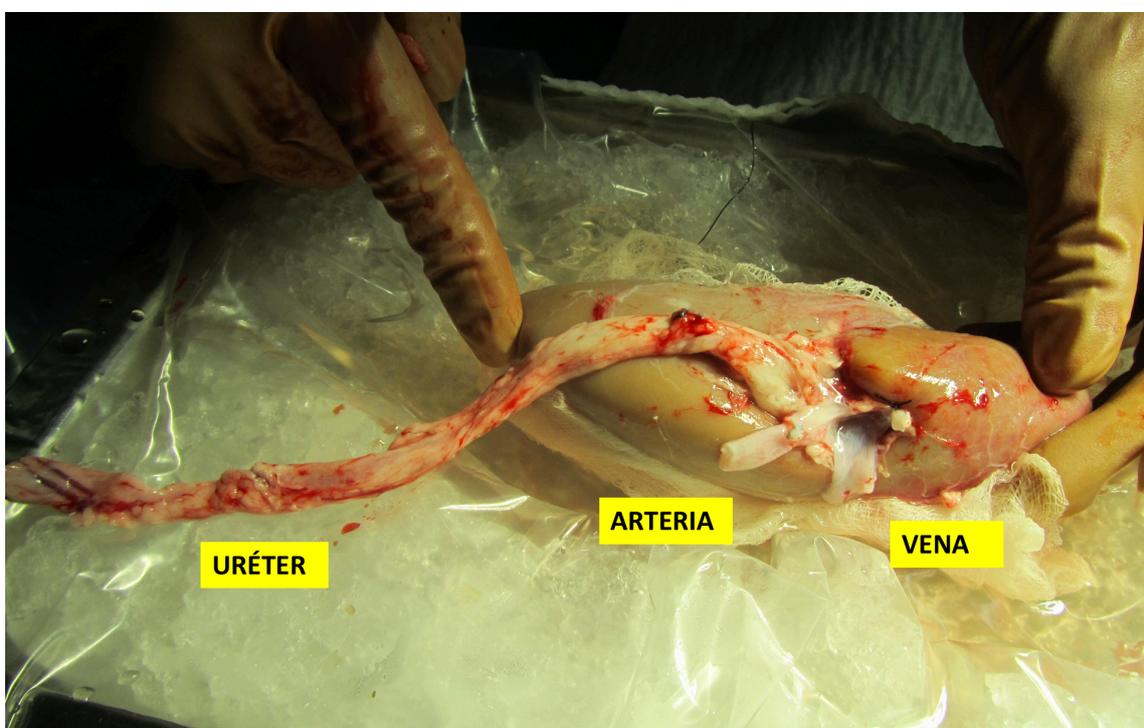


Figura 24: revisión en banco del riñón izquierdo inmediatamente después de su extracción, tras el tiempo de isquemia caliente (TIC) de 30 minutos.

MATERIAL Y MÉTODOS

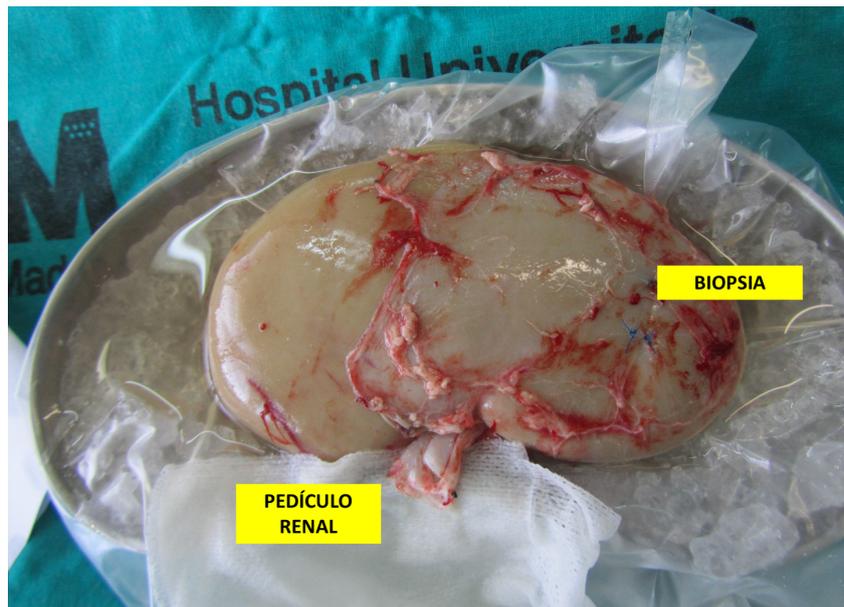


Figura 25: riñón izquierdo en el momento previo a su perfusión en máquina, una vez extraído y lavado en banco con Celsior, y con la biopsia pre-perfusión tomada en polo superior.

4.4.5. Perfusión en máquina y autotrasplante

La perfusión hipotérmica en máquina se realizó en el dispositivo *LifePort®* (*Organ Recovery Systems®, Itasca, IL, USA*) a una presión constante de 30 mmHg y con 1 litro de la solución de preservación *KPS-1* (*Organ Recovery Systems®, Itasca, IL, USA*), empleando la cánula arterial en T de 3mm para un correcto acoplamiento a la máquina (Figura 26).



Figura 26: cánula arterial en T de 3 mm (izquierda) y su conexión al injerto para perfusión (derecha).

MATERIAL Y MÉTODOS

En este punto del experimento cada injerto es perfundido acorde al grupo de aleatorización al que ha sido asignado: un grupo no oxigenado (PHM) y otro con oxigenación activa (PHMO). Ésta fue proporcionada inicialmente por O₂ al 100% a través de un oxigenador pediátrico de membrana de fibra hueca (*Dideco Kids D100®*, Sorin Group, USA) (Figura 27). Sin embargo, tras comprobar en los primeros 5 animales del grupo PHMO que la pO₂ alcanzada en la solución de perfusión era inconsistente y poco fiable, se sustituyó este oxigenador de membrana por uno de superficie mediante burbujeo (*bubble oxygenator*, Figura 27), con una FiO₂ del 95% durante 30 minutos de precarga de O₂ antes del inicio de la perfusión. En consecuencia, estos 5 animales fueron excluidos del análisis final.

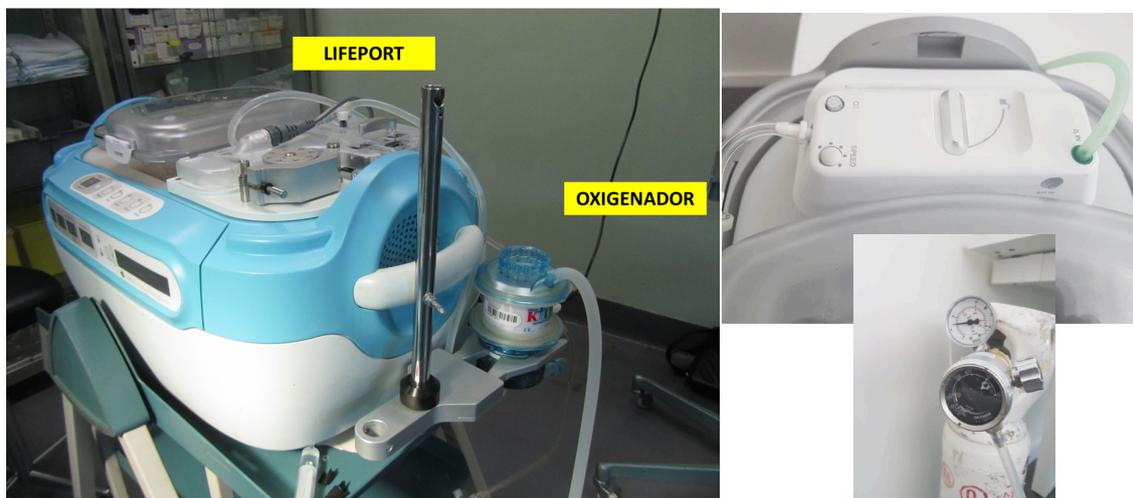


Figura 27: dispositivo LifePort conectado a oxigenador pediátrico de membrana (izquierda) y oxigenador de superficie mediante burbujeo (derecha).

MATERIAL Y MÉTODOS

Los parámetros de perfusión se registraron a los 1, 30, 60 minutos y en el momento final de la perfusión (22 horas). Se recogieron muestras del líquido de preservación en el punto basal, 1, 30, 60 y 120 minutos de perfusión y al final de ésta para la determinación de la gasometría, LDH, lactato y miRNA. Los riñones fueron conservados durante un total de 22 horas.

En el día 2, tras completarse la perfusión en máquina durante 22 horas, se tomaron del injerto izquierdo ya perfundido las segundas biopsias (post-perfusión). De forma paralela, en el campo quirúrgico del animal, se realizan sucesivamente la disección completa del riñón derecho y sus estructuras vasculares (Figura 28), se completa la nefrectomía derecha y finalmente se lleva a cabo el autotrasplante con el riñón izquierdo previamente preservado en máquina (Figura 29).

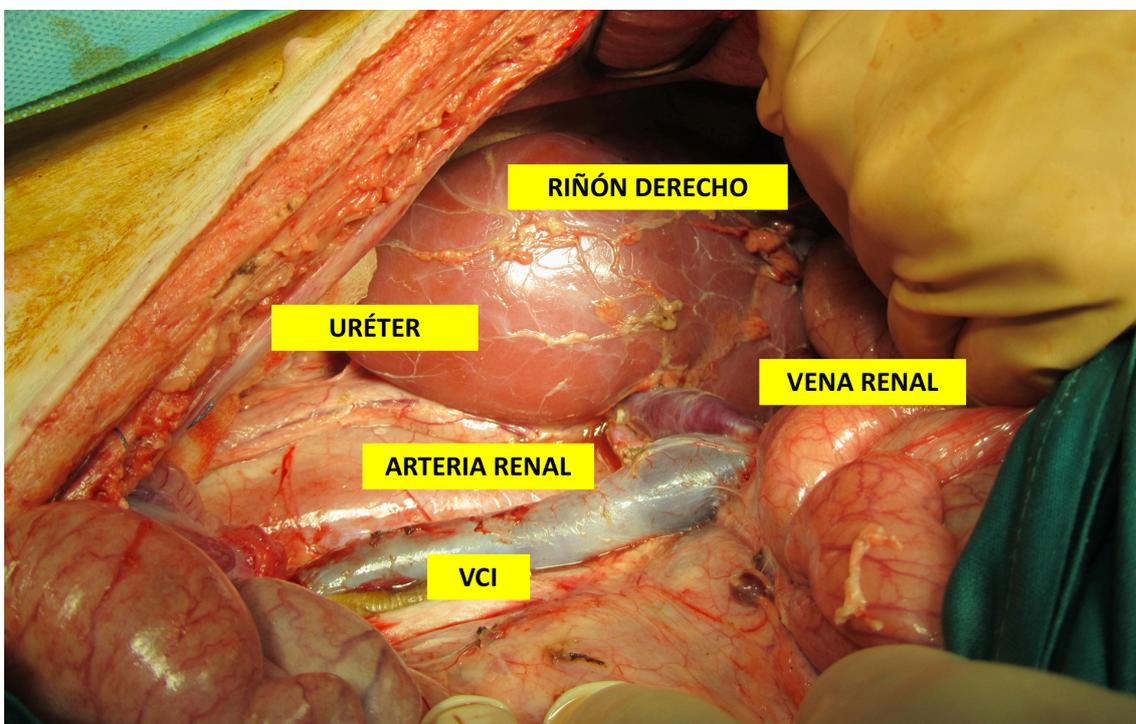


Figura 28: disección del riñón derecho previa a la nefrectomía. VCI: vena cava inferior.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizan anastomosis venosas termino-lateral (T-L) renal-cava o termino-terminal (T-T) renal-renal y arteriales termino-terminal (T-T) renal-renal, empleando sutura monofilamento no reabsorbible de *Prolene*® 7-0. Finalmente, la vía urinaria se reconstruye mediante ureteroureterostomía T-T intubada con catéter ureteral doble J de 6 Fr (Figura 29). Tras el despertar el animal fue trasladado al área de recuperación y estabulación, programándose su sacrificio al 10º día mediante inyección letal (tiopental sódico y cloruro potásico) seguida de la inmediata nefrectomía del injerto para análisis histológico y de peroxidación lipídica.

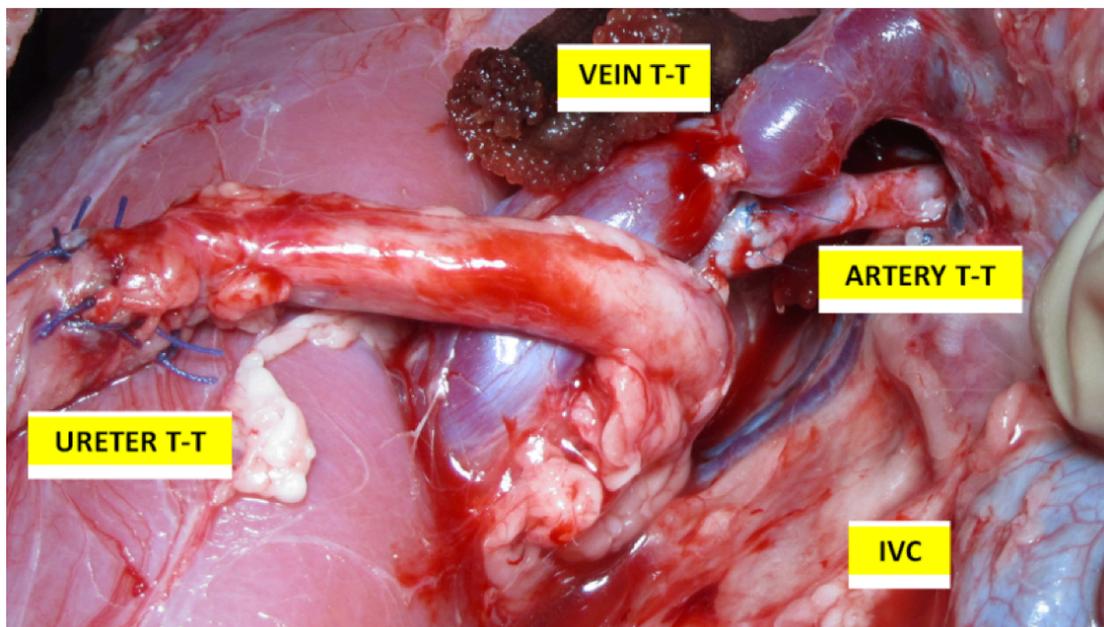


Figura 29: estado final tras el trasplante y la reperfusión. Anastomosis venosa T-T renal-renal, anastomosis arterial T-T renal-renal y anastomosis T-T uréter-uréter. IVC: vena cava inferior.

4.4.6. Cuantificación de miRNA

Antes de la extracción total de ARN, la solución de perfusión renal se centrifugó a 1000 g durante 5 min y a 4°C y después se almacenó a -80°C hasta su uso para análisis. El ARN total se extrajo de una muestra de 200 µl usando el kit *miRNeasy* (*Qiagen®*, *Hilden, Alemania*). Después de la extracción, se usaron 4 µl del ARN eluido como plantilla para la generación de ADNc por transcripción inversa utilizando el sistema *miRNA Universal RT* (*Exiqon®*, *Vedbaek, Dinamarca*). El ADNc se diluyó 1/11 con agua estéril libre de nucleasas y se usaron 4 µl como molde para la reacción de PCR, empleando *SYBR Green* y sondas específicas comercialmente disponibles (*Exiqon®*) para cada miRNA de interés. La PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) se realizó utilizando el sistema *Light Cycler 480* (*Roche®*, *Basilea, Suiza*) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El *UniSP2* exógeno añadido antes de la extracción del ARN se utilizó como miRNA técnico de mantenimiento. Todas las reacciones se llevaron a cabo por triplicado y la expresión de miRNA se expresó como inducción de pliegues, calculada mediante la fórmula $2^{\Delta\Delta CT} = (\text{prueba de miRNA} - \text{miRNA de control endógeno}) - (\text{miRNA basal} - \text{miRNA de control endógeno})$.

4.4.7. Evaluación bioquímica

Después del TR se tomaron muestras seriadas de sangre del animal. La urea y la creatinina se midieron periódicamente a través del catéter yugular desde el primer día postoperatorio hasta el último día de supervivencia del animal (Figura 30), mediante un ensayo de colorimetría (*Architect Analyzer*

MATERIAL Y MÉTODOS

c16000, Abbott Diagnostics®) y expresadas como valores de mediana (IQA) en mg/dl.

En cuanto a la solución de perfusión, la LDH fue estimada por ensayo de colorimetría en el analizador *Architect c16000 (Abbott Diagnostics®)* y el lactato medido por medio de un electrodo selectivo en un analizador *Werfen GEM4000®*.



Figura 30: postoperatorio del animal en curso, con acceso libre a alimentación (izquierda). Extracción seriada de analíticas a través del catéter venoso central (derecha).

4.4.8. Marcadores de estrés oxidativo. Peroxidación lipídica

La peroxidación lipídica se determinó mediante la detección de malondialdehído (MDA), producto resultante del ataque oxidativo sobre lípidos insaturados (158, 159), mediante la detección colorimétrica del producto de

MATERIAL Y MÉTODOS

reacción del MDA con el ácido tiobarbitúrico (TBA) según el procedimiento descrito en el kit comercial (*TBARS Assay Kit 10009055, Cayman Chemical®*).

Las muestras de corteza renal (sobre 30 mg) se lavaron con PBS frío y se transfirieron a homogeneizador vidrio-vidrio de tipo Dounce. Se añadieron 300 μL de tampón de lisis RIPA (Tris-HCl 50 mM pH 7.4, KCl 125 mM, β -glicerofosfato 5 mM, EDTA 1 mM, antipaína 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, leupeptina 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1% Tritón X-100, 0.5% deoxicolato sódico, 0.1% SDS), y se llevó a cabo la lisis del tejido hasta obtener una suspensión homogénea. Los lisados se centrifugaron a 1600 g durante 10 minutos a 4°C y 100 μL del sobrenadante obtenido se transfirieron a un vial de vidrio sobre el que se añadieron 100 μL de SDS y 4.0 mL de la disolución de TBA (5.3 mg/mL en mezcla 1:1 (v/v) ácido acético 20%/hidróxido sódico). La mezcla de reacción se agitó con vórtex y se incubó a 95°C durante 1 h. Transcurrido el tiempo de incubación, los viales se colocaron en hielo hasta alcanzar temperatura ambiente y su contenido fue transferido a tubos de centrifuga, donde se añadieron 2.0 mL de *n*-butanol y 0.8 mL de cloruro sódico 5 M (proporción final 5.25:2.5:1 muestra/*n*-butanol/cloruro sódico 5 M), y se agitó vigorosamente con vórtex durante 30 segundos. Posteriormente, los tubos se centrifugaron a 2200 g durante 5 min, y se tomó una alícuota (1.0 mL) de la fase orgánica (superior) en tubos de microcentrifuga para la evaporación del disolvente a presión reducida. El aducto MDA-TBA sólido obtenido se disolvió en 200 μL de agua destilada, que se pasaron a una placa p96 para la lectura de su absorbancia (540 nm). Los niveles de MDA de las muestras se determinaron por interpolación en la recta de calibrado obtenida con el patrón de MDA suministrado (en nmol) y respecto a la cantidad de tejido utilizada (en mg).

4.4.9. Respiración mitocondrial

Las células del túbulo proximal de las biopsias renales se obtuvieron y mantuvieron según la técnica habitual del grupo investigador (160). La evaluación de la función mitocondrial se realizó mediante *SeaHorse XF Cell Mito Stress Kit (Agilent®)*, una solución optimizada para ello. Se colocaron 10.000 células por pocillo en las microplacas de cultivo celular *SeaHorse XF* utilizando un medio de cultivo completo (*medio F12/DMEM, 10%FBS, 1%PSG, 1% ITS*) que permitió el crecimiento durante 48 horas. 24 horas antes de la medición, el cartucho del respirador *SeaHorse XF®* se hidrató añadiendo 200 μ L de calibrador XF a cada pocillo, seguido de una incubación nocturna a 37°C. Para la medición, el medio completo en la microplaca de cultivo celular fue sustituido por el medio celular *SeaHorse* (*medio DMEM, 0,5 mM de piruvato, 2,5 mM de glutamina y 17,5 mM de glucosa, pH 7,4*) y se colocó en una incubadora sin CO₂ a 37°C durante 45-60 minutos antes del ensayo. Mientras tanto, las soluciones madre compuestas (*100 μ M de oligomicina, 100 μ M de FCCP y 50 μ M de rotenona/antimicina A*) se prepararon según las instrucciones del fabricante y se cargaron en los puertos de inyección de los sensores de los cartuchos. La tasa de consumo de O₂ de las células fue supervisada por el analizador de flujo extracelular *SeaHorse XF® (SeaHorse Bioscience)* y los datos fueron calculados automáticamente por el *SeaHorse XF Mito Stress Test Report Generator®* usando el *Wave software* (Figura 31).

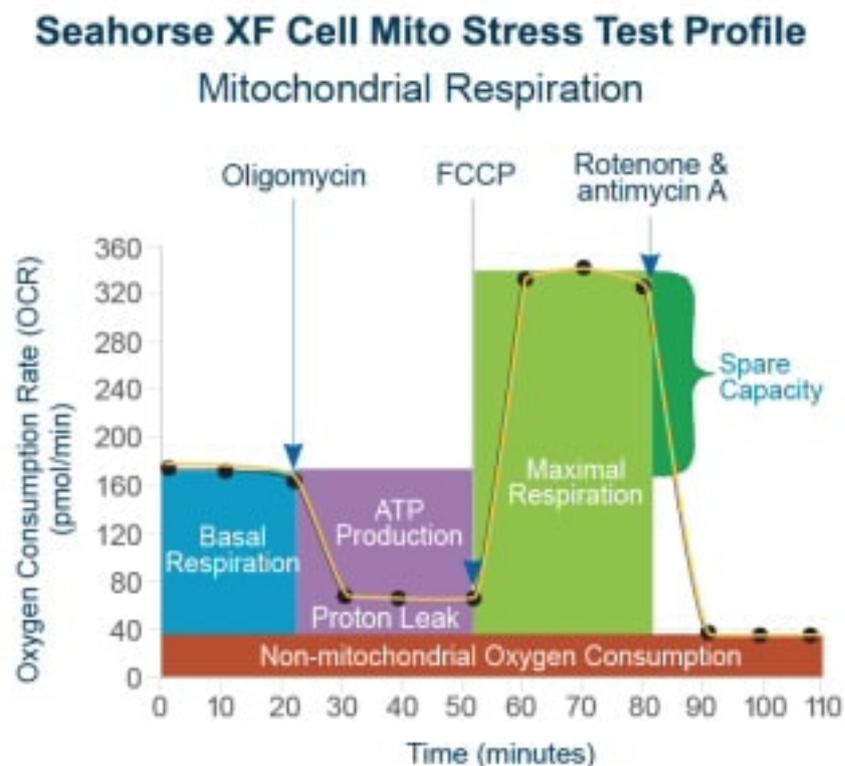


Figura 31: Perfil de la prueba SeaHorse XF Cell Mito Stress, reproducido de la web del fabricante (www.agilent.com)

Esta prueba permite estimar directamente la tasa de consumo de oxígeno (*oxygen consumption rate, OCR*), como método estándar e integral para evaluar los parámetros clave de la función mitocondrial: respiración basal, respiración ligada al ATP, pérdida de H⁺ (protón), respiración máxima, capacidad respiratoria residual y respiración no mitocondrial. Para ello se utiliza la adición al cultivo de oligomicina, FCCP y una mezcla de rotenona y antimicina A (Figura 31).

4.4.10. Expresión de genes de oxidación y transición epitelio-mesenquimal (TEM)

Las células se lisaron en 1 ml de *Tri-Reagente (Ambion)*. El ARN total se extrajo y cuantificó utilizando *Nanodrop 2000 (Thermo Scientific®)*. El ADNc se

MATERIAL Y MÉTODOS

obtuvo de 2 µg de ARN total de cada muestra utilizando el kit de síntesis de primera cadena del transcriptor (Roche®). 1 µl de la muestra de ADNc se utilizó como plantilla para la PCR con el *LightCycler 480 Sybr Green I Master* (Roche®), utilizando cebadores específicos (Tabla 2) y siguiendo las instrucciones del fabricante. La PCR se llevó a cabo también en el equipo *LightCycler 480 Sybr Green I Master* (Roche®). Para cada muestra y experimento, se realizaron triplicados y se normalizaron por niveles de ARNm de 28S.

GEN	CEBADOR	SECUENCIA 5'-3'
28S	Forward	CAGTACGAATACAGACCG
	Reverse	GGCAACAACACATCATCAG
Cadherina-E	Forward	ACAGACCCAGTAACCAATG
	Reverse	CTGAGCAGGGATGAAGAT
Colágeno	Forward	GAAGAAGACATCCCACCAGTCA
	Reverse	CAGATCACGTCATCGCACAA
Fibronectina	Forward	GAAAGAAATCAACCTTGCTCCTG
	Reverse	GTCTGCTTGTCAAAGTGTCCT
Vimentina	Forward	CCTTGACATTGAGATTGCCA
	Reverse	AGTGAATCCAGATTAGTTTCCC
SOD1	Forward	AAGATTCTGTGATCGCCCTC
	Reverse	CAAACGACTTCCAGCATTTC
SOD2	Forward	ATTGCCGCTTGTTCTAACCA
	Reverse	CAAATAGCTTTCAGGTAATCAGGT
Catalasa	Forward	GTTTCCTTCTGTTTCAGCGA
	Reverse	GCCTCTCCCTTCTCATTAACC

Tabla 2: cebadores específicos para la PCR de los genes de oxidación y transición epitelio-mesenquimal (TEM). SOD: superóxido dismutasa.

