

R.17.768

①

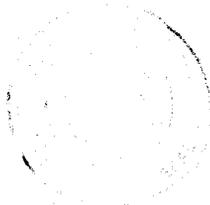
UNIVERSIDAD DE SEVILLA
 BIBLIOTECA DE MEDICINA
 No. de libro 466 No. de tomo 16
 Ciudad Sevilla

Alma Laffite

+D

0/32

**CONSERVACION CORAZON DONANTE PARA
 TRASPLANTE. ESTUDIO EXPERIMENTAL**



X



Antonio Ordóñez Fernández



FACULTAD DE MEDICINA

DTO. DE CITOLOGIA E HISTOLOGIA
NORMAL Y PATOLOGICA

41009 SEVILLA

DON HUGO GALERA DAVIDSON, CATEDRATICO DE HISTOLOGIA Y EMBRIOLOGIA GENERAL Y ANATOMIA PATOLOGICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA,

CERTIFICA: Que bajo su dirección y en el Departamento de Citología e Histología Normal y Patológica ha sido realizado el trabajo titulado: "CONSERVACION CORAZON DONANTE PARA TRASPLANTE. ESTUDIO EXPERIMENTAL", por Don ANTONIO ORDOÑEZ FERNANDEZ, para optar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía.

Y para que así conste, expide el presente certificado en Sevilla, a veintinueve de Noviembre de mil novecientos ochenta y nueve.

HISTORIA
CITOLOGIA
HISTOLOGIA
ANATOMIA PATOLOGICA



DEDICATORIA:

*a mi mujer y a mi hijo por
el tiempo que les quité.*

AGRADECIMIENTOS:

 Mi agradecimiento a cuantas personas han hecho posible la realización del presente trabajo con cita especial al Profesor Hugo Galera Davidson, Catedrático de Histología y Anatomía Patológica, y Director de la presente Tesis, porque con sus consejos pedagógicos, supo despertar en mi el espíritu de superación.

 Al Dr. Pérez Bernal por su paciencia y amistad demostrada durante la realización del presente trabajo.

 A la Dra. M. Cañada y al Dr. E. Rafel por su inestimable ayuda en la preparación de las muestras para el estudio al microscopio.

 A todos los técnicos del Laboratorio de Cirugía Experimental del Hospital Universitario "Virgen del Rocío" de Sevilla.

 Y a todos mis compañeros del Servicio de Cirugía Cardiovascular, dirigidos por el Dr. L. Castellón por su comprensión y tolerancia.

 A todos de Corazón mi mas sincero agradecimiento.

I.-INTRODUCCION:

A.-OBJETIVOS GENERALES DE LA TESIS..... 8

 1.-MOTIVO/IMPORTANCIA DEL ESTUDIO EXPERIMENTAL.....9

 2.-OBJETIVOS.....10

B.-PRESERVACION MIOCARDICA EN EL TRASPLANTE DE CORAZON

 1.-ANTECEDENTES PRESERVACION MIOCARDICA.....11

 2.-FISIOPATOLOGIA DEL MIOCARDIO.....13

 a.-GENERALIDADES.....14

 b.-METABOLISMO DEL MIOCARDIO.....15

 1.-METABOLISMO AEROBIO.....17

 2.-METABOLISMO ANAEROBIO.....22

 3.-METABO.EN HIPOTERMIA.....23

 3.-SISTEMAS DE PRESERVACION MIOCARDICA EN EL T/C.....25

 a.-GENERALIDADES.....25

 1.-CARDIOPLEJIAS.....26

 2.-SISTEMAS PRESERVACION30

 3.-REPERFUSION34

 b.-SISTEMAS SIN PERFUSION CORONARIA.....35

 1.-HIPOTERMIA POR INMERSION FRIA.....35

 2.-OXIGENACION HIPERBARICA.....37

 3.-SUPERENFRIAMIENTO.....38

 4.-CONGELACION.....38

 C.-SISTEMAS CON PERFUSION CORONARIA.....40

 1.-PERFUSION HIPOTERMICA.....41

 2.-PERFUSION EXTRACORPORA HIPOTERMICA43

C.-SISTEMAS VALORACION PRESERVACION MIOCARDICA EN EL T/C

 1.-SISTEMAS BIOLÓGICOS.....45

 2.-SISTEMAS MORFOLÓGICOS.....47

3.-SISTEMAS FUNCIONALES.....	48
II.-MATERIAL:	
A.-CENTRO DE TRABAJO.....	52
B.-ANIMAL DE EXPERIMENTACION	53
1.-CARACTERISTICAS.....	53
2.-DEFINICION DE LA MUESTRA.....	54
C.-MATERIAL ESPECIAL PARA LA EXTRACCION CARDIACA..	
1.-MATERIAL QUIRURGICO.....	55
2.-MONITORIZACION.....	58
D.-MATERIAL ESPECIAL PARA LA PRESERVACION CARDIACA.	
1.-SOLUCION DE CONSERVACION CARDIACA.....	59
2.-SISTEMA PARA PERFUSION CARDIACA.....	61
a.-PERFUSOR PORTATIL PARA CORAZON.....	62
b.-CONTENEDOR PARA CORAZON.....	63
c.-MONITORIZACION EN LA CONSERVACION.....	64
d.-LINEAS Y FILTROS.....	64
E.-MATERIAL ESPECIAL PARA LA IMPLANTACION CORAZON.	
1.-MATERIAL QUIRURGICO ESPECIAL.....	65
2.-MATERIAL ANESTESICO ESPECIAL.....	67
a.-RESPIRADOR.....	67
b.-LINEAS.....	68
c.-DEFIBRILADOR CARDIACO.....	69
d.-MARCAPASO CARDIACO.....	69
3.-MONITORIZACION BIOLOGICA.....	71
a.-MONITORIZACION PRESIONES	71
b.-MONITORIZACION TEMPERATURA.....	73
d.-REGISTRADORES.....	73

4.-SISTEMAS PARA CIRCULACION EXTRACORPOREA.....	74
a.-BOMBA DE CIRCULACION EXTRACORPOREA.....	74
b.-OXIGENADORES.....	75
c.-LINEAS.....	76
d.-RESERVORIO.....	76
e.-FILTROS.....	76
g.-ASPIRADORES.....	76
F.-MATERIAL LABORATORIO BIOQUIMICA	
1.-ANALIZADOR DE GASES.....	77
2.-ANALIZADOR DE IONES.....	79
G.-MATERIAL PARA ESTUDIO MORFOLOGICO	
1.-PESO.....	82
2.-MICROSCOPIA OPTICA.....	83
3.-MICROSCOPIA ELECTRONICA.....	83
4.-MATERIAL DE BIOPSIAS.....	84
H.-MATERIAL ESTUDIO FUNCION CARDIACA	
1.-BALON COMPLIANCE VENTRICULAR.....	84
2.-TRANSDUCTORES DE PRESION Y REGISTRADOR.....	86
I.-MATERIAL ESTUDIO ESTADISTICO	
1.-ORDENADOR.....	88
2.-SISTEMA ESTADISTICO.....	88
III.METODOLOGIA:	
A.-METODOLOGIA DE LA EXTRACCION.....	90
B.-METODOLOGIA DE LA CONSERVACION CARDIACA.....	94
C.-METODOLOGIA DE LA IMPLANTACION CARDIACA(TRASPLANTE)98	
D.-VALIDACION DE LA TESIS:	
1.-MORFOLOGICA:.....	105
2.-GANANCIA PESO.....	105

b.-MICROSCOPIA.....	107
2.-BIOQUIMICA.....	109
3.-FUNCIONAL.....	109
a.-EX VIVO (COMPLIANCE).....	109
b.-IN VIVO (ESTUDIO HEMODINAMICO).....	110
IV.-RESULTADOS	
A.-EXPOSICION RESULTADOS.....	112
V.-DISCUSION.....	131
VI.-RESUMEN.....	160
VII.-CONCLUSIONES.....	161
VIII.-BIBLIOGRAFIA.....	163

INTRODUCCION:

A.-OBJETIVOS GENERALES DE LA TESIS:

1.-MOTIVO/IMPORTANCIA DEL PROYECTO INVESTIGACION:

El desarrollo de métodos para la protección del miocardio, durante el tiempo de anoxia en las operaciones de corazón, ha sido uno de los mayores avances de la cirugía cardíaca en los últimos años.(1),(2),(3),(4),(5).

En la actualidad , sin embargo,aun no se ha conseguido una buena protección miocárdica superior a cuatro horas de anoxia,(6)-tiempo suficiente para realizar las intervenciones quirúrgicas habituales de corazón , pero muy corto para la práctica del trasplante de corazón- , ya que,en la mayoría de estos el traslado del corazón a distancias considerables obliga a consumir gran parte del tiempo tolerable de anoxia en el transporte del órgano.(7),(8),(9).

Para superar este obstáculo seria necesario por tanto,disponer de un método de protección miocárdica lo suficientemente seguro, que permitiendo la conservación de un corazón, durante al menos 24 horas,proporcionará tiempo suficiente para garantizar el transporte del órgano a grandes distancias con las consiguientes ventajas:(10)

como=

-compatibilizar a donante y receptor mediante pruebas cruzadas de compatibilidad antigénica.(sistema HLA).

-mejorar las condiciones del transporte, incluso a grandes distancias, eliminando acciones precipitadas por la lucha contra el tiempo.

-contar con mayor tiempo para la coordinación entre los distintos grupos que intervienen en la extracción e implantación del órgano.

En resumen:

Se consigue un incremento considerable en las posibilidades de éxito en un trasplante de corazón clínico, como consecuencia del aumento de tiempo de conservación de un corazón en anoxia .

2.-OBJETIVOS.--(HIPOTESIS DE TRABAJO):

El objetivo de este trabajo de investigación es: Obtener un método de preservación miocárdica, suficientemente extenso y seguro, durante el período de anoxia de un corazón donante, antes de ser trasplantado.

Se pretende conseguir dicho objetivo mediante la perfusión en el árbol coronario de una solución nutritiva y oxigenada durante 24 horas , con un sistema de perfusión portátil, que nos permita:

* conseguir un tiempo de espera seguro, de al menos 24 horas, muy superior al actual , incrementando considerablemente las posibilidades de éxito en un trasplante de corazón clínico.

referencia bibliográfica(11),(12),(10).



B.1.-ANTECEDENTES PRESERVACION MIOCARDICA EN EL TRASPLANTE DE CORAZON.

Basándose en los estudios sobre preservación renal, Webs y Howard en 1957 fueron los primeros en estudiar la preservación del corazón ,mediante un método de refrigeración, demostrando que, el corazón, si se enfriaba podía mantenerse viable durante un período comprendido entre dos y cuatro horas.(13),(14).

La hipotermia local, provocada por el contacto con una solución salina fría ,fue el modelo de preservación miocárdica que se utilizó, por el grupo de la Universidad de Stanford, en los primeros momentos para mantener viable el corazón durante unas horas;tiempo necesario para la practica del trasplante de corazón experimental.(15).

En 1962 se comunicó el primer trasplante de corazón experimental realizado con un tiempo de preservación de siete horas.(16).

En 1960 Lower y Shumway protegieron el corazón en período de anoxia miocárdica , sumergiendo el órgano en una solución salina fría a 4 grados centígrados durante el tiempo necesario para implantar el corazón con buenos resultados experimentales.(17),(18),(19).

A partir de la década de los sesenta, y coincidiendo con el gran desarrollo de la cirugía cardíaca, se han realizado numerosos trabajos de investigación en animales de experimentación y en clínica humana, para encontrar el mejor método de preservación miocárdica durante el período de anoxia .(16),(20),(1),(21),(22),(23),(25),26),27).

-----oOo-----

B.2.-FISIOPATOLOGIA DEL MIOCARDIO.

a)GENERALIDADES:El corazón esta formado por células con propiedades biológicas altamente especializada.

Tiene la capacidad de autoexcitarse,pueden conducir estímulos (conductibilidad) y poseen la propiedad de ser contráctiles.(28).

Dichas células están siempre en actividad,por lo que el consumo de sustratos energéticos,incluso durante el reposo,es muy alto.(29).

El aporte de sustratos energéticos,fundamentalmente glucosa y oxígeno, se produce mediante la circulación coronaria ; sistema vascular similar al del resto del organismo,que aporta todas las sustancias necesarias para su metabolismo.(24).

Anatómicamente, la circulación coronaria, esta formada por dos grandes troncos arteriales que nacen por encima del plano valvular aórtico con un sistema capilar y venoso que drena en la circulación venosa sistémica por medio del seno coronario en el interior de la aurícula derecha.(30).

El flujo coronario es fásico, porque depende de las fases de la presión aórtica y, también depende de la resistencia variable que le ofrece el miocardio al paso de la sangre durante la sístole ventricular.(31)

Por lo tanto, el llenado del lecho capilar coronario, se produce fundamentalmente durante la diástole ventricular.

Dependiendo, no solo de la presión de perfusión, sino de la resistencia a su paso.

Resistencia que se produce fundamentalmente a nivel arteriolar, ya que en las arteriolas es donde se producen los fenómenos de vasoconstricción y vasodilatación. (32).

Existe, además una diferencia importante entre el flujo coronario subendocárdico y subepicárdico, debido a los cambios de presión intramiocárdicos en relación con los cambios de presión diastólica intracavitaria.(33).

El miocardio depende por lo tanto, del oxígeno ofrecido por la sangre arterial coronaria para formar los fosfatos de alta energía, producidos por la fosforilización oxidativa en las mitocondrias, aportando con ello suficiente energía para mantener la contracción (función contráctil del corazón).(34).

Cuando la cantidad de oxígeno no es suficiente para los requerimientos de la respiración mitocondrial, comienza a producirse un descenso en la producción de fosfatos de alta energía por cambio al metabolismo anaerobio.

B.-2.-b.-METABOLISMO DEL MIOCARDIO:

Debido a la intensa actividad metabólica del corazón, la extracción de oxígeno por el miocardio en reposo, es de un 70 % del contenido en la sangre; equivalente al extraído por el músculo esquelético tras un intenso trabajo.

(35),(36).

Por lo tanto, el aumento de las necesidades de oxígeno por el miocardio, solo se puede conseguir mediante el aumento del flujo coronario.

Por otra parte, la principal vía metabólica del miocardio es la AEROBIA, por lo que, la privación de la fuente de oxígeno irremediablemente conlleva al paro de su función principal, que es la contráctil.

Según Olson el proceso metabólico del miocardio se puede dividir en tres fases bien definidas:(37).

-FASE DE FORMACION DE LA ENERGIA

-CONSERVACION O ALMACENAMIENTO DE LA ENERGIA.

-UTILIZACION DE LA ENERGIA.

FORMACION DE ENERGIA: esta fase corresponde a las reacciones químicas que rompen los principales sustratos energéticos utilizados por el corazón ;(como los ácidos grasos, la glucosa, los piruvatos y los lactatos); en fragmentos de dos carbonos que pueden entrar, en la vía oxidativa del ciclo de Krebs, en el interior de las mitocondrias y en presencia de enzimas oxidativas.(38).

Mediante este proceso, la ENERGIA LIBRE desprendida de los enlaces del sustrato, es transferida en forma de electrones (localizados en las mitocondria) hasta el oxígeno, que es el receptor de electrones que se encuentra al final de la cadena .(39)

CONSERVACION O ALMACENAMIENTO DE LA ENERGIA: corresponde esta fase al proceso de la fosforilación oxidativa.(40).

La energía libre desprendida del sustrato oxidativo no se usa directamente en el proceso contráctil; se usa para formar enlace ésteres de alta energía.

La energía libre de los electrones hidrógeno es transferible al enlace fosfato terminal ADP para formar el ATP, donde se ALMACENA la energía para su utilización posterior.

El glucógeno almacena, también en la célula miocárdica, cierta cantidad de energía.

UTILIZACION DE LA ENERGIA.-La utilización de la energía incluye aquellos procesos por los cuales, la energía almacenada en el fosfato terminal del ATP ,es conducida al interior del proceso contráctil, por medio del cual, se realiza el trabajo mecánico de la contracción cardíaca.

El ATP se utiliza también para realizar trabajo químico, al inducir en la vía metabólica, una variedad de reacciones químicas que requieren energía.(41).

B.-2.-b.-1.-METABOLISMO AEROBIO:

La cadena de acontecimientos químicos y mecánicos que se producen para la contracción cardíaca, cuando existe suficiente oxígeno , se explica de la siguiente forma:

El corazón es un órgano esencialmente aerobio , rico en enzimas respiratorias, necesarias para llevar a cabo las reacciones oxidativas del ciclo de Krebs.

Estas enzimas se encuentran dentro de las mitocondrias de las células cardíacas.(42).

Los sustratos energéticos como la "glucosa", se aportan por la sangre capilar hasta llegar a cruzar la membrana celular, introduciéndose en el sarcoplasma, donde en el caso de la glucosa como sustrato energético, sigue una de las tres vías metabólicas siguientes:(43).



- a)metabolismo directo "glucolisis aerobia"
- b)oxidación directa "derivación de las pentosas"
- c)incorporarse al glucógeno "glucogénesis"

a)GLUCOLISIS AEROBIA:(37).al final de la glucolisis aerobia, que tiene lugar en el sarcoplasma, se forma un compuesto de tres carbonos que es el ácido pirúvico.

El ácido pirúvico entra en la mitocondria donde es convertido en acetil coenzima A.

En el interior de la mitocondria, y gracias a enzimas respiratorias, se produce una oxidación completa de una molécula de piruvato de tres carbonos a tres moléculas de CO₂, con la liberación de la energía previamente atrapada entre los enlaces.

El enlace energético,liberado del fragmento acetil de dos carbonos, en forma de electrones hidrógeno , se transfiere para producir una molécula de electrones de enlace ATP que son transportados luego alrededor de la cadena de transporte de electrones.

Los enlaces hidrógenos DPNH penetran en la cadena de transporte de electrones,y la energía de esta corriente se ramifica en el sistema de transporte de electrones en tres lugares ;como resultado se obtiene la fosforilización del ADP a ATP.

Finalmente el electrón se combina con el oxígeno molecular para formar agua.

La glucólisis tiene un valor limitado en la producción de energía, puesto que representa la liberación de el 90 % de la energía contenida en la glucosa.

b) DERIVACION DE LAS PENTOSAS: Otra vía para metabolizar la glucosa, como sustrato energético en presencia de oxígeno, es el de las PENTOSAS .

La energía liberada de la glucosa en esta vía es cedida al TPNH formado; no hay por tanto una generación directa de ATP.

c) GLUCOGENESIS: Otra vía a seguir por la glucosa en el interior de la célula, en presencia de oxígeno, es la conversión en glucógeno bajo la influencia enzimática de la fosfoglucomutasa. (44).

La desintegración del glucógeno es diferente a la seguida para su formación.

Bajo la influencia de la fosforilasa el glucógeno se rompe siguiendo unos pasos que conducen a la liberación de glucosa.

La concentración cardíaca de glucógeno es muy constante siendo aproximadamente del 0,5 % . No obstante no

constituye un almacenamiento inerte de sustrato , sino un depósito metabólico de intercambio activo.

El glucógeno se considera un combustible de alta energía fácilmente disponible para una entrada rápida en el ciclo de la glucólisis.

En la hipoxia, la glucólisis , así como la desintegración del glucógeno, se acelera enormemente.(45).

Otros sustratos energéticos utilizados por la célula miocárdica son los ACIDOS GRASOS NO ESTERIFICADOS, que, al penetrar en la célula, se combinan con la albúmina metabolizándose, mediante la beta -oxidación que separa fragmentos de dos carbonos, llegando a formar en el interior de la mitocondria acetil-coenzima A, que se oxida en el interior de la mitocondria por el ciclo de KREBS.

Los ácidos grasos constituyen un importante combustible energético para el corazón.

Los ácidos grasos proporcionan el 80 % de los requerimientos energéticos del corazón, cuando no existe glucosa para su metabolismo.(46).

El ATP formado durante la oxidación del sustrato, es la principal fuente energética del metabolismo celular

cardíaco; es decir, todo el trabajo químico y mecánico de la célula miocárdica se realiza a expensas de la energía liberada en la transformación del ATP en ADP.

El fosfato de creatina es una fuente energética de reserva, que puede ser usada para fosforilar el ADP, que pasa a ATP si está interrumpida la generación metabólica de ATP.

El ATP es la fuente energética inmediata para la contracción muscular. Contracción muscular que se produce por el entrecruzamiento de filamentos de proteínas (actina y miosina) en presencia de Calcio, como factor crítico de acoplamiento en la contracción.(47).

En presencia del ion calcio, y utilizando la energía liberada por la rotura de los enlaces del ATP (producida por la acción de la ATP asa), ambos miofilamentos se deslizan uno sobre otro desarrollando TENSION en las bandas Z y produciendo el acortamiento del sarcómero.(48).

El desplazamiento de las fibras de proteína se produce por la reactividad cambiante de los entrecruzamientos.

En dicho proceso el ATP se rompe por el cambio en el entrecruzamiento por una enzima ATPasa dependiente del calcio.(49).

La suma de acortamientos de todos los sarcómeros de las miofibrillas, produce el acortamiento de estas, y como resultado, el de todas las fibras cardíacas.

B.-2.-b.-2.-METABOLISMO ANAEROBIO:

Cuando no hay suficiente oxígeno para que el piruvato sea oxidado en el ciclo de KREBS, se pasa a la glucólisis anaerobia mediante la oxidación del difosforipiridin-nucleotido reducido (DPNH), formado durante la desintegración del fosfato triosa que se convierte en ácido fosfoglicérico, produciéndose ácido láctico a partir del piruvato mediante la enzima deshidrogenasa del ácido láctico-
(50).

En esta situación, la formación de ATP es mucho menor, produciéndose sólo dos moléculas de ATP.

Durante la preservación, en situación de anoxia, se produce un aumento en la producción de lactatos y un trastorno en el balance ácido-base como consecuencia de la continuación de la actividad metabólica sin oxígeno, es decir, en situación anaeróbica, se consumen las reservas de glucógeno y se produce una derivación de la actividad metabólica hacia la glucólisis anaerobia: con formación de lactatos, y disminución del pH (acidosis). (51), (52).

La baja tensión de oxígeno durante la anoxia, hace decrecer la formación de agentes quelantes del calcio, (ATP y Citratos) predisponiendo al miocardio para una inadecuada homeostasis

Durante la fase de reperfusión, la reposición del oxígeno del cual el órgano fue privado, tiene un efecto paradójico, porque ioniza al calcio que ahora es tomado rápidamente por las mitocondrias.

Se sigue, por un estallamiento de las células ,lesiones mitocondriales y miofibrilares , apareciendo las bandas de contracción y depósitos de calcio intramitocondriales.

El último efecto de la acumulación de calcio intracelular, es la aparición del llamado "Corazón de piedra",provocado por una contractura isquémica del miocardio.(53).

B.-2.-b.-3.-METABOLISMO CARDIACO EN HIPOTERMIA:

Los requerimientos energéticos del corazón ,reflejados por el consumo de oxígeno,se reducen durante la hipotermia, ya que las reacciones bioquímicas, como índice de actividad metabólica disminuyen con el frío.(54).

Esta interrelación ha sido expresada matemáticamente de varias formas:

- Usando un modelo de relación lineal entre la actividad metabólica y la temperatura.

- Usando un modelo basado en la teoría de Arrhenius que expresa la proporción inversa entre las reacciones químicas y la temperatura absoluta.(55).

- Otra forma de relacionar la temperatura con la actividad metabólica ,se basa en la ley cinética de la velocidad de reacción, que relacionan logarítmicamente el tiempo con las concentraciones y un coeficiente que a su vez esta en función de la temperatura.Van T'Hoff formuló empíricamente, que este coeficiente hay que multiplicarlo por dos , por cada 10° C de aumento de la temperatura. (56),(57),(58).

- En química usan el Q10 para referirse al aumento de la actividad metabólica para el aumento de diez grados en la temperatura.(59).

Se puede concluir que el consumo de oxígeno es la expresión de todas las reacciones oxidativas,y por tanto el logaritmo del consumo de oxígeno es directamente proporcional a la temperatura.

Datos de estudios recientes demuestran que las demandas de oxígeno se subestiman durante la hipotermia, ya que solo las áreas de tejido donde persiste la perfusión de

la microcirculación, participan en las demandas de oxígeno, cuando el órgano se encuentra aislado y perfundido, como en el caso que nos interesa para la conservación de un corazón donante para trasplante.(60),(61).

La vasodilatación debida al recalentamiento del órgano, asegura la llegada de oxígeno a todos los tejidos, y este Q_{10} , representa el verdadero consumo de oxígeno por los tejidos.

El conocimiento de la llamada "densidad efectiva capilar ", resultante del gasto cardíaco ,vasoconstricción ,vasodilatación y viscosidad de la sangre ,determina la oxigenación existente en ese momento y permite la introducción de factores de corrección en el consumo de oxígeno.(62).

El consumo de oxígeno nunca se reduce a cero aunque se baje mucho la temperatura.

El enfriamiento celular, disminuye la actividad molecular, reduciendo la actividad metabólica y protegiendo por tanto a la célula, de las lesiones producidas por la hipoxia

La actividad metabólica persiste en hipotermia; permitiendo el calentamiento durante los períodos de parada cardíaca.(64).

B.-3.-SISTEMAS DE PRESERVACION MIOCARDICA EN EL TRASPLANTE DE CORAZON:

B.-3.-a.-GENERALIDADES:

El número insuficiente de donantes cardíacos y la pérdida de viabilidad del órgano (en función del tiempo transcurrido desde la donación hasta el implante) ha estimulado al desarrollo de técnicas para la preservación de órganos para trasplantes.(63),(53),(12).

Todo sistema para conservar un órgano pasa por tres fases bien definidas:

1)FASE DE EXTRACCION

2)FASE DE CONSERVACION (Preservación)

3)FASE DE REPERFUSION

1.2.3.1.1.-FASE DE EXTRACCION / CARDIOPLEJIA/:

Durante esta fase, se extrae el corazón en las mejores condiciones, siendo preciso para ello el PARAR el Corazón rápidamente, en diástole mediante el pinzamiento transversal aórtico (anoxia miocárdica), y la introducción mediante infusión de una solución CARDIOPLEJICA en el sistema coronario, a través de la raíz de la aorta .(65).

Existe unanimidad de criterios en cuanto a que el comienzo de una buena preservación ,se inicie con la PARADA CARDIACA por infusión de CARDIOPLEJIA.

La rápida parada electromecánica del corazón, mediante el pinzamiento transversal aórtico y la infusión de solución cardiopléjica en el árbol coronario, es el mejor método de protección miocárdica durante el periodo de tiempo transcurrido entre la extracción del corazón y la conexión al sistema de preservación elegido.(66).

Ello produce una disminución brusca de las demandas de oxígeno manteniendo la viabilidad de las células miocárdicas.

Durante la anoxia miocárdica la energía necesaria se extrae del metabolismo anaerobio , energía suficiente para las pocas necesidades solicitadas.

El término de CARDIOPLEJIA fue introducido por Melrose en 1955. Para conseguirlo utilizó una solución hiperosmolar con malos resultados clínicos.(65),(1).

Entre 1960 y 1970 se hicieron muchos estudios experimentales sobre cardioplejias y su composición por Bretschneider, sin que llegara a introducirse definitivamente en la clínica humana, debido a sus malos resultados, comparados con otros métodos de protección.(66).

Mientras que no se asoció la parada electro-mecánica del corazón mediante fármacos (cardioplejias), con la hipotermia ,no se obtuvieron buenos resultados clínicos. Hoy utilizada por la mayoría de los cirujanos cardiovasculars en todos sus procedimientos , como el mejor método de protección miocárdica.

Las características que debe reunir una solución cardiopléjica son :(67),(68),(69),(70).

- Enfriada a 4 ° C para mantener el corazón, tras su infusión, entre 15° C y 20 ° C
- Que no produzca lesión directa sobre la membrana celular
- Que no produzca cambios iónicos intracelulares importantes; especialmente un aumento de concentración de calcio libre.
- Que no modifique el contenido de agua en el miocardio sobretodo intracelular .

Existen múltiples compuestos químicos cuyas propiedades cumplen las condiciones anteriores y detienen el metabolismo cardíaco,siendo el mas conocido de todos el POTASIO , hoy utilizado por su seguridad en casi todas las soluciones cardiopléjicas y el SODIO , en los límites inferiores fisiológicos, se usa, porque una marcada hiponatremia extracelular, aumenta la conductividad del calcio, que es desventajosa durante el periodo de anoxia.(71),(72).



Las soluciones cardioplégicas deben ser además:

*ligeramente hiperosmolar (3330-350 mmosmol / l) para retrasar el edema intersticial .(73).

*debe contener un sistema Buffer porque, el poco metabolismo que persiste incluso durante la anoxia, produce una acidosis , que debe ser contrarrestada.(74).

*debe contener estabilizantes de la membrana celular como los corticoides.(75).

*debe contener sustratos energéticos y oxígeno para aumentar las ofertas de ambos .(4).

Existen múltiples componentes químicos, en fase de investigación clínica , que se incluyen en las soluciones cardioplégicas:

-como los vasodilatadores coronarios para reducir mediante la vasodilatación el aumento de resistencia que se produce durante la perfusión.(76).

-emulsiones transportadoras de oxígeno como los perfluorocarbonos que aumentan el aporte de oxígeno a la célula miocárdica durante el período de anoxia. (77),(78).

-cardioplejias hemáticas cuyo componente fundamental es la sangre isogrupo en hipotermia, y con un alto contenido de potasio .(79).

La combinación de agentes químicos con propiedades plejiantes junto a la hipotermia muestra una acción sinérgica en la protección de la célula miocárdica.

B.-3.-a.-2.-SISTEMAS DE PRESERVACION .Corresponde a la conservación del corazón propiamente dicha y comprende el periodo de tiempo transcurrido entre la extracción (cardiectomía) del donante y la implantación al receptor.

En dicha fase estudiaremos :

- a) los sistemas utilizados y
- b) las soluciones de preservación o soluciones nutricias.

a) Son sistemas de preservación, las formas o procedimientos existentes para proteger el corazón durante el periodo de anoxia, bien mediante la introducción de una solución nutricia en el sistema coronario, los llamados Sistemas con Perfusión; o bien mediante solo por el contacto de la solución nutricia con el epicardio, sin la introducción en las coronarias.

Existen diversos sistemas para preservación de un corazón como:

-PERFUSION TOTAL: La mejor forma de mantener viable un órgano es mantenerlo bajo perfusión dentro de su propio sistema como el organismo humano(soportado por una bomba de circulación extracorporea).Este sistema conlleva grandes dificultades para usarlo debido a la necesidad de personal cualificado que es necesario solo para mantener el órgano en períodos cortos de tiempo.(80).

-AUTOPERFUSION: Mediante una preparación cardiopulmonar ,donde la circulación sistémica solo estaría representada por el sistema coronario,con mantenimiento artificial de la respiración y temperatura, es un sistema de preservación del corazón descrito en 1948 por DEMIKHOV previo al trasplante de corazón,pero de poca utilidad práctica por el poco tiempo de viabilidad que origina.(81)

-PARABIOSIS:La viabilidad del corazón durante el tiempo de espera se mantiene por una perfusión CRUZADA desde un ANIMAL HUESPED , que debe estar inmunodeprimido, pero de difícil uso en clínica humana por claras implicaciones éticas.(82)

-PERFUSION EXTRACORPOREA: Método usado en nuestra experiencia y consistente básicamente en la introducción en el árbol coronario, bien por vía retrógrada (seno coronario) como por vía anterógrada (raíz de aorta) , de una solución de preservación hipotérmica.

Básicamente se requiere:

- rodillos para impulsión peristáltica de la solución de preservación.
- Líneas de conducción de la solución con características de ser inertes.
- Cánulas para la introducción en el árbol coronario.
- oxigenador para burbujear en la solución de preservación.
- Intercambiador de calor para control de la temperatura de la solución de preservación y del órgano.

b) Son soluciones de preservación las compuestas por agentes químicos y sustratos, que permiten la conservación del órgano en las mejores condiciones durante el periodo de anoxia, pudiendo ser soluciones coloides o cristaloides, con sangre, u oxigenada, e hiperosmolares.

En las soluciones de preservación se emplean los siguientes aditivos:

- COENZIMA Q₁₀: Reduce la acumulación de calcio en las mitocondrias, protegiendo al miocardio de los efectos de la anoxia sobre las células miocárdicas.(83).
- TAURINA: Constituye el 50% de los aminoácidos libres del miocardio, reduciendo la pérdida de potasio celular.(84).
- PERFLUOROCARBONOS: Son compuestos químicos con capacidad de transportar oxígeno.(78).

-Captan y liberan oxígeno de acuerdo con su presión parcial y a mayor velocidad que con la hemoglobina. Su utilidad en la composición de las soluciones de preservación viene dada por la facilidad de intercambios que actúan en función de la pO_2 y temperatura.

El tamaño de sus partículas es de 0,1 micras con una viscosidad inferior a la de la sangre, siendo ideal para preservar corazones por :

- 1) su baja viscosidad
- 2) sus partículas no son retenidas por el miocardio
- 3) su máxima capacidad transportadora de oxígeno
- 4) su máxima liberación de oxígeno

-CONCENTRACION DE CALCIO: Debe mantenerse concentraciones bajas de calcio, para que en la reperfusión, exista la menor concentración del mismo, pero suficiente para iniciar la contracción.(72).

-OXIGENACION DE LAS SOLUCIONES DE PRESERVACION: la falta de oxígeno reduce en el miocardio la concentración de ATP mitocondrial, por lo que es imprescindible mantener la solución de preservación bien Oxigenada.(4).

-DEBE MANTENERSE EL pH ALCALOTICO: para disminuir la acidosis producida por el acumulo de ácido láctico ,la solución debe tamponarse.(74)



-DEBE SER HIPEROSMOLAR: Para disminuir el edema intersticial.(73).

En nuestro caso utilizamos la misma solución de conservación que la usada para parar el corazón, porque pensamos que la conservación comienza desde la parada electromecánica del mismo.

Una solución cristaloide hiperkaliémica, oxigenada e hiperosmolar.

B.-3.-a.-3.-FASE DE REPERFUSION.- Finalizada la conservación y antes de implantar el corazón, se inicia la fase de reperfusión, consistente en la entrada de sangre oxigenada en el árbol coronario a temperatura fisiológica (en normotermia) de 37 ° C.

Es de vital importancia realizar una reperfusión adecuada que consiste en :

- la introducción en las coronarias de una solución de reperfusión a una temperatura adecuada, que permita realizar el calentamiento en dos fases que oscilen entre 20 y 28 ° C.(85).

Esta solución de reperfusión debe ser :

-ligeramente alcalótica para compensar la acidosis residual desarrollada durante el periodo de conservación (anoxia).

-debe contener antagonistas del calcio para evitar la entrada brusca de Calcio en el interior de las mitocondrias .

El uso de Perfluorocarbonos se comprobó útil por su baja viscosidad y buen transporte y liberación de oxígeno llegando a todos los tejidos isquémicos, perfundidos con una presión de infusión no superior a 50 mmHg de media para no provocar aumento del edema miocárdico.(86).

