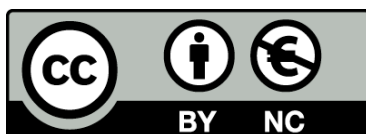




UNIVERSITAT DE
BARCELONA

**Donants d'òrgans a cor parat:
recirculació normotèrmica i refredament corporal
amb derivació cardiopulmonar com a mètode
d'obtenció d'òrgans. Estudi clínic i experimental**

Ricard Valero i Castell



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial 4.0. Espanya de Creative Commons**.

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial 4.0. España de Creative Commons**.

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0. Spain License**.

**DONANTS D'ÒRGANS A COR PARAT.
RECIRCULACIÓ NORMOTÈRMICA I REFREDAMENT
CORPORAL AMB DERIVACIÓ CARDIOPULMONAR
COM A MÈTODE D'OBTENCIÓ D'ÒRGANS.
ESTUDI CLÍNIC I EXPERIMENTAL**

**Tesi presentada per
Ricard VALERO i CASTELL
per aspirar al
grau de doctor en Medicina**

**FACULTAT DE MEDICINA
UNIVERSITAT DE BARCELONA
Barcelona, maig de 2000**

BIBLIOTECA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA



0701084753

x

Als meus pares
A l'Eva

AGRAÏMENTS

AGRAÏMENTS

- Al **Dr. Martí Manyalich**, cap del Servei de Coordinació de Trasplantaments de l'Hospital Clínic i codirector de la tesi, per l'empenta i el suport constant, sense el qual aquesta tesi no hagués pogut realitzar-se.

- Al **Prof. Dr. Juan Carlos García-Valdecasas**, cap del grup de recerca de trasplantament hepàtic de donants a cor parat i codirector de la tesi, pel seu constant treball en el desenvolupament de la tasca d'aquest grup, gràcies al qual han estat possibles els estudis experimentals de recerca.

- A la **Prof. Dra. Carmen Gomar**, cap del Servei d'Anestesiologia i Reanimació de l'Hospital Clínic, professora titular d'Anestesiologia de la Universitat de Barcelona i tutora de la meua tesi doctoral, que em va impulsar a treballar en aquesta línia i em va donar suport en tot moment.

- A la **Dra. Catiana Cabrer**, metge del Servei de Coordinació de Trasplantaments de l'Hospital Clínic, que amb la transmissió de la seva energia i l'entusiasme sempre m'ha empentat a dur a terme aquest treball, i per la seva dedicació a l'aplicació clínica de la donació d'òrgans a cor parat.

- Al **Prof. Miguel Ángel Nalda**, catedràtic d'Anestesiologia de la Universitat de Barcelona, per la seva confiança en el meu treball.

- A tot l'equip humà del Servei de Coordinació de Trasplantaments, motors indiscutibles d'aquesta feina, especialment, al **Dr. Jacinto Sánchez**, amic i company, i al **Dr. Esteve Trias**.

-A la **Dra. Pilar Taurà** i al **Dr. Joan Beltrán** i també a la **Dra. Purificación Calatrava**, al **Dr. Ramón Adalia**, a la **Dra Mercé Agustí**, i a la **Dra. Annabel Blasi**, que han estat part integrant de l'equip de recerca que ha fet possible aquest treball, i a tots els meus companys del Servei d'Anestesiologia i Reanimació de l'Hospital Clínic, pel seu suport.

- Al **Dr. Ramón Rull**, al **Dr. Andrés Cifuentes**, a la **Dra. Jeanine Tabet**, al **Dr. Xavier González**, al **Dr. Miquel Àngel López Boado**, al **Dr. Joaquín Angás** i al **Dr. Raul Almenara** del Servei de Cirurgia General i Digestiva per la seva enorme tasca en els protocols experimentals i clínics del trasplantament hepàtic de donants a cor parat.

- A en **Marc Net**, bioquímic becari del nostre grup de recerca, per la seva gran ajuda en el seguiment dels estudis experimentals i en l'anàlisi dels resultats.

- A en **Lluís Capdevila**, veterinari becari del nostre grup, per la seva col·laboració en el programa de recerca.

- Al **Dr. Frederic Oppenheimer** i a tot l'equip de la Unitat de Trasplantament Renal, que m'han ajudat a analitzar les dades del seguiment dels pacients trasplantats.

- Al **Dr. Rafael Gutierrez**, al **Dr. Antonio Alcaraz** i a tot l'equip d'Urologia que van col·laborar en el programa de donants a cor parat.
- A l'equip d'infermeria d'urgències i, especialment, a les infermeres del quiròfan d'urgències, que sempre han col·laborat en el desenvolupament dels protocols de donants a cor parat.
- A l'equip d'infermeres perfusionistes, i especialment a la **Sra. Ana González**, per les seves ensenyances en el maneig de la derivació cardiopulmonar.
- Al **Dr. Ramón Deulofeu** i a la **Dra. Montserrat Elena**, del Servei de Bioquímica de l'Hospital Clínic, pel seu suport en l'anàlisi de les mostres recollides durant l'estudi experimental.
- Al **Dr. Jaume Ordi** per la seva feina en l'anàlisi i la interpretació de les peces histològiques hepàtiques dels treballs experimentals.
- Al **Departament de Cirurgia** de la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona, per la seva ajuda en els inicis del programa de recerca.
- A la **Dra. Amèrica Jiménez** del Servei d'estabulari de la Facultat de Medicina, on hem pogut desenvolupar gran part del treball de recerca.
- Al Servei de Llengua Catalana de la Universitat de Barcelona pel seu suport en la correcció del manuscrit.

- Als **donants d'òrgans** i a les seves famílies, perquè del seu dolor neix esperança per als altres.

ÍNDEX

ÍNDEX

1. MOTIVACIÓ

1.1 Motivació general

1.2 Motivació personal

2. INTRODUCCIÓ

2.1 Detecció i procedència dels donants a cor parat

2.2 Criteris de selecció dels donants a cor parat

2.3 Lesió dels òrgans per la síndrome d'isquèmia-reperfusió

2.4 Procediments per a l'extracció d'òrgans de donants a cor parat

2.4.1 Procediments inicials

2.4.2 Perfusió dels òrgans

2.4.2.a Perfusió *in situ*

2.4.2.b Refredament corporal amb circulació extracorpòria

2.4.2.c Perfusió dels òrgans amb sang normotèrmica

2.4.3 Preservació dels òrgans després de l'extracció: emmagatzematge en fred i perfusió contínua pulsativa

2.4.4 Selecció del receptor i trasplantament

2.5 Anàlisi de la viabilitat dels òrgans procedents de donants a cor parat

2.6 Estat actual del trasplantament de ronyó procedent de donant a cor parat

2.7 Estat actual del trasplantament de fetge procedent de donant a cor parat

2.8 Aspectes socials i legals de la donació d'òrgans de donants a cor parat

3. HIPÒTESI I OBJECTIUS

3.1 Hipòtesi

3.2 Objectius

4. INVESTIGACIÓ I RESULTATS

4.1 Recerca clínica en el trasplantament renal de donants d'òrgans a cor parat

Normothermic Recirculation Reduces Primary Graft Dysfunction of Kidneys Obtained from Non-Heart-Beating Donors. (Transplant International 2000; en premsa).

4.2 Recerca experimental en el trasplantament hepàtic de donants d'òrgans a cor parat

Hepatic blood flow and oxygen extraction ratio during normothermic recirculation and total body cooling as viability predictors in non-heart-beating donor pigs. (Transplantation 1998; 66:170-6).

L-arginine reduces liver and biliary tract damage after liver transplantation from non-heart-beating donor pigs. (Transplantation 2000; en premsa).

5. DISCUSIÓ GLOBAL

6. CONCLUSIONS

7. BIBLIOGRAFIA

1. MOTIVACIÓ

1.1 MOTIVACIÓ GENERAL

La manca d'òrgans aptes per a trasplantament, juntament amb l'augment de les indicacions terapèutiques d'aquest, obliga a la utilització de tots els mitjans humans i tècnics en la recerca de solucions per a aquest problema. Durant els últims anys s'ha replantejat la possibilitat d'obtenir òrgans per a trasplantament de donants morts en aturada cardiorespiratòria: els donants a cor parat. Gràcies als treballs de García-Rinaldi, el 1975 es va iniciar amb èxit la tècnica de preservació *in situ* de ronyons de cadàver mitjançant la perfusió freda duta a terme directament a través d'un catèter col·locat per via femoral fins a l'aorta. Així es va aconseguir reduir el temps d'isquèmia calenta des de l'aturada cardiorespiratòria fins a la nefrectomia, i es va millorar d'aquesta manera el problema principal d'aquests donants: la preservació deficient dels òrgans sotmesos a llargs períodes d'isquèmia calenta. Posteriorment nombrosos autors han posat en pràctica aquests mètodes, han obtingut bons resultats i han aconsellat la inclusió d'aquest grup de donants en el programa d'obtenció d'òrgans.

Malgrat tot, l'aplicació d'aquestes tècniques d'obtenció i preservació dels òrgans d'aquests donants ha tingut importants limitacions. En primer lloc, i fent referència específicament al trasplantament renal, hi ha l'elevat índex de disfunció primària de l'empelt, amb un retard en l'inici de la funció d'aquest i, fins i tot, el fracàs inicial del trasplantament. En segon lloc, en funció de les tècniques emprades fins aquest moment, hi ha una limitació en l'aprofitament d'altres òrgans, tan necessaris per al trasplantament, amb garanties d'èxit.