4.4.11. Análisis histológico. Microscopía de luz

Las biopsias de los riñones se tomaron en el momento previo y posterior a la perfusión en máquina, además del análisis completo del injerto trasplantado en el momento del sacrificio del animal. Su procesamiento incluyó la fijación en

MATERIAL Y MÉTODOS

formalina tamponada al 4%, deshidratación y posterior inclusión en parafina. Los portaobjetos se cortaron a 4 μm usando un microtomo y se tiñeron con hematoxilina-eosina (H-E) para la evaluación con microscopio de luz. Un patólogo altamente experimentado en histopatología renal y cegado para los diferentes grupos examinó todas las biopsias renales. Se evaluaron 3 parámetros morfológicos que indican lesión del parénquima renal por orden ascendente de gravedad: infiltrado inflamatorio agudo (IIA), necrosis tubular aguda (NTA) y necrosis isquémica (NI). A éstos se les aplicó una escala de cuatro puntos para cada parámetro:

- 0 = *sin daño;*
- 1 (*leve*) = *lesiones que afectan < 25% del campo óptico*
- 2 (*moderada*) = *daño del 25%-50% del campo óptico*
- 3 (*severa*) = *lesiones que afectan > 50% del campo óptico.*

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. Características basales

El modelo experimental se llevó a cabo en un total de 24 animales. Tras la exclusión de los 5 primeros casos del grupo PHMO debido a la oxigenación inconsistente que proporcionaba el oxigenador pediátrico, un total de 19 animales fueron válidos para su inclusión en el análisis de bioquímico, de miRNA y peroxidación lipídica. La aleatorización distribuyó 7 animales al grupo oxigenado (PHMO) y 12 al grupo sin oxigenar (PHM). Sólo 15 animales pudieron ser finalmente trasplantados y sus datos de función renal y supervivencia analizados, tal y como refleja el diagrama de flujo de la Figura 32.

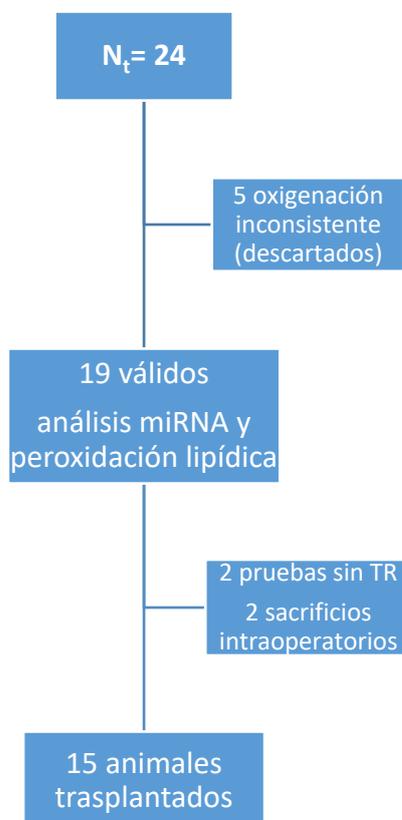


Figura 32: diagrama de flujo de los animales incluidos en el modelo experimental. TR: trasplante renal

RESULTADOS

5.1.1. Edad

La mediana de edad, representada la Tabla 3, correspondió a 4,5 meses para ambos grupos, sin diferencias estadísticamente significativas ($p=0,650$).

	Mediana (meses)	Rango
PHM	4,5	2
PHMO	4,0	2
p (U-Mann-Whitney)	nS (0,650)	

Tabla 3: mediana de edad de los dos grupos (PHM y PHMO).

5.1.2. Peso de los animales

La mediana de peso fue de 47,0 Kg y 52,0 Kg en los grupos PHM y PHMO respectivamente (Tabla 4), sin diferencias estadísticamente significativas entre ambos ($p=0,227$).

	Mediana (Kg)	Rango
PHM	47,0	20
PHMO	52,0	8
p (U-Mann-Whitney)	nS (0,227)	

Tabla 4: mediana de peso de los dos grupos (PHM y PHMO).

5.1.3. Supervivencia de los animales

La mediana de supervivencia (Tabla 5 y Figura 33) en ambos grupos fue de 5,0 (PHM) y 6,0 (PHMO), sin obtener significación estadística (Log Rank $p=0,359$).

	Mediana (días)	IC 95%
PHM	5,0	1,8-8,2
PHMO	6,0	5,0-10,0

Tabla 5: mediana de supervivencia de los animales en los dos grupos (PHM y PHMO).

RESULTADOS

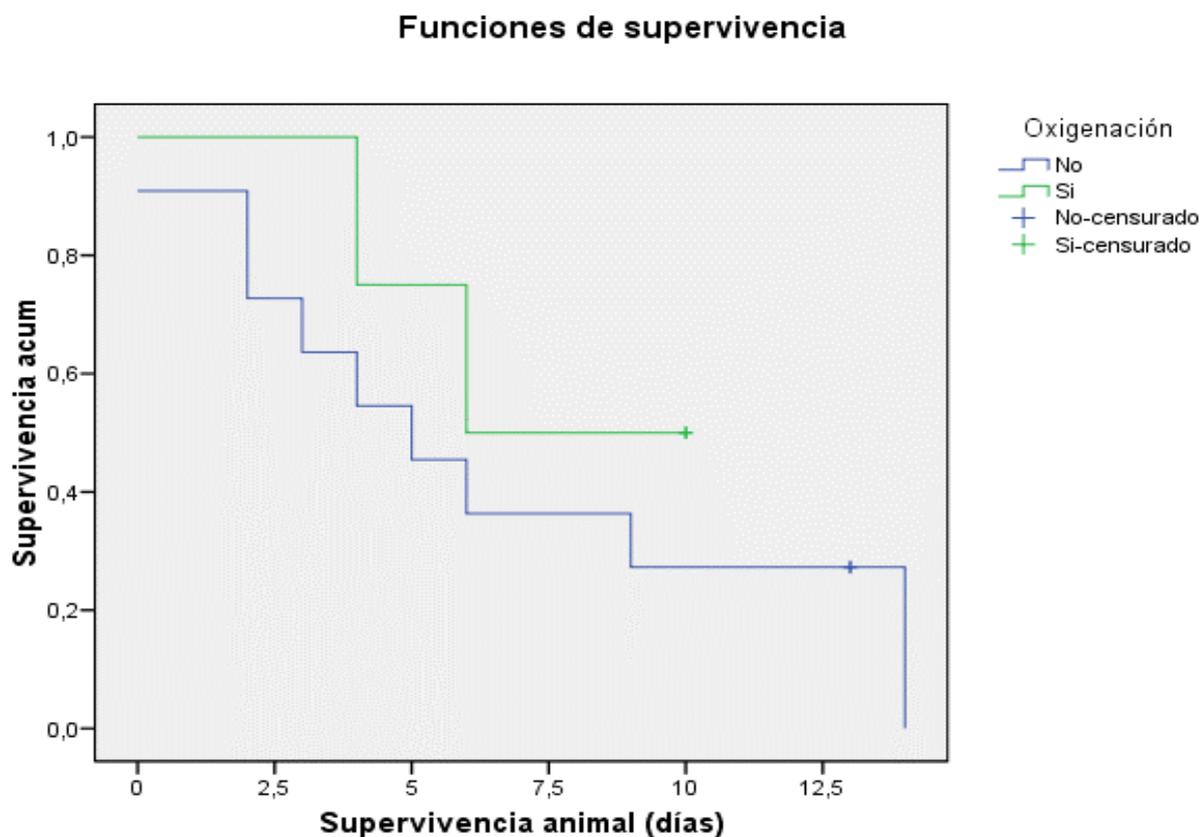


Figura 33: curvas Kaplan-Meier de supervivencia de los animales de ambos grupos (PHM en azul y PHMO en verde)

5.1.4. Determinaciones analíticas basales

No se identificaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos en la función renal basal (Tabla 6).

	Mediana	Percentiles			p
		25	50	75	
Cr (mg/dl)					
PHM	0,920	0,805	0,920	1,200	0,250
PHMO	1,065	0,010	1,065	1,240	

p (U-Mann-Whitney)

Tabla 6: mediana y percentiles de creatinina sérica basal en ambos grupos.

RESULTADOS

5.1.5. Determinaciones analíticas post nefrectomía izquierda

Tampoco se identificaron diferencias en los valores analíticos post-nefrectomía entre ambos grupos experimentales, con una mediana de Cr 1,8 mg/dl en ambos grupos (Tabla 7).

	Mediana	Percentiles			p
		25	50	75	
Cr (mg/dl)					
PHM	1,8	1,5	1,8	2,0	0,684
PHMO	1,8	1,6	1,8	2,0	

Test U de Mann-Whitney

Tabla 7: mediana y percentiles de creatinina sérica post nefrectomía izquierda en ambos grupos.

Se observó un incremento de las cifras medianas de creatinina en ambos grupos, que sólo alcanzó la significación estadística en el grupo PHM (Tabla 8).

	Diferencia de medianas Cr (mg/dl)	p
PHM	0,75	0,002
PHMO	0,69	0,068

Test Wilcoxon

Tabla 8: diferencia de medianas de creatinina sérica pre y post nefrectomía izquierda en ambos grupos.

5.2. Los niveles de oxígeno

Los riñones obtenidos fueron perfundidos por 3 métodos diferentes. En el grupo PHM mediante *LifePort*® estándar que no proporciona oxigenación, su media de pO_2 varió desde 162,9 mmHg (SD 33,5) en el momento basal hasta 92,9 mmHg (SD 18,5) al final de la perfusión (Figura 34A). Por otra parte, el grupo PHMO fue perfundido en los primeros casos utilizando un circuito *LifePort*® modificado que proporcionaba la oxigenación mediante un oxigenador pediátrico de membrana, el cual lo hacía de forma errática e inconsistente (Figura 34B y Figura 35), lo que llevó a su sustitución por el oxigenador de burbuja (Figura 34C) integrado en el circuito de perfusión *LifePort*®.

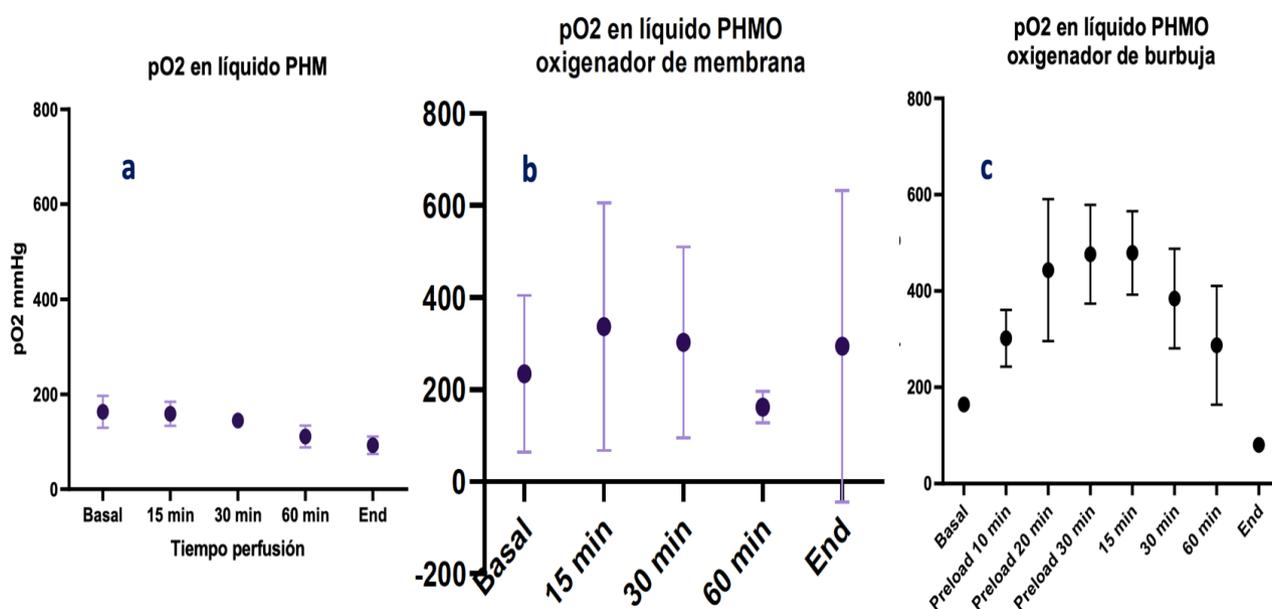


Figura 34: evolución de la pO_2 durante la preservación en máquina. A: descenso lento de la pO_2 en el grupo PHM. B: oxigenador pediátrico de membrana con niveles inconsistentes en los 5 primeros animales. C: incremento inicial de la pO_2 durante los 30 min de precarga y paulatino descenso en el grupo PHMO con oxigenador de burbuja.

RESULTADOS

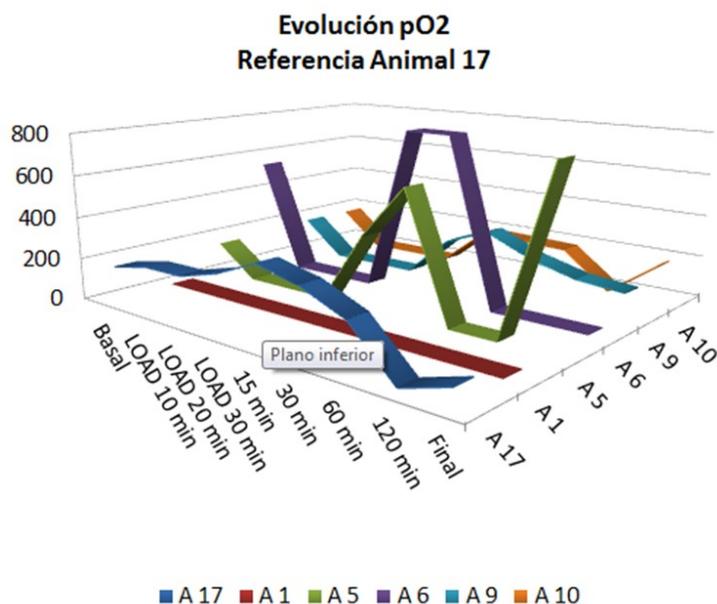


Figura 35: la figura muestra la variabilidad en la pO₂ durante la PHMO de los riñones en la primera fase del trabajo experimental (animales 1-12). Se comparan sus resultados individuales con los del animal 17, en el que se llevó a cabo la oxigenación mediante el empleo del oxigenador de burbuja integrado en el circuito de perfusión.

Una vez descartados del análisis los casos del oxigenador pediátrico de membrana, la media de pO₂ del grupo PHMO (n = 4) siguió la curva de evolución que se muestra en la Figura 34C y sus resultados desglosados por animales en la Figura 36. Esta media de pO₂ en el grupo PHMO pasó de 164,4 mmHg (SD 13,9) basal a 80,7 mmHg (SD 11,3), similar a los valores del grupo PHM. El valor de pO₂ más alto se alcanzó tras los 30 min de precarga (476,3 mmHg, SD 102,6) y sólo se mantuvo pasados 15 min (479,2 mmHg, SD 86,4), para descender progresivamente durante el periodo de perfusión.

RESULTADOS

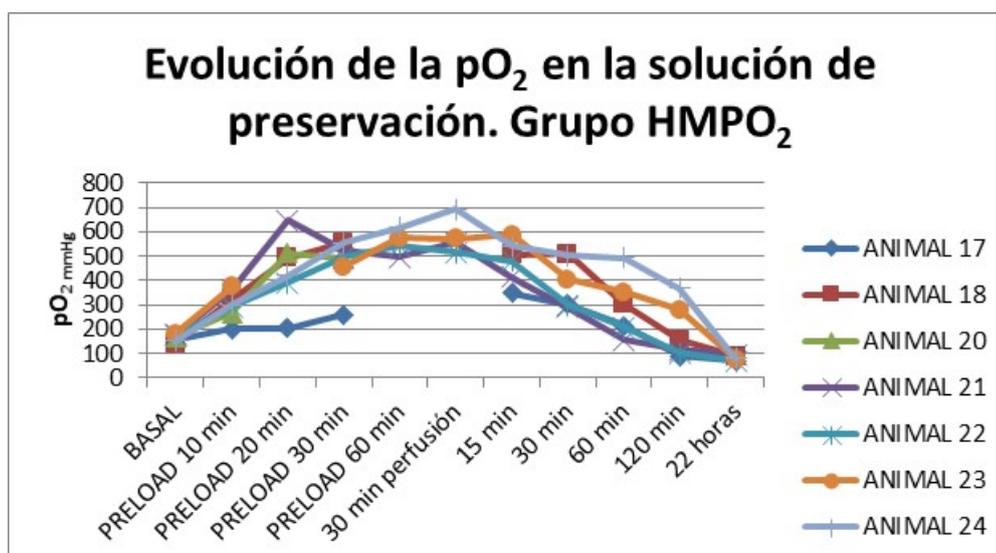


Figura 36: evolución temporal de la pO₂ de los animales asignados al grupo PHMO, una vez descartados los primeros 5 animales perfundidos con el oxigenador de membrana.

La precarga de O₂ con el oxigenador de burbuja no fue capaz de mantener niveles suprafisiológicos de pO₂ hasta el final de la perfusión en el grupo PHMO, aunque fue del doble a las 2 horas de iniciarse la perfusión.

5.3. Parámetros de perfusión en máquina

Como es habitual, se observó un incremento del flujo a lo largo de la perfusión que en ambos grupos fue estadísticamente significativa (

Tabla 9). Los dos grupos PHMO y PHM mostraron patrones de FP similares, comenzando con un marcado aumento en los primeros 30 minutos, seguidos de un aumento lento hasta el final de la perfusión (Figura 37a), sin presentar diferencias estadísticamente significativas entre ambos.

RESULTADOS

	Flujo (ml/min)		
	1 min	Final	p
PHMO	21 (24)	41 (26)	0,042
PHM	29 (18)	51,5 (20)	0,003
p	0,506	0,104	

*p < 0,05

Tabla 9: parámetros de flujo (FP) en la máquina de perfusión en ambos grupos PHM y PHMO.

Los patrones del IR presentaron un paulatino descenso a lo largo de la perfusión en máquina (Tabla 10), ofreciendo una morfología de las curvas análoga a la del FP (Figura 37b).

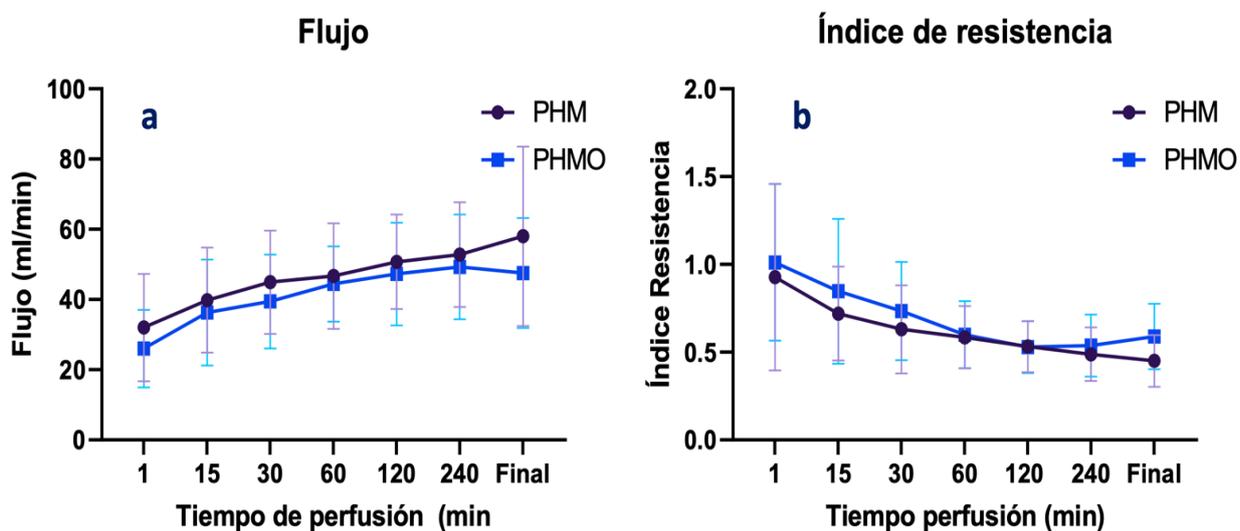


Figura 37: parámetros de perfusión en máquina de sendos grupos PHMO y PHM, flujo (a) y resistencia (b).

RESULTADOS

	IR		
	1 min	Final	p
PHMO	1,32 (0,84)	0,5 (0,1)	0,080
PHM	0,91 (0,46)	0,6 (0,2)	0,005
p	0,442	0,130	

*p < 0,05

Tabla 10: parámetros de resistencia (IR) en la máquina en ambos grupos PHM y PHMO.

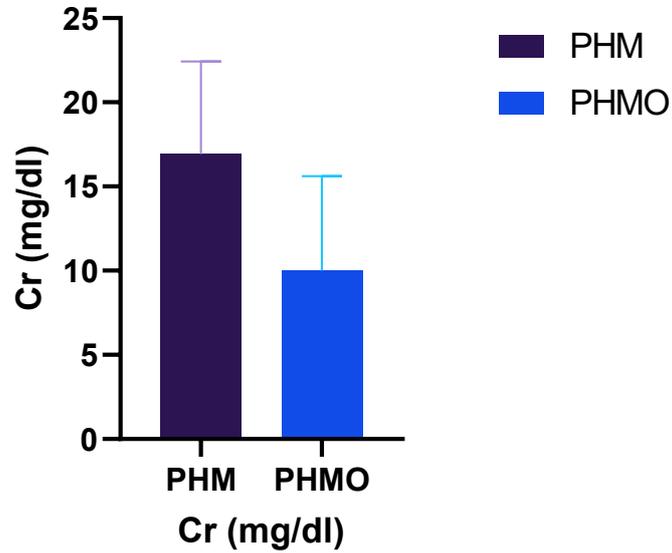
5.4. Parámetros bioquímicos séricos

5.4.1. Función renal: creatinina

La nefrectomía derecha previa al trasplante permite el uso de los niveles de creatinina sérica post-TR para evaluar la función del injerto perfundido en máquina. Se observó una tendencia hacia una mejor función renal del grupo oxigenado expresada por la creatinina sérica en el día 3 post-TR: 12,5 (3,6-13,9) del grupo PHMO vs 16,5 mg/dl (11,3-23,5) del grupo PHM (p=0,400), sin diferencias estadísticamente significativas. Estos valores y evolución de la creatinina pueden verse en la Figura 38, y sus áreas bajo la curva (AUC) fueron 74,0 (IC 95% 47,5-100,5) para PHM y 36,2 (IC 95%, 25,6-46,8) para PHMO.

RESULTADOS

Creatinina día 3



Evolución Creatinina

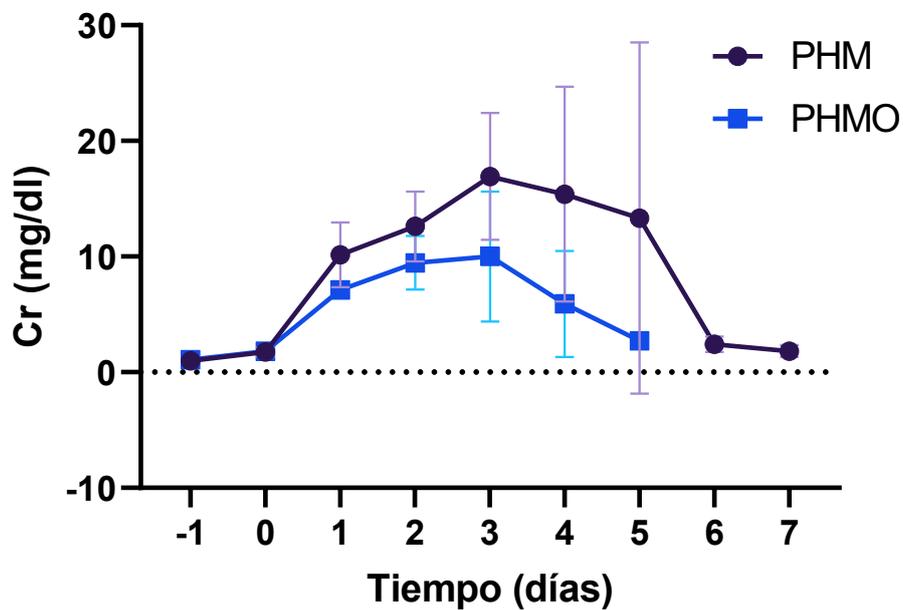
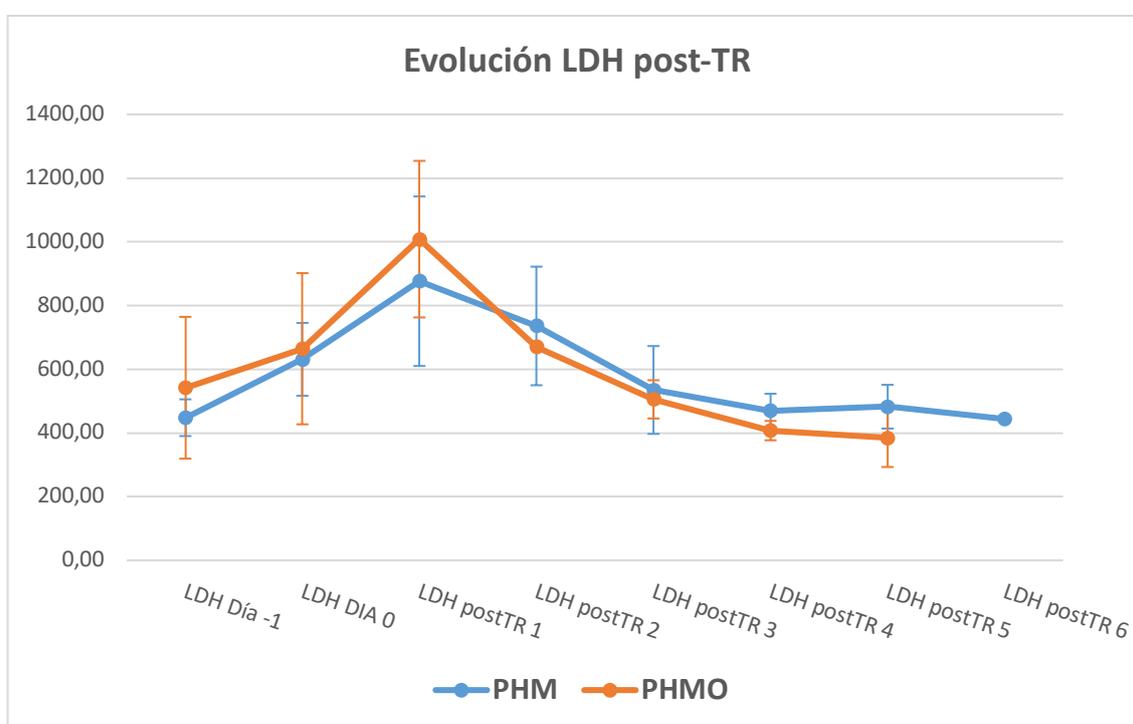


Figura 38: arriba, niveles de creatinina sérica al día 3 postrasplante según los grupos, sin diferencias estadísticamente significativas ($p=0,4$). Abajo, evolución de la creatinina sérica de los animales (PHMO vs PHM) en la primera semana post trasplante.