B.-3.-b.-SISTEMAS DE PRESERVACION DE CORAZON SIN PERFUSION CORONARIA:

B.-3.-b.-1.-INMERSION EN SOLUCION FRIA.Por simple almacenaje en solución salina helada, consistente en un baño tópico con solución isotónica a 4 grados centígrados, se consiguió una viabilidad en los trasplantes cardíacos de unas tres a cuatro horas.

La hipotermia local provocada por el contacto con una solución salina fría , ha sido el modelo de preservación cardíaca utilizada en sus primeros momentos por el grupo de la Universidad de Stanford por el Dr Shumway para mantener viable el corazón durante unas horas en el Trasplante de Corazón Experimental.(87),(15).

En 1962 se comunicó el primer Trasplante de Corazón realizado con un tiempo de preservación de siete horas en experimentación animal.(16).

Las bases fisiológicas en que se basa la protección celular con esta técnica, se apoya en la reducción de la actividad metabólica al bajar la temperatura que en el caso del miocardio, la reversibilidad de dichas lesiones esta limitada a un máximo de doce horas.

El enfriamiento celular reduce el número de moléculas en actividad para los procesos fisiológicos, reduciendo a la vez las demandas metabólicas y protegiendo por tanto a la célula de las lesiones isquémicas y anóxicas.

La actividad metabólica desarrollada por las células puede medirse, bien por la función de Arrhenius o bien por la de Van T'Hoff o aplicando esta última al disminuir la temperatura en 10° C decrece la actividad metabólica en aproximadamente a la mitad.(61),(88).

La actividad metabólica, sin embargo no desaparece totalmente hasta temperaturas de -60° C y por tanto , los tejidos preservados a solo 0° C son susceptibles de daño isquémico.(20).

La lesión celular tiene lugar durante el periodo de preservación, pero sólo se hace evidente durante la fase de reperfusión, cuando la subida de la temperatura a cifras normales (37 grados centígrados) ,y la entrada de sangre oxigenada ,provocada por la instauración de la circulación, hacen aumentar la actividad metabólica. (89).

B.-3.-b.-2.-HIPOTERMIA CON OXIGENACION HIPERBARICA:

Otro método de conservación del corazón, sin perfusión ,actualmente en vías de investigación y por tanto no utilizado clínicamente,es el de enfriamiento y oxigenación a presión alta.

Esta técnica de preservación consiste en la inmersión del órgano en solución cardiopléjica oxigenada a presión positiva (3 atm).Manax y Lillehei fueron los primeros, en 1964, en usar esta técnica para la preservación de tejidos vivos.

El tejido se mantiene en hipotermia a 4 ° C y oxigenado a 4 atmósferas de presión.La hipotermia y la oxigenación a hiperpresión actúan sinérgicamente en la protección del miocardio

Estas técnicas se abandonaron al no conocerse claramente las consecuencias de la descompresión, sobre el miocardio , e irreversibilidad de las mismas .Se sabe sin embargo, que se disminuyen la posibilidad de las lesiones, si la descompresión se hace lenta y progresivamente .(90).

B.-3.-b.-3.-SUPERENFRIAMIENTO/CONGELACION:

Consiste en el enfriamiento del órgano por debajo de 0 grado centígrados, hasta -0,6 , sin llegar al punto de congelación celular.

El bajo peso molecular de los solutos de las células hace caer el punto de congelación por debajo de 0,6 ° C. Esto evita que las células se congelen en su interior.

El superenfriamiento es un mecanismo para prolongar la preservación del corazón debido a que reduce considerablemente la actividad metabólica.

Las células, en este estado son muy inestables y en ausencia de agentes crioprotectores corren el riesgo de ser lesionadas por congelación.(91)

B.-3.-b.-4.-CONGELACION:

Consiste en la congelación de células miocárdicas con adición previa de agentes crioprotectores.(92).

Las células cardíacas pueden ser preservadas durante años si se mantienen a (- 196 grados Centígrados) ya que la actividad metabólica se detiene ,debido al cese de todo movimiento molecular.

La inhibición del movimiento molecular está en proporción con la reducción de la temperatura, y con ella, toda actividad bioquímica y fisiológica puede llegar a detenerse

Al añadir agentes crioprotectores, se produce un

desplazamiento del agua y al aumento de la concentración de solutos, provocándose una reducción del punto de congelación.

La velocidad de enfriamiento, desempeña un papel importante, así como el lugar donde primero se produce, ya que al congelarse inicialmente el espacio extracelular, los cristales de hielo producen daños irreversibles en la membrana celular.

Estos problemas no solo existen durante la fase de la congelación, sino también con la descongelación.

Los agentes crioprotectores deben extraerse lentamente de las células descongeladas porque la descongelación rápida, puede provocar daños por estallamiento celular.

Cada paso congelación / descongelación, debe hacerse dentro de estrechos límites de tiempo, para permitir una alta viabilidad de las células después del proceso.

Sin embargo, los pobres resultados obtenidos con la congelación de órganos completos, hacen actualmente de esta técnica algo infructuosa para la conservación del órgano, durante largos periodos de tiempo en la práctica del trasplante cardíaco.

B.-3.-c.-METODOS DE PRESERVACION DEL CORAZON CON PERFUSION CORONARIA:

Los primeros intentos, fueron realizados por Lindeberg y Carrel, utilizando un sistema de perfusión coronaria pulsátil con sangre en normotermia, dando malos resultados.(93).

Como consecuencia de una mala filtración de la solución de preservación, puede provocarse un aumento de resistencia vascular coronaria, sugestiva de daño miocárdico.

El sistema de perfusión cerrado, produce una disminución de las concentraciones de nutrientes así como un acumulación de productos tóxicos .

Se están estudiando diferentes tipos de soluciones de preservación , siendo teóricamente la sangre el ideal; pero esta tiene un límite debido a la destrucción celular que se produce en todos los sistemas in vitro, alterando los componentes de la sangre y provocando por lo tanto daño miocárdico.(94).

Estos malos resultados se explican por la transformación que sufre la sangre al permanecer en un circuito cerrado, sin filtros de depuración, como los que existen en su medio natural, en el riñón y el hígado.

Mas tarde, Toledo-Pereyra realizó experiencias con perfusión pulsátil en hipotermia con diferentes soluciones, sin demostrarse resultados concluyentes, debido a que la viabilidad del injerto solo se valoró por métodos morfológicos, ya que el implante a otro animal, se realizó en situación heterotópica sin poder determinar la función cardíaca manteniendo un "gasto cardíaco" adecuado .(95).

B.-3.-c.-1.-PERFUSION EXTRACORPOREA HIPOTERMICA: fueron Lindeberg y Carrel los primeros investigadores en mantener órganos vivos fuera de su emplazamiento original.(93).

La perfusión de órganos extracorporea ha planteado multitud de problemas derivados fundamentalmente de la composición de la solución a perfundir y de la forma de llevarla a cabo.

Así se han utilizado perfusatos cristaloides y sanguíneos, con oxigenación y sin ella , con perfusión anterógrada (por coronaria) y por perfusión retrógrada (seno coronario).

Actualmente, y basado en la técnica de Proctor y Copeland, se ha utilizado experimentalmente, y con buen resultado, la perfusión aislada de corazón con baja presión y con solución cristaloides hipotérmica .(96).

El primer intento de mantener un corazón fuera del organismo mediante la perfusión de una solución a temperatura fisiológica (normotermia) fue efectuado por Linderberg (1935). (93).

Los resultados no fueron alentadores, debido a una difícil perfusión por aumento de las resistencias vasculares coronarias, sugestivo de edema miocardio, como consecuencia de microembolismos ocasionados por la falta de filtración de la solución de preservación y a la ausencia de superficies siliconadas.

Por otra parte, el acumulo de productos tóxicos, no fue valorado por el implante del órgano conservado a otro animal. Solo se hizo por estudios histológicos, siendo por lo tanto incompletos.

Los sistemas de perfusión y las soluciones de preservación existentes en la actualidad, no son suficientemente buenos para proteger al miocardio en normotermia.

La adición de hipotermia a estos mismos sistemas, mejoran significativamente la viabilidad del órgano. (97).

B.-3.-c.-2.-PERFUSION CORONARIA HIPOTERMICA EXTRACORPOREA.

Uno de los mayores avances en los sistemas de preservación fue alcanzado por Proctor y Parker, quienes introdujeron la perfusión de una solución fría (hipotérmica) para la conservación de órganos.(96).

La perfusión hipotérmica tiene ventajas sobre la conservación por simple inmersión en solución fría , ya que además de proporcionar una fuente continua de oxígeno y sustratos energéticos ,extrae los productos de desechos originados durante el metabolismo celular.

Para cortos períodos de tiempo la necesidad de perfusión no es imprescindible; aunque si lo es para períodos mayores.

El éxito o el fallo de la perfusión hipotérmica depende más de los componentes químicos de la solución de preservación,(98). que de las características de los sistemas de perfusión.

CARACTERISTICAS DE LA PERFUSION

PERFUSION PULSATIL: los primeros intentos se realizaron por Lindberg y Carrel con sistemas de perfusión de tipo pulsátil a presión de perfusión fisiológica y con sangre, con malos resultados.

Más tarde se utilizó el mismo método de perfusión pero con soluciones distintas (Toledo Pereyra) también con resultados desalentadores por provocar las altas presiones, - lesiones irreversibles en el miocardio.(99).

PERFUSION NO PULSATIL:Proctor desarrolló un sistema de perfusión NO pulsátil a baja presión con flujos altos e hipotermia, sin conseguir resultados satisfactorios debido al edema importante desarrollado en el miocardio.(100).

Dichas perfusiones se han realizado de forma anterógrada (a través de ostium coronarios) o de forma retrógrada, por seno coronario para evitar lesiones en el árbol arterial coronario , por una perfusión no fisiológica.(101).

C.-SISTEMAS DE VALORACION DE LA PRESERVACION MIOCARDICA EN EL TRASPLANTE DE CORAZON:

C.-1.-SISTEMAS BIOLOGICOS:(Estudio bioquímico y enzimático): Todo proceso de "lesión isquémica" tiene su origen en los cambios de la química celular (metabolismo celular).(102).

La pérdida de la energía necesaria para el funcionamiento de la " bomba iónica transmembrana" es la primera consecuencia de la lesión tisular. Por ello la medida del sustrato energético, así como de los cambios iónicos, son parámetros que indican LESION TISULAR ISQUEMICA.(103),(104).

La perdida o acumulación de iones y sustratos energéticos, puede ser detectados por análisis de los tejidos o por el de los fluidos extracelulares (vascular) , que se miden por diferencia arteriovenosa que nos informará el nivel de consumo o eliminación por los tejidos.

El estado metabólico y la integridad de los tejidos se miden por tanto por:(105),(106).

-gasometrías, a la entrada y salida del líquido de perfusión

-iones sobre todo, pérdidas de potasio y magnesio hacia el espacio extracelular medidas en el sistema vascular, y acumulación de calcio y sodio en el citoplasma celular.

-substrato :bajo condiciones aerobias se consume lactato que se transforma en piruvato como un sustrato del metabolismo celular (mitocondrial).

En situaciones de isquemia miocárdica se inhibe el metabolismo oxidativo y por lo tanto se consume menos lactato, con acumulación de este último en la célula y salida del exceso al sistema vascular.

Las determinaciones se realizan en el seno coronario.(lo que equivaldría a la toma de muestra en la propia solución donde se encuentra inmersa el órgano)

-glucosa:El estudio del metabolismo de la isquemia con la glucosa y el glucógeno como sustrato metabólico no solo se debe estudiar durante el paro isquémico si no también durante la REPERFUSION.

-fosfatos de alta energia: (ATP y CP) son los marcadores que , mejor y mas fácilmente, determinan el daño isquémico celular.

-pérdida de constituyentes celulares por salida al espacio extracelular : son las ENZIMAS los mejores indicadores de daño isquémico.Procede pues la determinación enzimática, fundamentalmente de CK y LDH.

C.-2.-SISTEMAS DE VALORACION MORFOLOGICOS:

Estudio morfológico: Los índices de viabilidad tisular de un órgano preservado se pueden conocer desde dos niveles.

a) ULTRAESTRUCTURALES (Con M/E).Tomas del material por BIOPSIA TRANSMURAL mediante aguja "TRut-Cut"y fijación mediante inmediata inmersión en la solución de fijación, compuesta por 2,5 % de glutaraldéhidó y paraformaldéhidó al 2 % estudiándose los siguientes organelos: núcleos, mitocondrias, I-bandas, edema, fibrosis y necrosis.(107),(108).

Los resultados de las determinaciones se clasifican en cuatro grados según el siguiente baremo:

-
-
- GRADO 0 =muestra normal
 - GRADO 1 =daño mínimo
 - GRADO 2 =cambios moderados
 - GRADO 3 =cambios severos
-
-

De todos los corazones se extraen tres muestras para biopsia>

- MUESTRA 1 =situación basal donante
- MUESTRA 2 =situación anóxica
- MUESTRA 3 =situación reperfusión.

para el estudio morfológico de los especímenes.

TEJIDO PARA MICROSCOPIO OPTICO: las tomas de las muestras se realizan con la misma técnica que para microscopio electrónico, es decir mediante una aguja de "trut-cut" para estudiar el espesor del miocardio completo. (109), (110).

Las muestras se fijan en solución de formol al 10 % por inmersión inmediata y se tiñe con hematoxilina y eosina para su estudio.

Se estudian el edema miocárdico y la fibrosis, graduadas en la misma escala que el anterior y con la mismas muestras.

C.-3.-SISTEMAS DE VALORACION FUNCIONAL: Estudio funcional a) .En situación EX VIVO , durante el periodo de conservación , con el corazón parado y en hipotermia, se mide la COMPLIANCE PASIVA, o sea , la tensión desarrollada por las paredes del miocardio ante el cambio de volumen provocado por la distensión de un balón intraventricular. Se fundamentan en las propiedades elásticas de las fibras miocárdicas en reposo $C = V / P$.(111), (112), (113).

Se precisa el siguiente material: Cateter con balón apical de COMPLIANCE CERO hasta volúmenes de 50 cc, a temperaturas comprendidas entre 5 grados centígrados y 37 grados centígrados a presión nula intrabalón a diferentes llenados, conectado a un transductor de presión , registrador

y jeringa para llenado con solución salina ;introducido a través de la aurícula izquierda y fijado con una sutura en "bolsa de tabaco" en el anillo mitral.

Durante el periodo de la conservación, se mide la compliance pasiva con volúmenes de llenado del balón de 0 a 30 cc de solución salina y se registran las presiones obtenidas, así como los valores de la dp/dt .Estas medidas deben tomarse a la primera hora, a las doce horas y a las 24 horas de conservación.

b)Valoración funcional durante la fase " IN VIVO " Esta fase corresponde al trasplante de corazón ortotópico según la técnica de Shumway, mediante el cual el corazón conservado durante 24 horas, se reperfunde tras su implantación en un animal receptor.

Se precisa de una aguja para toma de presiones conectadas a un traductor y a un registrador, computador para medida de gasto cardíaco por termodilución y medidor para flujos en raíz de aorta con registrador.

Una vez finalizado la circulación extracorporea y, cuando el corazón conservado soporte ya la circulación del receptor, se tomarán los siguientes parámetros para medir la función del órgano:(114).

- Presiones sistólicas y diastólicas y medidas de

todas la cavidades cardíacas y grandes vasos. Con estos datos se construye una CURVA DE PRESION-VOLUMEN como medida de la COMPLIANCE ,y se calculan los valores Dp/Dt como medida de la contractilidad.

- Gasto cardíaco por termodilución de ventrículo izquierdo y derecho así como el flujo aórtico. Se evalúa la eficacia ventricular izquierda expresando los valores de índice de trabajo por latido y por peso.

Todo el estudio de la función contráctil del corazón trasplantado se realiza a los 30 minutos del desclampaje aórtico anotando si necesita apoyo farmacológico o no, desconectado completamente del circuito de circulación extracorporea.

-Validación del proyecto.-Mediante la implantación del órgano preservado durante 24 horas en un animal receptor. TRASPLANTE DE CORAZON ORTOTOPICO según técnica de Shunmway consistente en la implantación del órgano preservado en la misma situación anatómica en un animal RECEPTOR mediante sutura continua de ambas aurículas y grandes vasos de salida, aorta y pulmonar .(87),(115).

MATERIAL Y METODO

II.-MATERIAL:

A.-CENTRO DE TRABAJO:

El lugar de trabajo, donde se realizó esta tesis fueron los quirófanos I y II del laboratorio experimental del hospital Universitario "Virgen del Rocío" en Sevilla, dependiente del Servicio Andaluz de Salud , así como toda su infraestructura, tanto en personal auxiliar como técnico.

Toda la analítica así como el estudio morfológico fue realizado en el departamento de análisis clínicos y de Anatomía patológica del mismo hospital "Virgen del Rocío".

El diseño y desarrollo del balón para medida de la " compliance ventricular izquierda " , se diseñó y desarrolló en el laboratorio de medicina y cirugía experimental " Gregorio Marañón" en la comunidad autónoma de Madrid.

El material gráfico , así como el estudio estadístico de la muestra fue supervisado por la comisión de investigación del hospital " Virgen del Rocío " de Sevilla.

B.-ANIMAL DE EXPERIMENTACION:

El animal usado en toda la experiencia fue el PERRO , de raza indeterminada .

Suministrado por el laboratorio de animales del departamento de veterinaria del ayuntamiento de Sevilla.

Todos fueron tratados según la "convención Europea para la protección de los animales, usados con propósitos experimentales".

Los animales fueron vacunados previamente por el servicio de veterinaria del laboratorio experimental contra el virus rábico así como desparasitados .

Se utilizaron parejas de animales de peso similar + - 10 % , usándose el primero como donante del corazón y al segundo como receptor del mismo, tras las 24 horas de conservación.

Todos los animales fueron premedicados con "Ketamina" (5mgrs /Kg/ peso), usando para la inducción anestésica pentotal sódico (2,5mg /Kg)

-ventilación mecánica con O₂ a 3 l/m y oxido nitroso 6 l/m.
-usando como gas anestésico "Forane ".(116).

B.2.-ANIMAL DE EXPERIMENTACION:DEFINICION DE LA MUESTRA:

La muestra consta de un total de 60 animales de experimentación (Perro de raza indeterminada)

Repartidos en parejas similares de peso ,donde uno actuaba de donante y el otro de receptor del corazón.

FASE PRELIMINAR 20 PERROS :

10 DONANTES DE CORAZON

10 RECEPTORES DE CORAZON

FASE TESIS 40 PERROS :

- GRUPO DE CONSERVACION POR INMERSION O TESTIGO

* 10 DONANTES DE CORAZON

* 10 RECEPTORES DE CORAZON

- GRUPO DE CONSERVACION CARDIACA CON PERFUSION

* 10 DONANTES DE CORAZON

* 10 RECEPTORES DE CORAZON

C.-MATERIAL ESPECIAL PARA LA EXTRACCION**1.-MATERIAL QUIRURGICO:**

Para la extracción del órgano (CORAZON) se necesita el siguiente material especial:

a)Para la anestesia

b)Para la cirugía de la extracción

a) para la anestesia

1.-pentotal en jeringa de 10 cc iv

2.-intubación orotraqueal mediante tubo PORTEX con balón de inflado de baja presión.

3.-ventilación con "ambú"(sistema ventilación manual)

4.-aguja de punción "abocath" nº 18, con sistema de goteo conectado a una solución Glucosada de 1500cc de capacidad.

5.-respirador con vaporizador anestésico(Draeger Pulmomat) y vaporizador para forane.

6.-drogas anestésicas:

(fentanylo,pancuronio,etrane,ketamyna)

b)para la cirugía de la extracción:

FUERA DEL CAMPO QUIRURGICO

- 1.-bisturí eléctrico, para diatermia y electrocoagulación
- 2.-aspirador eléctrico, para la fase con recuperación de sangre como para la perdida.
- 3.-sistema cardioplejia en bolsa de presión con aguja de "aorta" nº 18 F y sistema de goteo sin aire.

MESA AUXILIAR DE QUIROFANO PARA LA PREPARACION DEL CORAZON.

- 1.-campo estéril, con bolsas dobles de PVC para manejo del órgano.
- 2.-contenedor corazón isoterma ,estéril
- 3.-bolsas aislamiento (dos) ,para la introducción del corazón y su conservación posterior.
- 4.-jarra con un litro de solución fisiológica helada a 40 C, para mantenimiento en hipotermia del corazón ,mediante irrigación del saco pericárdico.

MESA INSTRUMENTAL

- 1.-material estéril para la cirugía.
- 2.-cabeza aspirador
- 3.-mango bisturí eléctrico ,para diatermia.
- 4.-sistema cardioplejia (macrogotheo sin aire) +bránula PVC
- 5.-pinzas hemostasia "Kocher" (cuatro)
- 6-tijera esternón o sierra
- 7-pinzas vasculares (dos)
- 8-separador esternal (Finochietto)
- 9-disector (uno)
- 10-clamp de aorta (uno)
- 11-porta aguja vascular.

12-SUTURAS USADAS PARA LA EXTRACCION CARDIACA:

13-ligaduras de seda del 4 (dos para Vena Cava Superior y una para Vena Cava Inferior, otra para controlar aorta)

14-ligadura seda del 2/0 (dos) para la vena "acigos" vena muy desarrollada en el perro ,y que es preciso ligar.

15-seda del 2/0 con C-15"pericardio" (tres) ,para preparación del saco pericárdico.

16-sutura monofilamento de polipropilene 4/0 "corazón" (dos),para lesiones vasculares durante la extracción.

17-aguja para toma de biopsia TRUT-CUT

18-HEPARINA SODICA para anticoagulación (3mgr X Kg peso)

19-contenedores con solución de fijación para biopsia.(solución de Karnosky)

20-Sistema para la infusión de la solución cardioplejica consistente en:

Solución CARDIOPLEJICA preparada por el servicio de farmacia en bolsa EVA (etilvinil acetato) conservada a 10^o C e

introducida en un manguito de presión conectado mediante un sistema de infusión sin aire a una aguja de aorta para punción de la raíz aórtica e introducción ,bajo presión de dicha solución.

La bolsa de presión lleva un manguito inflable ,mediante una pera, conectada a un manómetro para medir la presión de inflado.(150 mmHg)

C.-MATERIAL ESPECIAL PARA LA EXTRACCION

2.-MONITORIZACION:

La monitorización necesaria durante la fase de la extracción del corazón es la siguiente:

Control del ritmo cardíaco mediante electrocardiograma en una de sus derivaciones DII a través de un MONITOR DE TRES CANALES HEWLET-PACKARD MODELO 78353A

Conectado al animal mediante electrodos de contacto que se insertan en la cara anterior del tórax ,permitiendo un control directo y visual de un trazado del electrocardiograma de superficie en sus derivaciones DI,DII y DIII así como un registro de las mismas a través de un prolongador, que se aplica al registrador BECKMAN R-611 donde se inscribe sobre papel milimetrado ,el trazado eléctrico de la derivación seleccionada , a una velocidad de 25 mm por segundo.(117).

Se controla los gases en sangre arterial, e iones mediante toma de muestras seriadas .

El llenado del sistema circulatorio se controla mediante la PRESION VENOSA CENTRAL (PVC) para que la muestra experimental sea homogénea.(118).

D.-MATERIAL ESPECIAL PARA LA PRESERVACION CARDIACA:

1.-SOLUCION DE CONSERVACION DEL CORAZON.-La solución de conservación cardíaca tiene la siguiente composición ,es la misma usada para la extracción del corazón ,por considerar que la conservación comienza desde la parada electromecánica del mismo.

POTASIO.....	K ⁺	30 mEq/1
SODIO.....	Na ⁺	95mEq/1
CALCIO.....	Ca ^{**}	0,5mEq/1
MAGNESIO.....	Mg ⁺	15mEq/1
BICARBONATO.....	HCO ₃ ⁻	10MEq/1
GLUCOSA.....		2%
OSMOLARIDAD.....		340mOsm/1
pH.....		8

SOLUCION CONSERVACION

Esta solución de conservación, se prepara por el Servicio de Farmacia del Hospital Universitario Virgen del Rocío de Sevilla.

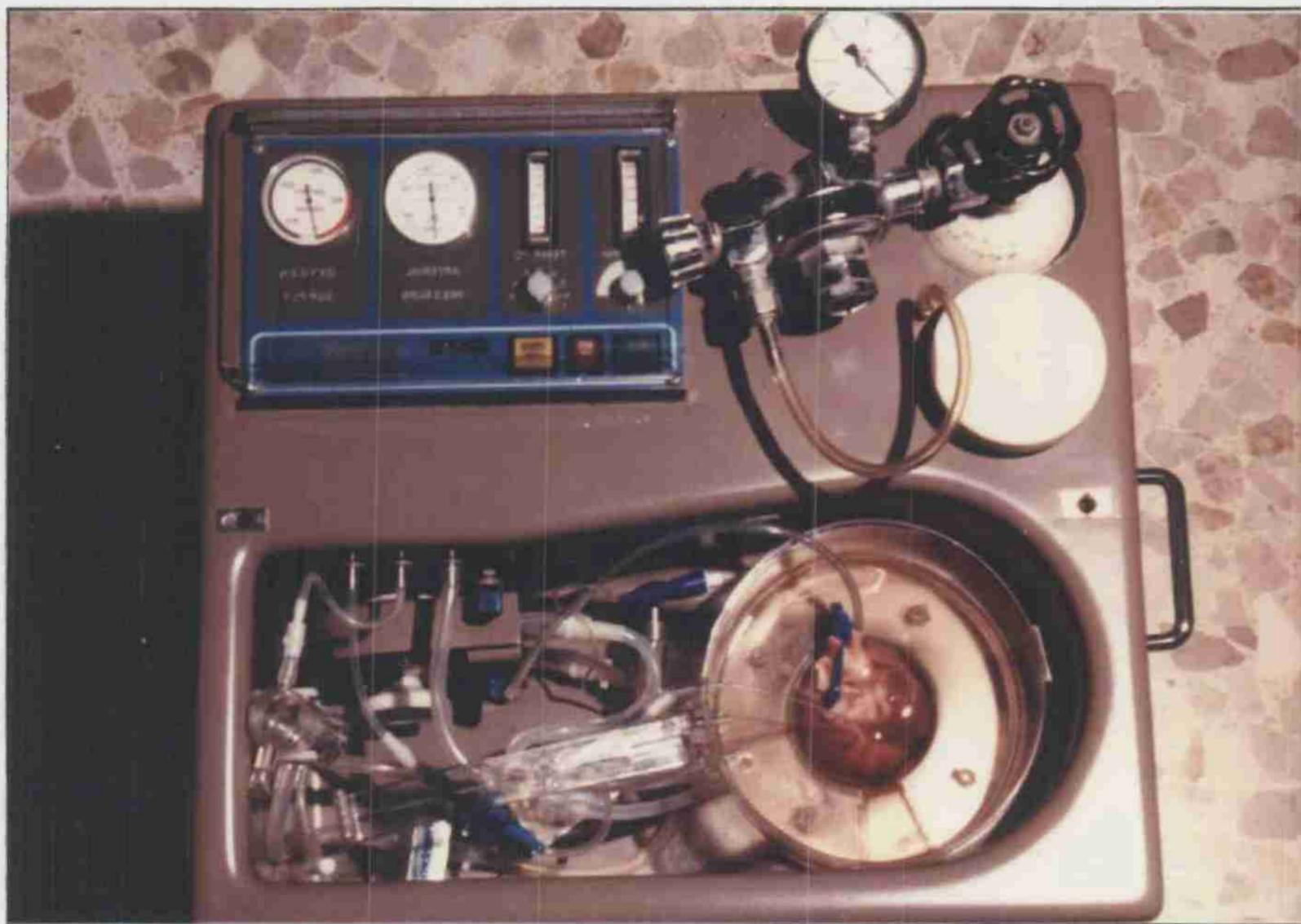
La preparación se realiza bajo condiciones asépticas en campana de flujo laminar horizontal, que provee un aire de clase 100 (es decir aire con menos de seis partículas de 0,2 micra por litro de aire).

Partiendo de soluciones electrolíticas comerciales ,reenvasándolas en bolsas de EVA (etilvinilacetato) de 500 ml de capacidad ,y conservándose en frigorífico hasta su utilización en el quirófano experimental a 10 ° C.

D.2.-SISTEMA PARA PERFUSION DE ORGANO AISLADO.CORAZON:El sistema usado en esta tesis para la conservación del corazón durante 24 horas esta basado en el "GAMBRO PRESERVATION SYSTEM" PF-3A con el contenedor para órganos PF-448.

Dicho sistema consta de:

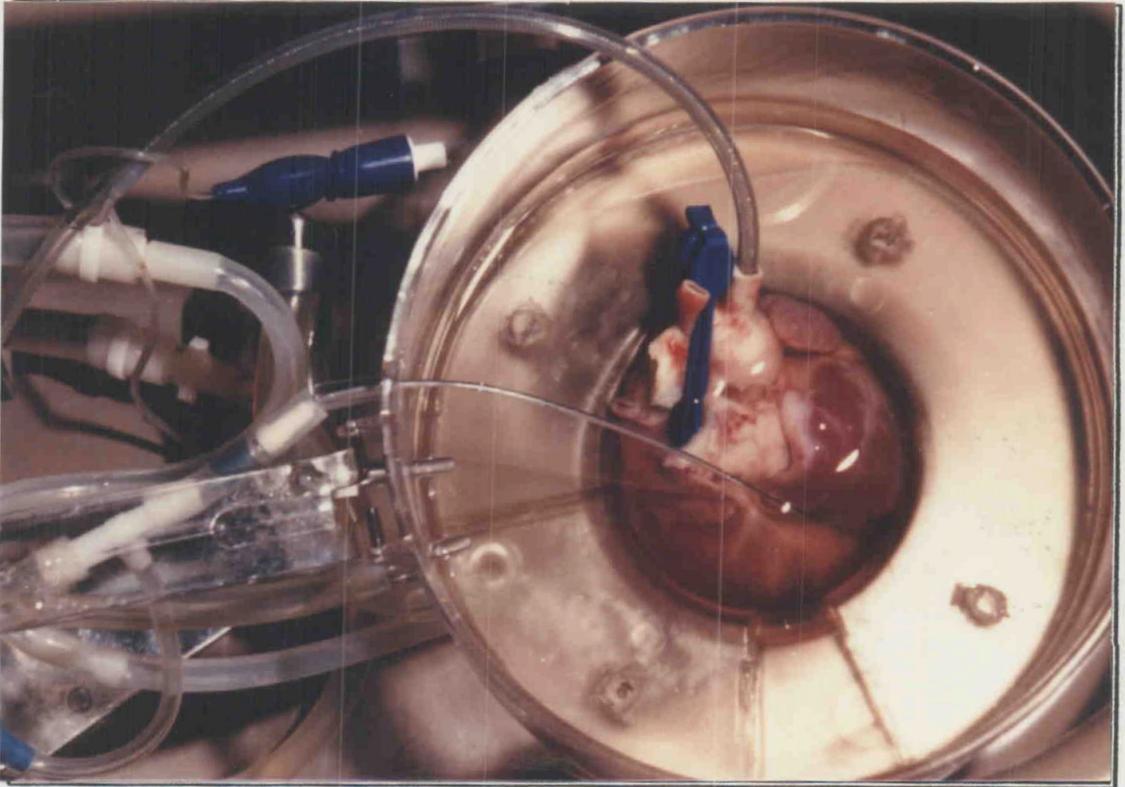
1) MAQUINA para la impulsión de la solución ,enfriamiento ,oxigenación y monitorización de la solución de conservación,de carácter autónoma . (PF-3A)(foto1).



Fotografía 1

En esta fotografía se observa un detalle de la máquina de perfusión usada en la experiencia de esta tesis, para la conservación de corazón.

2)CONTENEDOR para órgano , de un solo uso , donde se introduce el corazón , con la solución nutriente a perfundir.(PF-48) (foto 2).



fotografía 2

Contenedor de PVC de un solo uso(estéril) donde se aloja el corazón durante la experiencia.

1)MAQUINA. La máquina usada es la PF-3A ,autónoma y compartimentada en subsistemas como:

-subsistema de monitorización de :

.presión arterial continua.

.flujo de solución nutriente en mililitros minutos regulables mediante selector.

.temperatura en grados centígrados ,regulables

.flujo de oxígeno en mililitros/minutos

.manómetro de presión de la botella de gas (carbógeno)

-subsistema de impulsión: mediante un rodillo de presión peristáltica capaz de generar un flujo variable según un control manual.

-subsistema de hipotermia .Para conseguir un enfriamiento de la solución de conservación la "máquina" lleva un circuito cerrado por donde circula agua fría mediante una bomba de impulsión y un reservorio para hielo que permite mantener la temperatura constante ,según se haya seleccionado previamente con un termostato incorporado.

-subsistema para gas. La oxigenación de la solución de conservación se consigue mediante el burbujeo del gas comprimido en una botella con la mezcla de 95% de oxígeno y 5% de carbónico controlado mediante un selector que regula la salida de gas y su monitorización mediante un manómetro.

-sistema de autonomía: mediante baterías autorecargables de litio , que permite mantener la máquina funcionando con una autonomía de 4 horas,aunque el sistema permanece durante toda la experiencia conectado a la red.

2)CONTENEDOR Y LINEAS:

El sistema para contener el órgano es de plástico biocompatible recubierto de una camisa por donde circula agua fría para mantenerla a la temperatura deseada y un sistema de líneas,con filtros que permite llevar la solución nutriente hacia el corazón , fría , oxigenada y sin burbujas. (figura 1).

ESQUEMA GENERAL DE LA MAQUINA Y DEL CONTENEDOR PARA PERFUSION DE ORGANO AISLADO.