La major part dels estudis actuals sobre la utilitat dels òrgans procedents dels donants a cor parat se centren precisament en aquests dos punts. D'una banda, com optimitzar la funció dels ronyons, prèviament sotmesos a l'efecte deleteri de la isquèmia, i de l'altra banda, com ampliar els beneficis de la utilització dels ronyons fent servir altres òrgans, com ara el fetge.

1.2 MOTIVACIÓ PERSONAL

Durant la meva residència com a anestesiològ a l'Hospital Clínic de Barcelona vaig començar a interessar-me pels avanços que aleshores s'anaven desenvolupant en el món dels trasplantaments. En finalitzar la residència l'any 1990, se'm va concedir una beca de l'Hospital Clínic per desenvolupar un projecte d'investigació sobre els donants a cor parat. Impulsat per l'interès de la Dra. Gomar i de la mà del Dr. Manyalich, ànima primera de la coordinació de trasplantament a l'Hospital i primer iniciador de la recerca i utilització dels òrgans de donants a cor parat, vaig iniciar els estudis d'investigació de la que esdevindria la llavor d'aquesta tesi doctoral. Posteriorment, vam començar, juntament amb el grup de recerca experimental de trasplantament hepàtic dirigit pel Dr. García-Valdecasas, els treballs experimentals d'investigació sobre la utilització del fetge procedent dels donants a cor parat, que constitueixen la segona part d'aquesta tesi doctoral.

2. INTRODUCCIÓ

Els donants a cor parat van ser l'única font d'òrgans de donant cadàver fins a l'acceptació que va fer la comunitat científica de la mort encefàlica com a mort de l'individu. Aquesta no va ser reconeguda a Espanya fins el 1979 amb la promulgació de la Llei de trasplantaments. Fins aleshores calia esperar que els donants en mort encefàlica presentessin una aturada cardíaca per dur a terme l'extracció. Posteriorment, la millor viabilitat dels òrgans dels donants en mort encefàlica, amb el cor bategant, no sotmesos a la isquèmia secundària a l'aturada cardíaca, va fer que s'abandonés l'ús dels òrgans procedents dels donants a cor parat. Amb els anys, la milloria en la immunosupressió i l'establiment dels trasplantaments com una eina terapèutica rutinària de primer ordre van posar de manifest la manca de donants d'òrgans. Això va fer que es replantegés la possibilitat d'utilitzar novament els òrgans procedents dels donants a cor parat.

2.1.- DETECCIÓ I PROCEDÈNCIA DELS DONANTS A COR PARAT

La generació d'òrgans i teixits es produeix fonamentalment a través de quatre tipus de donants potencials: en primer lloc, els donants en mort encefàlica, que constitueixen, avui en dia, la font de donants d'òrgans més estesa; en segon lloc, els donants vius d'òrgans i teixits (donants de ronyó unilateral, donants sotmesos a hemihepatectomia, donant dominó, donants de medul·la òssia, donants de sang) i en tercer lloc, els teixits obtinguts de donants cadàver (vàlvules cardíaques, còrnies, ossos, pell, etc.). Finalment, un quart grup de donants potencials està constituït per individus en aturada cardiorespiratòria (ACR) irrecuperable, amb un *temps d'isquèmia calenta* suficientment reduït que permeti l'extracció d'òrgans i teixits aptes per a trasplantament. Aquests es coneixen com a *Donants a cor parat*.

La isquèmia és la causa fonamental del fet que els òrgans obtinguts de donants a cor parat puguin presentar un dèficit de la seva funció un cop trasplantats. Entenem per *temps d'isquèmia calenta* el temps transcorregut des del moment de l'aturada cardiocirculatòria fins a la perfusió de l'òrgan, sumant tant el temps transcorregut sense maniobres de reanimació cardiopulmonar (RCP) efectives com el transcorregut amb maniobres efectives. Per un altre banda, el *temps d'isquèmia freda* comprèn el temps transcorregut des de l'inici de la perfusió freda de l'òrgan fins al moment de la reperfusió, un cop implantat en el receptor.

L'origen o la procedència d'aquests donants a cor parat és múltiple. Després de la reunió de Maastricht, el 1995 es defineixen quatre categories de donants a cor parat⁽¹⁾:

- Categoria 1: Ingress cadàver a la seva arribada a l'hospital. Aquesta categoria inclou aquells pacients que són portats a l'hospital (sense dur a terme maniobres d'RCP), un cop diagnosticada la mort, generalment després d'un traumatisme (accidents de trànsit) o per altres raons mèdiques (infart de miocardi, p.ex.).
- Categoria 2: Reanimació cardiopulmonar no efectiva. Inclou la majoria dels donants a cor parat i la seva procedència pot ser intrahospitalària o extrahospitalària. Són pacients ingressats a les unitats de cures intensives o reanimació, malalts politraumàtics, amb traumatisme cranioencefàlic o aquells que han patit un accident vascular cerebral, infart agut de miocardi, etc. que pateixen una ACR que no és possible revertir, malgrat el tractament adequat.
- Categoria 3: Aturada cardíaca esperada. Aquest grup inclou els pacients amb dany cerebral irreversible (traumàtics, tumor cerebral), però que no compleixen criteris de mort encefàlica. Aquests donants potencials són portats a quiròfan on s'interrompen les mesures de suport vital i s'espera l'aturada cardíaca. Són els anomenats per Kootstra donants a cor parat *controlats*⁽²⁾. Aquest grup planteja nombroses consideracions ètiques i no està acceptat en el nostre entorn mèdic i social.
- Categoria 4: Durant el diagnòstic de mort encefàlica. Constituïda per aquells donants en programa d'extracció d'òrgans per mort encefàlica que pateixen una ACR durant els procediments de diagnòstic de la mort encefàlica o durant l'espera dels equips de trasplantament per a l'extracció dels òrgans.

2.2 CRITERIS DE SELECCIÓ DELS DONANTS A COR PARAT

Els criteris seguits per considerar un pacient mort com a donant potencial d'òrgans a cor parat inclouen, en primer lloc, els mateixos criteris de selecció habituals per als donants en mort encefàlica, o sigui, l'absència de malalties transmissibles infeccioses i neoplàsiques, la situació hemodinàmica prèvia a l'aturada cardíaca, la patologia associada, etc. En segon lloc, el donant ha de tenir una edat inferior als 60-65 anys. Aquest criteri, amb límits arbitraris, pretén reduir l'efecte deleteri afegit que l'edat avançada podria tenir sobre la funció dels òrgans, especialment considerant l'efecte negatiu que la isquèmia ja els provocarà⁽³⁾. Finalment, s'accepta un temps d'isquèmia calenta sense RCP efectiva inferior a 30 minuts, ja que aquest és el temps màxim que poden romandre els ronyons sense perfusió per garantir un funcionament acceptable posttrasplantament⁽⁴⁻⁷⁾. La major part dels equips, igual que el grup de Kootstra^(8,9), accepten un temps de fins a 2 hores d'isquèmia calenta si es poden mantenir maniobres d'RCP efectiva. Segons això, el temps total d'isquèmia calenta, incloent'hi el temps amb maniobres d'RCP i sense maniobres d'RCP, pot ser fins de 2 hores i mitja. S'ha descrit algun cas aïllat de funció posttrasplantament després de períodes més perllongats d'isquèmia calenta sense maniobres d'RCP (superior a 2 hores)^(10,11), encara que aquests temps en cap cas han de ser considerats com a norma per a l'acceptació d'aquests òrgans.

2.3.- LESIÓ DELS ÒRGANS PER LA SÍNDROME D'ISQUÈMIA-REPERFUSIÓ

El problema fonamental en la viabilitat dels òrgans procedents de donant a cor parat consisteix en l'efecte negatiu de la isquèmia i la posterior reperfusió de l'empelt. Aquesta lesió, que pateix un òrgan a conseqüència de la manca de flux sanguini seguit de la reperfusió amb sang oxigenada, depèn de la manca d'aportament d'oxigen i metabòlits i de l'acumulació de residus del metabolisme, que condueixen a l'alteració de la funció cel·lular i a la mort d'aquestes.

Aquestes alteracions, que es pateixen en qualsevol trasplantament, on l'òrgan se sotmet a una fase d'isquèmia freda i a la posterior reperfusió, són encara més greus i accentuats en el cas del donant a cor parat, on hi ha una fase més o menys perllongada d'isquèmia calenta que empitjora aquest gran efecte negatiu sobre la viabilitat de l'empelt.

La isquèmia apareix quan la davallada de la perfusió tissular excedeix la capacitat d'incrementar l'extracció d'oxigen de la sang. Es tradueix en un aportament inadequat d'oxigen i en una inadequada eliminació de CO₂, increment de la producció d'àcid làctic, descens dels magatzems d'energia i descens de la producció d'ATP⁽¹²⁾. La isquèmia i la manca d'oxigen consegüent provoca l'alteració de la membrana plasmàtica i l'aturada de la bomba de Na/K. Això condueix a una alteració de l'intercanvi iònic de sodi, potassi i calci^(13,14). El sodi i el calci entren a la cèl·lula arrossegant aigua i provocant edema intracel·lular. Com a resultat de la depleció d'ATP i l'augment de calci, s'inicien reaccions lipolítiques i proteolítiques. Les fosfolipases i proteases activades pel calci destrueixen els fosfolípids i les proteïnes de membranes cel·lulars i mitocondrials⁽¹⁵⁾.