RESULTADOS

5.4.2. LDH sérica

Los valores de LDH en suero se pueden considerar un buen marcador de isquemia renal post-TR y por lo tanto un adecuado indicador de la causa de disfunción inicial del injerto (NTA vs nefropatía isquémica). No se evidenciaron diferencias significativas en los valores séricos de LDH entre ambos grupos, salvo en el día +1, donde el grupo PHMO presentó un valor superior (1008,5 vs. 876,5 UI/L) que no alcanzó la significación estadística (Figura 39).



PHM	5	5	4	4	3	3	2	1
PHMO	4	4	4	1	2	2	2	0

Figura 39: niveles de LDH sérica (UI/L) post-trasplante en ambos grupos PHM y PHMO.

5.5. Parámetros bioquímicos en solución de preservación

5.5.1. Composición iónica

Por protocolo, la solución de preservación utilizada fue KPS-1 (ORS®, Itaca, IL, USA), una modificación de UW adaptada para la máquina. La

Tabla 11 refleja la composición basal de ambas soluciones.

Componentes	KPS-1	SPS-1 (UW)
Na (mmol/l)	100	30
K (mmol/l)	25	120
Coloides	HES	HES
Agentes osmóticos	Gluconato Manitol	Lactobionato Rafinosa
Tampón	Fosfato	Fosfato
Antioxidantes	Alopurinol	Dexametasona Alopurinol
Precusores ATP	Adenosina Glutation	Adenosina Glutation
Viscosidad (cP)	2,5	5,7

Tabla 11: composición de las soluciones de preservación KPS-1 y SPS-1 o solución de la Universidad de Wisconsin (UW). HES: hidroxietil almidón.

RESULTADOS

A lo largo de la perfusión se observa en la solución de preservación una discreta disminución de Na^+ y un aumento del K^+ , sin ser estas diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (

Tabla 12).

RESULTADOS

	Basal	15 min	30 min	60 min	Final
Na⁺ (mEq/l)					
PHM	108,5	108,0	107,0	106,5	105,0
PHMO	113,0	110,0	110,0	110,0	106,5
<i>p</i>	0,800	0,800	0,800	0,800	1,000
K⁺ (mEq/l)					
PHM	25,2	26,5	27,1	27,3	29,7
PHMO	25,5	27,6	27,6	27,6	28,8
<i>p</i>	0,800	1,000	1,000	1,000	1,000

Tabla 12: evolución temporal de las concentraciones de sodio (Na⁺) y potasio (K⁺) en el líquido de perfusión durante la preservación en máquina.

5.5.2. Lesión celular. LDH y lactato

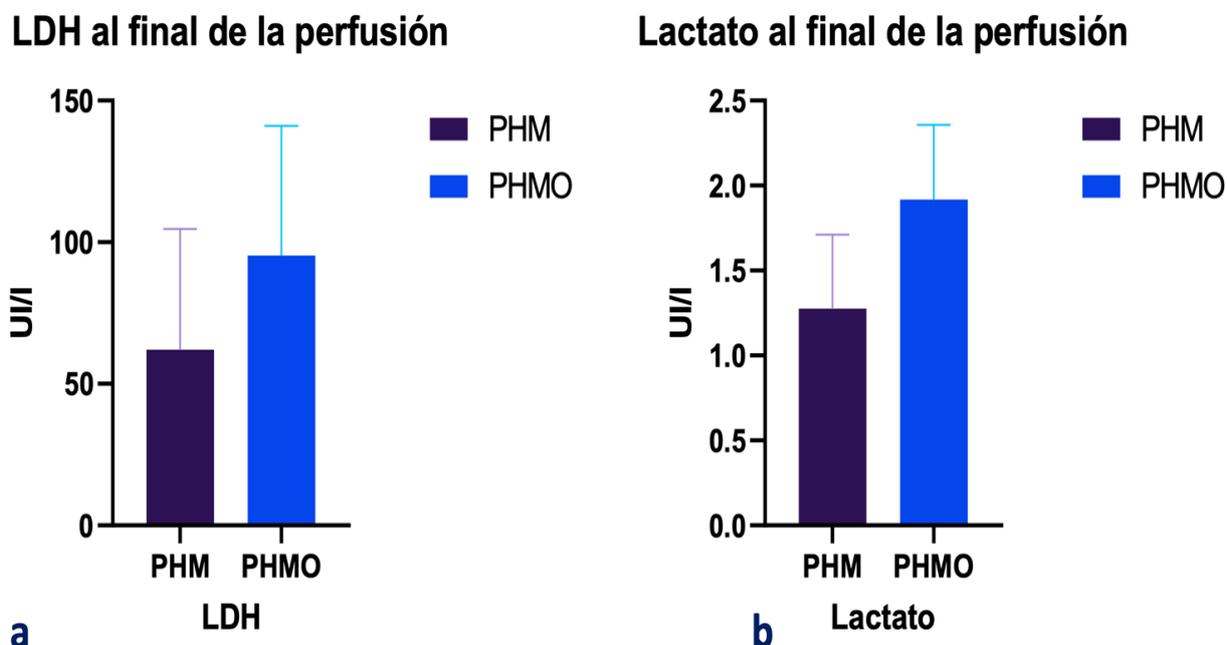
Los niveles de LDH en el líquido al final de la perfusión fueron superiores para el grupo PHMO, aunque estas diferencias no alcanzaron significación estadística (

Figura 40).

Por el contrario, las concentraciones de lactato en la solución de preservación fueron más altas y estadísticamente significativas en el grupo PHMO ($p=0,026$), en relación con un mayor estrés oxidativo y peroxidación lipídica (

Figura 40).

RESULTADOS



PHM	12	12	5	5	11
PHMO	7	6	6	6	6

Figura 40: niveles de LDH (a) y lactato (b) al final de la perfusión en máquina para sendos grupos.

5.6. miRNA en la solución de perfusión

Se probó una combinación de miRNA con alto valor diagnóstico en el daño renal agudo isquémico y que comprendía: miR-210, miR-126, miR-127, miR146, miR-10a, miR-101 miR-93, miR-27a, miR-26b y miR-29a. La expresión de la mayoría de los miRNA fue mayor en presencia de oxígeno (grupo PHMO), aunque las diferencias sólo alcanzaron significación estadística para miRNA-126 y miRNA-101 al final de la perfusión (Figura 41).

RESULTADOS

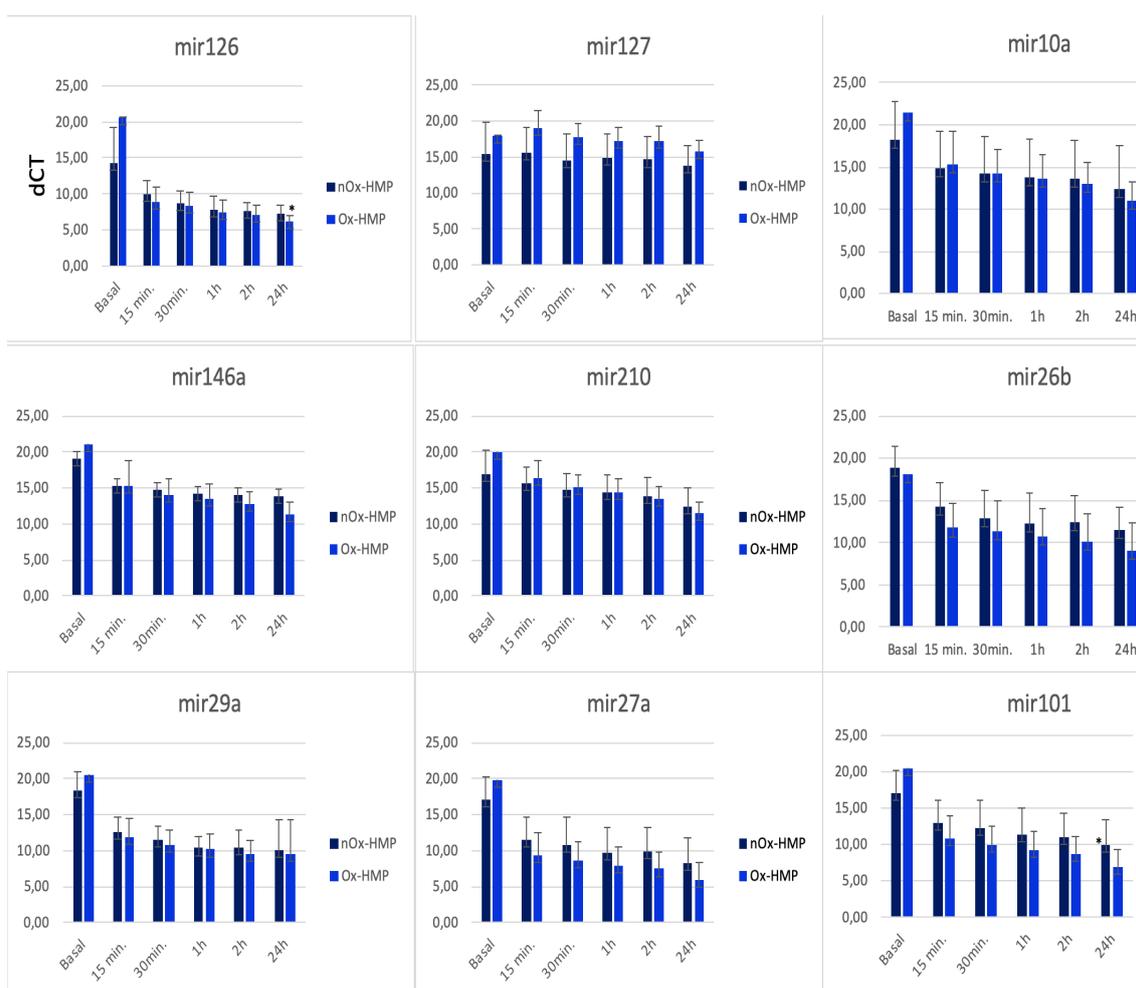


Figura 41: niveles de miRNA en la solución de preservación durante el período de perfusión en máquina ($p \leq 0.05$). Barras azul oscuro grupo PHM (nOx-HMP) y barras azul claro grupo PHMO (Ox-HMP)

5.7. Peroxidación lipídica: marcador de estrés oxidativo

Se definieron cuatro grupos de estudio de la peroxidación lipídica, de los que se tomaron biopsias en distintos momentos del experimento:

- **Grupo control:** biopsias del riñón contralateral sano (derecho) en el momento de la nefrectomía que precedía al autotrasplante.
- **Isquemia:** obtenidas del riñón izquierdo inmediatamente después del TIC de 30 minutos, que se consideraron como muestras

RESULTADOS

basales para los ensayos de respiración mitocondrial y expresión génica de transición epitelio-mesenquimal (TEM).

- **Post perfusión:** del riñón izquierdo después de la preservación en máquina (PHMO vs PHM) y antes de ser trasplantado.
- **Post-trasplante:** tomadas del riñón trasplantado en el momento del sacrificio del animal.

La

Figura 42 muestra el contenido de MDA (mmol/mg de proteína) en los diferentes momentos temporales previamente definidos. Después de los 30 minutos del TIC que definen el modelo experimental de DAC, se observan niveles significativamente mayores de peroxidación lipídica. En el grupo PHM se produce una disminución de estos niveles de peroxidación lipídica, que llegan incluso a asemejarse a los del grupo control. Sin embargo, los niveles de MDA aumentan significativamente en el grupo PHMO, fruto de un mayor estrés oxidativo y su consiguiente peroxidación lipídica, y siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

RESULTADOS

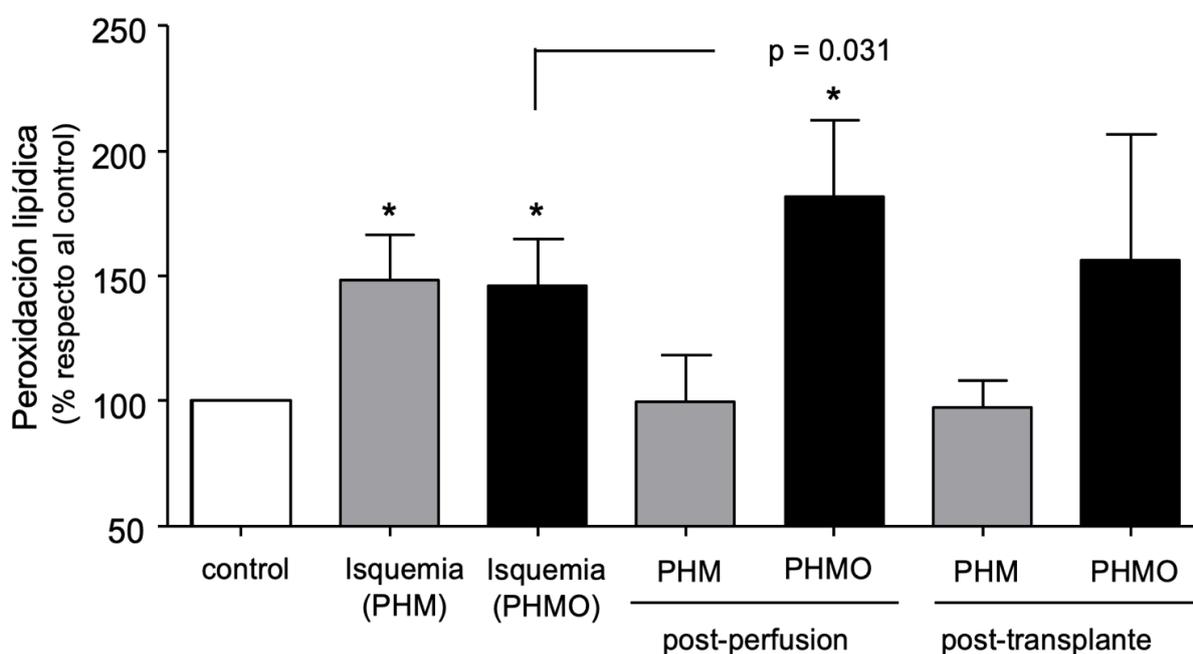


Figura 42: cantidad de MDA (mmol/mg proteína) en las diferentes biopsias de los injertos tomadas tras la isquemia caliente, tras la perfusión y tras el trasplante.

5.8. Respiración mitocondrial

Los resultados de la respiración mitocondrial se resumen en la Figura 43. El grupo basal (barras blancas) corresponde a las biopsias de los injertos tomadas justo después de los 30 min del TIC, y contiene los experimentos de todos los animales antes de su aleatorización a los grupos PHM o PHMO (n=19).

Después del período de isquemia caliente (barras blancas), se observa un efecto positivo de la preservación en máquina por sí misma en forma de aumento de la producción de ATP, que parece ligeramente mayor en el grupo PHM (Figura 43a). Un alto nivel de fuga de protones (Figura 43b) y su correspondiente baja capacidad respiratoria de reserva (Figura 43c) representan la pérdida de eficiencia en la cadena respiratoria después de la isquemia caliente

RESULTADOS

(barras blancas), la cual se atenúa en el grupo PHM (barras grises) y por el contrario se agrava con la adición de oxígeno en el grupo PHMO (barras negras).

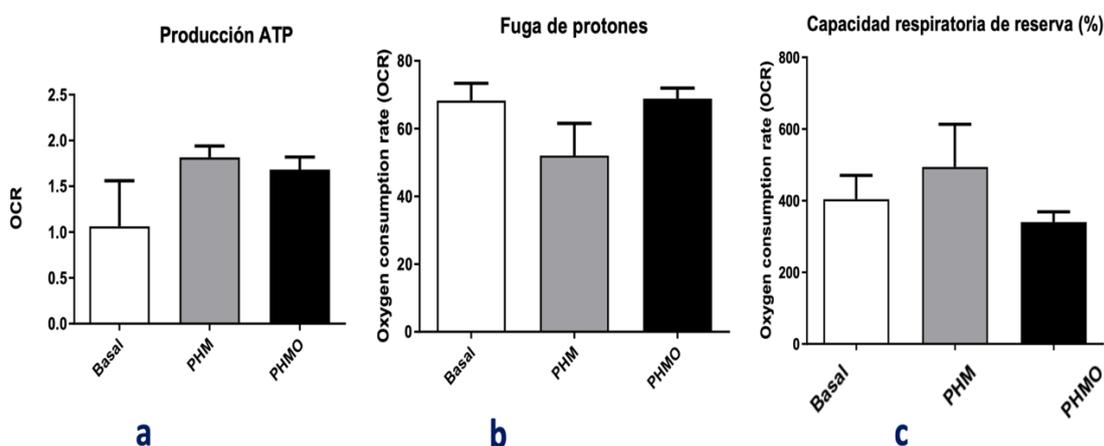


Figura 43: niveles de producción de ATP (a), fuga de protones (b) y capacidad respiratoria de reserva (c) medidos con la plataforma SeaHorse en las biopsias de los injertos.

En la Figura 44 se muestran las imágenes correspondientes de contraste de fase los cultivos primarios de células tubulares proximales obtenidos a partir de biopsias pre y post-perfusión, así como biopsias del riñón contralateral (sin isquemia), como control. Los cultivos primarios se establecieron a partir de las biopsias renales tomadas antes y después de la perfusión en máquina. A pesar de utilizar medios de cultivo que favorecen el crecimiento de células epiteliales tubulares proximales, al final se obtienen cultivos mixtos de células epiteliales y fibroblastos. Éstos son un tipo celular mucho más resistente y favorecido en cualquier cultivo primario no puro, dados sus mínimos requerimientos en medios de cultivo y en adhesión celular a sustrato (plástico). Como puede observarse en las fotos de microscopía de contraste de fase (Figura 44), el porcentaje de fibroblastos varía en los cultivos de los diferentes animales, con morfología alargada para los fibroblastos y más cúbica y plana para las células epiteliales.

RESULTADOS

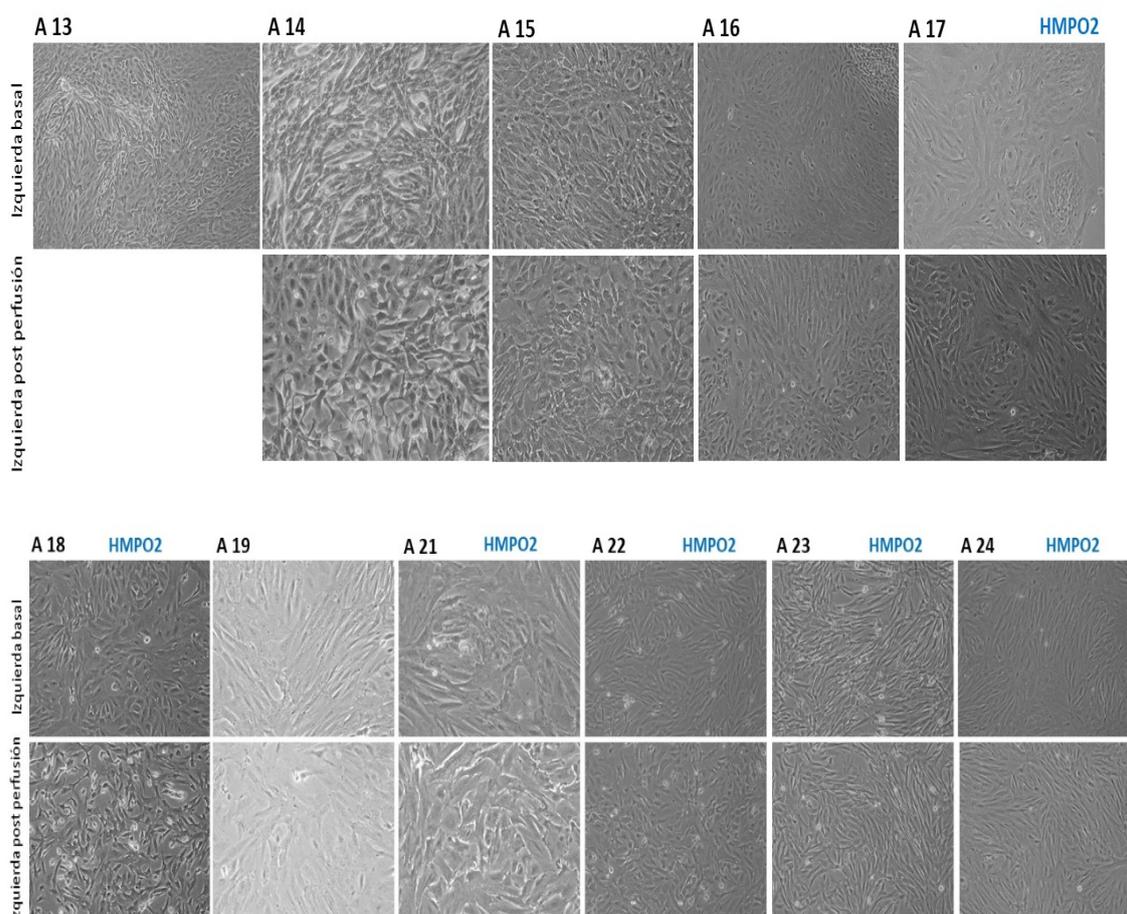


Figura 44: imágenes de microscopía de contraste de fase de los cultivos primarios de células tubulares proximales de la corteza renal. Se muestran las biopsias de los animales (A) 13 al 24 y señalados aquellos sometidos a oxigenación activa en máquina del grupo PHMO. El porcentaje de fibroblastos (morfología alargada) y células epiteliales del túbulo (células cúbicas y planas) varía según los animales.

La variación en el porcentaje de fibroblastos que forman parte de los cultivos primarios de células epiteliales puede contribuir a los resultados obtenidos en los estudios de metabolismo mitocondrial determinados mediante *SeaHorse*, ya que este tipo celular tiene una respiración mitocondrial y metabolismo general menor que las células epiteliales tubulares. No se apreciaron diferencias morfológicas a nivel de los cultivos celulares entre los grupos PHM y PHMO.

5.9. Sistemas antioxidantes. Expresión génica de la TEM.

La

Figura 45 permite apreciar el efecto de la perfusión en máquina como una traducción del metabolismo mitocondrial. En un contexto metabólico de menor estrés oxidativo (PHM), las necesidades de enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa 1 (SOD1) y catalasa disminuyen significativamente ($p < 0,01$) sus niveles basales después del período de isquemia caliente. Por el contrario, durante el estrés oxidativo del PHMO, las demandas de SOD1 y catalasa aumentan. La enzima mitocondrial superóxido dismutasa 2 (SOD2) requiere un control más estricto y los cambios en sus niveles presentan menor variabilidad.

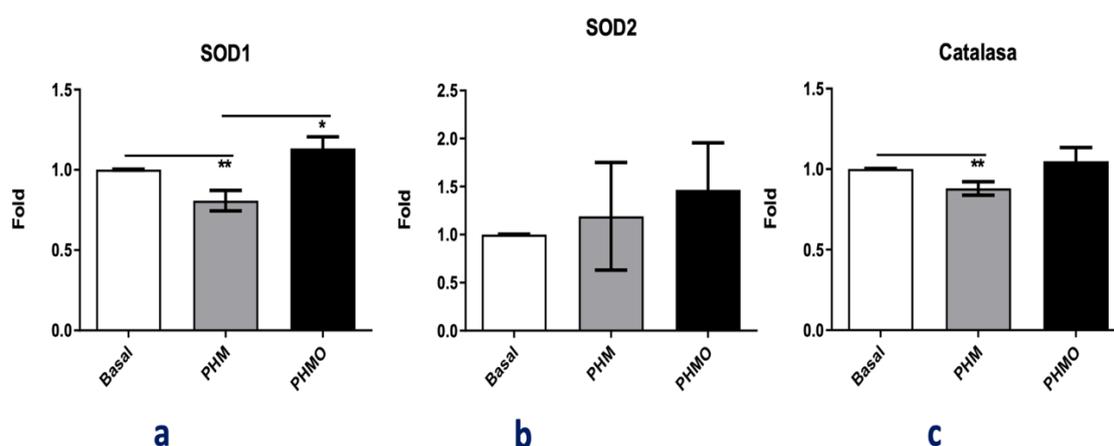


Figura 45: niveles de enzimas antioxidantes en las biopsias de injertos renales: SOD1 (a), SOD2 (b) y catalasa (c).

La cadherina-E (Figura 46a) es un marcador de integridad epitelial y su aumento en el grupo PHM (barras grises) traduce una menor transición epitelio-mesenquimal (TEM) frente al grupo PHMO (barras negras) y tras la isquemia caliente (barras blancas). Por el contrario, marcadores de fibrosis como la

RESULTADOS

vimentina y la fibronectina, así como el colágeno, disminuyen durante la PHM (Figura 46bcd). Sin embargo, la PHMO (barras negras) parece inducir a una mayor fibrosis, reflejada por el aumento de los niveles de fibronectina y vimentina por encima incluso del momento de isquemia caliente (barras blancas, Figura 46).