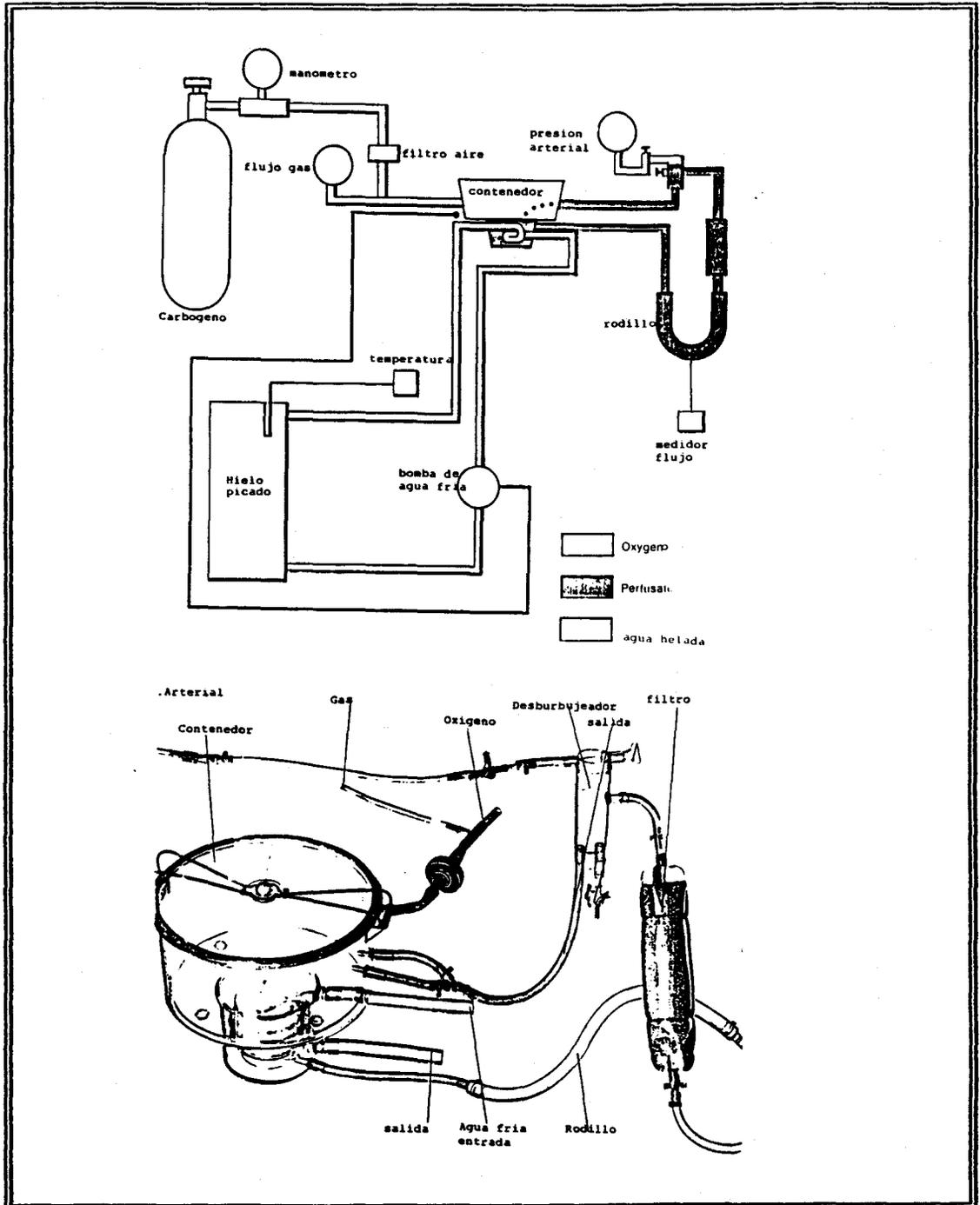


figura 1

En este esquema se detalla el sistema de perfusion usado

E.-MATERIAL QUIRURGICO ESPECIAL PARA LA IMPLANTACION DEL CORAZON:

- 1.-bisturi eléctrico para electrocoagulación de tejidos.
- 2.-aspirador calle,para la recogida de sangre no heparinizada y por lo tanto no recuperable.
- 3.-MESA INSTRUMENTAL (sábana,guantes y batas)
- 4.-seis campos y una sábana abierta
- 5.-bisturí de piel y bisturí fino para la apertura de cavidades cardiacas.
- 6.-sierra esternón
- 7.-pinzas hemostasia "kocher" (seis)
- 8-separador esternal de finochietto.
- 9-pinzas vasculares largas (dos)
- 10-tijera disección larga (dos)
- 11-porta agujas vasculares (dos)
- 12-clamp"Satinsky" largo y corto
- 13-clamp aorta (dos)
- 14-disector largo (uno)
- 15-mosquitos protegidos (seis)
- 16-jarra con un litro de suero fisiológico a 40C. (baño pericárdico)
- 17-pasahilos (cuatro) para control de canulas.
- 18-pasacintas (dos) para control de cavas.
- 19-sistema para hemodinámica(aguja trocar,alargadera,llave tres pasos,conexión a transductor de presión.
- 20-pinzas biopsia TRU_CUT de Travenol.
- 21-SUTURAS usadas para la implantación del corazón tras su

- conservación.(deben ser de material irreabsorbible).
- 22-sutura monofilamento polipropilene 4/0 (seis).Para cavidades cardíacas y grandes vasos.
- 23-seda del 4 sin aguja (seis) para control de grandes vasos, aorta pulmonar y cavas.
- 24-ligadura seda del 2/0 (dos)
- 25-seda del 2/0 pericardio con c-15 (dos)
- 26-heparina en jeringa (según peso)a 3mgr X Kg de peso
- 27-CANULAS CEC
- 28-Cánula arterial TYGON nº 16 aórtica.Siliconadas y que permitan flujos adecuados.
- 29-cánula venosa (dos) USCI 26 y 32 para CAVAS.Con anillos de refuerzo para que sean incolapsables.
- 30-conexión en Y, para el sistema de drenado con dos cavas
- 31-Termómetro septal (Myocardial Probe DPM Shiley) para monitorización continua de la temperatura del animal durante la intervención.
- 32-clamp de tubo(dos) atraumáticos.
- 33-líneas arterial y venosa de PVC siliconadas.
- 34-Filtro arterial, para eliminación de burbujas que eviten embolismos.
- 35-filtro de gas antibacteriano.
- 36-OXIGENADOR DE BURBUJAS:
- Sistema " de un solo uso", que permita la oxigenación de la sangre , mediante el burbujeo del gas en su interior, y que consiga el intercambio de temperatura para mantener la sangre en hipotermia.

E.2.-MATERIAL ESPECIAL ANESTESIA IMPLANTACION CARDIACA:

a) APARATO DE ANESTESIA marca DRAEGER, modelo TIBERIUS, con sistema mezclador de gases, a base de rotámetros, que permite combinar Oxígeno, Aire y Oxido Nitroso, provisto de:

- RESPIRADOR por generación de presión tipo PULMOMAT.
- VAPORIZADORES para la administración de anestésicos inhalatorios: HALOTHANO (VAPOR 19) e ISOFLURANO (ISOTEC 3 FORANE).
- CIRCUITOS abierto, semicerrado o cerrado con absorbedores de CO₂ por medio de cal sodada.
- ESPIROMETRO parcial y total (temporizador) para control de Volumen corriente y Volumen minuto.
- MANOMETRO para control de presiones en el circuito paciente
- ASPIRADOR por efecto Venturi generado por los propios gases anestésicos, con presión regulable a través de válvula mecánica.
- INTUBACION ORO-TRAQUEAL con tubo PORTEX con balón de llenado de baja presión.

Se usa un laringoscopio de pala larga, especialmente diseñado para intubación animal, por nuestro laboratorio.

b.-LINEAS:

LINEA VENOSA: se usan dos líneas venosas, una periférica tomada mediante aguja de punción "Abocath" del nº 14 en vena periférica, utilizada para la inducción anestésica.

Otra vía central, tomada por punción de la yugular interna del lado izquierdo a través de un Cavafix y conectada a un sistema para medida de presión venosa mediante una regleta graduada en centímetros de agua , que se usa también como vía rápida de administración de fluidos y drogas, permitiendo de esta forma el mantenimiento en las mejores condiciones del animal, antes y después del implante del corazón conservado.

LINEA ARTERIAL: por punción de una arteria (femoral) en la pata del animal con una aguja de punción "Abocath" del nº17 y conectada a una llave de tres pasos con una alargadera(INFLUX) hasta un sistema de lavado continuo de solución fisiológica heparinizada ("Intraflow"), hasta llegar a un transductor de presión que registra los cambios de presión en la columna de suero, modificada por los cambios de presión de la sangre y/ o de las cavidades cardíacas tras el implante del corazón conservado, consiguiéndose una monitorización hemodinámica completa.

c.-DESFIBRILADOR CARDIACO :

Consistente en un desfibrilador de corriente alterna con una duración de pulso breve comprendida entre 0,25 y 1 segundo de 50 Hz a 60 Hz tomados directamente de la

red de distribución de energía eléctrica, mediante un transformador elevador.

El modelo utilizado en esta tesis es el DES-FIBRILADOR DE PALAS INTERNAS BIRTCHER .The Birtcher corporation modelo 225 R.

Estando la tensión aplicada directamente sobre el corazón comprendida entre 80 y 300 voltios, siendo atravesada durante la descarga con una intensidad de hasta 15 Amperios.

d.-MARCAPASOS CARDIACO:

Como marcapaso se usa un estimulador eléctrico que establece y mantiene la actividad rítmica del corazón mediante impulsos eléctricos periódicos, conducidos a electrodos situados en la superficie del corazón (epicardio).

El Marcapaso usado es un MEDTRONIC externo de demanda con selector de asincronía (fijo) o sincronía (a demanda).

El oscilador del marcapaso ofrece un ritmo variable entre 20 y 150 impulsos por minuto con una salida en miliamperios entre 0,5 y 10 mA, conectándose al epicardio mediante electrodos implantables sobre el miocardio, siendo uno de ellos indiferente (negativo) y el otro electrodo, el activo(positivo)

El uso del marcapaso es muy frecuente en corazones trasplantados por la alta incidencia de BLOQUEO AURICULO-VENTRICULARES que presentan, ya que son corazones denervados.

El déficit hemodinámico ,tras la reperfusión ,que se produce como consecuencia de un bloqueo av se controla mediante el implante de dos electrodos cogidos mediante un punto a:

-uno en la cara anterior del ventrículo derecho(epicardio) y otro en

- músculo esternal, como electrodo indiferente.

Conectandose el generador a 100 latidos minutos en ritmo a demanda (asincrónico), con una salida en miliamperios de 1 mA y 5 Voltios.

3.-MONITORIZACION BIOLOGICA DURANTE LA EXPERIENCIA:

A.-MONITORIZACION DE PRESIONES.- Los cambios de presión originados en el sistema circulatorio ,que tienen lugar tanto durante la fase de implantación como durante la REPERFUSION (es decir una vez el corazón conservado es trasplantado y comienza a latir),son tomadas mediante un POLIGRAFO BECKMAN R-611 DYNOGRAPH RECORDER a través de un transductor de presión P23AA que comunica los cambios de presión ocasionados en el torrente circulatorio , significativos de la actividad del corazón.

Este modelo es un registrador oscilográfico de escritura directa programado para el registro de datos físicos y fisiológicos.

Mediante un transductor de presión se registran las presiones generadas en el corazón así como el registro de biopotenciales (electrocardiograma) mediante electrodos implantables en la superficie del tórax.

El R-611 registra sobre carta milimetrada, con distintas velocidades del papel (usándose para esta experiencia 25mm por segundos) y consta de:

1. Entrada acoplador (input coupler):la señal de entrada se le aplica a un transductor, el cual convierte la señal en

voltios, este voltaje generado por el transductor se aplica a un cable interconectado a la entrada del acoplador que se usa como filtro selectivo de datos o para presentar computación analógica, o de frecuencia.

2. El preamplificador es un canal sensitivo único, el cual amplifica las señales desde un nivel producido por el transductor, a un nivel que pueda ser aceptado por el amplificador.

3. El amplificador añade una ganancia adicional a la señal, proporcionando la fuerza necesaria para mover el galvanómetro que utiliza una bobina móvil para conducir la pluma y hacer un registro.

TRANSDUCTORES DE PRESION: Se usa un transductor extravascular que consta de un diafragma como sensor y un sistema para medir su deformación.

Posee una cúpula transparente con dos salidas, una de ellas para purgar burbujas y la otra para medir presiones.

El transductor de presión usado en esta tesis es el P23AA para medidas de presiones arteriales y el P23DB para medidas de presiones venosas.

SISTEMA PARA MEDIDA DE PRESIONES: El sistema consta de aguja de punción que se introduce en la cavidad o vaso a medir, conectada mediante sistema luer/lock a una alargadera INFLUX, dicha alargadera se conecta a un sistema de lavado continuo INTRAFLOW que fluye continuamente con una solución fisiológica heparinizada mantenida a presión, mediante bolsa de Fenwal.

Todo el sistema se conecta a una llave de tres pasos para toma de muestra, y control de la calibración mediante el "cero" que a su vez se conecta a una "cúpula" que está en contacto con el transductor de presión y este a su vez con el monitor, donde se registran en papel milimetrado las presiones.

b.-MONITORIZACION DE LA TEMPERATURA:

El control de la temperatura del corazón, se realiza mediante la introducción de una sonda termistor (SONDA MIOCARDICA D "DPM" & "DPML" , por punción ,en el espesor del miocardio a nivel del septo interventricular y conectada a un monitor de temperatura " SHILEY TEMPERATURE MONITOR " TMI que registra en dígitos la temperatura en un rango comprendido entre 0 °C y 50 °C. Dicha monitorización es continua durante todo el tiempo que dura la intervención.

4.-SISTEMAS PARA CIRCULACION EXTRACORPOREA:

Para mantener la circulación, sobre todo de órganos vitales, como el riñón, hígado, cerebro etc, mientras se realiza la implantación del corazón conservado, es necesario utilizar un SISTEMA DE ASISTENCIA (CIRCULACION EXTRACORPOREA) consistente en una MAQUINA PULMON-CORAZON que sustituya las funciones de bomba del corazón y las de oxigenación por los pulmones, compuesta por:

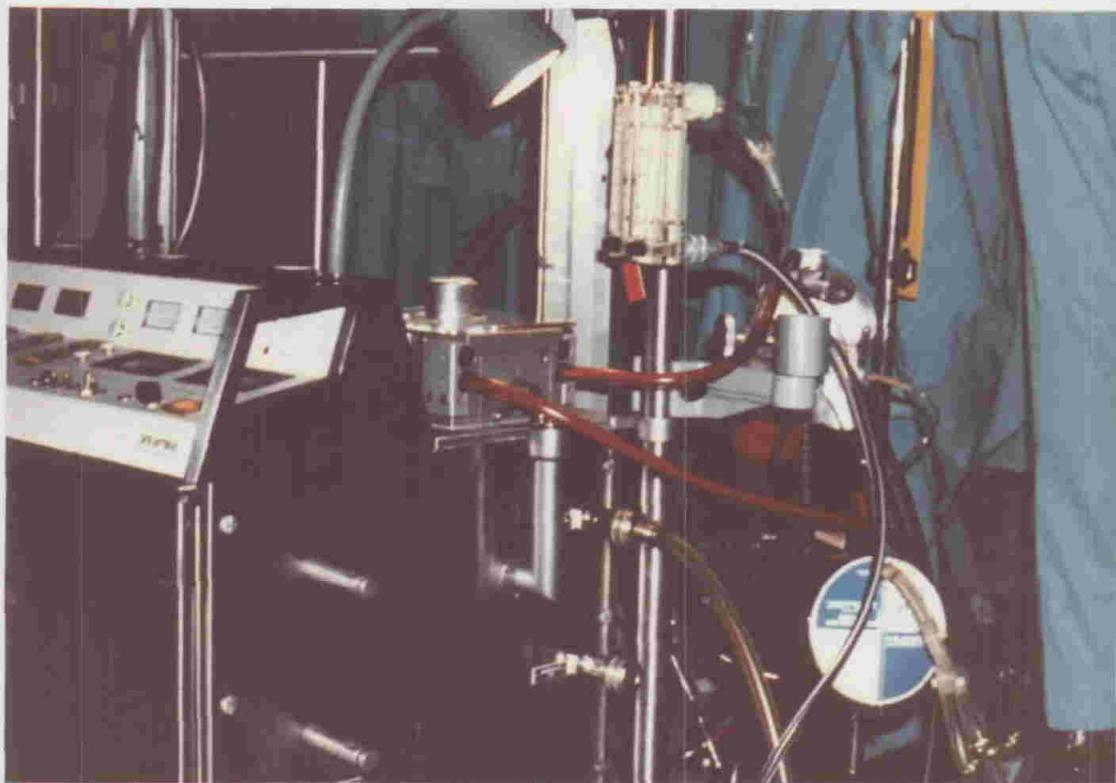
-BOMBA MODULAR SARM 5000 (Sarns Heart-Lung Consoles Model 5000 n.14463) con cinco rodillos peristálticos de presión ,sistema detector de burbujas,sistema de monitorización de nivel de volumen del oxigenador,sistema para control de la temperatura de la sangre y del agua.

Un rodillo se usa como bomba de impulsión arterial y dos como aspiradores.

El flujo arterial se modifica según las revoluciones del rodillo controlado mediante un selector.

El drenaje de la sangre venosa procedente de las cavas se realiza por gravedad, mediante dos canulas introducidas en la aurícula derecha,conectadas a su vez a las líneas de retorno.

Un sistema de aspiradores permite la recogida de sangre del campo quirúrgico,retornándola una vez filtrado, el sistema intravascular mediante un reservorio y dos rodillos de aspiración.(FOTO 3).



Ilustr.foto 3

fotografía 3

Bomba para circulación extracorporea, usada para la práctica del trasplante de Corazón en esta tesis.

Un sistema para normo-hipotermia incorporado permite, mediante un intercambiador de temperatura, mantener la sangre de retorno arterial a la temperatura deseada.

OXIGENADORES UTILIZADOS: la sangre drenada mediante las cavas es devuelta una vez oxigenada, mediante un OXIGENADOR DE BURBUJAS con intercambiador de temperatura para que mediante el paso de una corriente de agua, y de una corriente de oxígeno, se consiga la oxigenación y temperatura adecuada a las necesidades del organismo.

La adecuada oxigenación de la sangre se consigue mediante el burbujeo de un chorro del gas en el interior del oxigenador a través de un difusor ,que permite la difusión del oxígeno en la sangre.

El Oxigenador usado en esta tesis,es el COBE OPTIFLO II (42-221), unidad estéril,usada cuando se practica un "bypass" cardiopulmonar convencional en clínica humana.

Está formada por una columna donde el oxígeno es transferido hacia la sangre y donde se extrae el carbónico.

-un intercambiador de temperatura .

-una cámara desburbujeadora y un reservorio arterial.

LINEAS Y FILTROS : las líneas son de PVC siliconadas en su interior para minimizar la acción trombogénica de los plásticos.

Se usan filtros en línea arterial y filtro en líneas de oxígeno.

El filtro usado para la línea arterial es el FILTRO DE SANGRE PALL ULTIPOR para circulación extracorporea, con superficie efectiva de 645 cm^2 y poros de 40 nanomicras.



Otro filtro usado es el FILTRO ULTIPOR para la conducción de gas al oxigenador, que impide la contaminación bacteriana de la sangre e impide el bloqueo mecánico del difusor de oxígeno, sin que produzca interferencia con la entrada de oxígeno.

F.-MATERIAL LABORATORIO BIOQUIMICA:

ANALIZADOR DE GASES:

Se usó el SISTEMA ANALIZADOR DE GAS EN SANGRE CIBA CORNING 288 para el cálculo del pH, (carbónico) pCO_2 , (Oxígeno) pO_2 , sodio (Na^+), potasio (K^+), hemoglobina total, calcio ionizado (Ca^{+2}) y cloruro (Cl^-) así como los siguientes parámetros calculados: bicarbonato real y normal (HCO_3^-), anhídrido carbónico total (TCO_2), exceso de base in vivo e in vitro (BE), saturación de oxígeno (O_2 CT) y hematocrito. (119).

Los principios de funcionamiento se basan en sistemas de "electrodos" como:

ELECTRODO TESTIGO: es un electrodo de Ag/AgCl (plata/cloruro de plata) y lleno de KCl saturado separado de la muestra por una membrana de celulosa, creándose una difusión entre la muestra y el cloruro de potasio saturado en la membrana.

Este potencial no cambia de una muestra a otra, proporcionando un potencial constante para la célula

electroquímica. Se realiza la conexión eléctrica con los electrodos de medida por medio del conductor Ag/AgCl revestido de un polímero permeable a los iones.

La diferencia de potencial que se desarrolla entre el electrodo de medida y el electrodo testigo varía con la actividad del ion de la muestra.

ELECTRODOS DE pH. Las características ácido-base de la sangre o plasma se describen con el pH (concepto de pH introducido por Sorensen).

Con el modelo utilizado la medición del pH consiste en un electrodo de medida, capaz de detectar los iones de hidrógeno.

El electrodo pH es de cristal y desarrolla una diferencia de potencial cuando el pH de la muestra difiere del pH de la solución de llenado del electrodo.

ELECTRODO DE $p\text{CO}_2$. El anhídrido carbónico (CO_2) es un producto del metabolismo celular y su desviación implica un trastorno en el equilibrio ácido-base.

El sistema de medición se basa en el electrodo descrito por Severinghaus, y consiste en un electrodo de

cristal separado de la muestra por una membrana permeable al CO_2 .

SISTEMA ELECTRODO pO_2 .El grado de intercambio de oxígeno (O_2) en los pulmones y la capacidad de la sangre de distribuirlo por los tejidos se puede valorar calculando la presión parcial de oxígeno en el plasma o en la sangre completa.(120).

En el modelo usado en esta tesis (CORNING 288) el sistema de medición de pO_2 se basa en el electrodo de oxígeno descrito por Clark . Dicho electrodo es AMPEROMETRICO ya que mide la corriente obtenida por un proceso electrolítico que se realiza por la presencia del oxígeno.

F.-2.-ANALIZADOR DE IONES:Se usa como analizador de iones durante esta tesis el ANALIZADOR CIBA CORNING 288 que estudia la muestra a través de electrodos como el de:

SISTEMA ELECTRODO DE SODIO: el sodio (Na^+) es el catión extracelular mas importante del organismo.Desempeñando un papel importante en el mantenimiento de la distribución del agua y la presión osmótica en el fluido extracelular.

En el modelo CORNING 288 utilizado en la tesis ,para la determinación del sodio se usa un electrodo selector de iones de cristal.

Su membrana es un capilar de cristal selectivo de los iones de sodio.La diferencia de potencial creada entre

el electrodo de medida y el testigo varía con la actividad iónica de la muestra.

SISTEMA DE ELECTRODO PARA IONES POTASIO: El potasio (K^+) es el catión intracelular mas importante. El electrodo consiste en un portador neutro selectivo al potasio, inmovilizado en una membrana de PVC (polivinilo).

Se desarrolla un potencial a través de la membrana que es directamente proporcional a la actividad del potasio de la muestra.

SISTEMA DE ELECTRODO DE CALCIO IONIZADO: El calcio ionizado (Ca^{2+}) es la forma activa del calcio y comprende el 45 % del calcio total que existe en el plasma. Se usa como electrodo selector de iones de membrana líquida y consiste en un portador neutro selectivo al calcio, inmovilizado en una membrana de PVC.

Esta membrana se halla en contacto con la muestra por un lado y la solución de llenado del electrodo por el otro lado. Desarrollándose un potencial a través de la membrana que es directamente proporcional a la actividad del calcio ionizado en la muestra.

SISTEMA ELECTRODO CLORURO: El cloruro es el anión extracelular mas importante y desempeña un papel fundamental en el mantenimiento de la distribución del agua, presión osmótica y

equilibrio anión-cación en el fluido extracelular.

En el modelo usado en esta tesis CIBA CORNIG 288 este electrodo consiste en un selector de iones de membrana líquida.

La diferencia de potencial que se desarrolla entre el electrodo testigo varía con la actividad iónica de la muestra.

SISTEMA PARA MEDIDA DE LA HEMOGLOBINA TOTAL: La hemoglobina es el elemento mas importante de los glóbulos rojos. Es una proteína tetranémica que consiste en cuatro cadenas polipeptidas, cada una de las cuales tiene una molécula HEM conteniendo hierro. Las moléculas de HEM se combinan reversiblemente con el oxígeno y el anhídrido carbónico para transportar el oxígeno y el anhídrido carbónico entre los pulmones y los tejidos .

En el modelo usado en esta tesis se utiliza un método de análisis de inyección de flujos .(Ciba Corning modelo 288).

EL CIBA CORNING 288 facilita valores de otros parámetros utilizando diversas ecuaciones como:

ECUACIONES DE BICARBONATO: Relacionando los iones de bicarbonato con la pCO_2 .

CONTENIDO DE OXIGENO: es el volumen total de oxígeno contenido

en la sangre expresado en % de volumen.

EXCESO DE BASE: Expresión empírica que se aproxima a la cantidad de ácido o base que sería necesario para dosificar un litro de sangre para un pH normal.

ANHIDRIDO CARBONICO TOTAL: en combinación con el pH y pCO_2 para distinguir entre trastornos metabólicos o respiratorios.

El instrumento consiste en cuatro sistemas:

1) Interfaz del ordenador que facilita la información y nos permite dirigir las actividades.

2) Sistema de medidas que detecta los análisis presentes en la muestra y es donde se encuentran los electrodos.

3) sistema fluídico que es el responsable de los movimientos de flujos , tanto de gas como de líquidos.

4) Un sistema electrónico que dirige todas las operaciones.

G.-MATERIAL PARA EL ESTUDIO MORFOLOGICO:

1.-PESO.-el utilizado es una balanza de precisión con las siguientes características:

- pesas de décimas de gramo
- platillo con 20 cmtrs de diámetro
- con cápsula estéril para pesada
- hasta 500 gramos de máximo.

2.-MICROSCOPIA OPTICA:Se usa un microscopio convencional LEITZ (Vetzlan) con ocular graduado con reglilla y cuadrícula para estudio cualitativo y cuantitativo de los cambios morfológicos del miocardio.

3.-MICROSCOPIA ELECTRONICA: El microscopio electrónico utilizado es el " MICROSCOPIO ELECTRONICO PHILIPS MODELO EM 300 "

4.-MATERIAL DE BIOPSIAS: El material necesario para biopsias comprende:

-aguja para tomas de biopsia TRU-CUT (Travenol)

-contenedores de cristal para la muestra

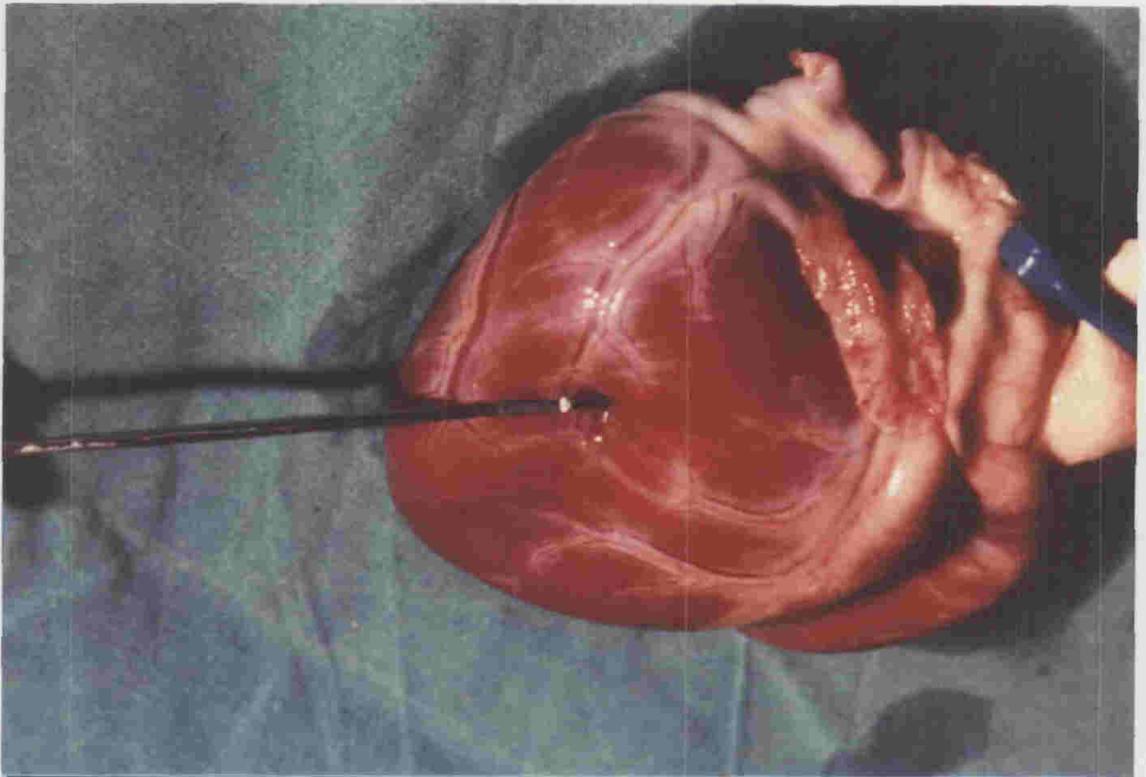
-solución de glutaraldéhidro al 5%

-nevera de pequeño tamaño para el transporte de la muestra

-azul de toluidina

hematoxilina y eoxina

En la página siguiente se observa una pinza de biopsia utilizada para la toma de muestra.(fotografía 4



Ilustr.foto 4

fotografía 4

Pinza de biopsia para la toma de muestras.

H.-MATERIAL ESTUDIO FUNCION CARDIACA TRAS LA CONSERVACION:

1.-BALON DILATACION INTRAVENTRICULAR, usado para medida de la función ventricular tras el implante del corazón conservado , así como de la Compliance Ventricular pasiva (para determinar la "dureza" del miocardio).

El balón para estudio de la función ventricular, reúne las siguientes características técnicas:

-fabricado en látex, para que sea lo suficientemente flexible y se adapte a la cavidad ventricular con los diferentes volúmenes de llenado.

-con compliance lo mas próxima al 0, es decir que hasta 25 cc de llenado con solución salina no genere por si mismo presión.

-interconectado a un cateter rígido y corto para que la transmisión de las presiones sea lo mas fiable.

-las modificaciones de la presión se transmite a un transductor de presión, que a su vez se conecta a un registrador.

Con todo lo anteriormente expuesto se desarrolló un balón en el laboratorio experimental del hospital "Gregorio Marañón" en la comunidad autónoma de Madrid, que fue el usado en esta tesis.(FIGURA 2)

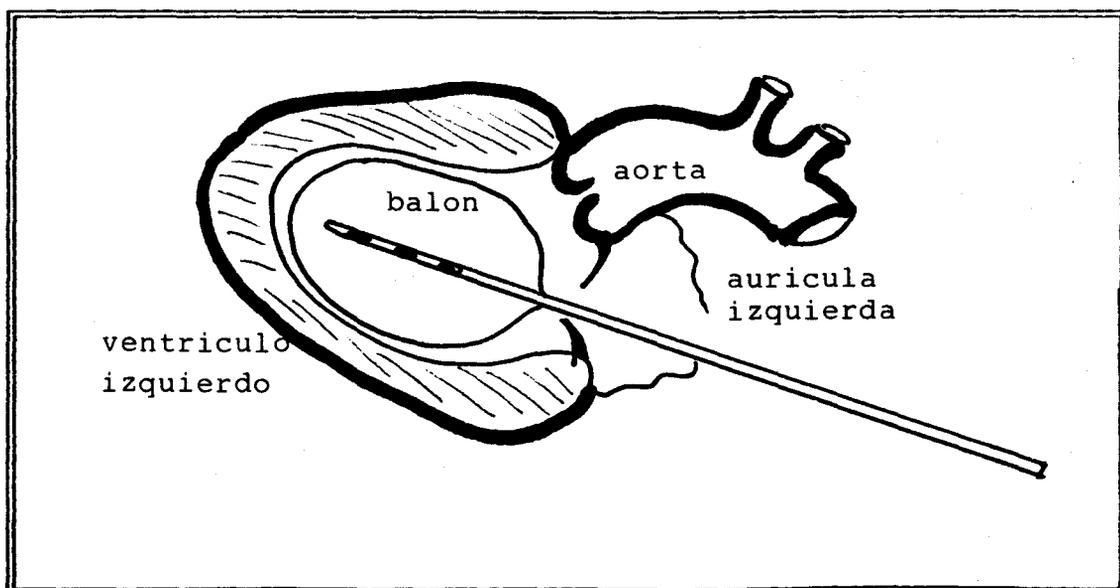


figura 2

En la figura 2 de la página anterior, se observa el esquema del balón utilizado para la medida de la Compliance Ventricular izquierda, en el interior de la cavidad ventricular, una vez distendido por la inyección de un volumen conocido de solución salina.

2.-CAPSULAS DE PRESION Y REGISTROS :

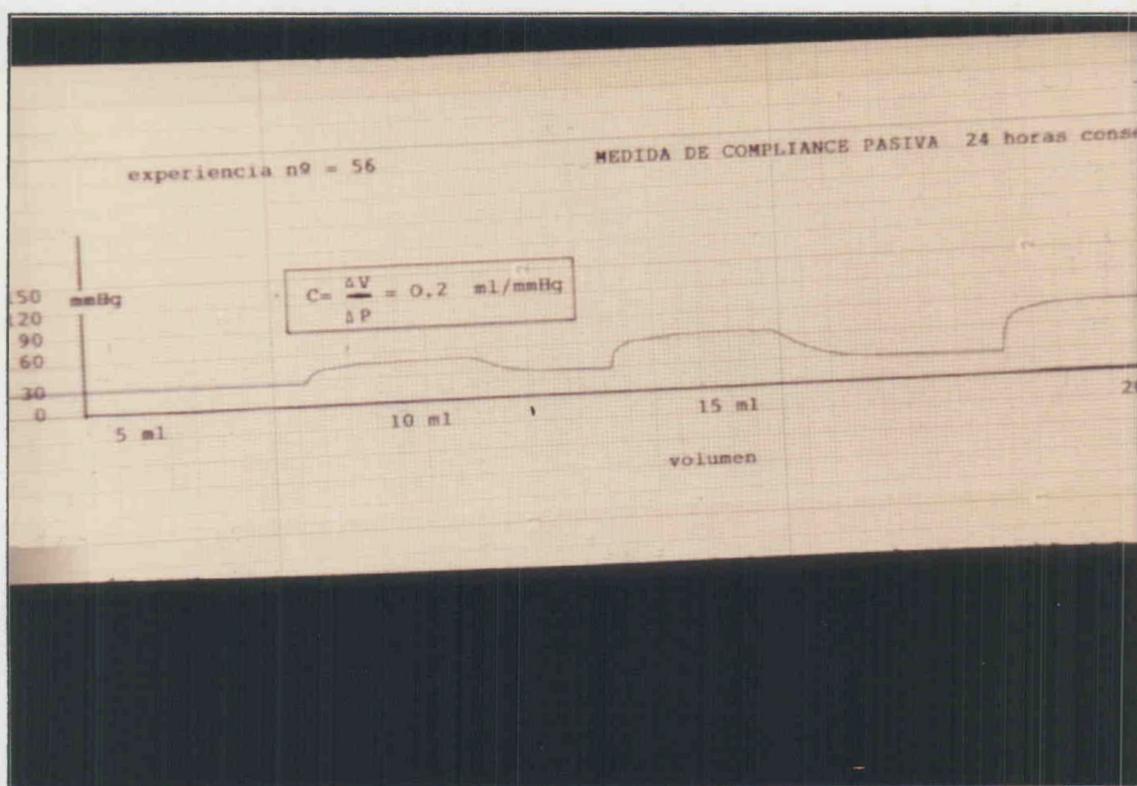
Para la medida de la función ventricular mediante la compliance ventricular ,es preciso conectar el sistema a un medidor de presión y registrados de la siguiente forma:

El balón de dilatación intraventricular diseñado, previa purga de aire con solución salina, se conecta a una llave de precisión de tres pasos, donde, en un extremo se introduce una jeringa de infusión especial de cristal, y el otro extremo se conecta a un transductor de presión modelo P23AA .