La degradació de l'ATP durant la isquèmia condueix a una acumulació dels seus productes de degradació fins a AMP, que es degrada a hipoxantina i finalment a xantina. La xantina-deshidrogenasa és l'enzim responsable de l'oxidació d'hipoxantina a xantina. Durant la isquèmia, aquesta xantina-deshidrogenasa es converteix en la forma oxidada (xantina-oxidasa) per dos mecanismes: d'una banda, per conversió reversible per oxidació i de l'altre, per una conversió irreversible per proteòlisi limitada⁽¹⁶⁾. La xantina-oxidasa utilitza l'oxigen molecular en lloc de NAD⁺ com a cofactor, i produeix radicals superòxid (O₂⁻)⁽¹⁷⁻²⁰⁾. La xantina-oxidasa, que es produeix en la majoria de les cèl·lules hepàtiques durant la isquèmia reperfusió, és particularment abundant a l'endoteli vascular i a les cèl·lules de Kupffer⁽²¹⁾.

La reperfusió de l'empelt, amb el nou aportament d'oxigen per la restauració del flux sanguini, afavoreix l'acció de la xantina-oxidasa i la conversió de la hipoxantina a xantina i l'alliberació de radicals lliures com ara l'anió superòxid (O₂⁻), peròxid d'hidrogen (H₂O₂) i radicals hidroxil (OH[·]), que empitjorarà la ja desenvolupada lesió cel·lular^(13, 22-25).

Els radicals lliures, químicament inestables pel nombre senar d'electrons de la valència, són altament reactius i provoquen lesió en la membrana cel·lular. Al cap de pocs minuts d'iniciar la reperfusió, l'acció dels radicals lliures sobre els àcids grassos poliinsaturats de la membrana cel·lular genera peroxiradicals i lipoperòxids (peroxidació lipídica)⁽²⁶⁾. Aquests últims empitjoraran la lesió de les membranes cel·lulars, i a més produiran un increment de la concentració intracel·lular de calci.

Per un altre costat, aquest increment del calci activa l'enzim fosfolipasa A_2 de la membrana plasmàtica, que hidrolitzarà els fosfolípids i donarà pas a la formació de factor activador de plaquetes (PAF) i eicosanoides (tromboxà A_2 i prostaglandina I_2). El PAF, tanmateix, activarà els polimorfonuclears.

A més, al cap de 6-24 hores de la reperfusió apareix una infiltració per neutròfils que són activats⁽²⁷⁾. En el fetge, aquesta sembla ser secundària a l'aparició de molècules d'adhesió cel·lular en el sinusoides hepàtic (molècula d'adhesió cel·lular vascular 1 (VCAM-1) o molècula d'adhesió intercel·lular 1 (ICAM-1)). La síntesi d'aquestes molècules estaria induïda per diverses citokines (factor de necrosi tumoral, interleucina 1) i determinats eicosanoides (leucotriè B4 i C4)⁽²⁸⁾. Les citokines i el PAF són activadors potents dels polimorfonuclears i de les cèl·lules endotelials, n'inicien i n'augmenten l'adhesió, causen lesió tissular en generar radicals lliures i alliberen enzims proteolítics com ara elastasa, colagenasa i gelatinasa⁽²⁹⁾. A més, els neutròfils activats poden formar agregats, que oclouen la microcirculació en els teixits isquèmics^(30,31). Finalment, l'alteració de la microcirculació agreuja encara més el dany isquèmic⁽³¹⁾.

Els teixits lesionats presenten elements defensius que tracten de minimitzar l'agressió dels radicals lliures i dels leucòcits, millorant la microcirculació tissular. Les cèl·lules endotelials sintetitzen enzims que bloquen i eliminen els radicals lliures (superòxid-dismutasa, catalasa, glutatió-peroxidasa)^(18,21,26,32). D'altra banda, també sintetitzen altres substàncies com ara eicosanoides (PGI₂, PGE₁, PGE₂)⁽³³⁾ i òxid nítric⁽³⁴⁾ que desenvolupen un paper important en la protecció de l'empelt hepàtic en front de la lesió per isquèmia-reperfusió.

Els eicosanoides tenen la capacitat de reduir el grau d'infiltració i activació leucocitària⁽³⁵⁾, presenten acció vasodilatadora i milloren la hipòxia i el dany tissular durant la isquèmia freda^(33,35,36).

L'òxid nítric és sintetitzat per les cèl·lules de l'endoteli vascular mitjançant l'enzim òxid nítric sintasa, a partir d'un àtom de nitrogen del terminal guanidino de l'aminoàcid L-arginina, l'oxigen molecular i el NADPH com a cofactor^(37,38). L'òxid nítric té una acció vasodilatadora per l'estímul de la síntesi de GMPc⁽³⁹⁾ que inactiva les proteïnes G acoblades als receptors de membrana dels canals del calci, causants de vasoconstricció muscular, en les cèl·lules musculars llises⁽⁴⁰⁾. L'òxid nítric és capaç de combinar-se amb els radicals lliures, preferentment el radical superòxid^(41,42) i inhibir l'adhesió de neutròfils, com també inhibir l'agregació i l'adhesió plaquetària⁽⁴³⁾.

Hi ha un bon nombre d'estudis que demostren la relació entre una activitat reduïda de l'òxid nítric i la lesió per isquèmia reperfusió. La síntesi d'òxid nítric està reduïda durant la isquèmia reperfusió a causa del dany de les cèl·lules endotelials i d'una reducció de la disponibilitat d'L-arginina secundària a un augment de l'alliberació d'arginasa des del teixit hepàtic isquèmic⁽⁴⁴⁾. La inhibició de l'òxid nítric empitjora la lesió d'isquèmia reperfusió⁽⁴⁵⁻⁴⁸⁾. A més, l'L-arginina (substrat de l'òxid nítric sintasa)⁽³⁸⁾ com també d'altres donadors d'òxid nítric, han demostrat la seva efectivitat reduint el dany hepàtic durant la reperfusió^(45,46,49-52). Tanmateix, s'ha demostrat que l'administració d'L-arginina durant la reperfusió en el receptor produeix un increment del flux venós portal⁽⁵³⁾ i del flux sanguini tissular hepàtic^(47,49,54).

2.4 PROCEDIMENTS PER A L'EXTRACCIÓ D'ÒRGANS DE DONANTS A COR PARAT

2.4.1 Procediments inicials

El procediment d'extracció d'òrgans de donant a cor parat s'inicia després que l'equip mèdic que ha atès al pacient diagnostiqui la mort per aturada cardiorespiratòria. Un cop s'ha fet el diagnòstic es pot considerar el cadàver com a donant potencial.

En aquest moment és necessari valorar amb exactitud el temps d'isquèmia calenta, des del moment de l'aturada cardiorespiratòria fins a l'inici de les maniobres d'RCP i des de l'inici de les maniobres d'RCP fins al començament de la perfusió dels òrgans. Inicialment es continua la ventilació artificial amb una concentració alta d'oxigen (FiO_2 1) i el massatge cardíac al cadàver, amb la finalitat de mantenir el millor flux sanguini possible als òrgans. Inmediatament es procedeix a l'obtenció de les mostres sanguínies per a la realització de determinacions de laboratori i, especialment, de les serologies plasmàtiques, necessàries per a l'evaluació del donant, i simultàniament es procedeix a l'heparinització del donant (3 mg/kg de pes). Alguns autors⁽⁸⁾ recomanen l'ús de fentolamina (0,125 mg/kg) per provocar vasodilatació dels vasos renals prèviament a la perfusió i per facilitar així el descens ràpid de temperatura. Alguns grups^(55,56) han referit el manteniment del donant fins a l'extracció amb la utilització aïllada de ventilació mecànica i massatge cardíac, monitoritzant-ne l'efectivitat, amb bons resultats. La major part dels equips, però, duen a terme en aquest moment la cateterització de l'artèria i la vena femoral per dissecció quirúrgica per poder iniciar la preservació dels òrgans.