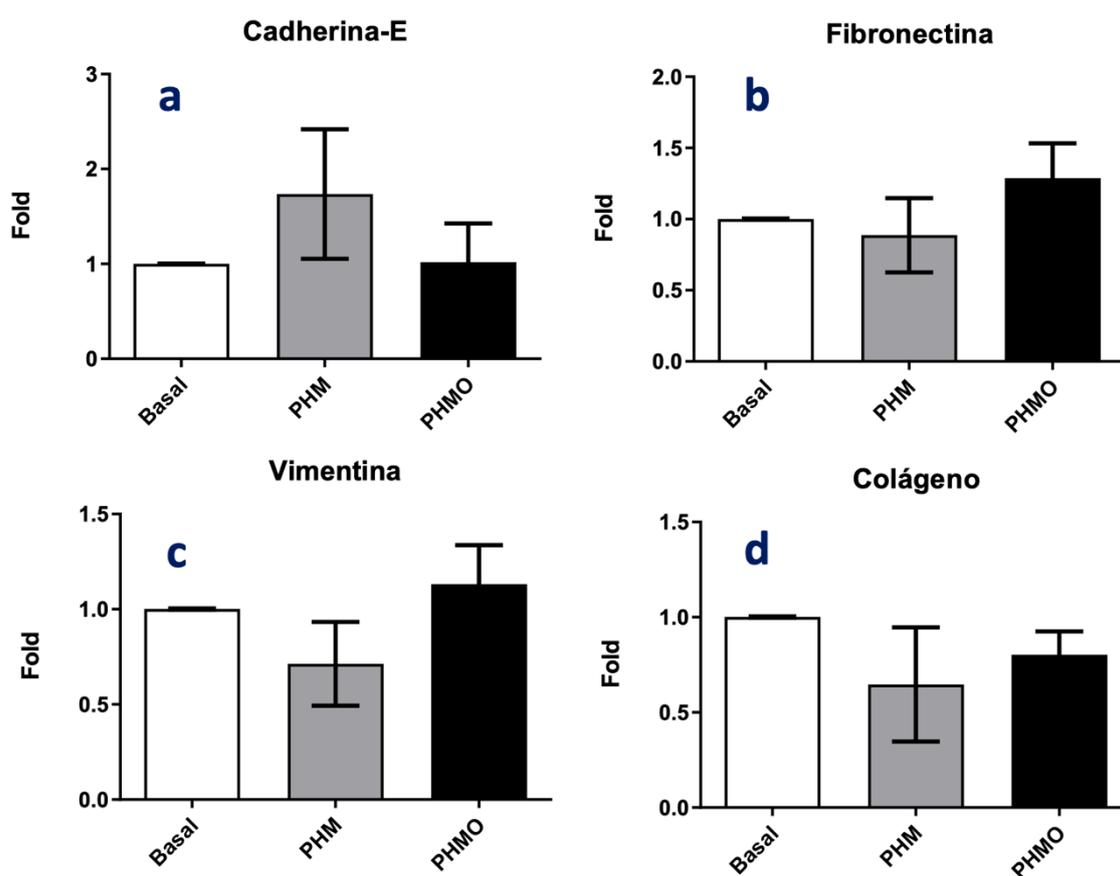


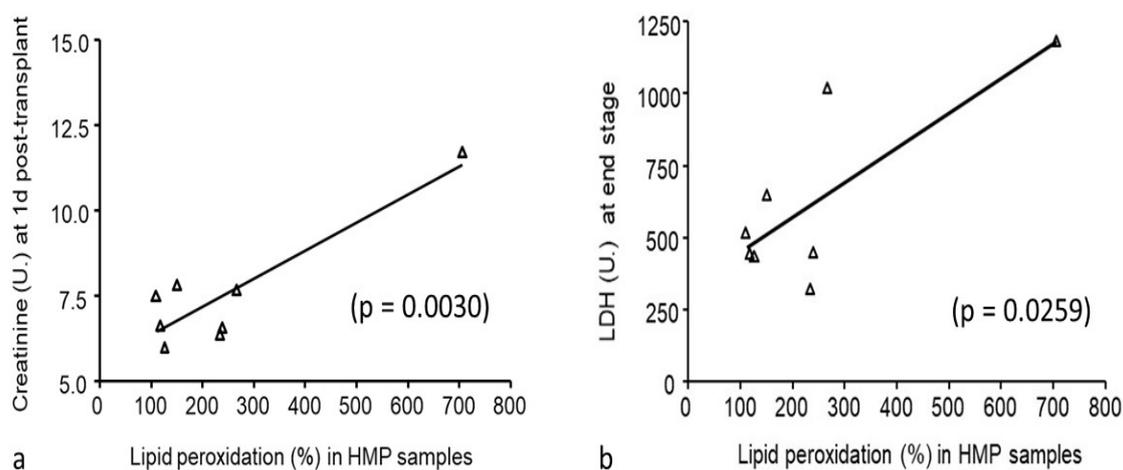
Figura 46: niveles de cadherina E (a), fibronectina (b), vimentina (c) y colágeno (d) tras los 30 min de isquemia caliente (barras blancas).

5.10. Correlación funcional y de peroxidación lipídica

Se halló una correlación significativa entre los niveles de peroxidación lipídica posteriores a la perfusión y la situación funcional post-TR, representada por los niveles de creatinina en el día +1 y los de LDH al final del seguimiento

RESULTADOS

(Figura 47). Así, podría interpretarse que el nivel de peroxidación lipídica determinado en la biopsia post-perfusión constituiría un indicador de estrés oxidativo tisular y un predictor de resultados funcionales tras el trasplante.



*Pearson Correlation Coefficient

Figura 47: correlaciones de peroxidación lipídica y función renal post-TR. Se determinó una correlación significativa entre los niveles de peroxidación lipídica post-perfusión y la situación funcional post-TR representada por los niveles de creatinina en el día 1 (a) y la LDH al final del seguimiento (b).

Una vez establecida la correlación entre el nivel de peroxidación lipídica y los resultados funcionales (Cr día +1 y LDH final), se estudió la posible relación del nivel de peroxidación lipídica y de estos parámetros bioquímicos con la supervivencia del animal. Aunque no se puso de manifiesto una correlación inversa significativa entre el nivel de peroxidación lipídica y la supervivencia del animal (Figura 48a), si se observó entre la creatinina el día +1 y la supervivencia (Figura 48b), así como entre la LDH el día +1 y la supervivencia del animal (Figura 48c), la cual se mantiene con la LDH al final del seguimiento (Figura 48d).

RESULTADOS

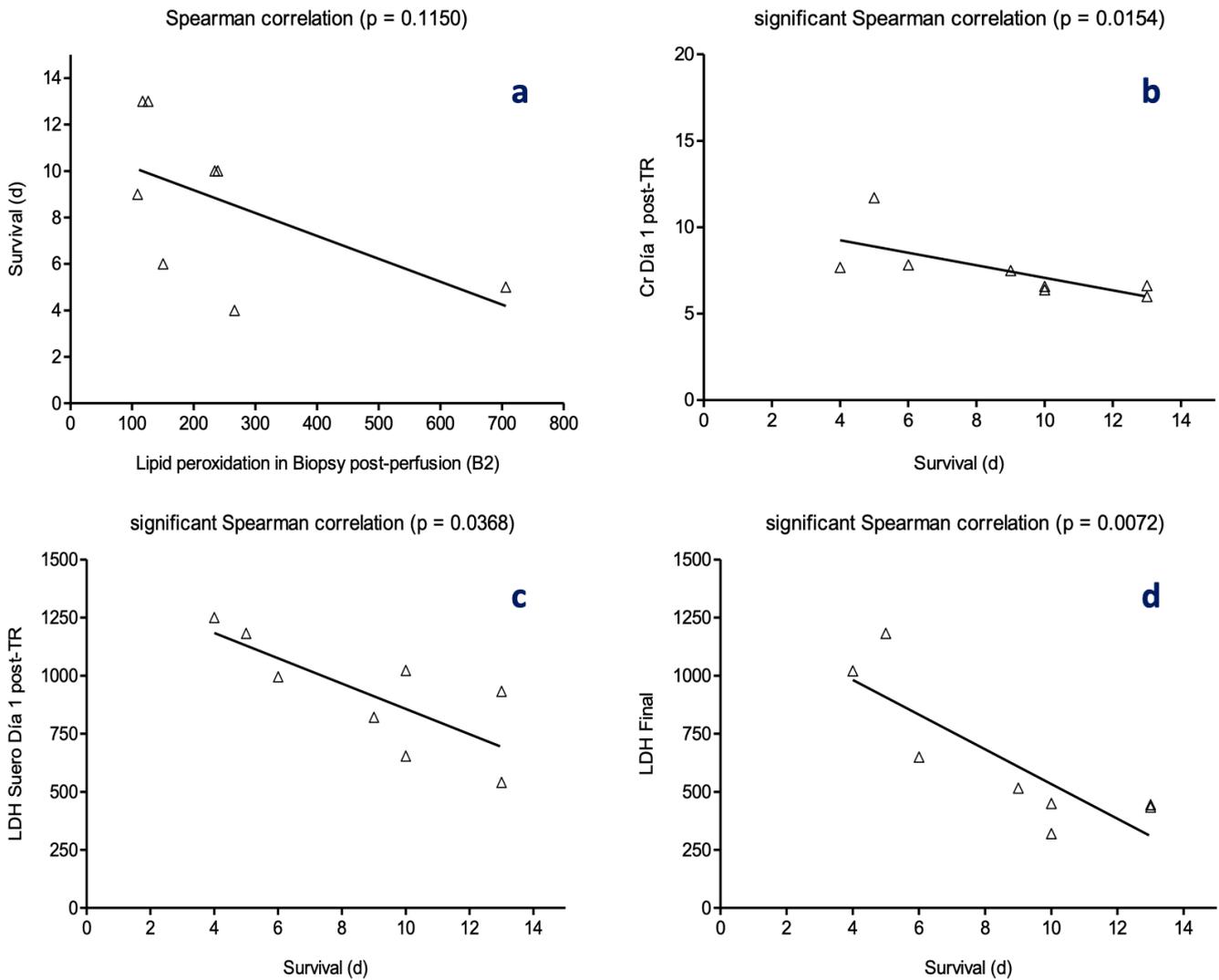


Figura 48: estudios de correlación entre variables: A) peroxidación lipídica y supervivencia del animal. B) creatinina el día +1 y la supervivencia del animal. C) LDH el día +1 y supervivencia del animal. D) LDH al final del seguimiento y supervivencia del animal.

5.12. Análisis histológico: microscopía de luz

Las biopsias renales tomadas antes y después de la perfusión fueron normales a su examen histológico con microscopía de luz (Figura 49).

RESULTADOS

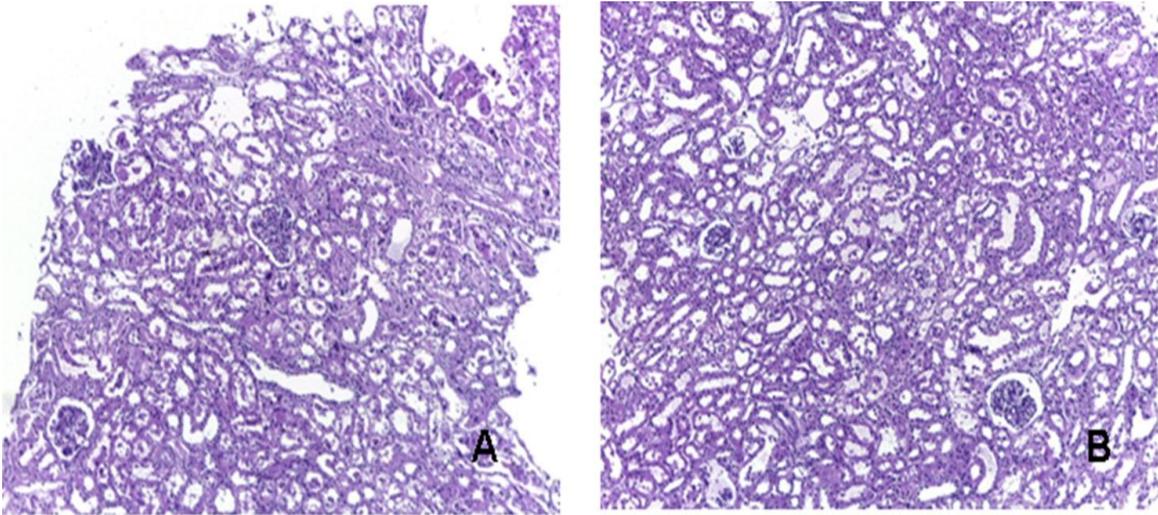


Figura 49: las biopsias parafinadas pre (A) y post (B) perfusión de los diferentes injertos fueron normales en su evaluación mediante microscopía óptica (H-E x 40).

Tal y como se ha expuesto anteriormente en el diagrama de flujo de la Figura 32, sólo 15 animales fueron finalmente trasplantados y válidos por tanto para el análisis histológico del riñón completo en el momento del sacrificio del animal (11 PHM y 4 PHMO). Los hallazgos histológicos de sendos grupos, acordes a la clasificación establecida, se representan en la Figura 50:

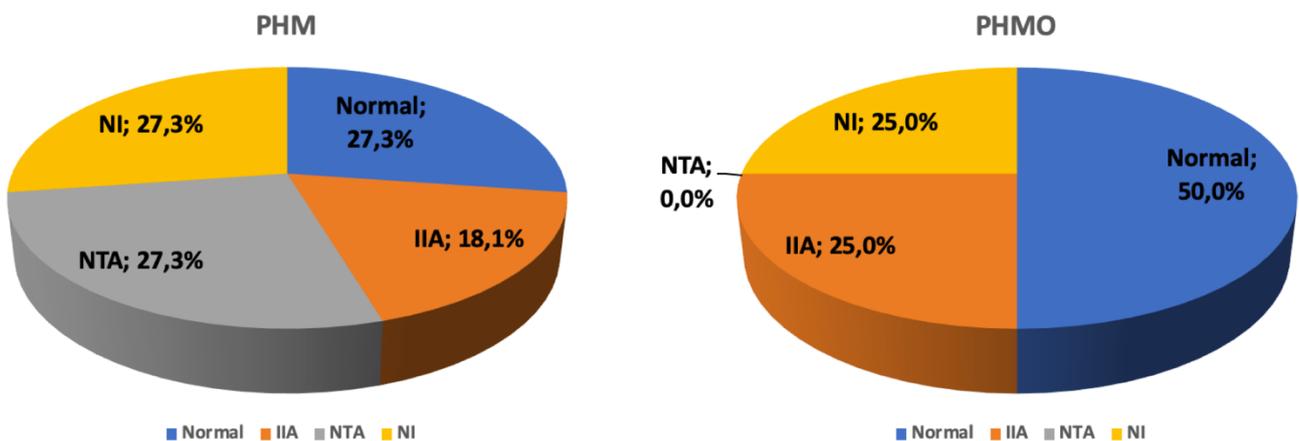


Figura 50: resultados histológicos de las piezas de nefrectomía en sendos grupos PHM y PHMO representados en diagrama de sectores. IIA: infiltrado inflamatorio agudo. NTA: necrosis tubular aguda. NI: necrosis isquémica.

RESULTADOS

En el grupo experimental (PHMO, n=4), el 50% (2/4) presentaron histología normal, un 25% (1/4) IIA leve y un 25% (1/4) NI severa. En cambio, en el grupo PHM (n=11), se evidenció NI en el 27,3% (3/11), NTA severa en el 18,2% (2/11), NTA moderada en el 9,1% (1/11), IIA severo en el 9,1% (1/11), IIA leve en el 9,1% (1/11) e histología normal en el 27,3% (3/11). La Tabla 13 recoge agrupados estos resultados histológicos. Las columnas sombreadas corresponden a los injertos del grupo PHMO, habiendo sido descartados los 5 primeros por oxigenación inconsistente (animales 1, 5, 6, 9 y 10). Como se puede observar, en el segundo periodo del trabajo experimental (animales 13-24), sólo 1 injerto mostró signos de necrosis isquémica (25-50%), y 3/4 (75%) de las necrosis isquémicas de la serie acontecieron durante el primer periodo del proyecto (animales 1-12). Ambos hechos probablemente reflejen el peaje de la “curva de aprendizaje” de un modelo experimental complejo.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
1. Riñon normal					X					X		X		X		X		X					X	X
2 a. II Agudo Leve(+)		X	X	X											X					X				
2 b. II agudo Moderado(++)						X																		
2 c. II Agudo Severo (+++)																			X					
3 a. NTA Leve (+)						X											X							
3 b. NTA Moderada (++)													X											
3 c. NTA Severa (+++)																								
4. Necrosis Isquémica																								
a. <25%																								
b. 25-50%																						X		
c. >50%		X					X																	

Tabla 13: tabla resumen con los resultados histológicos de las piezas de nefrectomía en el momento del sacrificio del animal. Las columnas sombreadas corresponden a los animales aleatorizados al grupo PHMO.

DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

Introducción

Existe cierto consenso en la actualidad sobre la **utilidad de la PHM en la preservación de riñones procedentes de DAC**, ya que **reduce las tasas de FRR** (64-67). Se cree que la recirculación continua de perfusión fría a través de la vascularización renal reduce el vasoespasmo y protege el endotelio vascular mediante la modulación del *KLF2*, el aumento de la regulación de las vías de señalización de la sintetasa de óxido nítrico (NOS) endotelial (81, 161) e incluso alterando el perfil inmunológico del órgano (162). Sin embargo, tanto en nuestra experiencia (19) como en la literatura, sus resultados siguen siendo discretos: aunque produce menores tasas de FRR (64-67), no ha demostrado beneficio en términos de NFP (66, 68, 69) ni de supervivencia a 1 año del injerto (64, 70). Fruto de ello nace el interés por la PHMO, si bien **la utilidad potencial de esta suplementación de oxígeno no ha sido esclarecida** y su efecto es aún desconocido.

Varios estudios preclínicos y al menos 2 ensayos clínicos aleatorizados en humanos recientes han tratado de arrojar luz sobre esta incógnita, obteniendo resultados dispares (115). La hipótesis del potencial efecto beneficioso del O₂ radicaría, tal y como se ha expuesto con anterioridad, en la existencia de un remanente metabólico basal del 10% en condiciones de hipotermia (83), el cual se vería beneficiado por la oxigenación logrando reponer el ATP celular. La principal fuente de este ATP celular es la **fosforilación oxidativa mitocondrial**, que depende del O₂ como aceptor final de electrones en la cadena respiratoria

DISCUSIÓN

(100, 163). Un agotamiento gradual del ATP celular causado por las condiciones de preservación anóxica provoca lesiones celulares irreversibles que pueden conducir a la pérdida del injerto. Sin embargo, **el oxígeno no sólo ofrece potenciales ventajas**, sino que su administración puede producir efectos negativos en el metabolismo celular debidos a la producción de RLO (93, 100, 105). La generación de estas sustancias oxidantes, la liberación de citoquinas inflamatorias y la adhesión y movilización de leucocitos ocasionan lesión renal y la consiguiente generación de FRR (164). Por todo ello, una correcta y exhaustiva evaluación del efecto del O₂ en la preservación de un riñón destinado a trasplante deberá incluir el estudio de la adición del gas al circuito de preservación, el análisis de sus efectos sobre el metabolismo celular, el examen de la expresión de biomarcadores ligados a la función o daño renal y la investigación de los cambios histológicos producidos en el órgano.

Investigar sobre la DA conlleva el **estudio en profundidad del efecto negativo de la isquemia caliente**, verdadero factor diferencial de este tipo de donación y principal limitante de la expansión de estos órganos como fuente para trasplante. Nuestro grupo fijó el TIC en 30 minutos a través del clampaje arterial exclusivo, similar a la media de 28 minutos en los DA en España comunicada por la ONT (165). Y es en la **mitocondria** donde se localiza el epicentro del terremoto que la isquemia caliente desencadena sobre el metabolismo celular. Este orgánulo celular, auténtico objeto de estudio en profundidad de nuestro experimento, actúa como una central energética donde se produce el suministro necesario para llevar a cabo la síntesis de ATP (Figura 51).

DISCUSIÓN

El agotamiento del oxígeno puede provocar el colapso de la cadena transportadora de electrones (CTE) en la mitocondria, elemento crucial para la fosforilación oxidativa y la consecuente generación de ATP celular. La producción de RLO es consecuencia de la interacción del oxígeno con una cadena respiratoria disfuncional durante la reperfusión. *Chouchani et al* (91) demostraron que la acumulación de succinato mitocondrial originada durante la isquemia es responsable de la mayor parte de la producción de RLO durante la reperfusión. En condiciones de **isquemia se establece un transporte inverso de electrones en la cadena respiratoria** que resulta en acúmulo de succinato y lactato, disminución de la producción de ATP y producción de sustancias pro-oxidantes y RLO como el superóxido y peróxido de hidrógeno. *Dutkowski et al* describieron que la PHMO hepática al final del periodo de isquemia, inmediatamente antes de implantar el órgano, restablece el transporte anterógrado de electrones a nivel de la CTE, ocasionando una disminución del succinato, un aumento del ATP y una consiguiente mejora de la función del injerto (97). Hallazgos metabólicos similares favoreciendo la PHMO en preservación renal han sido también comunicados recientemente por *Darius et al* (113).

DISCUSIÓN

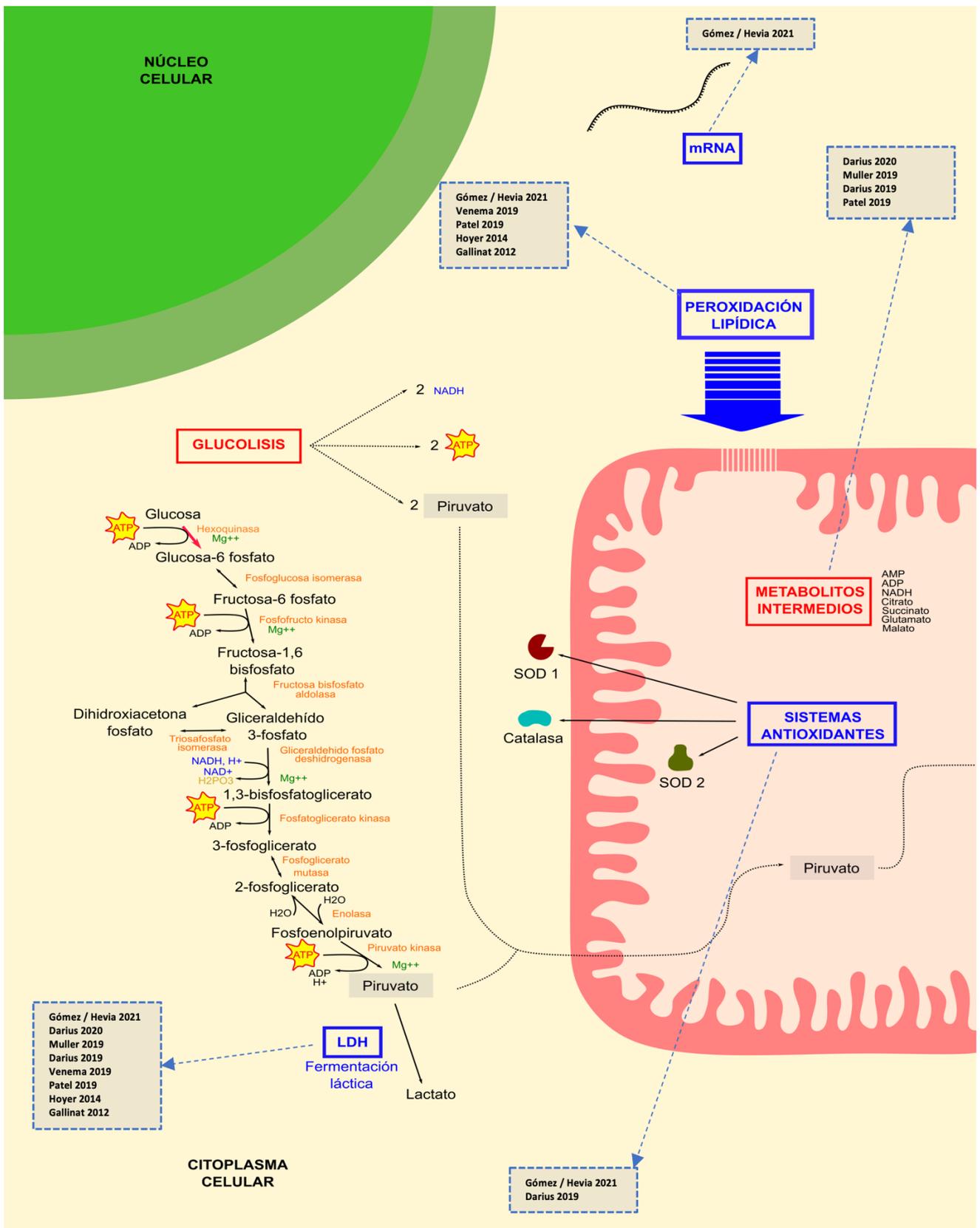
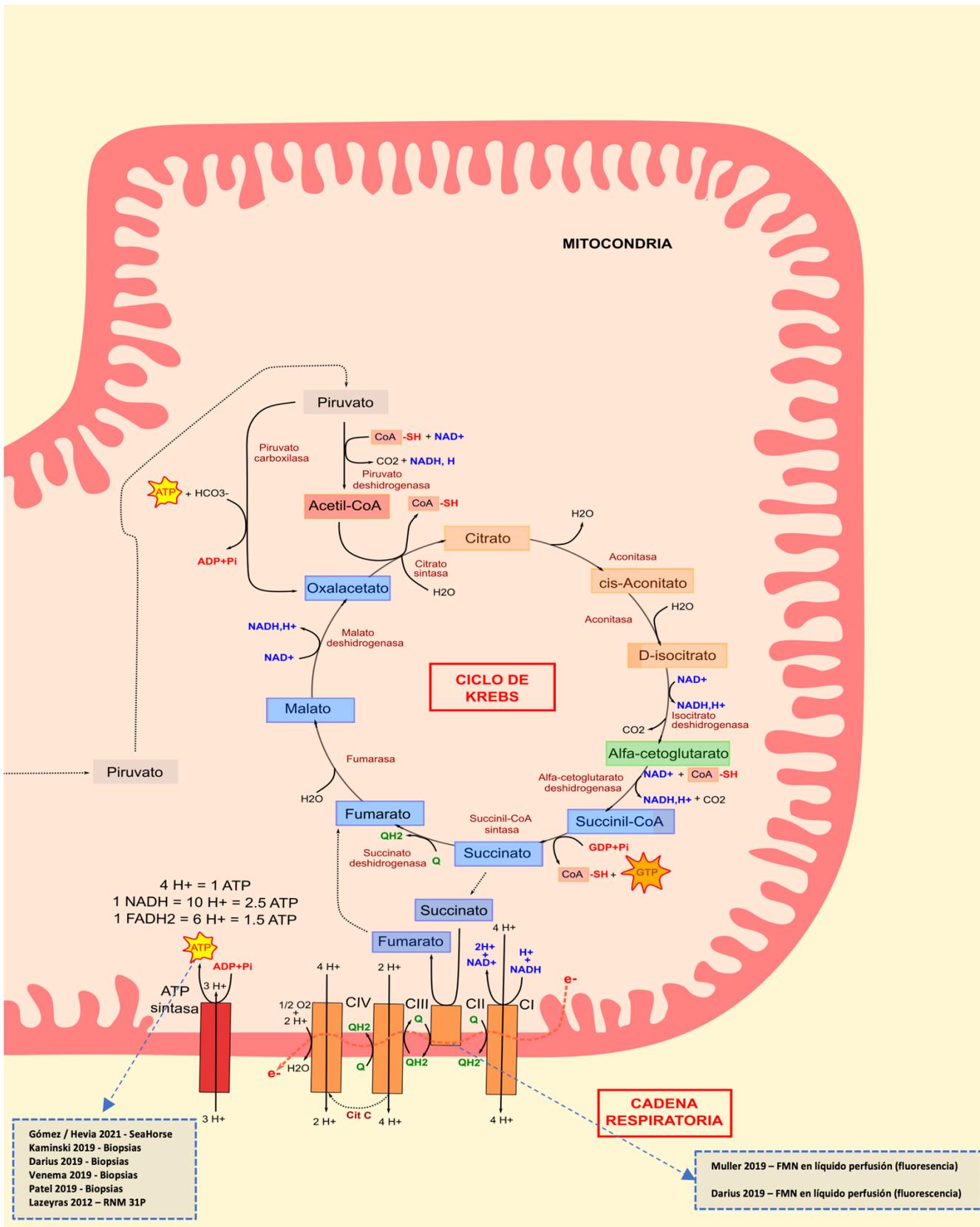


Figura 51: esquema metabolismo mitocondrial y las mediciones de éste realizadas en los distintos trabajos existentes en la literatura

DISCUSIÓN



DISCUSIÓN

En un intento por amortiguar o evitar el impacto negativo de la isquemia sobre el metabolismo celular y mitocondrial surge el interés por la PHMO, aunque su investigación experimental es escasa. Hasta la fecha, sólo 3 estudios han evaluado la PHE frente a la PHMO al 100% en modelos preclínicos de autotrasplante porcino (101, 107, 109), los cuales mostraron efectos beneficiosos significativos de la PHMO sobre la función renal. Sin embargo, estos estudios no incluyeron en su comparación un grupo PHM sin oxigenación activa, por lo que dichos beneficios obtenidos no pueden ser atribuidos exclusivamente al oxígeno (166, 167). De hecho, es conocido el efecto beneficioso de la PHM por sí misma, reduciendo las tasas de FRR en injertos procedentes de DAC (24, 66, 69). Por tanto, nuestro trabajo compara la PHM con la PHMO empleando O₂ al 100%, sin incluir como grupo control a la PHE clásica, tras aceptar la premisa del trabajo de *Venema et al* en el que demostraron un beneficio significativo de la PHM frente a la PHE independientemente del oxígeno, reduciendo el daño celular y aumentando la producción de ATP (72).