Dicho transductor de presión esta interconectado con un POLIGRAFO BECKMAN R-611 DYNOGRAPH RECORDER , donde se registra trazados de presión en relación con volúmenes de inyección, según la Compliance ventricular.

Se construyen curvas de presión-volumen en relación con el estado contráctil de la cavidad ventricular izquierda , a lo largo de todo el periodo de la conservación, con lo que se pretende medir la "dureza" del músculo cardíaco y con ello la viabilidad del mismo tras el reimplante.

En la FOTO 5 se detalla una curva construida por las presiones generadas tras la introducción de diferentes volúmenes de llenado y el valor de la Compliance Ventricular izquierda en esa experiencia.



fotografía 5

En esta fotografía se detalla una curva típica realizada para la determinación de la Compliance Ventricular izquierda .

En el eje X se especifican los volúmenes de solución salina inyectado para provocar dilatación del balón, y en el eje de las Y se indica la presión generada.

I.-MATERIAL ESTUDIO ESTADISTICO:

1.-ORDENADOR: El computador usado para el estudio estadístico de esta tesis doctoral es el IBM personal System/2 modelo 50. Con sistema operativo DOS 3.30 con disco fijo de 20 megabites y diskettes de 3.5 pulgadas.

2.-SISTEMA ESTADISTICO:

Paquete estadístico STATGRAPH, que además de realizar cálculos estadísticos, genera directamente los gráficos correspondientes.

Se han realizado los estudios siguientes.

- Estadística descriptiva: medidas de tendencia central, de dispersión y estudio de la distribución.
- Estadística inferencial: correlación entre las diferentes variables.
- Construcción de gráficos y curvas representativas de las mismas.

---oOo---

METODOLOGIA:

Se extrae el corazón del animal donante, conservándose durante 24 horas. Posteriormente se valora el tipo de conservación mediante métodos morfológicos, bioquímicos, funcionales. Por último se valora su hemodinámica, tras el implante (trasplante de corazón) a otro animal.

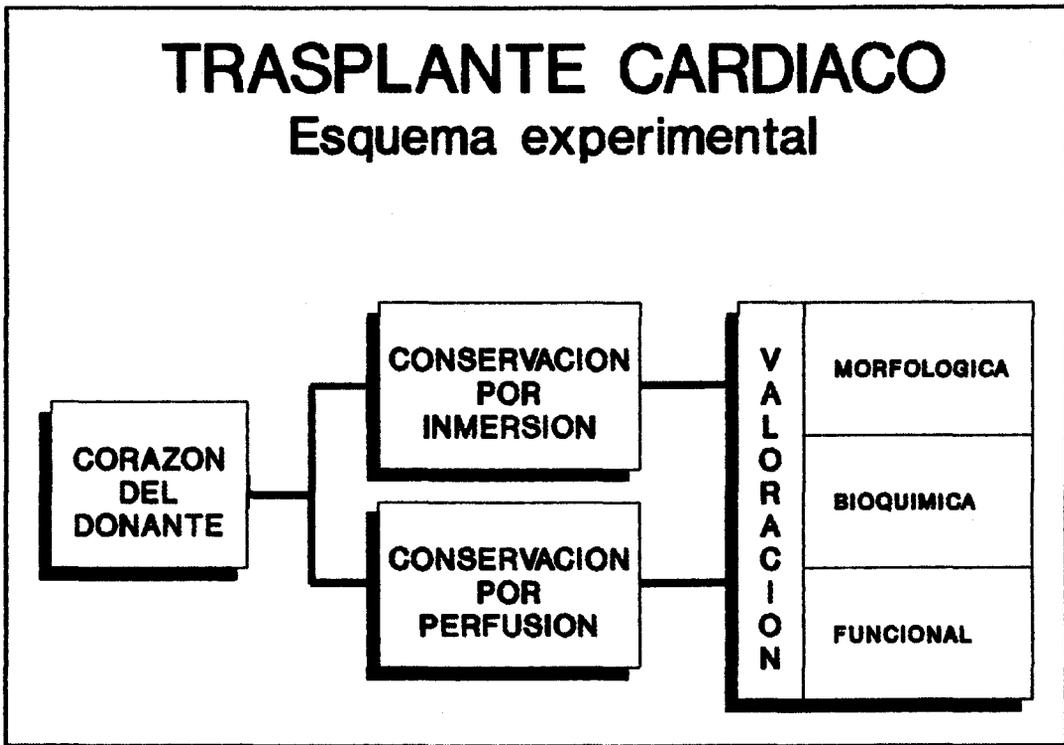


figura3

Mediante el esquema general arriba expuesto, se representa el método usado para la consecución del objetivo. En el se puede observar dos métodos de conservación, uno de ellos convencional, consistente en la conservación por inmersión y el otro el diseñado para esta tesis, mediante la perfusión de un órgano.

Se representan también los métodos usados para la valoración de dicho sistema y sus interrelaciones, así como la validación clínica mediante el trasplante de corazón.

I.-METODOLOGIA DE LA DONACION DEL CORAZON:

A.- EXTRACCION DEL ORGANNO:(129) El método seguido para la extracción del corazón ,que se conservará durante 24 horas ,ha sido en todos los casos la siguiente:

Se usa un animal(PERRO) de peso similar ,con constantes mantenidas durante la intervención (donación) como ,presión arterial media por encima de 50 mmHg,presión venosa central en 10 cm de agua y presión parcial de oxígeno a 100 mm Hg.

La intervención se realiza de la siguiente forma:

- 1.-pintar campo quirúrgico con alcohol yodado
- 2.-sábana abierta
- 3.-conexión bisturí eléctrico
- 4.-conexión aspirador
- 5.-apertura piel sobre plano anterior del tórax
- 6.-esternotomía media para llegar al mediastino anterior.
- 7.-apertura pericardio en T invertida y fijación piel hasta llegar al corazón.
- 8.-se aísla aorta y pulmonar (seda del 4),para control.
- 9.-dos ligaduras por cava superior
- 10-una ligadura por cava inferior
- 11-ligadura y sección de vena acigos (2/0) por anomalía en

este animal de experimentación.

12-purgar de burbujas de aire la cardioplejia, para evitar durante su introducción el embolismo coronario.

13-heparina intraauricular para anticoagulación sistémica.

14-ligar cava superior entre dos ligaduras y cortar ,para disminuir la entrada de sangre en el corazón , previa a la cardiectomía.

15-extraer sangre por femoral (retirar pinza),usándose como banco de sangre para la intervención del implante.

16-parar ventilación,ya que no es preciso mantenerla.

17-ligar cava inferior

18-CLAMPAR AORTA lo mas alto posible (comienza la anoxia miocárdica).

19-cardioplejia dentro del sistema coronario (500 cc)- mediante bolsa de presión)

20-suero frío en pericardio un litro,para disminuir gradiente térmico entre epicardio y endocardio,producido por la introducción de la solución cardioplejica.

21-abrir cava inferior por encima ligadura,para drenaje.

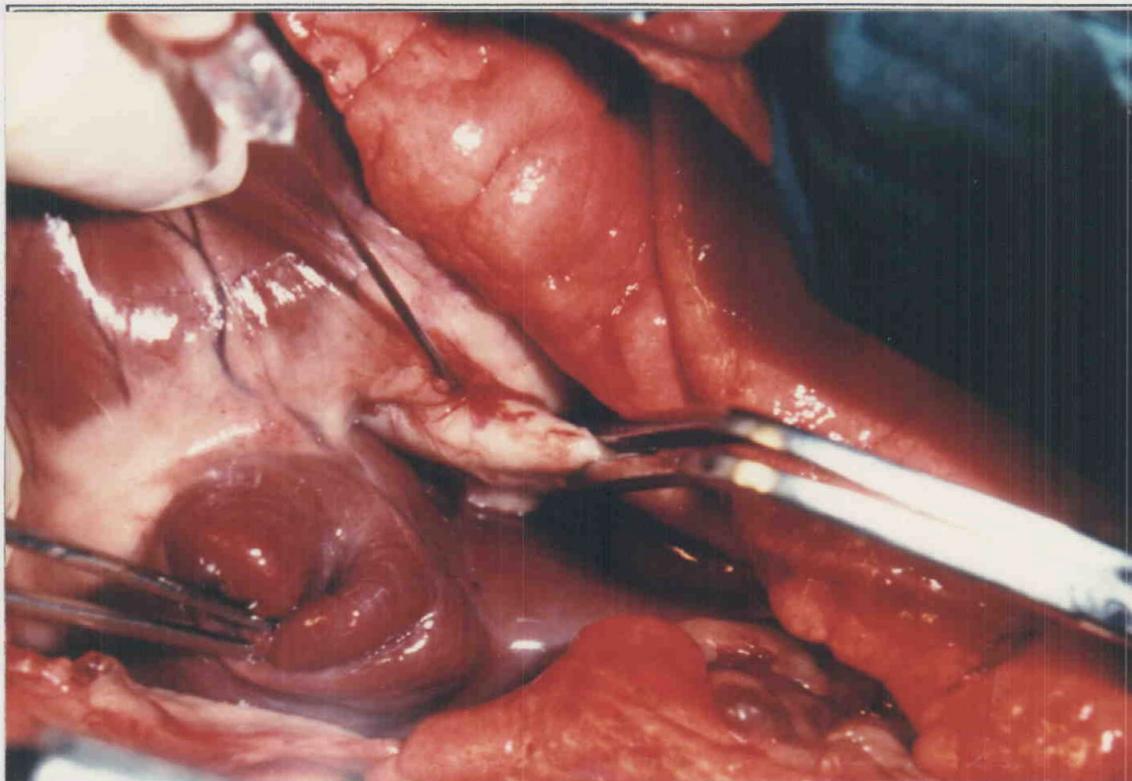
22-abrir aurícula izquierda " VPSI" ,para descomprimir cavidades izquierdas.

23-se corta la aurícula izquierda a nivel de venas pulmonares

24-sección aorta lo mas alto posible

25-sección arteria pulmonar por bifurcación

26-completar extracción del corazón y llevarlo al contenedor donde se conserva en suero salino a 4°C.



fotografía 6

En la foto 6 se observa la aorta pinzada y la aguja para la infusión de solución cardiopléjica en el sistema coronario del corazón donante como paso previo a la introducción en el sistema de conservación .

PREPARACION EXTERIOR DEL ORGANNO:

Una vez extraído el corazón se:

27-abrir la aurícula derecha desde cava inferior hasta orejuela

28-preparación y lavado en mesa auxiliar.

29-toma de biopsia transmural apex V.I,

30-peso del órgano para valorar el edema

31-transporte del mismo a la máquina de conservación, donde se conectará mediante la introducción de una cánula en raíz de aorta, a través de la arteria carótida izquierda, e inflado del balón para impedir el retorno, así como el cierre mediante "Clip umbilical" de la aorta distal

32.-iniciar la perfusión de la solución nutricia o introducirlo por inmersión según el método usado.

B.-METODOLOGIA DE LA CONSERVACION CARDIACA:Una vez extraído el corazón, previa parada cardíaca, por pinzamiento de la aorta e infusión de solución cardioplejica en el sistema coronario , entramos en la FASE DE LA CONSERVACION .

Esta fase desarrolla el SISTEMA DE CONSERVACION OBJETO DE ESTA TESIS y su comparación con la CONSERVACION TESTIGO.(POR SIMPLE INMERSION EN SOLUCION DE CONSERVACION)
METODOLOGIA DEL SISTEMA DE CONSERVACION CON PERFUSION: Este sistema consiste fundamentalmente en la perfusión de una solución de conservación (nutrientes) oxigenada e hipotérmica en el sistema coronario del corazón a un flujo constante durante 24 horas ,mediante un sistema autónomo.

Las características que debe reunir la perfusión del órgano son las siguientes:

- 1º.perfusión a flujo constante 0,4 ml x gramos de peso del corazón al inicio de la experiencia.
- 2º.la solución a perfundir esta a 10º C
- 3º.oxigenación con "carbógeno " (95 % O₂ y 5% CO₂) 4ºfiltrada de partículas en suspensión.
- 5ºcon desburbujeador (para evitar embolismos aéreos)
- 6ºmonitorización de la temperatura,flujo,presión variables.
- 7º en condiciones de esterilidad.

El corazón una vez parado y extraído, se pesa y se toma biopsias para control basal de los mismos.

-se prepara en una bandeja con suero helado para la implantación de una cánula con balón tipo "DPL Venous return canulae " , que se introduce en la aorta ascendente a través de la carótida izquierda hasta llegar un centímetro por encima del plano valvular aórtico , a nivel de los ostium coronarios , para que se mantenga una buena perfusión coronaria gracias a la competencia de la válvula aórtica-
(foto 7)

Se purga de aire el sistema y se infla el balón con 5 centímetros cúbicos de solución salina para que se quede anclado en el cayado aórtico por su imposibilidad de salir por la carótida.

La aorta distal se cierra con un CLIP UMBILICAL para evitar la salida retrógrada del liquido de conservación hacia el exterior.(foto 7)

fotografia 7



Una vez purgado de aire , para evitar embolismos aéreos se conecta al SISTEMA DE PERFUSION AUTONOMO "The Gambro Perfusion System " regulando el flujo a 0,4 ml x gramo de peso del corazón al inicio de la experiencia.La temperatura se regula a 10 ° C y el flujo de gas a 150 ml/m.

Durante la conservación, sistemáticamente se realizan los siguientes controles:(cada cuatro horas)

1ºPeso del corazón

2ºGasometrías de la solución de perfusión (pH ,PO₂ ,pCO₂)

3ºmedida de la presión media de perfusión.

4ºmedida de la temperatura del miocardio.

5ºmedida de la resistencia vasculares coronarias.

6ºmedida de los cambios iónicos que tienen lugar en la solución de conservación.

Y las siguientes determinaciones que se realizan al principio y al final de la conservación (0 y 24 horas) de la experiencia.

- a las 0 horas de la conservación=biopsia M/O y ME

medida COMPLIANCE.(112).

-a las 24 horas de la conservación= biopsia M/O y M/E

COMPLIANCE

Al terminar la conservación, y tomadas todas las determinaciones el órgano es lavado en solución salina

fisiológica a 4^o centígrados y se implanta en el sistema circulatorio del animal receptor para su última valoración FUNCIONAL IN VIVO mediante el trasplante de corazón a otro animal receptor.

BIOQUIMICA:

Los estudios bioquímicos que se realizan para el estudio de la solución de preservación y su estabilidad a lo largo del período de conservación son los siguientes:

-determinaciones seriadas de gasometrías en el líquido de conservación cada cuatro horas y su corrección mediante el aporte de bicarbonato .

-pH, (para medir la acidosis)

-pO₂ medida de la presión parcial de oxígeno disuelto en la solución de conservación, manteniéndolo constante en 400 mmHg.

-pCO₂ para la determinación del carbónico disuelto

Bicarbonato

-determinaciones seriadas de IONOGRAMAS (cada cuatro horas)
como:

Sodio, Calcio, y potasio, previa toma de un centímetro cúbico de solución de preservación , normalización de la temperatura (37 °C) e introducción en CORNIG para detección de los cambios iónicos.

C.-METODOLOGIA DE LA IMPLANTACION CARDIACA .TRASPLANTE DE CORAZON.-La valoración final del corazón conservado será cuando tras la implantación del órgano(trasplante de corazón) se estudie su comportamiento hemodinámico,para lo cual se sigue la siguiente metodología:

A) EXTRACCION CORAZ N RECEPTOR

- 1.- pintar tórax y ambas ingles con yodopovidona.
- 2.-disección arteria femoral derecha para monitorizar presión arterial.
- 3.-apertura de piel sobre plano esternal.
- 4.-esternotomía media mediante sierra.
- 5.-apertura pericardio y fijación a piel para hipotermia tópica con suero salino a 4 ° C.
- 6.-se controla ácigos ,por su importante drenaje anómalo.
- 7.-dos ligaduras del 4 a cavas (pasa cinta)

PREPARACION PARA ENTRADA EN CIRCULACION EXTRACORPOREA.

- 8.-disección aorta y pulmonar (ligadura del 4)
- 9.-punto en bolsa de tabaco sobre aorta, para canulación.
- 10-bolsa tabaco con prolene 4/0 orejuela Derecha
- 11-bolsa tabaco con prolene 4/0 cava inferior (pasa hilo)
- 12-circuito arterial ,venoso y aspiradores bomba (fijarlo)
- 13-heparina intraauricular a 3mgrs X Kgrs peso, para conseguir una anticoagulación sistémica.
- 14-arteriotomía aórtica para canulación

CONTINUACION ENTRADA CEC PARA CARDIECTOMIA:

- 15-conexión a la bomba de circulación extracorporea mediante

línea arterial, evitando toda burbuja de aire.

16-canulación cavas con cánulas reforzadas USCI .

17 conexión a la bomba mediante líneas de retorno venoso por gravedad , hasta el oxigenador.

18-entrada en CIRCULACION EXTRACORPOREA

19-hipotermia sistémica a 30 grados centígrados

20-clampaje cavas y ácigos para dirigir toda la sangre a través de la bomba de CEC.

21-parada ventilación mecánica, ya que todo el flujo lo lleva perfusión.

22-clampaje aórtico lo mas alto posible para parar el corazón y dejarlo exangüe.

23-apertura con bisturí y tijera de AD

24-continua cerca del surco AV por AI

25-sección aorta cerca plano valvular

26-sección pulmonar cerca plano valvular

27-extracción corazón.

La cardiectomía , se realiza una vez el corazón (enfermo) esté parado y exangüe, para asegurar el sitio de implante del corazón a valorar (conservado), gracias a la asistencia circulatoria mediante la bomba de extracorporea.

B)IMPLANTACION CORAZON:(87) la valoración mas importante del sistema de conservación diseñado en esta tesis se realiza mediante el implante, del corazón conservado, en un animal receptor , una vez extraído el suyo, y comprobándose tras la reperfusion, la respuesta hemodinámica que es capaz de realizar después de estar conservado durante 24 horas.

Una vez extraído el corazón del sistema de conservación se lleva hasta el quirófano donde se implanta al receptor , en situación ORTOTOPICA es decir en el mismo lugar que ocupaba su propio corazón que previamente ha sido extraído.

Implantación del corazón conservado durante 24 horas:

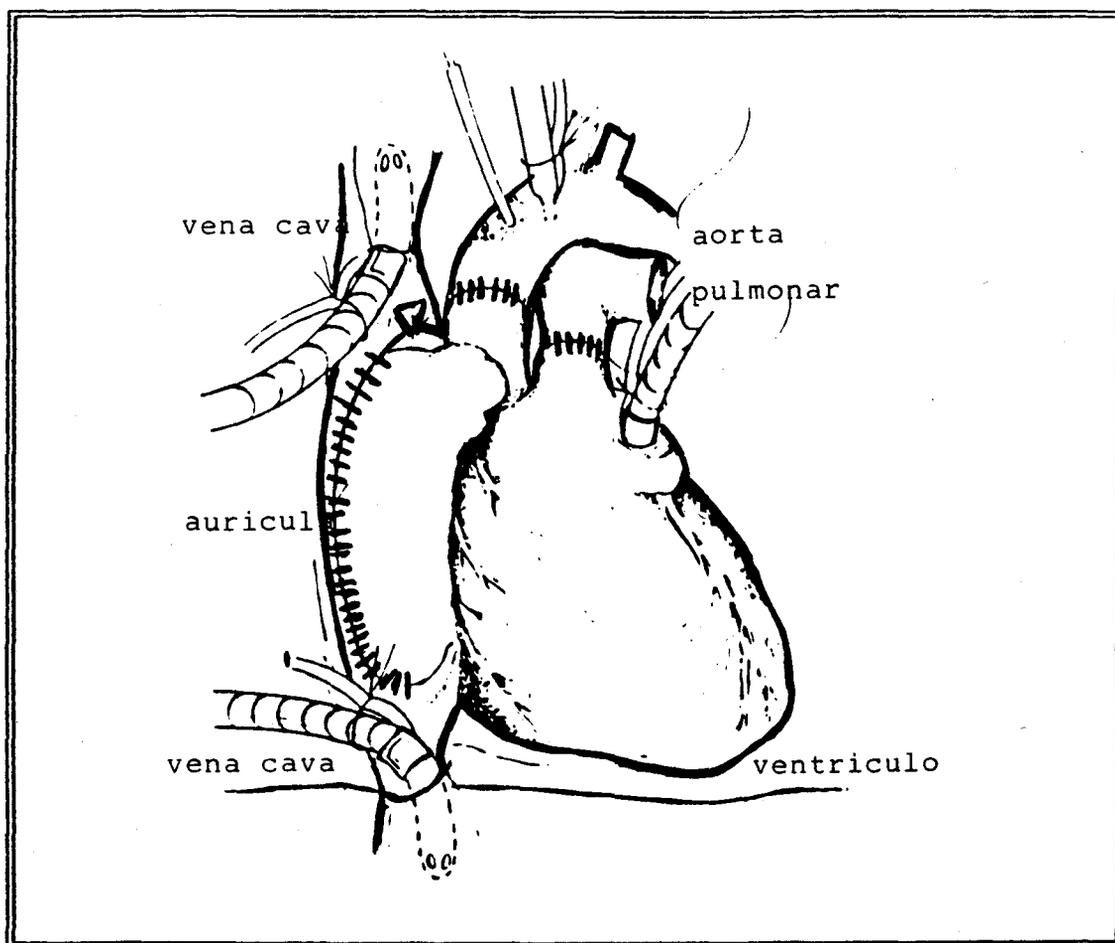


figura 4

En la figura 4 se observa un esquema general de la implantación de un corazón ,mediante la técnica desarrollada en esta tesis, similar a la descrita por Lower y Shumway para el trasplante de corazón ortotópico.

Mediante dicha técnica el corazón conservado se conecta al sistema circulatorio del receptor.

1-el corazón donante se sitúa en el hemitórax izquierdo, para comenzar el implante.

2-la primera sutura se realiza con prolene 4/0 a distancia vena pulmonar superior izquierda con la base de la orejuela.

3-sutura continua A.I. termina en borde inferior tabique

4-sutura continua con prolene 4/0 A.D. termina arriba

5-sutura continua pulmonar P. 4/0 termina arriba

6-sutura continua aorta P.4/0 termina arriba

7-Extracción aire AD,VD,AI,VI Ao yPul con aguja.

8-desclampa cavas para llenar el corazón derecho

9-ventilación para llenar aurícula izquierda

10-desclampa aorta con lo que se inicia la REPERFUSION del corazón implantado , por la llegada de sangre oxigenada al árbol coronario del corazón conservado (donante)

11-recalienta hasta 37 grados centígrados

12-revisión de hemostasia .

13-SALIDA DE CIRCULACION EXTRACORPOREA

Una vez terminado el implante del órgano, e iniciada la reperfusión del corazón mediante el desclampaje aórtico, se inicia la salida de la asistencia circulatoria, dejando el corazón cada vez maneje mayor cantidad de volumen , disminuyendo la asistencia.

14-HEMODINAMICA (medida de presiones en todas las cavidades cardíacas. Una vez que el corazón soporte el solo toda la circulación.

-
- 15-BIOPSIA transmural de ventrículo izquierdo (dos)
 - 16-protamina como antídoto 1:1 para la heparina
 - 17-decanulación cavas
 - 18-decanulación aórtica
 - 19-drenaje torácico
 - 20-electrodo MP dos AD y uno VD
 - 21-cierre alambre esternón
 - 22-se termina la experiencia , con anotación de datos.

CONTROL DE LA FIBRILACION VENTRICULAR a la salida de CEC.:

Se denomina fibrilación ventricular al movimiento espasmódico e independiente de las fibras musculares del corazón.

Siendo esta la forma habitual de salir de los corazones conservados durante largos periodos de tiempo, como consecuencia de la isquemia mantenida y de la hipotermia.

Por lo tanto es imprescindible contar con un sistema que provoque la vuelta al ritmo normal, ya que la eficacia del bombeo cardíaco depende de la ritmicidad y coordinación de sus cámaras.

La desfibrilación cardíaca se realiza aplicando una descarga eléctrica entre dos electrodos situados directamente sobre el corazón.

El objetivo es lograr la contracción simultánea del máximo número de células miocárdicas (que no estén en período refractario absoluto),esperando que luego entren todas a la vez,en su período refractario y el nódulo sinusal vuelva a recuperar su control, manteniendo una buena hemodinámica .

La eficacia de la desfibrilación depende de la :

- AMPLITUD de la descarga (si es pequeña es ineficaz ya que solo afecta a un número pequeño de células, y si es grande puede dañarlas)

- DURACION DE LA DESCARGA. Esta debe ser suficientemente larga para que haya un número elevado de células que no estén en los períodos refractario.

- FORMA DE LA ONDA,no es bueno valores de pico muy altos, ni " colas" de baja amplitud.

- ELECTRODOS, con impedancia baja entre el electrodo y el órgano (buen contacto), tamaño de los electrodos y posición de los mismos (anterioposterior).

D.--VALIDACION DE LA TESIS

V A L O R A C I O N	MORFOLOGICA	GANANCIA DE PESO (valorar edema)
		MICROSCOPIO OPTICO (cambios microscopicos)
		MICROSCOPIO ELECTRONICO (cambios ultraestruct.)
	BIOQUIMICA	GASOMETRIA (equilibrio acido/base)
		IONOGRAMA (cambios electroliticos)
	FUNCIONAL	COMPLIANCE (rigidez de la cavidad ventricular)
		HEMODINAMICA (función contractil)

FIGURA 5

Según el esquema de la figura 5 ,la validez de la tesis se basa en el estudio de los distintos medios de conservación mediante métodos diferentes, que se describen en páginas posteriores.

D.-METODOLOGIA DE LA VALIDACION DE LA TESIS:

La validación de la hipótesis de trabajo se realiza por tres métodos distintos, siendo unos mas específicos que otros y con sensibilidad también distinta, pero complementadas entre si.

Métodos MORFOLOGICOS, donde se estudian las características macroscópicas del corazón a lo largo de la conservación, basándonos en el peso como valoración del edema. Se estudian también las lesiones morfológicas a nivel celular y de tejidos, producidas por una isquemia prolongada, relacionándolas con la respuesta hemodinámica y con el tipo de conservación.

Métodos de validación BIOQUIMICOS por determinación del consumo de nutrientes y producción de catabolitos, detectados por muestras tomadas en la solución de conservación.

Y por último una validación FUNCIONAL en situación EX VIVO buscándose un método específico y sensible, que determine la probable función del órgano antes de su implante. (medida de la compliance ventricular izquierdo y su relación con la ganancia en peso por edema).

Y IN VIVO por el estudio hemodinámico tras el implante (trasplante de corazón) del órgano en un animal receptor.

1.-VALORACION MORFOLOGICA: ANTES Y DESPUES DE LA REPERFUSION= TRASPANTE

El estudio morfológico de las muestras de miocardio se realiza de la siguiente forma:

-TOMA DE MUESTRAS: (biopsia transmural de músculo cardíaco)

1ºBASAL al comienzo de la experiencia ,cuando el corazón donante esta latiendo, en normotermia, bien oxigenado y con un buen gasto cardíaco.

2ºANOXIA al final del periodo de conservación, una vez transcurrido las 24 horas en el que el órgano esta anóxico, en hipotermia y parado.

3ºREPERFUSION cuando el corazón conservado esta reperfundido y se encuentra de nuevo en normotermia y latiendo .

FORMA: se toman con una aguja de biopsias Tru-Cut de Travenol, en el ápex del ventrículo izquierdo y en el espesor del miocardio, de epicardio a endocardio, siendo inmediatamente transferido a la solución de fijación por inmersión .(122).

PROCEDIMIENTO DE FIJACION E INCLUSION:Se sumergirán al menos dos fragmentos en frascos preparados que contengan GLUTARALDEHIDO AL 2 %.Los fragmentos, se depositarán en este liquido fijador, inmediatamente de ser obtenidos del corazón.

La fijación en glutaraldéhidro se mantiene al menos dos horas en refrigerador.

Los especímenes seleccionados(se seleccionan los cortados mas longitudinalmente ,para mejor estudio de miofibrillas) para el estudio se incluyen y cortan según sean para el:

-MICROSCOPIO OPTICO: se incluyen en parafina y se cortan en serie, realizando tinción de Hematoxilina-Eosina.

-MICROSCOPIO ELECTRONICO:se postfijan en tetróxido de osmio, se incluyen en Epon 812 y se cortan.Los cortes semifinos se tiñen con azul de toluidina, pudiéndose también utilizar para microscopio óptico.

ESTUDIO AL MICROSCOPIO OPTICO:

Valoración del edema intracelular y extracelular, degeneración vacuolar o hidrópica, desaparición de las estriaciones normales del músculo cardíaco o aparición de bandas anormales de contracción, cambios nucleares anóxicos, picnosis, coriolisis o cariorresis, posibles depósito de pigmentos intracitoplasmático(lipocromos) y posible reacción inflamatoria o fagocitaria a las células necróticas.

EVALUACION DE LOS CAMBIOS ULTRAESTRUCTURALES: Utilizamos un método de evaluación del grado de isquemia en miocardio de corazones conservado durante 24 horas, semicuantitativo. (123).

Esta evaluación ,procura estandarizar las lesiones subcelulares de un miocardio, en dos etapas.

19.-gradación de los diferentes estadios de las lesiones isquémicas:(124)

- SIN LESION.....0
- LESION DE GRADO LIGERO.....I
- LESION DE GRADO MODERADO....II
- LESION DE GRADO SEVERO.....III
- LESION DE GRADO IRREVERSIBLE.IV

20.-gradación de los cambios ultraestructurales:

-MITOCONDRIAS .Se valoran cambios en su estructura como la hinchazón o tumefacción ,disrupción de las crestas y /o aparición de cuerpos floculentos.

.GRANULOS

.FLOCULENCIAS

.MATRIZ

.CRESTAS

-NUCLEOS. la disposición de la cromatina nuclear.

.CLAROS/PICNOTICOS

-MIOFIBRILLAS

.CONTRACCION/RELAJADAS

.BANDAS DE CONTRACCION

-EDEMA

.INTERSTICIAL

.INTRACELULAR

-VASOS

2.-VALORACION BIOQUIMICA:Se estudia el contenido iónico de la solución donde esta inmerso el órgano al inicio y al final de la experiencia para valorar los cambios sufridos como consecuencia de la isquemia a la que se ha sometido el corazón.

3.-VALORACION FUNCIONAL:(ANTES Y DESPUES DE LA REPERFUSION)

El estudio funcional del corazón se realiza EX VIVO (es decir durante la conservación y fuera del animal) por la medida de la COMPLIANCE VENTRICULAR IZQUIERDA como estudio de la función ventricular izquierda en un corazón parado.

Introduciendo un balón de látex en la cavidad ventricular izquierda , a través de la válvula mitral (se le practica una anuloplastia para evitar que el balón se hernie en la aurícula izquierda .

Se introducen cantidades de volumen de solución salina predeterminada y se mide la presión que genera el balón , debido a la diferente resistencia que se le ofrece a la dilatación , midiendo por lo tanto la elasticidad de las fibras miocárdicas como índice de funcionalidad ventricular.

VALORACION FUNCIONAL IN VIVO: Una vez finalizada la implantación del corazón conservado en un animal receptor, se procede a la salida de "bypass" (circulación extracorporea) y a dejar que el corazón sea capaz de mantener la circulación por sí sola, practicándosele determinaciones de dinámica intracavitarias(HEMODINAMICA) mediante la punción directa de todas las cavidades cardíacas , midiéndose en ellas las presiones sistólicas, diastólicas y medias. Es de cir se mide la función como bomba del corazón conservado durante 24 horas.

R E S U L T A D O S



El corazón para la experiencia, se obtiene tras la parada cardíaca inducida por pinzamiento transversal de la aorta y la administración de solución cardiopléjica hipotérmica en el sistema coronario del animal donante.(125),(126).

En todos los casos la extracción fue similar y con ello empieza la "conservación" propiamente dicha (6),diferenciándose a partir de este momento,con diez casos (control) para un tipo de conservación por simple inmersión(127) y otros diez casos de conservación por perfusión (desarrollado en esta tesis).

En la Tabla I y II se describe la forma de parada del corazón , así como el tiempo transcurrido desde el pinzamiento aórtico hasta el cese total de actividad;siendo la arritmia mas frecuentemente observada la fibrilación ventricular(50%) sin relación con el resultado final.

**OBTENCION DEL ORGANO (CORAZON)
para conservacion por inmersion.**

<u>Experiencia N°</u>	<u>Forma de parada</u>	<u>Tiempo en pararse.</u>
1	Fibrilacion V.	75 seg.
2	Fibrilacion V.	60 seg
3	Fibrilacion V.	50 seg.
4	Parada.	55 seg.
5	Bloqueo AV.	55 seg.
6	Fibrilacion V.	60 seg.
15	Bloqueo AV.	65 seg.
16	Fibrilacion V.	70 seg.
22	Parada.	70 seg.
24	Bloqueo AV.	75 seg.

Tabla I

Detalle de la forma de parada de los corazones para conservación.

**OBTENCION DEL ORGANO
para conservacion por perfusion**

<u>Experiencia N°.</u>	<u>Forma de parada.</u>	<u>Tiempo en pararse.</u>
28	Fibrilacion V.	55 seg.
29	Fibrilacion V.	60 seg.
30	Parada.	45 seg.
33	Bloqueo AV	70 seg.
34	Fibrilacion V.	85 seg.
35	Parada.	50 seg.
46	Fibrilacion V.	55 seg.
48	Bloqueo AV.	90 seg.
49	Parada.	55 seg.
50	Fibrilacion V.	65 seg.

Tabla II

El tiempo transcurrido desde la anoxia inducida por pinzamiento transversal de la aorta hasta el cese total de la actividad electromecánica (TIEMPO EN PARARSE) osciló entre los 50 y 75 segundos, siendo la media de 63 segundos, similar para ambas series (inmersión y perfusión).