2.4.2 Perfusió dels òrgans

2.4.2.a Perfusió *in situ*

Durant els estudis inicials, la perfusió renal s'assolia mitjançant la perfusió per gravetat de líquid de Collins fred a través de l'artèria femoral⁽⁵⁷⁾: l'anomenada perfusió *in situ*. En el primer treball experimental dut a terme sobre la perfusió dels òrgans de donant a cor parat, Banowski⁽⁵⁸⁾ va dissenyar un catèter de doble baló i triple llum que, col·locat en l'aorta per via femoral, aïllaria la circulació renal i permetria la perfusió freda d'aquests òrgans. L'objectiu fonamental d'aquesta tècnica era reduir de la manera més ràpida possible la temperatura dels ronyons per reduir el metabolisme cel·lular i, consegüentment, el dany provocat per la isquèmia calenta. Més endavant, García Rinaldi⁽⁵⁷⁾ i col·laboradors van utilitzar un catèter de disseny similar en un treball experimental i clínic i van obtenir per primer cop ronyons que van ser trasplantats, fet que va demostrar la viabilitat del procediment. Posteriorment Garvin⁽⁵⁹⁾ i Schweizer⁽⁶⁰⁾ i, més recentment, Fujita⁽⁶¹⁾, Kootstra, Booster, Ruers i col·laboradors^(2,4,8,62,63), com també altres equips^(10,11,64-72), han posat en pràctica aquests mètodes, mitjançant l'ús de diversos tipus de catèters (doble baló i triple llum^(4,57,61,73), catèter de Foley⁽⁵⁷⁾, catèter d'Anaise^(74,75), catèter de quatre llums⁽⁷⁶⁾), han obtingut bons resultats i han aconsellat la inclusió d'aquest grup de donants en el programa d'obtenció d'òrgans. S'ha suggerit que el refredament renal de superfície (mitjançant perfusió peritoneal hipotèrmica contínua⁽⁷⁷⁾) podria reduir la temperatura renal i protegir la microvascularització en casos de perfusió freda no suficientment efectiva i especialment en casos de perfusió de llarga durada^(74,75). Alguns equips⁽⁷⁸⁾ han utilitzat aquesta tècnica de forma aïllada amb resultats acceptables.

Un altre factor que s'ha relacionat amb una millor funció renal posttrasplantament ha estat la pressió de perfusió del líquid de preservació. Anaise^(74,75,77) demostra que quan aquesta és de 70 mmHg el descens de la temperatura és més ràpid i efectiu (fins a 15°C en 5 min). Una pressió de perfusió baixa augmentaria l'alliberació de renina-angiotensina, cosa que ocasionaria un augment de les resistències vasculars renals i condicionaria una disminució del flux renal i una mala reducció de la temperatura dels òrgans^(74,75).

S'han assajat diferents líquids de preservació (HTK^(8,79), líquid de la Universitat de Wisconsin⁽⁶⁷⁾, lactat de Ringer⁽⁶¹⁾) amb diferents constituents afegits (Anaise^(75,80) hi inclou trifluoroperazina, un inhibidor de la calmodulina) amb la finalitat de millorar la preservació dels òrgans, disminuint els efectes negatius de la reperfusió, etc. L'addició de fàrmacs com ara superòxid-dismutasa i catalasa⁽⁸¹⁾ permetria millorar les lesions degudes a la isquèmia calenta, secundàries a la vasoconstricció. Probablement la solució de la Universitat de Wisconsin sigui la que ha reportat més avantatges per sobre d'altres líquids de preservació⁽⁸²⁾.

2.4.2.b *Refredament corporal amb circulació extracorpòria (Total body cooling)*

La derivació cardiopulmonar (circulació extracorpòria) és un mètode artificial utilitzat habitualment en cirurgia cardíaca, destinat a mantenir la perfusió i l'oxigenació tissular evitant el sistema fisiològic cardiopulmonar i, bàsicament, consisteix en un circuit tancat en el qual es produeix l'arterialització de la sang venosa. El 1935, Alexis Carrell descriu la supervivència d'òrgans aïllats gràcies a una bomba de circulació. Durant la dècada dels cinquanta es va desenvolupar amb èxit la pràctica clínica de la circulació

extracorpòria, que va permetre les intervencions sobre el cor aturat, mantenint la circulació i l'oxigenació amb un circuit artificial i extern.

A escala fisiopatològica la bomba de derivació cardiopulmonar, en l'*individu viu*, produeix una disminució generalitzada del flux sanguini de diversos òrgans, entre els quals hi ha el fetge⁽⁸³⁻⁸⁵⁾. Actualment es coneixen múltiples factors que influeixen sobre la circulació hepàtica durant la bomba de derivació cardiopulmonar, com ara la hipotèrmia, la hipotensió, la hemodilució, els canvis de l'equilibri acido-bàsic i en els gasos sanguinis.

La hipòxia, la hipercàpnia i l'acidosi metabòlica causen vasoconstricció arterial hepàtica degut a causa d'un estimul simpàtic, mentre que la hipocàpnia disminueix el flux arterial i portal. La hemodilució, que indueix un descens de l'aportament d'oxigen, produeix vasodilatació del territori esplàncnic mentre que a escala hepàtica indueix una dèbil vasoconstricció arterial. La hipotensió secundària a l'hemorràgia causa un descens del flux portal, i hi ha una autoregulació del flux arterial hepàtic que intenta contrarestar aquest descens fins a valors molt baixos de pressió arterial. La hipotèrmia (descensos de temperatura corporal entre 5 i 10°C) té poc efecte sobre el flux arterial i incrementa el flux portal⁽⁸⁶⁻⁸⁹⁾. Aquestes alteracions poden provocar disfuncions com ara la hiperbilirrubinèmia, que s'associa a un augment de la mortalitat postoperatòria⁽⁹⁰⁾ i que és més freqüent en individus amb alteració hepàtica prèvia o insuficiència cardíaca crònica.

De manera semblant, s'afecta la funció renal durant la derivació cardiopulmonar. La hipotèrmia, l'hemodilució i l'hemòlisi, la utilització de fluxos baixos de perfusió, la perfusió no pulsativa i l'activació del complement, poden ser factors lesius de la funció renal i poden arribar a provocar l'aparició d'una insuficiència renal aguda⁽⁹¹⁻⁹⁴⁾.

Aquests efectes deleteris sobre la perfusió dels òrgans, demostrats en el cas de l'aplicació de circulació extracorpòria en individus vius, són clars quan es comparen amb la circulació pulsativa fisiològica secundària al batec cardíac fisiològic. Malgrat això, i ben al contrari, l'aplicació d'una derivació cardiopulmonar en un *donant a cor parat* té altres implicacions. Aquest sistema permet la possibilitat de poder reiniciar una circulació sanguínia en una situació on l'alternativa és la parada circulatòria i la isquèmia consegüent dels òrgans.

A partir d'aquí s'han dissenyat tècniques per a la perfusió dels òrgans de donants a cor parat amb la utilització dels sistemes de derivació cardiopulmonar. En aquest sentit, destaca l'antecedent històric del primer cop que es va emprar la tècnica de circulació extracorpòria amb oxigenació i hipotèrmia, a càrrec de Marchioro, Huntley, Waffel i Startz el 1963⁽⁹⁵⁾. Una primera fase experimental els va animar a iniciar una segona fase d'aplicació clínica, amb resultats dolents, i per això se'n va abandonar l'ús.

Més recentment, el *refredament corporal amb circulació extracorpòria*, s'ha assajat en estudis experimentals animals⁽⁹⁶⁾ com a alternativa a la perfusió *in situ*, i s'han obtingut resultats favorables. Després dels bons resultats obtinguts en la perfusió corporal total mitjançant circulació extracorpòria per a la preservació de cor i pulmó, com també en els

casos d'extracció multiorgànica⁽⁹⁷⁻¹⁰¹⁾, Koyama⁽¹⁰²⁾ i d'altres autors⁽¹⁰³⁻¹⁰⁵⁾ han utilitzat la tècnica del refredament corporal mitjançant derivació cardiopulmonar en donants renals humans a cor parat amb bons resultats.

Entre els factors argumentats per explicar un possible benefici del refredament corporal sobre la perfusió *in situ* destaquen una millor qualitat d'hipotèrmia, induïda de manera més suau i progressiva⁽⁹⁹⁾. Com ja hem comentat prèviament, una pressió de perfusió més elevada s'ha correlacionat amb una millora de la funció renal posttrasplantament^(75,102). La possibilitat de mesurar i controlar la pressió de perfusió és important com a mètode de valoració de la viabilitat dels òrgans. En aquest sentit, el manteniment de més pressió de perfusió amb la bomba de circulació extracorpòria, comparat amb la perfusió *in situ*, proporcionaria una millor perfusió tissular i, consegüentment, millor viabilitat dels òrgans. A més, el descens de la temperatura és més ràpid i efectiu quan les pressions de perfusió són més altes⁽⁷⁵⁾. Finalment, el refredament corporal amb circulació extracorpòria afegeix el benefici de l'oxigenació contínua dels òrgans durant el període de refredament⁽⁹⁷⁾.

D'altre banda, estudis experimentals recents de Hoshino⁽¹⁰⁶⁻¹⁰⁸⁾ plantegen l'obtenció de fetges en aquest tipus de donants mitjançant l'aplicació de tècniques de refredament corporal utilitzant derivació cardiopulmonar, que aportaria oxigenació de manera continuada als òrgans del donant durant tot el procediment i permetria que aquests es recuperessin de l'agressió isquèmica causada per l'ACR precedent.

2.4.2.c Perfusió dels òrgans amb sang normotèrmica

Van der Wijk i col·laboradors van ser els primers a suggerir la millora de la preservació i la viabilitat dels ronyons preservats en fred quan eren sotmesos a períodes de perfusió *ex vivo* amb sang normotèrmica⁽¹⁰⁹⁾. Aquests resultats van ser posteriorment confirmats per altres autors^(110,111). Mayfield⁽¹¹²⁾ va demostrar una millora de la capacitat de controlar l'edema tissular i l'activitat de les bombes iòniques en els ronyons perfosos amb sang, fet que suggeriria una millor integritat de la membrana tissular.