La Tabla 14 resume los aspectos más relevantes de los estudios preclínicos existentes en la literatura empleando riñones porcinos, en los que se investigan diferentes concentraciones de O₂ durante la PHMO y su efecto en la función temprana del injerto y el flujo renal *ex vivo*. En ellos, bien a través de la perfusión normotérmica *ex vivo* (PNEV) o de modelos de autotrasplante, se muestran resultados contradictorios (72, 101, 107-109).

	Autor	Modelo	Grupos de estudio	pO ₂ mmHg	Función renal inicial	Flujo durante PHM	Flujo al final PHM
PNEV	<i>Hoyer 2014 (108)</i>	30 min TIC + 21 h PHM	21h PHM 0% O ₂ (n=5)	0	PHMO 100% O ₂ proporciona la mejor función renal inicial, seguida de la PHMO 21% y la PHM 0%.	El aumento más rápido del flujo renal se obtuvo con PHMO 100% O ₂ , seguido de PHMO 21% y PHM 0%	PHMO 100% y PHMO 20% significativamente mayores que PHM 0%
			21h PHMO 21% O ₂ (n=5)	200 - 220			
			21h PHMO 100% O ₂ (n=5)	760 - 800			
	<i>Venema 2019 (72)</i>	30 min TIC + 24 h PHM	24h PHE (n=6)	-	Todos los grupos de PHM mejor función renal que la PHE. No diferencias entre los distintos grupos de PHMO.	NA	NA
			24h PHM 0% O ₂ (n=6)	0			
			21h PHMO 21% O ₂ (n=6)	NA			
			24h PHMO 100% O ₂ (n=6)	NA			
Auto - TR	<i>Gallinat 2012 (101)</i>	No TIC + 21 h PHM	21h PHM 0% O ₂ (n=5)	0	Significativamente mejor después de PHM 0% O ₂ comparado con PHMO 100% O ₂	NA	NA
			21h PHMO 100% O ₂ (n=5)	> 500			
	<i>Thuillier 2013 (109)</i>	60 min TIC + 22 h PHM	22h PHM 0% O ₂ (n=4)	0	PHMO 100% O ₂ pico de Cr sérica más bajo y retorno más rápido a los niveles normales	NA	Sin diferencias entre los grupos
			22h PHM 100% O ₂ (n=4)	NA			
	<i>Darius 2020 (113)</i>	30 min TIC + 22 h PHM	22h PHE (n=6)	-	PHMO O ₂ bajo y alto flujo significativamente mejor función inicial del injerto en comparación con PHM. Todos los grupos de PHM mejor función inicial del injerto en comparación con PHE	Aumento más rápido en los grupos de PHMO O ₂ bajo y alto en comparación con la PHM estándar. No hay diferencias significativas entre PHMO O ₂ bajo y alto.	Significativamente más alto en PHMO O ₂ bajo y alto comparado con la PHM estándar.
			22h PHM (n=6)	65 - 75			
			22h PHMO bajo (n=8)	210 - 230			
			22h PHMO alto (n=8)	680 - 760			
	<i>Gómez / Hevia 2021</i>	30 min TIC + 22 h PHM	22h PHM (n=11)	93 (SD 19)	PHMO 100% O ₂ pico de Cr sérica más bajo y retorno más rápido a los niveles normales	Aumento más rápido de PHMO 100% O ₂ , pero sin diferencias significativas	Sin diferencias significativas
			22h PHMO O ₂ 100% (n=4)	479 (SD 86)			

Tabla 14: resumen de los estudios preclínicos en cerdos que investigan las diferentes concentraciones de oxígeno durante la PHM empleando modelos de PNEV o auto-TR. NA: no aplicable. Cr: creatinina. TIC: tiempo de isquemia caliente.

DISCUSIÓN

Curiosamente, en los modelos de autotrasplante, los beneficios funcionales del oxígeno parecen correlacionarse con el daño isquémico, después de los 30-60 minutos del TIC que preceden a la preservación en máquina. En ausencia de esta isquemia caliente, no se observó beneficio alguno de la oxigenación (101).

Oxigenación

Como se ha dicho, el objetivo de la oxigenación activa en la PHMO sería recargar el ATP de forma precoz con el fin de amortiguar el impacto de la agresión producida por la isquemia caliente. Esta oxigenación puede aplicarse atendiendo a **diferentes estrategias temporales y a su duración**. La más empleada habitualmente es en el momento de iniciarse la PHMO y mantenida de forma continua durante todo el proceso, pero también se ha empleado en las horas finales de la isquemia fría tras un periodo de PHE clásica (168). Desde un punto de vista logístico, quizá esta última estrategia fuese la más factible de llevar a cabo en el ámbito clínico de compartición y transporte de órganos.

El nivel óptimo de oxigenación durante la PHMO sigue sin estar claro.

Algunos estudios experimentales han favorecido el uso de concentraciones altas de oxígeno (107, 108). Según la ley de Henry, la concentración de equilibrio de un gas disuelto es el producto de su presión parcial. La solubilidad del oxígeno se realiza por difusión y tiene relación inversa con la temperatura, aumentando a temperaturas más bajas, por lo que se puede disolver más O₂ en soluciones de perfusión hipotérmica (108, 169).

DISCUSIÓN

Un problema básico en la interpretación de los resultados es la realización de una **corrección adecuada de la pO₂ en función de la temperatura**. La determinación de los parámetros de oxigenación (pH, pO₂, electrolitos y lactato) en la solución de preservación durante la PHM/PHMO se realizó mediante un analizador de gases en sangre empleado en el ámbito clínico (*GEM Premier 4000©, Werfen, Barcelona, España*), tomando las muestras del puerto de muestreo del que dispone la máquina en su circuito de perfusión. Estos analizadores requieren unos intervalos de temperatura y hematocrito determinados para poder hacer una correcta determinación de electrolitos y gases. Sin embargo, la solución de preservación empleada se encuentra fuera de estos intervalos, por lo que sus resultados se ven artefactados. En caso de no disponer de una sonda integrada en el circuito de la máquina que determine la pO₂, que fue nuestro caso, se deben realizar una serie de correcciones sugeridas por el grupo investigador colaborador de la *Université Catholique de Louvain*. Éstas se basan en el principio de que, a medida que la temperatura desciende, la solubilidad del O₂ aumenta, lo que disminuye su correspondiente presión parcial (pO₂). La pO₂ desciende en torno a 5 mmHg por cada grado centígrado de temperatura por debajo de los 37°C. Así, para una pO₂ de 100 mmHg a 37°C, a 27°C la pO₂ será:

$$37 - 27 \text{ }^\circ\text{C} = 10 \text{ }^\circ\text{C}$$
$$10^\circ\text{C} \times 5 \text{ mm Hg} = 50 \text{ mmHg}$$

Esta fórmula permite hacer una corrección aproximada de la pO₂ a la temperatura determinada en el circuito. Aunque la corrección se ha realizado

DISCUSIÓN

habitualmente a 4°C, la temperatura real en la máquina se encuentra en torno a los 5,0 - 5,5°C. Frente a este modo de medir la pO₂ con cooxímetros clínicos empleado por nuestro grupo, otros autores emplean sondas ópticas de fluorescencia en vivo (113) que simplifican este cálculo y evitan el reajuste matemático.

Como era de esperar, se comprobó que **la pO₂ en el líquido de perfusión**, acelular y carente de un transportador de oxígeno, **puede aumentar durante la PHMO** y depende de la concentración de oxígeno suministrado durante ésta. Así, la media de pO₂ cambió de 164,4 mmHg (SD 13,9) a 80,7 mmHg (SD 11,3), similares a los valores de pO₂ observados en el grupo PHM (Figura 34A) donde pasó de 162,9 mmHg (SD 33,5) a 92,9 mmHg (SD 18,5). La pO₂ más alta del grupo PHMO se alcanzó después de los 30 min de precarga de O₂ (476,3 mmHg, SD 102,6) y sólo se mantuvo durante 15 min (479,2 mmHg, SD 86,4), tal y como se observa en la Figura 34C. No obstante, aunque esta precarga de O₂ con el oxigenador de burbuja no fue capaz de mantener una pO₂ suprafisiológica hasta el final de la perfusión, a las 2 horas de iniciarse sus valores de pO₂ fueron del doble respecto al grupo PHM. Obviamente, el descenso de la pO₂ fue más lento en el grupo PHM que en el grupo PHMO (Figura 34). Estos resultados obtenidos **difieren claramente del resto de los estudios experimentales de la literatura** (Figura 52), en los que los niveles de pO₂ alcanzados fueron significativamente más altos, normalmente por encima de 500 mmHg y más comúnmente entre 700-800 mmHg (101, 107, 108).

DISCUSIÓN

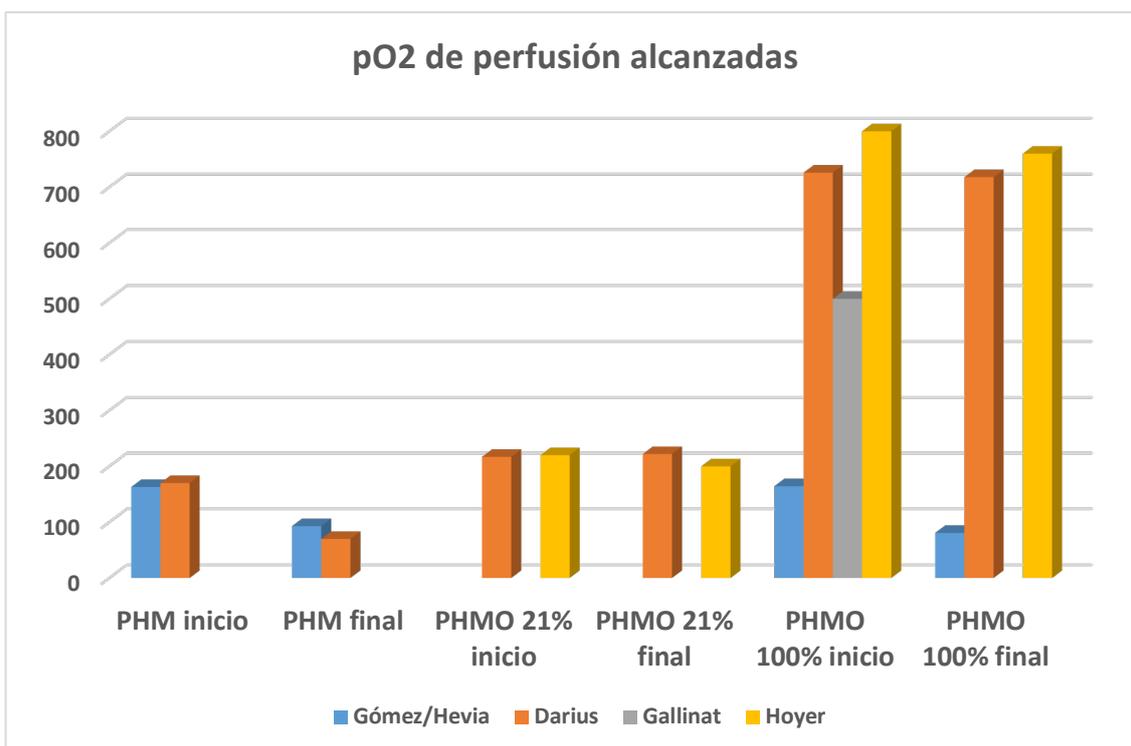


Figura 52: distintas pO₂ alcanzadas en los estudios preclínicos de PHMO existentes en la literatura. Se observa una baja pO₂ de nuestro experimento en comparación con los existentes en la literatura (101, 107, 108). Fuente: elaboración propia.

No encontramos una clara explicación a este hecho, aunque el entorno experimental en el que se desarrolló nuestro trabajo mostró algunas diferencias relevantes en comparación con otros grupos. En primer lugar, después de varios animales en los que se obtuvieron resultados muy inconsistentes de pO₂ utilizando un **oxigenador de membrana externa** (Figura 34B), éste fue sustituido por un oxigenador de burbuja de superficie que proporcionase una oxigenación directa. En segundo lugar, esta oxigenación por perfusión directa no fue continua durante todo el tiempo en máquina, sino que sólo se mantuvo durante un **corto período de 30 minutos** previos al comienzo de la PHMO (precarga). Los depósitos de perfusión pueden ser gaseados generalmente con oxigenadores de burbuja, de discos giratorios o de membrana (156), más

DISCUSIÓN

recientes en experimentos de perfusión (170, 171). Estos dispositivos de membrana, empleados habitualmente en la cirugía cardiaca o en el soporte vital (*extracorporeal membrane oxygenation, ECMO*) han demostrado su eficacia en la oxigenación de medios que contienen eritrocitos (172). La tecnología *LifePort®* permite el uso de un oxigenador de burbuja integrado (Figura 27) en la tapa extraíble del contenedor de hielo (95, 113), entrando el oxígeno en contacto con el líquido de perfusión dentro del compartimento estanco donde el riñón se encuentra parcialmente sumergido. En cambio, el oxigenador de membrana obligaba a ajustar el circuito de perfusión para integrarlo (

Figura 53).

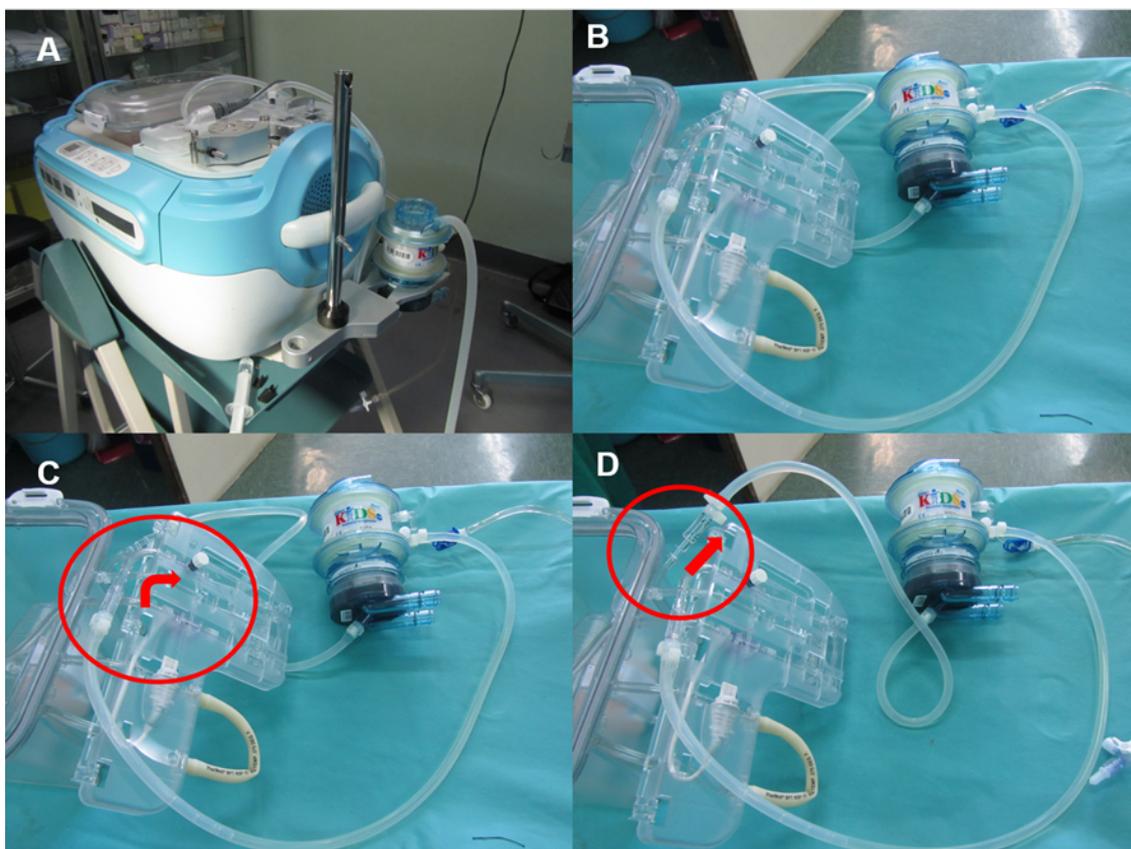


Figura 53: (A) Modificación del circuito de perfusión de *LifePort®* para el empleo de un oxigenador pediátrico de membrana. (B) Oxigenador de membrana integrado en el conjunto de tubos estériles desechables de *LifePort®*. (C) El líquido de perfusión oxigenado entra en el

DISCUSIÓN

circuito en su punto de retorno. (D) La línea de lavado entra en el oxigenador de membrana de fibra hueca para oxigenar continuamente el líquido.

Estas diferencias en los niveles de pO_2 alcanzados durante la PHMO pueden explicar los resultados obtenidos. *Darius et al* demostraron, en un modelo de autotrasplante renal porcino similar al de nuestro estudio, que la administración continua de oxígeno podía alcanzar **niveles de pO_2 suprafisiológicos (700-800 mmHg)**, y que esta estrategia de suplementación de oxígeno durante la PHMO **podría ser la mejor en términos de protección mitocondrial** en comparación con los niveles bajos de oxígeno (220-240 mmHg), **aunque finalmente dieran lugar a una función renal precoz similar**, pero superior a la del grupo PHM (113). En un estudio preclínico adicional del mismo grupo investigador, observaron que **sólo 2 horas de oxigenación al inicio del PHMO son suficientes** para obtener la misma protección mitocondrial y los mismos efectos positivos sobre la función precoz del injerto en comparación con la oxigenación continua durante la PHMO (95). Sin embargo, tanto en los dos estudios descritos anteriormente como en el resto de experimentos preclínicos sobre PHMO de la literatura se emplearon oxigenadores de membrana (72, 95, 101, 108, 109, 113). Por último, el **gas empleado** en el experimento de *Darius et al* (113) fue *Carbogen®*, compuesto por 95% O_2 y 5% CO_2 . Esta mezcla de gases es frecuentemente empleada en soluciones de perfusión acelulares y sin portador de oxígeno, ya que su capacidad tampón depende del CO_2 (173) y requieren un mayor contenido de O_2 para satisfacer la demanda tisular. El oxígeno puro es menos empleado en experimentos de

DISCUSIÓN

perfusión (174), ya que una tensión de oxígeno elevada y no fisiológica puede dar lugar a la producción de radicales libres (83).

Con todo esto, la **combinación entre presión ideal de O₂ y el momento óptimo de iniciar la PHMO**, que nos proporcionen un correcto balance entre sus beneficios y el riesgo de una mayor producción de RLO, **siguen siendo desconocidas** (105, 108). Parece que la perfusión continua durante todo el periodo de isquemia fría es la estrategia más frecuentemente utilizada y que arroja mejores resultados (107). Indudablemente, la precarga inicial de 2 horas de oxígeno durante la PHMO sugerida por *Darius et al* como eficaz en el mantenimiento del metabolismo aeróbico y protección mitocondrial gozaría de un evidente interés clínico, puesto que eliminaría la necesidad de una fuente de oxígeno para la PHMO durante el transporte del riñón (95). Sin embargo, atendiendo a este mismo punto de vista clínico, los resultados con las estrategias de perfusión corta al final de la isquemia fría son inferiores (107). Por tanto, antes de ser extrapolada al ámbito humano se **hace necesario que la PHMO refine y defina** tanto la forma de suplementación del oxígeno al circuito de la máquina como la forma de medir la concentración del gas en el líquido, ambos elementos clave en la perfusión y susceptibles de ser ajustados durante el proceso.

Parámetros hemodinámicos en máquina

La utilidad de los parámetros de perfusión como predictores de resultados funcionales tras el trasplante ha sido limitada (58, 60). Los datos del presente estudio coinciden con otros similares en la literatura (72, 101, 107, 108),

DISCUSIÓN

mostrando un **incremento del flujo y una disminución de la resistencia constantes a lo largo de la perfusión** en ambos grupos, con patrones similares y sin diferencias estadísticamente significativas entre ellos. Tal y como hemos publicado anteriormente en un estudio clínico en humanos, y en consonancia con otros trabajos de la literatura, los parámetros de perfusión **no mostraron relación alguna con la función renal post-trasplante** (58, 60, 117).

La experiencia previa de nuestro grupo y los datos de otros autores han demostrado que los principales cambios en los parámetros hemodinámicos de la preservación en máquina se producen durante los primeros 120 min (Figura 37), manteniéndose estables posteriormente hasta el final de la perfusión cuando se utilizan los tiempos habituales de preservación (< 24 h). Sin embargo, algunos autores han demostrado un empeoramiento de estos parámetros hemodinámicos cuando se emplean períodos más largos (> 36 h) (175).

Función renal. LDH y lactato como marcadores de isquemia. Iones

En contraposición a lo observado en otros estudios experimentales, en los que la PHMO fue beneficiosa en términos de función renal (107, 108, 166, 167), nuestro estudio no ofreció claras ventajas significativas entre ambos grupos respecto a la **creatinina** (Figura 38). Sin embargo, sí se observó una tendencia a favor de la PHMO a largo plazo que, aunque no se tradujo significativamente en una mejor función renal, presentó un **área bajo la curva (AUC) de creatinina mayor** (74,0; IC95% 47,5-100,5) que la del grupo PHM (36,2; IC95% 25,6-46,8).

DISCUSIÓN

Sin embargo, la calidad de un riñón destinado al trasplante engloba algo más que su mera función expresada en creatinina sérica. Por ello se realizaron análisis complementarios que abarcasen una amplia gama de marcadores de calidad y de lesión, y que permitiesen responder a algunos problemas específicos del oxígeno que pueden ser esenciales en la preservación del riñón.

El **lactato**, considerado un marcador universal del metabolismo anaeróbico, presentó una **concentración significativamente mayor en el líquido de perfusión del grupo PHMO** (

Figura 40). Este hecho confronta con la esperada disminución que ocasionarían unas mejores condiciones de oxigenación del grupo PHMO, donde la eficiencia del metabolismo celular debería mejorar y, por consiguiente, la actividad anaeróbica general debería disminuir. Recientemente, *Darius et al* observaron **claras ventajas metabólicas tras la PHMO suprafisiológica a alto flujo**, con menores niveles de lactato y succinato en el líquido de perfusión (113). Estos hallazgos tienen su explicación en una regulación al alza del ciclo de Krebs y la correspondiente reducción de la actividad metabólica anaeróbica en condiciones ricas en oxígeno, que parece dosis-dependiente, obteniéndose una actividad máxima del ciclo de Krebs y su consiguiente mayor producción de ATP celular en condiciones de altas pO_2 . Así, la concentración de lactato en los grupos de PHMO de bajo flujo y de PHM estándar fue similar, mientras que en el grupo de PHMO de alto flujo disminuyó sustancialmente (113). Los **bajos niveles de pO_2 logrados en nuestro estudio**, claramente inferiores a los suprafisiológicos de *Darius et al*, podrían explicar una **activación deficiente del metabolismo** aeróbico y una disfunción persistente de la cadena respiratoria,

DISCUSIÓN

ocasionando el mayor acúmulo de lactato observado en el grupo PHMO. En este sentido, los estudios de rastreo con sustratos metabólicos marcados isotópicamente son una herramienta útil que permite dilucidar si un metabolito detectado ha sido producido *de novo*. Utilizando una combinación de RNM y espectrometría de masas en un modelo porcino similar, *Patel et al* demostraron que la PHMO con alta concentración de oxígeno (95%) da lugar a un mayor grado de metabolismo aeróbico al final de la perfusión mecánica frente a la aireación activa con oxígeno al 21% (81).

La **LDH** es la enzima responsable de la conversión del lactato y el piruvato en la glucólisis anaerobia (Figura 51) y se puede encontrar en casi todos los tejidos. Una elevada actividad de la LDH puede estar asociada con la hemólisis y la lesión o muerte celular en general (176). En los experimentos de perfusión se ha utilizado, por consiguiente, como **indicador de la muerte celular o necrosis**. El daño de la membrana celular puede inferirse por el aumento de los niveles de LDH detectados en el líquido de perfusión (101, 113). Estos niveles más altos de LDH pueden coincidir con un aumento de la fuga de metabolitos celulares en el líquido de perfusión. *Darius et al* observaron niveles más altos de LDH en el líquido de perfusión de los grupos de PHMO bajo flujo y PHM estándar, en comparación con el grupo de PHMO alto flujo. En nuestro estudio **no se pudo demostrar una diferencia significativa entre ambos grupos PHMO y PHM** (Figura 39), probablemente relacionada con un tiempo de suministro de oxígeno más corto (30 min de precarga).