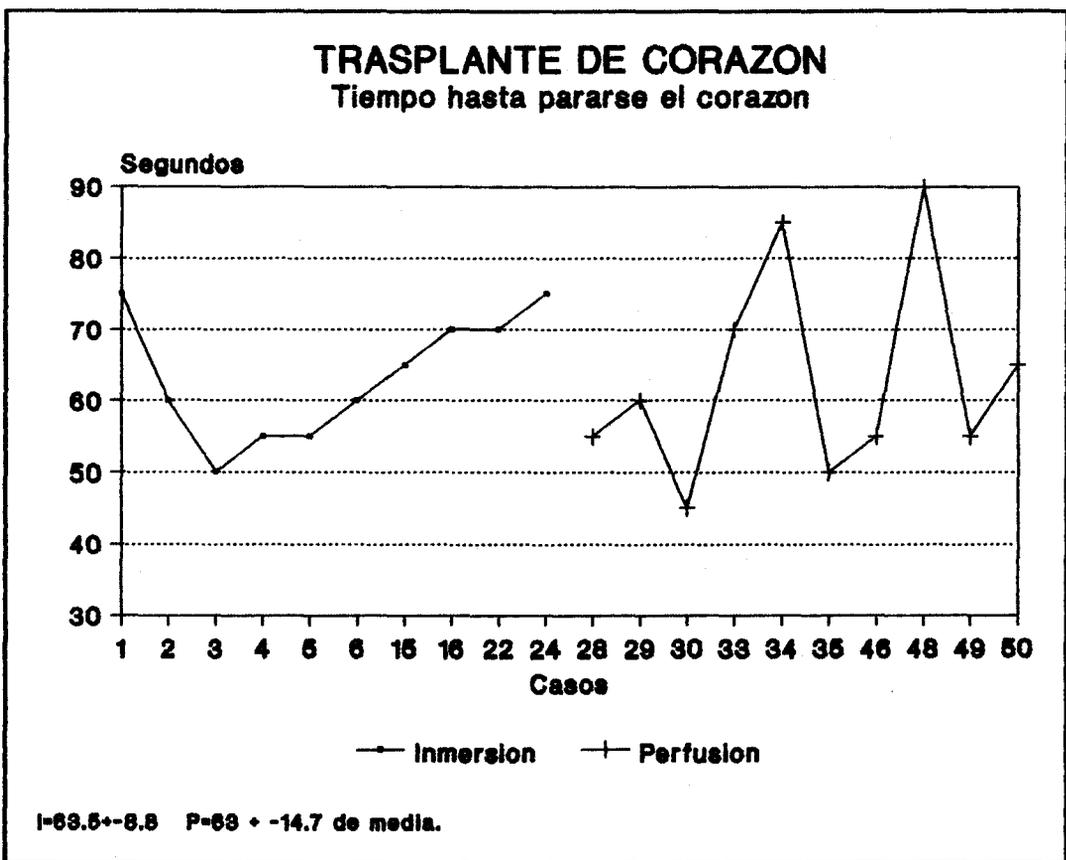


Figura 6

En la figura 6 se observa en puntos los tiempos por inmersión y en + los tiempos de parada en los conservados por perfusión.

Se considera por lo tanto que el método de extracción del órgano fue similar y no influencia los resultados finales de la conservación.

Todos los corazones una vez extraído son pesados para controlar a partir de él, la ganancia del mismo y con ello el edema miocárdico producido por el tipo de conservación usado.(128).

En la tabla III se reflejan los pesos en Kgrms del animal usado en la experiencia, así como el peso en gramo del corazón una vez extraído del donante.

EXP.NO	CONSERVACION	PESO ANIMAL (kgrs)	PESO CORAZON (grs)	SUPERVIVENCIA
1	Inmersión	30	160	no
2	„	28	153	no
3	„	23	148	no
4	„	17	135	no
5	„	21	140	no
6	„	19	141	no
15	„	21	145	no
16	„	18	134	no
22	„	25	151	no
24	„	18	132	no
28	Perfusión	18	133	si
29	„	20	142	si
30	„	18	136	si
33	„	18	130	si
34	„	24	150	si
35	„	20	148	si
46	„	22	150	si
48	„	20	137	si
49	„	22	145	si
50	„	23	146	si

 * Media 21.25 142.80 *
 * Desviacion 3.40 7.9 *

Tabla III

Para que la muestra fuera homogénea se usaron animales de peso similar con una media similar entre los dos métodos de conservación usados.

CONSERV. INMERSION

CONSERV. PERFUSION

PESO ANIMAL (MEDIA) 22Kgr+/-4.4 20.5Kgr+/-2.1

PESO CORAZON (MEDIA) 143grm+/-9.1 141grm+/-7.2

Por lo tanto ambas series fueron similares en el peso del órgano y la muestra se considera homogénea.

Se midió el peso del corazón cada cuatro horas durante toda la experiencia, observándose los resultados expuestos en la TABLA IV, para así determinar el grado de edema miocárdico producido como consecuencia del método de conservación. (129).

EXP. Nº	CONSERVACION	PESO CORAZON (grs)	4 h	16 h	24h	%	SUPERVIVENCIA
1	Inmer.	160	160	161	158	-1,3	no
2	,,	153	153	154	155	1,3	no
3	,,	148	148	148	139	-0,6	no
4	,,	135	136	136	136	0,7	no
5	,,	140	140	141	140	0	no
6	,,	141	141	140	142	0,7	no
15	,,	145	145	144	143	-1,4	no
16	,,	134	134	135	133	-0,7	no
22	,,	151	151	151	151	0	no
24	,,	132	132	130	130	-1,5	no
28	Perf.	133	149	150	155	16,5	si
29	,,	142	150	160	163	14,7	si
30	,,	136	157	159	161	18,3	si
33	,,	130	170	174	180	38,4	si
34	,,	150	168	170	179	19,3	si
35	,,	148	154	168	170	14,8	si
46	,,	150	192	199	202	35	si
48	,,	137	140	162	174	27	si
49	,,	145	169	170	175	20,6	si
50	,,	146	150	168	176	20,5	si

Tabla IV

El mayor incremento de peso se produce en las primeras cuatro horas para después permanecer constante.

En la última columna de la TABLA IV se especifica la ganancia porcentual en peso del corazón y su relación con la supervivencia.(130),(36)..

La ganancia media en corazones conservados por inmersión fue del $-0.8\% \pm 2.09$ frente a una ganancia media de 22.5% gramos $\pm 8.2\%$ de los conservados por perfusión, lo que representa una diferencia significativa en ganancia de peso según el tipo de conservación usado y por lo tanto del edema miocárdico.(131).

Según el modelo de conservación el corazón, una vez extraído se dirige a la inmersión con solución hipotérmica para su conservación durante 24 horas (132),(17) o se introduce en el perfusor para iniciar el método diseñado para esta tesis.

En el modelo de conservación con perfusión se determina parametros hemodinámicos durante las 24 horas que se expresan en la siguiente tabla TABLA V.

En los corazones conservados por inmersión, no es posible determinar dichos parámetros ,ya que se hayan solo inmerso en la solución de conservación sin ninguna conexión mediante líneas.

EXP. NUM.	PESO CORAZON	FLUJ	PRESION INICAL	PRESION FINAL	RVC INICIAL	RVC FINAL	SUPERV VENCIA
1	160	-	-	-	-	-	no
2	153	0	-	-	-	-	no
3	148	0	-	-	-	-	no
4	135	0	-	-	-	-	no
5	140	0	-	-	-	-	no
6	141	0	-	-	-	-	no
15	145	0	-	-	-	-	no
16	134	0	-	-	-	-	no
22	151	0	-	-	-	-	no
24	132	0	-	-	-	-	no
28	133	53	15	20	37	50	si
29	142	57	18	28	45	70	si
30	136	54	12	20	30	51	si
33	130	52	14	30	35	75	si
34	150	60	15	24	37	60	si
35	148	59	18	25	45	63	si
46	150	60	17	28	42	70	si
48	137	55	15	24	37	79	si
49	145	58	15	28	37	70	si
50	146	58	15	23	38	37	si

TABLA V

El flujo de perfusión se mantiene constante, obtenido a partir del peso del órgano en gramos por 0,4 ml
 FLUJO BOMBA PERFUSION = 0,4 x Gramos en peso del órgano.
 (129),(135). Siendo la presión de perfusión dependiente por lo tanto de la resistencia al paso de dicho flujo. (136).

La Resistencia vascular coronaria se calcula a partir de la formula:

Resistencia Vascular Coronaria=

Presion perfusión/Flujo Coronario x Peso

en mm de Hg X minutos x gramos / ml.(137).

La ganancia porcentual de la Resistencia Vascular Coronaria es de un 71.4 % en mmHg por minutos gramos mililitros, a lo largo de las 24 horas que dura la experiencia, lo que representa un importante papel en el desarrollo de edema miocárdico y en la función postoperatoria del órgano.(137),(129).Figura 7

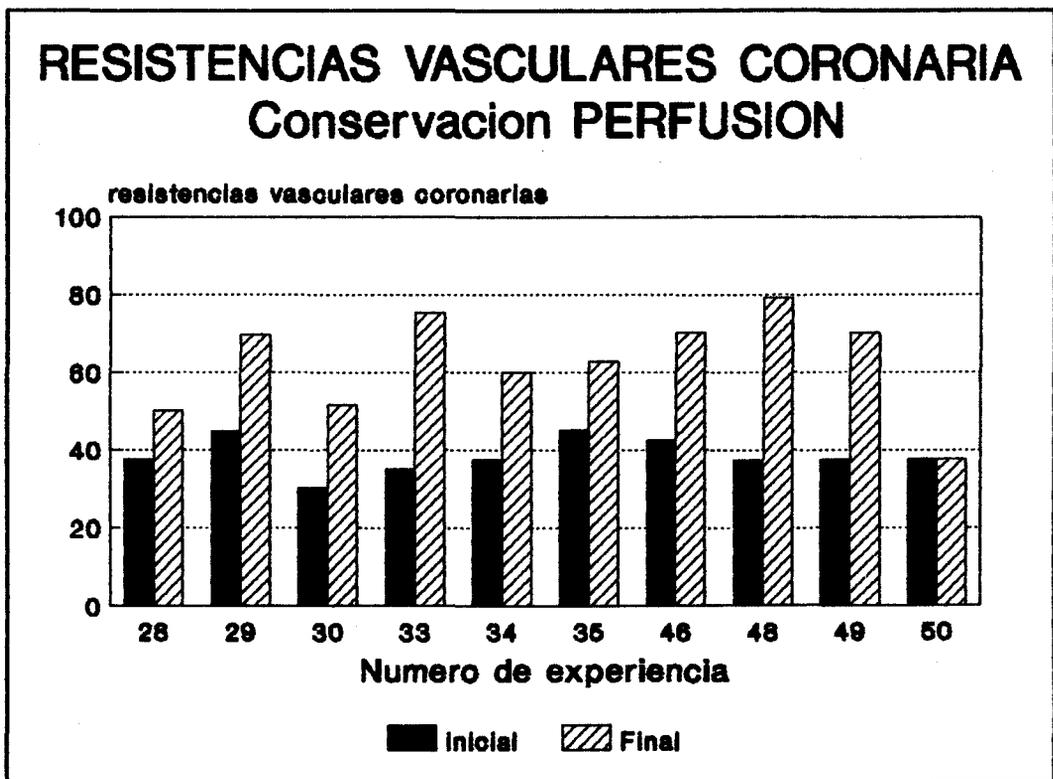


Figura 7

En la figura 7 se observa un aumento de la resistencia vascular coronaria en todos los casos de los conservados con el método de perfusión coronaria,siendo superior en aquellas experiencias en las que la función postoperatoria fue inferior (experiencia 33 y 46)

La oxigenación de la solución de conservación se obtiene a partir de una mezcla de carbónico y oxígeno (95% y 5% respectivamente) (CARBOGENO) para que las presiones parciales de oxígeno no sobrepasen los valores patológicos que sean tóxicos para el órgano.(134).

Se consigue una mayor presión parcial de oxígeno en aquellos en los que se hace burbujear el gas en su interior (139) encontrándose una ganancia del 44.7 % +37.5% (116).

Todas las determinaciones de presiones parciales de oxígeno,ph y carbónico se realizan con ambos métodos de conservación y al inicio y al final de la experiencia.

Los resultados obtenidos de las muestras de solución nutritiva en contacto con el órgano a lo largo de toda la experiencia se exponen en la TABLA VI y en ella se observa la importante acidificación del medio, con una pérdida de pH del - 13.71% en los corazones conservados por perfusión frente a un -4.6 % de los corazones conservados por el sistema de inmersión en solución nutritiva. (138)

La acidificación del medio determinada por la caída del Ph.esta provocada por la acumulación de ácido láctico como consecuencia del metabolismo anaerobio a la que se ve sometido el órgano .

EXP NUM	CONSER VACION	PH INIC.	PH FINAL	PO ₂ INIC	PO ₂ FINAL	PCO ₂ INIC	PCO ₂ FINAL	SUP VIV
1	Inmers.	7.9	7.4	80	110	27	25	no
2	,,	7.8	7.3	94	130	24	23	no
3	,,	7.8	7.4	82	145	24	24	no
4	,,	7.9	7.5	79	160	23	24	no
5	,,	7.7	7.3	78	110	21	24	no
6	,,	7.8	7.4	82	130	23	28	no
15	,,	7.7	7.5	92	140	24	23	no
16	,,	7.9	7.6	83	99	23	30	no
22	,,	7.8	7.5	79	125	27	31	no
24	,,	7.8	7.6	94	160	25	24	no
28	Perfus.	7.8	6.8	128	160	37	39	si
29	,,	7.9	6.7	147	227	20	29	si
30	,,	7.8	6.9	222	259	24	50	si
33	,,	7.9	6.1	200	270	16	31	si
34	,,	7.8	7.0	128	260	18	25	si
35	,,	7.5	6.8	219	387	28	46	si
46	,,	7.8	6.5	150	300	30	41	si
48	,,	7.9	7.1	154	172	18	20	si
49	,,	7.9	7.2	210	200	21	29	si
50	,,	7.7	6.2	140	179	17	23	si

Tabla VI

Las presiones parciales de carbónico experimentan una ganancia absoluta en todos los casos de órganos conservados por perfusión de un 47.69 % \pm 32.7% siendo mas inferior e incluso negativas en los conservados por inmersión. 6.05% \pm 12.7%.

En la TABLA VII se exponen los resultados obtenidos, tanto al inicio como al final de la experiencia (24 horas de conservación), determinandose los cambios iónicos en dicha solución tras la conservación con respecto a los obtenidos a su inicio .

Dichos cambios determinan, la salida hacia el exterior de solutos, con acumulos de los mismos o la disminución por consumo en el órgano, como índice de actividad metabólica (140)

EXP. NUM.	CONSERVACION	Na Inic.	Na Fin	K Inic.	K Fin	Ca Inic.	Ca Fin	SUPERVIVENCIA
1	Inmers	94	93	30	35	0,40	0,40	no
2	„	94	94	30	35	0,40	0,30	no
3	„	95	94	30	30	0,50	0,40	no
4	„	93	94	29	31	0,40	0,40	no
5	„	94	95	30	30	0,50	0,30	no
6	„	93	93	30	40	0,50	0,30	no
15	„	92	91	28	30	0,40	0,30	no
16	„	95	93	30	31	0,50	0,40	no
22	„	94	96	29	30	0,30	0,30	no
24	„	92	90	29	30	0,50	0,40	no
28	Perfus.	95	94	30	45	0,50	0,10	si
29	„	92	91	29	47	0,50	0,20	si
30	„	95	94	30	39	0,60	0,40	si
33	„	94	93	29	50	0,50	0,20	si
34	„	92	90	30	44	0,50	0,10	si
35	„	94	93	30	35	0,50	0,40	si
46	„	92	93	28	48	0,40	0,30	si
48	„	94	93	29	46	0,50	0,30	si
49	„	95	90	30	45	0,50	0,20	si
50	„	92	90	30	45	0,50	0,20	si

Tabla VII
Las muestras de sodio inicial y final a las 24

horas se mantiene con pequeñas variaciones con pérdida de -0.3% en inmersión y -1.5% en los conservados por perfusión (144), mientras que el potasio aumenta en un 46.6% en perfusión y un 10% en inmersión (142).

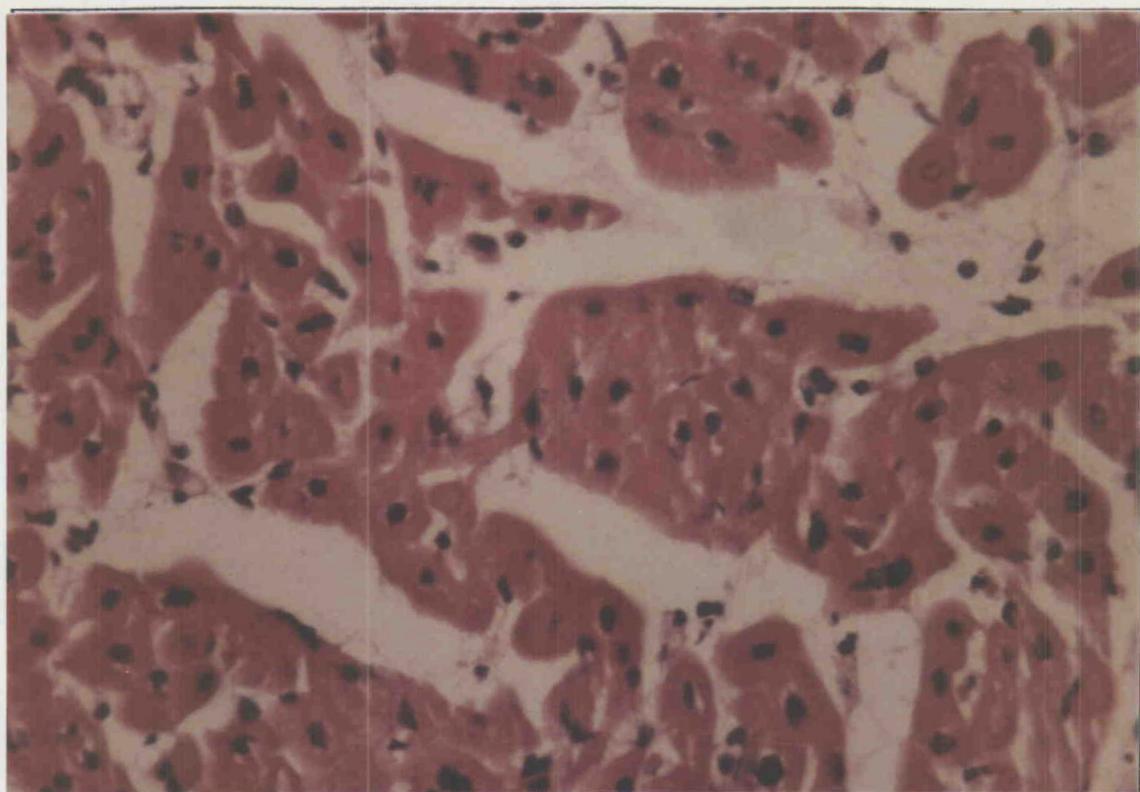
El calcio entra en el tejido miocárdico disminuyendo en la solución en un -49.8% en los conservados por perfusión y un -19% en los de inmersión (143), (141).

Las lesiones morfológicas observadas al microscopio de luz tras la toma de una biopsia al final del periodo de conservación se describen en la tabla VIII. (146) ,tanto en las correspondientes a la conservación por inmersión como las conservados por perfusión (146).

EXP.	EDEMA.	NUCLEO.	MIOFIBRI	EXTRAV.	INFLAM.
1	++	+++	-	++	-
2	+++	+++	-	+++	-
3	+++	+++	-	+	-
4	++	++	-	-	-
5	++	+++	-	-	-
6	+++	++	-	+	-
15	+++	+++	-	++	-
16	++	+++	-	-	-
22	++	++	-	-	-
24	+++	+++	-	+	+
28	+	++	-	-	-
29	+	++	-	-	-
30	+ -	-	-	-	-
33	+++	+++	rota	+++	+
34	+	++	-	-	-
35	+ -	+	-	-	-
46	+++	+++	rota	+++	+
48	++	++	-	-	-
49	+	+	-	-	-
50	+	+	-	-	-

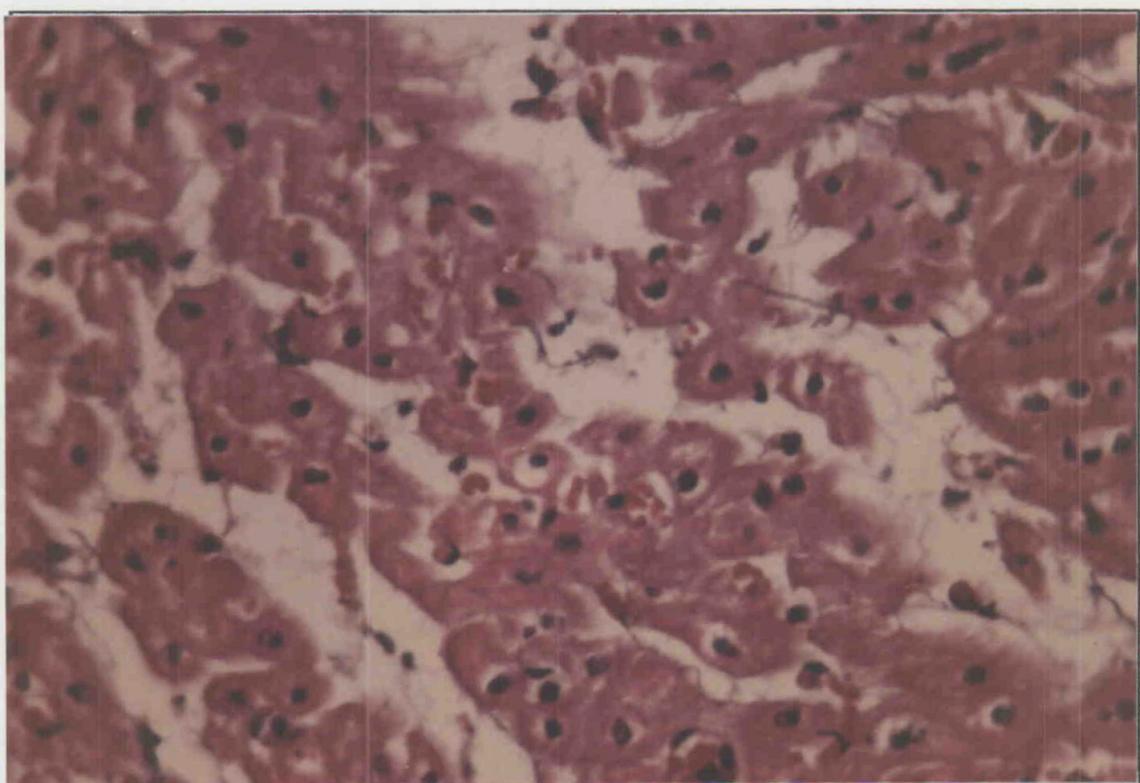
Tabla VIII

En ellas solo se describen el edema intracelular y extracelular FOTO 8 con degeneración vacuolar e hidrópica (147),borramiento de las estriaciones del músculo cardiaco o aparición de bandas anómalas de contracción FOTO 9 ,cambios nucleares anóxicos (picnosis) y reacciones inflamatorias FOTO 10 y/o hemorragia FOTO 11.



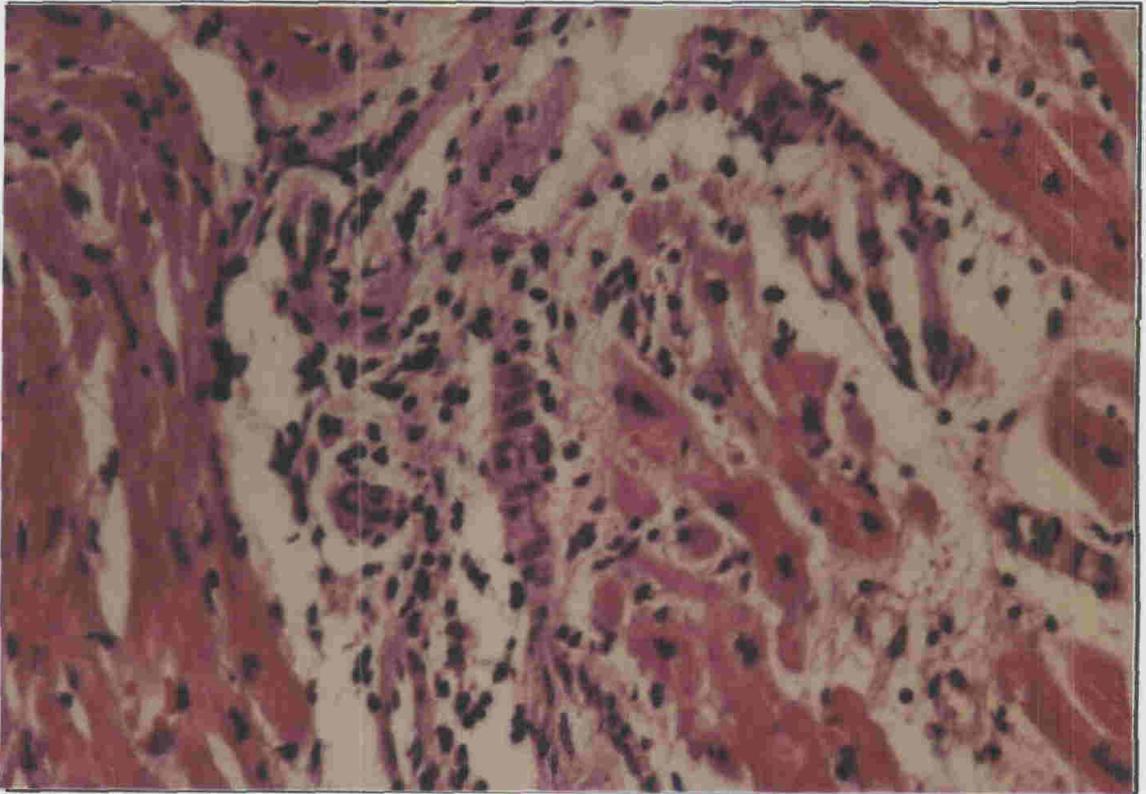
Edema intersticial.

fotografia nº 8

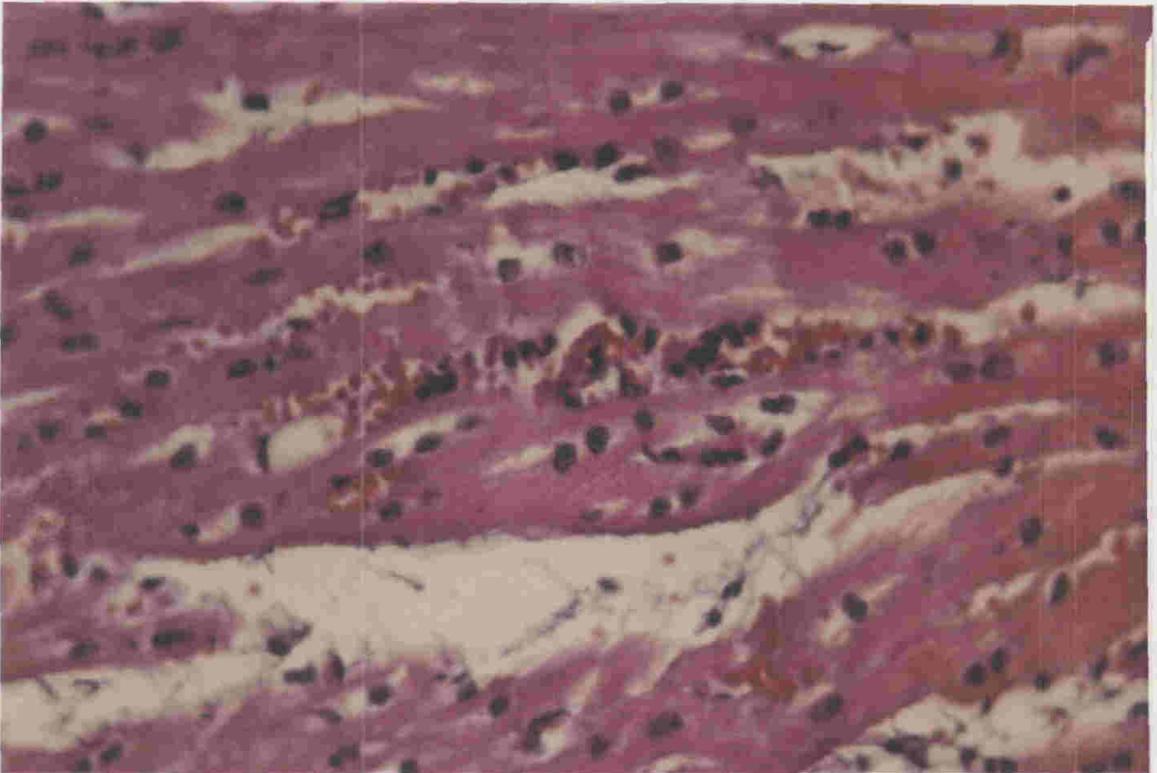


Picnosis

fotografia nº 9



Signos inflamatorios. fotografía 10



Hemorragia.

fotografía 11

Las lesiones ultraestructurales observadas como consecuencia de la anoxia miocárdica se describen en la tabla IX, en corazones conservados por simple inmersión y en la tabla X por corazones conservados por perfusión (148),- (149), (150) y (151).

CAMBIOS ULTRAESTRUCTURALES (Conservación por perfusión)

EXP.	EDEMA		NUCLEO	MITOCONDRIA		MIOFIBRILLA	VASOS
	int.	ex.		cresta	matriz		
28	2	2	3	3	2	contract	3
29	2	2	3	2	3	contract	3
30	1	2	1	2	1	contract	1
33	4	4	4	4	4	rotura	4
34	2	3	3	3	3	bandas Z	2
35	1	2	1	2	2	contract	1
46	4	4	4	4	4	rotura	4
48	3	2	3	3	3	contract	3
49	2	2	3	2	1	bandas Z	2
50	2	3	2	3	3	contract	3

Tabla IX

CAMBIOS ULTRAESTRUCTURALES. (Conservación por inmersión)

EXP	EDEMA		NUCLEO	MITOCONDRIA		MIOFIBRILLA	VASO
	int.	ex.		cresta	matriz		
1	3	0	4	3	4	rotura	2
2	4	0	4	3	4	contract	3
3	4	1	4	3	3	contract	4
4	3	1	3	4	4	contract	3
5	3	0	4	3	4	rotura	3
6	4	1	3	4	4	contract	3
15	4	0	4	3	4	contract	2
16	3	1	4	4	3	contract	3
22	3	2	3	4	4	contract	3
24	4	1	4	3	4	rotura	4

TABLA X

Las lesiones observadas se gradúan según el siguiente esquema:

GRADO 0 = no hay lesión, es normal.

GRADO 1 = mínima lesión ultraestructural.

GRADO 2 = lesiones moderadas.

GRADO 3 = Rotura mitocondrial, picnosis importante, pérdida de capa media en el vaso.

GRADO 4 = Sarcolema roto, floculencias mitocondriales, lesiones consideradas irreversibles.

--oOo--

La valoración funcional se realizó bajo dos formas:

SITUACION EX VIVO es decir fuera del animal y durante la fase de conservación TABLA XI mediante la medida de la Compliance Ventricular izquierda, donde la pérdida o caída de la misma se relaciona con la supervivencia y el edema miocárdico. (152), (153), (154), (155).

EXP. NUM	CONSERVACION	EDEMA ganancia	RVC	COMPLIANCE perdida	SUPERVIVENCIA
1	Inmers.	- 1.0	-	0.20	no
2	„	1.3	-	0.15	no
3	„	-0.6	-	0.10	no
4	„	0.7	-	0.20	no
5	„	0.0	-	0.10	no
6	„	0.7	-	0.15	no
15	„	1.4	-	0.10	no
16	„	0.7	-	0.20	no
22	„	0.0	-	0.20	no
24	„	1.5	-	0.20	no
28	Perfus.	16.0	50	0.07	si
29	„	14.0	70	0.09	si
30	„	18.0	51	0.03	si
33	„	38.0	75	0.10	si
34	„	19.0	60	0.10	si
35	„	15.0	63	0.04	si
46	„	35.0	70	0.10	si
48	„	27.0	79	0.07	si
49	„	21.0	70	0.05	si
50	„	20.0	37	0.12	si

Tabla XI

En la tabla XI se relaciona la ganancia en peso representado como EDEMA con la pérdida de Compliance o distensibilidad del corazón.

La valoración IN VIVO una vez reperfundido el corazón en el sistema circulatorio de un animal huésped (trasplante de corazón)(156),(189) se realiza mediante un estudio hemodinámico a la salida de bypass, cuyos datos se representan en las siguientes tablas TABLA XII y TABLA XIII.

VALORACION FUNCIONAL (Conservación por inmersión

EXP.	SALIDA ANOXIA	SALIDA C.E.C	PRESION AORTICA	PRESION AURIC.I	SUPERV.
1	0	0	0	0	Exitus
2	0	0	0	0	Exitus
3	0	0	0	0	Exitus
4	0	0	0	0	Exitus
5	0	0	0	0	Exitus
6	0	0	0	0	Exitus
15	0	0	0	0	Exitus
16	2	0	0	30	Exitus
22	2	0	0	35	Exitus
24	2	0	0	34	Exitus

Tabla XII

VALORACION FUNCIONAL (Conservación por perfusión)

EXP.	SALIDA ANOXIA	SALIDA C.E.C	PRESION AORTICA	PRESION AURIC.I	SUPERV.
28	2	3	75	22	Vivo
29	2	3	65	25	Vivo
30	1	1	85	18	Vivo
33	2	0	10	38	ExitusT
34	3	2	85	20	Vivo
35	1	1	90	20	Vivo
46	2	0	25	35	ExitusT
48	2	2	85	21	vivo
49	2	1	90	16	Vivo
50	2	3	70	18	Vivo

Tabla XIII

Se toman presiones en mm de Hg en raiz de aorta y simultaneas en aurícula derecha e izquierda, sistólica, diastólica y media, relacionandolas con la salida de anoxia y la salida de Circulación extracorporea, es decir tras la reperfusión. (157), (190), (191).

Los grados para evaluar la salida de ANOXIA y de CEC tras la REPERFUSION del órgano se expresan de la siguiente forma:

SALIDA DE ANOXIA (tras la reperfusión):

- | | |
|---|------------------------------------|
| 0 | no sale de anoxia |
| 1 | si sale de forma espontanea |
| 2 | si sale en fibrilación ventricular |
| 3 | si sale en bloqueo av |

SALIDA DE CIRCULACION EXTRACORPOREA

- | | |
|---|---|
| 0 | no sale de CEC |
| 1 | sale espontaneamente |
| 2 | sale con apoyo de bomba de CEC |
| 3 | Necesita para salir apoyo farmacológico |
| 4 | Necesita apoyo de marcapaso |

DISCUSSION

Del análisis de los resultados anteriormente expuestos, se observa un comportamiento diferente del órgano, según el tipo de conservación usado (158).

Los cambios morfológicos groseros reflejados fundamentalmente por el PESO y sobre todo por la ganancia del mismo a lo largo de la experiencia, representa el EDEMA miocárdico (129) ocasionado por la entrada de líquido desde el sistema vascular hacia el intersticio y mas tardiamente hacia el interior de la célula miocárdica (159),(160), como consecuencia del sistema de perfusión usado para la conservación.

En la (Figura 8) se observa la diferencia significativa en ganancia porcentual de peso, según el tipo de conservación usado en esta experiencia, siendo el paso de líquido al interior del miocardio nulo en los corazones conservados por inmersión, mientras que es evidente en los que se perfunden con solución nutritiva a través del sistema vascular coronario (161),(162).

Hay un crecimiento del 22.5 % de media de peso, en los perfundidos contra solo -0.8% en los conservados por simple inmersión, como se observa en la figura 8.