La possibilitat de reiniciar els processos metabòlics i reparar el dany cel·lular és el mecanisme que s'ha postulat com el responsable d'aquesta millora⁽¹¹³⁾. La perfusió amb sang normotèrmica recuperaria els nivells de nucleòtids d'adenina^(114,115,116), i augmentaria els nivells de glutatió reduït⁽¹¹⁴⁾.

2.4.3 Preservació dels òrgans després de l'extracció: emmagatzematge en fred i perfusió contínua pulsativa

Els treballs inicials de Belzer i Najarian el 1966 amb la perfusió contínua dels òrgans amb plasma crioprecipitat van ser dels primers a cridar l'atenció de la importància de la preservació correcta dels òrgans després de l'extracció. Actualment, les tècniques de preservació dels òrgans un cop extrets són dues: emmagatzematge en fred i perfusió contínua pulsativa. La primera, i emprada més correntment, és l'emmagatzematge simple en líquid de preservació fred. La solució de preservació permet, per un costat l'eliminació dels elements formes sanguinis, isoaglutinines i factors de coagulació de l'arbre vascular,

i, per l'altre, i més important, el seu refredament i la reducció al mínim del metabolisme cel·lular. El líquid de preservació ha de permetre minimitzar l'edema cel·lular que apareixerà en aturar-se l'acció de les bombes iòniques, prevenir l'acidosi intracel·lular i l'aparició d'edema intersticial, reduir l'acció dels radicals lliures durant la reperfusió, inhibir l'acció del calci i, finalment, aportar els substrats necessaris per regenerar, en la mesura que sigui possible, els dipòsits d'energia. Amb aquestes intencions s'han dissenyat nombroses formulacions d'aquests líquids, que, amb diversos components, intenten assolir aquests objectius. Els avantatges d'aquest tipus de preservació inclouen la seva senzillesa i la disminució del risc derivat de la manipulació de l'òrgan (embòlia aèria, mala perfusió, etc.).

Recentment, diferents estudis estan tornant el protagonisme a la preservació dels òrgans mitjançant la utilització de màquines de perfusió pulsativa després de l'extracció fins a l'empelt. Aquests estudis han demostrat una millora del funcionalisme renal posttrasplantament en aquells ronyons afectats per dany isquèmic. Aquest tipus de preservació, en oposició a la preservació freda simple, podria reduir les resistències vasculares induïdes per la isquèmia i facilitar l'eliminació de les restes d'eritròcits de la microcirculació, permetent una millor reperfusió postimplantament⁽¹¹⁷⁻¹²⁰⁾. La utilització de la perfusió pulsativa redueix la incidència de disfunció de l'empelt^(119,121). Tanmateix, durant la preservació amb perfusió pulsativa es poden dur a terme mesures de la dinàmica de la perfusió com també mesures bioquímiques que poden correlacionar-se amb la viabilitat de l'empelt^(122,123). Així la mesura del flux, la pressió de perfusió i les resistències vasculares de la perfusió de preservació i la determinació d'LDH i d'alfa-GST en el líquid de perfusió s'han relacionat amb la viabilitat renal dels òrgans preservats d'aquesta forma.

2.4.4 Selecció del receptor i trasplantament

Els procediments que condueixen al trasplantament dels òrgans obtinguts de donants a cor parat, han de procurar eliminar o minimitzar tots els factors que podrien empitjorar la viabilitat d'aquests òrgans, presumiblement reduïda a causa del període d'isquèmia calenta precedent.

La selecció del receptor es pot fer segons la prova d'histocompatibilitat encreuada, evitant-se la realització de la tipificació de l'HLA, amb la qual cosa es pot reduir considerablement el temps de preparació per fer el trasplantament, i aixó permet una considerable reducció del temps d'isquèmia freda.

Tanmateix, cal utilitzar immunosupressors que afectin el mínim possible la funció de l'òrgan. La utilització de petites dosis de ciclosporina^(68,71) o, fins i tot, la seva retirada durant els primers dies posttrasplantament⁽¹²⁴⁾, són algunes de les mesures que es recomanen en aquest sentit.

2.5 ANÀLISI DE LA VIABILITAT DELS ÒRGANS PROCEDENTS DE DONANTS A COR PARAT

És crucial valorar la viabilitat d'aquests òrgans prèviament al trasplantament. El temps estimat d'isquèmia calenta és, clínicament, el paràmetre més important per determinar la viabilitat dels òrgans donants per a trasplantament^(5,113). Cal valorar també l'aspecte macroscòpic de l'òrgan després de la perfusió, i també dur a terme biòpsies per a estudis mitjançant microscòpia òptica. Les determinacions bioquímiques després de la mort ens orientaran ben poc sobre el funcionalisme dels òrgans a causa dels processos de citòlisi (hemòlisi) *post mortem*. La valoració de la creatinina plasmàtica immediatament després de la mort podria reflectir la funció renal prèvia. L'estudi del metabolisme dels nucleòtids d'adenina (NA) està suposant un gran avenç en l'estudi de la viabilitat dels òrgans en aquest camp^(6,7,125-128). Mitjançant aquests estudis s'ha establert la correlació entre la càrrega energètica cel·lular (nivells d'NA) i el funcionalisme posttrasplantament, tant de ronyons com de fetges^(106,107) obtinguts de donants a cor parat.

D'altre banda, s'està estudiant la correlació de paràmetres obtinguts durant la perfusió renal mitjançant la màquina de preservació (flux, resistències vasculars intrarenals, LDH, pH) amb la viabilitat renal posttrasplantament⁽¹²⁹⁾.

Malgrat tot, no hi ha ara per ara cap paràmetre que pugui predir amb certesa la viabilitat dels òrgans procedents dels donants a cor parat. Nombroses línies de recerca hi dediquen esforços per aconseguir aquesta fita.

2.6 ESTAT ACTUAL DEL TRASPLANTAMENT DE RONYÓ PROCEDENT DE DONANT A COR PARAT

El problema més important que sorgeix de la utilització dels ronyons de donants a cor parat és una major incidència de necrosi tubular aguda o retard del funcionament de l'empelt en els receptors d'òrgans obtinguts a cor parat, com també una alta incidència de ronyons amb fallada primària de l'empelt^(70,130,131). En els grups amb més experiència, la incidència de retard del funcionament de l'empelt varia entre un 48 i un 78,4% i la incidència de fallada primària entre un 4 i un 19%^(124,132-138).

L'aparició de rebuig vascular agut associat a la síndrome hemolítica urèmica s'ha observat en alguns casos, sense que s'hagi pogut establir una relació causal^(64,124).

Com ja s'ha esmentat amb anterioritat, la utilització de diversos líquids de preservació^(75,79), amb reductors dels radicals lliures⁽¹⁰⁸⁾, l'escurçament del temps d'isquèmia freda, la utilització de màquines de perfusió per a la preservació durant aquest període⁽¹³⁹⁾, i la utilització de petites dosis de ciclosporina^(68,71,124), són algunes de les mesures que es recomanen per millorar encara més el funcionalisme d'aquests òrgans. En experiments animals, Shirakura i col·laboradors⁽¹⁴⁰⁾ utilitzen vasodilatadors, antitrombocítics, antiarítmics, anticomplement i antiradicals lliures (prostaciclina, propranolol, al·lopurinol, nafamostat mesilat) per a l'obtenció i trasplantament de pàncrees, cor, pulmó i ronyons després de 30 minuts d'isquèmia calenta.

Amb tot això, la viabilitat a llarg termini dels ronyons obtinguts procedents de donants a cor parat és similar a la dels òrgans procedents dels donants en mort encefàlica. La supervivència de l'empelt renal és al voltant del 75% el primer any i del 60% al cap de quatre anys, i són similars en la majoria de les sèries ^(3,68,70,79,124,130,138).

Els donants a cor parat han suposat un increment en el nombre total de donants entre un 7% i un 20% segons les sèries ^(69,72,141,142) i han de ser inclosos com un grup de donants potencials a considerar dins del grup de donants aptes per a trasplantament.

2.7 ESTAT ACTUAL DEL TRASPLANTAMENT DE FETGE PROCEDENT DE DONANT A COR PARAT

El trasplantament hepàtic és avui en dia un procediment àmpliament establert en el tractament de pacients en fase terminal de múltiples malalties hepàtiques. Igual que passa amb el trasplantament renal, i amb el d'altres òrgans, el nombre de fetges necessaris supera amb escreix el nombre d'òrgans disponibles. Això ha fet que recentment alguns equips amb àmplia experiència en el trasplantament hepàtic de donants en mort encefàlica estiguin investigant la manera d'ampliar aquest nombre d'òrgans disponibles. En aquest sentit, la partició del fetge d'un donant per a dos receptors, el trasplantament d'òrgans procedents de donant viu, la utilització clínica dels òrgans dominó, i el trasplantament hepàtic d'òrgans procedents de donant a cor parat són motiu d'estudi per la seva difusió en la pràctica clínica.

En el cas del trasplantament renal, la disfunció inicial o la fallada primària de la funció de l'empelt pot ser temporalment substituïda per la diàlisi, fins que l'òrgan recupera la funció o fins que es practica un altre trasplantament. Al contrari, el trasplantament hepàtic ha d'assegurar la funció immediata de l'empelt, ja que no es disposa actualment de cap teràpia substitutiva. És per això que els estudis estan dirigits, per un costat a valorar la viabilitat del fetge abans del trasplantament i, per l'altre, a millorar-ne la funció, que ha quedat malmesa després de la isquèmia, mitjançant la modificació de les tècniques d'obtenció i preservació dels empelts fins al trasplantament.