En cuanto a los iones, los **niveles de Na⁺ y K⁺** en el líquido de perfusión pueden utilizarse como medida indirecta de la integridad y la muerte celular

DISCUSIÓN

(177, 178). En la célula dañada, el K^+ sigue su gradiente electroquímico hasta el espacio extracelular, lo que da lugar a su aumento el líquido de perfusión. En nuestro estudio, los niveles de Na^+ y K^+ **no mostraron diferencias entre los grupos (**

Tabla 12), pudiendo interpretarse que el grado de lesión celular fue similar en ambos.

miRNA

Los miRNA han ganado interés en los últimos tiempos debido a su posible papel como potentes reguladores de enfermedades, incluida la enfermedad renal. Estos miRNA representan pequeños transcritos de ARN no codificante que funcionan en la supresión de los genes, la expresión de las proteínas y/o la inhibición traslacional de la síntesis de las proteínas (119). Son, por tanto, **finos señalizadores de procesos celulares implicados en el daño renal isquémico** (119). Previamente, nuestro grupo investigador colaborador identificó un panel de miRNA útiles como biomarcadores del fracaso renal agudo (FRA) en la práctica clínica, mostrando su detección temprana y un alto valor diagnóstico (124, 125). Los miRNA incluidos en este panel son miR-210, miR-126, miR-127, miR-146, miR-10a, miR-101 miR-93, miR-27a, miR-26b y miR-29a. De hecho, los experimentos de perfil amplio del genoma han demostrado que algunos de estos miRNA (miR10a, miR27a, miR29a, miR101 y miR210) están altamente expresados en el tejido renal humano (179, 180), además de poder ser extraídos

DISCUSIÓN

y medidos en muestras de líquido de preservación, tal y como nuestro grupo ha comunicado previamente (181, 182).

Un subconjunto de estos miRNA formado por **miR-101 y miR-126** mostró su expresión más significativamente modificada en respuesta a las condiciones de preservación (Figura 41). Su análisis funcional reveló que miR-101 se asocia con el desarrollo del riñón, la adhesión celular y la endocitosis. Por otro lado, miR-126 se asocia con el desarrollo del riñón, así como con el transporte basado en microtúbulos y las uniones de adhesión celular, que son características y funciones importantes de las células epiteliales del túbulo proximal. La integridad de la red capilar peritubular renal es un importante factor limitante en la recuperación de la lesión renal por I/R. Se ha demostrado que el miR-126 mejora la regeneración vascular mediante la movilización de células madre. Por todo ello, estos miRNA parecen participar en la recuperación del tejido renal y, por tanto, podrían ser biomarcadores útiles en la evaluación de injertos durante la preservación (123, 127).

Estos miRNA en la solución de preservación, **miR-101 y miR-126**, **presentaron una expresión mayor en el grupo PHMO**. Hasta donde sabemos, este es el primer informe de un conjunto de miRNA relacionados con la respuesta del injerto renal a las condiciones de conservación mediante PHMO. Un hecho inherente a los miRNA como biomarcadores es su naturaleza de finos reguladores de los procesos celulares, lo que condiciona la obtención de resultados acortando el intervalo de las diferencias que puedan observarse en su detección. Dicho de otro modo, en los estudios de miRNA como biomarcadores en este contexto, las diferencias observadas en su medición no

DISCUSIÓN

son de gran magnitud. Y este hecho puede tener cierta trascendencia en los resultados observados en nuestro trabajo, en el que se observan **claras tendencias de expresión modificada de los miRNA en el grupo PHMO**, pero tan sólo en 2 de ellos (miR-101 y miR-126) se obtiene la significación estadística, quizá en parte influenciado por el bajo tamaño muestral.

Con el fin de establecer si las diferencias detectadas en la expresión de miRNA en el líquido de perfusión fueron resultado de la inducción de su expresión o bien fruto de un aumento en su secreción, se determinó la expresión de ellos en las biopsias en parafina de tejido renal tomadas antes y después de la perfusión. Los **injertos del grupo PHMO mostraron un cambio menor entre la expresión de miRNA en biopsias renales pre y post perfusión**. Estos miRNA tisulares y los excretados a la solución de preservación podrían tener diferentes funciones y significado biológico. La secreción de miRNA a los fluidos extracelulares es un proceso selectivo en el que éstos no reflejan el perfil de miRNA de las células madre (183). Lo que parece significativo es el diferente perfil de expresión de miRNA durante la PHMO, en particular en miR-101 y miR-126. Mientras que su expresión se mostró significativamente modificada en el líquido de perfusión, no se encontraron diferencias significativas de esta expresión en las biopsias de los dos grupos PHMO y PHM. Ello permite inferir que el suministro de O₂ promueve la secreción de miRNA a la solución de perfusión.

Aunque nuestros datos no permiten establecer un análisis estadístico de suficiente solidez debido al tamaño muestral, es factible señalar a estos miRNA como **hipotéticos biomarcadores de isquemia con utilidad en la predicción**

de la evolución del injerto durante la preservación, ya que parecen tener una implicación biológica en nuestro contexto clínico.

Respiración mitocondrial y producción de ATP

En nuestro estudio experimental, para la detección del ATP, se emplearon analizadores *SeaHorse* que miden la tasa de consumo de oxígeno (OCR) y la tasa de acidificación extracelular como indicadores de respiración mitocondrial y glucólisis anaerobia (Figura 43). Esta plataforma de alto rendimiento proporciona una **medición precisa del estrés y energía mitocondriales** (184). Sin embargo, su principal hándicap radica en que su medición no es directa, sino que requiere el cultivo de las células obtenidas de las biopsias del injerto, hecho que puede introducir una serie de artefactos que repercutan en la valoración. En nuestro trabajo, tras el TIC preestablecido de 30 min se observa un efecto positivo de la máquina en forma de aumento de la producción de ATP, el cual es ligeramente mayor en el grupo PHM. Además, un alto nivel de fuga de protones y el correspondiente bajo nivel de capacidad respiratoria de reserva representan una pérdida de eficiencia de la cadena respiratoria, la cual se observa después de la isquemia caliente. Esta **pérdida de eficiencia se ve atenuada por la PHM y empeora tras la adición de oxígeno de la PHMO** (Figura 43). La fuga de protones es la principal causa de producción de superóxido, conocido RLO que incrementa el estrés oxidativo e induce por tanto la activación de mecanismos antioxidantes naturales como superóxido dismutasa (SOD1 y SOD2).

DISCUSIÓN

Frente a esta medición en cultivos celulares, otros autores (81, 102, 113, 121) realizan la identificación directa de moléculas o metabolitos implicados en las rutas energéticas mitocondriales como el succinato, ATP, ADP, AMP, FMN, NADH, etc... mediante diferentes técnicas de cromatografía líquida y espectrometría de masas (185). Algunos de estos metabolitos como el **flavín mononucleótido (FMN)**, un antioxidante más potente que el NAD, han cobrado reciente interés por las evidentes ventajas que ofrece. Su condición de receptor para la luz azul y ser por tanto un agente luminiscente (186) ha sido aprovechada por algunos autores para testarlo en tiempo real durante la preservación en máquina. Su **determinación en tiempo real por espectroscopia de fluorescencia en el líquido de preservación durante la PHMO es fácil y rápida**, y requiere únicamente de una fuente de luz halógena emisora y de una sonda receptora que cuantifique la cantidad de luz fluorescente emitida por el FMN. Esta medición dura tan sólo unos segundos y su valor final puede ser mostrado instantáneamente en un monitor. Esta novedosa y a la vez sencilla técnica de determinación en tiempo real del FMN durante la PHMO ha sido descrita por el grupo suizo de *Dutkowski*, demostrando su utilidad como biomarcador de lesión en el complejo I de la CTE y como predictor de función temprana y riesgo de pérdida del injerto (99). Es por eso que este grupo ha ensayado posteriormente esta técnica con animales en preservación renal (187) y recientemente también al entorno de la perfusión normotérmica renal y hepática (188).

Kaminski et al determinaron el consumo de oxígeno y la síntesis de ATP celular durante la PHM (sin oxígeno) en un modelo porcino después de un TIC

DISCUSIÓN

de 60 minutos (102). A diferencia de nuestro grupo, para ello emplearon la **detección directa de la molécula ATP mediante colorimetría en las biopsias de los injertos preservados**. En su estudio, observaron que el TIC de 1 hora redujo el ATP en un 90%. Comparándolo con nuestros resultados, la pO_2 de su grupo PHM presentó una caída más rápida y pronunciada para después estabilizarse. En nuestro estudio, la media de pO_2 en el grupo PHM varió de 162,9 mmHg (SD 33,5) en el punto basal a 92,9 mmHg (SD 18,5) al final de la perfusión, mientras que para *Kaminski et al* la pO_2 permaneció poco tiempo (10 min) a nivel atmosférico (145 mmHg) y luego disminuyó rápida y significativamente hasta un valor final de 6,8 mmHg. Estos hallazgos pueden estar relacionados con una lesión isquémica más grave en su modelo, cuyo TIC fue de 60 min. En sus resultados, la PHM presentó mayor consumo de oxígeno (2,7 vs 0,5 mmol/min/100 g) y mayor nivel de ATP al final de preservación (5,8 vs 0,1 mmol/L), lo que podría explicar la superioridad establecida de la PHM sobre la PHE (102).

Por el contrario, otros autores han demostrado que la oxigenación promueve el metabolismo aeróbico, reflejado en concentraciones más altas de glutamato, y disminuye la actividad glucolítica, representada en concentraciones más bajas de alanina y lactato (81, 189, 190). *Venema et al* midieron el acoplamiento metabólico o el uso eficiente del oxígeno para la producción de ATP, representado por el transporte de Na^+ en las células epiteliales tubulares, y observaron que se mejoraba en los riñones con PHM en comparación con los riñones con PHE, independientemente de la concentración de oxígeno. Este transporte activo de Na^+ requiere ATP como fuente de energía (72). Esta lesión

DISCUSIÓN

tubular medida como **excreción fraccionada de Na⁺ urinario** se utiliza en algunos modelos de animales porcinos para evaluar el impacto de la lesión por I/R (191, 192).

La **detección de ATP en vivo mediante espectroscopia de resonancia magnética ³¹P** durante la PHMO en un modelo porcino experimental demostró la resíntesis de ATP durante la PHMO después de un período inicial de TIC o PHE, pero no si ambos se combinan (121). La resíntesis de ATP disminuye a medida que aumenta el tiempo de PHE. Por lo tanto, después del período de TIC que define la DA, la PHM debe ser introducida inmediatamente para así lograr una mayor resíntesis de ATP (106, 121). Esta detección es también en tiempo real durante la PHM, pero requiere de una infraestructura mayor como es el dispositivo de resonancia magnética, frente a la sencillez de la determinación de FMN por fluorescencia (99, 187) .

Una limitación achacable a nuestro estudio podría ser no haber realizado determinaciones de metabolismo celular en las biopsias del riñón en su momento final, una vez ya trasplantado. Aunque de potencial utilidad en la investigación y con probable interés metodológico, sus determinaciones fueron descartadas por nuestro grupo debido a una priorización de la seguridad quirúrgica del autotrasplante, debido a los potenciales riesgos de sangrado y morbilidad en el animal que un modelo de PNEV no tendría. Estas determinaciones si fueron realizadas por otros autores como *Darius et al*, empleando técnicas de cromatografía líquida y espectrometría de masas según la técnica descrita por *Coulier* (185). En sus resultados, a pesar de encontrar unos niveles de ATP 8 veces superiores tras la PHMO frente a la PHM, no encontraron diferencias en

los niveles de metabolitos y moléculas relevantes como el lactato, succinato, glutamato, ATP, ADP, AMP y el NADH al final de la perfusión en máquina y tras la reperfusión (113).

Peroxidación lipídica

El **malondialdehído (MDA)** es un producto de la peroxidación de los lípidos poliinsaturados de la membrana mitocondrial, muy empleado como **biomarcador de estrés oxidativo** (193). Esta peroxidación lipídica, que acontece tras la interacción del oxígeno con una CTE disfuncional y merma a la membrana mitocondrial haciéndole perder sus capacidades de intercambio y fluidez, ha sido determinado en diversos estudios preclínicos con resultados contradictorios y en ocasiones inconsistentes (72, 81, 101, 108).

El **aumento de la peroxidación lipídica en el grupo PHMO** de nuestro estudio, representada por los niveles de MDA en las muestras del injerto (

Figura 42), revela que hay un aumento de los RLO y por consiguiente un mayor estrés oxidativo en presencia de niveles más altos de oxígeno. Este hecho también fue observado por *Hoyer et al*, con mayores niveles de MDA a medida que aumenta la concentración de O₂ en los grupos PHMO, aunque sin impacto en la función renal tras la reperfusión (108). Sin embargo, nuestro grupo observó una **correlación significativa entre los niveles de peroxidación lipídica posteriores a la perfusión y la situación funcional post-TR**, representada por los niveles de creatinina en el día +1 y la LDH al final del seguimiento (Figura

47). Por tanto, este nivel de peroxidación lipídica determinado en las biopsias post perfusión podría constituir un indicador de estrés tisular y un predictor de la evolución del injerto renal posterior al trasplante que se sumaría al FMN detectado en tiempo real durante la preservación por *Muller et al* (99), formando parte de la estrategia de evaluación de los injertos antes de ser implantados.

Sistemas antioxidantes

Las enzimas catalasa y superóxido dismutasa (SOD1 y SOD2) son sistemas antioxidantes celulares naturales que se activan para contrarrestar la formación de RLO como el superóxido. Para apoyar los resultados obtenidos sobre la respiración mitocondrial (*SeaHorse* y peroxidación lipídica), se determinó la expresión de genes antioxidantes en cultivos de tejidos, que parecen estar en consonancia (

Figura 45). Como es esperable, la situación basal inmediatamente tras el periodo de isquemia caliente es similar en ambos grupos. En cambio, en un contexto metabólico de potencial menor estrés oxidativo durante la PHM, estas enzimas SOD1, SOD2 y catalasa disminuyen significativamente de sus elevados niveles alcanzados tras el TIC. En cambio, **tras la PHMO los niveles de estas enzimas antioxidantes aumentan**, en relación con un mayor estrés oxidativo.

La medición de estas enzimas en las biopsias de los injertos también ha sido llevada a cabo por el grupo belga de *Darius*, obteniendo resultados similares a los nuestros (95, 113). En ellos, aunque no alcanzan la significación estadística, los niveles de SOD1 tras la PHMO se asemejan a los obtenidos tras la PHE, mientras que son inferiores tras la PHM.

Expresión génica de TEM

El fenómeno de transición epitelio-mesenquimal (TEM) consiste en un proceso dinámico por el que las células epiteliales adquieren progresivamente un fenotipo mesenquimal, con pérdida de las uniones célula-célula, modificaciones en el citoesqueleto y adquisición de marcadores como E-cadherina, fibronectina, vimentina y colágeno. El estrés oxidativo sostenido podría promover la fibrosis renal al promover la transición epitelio-mesenquimal (TEM) en las células epiteliales tubulares proximales. De hecho, bajo las condiciones de PHMO se observó una **disminución de la cadherina-E como marcador de integridad epitelial**, además de un aumento de la fibronectina, la vimentina y el colágeno como marcadores de TEM, aunque sin mostrar significación estadística (Figura 46). Este hallazgo sugiere que **la adición de oxígeno de la PHMO podría provocar la aparición de fibrosis**, comprometiendo los resultados de los injertos a largo plazo.

Histología

La evaluación histológica por microscopía óptica de las biopsias previas a la implantación **no mostró diferencias estructurales entre ambos grupos**, tal y como sucedió en el estudio de *Darius et al* (113), donde además no se correlacionaron con la función inicial del injerto. Esto podría reflejar una limitación de nuestro modelo de autotrasplante, en el que se emplearon cerdos jóvenes y

DISCUSIÓN

sanos, sin enfermedad renal preexistente y con sólo 30 minutos de TIC. Sin embargo, este tiempo es similar a la media de TIC en la mayoría de los programas clínicos de trasplante renal de DA (165), y es además el usado habitualmente en los modelos preclínicos existentes en la literatura (72, 107, 108, 113). Cabe destacar que, en nuestro trabajo, sí se observaron **casos más frecuentes de NI, NTA grave e IIA en el grupo PHM** (Figura 50 y Tabla 13) que, aunque no se tradujeron en un empeoramiento significativo de la función renal, sí presentaron un área bajo la curva (AUC) de creatinina mayor (74,0 – (IC95% 47,5-100,5)) que la del grupo PHMO (36,2 – (IC95%, 25,6-46,8)).

Algunos autores emplean el score histológico de *Hosgood et al* (194) para la lesión tubular aguda basado en 4 categorías: dilatación tubular, residuos tubulares, vacuolización e infiltración. Desafortunadamente, nuestro grupo no empleó esta clasificación en su metodología de investigación por un motivo puramente cronológico, ya que su fecha de publicación fue posterior al inicio de nuestro experimento.

Justificación del modelo animal

A pesar de su probada utilidad y extendida práctica en investigación, los modelos animales de experimentación presentan evidentes factores limitantes operativos y éticos. Garantizar un correcto cuidado perioperatorio de los animales que repercuta positivamente en su supervivencia y limitación del sufrimiento requiere de una **importante infraestructura material, física y personal**. Su ventaja principal y su principal justificación viene dada por el interés

DISCUSIÓN

y relevancia del **estudio de la función renal como variable sólida** de los resultados de estos experimentos, sin duda más extrapolable al objeto final de la experimentación, que es el humano. Sin embargo, existen alternativas quizá más eficientes en este tipo de ensayos, como es el empleo de la PNEV una vez ejecutado el experimento de la preservación. Estos **modelos con PNEV** proporcionan pruebas muy inmediatas del estado del riñón, siendo su principal limitante el corto periodo de reperusión (156). Además, en el caso de órganos pares como el riñón permiten obtener un **mayor número de injertos empleando menos animales** (44). Por ello, desde un punto de vista ético y considerando “*el principio de las 3Rs de la experimentación animal*” (155), estos modelos tienen un mejor encaje para examinar los primeros cambios celulares y moleculares que la función renal a medio-largo plazo, y quizá por esto tengan una mejor cabida en la evaluación de ideas y ensayos preliminares como el nuestro. No obstante, también requieren de una **logística importante** como es la tecnología de la PNEV, de la que no resulta sencillo disponer.

Limitaciones

Reconocemos que existen una serie de limitaciones inherentes a nuestro trabajo experimental con un modelo de autotrasplante porcino. En primer lugar, el **bajo tamaño muestral** de este tipo de estudios experimentales preclínicos (Tabla 14), además de sus conocidas dificultades y el debido rigor exigido en estos modelos, regulados por el *RD 53/2013 de 1 de febrero* y controlados por el *Comité de Ética de Experimentación Animal* local. Adicionalmente, el número

DISCUSIÓN

de animales incluidos en el análisis del grupo experimental PHMO fue limitado, en gran medida por el comentado **problema con el oxigenador de membrana** empleado al inicio, lo que sin duda dificulta la identificación de diferencias estadísticas.

En segundo lugar, los modelos porcinos que utilizan **animales jóvenes y sanos, sin enfermedad renal preexistente**, pueden requerir un tiempo de lesión isquémica más largo (>22 horas) para tener impacto en la histología previa y posterior a la preservación.

En tercer lugar, la **recuperación de los animales y su supervivencia post trasplante** puede presentar limitaciones causadas por eventos como la FRR, la cual puede ser secundaria a distintas causas de gravedad variable y cuyo manejo en el animal difiere del humano.

En cuarto lugar, la **evaluación del metabolismo mitocondrial y respiración celular** se realizó mediante una tecnología (*SeaHorse*) que requiere el cultivo de las células tubulares renales obtenidas de las biopsias, proceso que por sí mismo puede producir alteraciones que dificulten o modifiquen la evaluación de los resultados. Frente a ello se posicionan metodologías de imagen empleadas por otros autores como la RNM (106, 121, 195), la espectrometría de masas (185) o de fluorescencia (99), que ofrecen una **evaluación en vivo de los niveles de ATP y de metabolitos implicados en la respiración celular mitocondrial**. Nuestro grupo optó por *SeaHorse* por razones tanto de infraestructura, al no disponer de resonancia, como por un mero motivo cronológico en el caso de la fluorescencia de FMN en tiempo real, cuya

DISCUSIÓN

descripción en la literatura data de 2019 (99). Entre algunas novedosas técnicas de imagen que pudieran contribuir a la evaluación de la viabilidad de estos injertos señaladas por algunos autores se encuentra la ecografía con contraste de microburbujas, que ofrece información de alta resolución de la microvascularización del riñón y su correlación con la función del injerto (196, 197). Nuestro grupo atesora amplia experiencia en esta técnica en el estudio y seguimiento de masas renales (198, 199), así como una experiencia preliminar en la evaluación de la función del injerto trasplantado (200). Su incorporación a este estudio experimental que se presenta no se llevó a cabo por una mera cuestión cronológica, ya que éste se inició antes.

Por último, la hipótesis de que el **aporte de O₂ mediante una oxigenación de burbujeo integrada en la PHMO** podría ser capaz de elevar uniformemente los niveles de pO₂ a niveles suprafisiológicos (>500 mmHg) aún no se ha demostrado. Nuestro experimento no ha demostrado la capacidad de la estrategia de precarga temprana de oxígeno para mantener la pO₂ suprafisiológica más allá de un corto período de tiempo al finalizar la precarga, en contraste con el uso más común de la oxigenación continua de membrana en los estudios de la literatura.

DISCUSIÓN

CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

7.1. Respecto a los objetivos primarios

Se observó una tendencia hacia una mejor función renal con niveles más bajos de creatinina sérica en el grupo PHMO que no alcanzó la significación estadística.

De igual modo, la supervivencia de los animales fue ligeramente mayor en el grupo PHMO, aunque sin alcanzar la significación estadística.

7.2. Respecto a los objetivos secundarios

La precarga inicial de 30 minutos al inicio de la PHMO con oxigenador de burbuja no logró presiones parciales de oxígeno sostenidamente elevadas durante la perfusión del injerto en máquina.

La respiración mitocondrial del grupo experimental PHMO, expresada por la producción de ATP, la fuga de electrones y la capacidad respiratoria de reserva fueron inferiores a las del grupo PHM, lo que representaría una mayor pérdida de eficiencia de la cadena respiratoria después del periodo de isquemia caliente en el grupo PHMO.

Los niveles de peroxidación lipídica del grupo experimental PHMO fueron superiores a los del grupo control PHM y alcanzaron la significación estadística, en relación con un mayor estrés oxidativo.

CONCLUSIONES

La expresión de los sistemas antioxidantes celulares (SOD1, SOD2 y catalasa) se incrementa sustancialmente en el grupo PHMO, como consecuencia de un mayor estrés oxidativo. En el caso concreto de la SOD1, este incremento alcanzó la significación estadística.

La expresión de la transición epitelio-mesenquimal y marcadores de fibrosis fue mayor en el grupo PHMO.

La expresión de la mayoría de los miRNA fue mayor en el grupo PHMO, aunque las diferencias sólo alcanzaron significación estadística para miRNA-126 y miRNA-101. Los injertos de PHMO y PHM presentan un perfil diferente de secreción de miRNA que puede ser predictivo del metabolismo celular.

El papel y la seguridad la PHMO no se ha aclarado completamente y, por consiguiente, su suministro durante la preservación hipotérmica en máquina no puede ser considerado práctica habitual.

BIBLIOGRAFÍA

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Eriksson JK, Neovius M, Jacobson SH, Elinder CG, Hylander B. Healthcare costs in chronic kidney disease and renal replacement therapy: a population-based cohort study in Sweden. *BMJ Open*. 2016;6(10):e012062.
2. Nefrología. SEd. Documento de consenso sobre la Enfermedad Renal Crónica. Madrid: Sociedad Española de Nefrología (SEN); 2012.
3. Group. KDIGO. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Kidney International Supplements*. 2013;3(1):1-150.
4. ONT. Registro Español de Enfermos Renales (REER): Informe 2020. Madrid: Organización Nacional de Trasplantes; 2021.
5. Evans RW, Manninen DL, Garrison LP, Jr., Hart LG, Blagg CR, Gutman RA, et al. The quality of life of patients with end-stage renal disease. *N Engl J Med*. 1985;312(9):553-9.
6. ONT. Actividad de donación y trasplante España 2020. Madrid: Organización Nacional de Trasplantes; 2021.
7. Eurotransplant. Annual Report 2020: Eurotransplant; 2021 [Available from: <https://www.eurotransplant.org/statistics/annual-report/>].
8. Hart A, Lentine KL, Smith JM, Miller JM, Skeans MA, Prentice M, et al. OPTN/SRTR 2019 Annual Data Report: Kidney. *Am J Transplant*. 2021;21 Suppl 2:21-137.
9. Tullius SG, Rabb H. Improving the Supply and Quality of Deceased-Donor Organs for Transplantation. *N Engl J Med*. 2018;378(20):1920-9.
10. GODT. International report on organ donation and transplant activities. World Health Organization (WHO) & Organización Nacional de Trasplantes (ONT); 2021 December 2021.
11. ONT. Donación en asistolia en España: situación actual y recomendaciones. Documento de Consenso Nacional 2012. Madrid: Organización Nacional de Trasplantes; 2012.