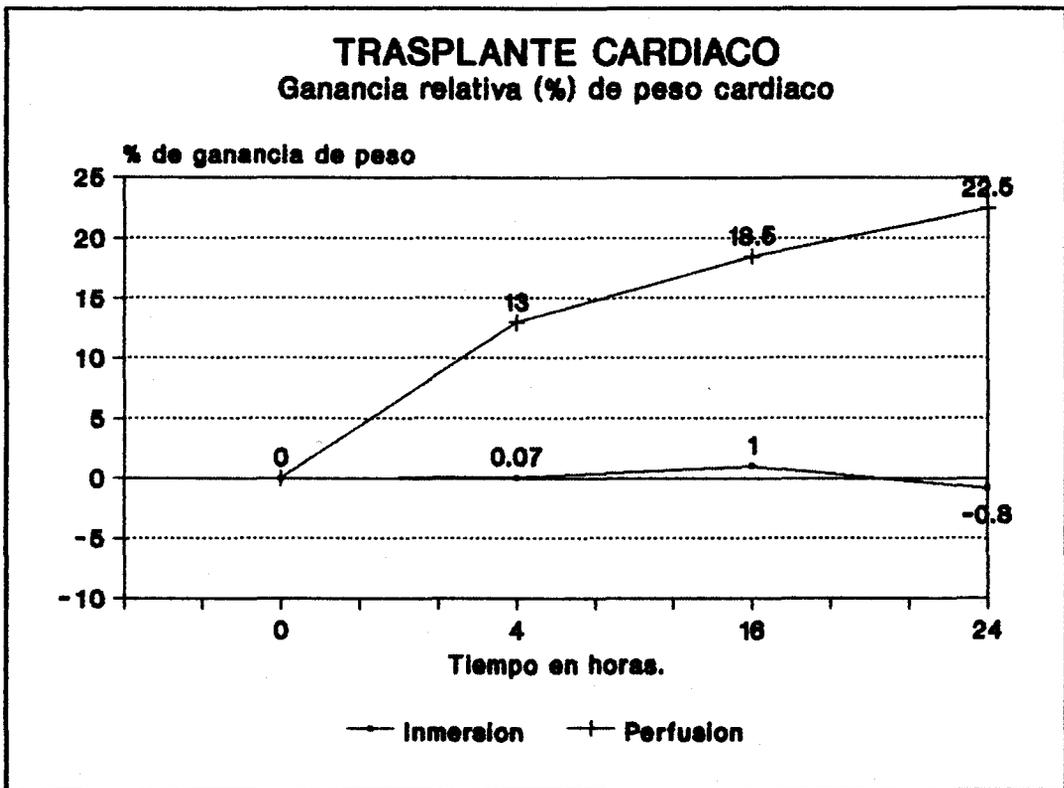


FIGURA 8

El edema miocárdico en su primera fase es intersticial, para en sus fases más tardías hacerse intracelular, por el paso de líquido hacia el interior de la célula con la consiguiente pérdida de función de la misma.

Este edema se atribuye al balance entre la presión de perfusión, la presión coloidosmótica (159), a la disminución del drenaje linfático y a la ausencia de contracción; situación esta en la que se encuentra un corazón cuando está en el período de conservación.

Esta disfunción en la regulación del volumen de agua se produce fundamentalmente por una diferencia de presiones ,sobre todo coloidosmotica (160) que dificulta la función cardíaca,sin que indique una perdida absoluta de contractilidad (163),(164),(165) sino solo una disminución de la misma como se observa en la (FIGURA 9)

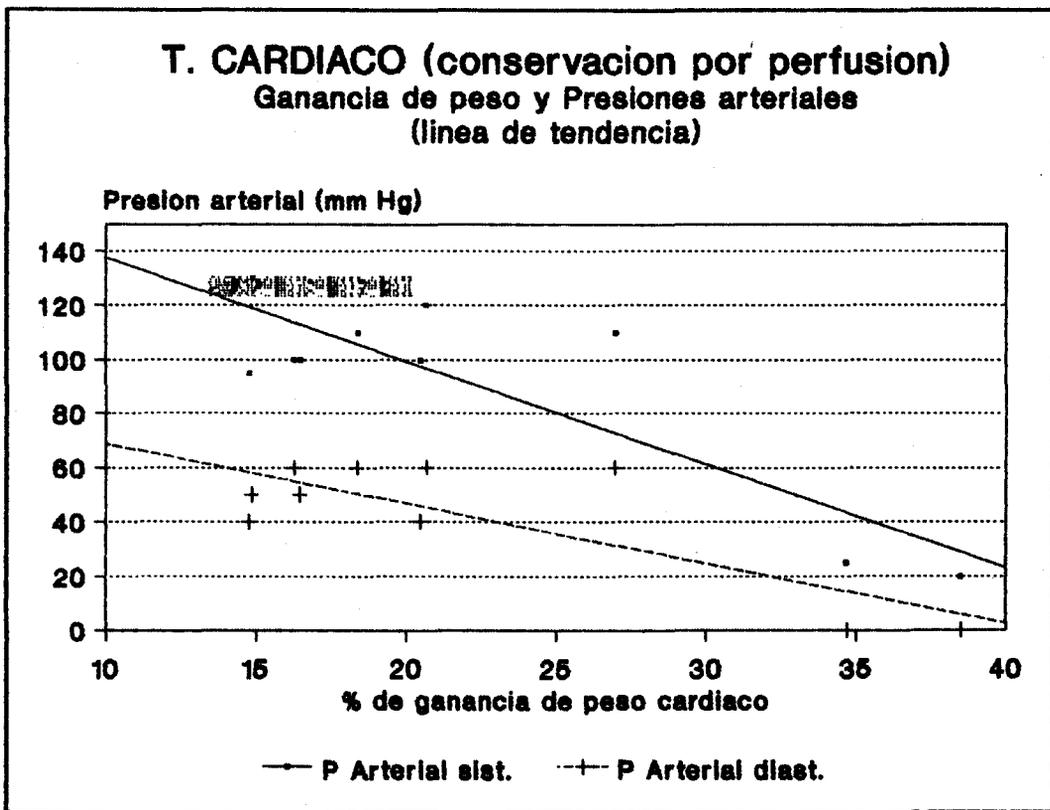


Figura 9

En la Figura 9 se relaciona mediante una ecuación de regresión de Pearson, las presiones arteriales a la salida del by-pass tras la reperfusión del corazón, con la ganancia porcentual del peso, observándose una disminución de presiones de salida a mayor peso ganado durante la conservación (166), signo de mala función postoperatoria del órgano como consecuencia del edema.

En la figura 10 se correlaciona la ganancia porcentual en peso (edema) con las presiones auriculares de llenado ventricular en el postoperatorio inmediato, tras la reperfusión del corazón, observándose una mayor presión de llenado a mayor peso ganado, siendo también un índice de pérdida de función ventricular y relacionada con las presiones picosistólicas aórticas. (167), (168).

Estadísticamente esta relación se expresa: como correlación significativa entre la ganancia porcentual de peso y las presiones arteriales de salida tras la reperfusión del órgano $r=.864$ (para las presiones sistólicas) y $r=.778$ (para las presiones diastólicas) con una relación estadísticamente significativa a un nivel de confianza del 95% entre el crecimiento porcentual del peso ganado durante la conservación y las presiones auriculares $r=.714$, para la aurícula derecha y $r=.716$ para la aurícula izquierda respectivamente. ($p<0.005$).

Esto solo nos indica que el edema miocárdico tiene una acción negativa sobre la función postoperatoria inmediata del corazón una vez reperfundido, aunque como más tarde se verá, no irreversible, si no más bien como diluyente del calcio iónico, acumulado en exceso en el exterior de la célula y que contribuye a la contractura isquémica del miocardio.

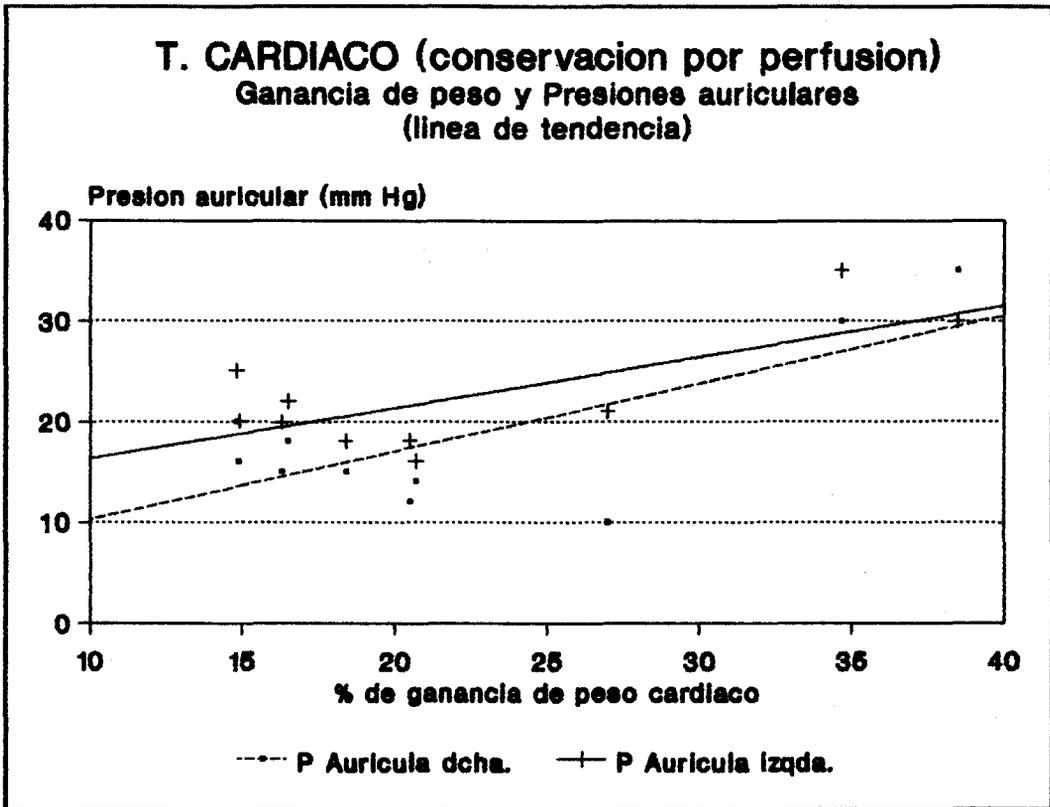


FIGURA 10

El edema miocárdico produce una compresión mecánica del sistema microvascular coronario, provocando por lo tanto un aumento de la Resistencia Vascular Coronaria, medida al principio y al final de la experiencia, como se observa en la figura 11, donde se relaciona la ganancia en peso con la Resistencia vascular coronaria .(137).(192).

En la figura 11 se representa en el eje de la ordenadas la ganancia en % del peso, lo que es representativo del edema y en el eje de las abcisas la resistencia vascular coronaria. Se relacionan mediante una ecuación de regresión, observándose que a mayor edema mayor resistencia vascular coronaria, con un coeficiente de correlación de $R=.4928$.

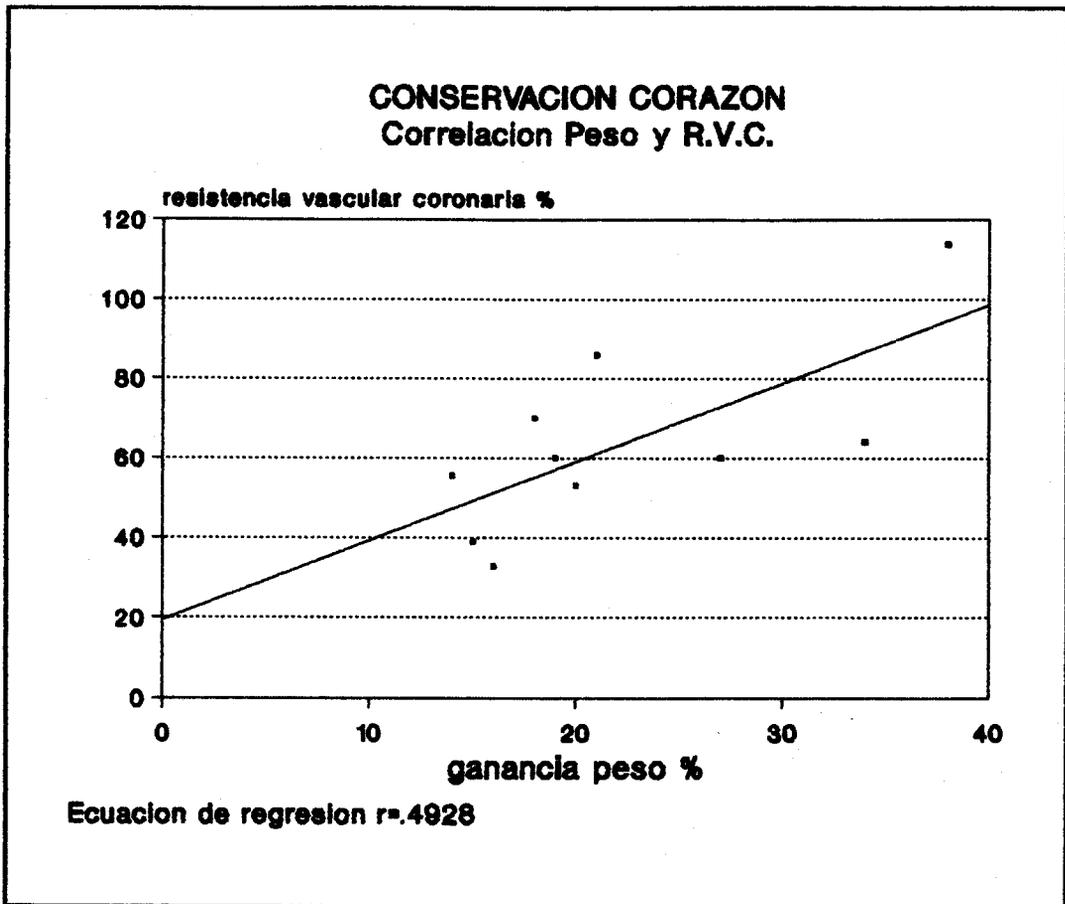


FIGURA 11

La compresión mecánica , produce una pérdida de distensibilidad o COMPLIANCE y por lo tanto un aumento de las presiones de llenado con deficit de la perfusión sub-endocárdica, lo que justifica su pobre función posoperatoria.(163).

El edema cardíaco representa a nuestro entender un " mal menor"(116) como consecuencia de la perfusión de soluciones en el interior del sistema coronario, ya que contribuye significativamente a la dilución del Calcio que sale

al intersticio como consecuencia de la anoxia (169) y por lo tanto favorece la contractilidad miocárdica , evitando en cierto modo la contractura isquémica provocada por aumento del calcio, y el acúmulo de catabolitos tóxicos procedentes del metabolismo anaerobio, que se depositan en el exterior de la célula.

Los cambios morfológicos groseros, manifestado principalmente por el peso del órgano, tienen una representación fina, representada por lesiones estructurales observadas al microscopio de luz así como al electrónico y descritos anteriormente en las TABLAS VII-VIII-IX-X .

Son el resultado de una isquemia severa sobre el miocardio, como consecuencia de la separación del corazón de su sistema circulatorio, así como del sistema usado para la conservación.

Los cambios estructurales dependen del tiempo que se mantiene la isquemia (que en nuestra experiencia siempre es el mismo ,24 horas de conservación) y de los medios usados para contrarrestar la anoxia (que en nuestra tesis se refieren a dos ,inmersión o perfusión). La lesión estructural mas observada es el "edema intersticial", manifestado en forma grosera por el cambio de peso anteriormente expuesto y relacionada directamente con el tipo de conservación usado .

Otras lesiones estructurales, relacionadas directamente con la isquemia a la que es sometido el órgano pero de carácter reversible ya que desaparecen cuando cesa la causa que los motivó (isquemia) son: la desaparición de los depósitos de glucógeno, alteración de las miofibrillas, marginación de la cromatina nuclear, pérdida de la matriz granular normal y desorganización de las crestas que presentan las mitocondrias en condiciones normales (174), (175), (176).

Todas estas lesiones se observan en aquellas experiencias en las que el sistema de conservación fue mejor, que son el 80% de los casos conservados por perfusión menos en las experiencias 33 y 46.

En aquellos casos cuyas condiciones de conservación fueron peores, los cambios estructurales se hicieron mas marcados, encontrándose la cromatina nuclear agregada a lo largo de la membrana, mitocondrias hinchadas, con pérdida de crestas, aunque son lesiones que retornan a la normalidad tras la reperfusión por lo que son consideradas reversibles (176). (FOTOGRAFIA Nº12)

Existen dos signos de IRREVERSIBILIDAD de los miocitos cuya aparición es una lesión inequívoca de pérdida de función definitiva y son:

ROTURA DE DE LAS MIOFIBRILLAS (FOTOGRAFIA Nº 13).

DENSIDADES AMORFAS O CUERPOS FLOCULENTOS desarrollada en el interior de la matriz de las mitocondrias (177),(149).

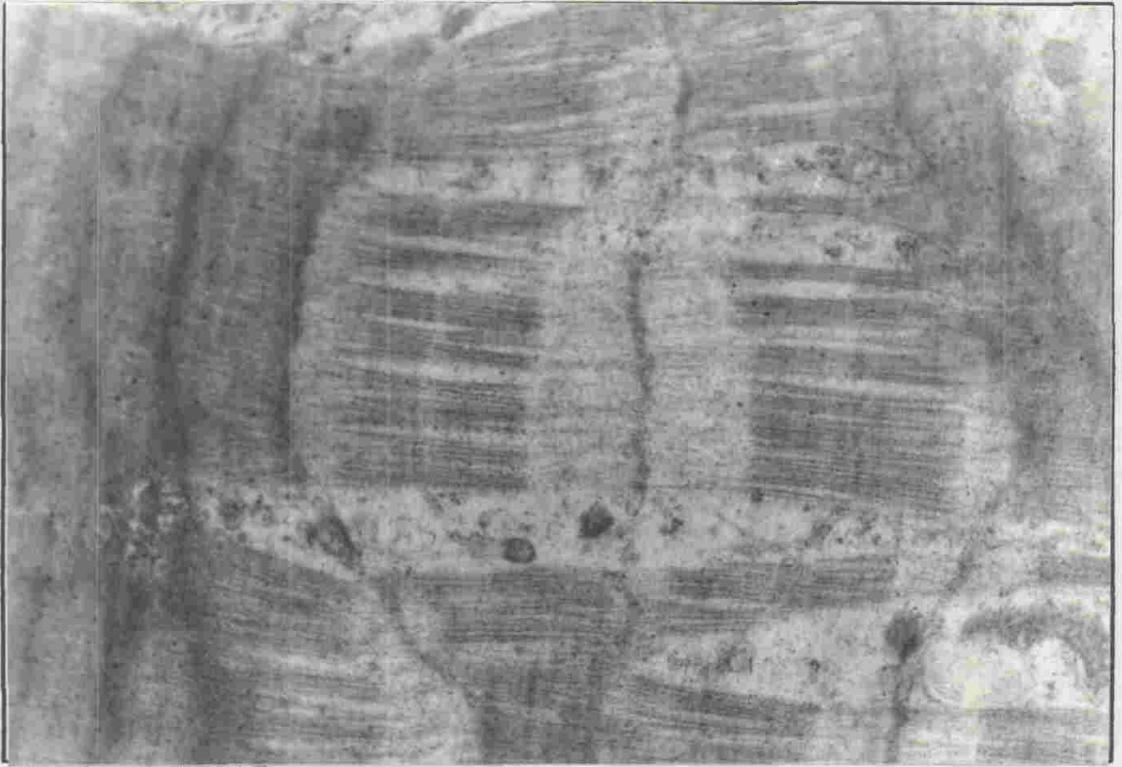
ROTURAS EN EL PLASMALEMA detectable en las membranas de los miocitos (178)(FOTOGRAFIA Nº14)



Ilustr.foto 12

FOTOGRAFIA N 9 12

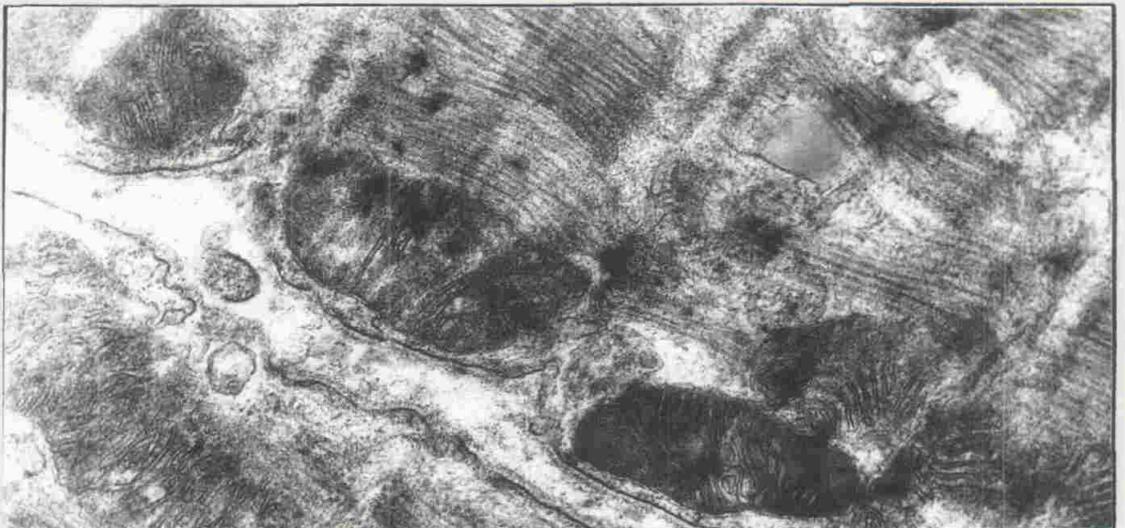
En esta microfotografía se observa la destrucción de una mitocondria, con rotura de su membrana y crestas.



Ilustr.foto 13

FOTOGRAFIA Nº 13

Detalle de una miofibrilla rota



Ilustr.FOTO 14

FOTOGRAFIA Nº 14

Rotura del sarcolema

No existe una diferencia precisa entre la reversibilidad e irreversibilidad de lesiones estructurales llamado PUNTO DE NO RETORNO(169)

Nosotros consideramos lesiones reversibles, aquellas lesiones celulares que desaparecen cuando cesa la isquemia que los provocó (durante la reperfusión) y lesiones irreversibles a aquellas que no desaparecen cuando cesa la causa (Cuerpos floculentos y rotura del sarcolema) (179),- (180).

En nuestra serie solo encontramos en un caso (caso 33) CUERPOS FLOCULENTOS y fue éxitus tras la reperfusión, y en otro caso(caso nº 46) se encontró rotura del sarcolema y también fue seguido de éxitus por lo que confirmamos lo anteriormente expuesto.

Todas las demás lesiones fueron reversibles aunque en los casos de los conservados por inmersión, que su función postoperatoria fue muy mala, no encontramos lesiones irreversibles, pudiendo concluir que :

- la presencia de lesiones irreversibles se sigue de mal función postoperatoria, pero no en toda mal función del órgano se observa siempre lesiones irreversibles en su estructura.

Dichos cambios estructurales si son severos se relacionan directamente con la función postoperatoria del órgano (171),(172), aunque se observan antes de que ocurra el deterioro hemodinámico (108).

La pérdida de contractilidad es la primera consecuencia de la isquemia, la restauración del flujo sanguíneo no se sigue de la restauración de la función contractil a los niveles de control y sin embargo no es índice de la muerte de los miocitos.

Relación entre el grado de lesión histológica y función postoperatoria del corazón.

Nº CASO	GRADO LESION	FUNCION CARDIAC
1	4	0
2	4	0
3	4	0
4	4	0
5	3	0
6	4	0
15	4	0
16	3	0
22	3	0
24	3	0
28	2	3
29	2	3
30	1	1
33	4	0
34	2	2
35	1	1
46	4	0
48	3	2
49	2	1
50	2	3

TABLA XIV

GRADO LESION

0	no hay
1	mínima
2	moderada
3	severa
4	graves (irreversible)

FUNCION CARDIACA

0	no late
1	salida espontánea
2	necesita apoyo CEC (bomba)
3	necesita apoyo fármacos

Existe una clara correlación entre la severidad de las lesiones y el grado de función cardíaca tras la reperfusión, cuando se implanta el corazón en otro animal receptor. (TABLA XIV)

Todos los corazones estudiados presenta una ligera pérdida de contractilidad demostrada IN VITRO mediante el estudio de la Compliance, e IN VIVO por el estudio hemodinámico realizado tras la reperfusión mediante el implante del órgano en un animal receptor (trasplante de corazón). (193).

Desde el punto de vista bioquímico las mayores consecuencias de una isquemia severa mantenida son:

1º El cese de la glucólisis aerobia y su paso a la anaerobia- (180) con reducción del gradiente transmembrana de Sodio (Na) y Potasio (K) y la sobrecarga de Calcio

2º.-el aumento de los catabolitos fundamentalmente lactatos con acumulo de hidrogeniones (H +) con la consiguiente acidificación del medio.(194),(195).

La determinación de la concentración de hidrogeniones o medida de pH del medio donde se encuentra inmerso el órgano, es un método ideal para determinar la acidez del mismo y así el grado de lesión isquémica a la que se haya sometido.

En la figura 12 se observa la caída del pH en todo los casos ,lo que indica una acidificación del medio como consecuencia de la hipoxia a que se encuentra sometido el corazón.

La línea horizontal (eje de las X) 0 es el pH considerado normal 7.37 ,observándose que todos los valores están por debajo de dicha línea(acidosis) y en todos los casos tratados en % de perdida.

En la figura 12 el punto(.)son los corazones conservados por inmersión y la(+)son los conservados por perfusión.

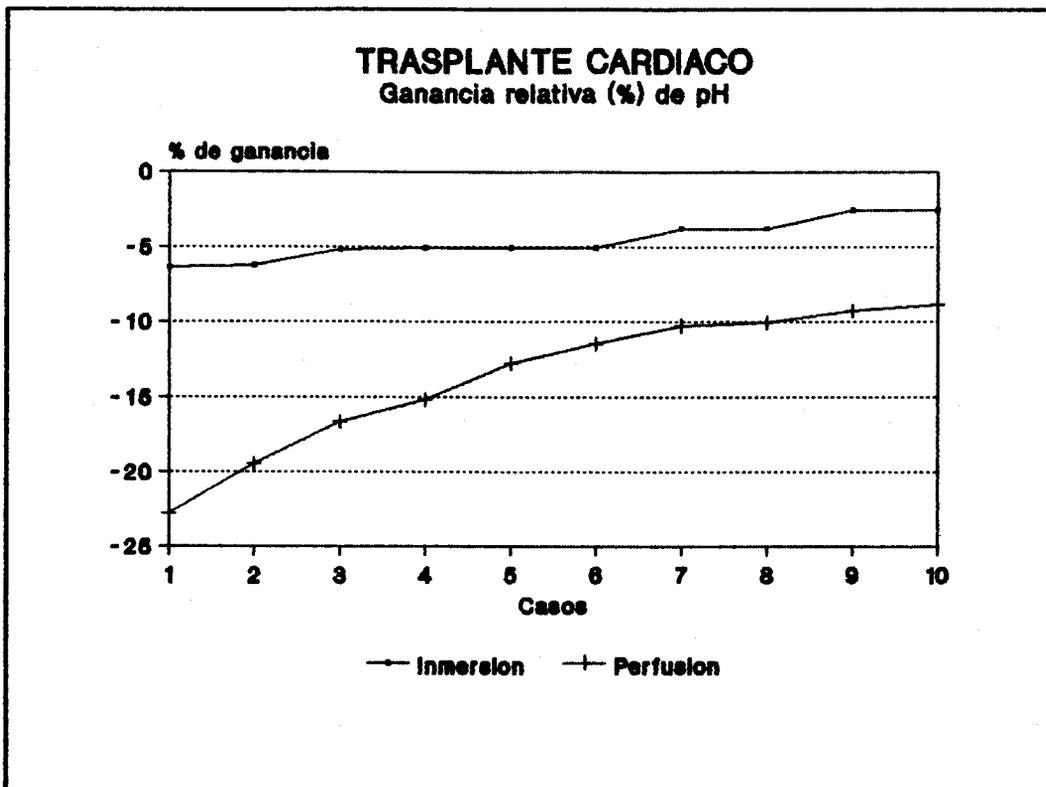


FIGURA 12

El acúmulo de catabolitos (Hidrogeniones)(Acidosis) producido por la isquemia tiene consecuencias letales sobre los miocitos, por lesión sobre la membrana (SARCOLEMA)- .(177).

La acidosis provoca una inadecuada formación de ATP produciendo una desnaturalización de las enzimas y dañando a la membrana celular provocando una pérdida importante(irreversible) de función del órgano.(196),(197).

Así se observa una relación estadísticamente significativa entre la acidificación del medio y los resultados de la prueba, medida hemodinámicamente al reperfundir el corazón.

En la figura 13 se observa la línea de tendencia y la correlación entre la pérdida de pH (acidificación) y las presiones arteriales del corazón conservado.

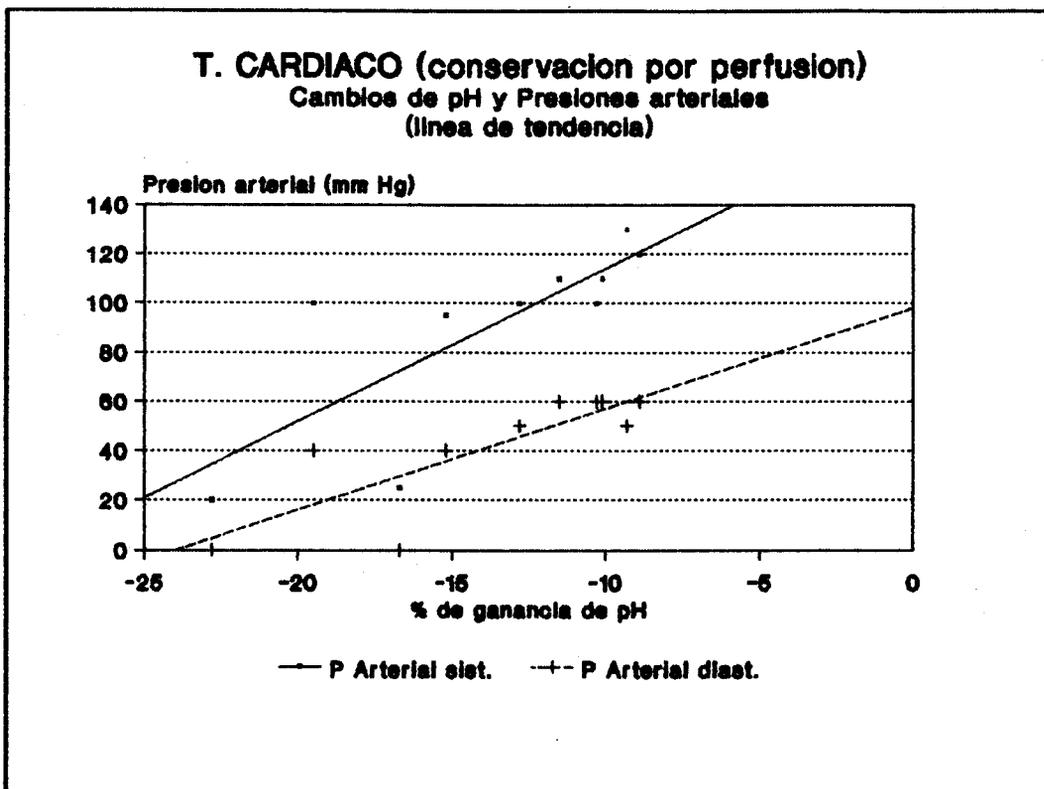


FIGURA 13

En la figura 13 se representa la correlación existente entre pérdida de pH (eje de ordenada) y el eje de las abscisas con la presión aórtica como índice de función postoperatoria del corazón .

Con un coeficiente de correlación de $r=0.779$ para con la presión sistólica y $r=0.819$ para con la presión diastólica a la salida de la reperfusión tras el trasplante de corazón, por lo que es altamente significativo con un nivel de confianza del 95 % .



Con respecto a la relación con las presiones auriculares como otro índice hemodinámico de función cardíaca ,también son estadísticamente significativo como se aprecia en la figura 14

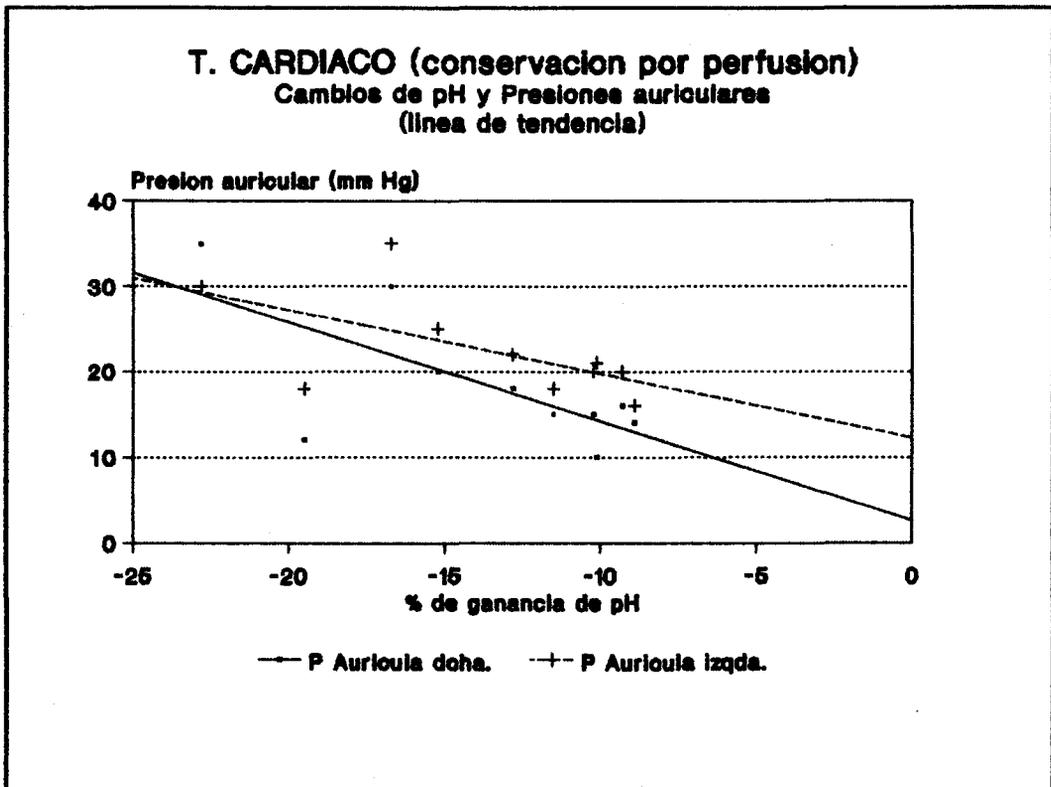


FIGURA 14

En dicho gráfico se observa la correlación existente entre la perdida de pH (acidosis) y el aumento de la presión de llenado ventricular izquierda, como índice de perdida de función.