D'aquesta manera hi ha estudis que han establert la correlació entre la càrrega energètica cel·lular (nivells d'NA) i el funcionalisme posttrasplantament de fetges^(106,107) obtinguts de donants a cor parat, com un intent de poder predir la viabilitat de l'empelt, o estudis com ara el de Tojimbara⁽¹⁴³⁾ sobre l'efecte de la temperatura del líquid de perfusió en l'empelt hepàtic de rata, amb l'objectiu de millorar-ne la funció. Tanmateix, els treballs de Hoshino⁽¹⁰⁶⁻¹⁰⁸⁾ plantegen l'obtenció de fetges mitjançant l'aplicació de tècniques de refredament corporal utilitzant la derivació cardiopulmonar.

Encara que la major part d'estudis clínics referents a l'aprofitament de fetges procedents de donants a cor parat està en fase experimental, s'han comunicat trasplantaments hepàtics en humans amb bon resultat, quan els temps d'isquèmia calenta han estat curts⁽¹⁴⁴⁻¹⁴⁸⁾.

La utilització clínica dels fetges de donants a cor parat està encara avui en la seva fase de desenvolupament inicial.

2.8 ASPECTES SOCIALS I LEGALS DE LA DONACIÓ D'ÒRGANS DE DONANTS A COR PARAT

Durant la fase inicial de manteniment del flux sanguini dels òrgans se sol·licita el consentiment familiar i judicial, si fos necessari, per al procediment de la donació. Un cop s'han obtingut, el cadàver és conduït a quiròfan on es practica l'extracció dels òrgans. El consentiment familiar adquireix en aquest grup de donants més dificultat pel major dramatisme del moment a causa de l'agudesesa del procés. Els aspectes legals han de seguir el procés habitual similar al dels donants per mort encefàlica. Després del diagnòstic de la mort del donant per aturada cardiorespiratòria que fa l'equip mèdic que va atendre el pacient, s'han de diferenciar dues possibilitats: *a/* en el cas de la mort natural, el certificat mèdic de defunció i el consentiment familiar són suficients per autoritzar l'extracció d'òrgans, i *b/* en el cas de la mort violenta, abans de l'extracció d'òrgans, és necessària l'autorització del jutge i del metge forense, que en permetrà l'extracció.

Recentment ha entrat en vigor el nou Reial Decret sobre donació d'òrgans per a trasplantament (Real Decreto 2070/1999, de 30 de Diciembre)⁽¹⁴⁹⁾. S'hi estableix els requisits legals necessaris per poder procedir a la preservació dels òrgans en el cadàver mort per aturada cardiorespiratòria, com també els procediments medicolegals que cal portar a terme per obtenir l'autorització judicial.

3. HIPÒTESI I OBJECTIUS

3.1 HIPÒTESI

Les tècniques d'obtenció i preservació d'òrgans de donants a cor parat han de permetre la funció correcta d'aquests òrgans trasplantats.

En l'àmbit del trasplantament renal, l'aplicació clínica d'aquestes tècniques augmentarà el nombre d'òrgans disponibles per a trasplantament, amb bona funció de l'empelt. Les noves tècniques de perfusió (refredament corporal i recirculació normotèrmica) haurien de permetre millorar el funcionament d'aquests òrgans i reduir la incidència de disfunció renal primària.

En l'àmbit del trasplantament hepàtic, la utilització de la recirculació normotèrmica hauria de permetre assessorar i predir la funció del fetge posttrasplantament, i la manipulació dels procediments durant aquesta fase hauria de permetre millorar la funció hepàtica posttrasplantament.

3.2 OBJECTIUS

3.2.1 Estudis clínics en trasplantament renal

- Instaurar les tècniques de refredament corporal total i recirculació normotèrmica en l'obtenció i la preservació de ronyons de donants a cor parat.
- Valorar la funció a curt i llarg termini i la supervivència dels empelts renals procedents del donant a cor parat.
- Estudi comparatiu de la funció i supervivència dels empelts renals de donant a cor parat, segons les diferents tècniques de perfusió: perfusió *in situ*, refredament corporal total i recirculació normotèrmica.

3.2.2 Estudis experimentals en trasplantament hepàtic

- Valorar l'efectivitat de la recirculació normotèrmica en l'obtenció de fetges de donants a cor parat.
- Estudiar els paràmetres de perfusió hepàtica (flux sanguini hepàtic i metabolisme d'oxigen hepàtic) com també els paràmetres de circulació extracorpòria (flux de bomba) i valorar-ne la capacitat predictiva de la funció de l'empelt posttrasplantament.
- Estudiar l'efecte de l'addició d'L-arginina (precursor d'òxid nítric) en els paràmetres abans esmentats com també en la funció i viabilitat de l'empelt hepàtic procedent de donants d'òrgans a cor parat.

4. INVESTIGACIÓ I RESULTATS

ESTRUCTURA DELS ESTUDIS

1. Estudis clínics de trasplantament renal de donants a cor parat:

Normothermic Recirculation Reduces Primary Graft Dysfunction of Kidneys Obtained from Non-Heart-Beating Donors.

Valero R, Cabrer C, Oppenheimer F, Trias E, Sánchez-Ibáñez J, De Cabo FM, Navarro A, Paredes D, Alcaraz A, Gutiérrez R, Manyalich M.

Transplant International 2000; (en premsa)

2. Estudis experimentals de trasplantament hepàtic de donants a cor parat:

Hepatic blood flow and oxygen extraction ratio during normothermic recirculation and total body cooling as viability predictors in non-heart-beating donor pigs.

Valero R, García Valdecasas JC, Tabet J, Taurá P, Rull R, Beltrán J, Cifuentes A, García F, González X, García F, López-Boado MA, Cabrer C, Visa J.

Transplantation 1998; 66:170-6.

L-arginine reduces liver and biliary tract damage after liver transplantation from non-heart-beating donor pigs

Valero R, García-Valdecasas JC, Net M, Beltran J, Ordi J, González FX, López-Boado MA, Almenara R, Taurá P, Elena M, Capdevila Ll, Manyalich M, Visa J.

Transplantation 2000 (en premsa).

Recerca clínica en el trasplantament renal de
donants d'òrgans a cor parat

**NORMOTHERMIC RECIRCULATION REDUCES PRIMARY GRAFT
DYSFUNCTION OF KIDNEYS OBTAINED FROM NON-HEART-BEATING
DONORS**

Ricard Valero¹, Catiana Cabrer², Frederic Oppenheimer³, Esteve Trias², Jacinto Sanchez-Ibañez², Francisco M. De Cabo², Aurora Navarro², David Paredes², Antonio Alcaraz³, Rafael Gutierrez³, Martí Manyalich².

Department of Anesthesiology¹, Transplant Coordination² and Urology³. Hospital Clínic de Barcelona.

Address correspondence to:

Ricard Valero, M.D.

Department of Anaesthesiology

Hospital Clínic de Barcelona

Villarroel 170, 08036 Barcelona

e.mail: rvalero@medicina.ub.es

fax: 34 93 2275409

tel: 34 93 2275500

ABSTRACT

Our aim was to analyse the short- and long-term function of kidneys procured from non-heart-beating donors (NHBD) by means of three techniques: *in situ* perfusion (ISP), total body cooling (TBC) and normothermic recirculation (NR).

Fifty seven potential NHBD were included. Mean warm ischemia time was 68.9 ± 35.6 min. Forty four kidneys were obtained from donors perfused with ISP, 8 with TBC and 8 with NR. Eighteen kidneys (32 %) started functioning immediately, 29 (52 %) showed delayed graft function (DGF) and 9 (16 %) showed primary non function (PNF). The actuarial graft survival rate was 76.4% at 1 year and 56% at five years. Patient survival rate was 89.3% at five years. Incidence of DGF and PNF was significantly lower in kidneys perfused with NR than those with ISP or TBC ($p < 0.01$). Duration of DGF was shorter in kidneys obtained through TBC than in kidneys obtained with ISP ($p < 0.05$).

In conclusion, NR reduce the incidence of DGF and may be considered the method of choice for kidney procurement from NHBD.

Key words:

Non-heart-beating donors

Kidney transplantation

Delayed graft function

Normothermic recirculation

INTRODUCTION

Non-heart-beating donors (NHBD) have been widely introduced in the clinical practice and the use of organs, especially kidneys, from this type of donors has been reported in multiple series (7,12,13,15,22,33,37,44,45). At our hospital, a program for identification and procurement of kidney grafts from asystolic donors has been in progress since 1986. The main problem using NHBD kidneys arises from the increased incidence of impaired graft function due to long periods of warm ischemia. High rates of delayed graft function (DGF) and primary graft non-function (PNF) are the main complications in NHBD, in comparison with heart-beating donors. In order to improve this impaired graft function, Banowsky et al. (5) in 1971 and García-Rinaldi et al. (18) in 1975 introduced “in situ” perfusion as a preservation technique for kidney retrieval in NHBD. This perfusion technique is nowadays the most widespread method used to perfuse these organs before their extraction. Nevertheless, high DGF rates have been reported using this technique (13,14,22,33,37,46,48,54).