BIBLIOGRAFÍA

12. Thuong M, Ruiz A, Evrard P, Kuiper M, Boffa C, Akhtar MZ, et al. New classification of donation after circulatory death donors definitions and terminology. *Transpl Int.* 2016;29(7):749-59.
13. ONT. Informe de actividad de donación y trasplante de donantes en asistolia. Madrid: ONT; 2019.
14. Broecker V, Mengel M. The significance of histological diagnosis in renal allograft biopsies in 2014. *Transpl Int.* 2015;28(2):136-43.
15. Summers DM, Watson CJ, Pettigrew GJ, Johnson RJ, Collett D, Neuberger JM, et al. Kidney donation after circulatory death (DCD): state of the art. *Kidney Int.* 2015;88(2):241-9.
16. Dominguez-Gil B, Haase-Kromwijk B, Van Leiden H, Neuberger J, Coene L, Morel P, et al. Current situation of donation after circulatory death in European countries. *Transpl Int.* 2011;24(7):676-86.
17. Hoogland ER, Snoeijs MG, Winkens B, Christaans MH, van Heurn LW. Kidney transplantation from donors after cardiac death: uncontrolled versus controlled donation. *Am J Transplant.* 2011;11(7):1427-34.
18. Summers DM, Johnson RJ, Hudson A, Collett D, Watson CJ, Bradley JA. Effect of donor age and cold storage time on outcome in recipients of kidneys donated after circulatory death in the UK: a cohort study. *The Lancet.* 2013;381(9868):727-34.
19. Gomez dos Santos V, Ruiz M, Nicolás VD, Alvarez S, Hevia V, Elias S, et al. Perfusion parameters during Hypothermic Machine Perfusion in Expanded Criteria Donors (ECD) and Donors after Circulatory Death (DCD). Does comparison allow their categorization? *Transplantation.* 2018;102(S495).
20. Rodríguez-Martínez D, del Cañizo López JF, Cabello Benavente R, Pedemonte G, Subirá Ríos D, Lledó García E. Aspectos técnicos de los dispositivos de perfusión de órgano aislado. *Actas Urológicas Españolas.* 2008;32(1):59-66.
21. Wight J, Chilcott J, Holmes M, Brewer N. The clinical and cost-effectiveness of pulsatile machine perfusion versus cold storage of kidneys for transplantation retrieved from heart-beating and non-heart-beating donors. *Health Technology Assessment.* 2003;7(25).

BIBLIOGRAFÍA

22. Reddy SP, Brockmann J, Friend PJ. Normothermic perfusion: a mini-review. *Transplantation*. 2009;87(5):631-2.
23. Lee CY, Mangino MJ. Preservation methods for kidney and liver. *Organogenesis*. 2009;5(3):105-12.
24. Moers C, Smits JM, Maathuis MH, Treckmann J, van Gelder F, Napieralski BP, et al. Machine perfusion or cold storage in deceased-donor kidney transplantation. *N Engl J Med*. 2009;360(1):7-19.
25. Taylor MJ, Baicu SC. Current state of hypothermic machine perfusion preservation of organs: The clinical perspective. *Cryobiology*. 2010;60(3 Suppl):S20-35.
26. Le Gallois CJJ. Experiences Sur Le Principe de La Vie: Notamment Sur Celui Des Mouvements Du Coeur, Et Sur Le Siege de Ce Principe: D'Hautel; 1812.
27. Chain E, Florey HW, Gardner AD, Oxford DM, Heatley NG, Jennings MA, et al. Penicillin as a chemotherapeutic agent. *Lancet*. 1940;236(6104):226-8.
28. Division of experimental surgery RlfMR. Apparatus to Circulate Liquid under Constant Pressure in a Closed System. *Science*. 1931;73(1899):566.
29. Mouzas GL. The present status of organ preservation: a review. *Postgraduate Medical Journal*. 1967;43(505):712-5.
30. Bickford RG, Winton FR. The influence of temperature on the isolated kidney of the dog. *J Physiol*. 1937;89(2):198-219.
31. Couch NP, Cassie GF, Murray JE. Survival of the excised dog kidney perfused in a pump-oxygenator system. I. Circulatory changes in the hypothermic preparation. *Surgery*. 1958;44(4):666-82.
32. Lapchinsky AG. Recent results of experimental transplantation of preserved limbs and kidneys and possible use of this technique in clinical practice. *Ann N Y Acad Sci*. 1960;87(1):539-71.

BIBLIOGRAFÍA

33. Humphries AL, Jr., Russell R, Ostafin J, Goodrich SM, Moretz WH. Successful reimplantation of dog kidney after 24 hour storage. *Surg Forum*. 1962;13:380-2.
34. Hoffman A, Burger C, Persky L. Influence of mannitol infusion upon extracorporeal renal storage. *Surg Forum*. 1964;15:500-1.
35. Hoffman A, Burger C, Persky L. Extracorporeal Renal Storage. *Invest Urol*. 1965;2:567-73.
36. Belzer FO, Ashby BS, Dunphy JE. 24-hour and 72-hour preservation of canine kidneys. *Lancet*. 1967;2(7515):536-8.
37. Belzer FO, Ashby BS, Gulyassy PF, Powell M. Successful seventeen-hour preservation and transplantation of human-cadaver kidney. *N Engl J Med*. 1968;278(11):608-10.
38. Belzer FO, Reed TW, Pryor JP, Kountz SL, Dunphy JE. Cause of renal injury in kidneys obtained from cadaver donors. *Surg Gynecol Obstet*. 1970;130:467.
39. Figueiredo A, Lledo-Garcia E. *European Textbook on Kidney Transplantation*. Arnhem, The Netherlands: European Association of Urology. The EAU Section of Transplantation in Urology; 2017 24-28 March 2017.
40. Collins GM, Bravo-Shugarman M, Terasaki PI. Kidney preservation for transportation. Initial perfusion and 30 hours' ice storage. *Lancet*. 1969;2(7632):1219-22.
41. Belzer FO, Southard JH. The future of kidney preservation. *Transplantation*. 1980;30(3):161-5.
42. Belzer FO, Glass NR, Sollinger HW, Hoffmann RM, Southard JH. A new perfusate for kidney preservation. *Transplantation*. 1982;33(3):322-3.
43. Ploeg RJ, van Bockel JH, Langendijk PT, Groenewegen M, van der Woude FJ, Persijn GG, et al. Effect of preservation solution on results of cadaveric kidney transplantation. The European Multicentre Study Group. *Lancet*. 1992;340(8812):129-37.

BIBLIOGRAFÍA

44. Szajer M, Shah G, Kittur D, Searles B, Li L, Bruch D, et al. A novel extracorporeal kidney perfusion system: a concept model. *Perfusion*. 2004;19(5):305-10.
45. Moers C, van Rijt G, Ploeg RJ, Leuvenink HG. The effect of normothermic recirculation before cold preservation on post-transplant injury of ischemically damaged donor kidneys. *Transpl Int*. 2012;25(2):210-7.
46. Moustafellos P, Hadjianastassiou V, Roy D, Muktadir A, Contractor H, Vaidya A, et al. The influence of pulsatile preservation in kidney transplantation from non-heart-beating donors. *Transplant Proc*. 2007;39(5):1323-5.
47. Balupuri S, Buckley P, Mohamed M, Cornell C, Mantle D, Kirby J, et al. Assessment of non-heart-beating donor (NHBD) kidneys for viability on machine perfusion. *Clin Chem Lab Med*. 2000;38(11):1103-6.
48. Kwiatkowski A, Wszola M, Kosieradzki M, Danielewicz R, Ostrowski K, Domagala P, et al. The early and long term function and survival of kidney allografts stored before transplantation by hypothermic pulsatile perfusion. A prospective randomized study. *Ann Transplant*. 2009;14(1):14-7.
49. Ruiz-Hernandez M, Gomez-Dos Santos V, Diaz-Perez D, Fernandez-Alcalde A, Hevia-Palacios V, Alvarez-Rodriguez S, et al. Experience With Hypothermic Machine Perfusion in Expanded Criteria Donors: Functional Outcomes. *Transplant Proc*. 2019;51(2):303-6.
50. Gomez V, Galeano C, Diez V, Bueno C, Diaz F, Burgos FJ. Economic impact of the introduction of machine perfusion preservation in a kidney transplantation program in the expanded donor era: cost-effectiveness assessment. *Transplant Proc*. 2012;44(9):2521-4.
51. Feldman HI, Gayner R, Berlin JA, Roth DA, Silibovsky R, Kushner S, et al. Delayed function reduces renal allograft survival independent of acute rejection. *Nephrol Dial Transplant*. 1996;11(7):1306-13.
52. de Vries B, Snoeijs MG, von Bonsdorff L, Ernest van Heurn LW, Parkkinen J, Buurman WA. Redox-active iron released during machine perfusion predicts viability of ischemically injured deceased donor kidneys. *Am J Transplant*. 2006;6(11):2686-93.
53. Kosieradzki M, Danielewicz R, Kwiatkowski A, Polak WP, Wszola M, Fesołowicz S, et al. Early function of kidneys stored by continuous hypothermic

BIBLIOGRAFÍA

pulsatile perfusion can be predicted using a new “viability index”. *Transplantation Proceedings*. 2002;34(2):541-3.

54. Metcalfe MS, Waller JR, Saunders RN, Veitch PS, Nicholson ML. Measuring intrarenal vascular resistance during machine perfusion preservation does not improve the assessment of renal viability made on clinical grounds. *Transplantation Proceedings*. 2001;33(7-8):3745-6.

55. Nyberg SL, Baskin-Bey ES, Kremers W, Prieto M, Henry ML, Stegall MD. Improving the prediction of donor kidney quality: deceased donor score and resistive indices. *Transplantation*. 2005;80(7):925-9.

56. Yushkov YY, Stern J, Ying A, Icitovic N, Dikman SH, Sheth M, et al. Identifying risk factors in renal allografts before transplant: machine-measured renal resistance and posttransplant allograft survival. *Prog Transplant*. 2012;22(2):175-82.

57. Sonnenday CJ, Cooper M, Kraus E, Gage F, Handley C, Montgomery RA. The hazards of basing acceptance of cadaveric renal allografts on pulsatile perfusion parameters alone. *Transplantation*. 2003;75(12):2029-33.

58. Gomez V, Orosa A, Rivera M, Diez-Nicolas V, Hevia V, Alvarez S, et al. Resistance index determination in the pre and post kidney transplantation time points in graft dysfunction diagnosis. *Transplant Proc*. 2015;47(1):34-7.

59. Burgos Revilla FJ, Hevia V, Diez V, Carracedo D, Gomis A, Orosa A, et al. Machine perfusion: initial results in an expanded criteria donor kidney transplant program. *Transplant Proc*. 2015;47(1):19-22.

60. Jochmans I, Moers C, Smits JM, Leuvenink HG, Treckmann J, Paul A, et al. The prognostic value of renal resistance during hypothermic machine perfusion of deceased donor kidneys. *Am J Transplant*. 2011;11(10):2214-20.

61. Moeckli B, Sun P, Lazeyras F, Morel P, Moll S, Pascual M, et al. Evaluation of donor kidneys prior to transplantation: an update of current and emerging methods. *Transpl Int*. 2019;32(5):459-69.

62. Bond M, Pitt M, Akoh J, Moxham T, Hoyle M, Anderson R. The effectiveness and cost-effectiveness of methods of storing donated kidneys from deceased donors: a systematic review and economic model. *Health Technol Assess*. 2009;13(38):iii-iv, xi-xiv, 1-156.

BIBLIOGRAFÍA

63. Light JA, Gage F, Kowalski AE, Sasaki TM, Callender CO. Immediate function and cost comparison between static and pulsatile preservation in kidney recipients. *Clin Transplant*. 1996;10(3):233-6.
64. Deng R, Gu G, Wang D, Tai Q, Wu L, Ju W, et al. Machine perfusion versus cold storage of kidneys derived from donation after cardiac death: a meta-analysis. *PLoS One*. 2013;8(3):e56368.
65. Bathini V, McGregor T, McAlister VC, Luke PP, Sener A. Renal perfusion pump vs cold storage for donation after cardiac death kidneys: a systematic review. *J Urol*. 2013;189(6):2214-20.
66. Jochmans I, Moers C, Smits JM, Leuvenink HG, Treckmann J, Paul A, et al. Machine perfusion versus cold storage for the preservation of kidneys donated after cardiac death: a multicenter, randomized, controlled trial. *Ann Surg*. 2010;252(5):756-64.
67. van der Vliet JA, Kievit JK, Héné RJ, Hilbrands LB, Kootstra G. Preservation of non-heart-beating donor kidneys: a clinical prospective randomised case-control study of machine perfusion versus cold storage. *Transplantation Proceedings*. 2001;33(1-2).
68. Martinez Arcos L, Fabuel Alcaniz JJ, Gomez Dos Santos V, Burgos Revilla FJ. Functional Results of Renal Preservation in Hypothermic Pulsatile Machine Perfusion Versus Cold Preservation: Systematic Review and Meta-Analysis of Clinical Trials. *Transplant Proc*. 2018;50(1):24-32.
69. Watson CJ, Wells AC, Roberts RJ, Akoh JA, Friend PJ, Akyol M, et al. Cold machine perfusion versus static cold storage of kidneys donated after cardiac death: a UK multicenter randomized controlled trial. *Am J Transplant*. 2010;10(9):1991-9.
70. Tingle SJ, Figueiredo RS, Moir JA, Goodfellow M, Talbot D, Wilson CH. Machine perfusion preservation versus static cold storage for deceased donor kidney transplantation. *Cochrane Database Syst Rev*. 2019;3:CD011671.
71. Debout A, Foucher Y, Trebern-Launay K, Legendre C, Kreis H, Mourad G, et al. Each additional hour of cold ischemia time significantly increases the risk of graft failure and mortality following renal transplantation. *Kidney Int*. 2015;87(2):343-9.

BIBLIOGRAFÍA

72. Venema LH, Brat A, Moers C, t Hart NA, Ploeg RJ, Hannaert P, et al. Effects of Oxygen During Long-term Hypothermic Machine Perfusion in a Porcine Model of Kidney Donation After Circulatory Death. *Transplantation*. 2019;103(10):2057-64.
73. Franklin G, Cannon R. Machine perfusion for improving outcomes following renal transplant: current perspectives. *Transplant Research and Risk Management*. 2016;8:1.
74. Wszola M, Kwiatkowski A, Diuwe P, Domagala P, Gorski L, Kieszek R, et al. One-year results of a prospective, randomized trial comparing two machine perfusion devices used for kidney preservation. *Transpl Int*. 2013;26(11):1088-96.
75. Gallinat A, Fox M, Luer B, Efferz P, Paul A, Minor T. Role of pulsatility in hypothermic reconditioning of porcine kidney grafts by machine perfusion after cold storage. *Transplantation*. 2013;96(6):538-42.
76. Cudas R, Thuillier R, Hauet T, Badet L. Renoprotective effect of pulsatile perfusion machine RM3: pathophysiological and kidney injury biomarker characterization in a preclinical model of autotransplanted pig. *BJU Int*. 2012;109(1):141-7.
77. Favreau F, Rossard L, Zhang K, Desurmont T, Manguy E, Belliard A, et al. Expression and modulation of translocator protein and its partners by hypoxia reoxygenation or ischemia and reperfusion in porcine renal models. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2009;297(1):F177-90.
78. de Vries EE, van Smaalen TC, Boer J, Hoogland ER, Krivitski NM, Snoeijs MG, et al. Measurement of renovascular circulating volume during hypothermic organ perfusion. *Transplantation*. 2013;95(9):1100-4.
79. Hosgood SA, Bagul A, Nicholson ML. Minimising cold ischaemic injury in an experimental model of kidney transplantation. *Eur J Clin Invest*. 2011;41(3):233-40.
80. Tozzi M, Franchin M, Soldini G, Ietto G, Chiappa C, Maritan E, et al. Impact of static cold storage VS hypothermic machine preservation on ischemic kidney graft: inflammatory cytokines and adhesion molecules as markers of ischemia/reperfusion tissue damage. Our preliminary results. *International Journal of Surgery*. 2013;11:S110-S4.

BIBLIOGRAFÍA

81. Patel K, Smith TB, Neil DAH, Thakker A, Tsuchiya Y, Higgs EB, et al. The Effects of Oxygenation on Ex Vivo Kidneys Undergoing Hypothermic Machine Perfusion. *Transplantation*. 2019;103(2):314-22.
82. Wright EM, Loo DD, Panayotova-Heiermann M, Hirayama BA, Turk E, Eskandari S, et al. Structure and function of the Na⁺/glucose cotransporter. *Acta Physiol Scand Suppl*. 1998;643:257-64.
83. Fuller BJ, Lee CY. Hypothermic perfusion preservation: the future of organ preservation revisited? *Cryobiology*. 2007;54(2):129-45.
84. Hendriks KDW, Brüggewirth IMA, Maassen H, Gerding A, Bakker B, Porte RJ, et al. Renal temperature reduction progressively favors mitochondrial ROS production over respiration in hypothermic kidney preservation. *J Transl Med*. 2019;17(1):265.
85. Weegman BP, Kirchner VA, Scott WE, 3rd, Avgoustiniatos ES, Suszynski TM, Ferrer-Fabrega J, et al. Continuous real-time viability assessment of kidneys based on oxygen consumption. *Transplant Proc*. 2010;42(6):2020-3.
86. Hosgood SA, Nicholson ML. Oxygen Supplementation Supports Energy Production During Hypothermic Machine Perfusion in a Model of Donation After Circulatory Death Donors. *Transplantation*. 2019;103(10):1980-1.
87. Mahboub P, Aburawi M, Karimian N, Lin F, Karabacak M, Fontan F, et al. The efficacy of HBOC-201 in ex situ gradual rewarming kidney perfusion in a rat model. *Artif Organs*. 2020;44(1):81-90.
88. Bhattacharjee RN, Patel SVB, Sun Q, Jiang L, Richard-Mohamed M, Ruthirakanthan A, et al. Renal Protection Against Ischemia Reperfusion Injury: Hemoglobin-based Oxygen Carrier-201 Versus Blood as an Oxygen Carrier in Ex Vivo Subnormothermic Machine Perfusion. *Transplantation*. 2020;104(3):482-9.
89. Kaminski J, Hannaert P, Kasil A, Thuillier R, Leize E, Delpy E, et al. Efficacy of the natural oxygen transporter HEMO(2) life(®) in cold preservation in a preclinical porcine model of donation after cardiac death. *Transpl Int*. 2019;32(9):985-96.
90. Le Meur Y, Badet L, Essig M, Thierry A, Büchler M, Drouin S, et al. First-in-human use of a marine oxygen carrier (M101) for organ preservation: A safety and proof-of-principle study. *Am J Transplant*. 2020.

BIBLIOGRAFÍA

91. Chouchani ET, Pell VR, Gaude E, Akseptijevic D, Sundier SY, Robb EL, et al. Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS. *Nature*. 2014;515(7527):431-5.
92. Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J*. 2009;417(1):1-13.
93. Wilson DF, Erecińska M, Drown C, Silver IA. The oxygen dependence of cellular energy metabolism. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1979;195(2):485-93.
94. Chouchani ET, Pell VR, James AM, Work LM, Saeb-Parsy K, Frezza C, et al. A Unifying Mechanism for Mitochondrial Superoxide Production during Ischemia-Reperfusion Injury. *Cell Metab*. 2016;23(2):254-63.
95. Darius T, Vergauwen M, Smith T, Gerin I, Joris V, Mueller M, et al. Brief O(2) uploading during continuous hypothermic machine perfusion is simple yet effective oxygenation method to improve initial kidney function in a porcine autotransplant model. *Am J Transplant*. 2020.
96. Ten V, Galkin A. Mechanism of mitochondrial complex I damage in brain ischemia/reperfusion injury. A hypothesis. *Mol Cell Neurosci*. 2019;100:103408.
97. Dutkowski P, Guarrera JV, de Jonge J, Martins PN, Porte RJ, Clavien PA. Evolving Trends in Machine Perfusion for Liver Transplantation. *Gastroenterology*. 2019;156(6):1542-7.
98. Dutkowski P, Clavien PA. Uploading cellular batteries: Caring for mitochondria is key. *Liver Transpl*. 2018;24(4):462-4.
99. Muller X, Schlegel A, Kron P, Eshmuminov D, Wurdinger M, Meierhofer D, et al. Novel Real-time Prediction of Liver Graft Function During Hypothermic Oxygenated Machine Perfusion Before Liver Transplantation. *Ann Surg*. 2019;270(5):783-90.
100. Coppolino G, Leonardi G, Andreucci M, Bolignano D. Oxidative Stress and Kidney Function: A Brief Update. *Curr Pharm Des*. 2018;24(40):4794-9.
101. Gallinat A, Paul A, Efferz P, Luer B, Swoboda S, Hoyer D, et al. Role of oxygenation in hypothermic machine perfusion of kidneys from heart beating donors. *Transplantation*. 2012;94(8):809-13.

BIBLIOGRAFÍA

102. Kaminski J, Delpech PO, Kaaki-Hosni S, Promeyrat X, Hauet T, Hannaert P. Oxygen Consumption by Warm Ischemia-Injured Porcine Kidneys in Hypothermic Static and Machine Preservation. *J Surg Res.* 2019;242:78-86.
103. Gallinat A, Amrillaeva V, Hoyer DP, Kocabayoglu P, Benko T, Treckmann JW, et al. Reconditioning by end-ischemic hypothermic in-house machine perfusion: A promising strategy to improve outcome in expanded criteria donors kidney transplantation. *Clin Transplant.* 2017;31(3).
104. Minor T, Efferz P, Lürer B. Hypothermic reconditioning by gaseous oxygen persufflation after cold storage of porcine kidneys. *Cryobiology.* 2012;65(1):41-4.
105. Hosgood SA, Nicholson HF, Nicholson ML. Oxygenated kidney preservation techniques. *Transplantation.* 2012;93(5):455-9.
106. Buchs JB, Lazeyras F, Ruttimann R, Nastasi A, Morel P. Oxygenated hypothermic pulsatile perfusion versus cold static storage for kidneys from non heart-beating donors tested by in-line ATP resynthesis to establish a strategy of preservation. *Perfusion.* 2011;26(2):159-65.
107. Darius T, Gianello P, Vergauwen M, Mourad N, Buemi A, De Meyer M, et al. The effect on early renal function of various dynamic preservation strategies in a preclinical pig ischemia-reperfusion autotransplant model. *Am J Transplant.* 2019;19(3):752-62.
108. Hoyer DP, Gallinat A, Swoboda S, Wohlschlaeger J, Rauen U, Paul A, et al. Influence of oxygen concentration during hypothermic machine perfusion on porcine kidneys from donation after circulatory death. *Transplantation.* 2014;98(9):944-50.
109. Thuillier R, Allain G, Celhay O, Hebrard W, Barrou B, Badet L, et al. Benefits of active oxygenation during hypothermic machine perfusion of kidneys in a preclinical model of deceased after cardiac death donors. *J Surg Res.* 2013;184(2):1174-81.
110. Kron P, Schlegel A, de Rougemont O, Oberkofler CE, Clavien PA, Dutkowski P. Short, Cool, and Well Oxygenated - HOPE for Kidney Transplantation in a Rodent Model. *Ann Surg.* 2016;264(5):815-22.
111. O'Callaghan JM, Pall KT, Pengel LHM, Consortium for Organ preservation in E. Supplemental oxygen during hypothermic kidney preservation: A systematic review. *Transplant Rev (Orlando).* 2017;31(3):172-9.

BIBLIOGRAFÍA

112. Lazeyras FBL HM, Vallee J, Nastasi A, Rutimann R, Morel P BJ. ATP resynthesis of pig kidneys during oxygenated hypothermic perfusion assessed by ³¹P CSI. *ESMRMB*. 2008;458.
113. Darius T, Vergauwen M, Smith TB, Patel K, Craps J, Joris V, et al. Influence of Different Partial Pressures of Oxygen During Continuous Hypothermic Machine Perfusion in a Pig Kidney Ischemia-reperfusion Autotransplant Model. *Transplantation*. 2020;104(4):731-43.
114. Jochmans I, Hofker HS, Davies L, Knight S, Pirenne J, Ploeg RJ. Oxygenated Hypothermic Machine Perfusion of Kidneys Donated after Circulatory Death: An International Randomised Controlled Trial. *Am J Transplant*. 2019;19 (suppl 3).
115. Jochmans I, Brat A, Davies L, Hofker HS, van de Leemkolk FEM, Leuvenink HGD, et al. Oxygenated versus standard cold perfusion preservation in kidney transplantation (COMPARE): a randomised, double-blind, paired, phase 3 trial. *The Lancet*. 2020;396(10263):1653-62.
116. Bontha SV, Maluf DG, Mueller TF, Mas VR. Systems Biology in Kidney Transplantation: The Application of Multi-Omics to a Complex Model. *Am J Transplant*. 2017;17(1):11-21.
117. Jochmans I, Pirenne J. Graft quality assessment in kidney transplantation: not an exact science yet! *Curr Opin Organ Transplant*. 2011;16(2):174-9.
118. de Vries EE, Hoogland ER, Winkens B, Snoeijs MG, van Heurn LW. Renovascular resistance of machine-perfused DCD kidneys is associated with primary nonfunction. *Am J Transplant*. 2011;11(12):2685-91.
119. Bhangoo RS, Hall IE, Reese PP, Parikh CR. Deceased-donor kidney perfusate and urine biomarkers for kidney allograft outcomes: a systematic review. *Nephrol Dial Transplant*. 2012;27(8):3305-14.
120. Hoogland ER, de Vries EE, Christiaans MH, Winkens B, Snoeijs MG, van Heurn LW. The value of machine perfusion biomarker concentration in DCD kidney transplantations. *Transplantation*. 2013;95(4):603-10.
121. Lazeyras F, Buhler L, Vallee JP, Hergt M, Nastasi A, Ruttimann R, et al. Detection of ATP by "in line" ³¹P magnetic resonance spectroscopy during oxygenated hypothermic pulsatile perfusion of pigs' kidneys. *MAGMA*. 2012;25(5):391-9.