Donde $r=-0.686$ representa el coeficiente de correlación de Pearson, para las presiones de aurícula derecha y $r=-0.595$ para las presiones auriculares izquierdas

Las determinaciones de gases en soluciones tomadas en la solución nutritiva muestran una ganancia de la pO_2 del 44.5 con una desviación estándar del ± 37.5 sin correlación con la función ventricular postoperatoria y solo debido al burbujeo mantenido durante toda la experiencia, lo que hace aumentar los niveles de la presión parcial de oxígeno.(162),(163).

La CO_2 tampoco tiene correlación con la función ventricular postoperatoria por lo que no se considera un índice para medir la viabilidad del corazón conservado.

Para el estudio de la función del órgano conservado se valora los cambios iónicos que ocurren en la solución de conservación usándose como índice de viabilidad, a través del estudio de su metabolismo.

La lesión de la membrana celular (sarcolema) producida por la isquemia, provoca una falta de regulación en la entrada y salida de iones a través de la misma.

La entrada de constituyentes extracelulares en el interior de la célula (miocito) y la pérdida de enzimas desde el miocito hacia el espacio extracelular son las principales consecuencias de la rotura de la membrana.

Estos dos hechos, son incompatibles para la supervivencia celular.

La pérdida o acumulo de iones, puede detectarse por análisis del tejido o por el estudio del fluido extracelular, que en nuestro caso es la solución de conservación donde se haya inmerso el órgano.(103).

Nos informan por tanto de forma inversa ,de la pérdida iónica que tiene lugar en el corazón como consecuencia de la isquemia a la que se ve sometido.(105)

En la tabla VII se detallan los resultados obtenidos al principio y final de la experiencia con los dos sistemas.

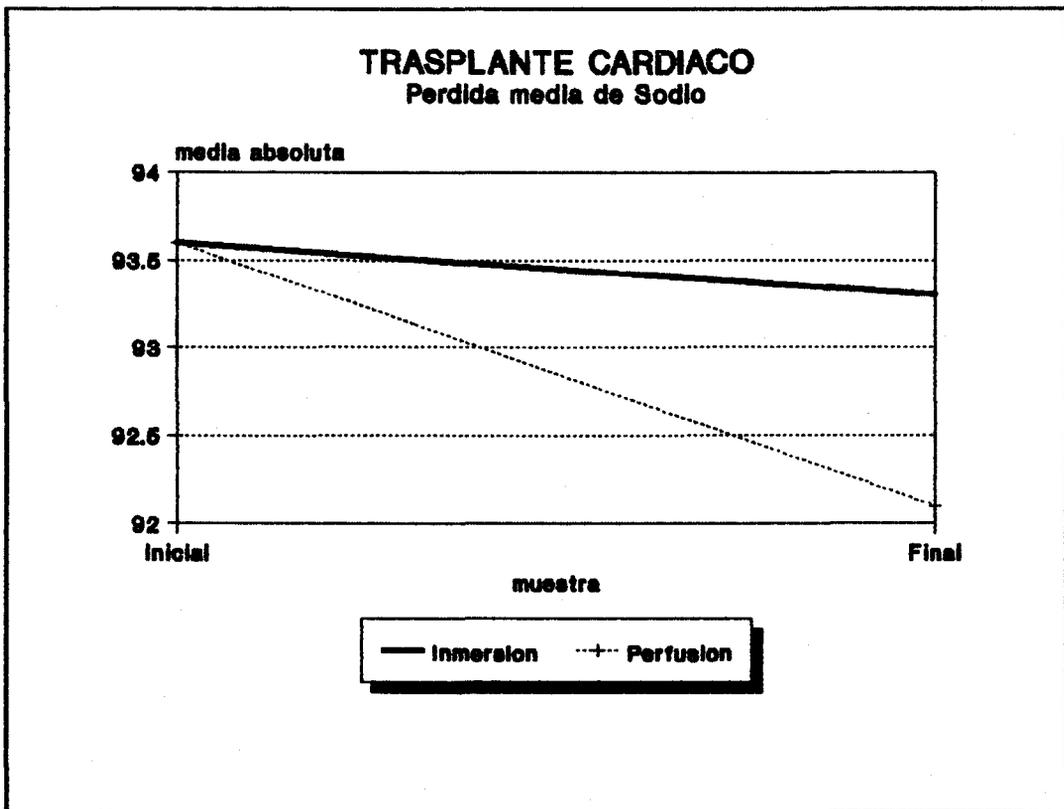


FIGURA 15

En la figura 15 se representa gráficamente la pérdida absoluta de sodio (Na) con ambos métodos de conservación, siendo de -1.5 para los perfundidos y de -0.3 en los conservados por inmersión.

Esta pérdida esta relacionada directamente con la sufrida por el potasio (K) debido a la interrelación de ambos iones por el uso del mismo sistema de bomba; que al detenerse por la falta de fosfatos de alta energía produce una mala regulación del intercambio iónico transmembrana.

Estos resultados no tiene correlación con el resultado final y solo indican fallo en el sistema de bomba iónica.

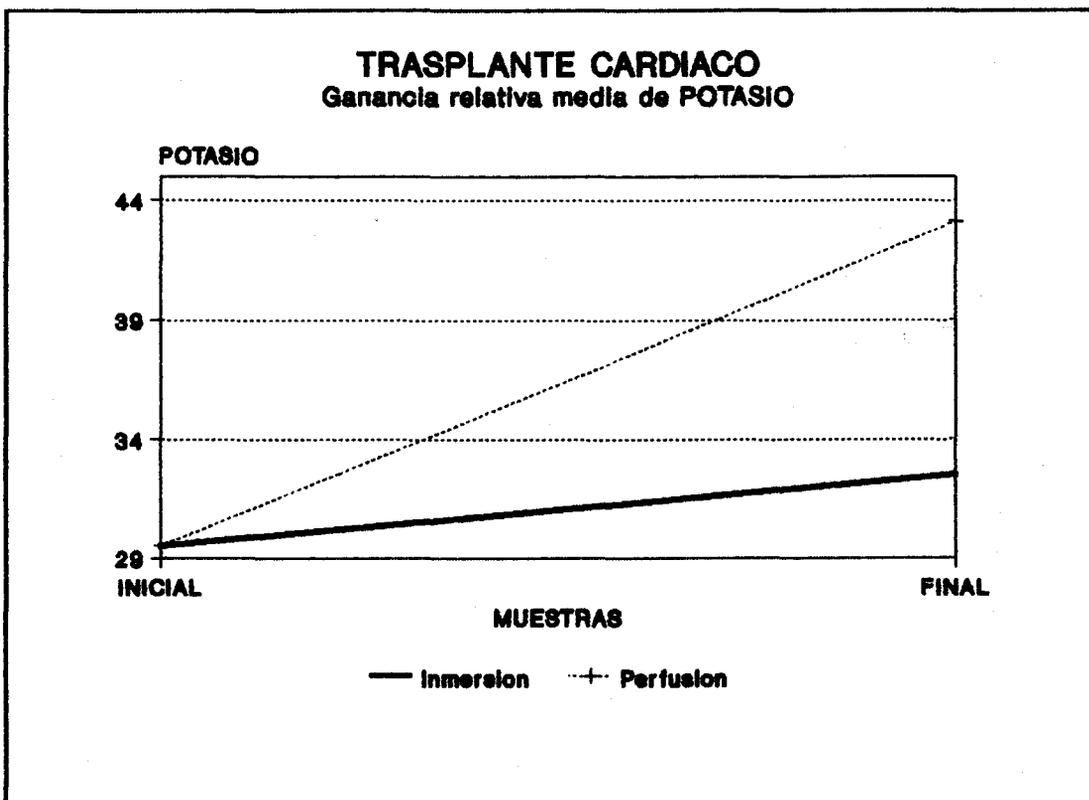


FIGURA 16

Una de las primeras consecuencias de la isquemia es la pérdida de la función de bomba para el transporte de potasio al interior de la célula, cuando no se produce, se detecta un aumento de potasio en el sistema extravascular (solución de inmersión) (183).

Como se observa en la FIGURA 16 hay un aumento progresivo entre el inicio y el final de la experiencia del ión potasio con ambos sistemas de conservación.

Existe por tanto una pérdida de potasio intracelular y un acúmulo de sodio en el interior de la célula.

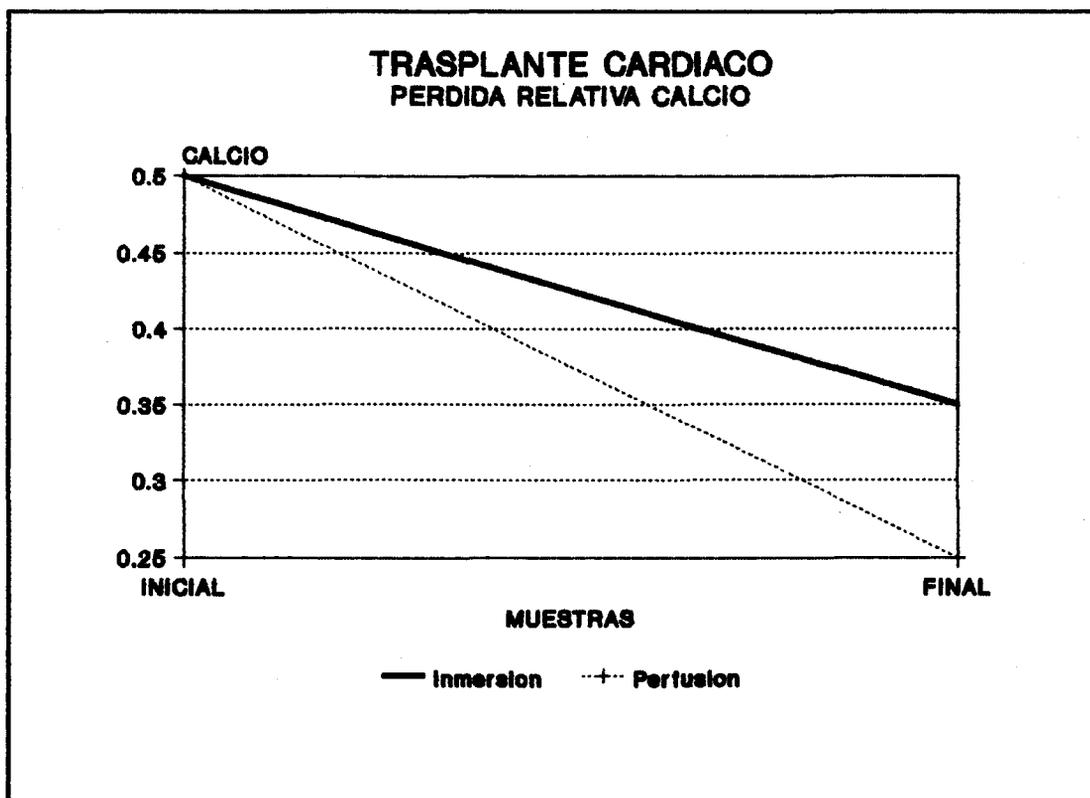


FIGURA 17

El aumento en los niveles de calcio iónico en el interior de la célula esta producido por la salida de calcio desde los depósitos de almacenamiento intracelulares y por la entrada de calcio desde el exterior de la célula (en la solución se detecta una pérdida) hacia el sarcoplasma.

Esto produce en el interior de la célula una sobrecarga de calcio, que activa las enzimas degenerativas , deteniendo la producción de energía (104),(182) y la rotura del sarcolema con la consiguiente muerte celular .(184),-(106).

El edema miocárdico desempeña un importante papel en la dilución del calcio para disminuir este fenómeno.(185).

No existe significación estadística (en todos los casos la correlación fue menor que 0.5) en los cambios iónicos detectados de los fluidos extravasculares ,entre los dos sistemas de conservación usados, debido a que:

1º los cambios son muy pequeños y de difícil cuantificación

2º solo detectan lesión en el sistema de bomba iónica y en ambos casos esta dañada.

3º la muestra esta contaminada ,pues no es posible detectar los cambios arteriovenosos de la misma.

Como consecuencia podemos afirmar , que la determinaciones iónicas en los fluidos extracelulares, solo indican daño isquémico, sin especificar que tipo de conservación es mejor, por lo que cabría esperar mejores resultados con determinaciones iónicas de el propio tejido.

Por lo tanto ,la determinaciones de iones en la solución de conservación, no es BUEN INDICE para medir la viabilidad de un corazón conservado.

Sin embargo el estudio de la función EX VIVO del corazón mediante la medida de la COMPLIANCE VENTRICULAR PASIVA si lo consideramos un buen método para valorar la función de un corazón conservado.

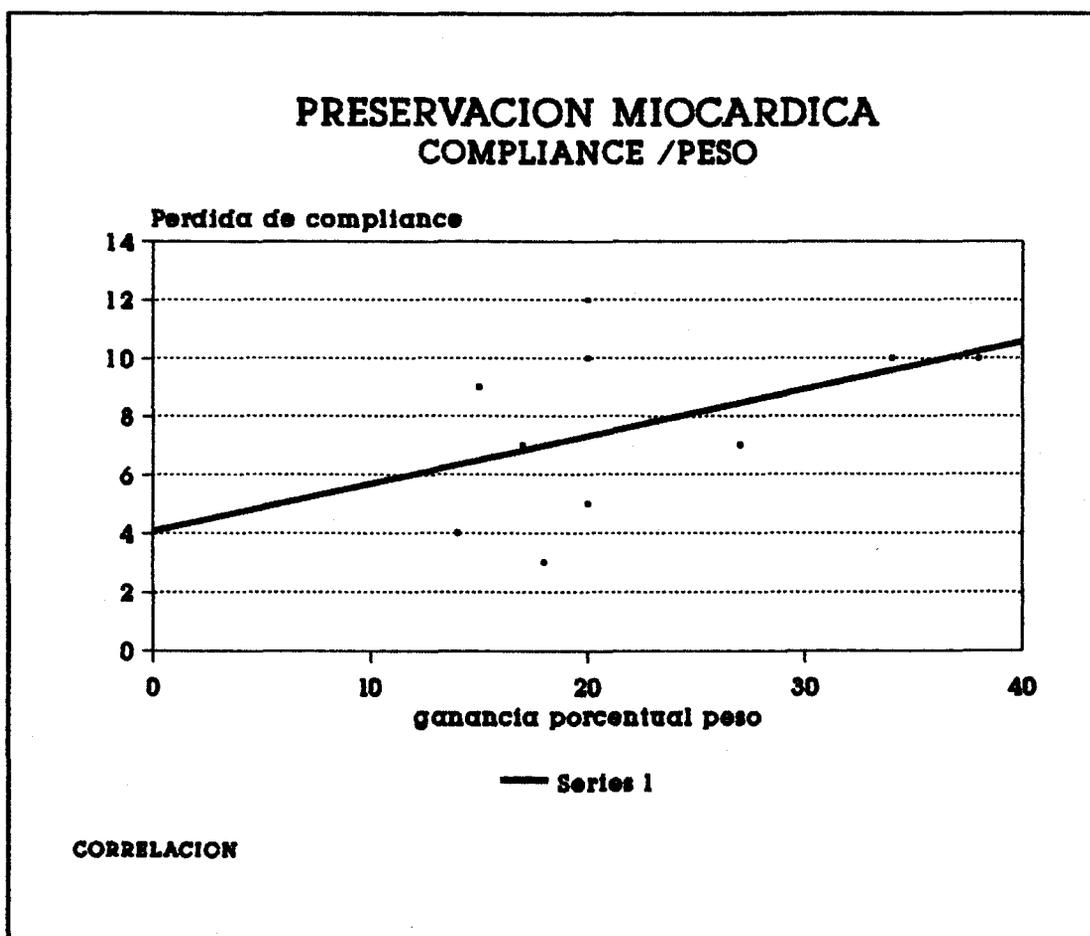


FIGURA 18

El edema miocárdico desempeña un importante papel en la dilución del calcio acumulado en el sarcoplasma como consecuencia de la isquemia (186),(187),disminuyendo la actividad sobre las enzimas degenerativas pero provocando la pérdida de función ventricular tras la reperfusión debido a la caída de la COMPLIANCE VENTRICULAR IZQUIERDA o DISTENSIBILIDAD.

Existe una pérdida de compliance ventricular izquierda entre la medida en el inicio de la experiencia y la tomada al final de la misma.(188),(113).

La pérdida de la compliance es superior en aquellos corazones que ganaron más peso, según se observa en la FIGURA 18, donde a mayor ganancia porcentual en peso (EDEMA) mayor pérdida de compliance ($-.1600 \pm 0.459$) de los conservados por inmersión frente a ($-.077 \pm 2.9$) de los conservados por perfusión, lo que es estadísticamente significativo.

En la FIGURA 19 se agrupan , aquellos cuya pérdida de compliance fue superior o inferior a 10 y se relaciona con la función ventricular observada tras la reperfusión (trasplante de corazón)

La función ventricular esta basada en la relación presiones de llenados (presión aurícula izquierda) con las presiones de salida(presiones picosistólicas aórtica).(44)

Observándose, que aquellos corazones cuya pérdida de compliance fue superior, presentan una función post-operatoria peor que aquellos cuya pérdida de compliance fue inferior ,necesitando por tanto presiones de llenados menores para producir buenas presiones picosistólicas.(198),(199),-(128).

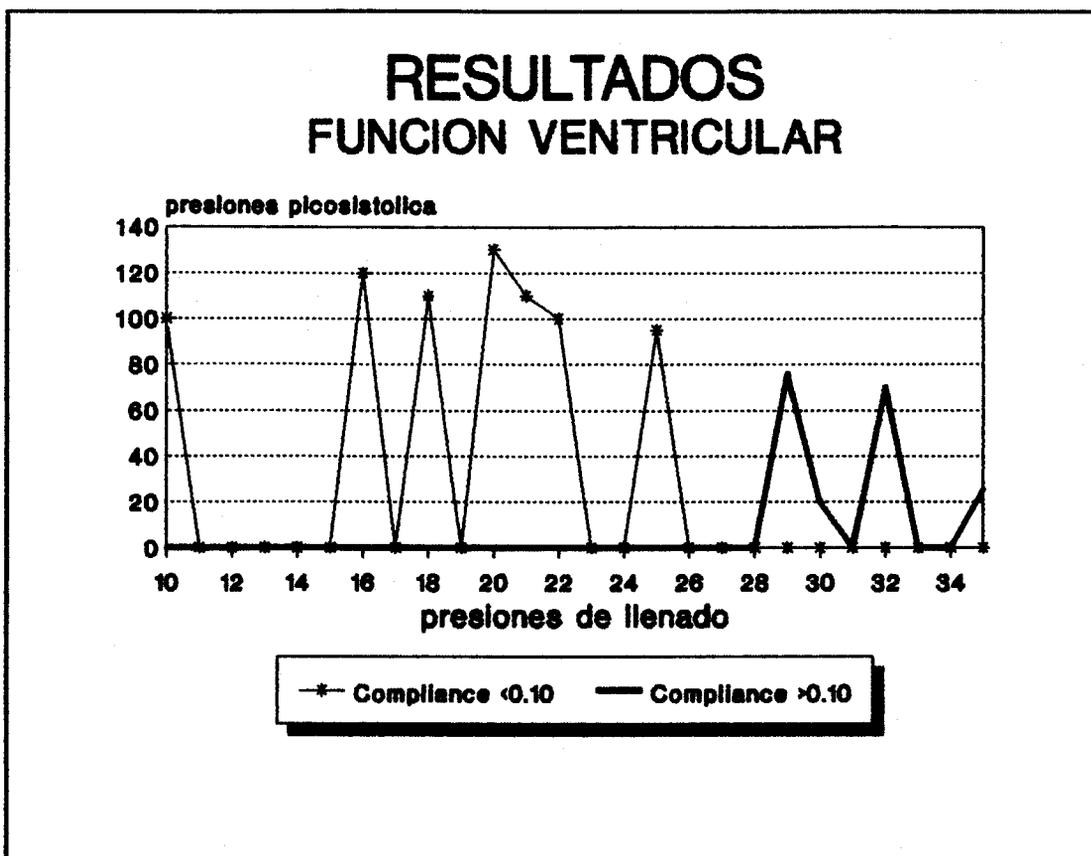


FIGURA 19

Todas las presiones picosistólicas de los de menor pérdida de compliance se encuentra por encima de 100 mm de Hg ,con presiones de llenado inferior a 28, mientras que aquellos cuya pérdida de compliance fue superior, por mayor edema ,las presiones aórticas son pequeñas para unas presiones de llenado muy altas.

Considerando la caída de presiones picosistólicas con las presiones de llenado (PAI) como índice de función ventricular izquierda,hay una correlación entre la pérdida de compliance (edema) y su función postoperatoria como se observa en la figura 19.

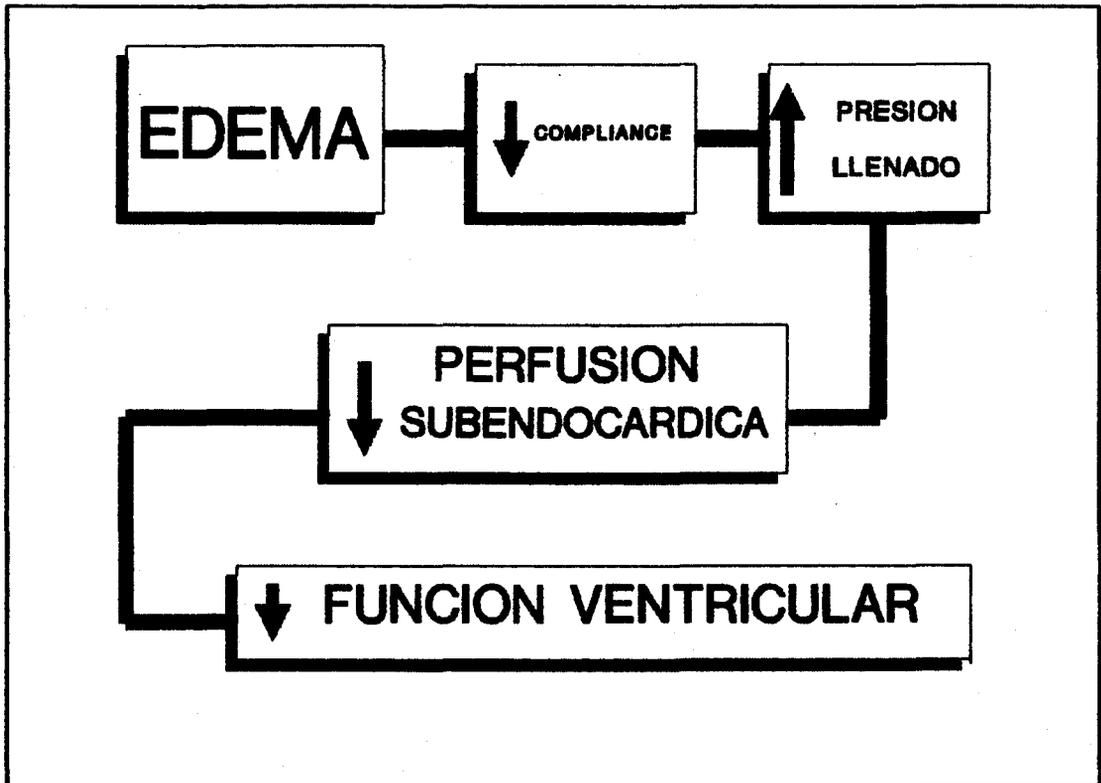


FIGURA 20

La justificación a este fenómeno está detallado en la FIGURA 20 donde se observa como el edema miocárdico produce una pérdida de compliance, esto a su vez "endurece" la cavidad ventricular por pérdida de distensibilidad, precisando mayor presión de llenado para provocar la dilatación de la cavidad ventricular y por lo tanto un déficit de perfusión subendocárdica al producirse la reperfusión tras el trasplante, que provoca una disminución de la función ventricular postoperatoria, expresada por la correlación entre presión aurícula izquierda y presiones aórticas.

De todo lo expuesto anteriormente , para valorar el método de conservación diseñado para esta tesis, se deduce , que existen unas pruebas bioquímicas "sensibles" pero no "específicas" para valorar la viabilidad del corazón y por lo tanto para valorar el método de conservación usado. Unas pruebas morfológicas que representan de forma exacta la lesión isquémica, pero de difícil y costosa preparación en tiempo; y unas pruebas funcionales en situación Ex-Vivo que valoran el estado del órgano solo como músculo y no en su función primordial como bomba.

Ninguna de ellas por si sola predice con exactitud la función cardíaca, siendo todavía hoy la implantación del corazón conservado la única forma sensible y real de valorar adecuadamente y en toda su extensión la función para la que el órgano fue creado. (200), (201), (202). la generación de un gasto cardíaco adecuado para mantener vivo el organismo que lo soporta.

RESUMEN :

En este trabajo de investigación se diseña un sistema para conservación del corazón, durante un período de tiempo superior al que actualmente se considera seguro para la práctica clínica de un Trasplante de Corazón.

El sistema usado consiste en un dispositivo compuesto por una bomba peristáltica para infundir una solución nutritiva e hipotérmica en el árbol coronario de un corazón donante.

Dicho corazón se mantiene conservado durante 24 horas mediante el sistema de perfusión de las coronarias y en hipotermia.

Para valorar el método se compara con el que se usa actualmente en clínica humana mediante la simple inmersión del corazón donante en solución hipotérmica.

Se determina la validez del método con estudios bioquímicos, morfológicos, funcionales y por último llevando el corazón conservado hasta la implantación en un animal receptor, como índice de mayor viabilidad.

CONCLUSIONES

1ª.-Se demuestra en esta tesis , que la mejor forma de conservación de un corazón,extraído del donante para trasplante, por encima de las cuatro horas,y con buen resultado morfológico y funcional, es mediante la perfusión de una solución a través de su sistema coronario.

2ª.-En esta tesis se demuestra que los elementos fundamentales de la solución a perfundir en coronaria para el mantenimiento del corazón en buena situación son :solución en hipotermia, hiperkaliémia y oxigenada.

3ª.-Se aporta un nuevo método específico, sensible y de fácil realización para la valoración de la futura función del corazón antes de su implante (situación EX VIVO).Este método consiste en la medición de la " Compliance ventricular"mediante un sistema diseñado especialmente para esta tesis.

4ª.-Con el sistema que se aporta diseñado especialmente para esta tesis, se han conseguido supervivencia del injerto por encima de las 24 horas de conservación extracorporea,con buena función una vez trasplantado al receptor.

5ª.-La conservación de un corazón para trasplante durante 24 horas fuera del donante,y con buena función una vez reperfundido,representará un gran avance en la práctica clínica de un programa de trasplante de corazón.

B I B L I O G R A F I A

- 1.-Melrose,D.G.;Dreyer,B.;Bentall,H.M.;Baker,J.B.E.: "Elective cardiac arrest.Preliminary communication".*Lancet*.2:21-28.1955.
- 2.-Brody,W.R.;Reitz,B.A.: "Topical hypothermic protection of the myocardium".*Ann.Thorac.Surg*.20:66-72.1975.
- 3.-Baldermann,S.C.;Binette,J.P.;Chan,A.W.;Gage,A.A.: "The optimal temperature of the myocardium during global ischemia-".*Ann.Thorac.Surg*.35:605-610.1983.
- 4.-Bodenhamer,R.M.;Deboer,L.W.;Geffin,G.A.;O'Keefe,D.D.;-Falton,J.T.;Areitz,I.H.;Dagget,W.M."Enhanced myocardial protection during ischemic arrest:oxygenation of a crystalloide cardioplegia solution".*J.Thorac.Cardiovasc.Surg*.85:769-775.1983.
- 5.-Bennet,E.V.;Fewer,J.G.;Grover,F.L.;Trinkle,J.K."Myocardial preservation effect of venous drainage".*Ann.Thorac.Surg*.-36:132-145.1983.
- 6.-Roe,B.B.;Hutchinson,J.C.;Fishmann,N.H.;Ullyot,D.J.;Smith,-D.L."Myocardial protection with cold ischaemic,potasium induced cardiopelgia".*J.Thorac.Cardiovasc.Surg*.73:366-371.1977.
- 7.-Thomas,F.T.;Szentpetery,S.S.;Mammania,R.E.;Wulfgang,T.C.;-

-
- Lower, R.R. "lung distance transportation of human hearts for transplantation". *Ann. Thorac. Surg.* 26:344-350. 1978.
- 8.-Billingham, M.E.; Baumgarthwer, W.A.; Watson, D.C. "Distant heart procurement for hyman transplantation. Ultrastructural studies". *Circulation.* 62:11-21. 1980.
- 9.-Walpoth, B.H.; Jamieson, S.W.; Modry, D.L.; Cohen, R.G.; Bleesenh-
n, W.H.; Bieber, C.P.; Billingham, M.E.; Shumway, N.E. "Results of
heart-lung preservation for transplantation". *Transplant. Proc.*
.16:1255-1265. 1984.
- 10.-Sollinger, H.W.; Glass, N.R.; Southard, J.M.; Belzer, F.O.-
"Current status of organ transplantation". *Clin. Lab. Med.* 3:763-
778. 1983.
- 11.-Gordon, R.T; "Myocardia preservation". *Ann. Thorac. Surg.* 43:-
240-252. 1987.
- 12.-Emery, R.V.; Levinson, M.M.; Copeland, J.G.; "The cardiac
donor: a five year experience". *Proc 21 annual meeting the
society of thoracic surgeons. Phoenic.* pp 46. 1985.
- 13.-Webb, W.R.; Howard, H.S.; "restoration of function of the
refrigerated heart". *Surg. Forum.* 8:313-321. 1957.
- 14.-Webb, W.R.; Howard, H.S.; Neely, W.A.; "Homologous transplanta-
tion of the canine heart". *J. Thorac. Surg.* 37.361-374. 1959.

-
- 15.-Lower,R.R.;Stofer,R.C.;Shumway,N.E.;"Homovital trans-
plantation of the heart".*J.Thorac.Cardiovasc.Surg.*41:196-
210.1961.
- 16.-Lower,R.R.;Stufer,R.C.;Hurley,E.J.;Dong,E.;Cohn,R.B.;-
Shumway,N.E."Succesfull homotransplantation of canine heart
after anoxic preservation for 7 hours".*Am.J.Surg.*104:302-
318.1962.
- 17.-Stinson,E.D.;Dong,E.;Angell,W.W.;Shumway,N.E."Myocardial
hypothermic for cardiac transplantation".*Laval.Med.*41:195-
218.1970.
- 18.-Angell,W.W.;Rikkers,L.;Dong,E.;Shumway,N.E.;"Organ
viability with hypotermia".*J.Thorac.Cardiovasc.Surg.*58:619-
675.1969.
- 19.-Reitz,B.A.;Stinson,E.B.;"Profound local hypotermia for
myocardial protection".*Symposium on intraoperative myocardial
protection.*Cologne.Germany.4.Oct. 1978.
- 20.-Bigelow,W.G.;Mustard,W.T.;Evans,J.G.;"Somephysiological
concepts of hypothermic and their application to cardiac
surgery".*J.Thorac.Cardiovasc.Surg.*28:480-452.1954.
- 21.-Nakae,S.;Webb,W.R.;Salyer,K.E.;Unal,M.O.;Cook,W.A.-

;Doddes,R.P.;Williams,C.T.;"Extended survival of the normo-thermic anoxic heart with metabolic inhibitors".*Ann.Thorac.-Surg.*3:37-45.1967.

22.-Buckberg,G.D.;"A proposed solution to the cardioplegic controversy".*J.Thorac.Cardiovasc.Surg.*77:803-824.1979.

23.-Hearse,D.J.;Stewart,D.A.;Braimbridge,M.V.;lular protection during myocardial ischemia".*Circulation.*54:193-218.1976.

24.-Neely,J.R.;Rovetto,M.J.;Oram,J.F.;"Myocardial utilization of carbohydrate and lipids".*Prog.Cardiovasc.Dis.*15:189-199.1972.

25.-Calman,K.C.;Bell,P.R.;"Experimental organ preservation".*Br.J.Surg.*59:758-775.1972.

26.-Mazur,P.;Karow,A.M.;Pegg,D.E.;"Organ preservation for transplantation"*O.Pre.Transpl.*2nd.Edn.pp 143(NY).1981.

27.-Wicomb,W.N.;Cooper,D.K.;Novitzky,D.B;Arnard,C.N.;"Cardiac transplantation following storage of the donor heart by a portable hypothermic perfusion system".*Ann.Thorac.Surg.*37:243-258.1984.

28.-Goerke.M.D.;Allan,H.;Nimes.Ph.D.;"The heart as a

pump". *Cardiovascular physiology* Raven press pp 99.1988.

29.-Berman,H.J.;Gamble,W.J.;"Myocardial oxygen usage:its measurement,regulation and meaning".*Microvasc.Res.*9:127-135.1986

30.-Berne,R.M.;Rubio,R.;"Coronary circulation in":*Handbook of physiology the coronary system*.Edited by R.M-Berne-pp 873.W DC.1979.

31.-Belloni,F.L.;"The local control of coronary blood flow".*Cardiovasc.Res.*13:63-75.1979.

32.-Bassingthwaighne.J.R.;Yipntstot,T.;Harvey,R.B.;"-
"microvasculature of the dog left ventricular myocardium".-
*Microvasc.Res.*7:229-241.1974.

33.-Bache,R.J.;Dymek,D.J.;"Local and regional regulation of coronary vasculature".*Prog.CARDIOVASC.Dis.*24:191-215.1981.

34.-Keith,A.;Reihmer,A.J.;Robert,B.;Jennings.A.;"The heart and cardiovascular system" in *Myocardial ischemia, hypoxia and infarction* Ed. RAVEN Press. pp 1133.1988.

35.-Alltschuld,R.A.;Hostetlerjr,B.K.;Brieriley,G.P.;"Response of isolated rat heart cells to hypoxia, re-oxygenation and acidosis".*Circ.Res.*49:307-321.1981.

-
- 36.-Basuk,W.L.;Reimer,K.A.;Jennings,R.B.;"Effect of repetitive brief episodes of ischemia on cell volume electrolytes and ultrastructure".*J.Am.Col.Cardiol.*3:342-362.1986.
- 37.-Olson,R.E.;Dow,P.;Hamilton,W.E.;"Physiology of cardiac muscle" in *Handbook of physiology* Volumen 1 pp 199 WD.C..1962.
- 38.-Olsson,R.E.;Dow,P.;"Changes in content of purine nucleoside in canine myocardium during coronary occlusion".*Circ.-Res.*26:301-321.1970.
- 39.-Bing,R.J.;"Cardiac Metabolism".*Physiol.Rev.*45:171-179.1965.
- 40.-Jobsis,F.F.;Dow,P;Fenn,F.;Rahm,M.N.;"Basic processes in cellular respiration" in *Handbook of physiology*.Ed.(NY).W.D.C pp 63 .1969.
- 41.-Neely,J.R.;Rovetto,M.J.;Oram,J.F.;"Myocardial utilization of carbohydrate and lipids".*Prog.Cardiovasc.DIs.*15:289-296.1972.
- 42.-Forster,R.E.;"Oxygenation of the muscle cell".*Circ.Res.*20:115-124.1967.
- 43.-Sonnenblick,E,M.;Skelton,C.L.;"Oxygen consumption of the

heart:physiological principles an clinical implications".-
*Mod.Concepts.Cardiovasc.Dis.*40:91-100.1971.