During the last few years, new techniques have been developed to improve the perfusion and post-transplant viability of organs obtained from NHBD. Total body cooling (TBC) through cardiopulmonary bypass (CPB) is a technique developed to minimise pre-existing ischemic damage, to ensure kidney viability in both the Maastricht category IV (32) and category II (2,50) NHBD.

More recently, “normothermic recirculation” has been described in experimental studies (4,19,25,40,51). This consist of the normothermic perfusion of the organs at 37°C with hyperoxygenated blood by means of a cardiopulmonary bypass, before TBC. As far as we know, there are no references dealing with the use of normothermic recirculation in the clinical setting in kidney transplantation from NHBD. The aim of our study has been

to analyse the clinical results of the normothermic recirculation technique for procurement of kidneys from NHBD in our hospital, as compared to *in situ* perfusion, and TBC.

MATERIAL AND METHODS

The present study was carried out in accordance with the ethical standards set down in the 1964 Declaration of Helsinki and was approved by the ethical committee in our centre.

Donors:

Potential NHBD admitted to the hospital were included in the study. In our series, only II and IV Maastricht NHBD categories (29) were considered. The procedure for non-heart-beating organ procurement begins after death is diagnosed. To consider a dead patient as a potential NHBD, the criteria included, in addition to the general criteria for donor selection, an age under 65 and a warm ischemia time lower than 150 minutes with a period of warm ischemia without cardiopulmonary resuscitation manoeuvres less than 30 minutes. Donor demographic characteristics (gender, age), warm ischemia time, as well as Maastricht categories and cause of death, were recorded. Initially, basic cardiopulmonary resuscitation manoeuvres (cardiac massage and mechanical ventilation at $FiO_2=1$) were set in motion and the donors were heparinized ($3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$). Subsequently, vascular access was attained by surgical dissection and cannulation of the femoral vessels, and a Fogarty catheter was introduced through the other femoral artery to block the diaphragmatic aorta and reduce the perfused territory to the splanchnic area.

Three different perfusion techniques were used along the years:

- "In situ" perfusion was achieved by means of cold perfusion of Collins' solution through a multiperforated catheter in the femoral artery. A catheter was placed into the cava vein through the femoral vein to allow blood drainage. In our early cases, liquid infusion was produced by gravity. In the later cases, a non-pulsatile perfusion pump was

used to maintain a constant Collins' solution perfusion flow of $500 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ until a clear solution through the vein catheter was obtained and then reduced to $200 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. -"Total body cooling" through cardiopulmonary bypass was used in other cases. Cannulation was carried out using a 16-18F cannula for the femoral artery and a 20-24F cannula for the femoral vein and these were then connected to a blood oxygenator (Bard Quantum Oxygenator and Venous reservoir, HF6000-H6770VR,CR Bard Inc®; Haverhill, MA 01832, USA), a heat exchanger (Módulo Normohipotermia Palex S.A., Barcelona, Spain) and a non-pulsatile roller pump (Stöckert-Shiley®, Munich, Germany). The circuit was primed with saline solution 500 ml, mannitol $0,5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ and Hemoce® (saline solution of polygeline) 500 ml. Oesophagic temperature was also monitored (Mon-A-Therm; Mallinckrodt Medical Inc®; St Louis, MO 63134, USA). Bypass was begun with a progressively increasing flow (1 to $2 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$) in an attempt to achieve $2.2 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ body surface. Sodium bicarbonate was added to the circuit to correct metabolic acidosis. TBC continued until the donor reached a core temperature of $15\text{-}20^{\circ}\text{C}$ and was maintained until permissions were obtained; kidney procurement was then performed. The kidneys were then cooled with 1-2 L University of Wisconsin solution perfusion through the aorta and preserved at 4°C until transplantation. As described elsewhere (50), when difficulties in obtaining good venous blood return appeared, TBC was aborted and "in situ" perfusion was started.

-"Normothermic recirculation" through CPB, was the technique used in the later cases. In these cases, extracorporeal circulation was maintained at 37°C , using the same technique above described for TBC. After cannulation of the femoral artery and vein, cannulas were connected to the blood oxygenator, the heat exchanger and the non-pulsatile roller pump. "Normothermic recirculation" was supported at the maximum

pump flow rate for 60 minutes with a progressively increasing flow (1 to 2 L · min⁻¹), in an attempt to achieve 2.2 L · min⁻¹ · m⁻² body surface and the temperature exchanger was set at 37°C to maintain donor temperature. Sodium bicarbonate was added to the circuit to correct metabolic acidosis. After the 60 min period of “normothermic recirculation”, cooling through the extracorporeal circulation was run until the donor reached a core temperature of 15-20°C and was maintained until permissions were obtained and organ extraction was finished. Time needed to reach that temperature depended on the donor size and the blood flow rate maintained during the period.

Recipients:

Kidneys obtained from NHBD were transplanted into blood group-compatible and negative cross-match recipients, in order to reduce cold ischemia time. Immunosuppression therapy varied according to the transplant era. However, most patients were treated with a sequential induction therapy with antithymocyte globuline or OKT3 antibodies, steroids, azathioprine or mycophenolate mophetil and cyclosporine A. Incidence of family or coroner refusal, and clinical contraindications for transplantation were recorded.

Demographic characteristics (age, gender) of the kidney recipients were collected. Delayed graft function was defined as the need for dialysis within the first week post transplantation. Duration of DGF was defined as the interval between the transplantation and the date of the last post-transplantation dialysis. The incidence of PNF kidneys was also recorded. Days necessary to recover plasmatic creatinine values inferior to 3 mg·dl⁻¹ were also registered. Finally, graft and patient survival analysis was made.

A comparative analysis was made of the results of kidneys function following the technique used for organ preservation (in situ perfusion, TBC and normothermic recirculation).

Statistical analysis was carried out according to Student's t test and ANOVA for the analysis of quantitative variables and Chi square and Fisher's exact probability test were used for the analysis of qualitative variables. Results are expressed as mean and standard deviation (SD). Graft and patient survival were analysed by means of the Kaplan Meier method and Logrank for comparison of survival curves. We considered a value of $p < 0.05$ to be statistically significant.

RESULTS

Donors:

Between October 1986 and March 1999, 57 potential NHBD were included in our study. Demographic characteristics, Maastricht categories, and death etiology of donors are described in table 1.

Age (years)	39.5 ± 15.6	
Gender (male/female)	43 / 14	
Maastricht categories (I-II-III-IV) ¹	0 - 51 - 0 - 6	
In situ	0 - 31 - 0 - 6	
Total body cooling	0 - 11 - 0 - 0	
Normothermic recirculation	0 - 6 - 0 - 0	
Etiology of death:		
Cardiac disease	23	40 %
Multiple trauma	21	37 %
Stroke	4	7 %
Anoxia	2	3 %
Isolated cranial trauma	3	5 %
Other	4	7%

TABLE 1: Demographic characteristics, Maastricht categories (according to the perfusion technique), and death etiology of non-heart-beating donors in our series. Results are expressed as mean ± standard deviation, and as the number of cases and percentage.

¹ In three cases the procedure was aborted before any perfusion procedure was started.

Mean warm ischemia time was 68.9 ± 35.6 minutes, with a mean period of warm ischemia without effective cardiopulmonary resuscitation manoeuvres of 6 ± 7 minutes. The procedure was aborted due to family refusal in 9 cases (15 %), and due to coroner refusal in 2 cases (3 %). Sixteen donors (27 %) were rejected due to a clinical contraindication, either for deficient donor perfusion technique (9 cases; 16 %), deficient organ perfusion noticed during organ explantation (2 cases; 3 %) or a positive virus serology or other risk factor for disease transmission (5 cases; 9 %).

Perfusion was achieved by means of *in situ* perfusion with cold Collins' solution by gravity in 29 cases (51 %), and *in situ* perfusion was achieved by means of a non-pulsatile pump in 8 cases (14%). TBC was performed in 11 cases (17%) but in 3 cases, due to a limited venous blood return, TBC was aborted and *in situ* perfusion by gravity was started. In the remaining 6 donors (11 %), normothermic recirculation technique was used. In 3 cases procedure was aborted before any perfusion procedure was started. In the end, 30 donors could be used. Forty four kidneys were obtained from donors perfused with *in situ* perfusion. Two kidneys were not transplanted due to intraoperative recipient problems, and two were transplanted in other centre, and not subsequently followed up. Eight kidneys were obtained from donors perfused with TBC technique and 8 from donors with normothermic recirculation.

Recipients and grafts:

The kidney recipients' mean age was 44.2 ± 16.5 years old. Thirty six were male and 20 female. Eighteen kidneys (32 %) started functioning immediately, 29 (52 %) showed DGF and 9 (16 %) never functioned. Mean duration of delayed graft function was 20.1 ± 14.6 days.

The actuarial graft survival rate was 76.4% at 1 year and 56% at five years. Graft survival rate is shown in figure 1. Patient survival rate was 90% at one year and 89.3% at five years.