BIBLIOGRAFÍA

122. Moers C, Varnav OC, van Heurn E, Jochmans I, Kirste GR, Rahmel A, et al. The value of machine perfusion perfusate biomarkers for predicting kidney transplant outcome. *Transplantation*. 2010;90(9):966-73.
123. Lorenzen JM. Vascular and circulating microRNAs in renal ischaemia-reperfusion injury. *J Physiol*. 2015;593(8):1777-84.
124. Aguado-Fraile E, Ramos E, Conde E, Rodriguez M, Martin-Gomez L, Lietor A, et al. A Pilot Study Identifying a Set of microRNAs As Precise Diagnostic Biomarkers of Acute Kidney Injury. *PLoS One*. 2015;10(6):e0127175.
125. Aguado-Fraile E, Ramos E, Conde E, Rodriguez M, Liano F, Garcia-Bermejo ML. MicroRNAs in the kidney: novel biomarkers of acute kidney injury. *Nefrologia*. 2013;33(6):826-34.
126. Aguado-Fraile E, Ramos E, Saenz-Morales D, Conde E, Blanco-Sanchez I, Stamatakis K, et al. miR-127 protects proximal tubule cells against ischemia/reperfusion: identification of kinesin family member 3B as miR-127 target. *PLoS One*. 2012;7(9):e44305.
127. Godwin JG, Ge X, Stephan K, Jurisch A, Tullius SG, Iacomini J. Identification of a microRNA signature of renal ischemia reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(32):14339-44.
128. Wang B, Komers R, Carew R, Winbanks CE, Xu B, Herman-Edelstein M, et al. Suppression of microRNA-29 expression by TGF-beta1 promotes collagen expression and renal fibrosis. *J Am Soc Nephrol*. 2012;23(2):252-65.
129. Lorenzen JM, Kielstein JT, Hafer C, Gupta SK, Kumpers P, Faulhaber-Walter R, et al. Circulating miR-210 predicts survival in critically ill patients with acute kidney injury. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2011;6(7):1540-6.
130. Khalid U, Ablorsu E, Szabo L, Jenkins RH, Bowen T, Chavez R, et al. MicroRNA-21 (miR-21) expression in hypothermic machine perfusate may be predictive of early outcomes in kidney transplantation. *Clin Transplant*. 2016;30(2):99-104.
131. Brook NR, Waller JR, Nicholson ML. Nonheart-beating kidney donation: current practice and future developments. *Kidney Int*. 2003;63(4):1516-29.

BIBLIOGRAFÍA

132. Gerstenkorn C. Non-heart-beating donors: renewed source of organs for renal transplantation during the twenty-first century. *World J Surg.* 2003;27(4):489-93.
133. Rela M, Jassem W. Transplantation from non-heart-beating donors. *Transplant Proc.* 2007;39(3):726-7.
134. Dehoux JP, Gianello P. The importance of large animal models in transplantation. *Frontiers in Bioscience.* 2007;12:4864-80.
135. Carrel A, Guthrie CC. La technique opératoire des anastomoses vasculaires et la transplantation des viscères. *Lyon Med.* 1902;98: 859-76.
136. Druml W. The beginning of organ transplantation: Emerich Ullmann (1861-1937). *Wien Klin Wochenschr.* 2002;114(4):128-37.
137. Küss R. The History of Kidney Transplantation. *Prog Urol.* 1996;6(5):677-82.
138. Sandin R, Wahlberg J, Modig J. Variations in superficial renal cortical blood flow and tissue oxygenation: an experimental porcine model. *Acta Anaesthesiol Scand.* 1991;35(5):411-9.
139. Rossi R, Costa A, Guarino M, Laicini F, Pastorelli G, Corino C. Effect of group size-floor space allowance and floor type on growth performance and carcass characteristics of heavy pigs. *J Swine Health Prod.* 2008;16(6):304-11.
140. Bowland JP, Standish JS. Influence of fasting, water deprivation and stress on carcass shrink of pigs and rats. *J Anim Sci.* 1966;25(2):377-80.
141. Zacherl J, Bock S, Feussner H, Erhardt W, Siewert JR, Stangl M. Periarterial application of papaverine during laparoscopic donor nephrectomy improves early graft function after kidney transplantation in pigs. *Surg Endosc.* 2004;18(3):417-20.
142. Theisen MM, Maas M, Hartlage MA, Ploner F, Niehues SM, Van Aken HK, et al. Ventral recumbency is crucial for fast and safe orotracheal intubation in laboratory swine. *Lab Anim.* 2009;43(1):96-101.

BIBLIOGRAFÍA

143. Kharasch ED, Frink EJJ, Zager R, Bowdle TA, Artru A, Nogami WM. Assessment of low-flow sevoflurane and isoflurane effects on renal function using sensitive markers of tubular toxicity. *Anesthesiology*. 1997;86(6):1238-53.
144. Kim M, Kim M, Park SW, Pitson SM, Lee HT. Isoflurane protects human kidney proximal tubule cells against necrosis via sphingosine kinase and sphingosine-1-phosphate generation. *Am J Nephrol*. 2010;31(4):353-62.
145. Swindle MM. *Swine in the laboratory: Surgery, anesthesia, imaging, and experimental techniques*. CRC2007.
146. McFarlin DE, Binns RM. Lymph node function and lymphocyte circulation in the pig. *Adv Exp Med Biol*. 1973;29(0):87-93.
147. West KW, Stephens B, Rescorla FJ, Vane DW, Grosfeld JL. Postoperative intussusception: experience with 36 cases in children. *Surgery*. 1988;104(4):781-7.
148. Jochmans I, Lerut E, Heedfeld V, Wylín T, Pirenne J, Monbaliu D. Reproducible model for kidney autotransplantation in pigs. *Transplant Proc*. 2009;41(8):3417-21.
149. McLoughlin TM, Fontana JL, Alving B, Mongan PD, Bungler R. Profound normovolemic hemodilution: hemostatic effects in patients and in a porcine model. *Anesth Analg*. 1996;83(3):459-65.
150. Pereira-Sampaio MA, Favorito LA, Sampaio FJB. Pig Kidney: Anatomical Relationships between the Intrarenal Arteries and the Kidney Collecting System. Applied Study for Urological Research and Surgical Training. *The Journal of Urology*. 2004;172(5):2077-81.
151. Schreinemachers MC, Doorschodt BM, Florquin S, van den Bergh Weerman MA, Zerneck A, Idu MM, et al. Pulsatile perfusion preservation of warm ischaemia-damaged experimental kidney grafts. *Br J Surg*. 2010;97(3):349-58.
152. Schreinemachers MC, Doorschodt BM, Florquin S, Idu MM, Tolba RH, van Gulik TM. Improved renal function of warm ischemically damaged kidneys using Polysol. *Transplant Proc*. 2009;41(1):32-5.

BIBLIOGRAFÍA

153. Schreinemachers MC, Doorschodt BM, Florquin S, van den Bergh Weerman MA, Reitsma JB, Lai W, et al. Improved preservation and microcirculation with POLYSOL after transplantation in a porcine kidney autotransplantation model. *Nephrol Dial Transplant*. 2009;24(3):816-24.
154. Hewson CJ. Do vocalizations tell us anything about animal welfare? *Can Vet J*. 2004;Do vocalizations tell us anything about animal welfare?(45):7.
155. MacArthur Clark J. The 3Rs in research: a contemporary approach to replacement, reduction and refinement. *Br J Nutr*. 2018;120(s1):S1-S7.
156. Daniel CR, Labens R, Argyle D, Licka TF. Extracorporeal perfusion of isolated organs of large animals - Bridging the gap between in vitro and in vivo studies. *ALTEX*. 2018;35(1):77-98.
157. BOE. Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia. In: Presidencia Mdl, editor. Madrid: Boletín Oficial del Estado; 2013. p. 11370-421.
158. Yagi K. Simple assay for the level of total lipid peroxides in serum or plasma. *Methods Mol Biol*. 1998;108:101-6.
159. Armstrong D, Browne R. The analysis of free radicals, lipid peroxides, antioxidant enzymes and compounds related to oxidative stress as applied to the clinical chemistry laboratory. *Adv Exp Med Biol*. 1994;366:43-58.
160. Saenz-Morales D, Conde E, Blanco-Sanchez I, Ponte B, Aguado-Fraile E, de Las Casas G, et al. Differential resolution of inflammation and recovery after renal ischemia-reperfusion injury in Brown Norway compared with Sprague Dawley rats. *Kidney Int*. 2010;77(9):781-93.
161. Chatauret N, Coudroy R, Delpech PO, Vandebrouck C, Hosni S, Scepi M, et al. Mechanistic analysis of nonoxygenated hypothermic machine perfusion's protection on warm ischemic kidney uncovers greater eNOS phosphorylation and vasodilation. *Am J Transplant*. 2014;14(11):2500-14.
162. Schlegel A, Kron P, Graf R, Clavien PA, Dutkowski P. Hypothermic Oxygenated Perfusion (HOPE) downregulates the immune response in a rat model of liver transplantation. *Ann Surg*. 2014;260(5):931-7; discussion 7-8.

BIBLIOGRAFÍA

163. Kosieradzki M, Rowinski W. Ischemia/reperfusion injury in kidney transplantation: mechanisms and prevention. *Transplant Proc.* 2008;40(10):3279-88.
164. Schroppel B, Legendre C. Delayed kidney graft function: from mechanism to translation. *Kidney Int.* 2014;86(2):251-8.
165. ONT. Informe de actividad de donación y trasplante de donantes en asistolia.; 2014.
166. Maathuis MH, Manekeller S, van der Plaats A, Leuvenink HG, t Hart NA, Lier AB, et al. Improved kidney graft function after preservation using a novel hypothermic machine perfusion device. *Ann Surg.* 2007;246(6):982-8; discussion 9-91.
167. Minor T, Sitzia M, Dombrowski F. Kidney transplantation from non-heart-beating donors after oxygenated low-flow machine perfusion preservation with histidine-tryptophan-ketoglutarate solution. *Transpl Int.* 2005;17(11):707-12.
168. Koetting M, Frotscher C, Minor T. Hypothermic reconditioning after cold storage improves postischemic graft function in isolated porcine kidneys. *Transpl Int.* 2010;23(5):538-42.
169. Bellini MI, Yiu J, Nozdrin M, Papalois V. The Effect of Preservation Temperature on Liver, Kidney, and Pancreas Tissue ATP in Animal and Preclinical Human Models. *J Clin Med.* 2019;8(9).
170. Butler AJ, Rees MA, Wight DG, Casey ND, Alexander G, White DJ, et al. Successful extracorporeal porcine liver perfusion for 72 hr. *Transplantation.* 2002;73(8):1212-8.
171. Muller S, Constantinescu MA, Kiermeir DM, Gajanayake T, Bongoni AK, Vollbach FH, et al. Ischemia/reperfusion injury of porcine limbs after extracorporeal perfusion. *J Surg Res.* 2013;181(1):170-82.
172. Patan B, Budras KD, Licka TF. Effects of long-term extracorporeal blood perfusion of the distal portion of isolated equine forelimbs on metabolic variables and morphology of lamina propria. *Am J Vet Res.* 2009;70(5):669-77.

BIBLIOGRAFÍA

173. Mancina E, Kalenski J, Paschenda P, Beckers C, Bleilevens C, Boor P, et al. Determination of the preferred conditions for the isolated perfusion of porcine kidneys. *Eur Surg Res.* 2015;54(1-2):44-54.
174. Drapanas T, Zemel R, Vang JO. Hemodynamics of the isolated perfused pig liver: metabolism according to routes of perfusion and rates of flow. *Ann Surg.* 1966;164(3):522-37.
175. Paloyo S, Sageshima J, Gaynor JJ, Chen L, Ciancio G, Burke GW. Negative impact of prolonged cold storage time before machine perfusion preservation in donation after circulatory death kidney transplantation. *Transpl Int.* 2016;29(10):1117-25.
176. Legrand C, Bour JM, Jacob C, Capiaumont J, Martial A, Marc A, et al. Lactate dehydrogenase (LDH) activity of the number of dead cells in the medium of cultured eukaryotic cells as marker. *Journal of Biotechnology.* 1992;25(3):231-43.
177. Bortner CD, Hughes FM, Jr., Cidlowski JA. A primary role for K⁺ and Na⁺ efflux in the activation of apoptosis. *J Biol Chem.* 1997;272(51):32436-42.
178. Trimarchi JR, Liu L, Smith PJ, Keefe DL. Noninvasive measurement of potassium efflux as an early indicator of cell death in mouse embryos. *Biol Reprod.* 2000;63(3):851-7.
179. Landgraf P, Rusu M, Sheridan R, Sewer A, Iovino N, Aravin A, et al. A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell.* 2007;129(7):1401-14.
180. Liu CG, Calin GA, Meloon B, Gamliel N, Sevignani C, Ferracin M, et al. An oligonucleotide microchip for genome-wide microRNA profiling in human and mouse tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(26):9740-4.
181. Gómez-Dos-Santos V, Hevia-Palacios V, Ramos-Muñoz E, Laura García-Bermejo M, Macarena Rodríguez-Serrano E, Saiz-González A, et al. MicroRNAs as Potential Markers for Advantageous Perfusion in a Preclinical Donation after Cardiac Death Animal Model of Oxygenated Hypothermic Machine Perfusion (HOPE). *OBM Transplantation.* 2018;2(2):1-.
182. Gómez V, Ramos E, Carracedo D, García-Bermejo ML, Orosa A, Diez-Nicolas V, et al. miRNAs profile throughout the sequence of ischemic lesion from

BIBLIOGRAFÍA

donor to recipient. Prediction of renal graft outcome. *Am J Transplant.* 2014;14(S3):366-7.

183. Mittelbrunn M, Gutierrez-Vazquez C, Villarroya-Beltri C, Gonzalez S, Sanchez-Cabo F, Gonzalez MA, et al. Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. *Nat Commun.* 2011;2:282.

184. Yepez VA, Kremer LS, Iuso A, Gusic M, Kopajtich R, Konarikova E, et al. OCR-Stats: Robust estimation and statistical testing of mitochondrial respiration activities using Seahorse XF Analyzer. *PLoS One.* 2018;13(7):e0199938.

185. Coulier L, Bas R, Jespersen S, Verheij E, van der Werf MJ, Hankemeier T. Simultaneous quantitative analysis of metabolites using ion-pair liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Chem.* 2006;78(18):6573-82.

186. Su D, Kabir MP, Orozco-Gonzalez Y, Gozem S, Gadda G. Fluorescence Properties of Flavin Semiquinone Radicals in Nitronate Monooxygenase. *Chembiochem.* 2019;20(13):1646-52.

187. Darius T, Vergauwen M, Mueller M, Aydin S, Dutkowski P, Gianello P, et al. Brief Bubble and Intermittent Surface Oxygenation Is a Simple and Effective Alternative for Membrane Oxygenation During Hypothermic Machine Perfusion in Kidneys. *Transplant Direct.* 2020;6(7):e571.

188. Wang L, Thompson E, Bates L, Pither TL, Hosgood SA, Nicholson ML, et al. Flavin Mononucleotide as a Biomarker of Organ Quality-A Pilot Study. *Transplant Direct.* 2020;6(9):e600.

189. Nath J, Smith T, Hollis A, Ebbs S, Canbilen SW, Tennant DA, et al. (13)C glucose labelling studies using 2D NMR are a useful tool for determining ex vivo whole organ metabolism during hypothermic machine perfusion of kidneys. *Transplant Res.* 2016;5:7.

190. Nath J, Guy A, Smith TB, Cobbold M, Inston NG, Hodson J, et al. Metabolomic perfusate analysis during kidney machine perfusion: the pig provides an appropriate model for human studies. *PLoS One.* 2014;9(12):e114818.

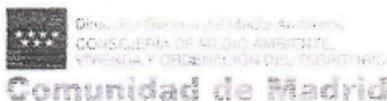
BIBLIOGRAFÍA

191. Hosgood SA, Shah K, Patel M, Nicholson ML. The effect of prolonged of warm ischaemic injury on renal function in an experimental ex vivo normothermic perfusion system. *J Transl Med.* 2015;13:207.
192. Gallinat A, Paul A, Efferz P, Luer B, Kaiser G, Wohlschlaeger J, et al. Hypothermic reconditioning of porcine kidney grafts by short-term preimplantation machine perfusion. *Transplantation.* 2012;93(8):787-93.
193. Tsikas D. Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges. *Anal Biochem.* 2017;524:13-30.
194. Hosgood SA, Barlow AD, Dormer J, Nicholson ML. The use of ex-vivo normothermic perfusion for the resuscitation and assessment of human kidneys discarded because of inadequate in situ perfusion. *J Transl Med.* 2015;13:329.
195. Buchs JB, Buehler L, Moll S, Ruttimann R, Nastasi A, Kasten J, et al. DCD pigs' kidneys analyzed by MRI to assess ex vivo their viability. *Transplantation.* 2014;97(2):148-53.
196. Stenberg B, Wilkinson M, Elliott S, Caplan N. The prevalence and significance of renal perfusion defects in early kidney transplants quantified using 3D contrast enhanced ultrasound (CEUS). *Eur Radiol.* 2017;27(11):4525-31.
197. Como G, Da Re J, Adani GL, Zuiani C, Girometti R. Role for contrast-enhanced ultrasound in assessing complications after kidney transplant. *World J Radiol.* 2020;12(8):156-71.
198. Sanz E, Hevia V, Arias F, Fabuel JJ, Alvarez S, Rodriguez-Patron R, et al. Contrast-enhanced ultrasound (CEUS): an excellent tool in the follow-up of small renal masses treated with cryoablation. *Curr Urol Rep.* 2015;16(1):469.
199. Sanz E, Hevia V, Gomez V, Alvarez S, Fabuel JJ, Martinez L, et al. Renal Complex Cystic Masses: Usefulness of Contrast-Enhanced Ultrasound (CEUS) in Their Assessment and Its Agreement with Computed Tomography. *Curr Urol Rep.* 2016;17(12):89.
200. Alvarez Rodriguez S, Hevia Palacios V, Sanz Mayayo E, Gomez Dos Santos V, Diez Nicolas V, Sanchez Gallego MD, et al. The Usefulness of Contrast-Enhanced Ultrasound in the Assessment of Early Kidney Transplant Function and Complications. *Diagnostics (Basel).* 2017;7(3).

ANEXOS

9. ANEXOS

9.1. Anexo 1: aprobación del CEEA (2011 y 2015)



D. JESÚS CARPINTERO HERVÁS, SUBDIRECTOR GENERAL DE RECURSOS AGRARIOS DE LA DIRECCIÓN GENERAL DEL MEDIO AMBIENTE DE LA CONSEJERÍA DE MEDIO AMBIENTE Y ORDENACIÓN DEL TERRITORIO DE LA COMUNIDAD DE MADRID.

Autoriza:

A la realización del procedimiento descrito en la memoria técnica titulada "ESTUDIO EXPERIMENTAL ALEATORIZADO DE LA EFICACIA DE LA PRESERVACIÓN RENAL MEDIANTE PERFUSIÓN NORMOTÉRMICA E HIPOTÉRMICA EN MÁQUINA. MODELO DE AUTOTRASPLANTE".

Según la solicitud registrada con fecha 28/07/2011 ref. ref. 07/587505.9/11

El procedimiento se ajusta a lo señalado en el Real Decreto 1201/2005 relativo a la utilización de animales de experimentación.

La presente autorización está condicionada a que la preparación y formación del personal que lleve a cabo el procedimiento, así como a que la posible utilización posterior de los animales se ajusten a lo que se especifica en el citado Real Decreto.

Madrid, a 02 de septiembre de 2011.

EL DIRECTOR GENERAL DE MEDIO AMBIENTE

(P.D.F. Resolución de 4 de agosto de 2011)

EL SUBDIRECTOR GENERAL DE RECURSOS AGRARIOS



[Handwritten signature]

Pdo.: Jesús Carpintero Hervás



Comunidad de Madrid

HOSPITAL UNIVERSITARIO RAMÓN Y CAJAL
COMITÉ ÉTICO DE BIENESTAR ANIMAL

Expediente nº 08/2011
Acta nº 1

COMITÉ ÉTICO DE BIENESTAR ANIMAL

CERTIFICA

Que una vez recibida la Autorización de la Autoridad Competente para el proyecto titulado:

Estudio experimental aleatorizado de la eficacia de la preservación renal mediante perfusión normotérmica a hipodérmica en máquina. Modelo de autotransplante.

Investigador Principal: **Dra. Victoria Gómez Dos Santos**

Servicio: **Urología**

Hospital Universitario Ramón y Cajal.

ha decidido emitir **INFORME FAVORABLE DEFINITIVO** “*quedando sometido en lo que respecta a inspecciones y sanciones a la Ley de Experimentación Animal 32/2007*”

Lo que firmo en Madrid, a 12 de Septiembre de 2011.



Hospital Universitario
Ramón y Cajal

COMISIÓN INVESTIGACIÓN
COMITÉ ÉTICO BIENESTAR ANIMAL

Dr. Carlos Correa Gorospe

Presidente del Comité Ético de Bienestar Animal (CEBA)

Hospital Universitario Ramón y Cajal



CONSEJERÍA DE MEDIO AMBIENTE
Y ORDENACIÓN DEL TERRITORIO

Comunidad de Madrid



REGISTRO DE SALIDA
Ref:10/077855.9/15 Fecha:27/04/2015 11:21



Cons. Medio Ambiente y Orden. Territorio
Reg C. Medio Amb. y Ord. T. (ALC)
Destino: Victoria Gómez Dos Santos

Vista la solicitud presentada por VICTORIA GÓMEZ DOS SANTOS, para la autorización del proyecto de memoria técnica titulada VALOR DE LA OXIGENACIÓN DURANTE LA PRESERVACIÓN HIPOTÉRMICA PULSÁTIL DEL INJERTO RENAL. MODELO ANIMAL DE DONANTE EN ASISTOLIA CONTROLADA: a desarrollar en el centro usuario HOSPITAL UNIVERSITARIO RAMON Y CAJAL con código de registro ES280790002001 y siendo el responsable del proyecto VICTORIA GÓMEZ DOS SANTOS.

Visto el informe del Área de Protección Animal.

Considerando que el citado proyecto se ajusta a lo establecido en el Real Decreto 53/2013 de 1 de febrero por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.

Esta Dirección General ha resuelto: autorizar la realización del proyecto referenciado siempre que se mantengan las condiciones que dieron lugar a la autorización y que el personal que intervenga tenga la preparación y formación adecuada que se especifica en el citado Real Decreto.

Tal y como se establece en el informe de evaluación aportado, este proyecto no deberá ser sometido a la realización de una evaluación retrospectiva.

La presente Resolución no pone fin a la vía administrativa y contra la misma podrá interponer recurso de Alzada en el plazo de un mes a partir del día siguiente al de la recepción de esta notificación, ante el Consejero de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio (C/ Alcalá 16, 28014 Madrid), o ante el Director General del Medio Ambiente (C/ Alcalá 16, 28014 Madrid), o en cualquiera de las formas previstas en el artículo 38.4 de la Ley 30/1992, de Régimen Jurídico de las Administraciones Públicas y del Procedimiento Administrativo Común de conformidad con lo previsto en los artículos 107, 114 y 115 de dicha Ley.

Madrid, 20 de abril de 2015.

EL DIRECTOR GENERAL DEL MEDIO AMBIENTE

Exp.- 14/2014

COMITÉ ÉTICO DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

CERTIFICA

Que el proyecto de investigación titulado:

Valor de la oxigenación durante la preservación hipotérmica pulsátil del injerto renal. Modelo animal de donante en asistolia controlada.

Investigadora Principal: Dra. Victoria Gómez Dos Santos del Servicio de Urología del Hospital Universitario Ramón y Cajal.

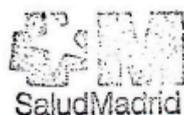
cumple los requisitos necesarios para emitir **INFORME FAVORABLE**, para los experimentos que se lleven a cabo en las instalaciones del Hospital Universitario Ramón y Cajal y se compromete a realizar el seguimiento del proyecto según lo indicado en el R. D. 53 / 2013 (art. 38.1.e.)

Este proyecto queda sometido en lo que respecta a inspecciones y sanciones a la Ley de Experimentación Animal 32/2007".

Lo que firmo en Madrid, a 8 de Enero de 2015



Dra. Ana I. Ortiz Chércoles
Presidenta del Comité Ético de Experimentación Animal (CEEA)
Hospital Universitario Ramón y Cajal



Hospital Universitario
Ramón y Cajal
COMITÉ ÉTICO
EXPERIMENTACIÓN ANIMAL
Comunidad de Madrid

Tfno.: 8.81.45 - Planta: -2 Dcha.

9.3. Anexo 2: acreditación para experimentación animal

Don VITAL HEVIA PALACIOS

HA REALIZADO EL CURSO
**FORMACIÓN DE PERSONAL QUE TRABAJA CON ANIMALES
DE EXPERIMENTACIÓN**

Curso de capacitación en experimentación animal, elaborado por BINAEX S.L, y dirigido a formación de personal de la Categoría B. Celebrado entre el 25 de Mayo y el 17 de Julio de 2015, con una carga lectiva total de 66 horas, y cuyos contenidos se recogen al dorso, **HABIENDO SUPERADO** la prueba final de evaluación del mismo y adquirido las competencias relativas a la acreditación. Lo que certifican sus directores:



Jesús Martínez Palacios
Director del curso



Hernán Serna Duque
Director Binaex

Este Curso cumple con los requisitos establecidos en el Anexo I B del RD 1201/2005 para la formación del personal Categoría B, acreditado por el Área de Protección Animal de la DG de Medio Ambiente de la Comunidad de Madrid por Resolución 10/062996.9/15 de fecha 7/04/2015

9.3. Anexo 3: concesión beca Mutua Madrileña

FUNDACIÓN
MUTUA MADRILEÑA

Fortuny, 18
28010 Madrid
Tel.: 991 592 28 36
info@fundacionmutua.es
www.fundacionmutua.es

Dr./Dra. Victoria Gomez Dos Santos
Av Francisco Pi Y Margall 79C 5º 10
28050 Madrid
Madrid

Madrid, 22 de junio de 2011

Estimado Dr./Dra. Gomez,

Tengo el gusto de comunicarle que el proyecto de investigación en el que Ud. figura como investigador principal, y que fue presentado a la VIII Convocatoria de Ayudas a la Investigación de la Fundación Mutua Madrileña, ha sido evaluado favorablemente por su Consejo Rector de Investigación y aprobado por el Patronato de la Fundación en su reunión del pasado día 21 de junio.

Sin embargo, le informo que el importe solicitado por usted ha sido rebajado a 25.000,00 €, dada la gran cantidad de solicitudes presentadas (más de 800) y de su cuantía económica (más de 71 millones de euros), que nos ha obligado a un mayor esfuerzo en la evaluación, selección y distribución de las ayudas. Espero que esta modificación no suponga un inconveniente para la realización de los trabajos previstos en su proyecto, ya que desde la Fundación Mutua Madrileña queremos seguir contribuyendo, en la medida de nuestras posibilidades, al avance de la investigación médica en España.

En los próximos días recibirá por correo electrónico, en la dirección que figura en su solicitud, las indicaciones relacionadas con los trámites necesarios para proceder al ingreso del importe concedido.

Si necesita cualquier aclaración, no dude en contactar con nosotros.

Reciba un cordial saludo,



Otilia Fernández López
Gerente Fundación Mutua Madrileña