44.-Soskin,S.;Levine,R."Carbohydrate metabolism:correlation of physiological biochemical and clinical aspects".*The university of chicago press*"Ed.Chi.Press.Volumen III.pp 305.1966.

45.-Scheuever,J.;Stezoski,S.W.;Ebert,P.A.;Potter,J.D.;-
"Protective role of increased myocardial glicogen stress in cardiac anoxia in the rat".*Circ.Res.*27:835-846.1970.

46.-Evans,J.R.;Reitz,B.A.;Duval,M.;Azafor.G.D.;"Importance of faty acid in myocardial metabolism".*Circ.Res.*14:96-112.1964.

47.-Egelman.E.M.;Ebert,P.A.;Morrith,G.P.;*J.Muscle.Res.- Cell.Motil.*6:129-132.1985.

48.-Robertson,SP.;Johnson,J.D.;Potters,J.D.;"The time course of Ca⁺⁺ exchange with calmodulim troponim paraalbumni and myosin in response to transient increases in Ca⁺⁺".*Biophys.- J.*34:559-572.1981.

49.-Zot,H.G.;Potter.J.D.;Murraith,H.L.;" A structural role for the Ca⁺⁺,Mg⁺⁺sites on troponim C in the regulation of muscle contraction preparation and properties of troponim C

depleted myofibrils." *J. Biol. Chem.* 257:7678-7690. 1982.

50.-Huckabee, B.E.; Mactruy, F.H.; Olat, M.V.; Relationship of piruvate and lactate during anaerobic metabolism". *Am. J. - Physiol.* 204:427-450. 1963.

51.-Neill, W.A.; Krasnow, N.; Levine, H.J.; "Myocardial anaerobic metabolism in intact dogs." *Am. J. Physiol.* 204:427-432. 1963.

52.-Olson, R.E. Allen, M.K.; Hamilton, W.F.; "Excess lactate and anaerobiosis". *Ann. Intern. Med.* 59:960-976. 1963.

53.-Cooley, D.A.; Reul, G.J.; Wukasch, D.C.; "Ischemic contracture of the heart STONE HEART" *Am. J. Cardiol.* 29:575-582. 1972.

54.-Fuhrman, G, J. Fuhrman, F.A.; "Oxygen consumption of animals and tissue as a function of temperature". *J. Gen. Physiol.* - 42:715-723. 1959.

55.-Harris, E.A.; Seelye, E.R.; Squire, A.W.; "Oxygen consption during cardiopulmonary bypass with moderate hypothermic in man". *Br. J. Anaesth.* 43:1113-1128. 1971.

56.-Bigelow, W.G.; Lindsay, M.K.; Harrisson. R.C.; Gordon, R.A.; - "Oxygen transport and utilization in depts at low body temperature" *Am. J. Physiol.* 160:125-132. 1950.

57.-Penrod, K.E.; Olsren, B.G.; Aslyh, M.N.; Artees, H.G.; "Oxygen

consumption and cooling in immersion hypothermia in the dog". *Am. J. Physiol* 257:436-445. 1949.

58.-Ross, D.N.; McBurtres, V.H.; Gainh, J.F.; "Physiological observations during hypothermia" *Guy's Hospital report* 103:116-123. 1954.

59.-Reidhemeister, J.C.; Heberer, G.; Gehl, H.; Thiele, P.; - "Klinische ergebnisse mit der Kardioplejic durch extrazellularem natriumud calcineustry mid procaingabe" *Langenbecks Arch. Chir.* 319:701-723. 1967.

60.-Harris, E.A.; Seelye, E.R.; Barrat-Boyes, B.G. "Respiratory and metabolic acid-base changes during cardiopulmonar by-pass in man" *Br. J. Anesth.* 42:912-919. 1970.

61.-Hallenbeck, J.M.; Bradley, M.E.; Moni, G.J.; Dleas, F.G.; - "Experimental model for systematic study of impaired microvascular reperfusion". *Stroke* 8:23-30. 1977.

62.-Kirklin, J.W.; Barrat-Boyes, B.G.; "Cardiac surgery" in *CARDIAC SURGERY* Ed NY Vol.1 pp 23. año 1988.

63.-Donor, D.K.C.; Allen, H.F.; Melrose, D.G.; "The donor heart: The present position with regard to resuscitation, storage and assessment of viability". *J. Surg. Res.* 21:363-371. 1976.

64.-Keon, W.J.; Hendry, P.J.; Taichmman, G.C.; Mainwood, G.W.; -

"Cardiac transplantation: the ideal myocardial temperature for graft transplant". *Ann. Thorac. Surg.* 46:337-341. 1988.

65.-Cabrol, C.; Gandjbakhch, I.; Pamie, A.; "Heart transplantation at la Pitie hospital. Paris 1968-1984." *Heart Transplant* 4:27-31. 1984.

66.-Bretschneider, J.; Hubner, G.; Knoll, D.; Lohr, B.; Nordbeck, H.; Spikerman, P.G.; "Myocardial resistance and tolerance to ischemia: physiological and biochemical bases". *J. Cardiovasc. Surg.* 16:241-253. 1975.

67.-Cont, V.R.; Bertanov, E.; Blackstone, E.H.; Kirklin, J.W.; "Cold cardioplegia vs. hypothermic as myocardial protection: randomized clinical study". *J. Thorac. Cardiovasc.* 76:577-584. 1978.

68.-Catinella, F.P.; Cunningham, J.N.; Spencer, F.C.; "Myocardial protection during prolonged aortic cross-clamping" *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 88:411-423. 1984.

69.-Feindell, C.M.; Tait, G.A.; Wilson, G.J.; Klement, P.; MacGrelbor, D.C.; "Multidose blood versus crystalloid cardioplegia: comparison by quantitative assessment of irreversible myocardial injury". *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 87:585-593. 1984.

70.-Rusenkratz, E.R.; Okamoto, F.; Buckberg, G.D.; Vinten, J.;-

Bugys, H.; "Safety of prolonged aortic clampings with blood cardioplegia". *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 88:402-418. 1984.

71.-Gay, W.A.; Ebert, P.A.; "Functional, metabolic, and morphologic effects of potassium-induced cardioplegia". *Surgery.* 74:184-195. 1973.

72.-Carafolli, E.; "The interaction of Ca ++ with mitochondria with special reference to the structural role of Ca ++ in mitochondrial and other membranes". *Mol, Cell. Biochem.* 8:133-145. 1975.

73.-Powell, W.J.; Dibonna, D.R.; Flores, J.; Leaf, A.; "The protective effect of hyperosmolar mannitol in myocardial ischemia and necrosis". *Circulation.* 54:603-615. 1976.

74.-Follete, D.M.; Feyk, K.; Mulder, D.G.; Maloney, J.V.; Buckberg, G.D.; "Prolonged safe aortic clamping by combining membrane stabilization, multidose cardioplegia and appropriate pH reperfusion". *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 74:682-197. 1977.

75.-Buckberg, G.D.; Follete, D.M.; Mulder, D.G.; "A proposed solution to the cardioplegia controversy". *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 77:803-817. 1979.

76.-Vtsunomiya, T.; Krausz, M.; Kobayashi, M.; Shepro, D.; Helhtman, H.; "Myocardial protection with prostacyclin after endo-

toxina". *Surgery* 92:101-126.1982.

77.-Menasche,P.H.;Piwnica,A."Les fluorocarbones.Aplications en chirurgie cardiovasculaire". *Nouv.Presse.Med* 11:2289-2297.1982.

78.-Flaherty,J.T.;Jaffin,J.H.;Magovern,G.J.;"Maintenance of aerobic metabolism during global ischemia with perfluorocarbons cardioplegia improves myocardial preservation". *Lab.-Invest.* 69:585-624.1984.

79.-Frenes,S.E.;Christakis,G.T.;Weissel,R.D.;Mickle,D.A.;McLavgin,P.R.;Baird,R.J.;"A Clinical trial of blood and crystalloid cardioplegia". *J.Thorac.Cardiovasc.Surg.* 88:726-745.1984.

80.-Barnard ,M.S.Van Heerden,J.;Hope,A.O'donovan,T,G.;-Barnard.C.N.;"Total body perfusion for cardiac transplantation". *S.Afr.Med.J.* 43:64-75.1969.

81.-Cooper.D.K.C.;"Haemodynamic studies during short-term preservation of the autoperfusing heart-lung preparation-"*Cardiovasc.Res.* 9:753-767.1975.

82.-Dupree.,E.L.;Millis.M.;Clark,R.;Sel,K.W.;"Xenoenic storage of primate hearts". *Transplant.Proc.* 1:840-856.1969.

83.-Matsumoto,H.;Matsumaga,H.;Kawauchi,M.;Asano,K.;"Effecbf

coenzyme Q 10 pretrament of myocardial preservation". *Heart Transplant* 3:160-175.1984.

84.-Chazov, E. I.; Halchikova, L. S.; Lipina, N. V.; Asafor, G. D.; Shirnov, V. N.; "Taurine and electrical activity of the heart". - *Circ. Res.* 34:11-22.1974.

85.-Menasche, P. H.; Gousset, C. H.; Duval, M.; Pernot, A.; Piwnica, A.; "Influence of the initial reperfusate composition on myocardial function following cardioplegia ischemic arrest". - *J. Moll. Cell. Cardiol.* 13:156-165.1981.

86.-Glogar, D. M.; Kloner, R. A.; Braumnald, D. E.; Clark, L. C.; "Perfluorocarbons reduce myocardial ischemic damage after coronary occlusion" *Science.* 211:1439-1450.1981.

87.-Lower, R. R.; Shumway, N. E.; "Studies on the orthotopic homotransplantation of the canine heart" *Surg. Forum.* 11:18-24.1960

88.-Shapiro, H.; Stonee, E. K.; "Body temperature and oxygen uptake in man". *Ann. Phys. Med.* 8:250-268.1966.

89.-Ganote, C. E.; Worstell, J.; Kaltenbach, J. P.; "Oxygen-induced enzyme release irreversible myocardial injury: effects of organide in perfused rat hearts". *Am. J. Pathol.* 84:327-345-1976.

90.-Bui-MOng-Hung, V. M.; Leandri, J.; Laurent, D.; "Influence of

descompression produce on heart viability after long-term storage using hyperbaric oxygen and hypothermia". *Nature*. 219:- 1175-1187. 1968.

91.-Wicomb, W.N.; Halasz, N.A.; Collins, E.M.; "Damaging effect of subzero temperature (-40C) on rabbit renal function".- *Criobiology* 18:497-506. 1981.

92.-Luyet, B.; "A review of reserach on the preservation of hearts in the frozen state" *Criobiology* 8:190-210. 1971.

93.-Lindbergh, C.A. "An apparatus for the culture of whole organs". *J. Exp. Med.* 62:409-423. 1935.

94.-Pegg, D.E.; Lazar, H.L.; Palmin, G.A.; "Organ preservation"- *Surg. Clin. North. Am.* 66:617-631. 1986.

95.-Toledo-Pereyra, L.H.; Sharp, H.L.; Condie, R.M.; Chee, M.;- Liliehei, R.C.; Najarian, J.S.; "Preservation of canine hearts after warm ischemia and one to two dogs of hypothermic storage. A comparative analysis of crystalloid and colloid solutions with diferent osmolarity and ion compositium"- *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 74:594-599. 1977.

96.-Copeland, J.G. Jones, M.; Spragg, R. Stinson, E.; "In vitro preservation of canine heart for 24 to 48 hours followed succesful orthotopic transplantation" *Ann. Surg.* 178:687-

678.1973.

97.-Minten,J.;Flameng,W.;Dyszkiewich,W.;"Optimal temperature and benefit of hypothermic cardioplegia arrest for long-term preservation of donor hearts:a study in the dog".*Transplant.-Int.* 1:19-32.1986.

98.-Wicomb,W.N.;Cooper,D.K.C.;Barnard,C.N.;"Twenty-four-hour preservation of the pig heart by a portable hypothermic perfusion system".*Transplantation* 34:246-254.1982.

99.-Toledo-Pereyra,L.H. Sharp,L.H.;Condie.R.M.;Lillehei.R.C-
.;"Organ preservation,liver,heart,lung and small intestine-"
"J.Surg.Res. 30:181-198.1981.

100.-Proctor,E.;Copeland,M.N;Jones,T.;Parker,R.;"Early sinus rhythm in dogs hearts preserved for 96 hours assessed in vivo"*Transplantation* 13:437-453.1972.

101.-Suzuki,S.;Sasaki,H.;Tomita,E.;"Twenty four hours preservation of canine hearts by retrograde coronary sinus perfusion" *Heart Transplant* 4:76-85.1984.

102.-Barinov,E.F.;"Changes in extra-and intracellular electrolytes and nucleic acid metabolism in the myocardium during biological preservation of the heart".*Fiziol.Zh.* 30:425-436.1984.

103.-Jennings,R.B.;Reimer,N.A.;Kattembach,J.F.;West,J.J.;-
"Electrolyte alterations in acute myocardial ischemic
injury".*Cir.Res.*14:260-269.1984.

104.-Neeley,J.R.;Fluvray,D.;"Metabolic products and myocar-
dial ischemia".*Am.J.Pathol*102:282-291.1981.

105.-Calman,K.C.;QUin,R.O.;Bell,P.R.F.;"Metabolic aspects of
organ storage and prediction oforgan viability"*Organ Preser-
vation* Ed.Edim ChurchillLivinstone pp 225.1973.

106.-Churem,J.G.;Sen,A.K.;"Regulation of canine hearts
sarcolemmal Ca-pumping ATP by ciclic GMP"*Biochim.Biophys.-
Acta.*728:191-200.1983.

107.-Jennings,R.B.;Reimer,K.A.;Steemaergen,C.;"The osmolar
load,membranedamage,andreperfusion".*J.Moll.Cell.Cardiol.*32-
:423.1986.

108.-Keimh,G.;Lurie,H.;Margaret,E.;Billingham,Masek,B.A.;-
Bristow,M.R.;Harrison,D.C.;"Ultraestructural and functional
studies on prolonged myocardial preservation in an experi-
mental heart transplant model"*J.Thorac.Cardiovasc.Surg.*-
84:122-129.1982.

109.-Trump,B.F.;Ginn,F.L.;"The pathogenesis ob subcellular

reaction to lethal injury".in*Methods and achievements in experimental pathology*VOL.IV pp1-29 ED.Bajusz and G.Jasmin .Yearbook medical publishers.Chicago.1969.

110.-Wicomb,W.N.;Rose,A.G.;Cooper,D.K.;Novitzky,D.;"hemo-
dynamic and myocardial histologic and ultrastructural studies
on babons from 3 to 27 months following autotrasplantation of
hearts stored by hypothermic perfusion for 24-48 hours"*J.-
Heart.Transplant.*5:122-129.1986.

111.-Gaasch,W.H.;Apstein,C.S.;Levine,H.J.;"Diastolic pro-
perties of the left ventricle " in *The ventricle basic in
clinical aspects* Ed.Levine.Boston pp 143-170.1985.

112.-Gaasch,W.H.;Levine,H.J.;Quinones,M.A.;Alexander."Left
ventricular compliance mechanisms and clinical implications"-
Am.J.Cardiol. 38:645-653.1976.

113.-Brutsaert,D.L.;De Clerck,N.M.;Goethais,M.A.;Housmaus,-
P.R.;"Relaxation of ventricular cardiac muscle"*J.Physiol.*283-
:469-480.1978.

114.-Solis,E.;Tago,M.;Kaye,M.P.;"Cardiac function following
prolonged preservation and orthotopic transplantation".*J.-
Heart.Transplant.* 4:357-362.1985.

115.-Barnard.C.N.;"A human cardiac transplantation interior

report of a succesful operation performed a Goote Schuer Hospital .Cape Town." *S.Afr.Med.J.* 41:1271-1281.1967.

116.-Wicomb,W.;Cooper,D.K.;Rose,M.B.;Barnard,C.N.;"Orthotopic transplantation after 20-24 hours preservation by continuos hypothermic perfusion with an oxygenated hiperosmolar solution" *J.Thorac.Cardiovasc.Surg.* 83:133-142.1982.

117.-Collins,J.C.;Higgins,S.B.;Harris,T.R.;Arnold,T.G.;"- "Patient monitoring systems:criteria for evaluation and selection" *J.Clinical.Engineering.* 6:111-119.1982.

118.-Hahn,C.E.W.;"Techniques for measuring the partial pressures of gases in the blood". *Scientific.Instruments.* 14- :783-791.1981.

119.-Severinghaus,J.W.;Bradley,A.F.;"Electrodos para el calculo de pO₂ y pCO₂ en la sangre". *J.Appl.Physiol.* 13:515-520.1968.

120.-Clark,L.O.Jr.;"Comprobacion y control de las tensiones de oxigeno en sangre y tejidos". *Trans.Am.Soc.Artif.Inter.-Organs.* 2:41-56.1956.

121.-Griepp,R.B.;Stinson,E.B.;Clark,D.A.;Dong,E.Jr.Sumway,- N.E.;"The cardiac donor" *Surg.Gynecol.Obstret.* 133:792-802.- 1971.

122.-Sommer, J.R.; Johnson, E.A.; "The ultrastructure of cardiac muscle" In *Handbook of Physiology* Ed. R. Berne. W.D.C. Section 2 pp 113. 1979.

123.-Mamoru Tago,; Ramiath Subramanian. Michael.; Kaye. P.; "Light and electron microscopic evaluation of canine hearts orthotopically transplanted after 24 hours of extracorporeal preservation". *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 12:912-919. 1983.

124.-Schaper, J.; Muich, J.; Winkler, B.; Schaper, W.; "Ultrastructural, functional, and biochemical criteria for estimation of reversibility of ischemic injury. A study on the effects of global ischemia on the isolated dog." *J. Mol. Cell. Cardiol.* 11:521-536. 1979.

125.-Melrose, D.G.; Longmore, D.; "Elective cardiac arrest: historical perspective " in *Modern Cardiac Surgery*. Edited by Longmorf MTP. Lancaster. pp 271-275. 1978.

126.-English, T.A.H.; Cory-Pearce, R.; Wheeldon, D.; "The role of cardioplegia in cardiac transplantation" in *Proc. First World Congress on open Heart Technology*. Brighton pp 98. 1981.

127.-Hardestry, R.L.; Griffith, B.P.; Deeb, G.H.; Bahnson, H.I.; Starzi, T.E.; "Improved cardiac function using cardioplegia during procurement and transplantation". *Transplant. Proc.*

15:1253-1262.1983.

128.-Janis,M.;Burt,Ph.D.;Jackg,L.;Copeland,D.;"Myocardial function after preservation for 24 hours".*J.Thorac.Cardiovasc.Surg.* 92:238-246.1986.

129.-Bethencour,D.M.;Lacks,H.;"IMportance of edema and compliance changes during 24 hours of preservation of the dog heart".*J.Thorac.Cardiovasc.Surg.* 81:440-449.1981.

130.-Pitzele.S.;"Important factors in extracorporeal oxygen support with special reference to the heart".*Can.J.Surg.*14-:100-108.1971.

131.-Watson,D.C.;"Consistant survival with prolonged donor heart preservation".*Transplant Proc.* 9:297-299.1977.

132.-Brody,W.R.;Reitz,B.A.;"Topical hypothermic protection of the myocardium"*Ann.Thorac.SUrg.* 20:66-72.1975.

133.-Perry,V.P.;Lindbergh,C.A.;Malinin,T.I.;Mover,G.H.;"Organ perfusion and preservation" in *J.C.Normal.* Ed.Appleton Century NY.pp 203-245.1968.

134.-Proctor,E.;Jones,T.;"Myocardial preservation for 4 days at 40C" in *Proc.First World Congress on open heart technology.*inBrighton pp 45-56.1981.

135.-Copeland,J.G.;Stinson,E.B.;"Evaluation of hypothermic perfusion for 24 hours preservation of canine hearts".*Transplant Proc.* 6:311-313.1974.

136.-Goerke,J.;Jon,H.;Mines,H.;Allan,M.;in *Cardiovascular Physiology*.Ed.Raven Press,NY. pp 162-169.1988.

137.-Guerraty,A.Alivizatos,P.;WArner,M.;Hejs,M.;Allen,L.;-Lower,R.R.;"Successful orthotopic canine heart transplantation after 24 hours in vitro preservation".*J.Thorac.-CARDIOVASC.Surg.* 82:531-541.1981.

138.-Tate,C.A.;Chu,A.;Mc Millan-Wood,J.;Barry van Winke,W.;-"Evidence for a Ca⁺⁺ sensitive factor which alters the alkaline pH sensitivity of SR Ca⁺⁺ transport".*J.Biol.Chem.* 256:2934-2939.1981.

139.-Kanter,D.P.;Jaffin,J.H.;Ehrlichman.R.J.;Flahertyu.J.T.;-Gott,R.L.;Gardnert.J.;"Superiority of perflurocarbon cardioplegia over blood or crystalloid cardioplegia".*Circulation* 64:11-75.1981.

140.-Hand,S.C.;Somero,G.N.;"Urea and methylamine effects on rabbit muscle phosphofructokinase".*J.Biol.Chem.* 257:734-739.1982.

141.-Zimmerman,A.N.E.;Daems,W.;Huisman,W.C.;Snisder,J.;

Wisse, E.; Durrresr. D.; "Morfological changes of heart muscle caused by successive perfusing with Ca^{++} free and Ca^{++} containing solutions. Calcium paradox." *Cardiovasc. Res.* 1:201-209. 1967.

142.-Crake, T.; Kirsty, M. S.; Poole-Wilson, P. A.; "Potasium efflux from the myocardium during hypoxia: role of lactate ions." *Cardiovasc. Res.* 21:886-891. 1987.

143.-Kanaide, M.; Menu, H.; Nakamura, M.; "Metabolic and physical changes during calcium paradox induced in the rat heart". *Br. J. Exp. Pathol.* 68:319-330. 1987.

144.-Kohno, H.; Shiki, K.; Venoy, A.; Tokunaga, K.; "Cold storage of the rat heart for transplantation. Two types of solution required for optimal preservation". *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 93:86-94. 1987.

145.-Robert, M.; Bodenhamer, H.; Lawrence de Boer, Guillian, G.;-Dennis Dökeffe, Willard, M.; Dagget. "Enhanced myocardial protection during ischemic arrest". *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 85:769-780. 1983.

146.-Spray, T. L.; Watson, D. C.; Roberts, W. C.; "Morphology of canine hearts after 24 hours preservation and orthotopic transplantation" *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 73:880-886. 1977.

147.-Rochow, T. G.; Rochow, E. G.; "An introduction to microscopy

by means light, electron, x-rays or ultrasound" in *Plenum Press*. New York. pp 123. 1978.

148.-Sommer, J.R.; Steere, R.L.; Johnson, E.A.; Jewett, P.H.; -
"Ultrastructure of cardiac muscle. A comparative review with
emphasis on the muscle fibers of the ventricles." in *Hiber-
nation and hypothermia, perspective and challenges*. Edited by
South Alpert pp 255-291. 1972.

149.-Tokuyasu, K.T.; "Visualization of longitudinally-oriented
intermediate filaments in frozen sections of chicken cardiac
muscle by a new staining method". *J. Cell. Biol.* 97:562-565. 1983.

150.-Joachim, R.; Sommer, G.; Robert, B.; Jennings, A.; "Ultra-
structure of cardiac muscle". in *The heart and cardio-
vascular system* Ed. Raven Press. USA. Volumen 1 pp:61-99. 1986.

151.-Trump, B.F.; Arstilla, A.; "Cell injury and cell death" in
Principles of pathobiology Ed. Exford University press. London
pp 9-88. 1971.

152.-Franklin, G.J. "Mechanical concepts in cardiovascular and
pulmonary physiology". In *Physiology* Ed. Lea & Febiger pp 13-
15. 1977.

153.-Levistky, S.; Williams, W.H.; Dether, D.E.; McIntosh, C.R.; -
Morrow, A.G.; "A functional evaluation of the preserved

heart" *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 60:625-635.1970.

154.-Solis,E.;Tago,M.;Kaye,M.P.;"Cardiac function following prolonged preservation and orthotopic transplantation ".*J.Heart Transplant.* 4:357-361.1985.

155.-Copeland,J.;Jones,M.;Spragg,R.;Stinson,E.B.;"In the preservation of canine hearts for 24 to 28 hours followed by successful orthotopic transplantation".*Ann.Surg.* 178:687-692.1983.

156.-Sodums,M.T.;Badke,F.R.;Starling.H.R.;"Evaluation of left ventricular contractile performance utilizing end-systolic pressure-volume relationships in conscious dog". *Circ.Res.*54:731-739.1984.

157.-Bernard,J.H.;Swyngheda,V.W.;"Funcion ventricular" in *Experimantation animales en Cardiologie* Ed. Inserm. pp 124 .1988.

158.-Wicomb,W.V.;Cooper,D.K.C.;Barnard,C.N.;"Donor heart storage" in *Heart Transplantation* Edited by Cooper and Lanza pp:51-57.1984.

159.-Starling,E.M."On the absorption of fluids from the coonective tissue spaces".*J.Physiol.* 19:312-318.1985.

160.-Goerke,J.;Allain,H.;Mines,A.;"Edema" in *Cardiovascular*

physiology. Edited by Raven Press pp 191. 1988.

161.-Toledo-Pereyra, L.H.; Chee, M.; Liliehei, R.C.; "Effect of pulsatile perfusion pressure and storage on hearts preserved for 24 hours under hypothermic for transplantation". *Ann.-Thorac.Surg.* 27:24-29. 1979.

162.-Abe, Y.; Chinzei, T.; Imachi, K.; Imannischi, K.; Ono, T.; Fujimasa, I.; "Long term preservation of beating heart in an artificial environment". *Asaio.Trans.* 34:778-783. 1988.

163.-Astrup, P.A.; "New approach to acid-base metabolism". *Clin.-Chem.* 7:1-9. 1961.

164.-Pitzele, S.; Sze, S.; Dobell, A.R.C.; "Functional evaluation of the heart after storage under hypothermic coronary perfusion". *Surgery.* 70:509-514. 1971.

165.-Burt, J.M.; Copeland, J.G.; "Myocardial function after preservation for 24 hours". *J.Thorac.Cardiovasc.Surg.* 92:238-243. 1986.

166.-Lee, B.Y.; Wilson, G.J.; Domenech, R.J.; Macgregor, D.C.; "relative roles of edema versus contracture in the myocardium postischemic "no reflow" phenomenon". *J.Surg.Res.* 29:50-61. 1980.

167.-Morsishita, Y.; Saigensi, H.; Higashi, T.; Umesbayashi, Y.-

;Tisira,A.; Goto,M.;"Function of the transplanted canine heart after prolonged preservation by simple immersion".*Heart Vesels.* 4:220-228.1985.

168.-Trento,A.;Hardesty,R.L.;Griffith,B.P.;Kornos,R.L.;-Bahnsen,H.T.;"Early function of cardiac homografts:relationships to hemodynamics in the donor and length of the ischemic period".*Circulation* 74:177-182.1986.

169.-Murphy,J.G.;Maesh,J.D.;Smith,T.W.;"The role of calcium in ischemic myocardial injury".*Circulation.* 6:24-29.1987.

170.-Fukuyama,T.;Sobel,B.E.;Roberts,R.;"Microvascular deterioration for reperfusion".*Cardiovasc.Res.*18:310-320.-1984.

171.-Collan.Y.;Mc.Dowell,E.;Trum,P.B.F.;"Studies on the pathogenesis of ischemic cell injury:VI mitochondrial flocculent densities in autolysis".*Virchow Arch.*35:189-199.1981.

172.-Ganote,C.E.;Humphrey,S.M.;"Effects of anoxic or oxygenated reperfusion in globally ischemic, isovolumic, perfused rat hearts".*Am.J.Pathol.* 120:129-145.1985.

173.-Jennings.R.B.;Ganote,C.E.;"Structural changes in myocardium during acute ischemia"*Circ.Res.*34:156-172.1974.

174.-Jennings,R.B.;Hawkins,H.K.;"Ultrastructural changes of

acute myocardial ischemia in: Degradative processes in heart and skeletal muscle". in *Ultrastructura* edited by K. Wildenthal Hollans pp 295-346. 1980.

175.-Jennings, R.B.; Schaper, J.; Hill, M.L.; Steenbergen, C.; Reihmer, K.A.; "Effect of reperfusion late in the phase of reversible ischemic injury. Changes in cell volume, electrolytes, metabolites, and ultrastructure". *Circ. Res.* 56:262-278. 1985.

176.-Schaper, J.; Hehrlein, F.; Schlepper, M.; Thiedemann, K.; "Ultrastructural alterations during ischemia and reperfusion in human hearts during open-heart surgery". *J. Mol. Cell. Cardiol.* 9:175-189. 1977.

177.-Jennings, R.B.; Reimer, K.A.; "Lethal myocardial injury". *Am. J. Pathol* 102:241-255. 1981.

178.-Jennings, R.B.; Steenbergen, C.; Kinney, R.B.; Hill, M.L.; Reihmer, K.A.; "Comparison of the effect of ischemia and anoxia on the sarcolmma of the dog heart". *Eur. Heart. J.* 4:123-137. 1983.

179.-Jennings, R.B.; Sommers, H.M.; Smyth, G.A.; Flack, H.A.; Lin, H.; "Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog" *Arch. Pathol.* 70:68-78. 1960.

180.-Keith, A.; Reimer, M.; Robert, B.; Jennings, R.B.; "Myocardial



ischemia, hypoxia and infarction" in *The heart and cardiovascular system*. edited by Raven press 2:1133-1156.1988.

181.-Nayler, W.G.; "The role of calcium in the ischemic myocardium" *Am. J. Pathol.* 102:262-270.1981.

182.-Jennings, R.B.; Reihmer, K.A.; Steembergen, C.; "Myocardial ischemia and reperfusion :role of calcium" in *Control and manipulation of calcium movement*. edited by J.R.; Parrat NY.pp 273-302.1985.

183.-Jennings, R.B.; Roberts, B.; "Myocardial tissue damage" in- *The heart and cardiovascular system*. Edited Raven press Capitulo III. Pagina 67.1988.

184.-Katz, A.M.; Reuter, H.; "Cellular calcium and cardiac cell death". *Am. J. Cardiol* 44:188-190.1979.

185.-Katz, A.M. "Calcium fluxes across the sarcoplasmic reticulum". *Persp. Cardiovasc. res.* 9:53-66.1984.

186.-Tsien, R.W.; "Calcium channels in excitable cell membranes". *Annu. Rev. Physiol.* 45:341-358.1983.

187.-Napolitano, C.A.; Cooke, P.; Segalmen, K.; Hervibette, L.; "Organization of calcium pumps proteins in the isolated sarcoplasmic reticulum membrane". *Biophys. J.* 42:119-125.1983.

188.-Gaasch,W.H.;Blaustein,A.S.;Adam,D.;"Myocardial relaxation IV.Mechanical determinants of the time course of left ventricular pressure decline during isovolumic relaxation-".*Eur.Heart.J.*1:11-117.1980.

189.-Allen,D.G.;Orchard,C.H.;"Myocardial contractile function during ischemia and hypoxia".*Circ.Res.*60:153-163.1987.

190.-Lorell,B.H.;Wexler,L.F.;Momomura,S.;Weinberg,E.;-Apsienec.S.;"The influence of pressure overlad left ventricular hypertrophy on diastolic properties during hypoxia in isovolumically contracting rat hearts".*Circ.Res.* 58:633-645.1986.

191.-Burt,J.M.;Copeland,J.G.;"Myocardial function after preservation for 24 hours".*J.Thorac.Cardiovasc.Surg.* 2:238-245.1986.

192.-Lazar,H.L.;Painvin,G.A.;Roberts,A.J.;"Myocardial preservation".*Surg,Clin.North.Am.*3:467-476.1986.

193.-Miller,L.W.;Jellinen.M.;Codo,J.E.;Kolana,R.J.;"Improved myocardial preservation by control of the oxidative-reduction potential".*j.Heart.Transplant.*4:319-326.1985.

194.-Rousou,J.A.;Engelman,R.M.;Dobibs,W.A.;Breyer,R.M.;Das,-

- D.K.; "Metabolic enhancement of myocardial preservation during cardioplejia arrest". *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 91:270-286-1986.
- 195.-Richards, T.L.; Terrier, F.; Sievers, R.E.; Lipton, M.J.; Moseley, M.E.; Higgins, C.B.; "Lactate acumulation in ischemic and anoxic isolated rat hearts assessed by H-I spectroscopy". *Invest. Radiol* 22:638-645. 1987.
- 196.-Brainard, J.R.; Hoekenga, D.E.; Hutsunj, Y.; "Metabolic consequences of anoxia in the isolated, perfused guinea pig heart: anaerobic metabolism of endogenous amino-acid." *Magn.-Reson. Med.* 3:673-685. 1986.
- 197.-Crake, T.; Kirby, M.S.; Poole-Wilson, P.A.; "Potasium afflux from the myocardium during hypoxia: role of lactate ions." *Cardiovasc. Res.* 21:886-900. 1987.
- 198.-Hardy, J.D.; Kurrus, F.D.; Chavez, C.M.; Webb, W.R.; "Heart transplantation in infant calves; evaluation of coronary perfusion to preserve organ during transfer" *Ann. NY. Acad. Sci.* 120:876-890. 1964.
- 199.-Mendler, N.; Struck, E.; Sebening, F.; "Orthotopic canine heart transplantation after 24 hours cold perfusion." *Transplant. Proc.* 16:173-186. 1984.
- 200.-Davtyan, H.G.; Corno, A.F.; Laks, H.; Chang, P.; Drinkwater, D.;

"Long term neonatal heart preservation". *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 1:44-58. 1988.

201.-Pennock, J.L.; Oyer, P.F.; Reitz, B.A.; "Cardiac transplantation in perspective for the future" *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 83:168-175. 1982.

202.-Herreros, J; Errasti, J.; "Perspectivas futuras del trasplante Cardíaco" en *TRASPLANTE CARDÍACO* Editorial Científico medica Barcelona. pagina 429. 1987

203.-Barnard, C.N.; Cooper, D.K.C.; Lanza, R.P.; "The future of the heart replacement" in *HEART TRANSPLANTATION* edited by cooper and lanza boston pp 341. 1984.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunión de Deliberación Integrada por los cinco miembros
del Comité de la Junta, para evaluar la Tesis Doctoral de
Automa. Ordoñez Fernández
"Conservación Circun dominante por transmisión:
Estudio experimental"

apto "cum laude" POR
UNANIMIDAD

29

febrero

1990