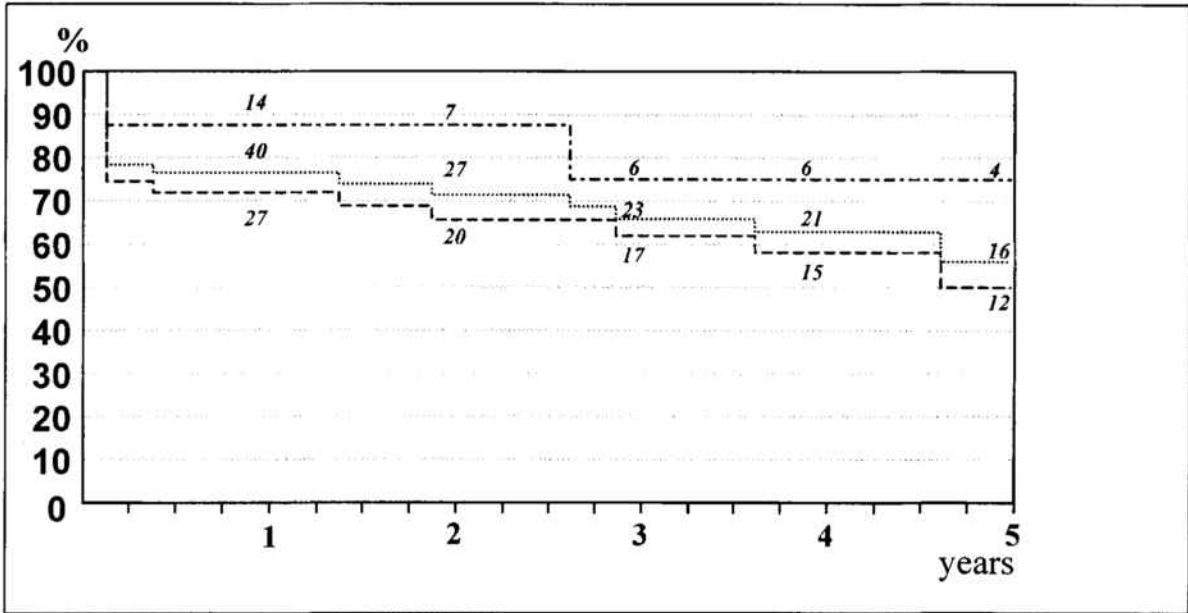


FIGURE 1.- Actuarial graft survival rate of kidneys transplanted from non-heart-beating donors in our series, according to the technique used: in situ perfusion technique and techniques using cardiopulmonary bypass (CPB) (including total body cooling and normothermic recirculation). Values on each line: Number of grafts at risk for each technique (at one to five year-period).

(In situ: ----- CPB: ----- Overall:.....).

Kidney function was analysed according to the organ perfusion technique used in the organ procurement. No differences were found in age, sex, HLA matching, cold ischemia time or immunosuppression therapy between the three groups (Table 2).

	In situ	Total body cooling	Normothermic recirculation
Donor's cause of death:			
PLT / Non PLT	9 / 13 ¹	1 / 3	0 / 4
Cold ischemia time (hours)	18.5 ± 6.2	15.3 ± 4.6	17.8 ± 6.7
Warm ischemia time (minutes)	58 ± 41 ¹	81 ± 15	82 ± 11
Recipients age (years)	36.7 ± 16.4	36 ± 5.9	46.7 ± 8.1
Recipients sex (M / F)	26 / 14	3 / 5	7 / 1
HLA-A,B,DR matching	1.9 ± 1.3	1.6 ± 1.1	1.3 ± 1.6

TABLE 2: Donor's cause of death, cold and warm ischemia time, recipients characteristics and HLA-A,B,DR matching according to the perfusion technique used for organ procurement. Values expressed as mean and standard deviation, and as the number of cases. (M= male; F= female; PLT = politraumatism). ¹ : p=0.02 compared to other groups.

The percentage of polytraumatic patients in the *in situ* group was statistically higher than in the other two groups (p=0.02). Warm ischemia time was significantly lower in the *in situ* group compared to the other groups (p=0.02) (Table 2). Incidence of DGF and PNF kidneys, according to the organ perfusion technique used, are shown in table 3.

	In situ	Total body cooling	Normothermic recirculation
Total transplanted kidneys	40	8	8
Immediate functioning kidneys	9 (22.5%)	2 (25%)	7 (87.5%) ¹
Delayed graft functioning kidneys	22 (55%)	6 (75%)	1 (12.5%) ¹
Primary non functioning kidneys	9 (22.5%)	0	0
Duration of delayed graft function (days)	22.3 ± 16.1	3.4 ± 4.4 ²	7
Days before plasmatic creatinine < 3 mg · dl ⁻¹	46.5 ± 66.7	29.1 ± 6.9	13.4 ± 7.8 ¹

TABLE 3: Kidney function according to the perfusion technique used for non-heart-beating donors organ procurement. Values expressed as number and percentage of kidneys with respect to the technique group, or mean and standard deviation.

¹ $p < 0.05$ compared to other groups; ² $p < 0.05$ compared to *in situ* group

Incidence of DGF and PNF was significantly lower in kidneys perfused with normothermic recirculation than in those perfused with *in situ* perfusion ($p=0.0003$) or TBC ($p=0.04$). The incidence of DGF and PNF was not significantly different in kidneys perfused with TBC compared with those perfused with *in situ* perfusion. However, the duration of DGF was significantly shorter in kidneys obtained through TBC than kidneys obtained with *in situ* perfusion ($p < 0.05$). Serum creatinine levels lower than 3 mg·dL⁻¹ were achieved in fewer days in the normothermic recirculation group than in the others, being these differences being statistically significant ($p=0.029$).

The graft survival rate was separately analysed, according to the perfusion technique, but no statistical differences were found (figure 1).

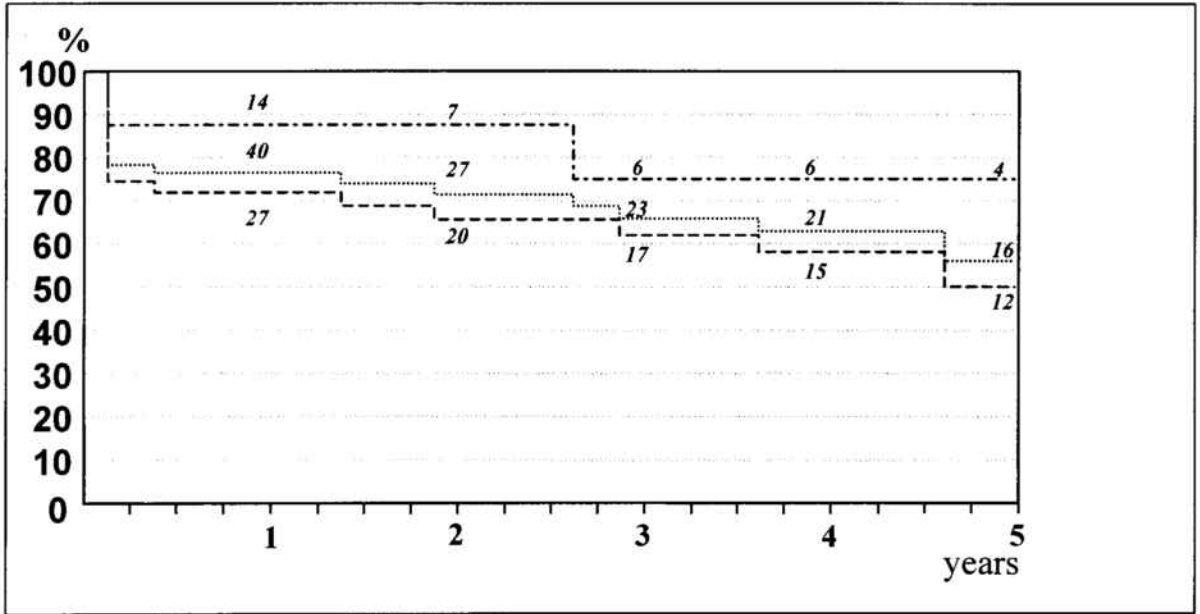


FIGURE 1.- Actuarial graft survival rate of kidneys transplanted from non-heart-beating donors in our series, according to the technique used: in situ perfusion technique and techniques using cardiopulmonary bypass (CPB) (including total body cooling and normothermic recirculation). Values on each line: Number of grafts at risk for each technique (at one to five year-period).

(In situ: ----- CPB: Overall:.....).

DISCUSSION

The main handicap of NHBD kidneys as opposed to heart-beating donors lies in the high incidence of DGF and a high percentage of never functioning grafts, which has been widely documented. In the most experienced groups, DGF varies from 48 to 78,4% and PNF kidneys from 4 to 19% (13,14,22,33,37,46,48,54). Our overall results, with a DGF rate of 52 % and PNF rate of 16 %, are very similar to the above data. DGF not only increases the duration of hospital admission but has been related to an impairment of the long-term graft function (11,41). Ojo et al found a significant and robust relationship between DGF and decreased cadaveric renal function, DGF being an independent risk factor for long and short-term graft survival. Some other authors (48,49,53), however, have failed to find a relationship between DGF and long term survival, acute graft rejection being the only risk factor identified.

Different techniques of organ perfusion and preservation before and after graft extraction have been developed. The use of the pulsatile perfusion preservation reduces the incidence of DGF (8,23), and it has been described as an useful test for considering whether a kidney is suitable for transplantation (28,36). As regard organ perfusion in the cadaver, different perfusion techniques have been developed. Several modifications of *in situ* perfusion technique have been introduced to improve viability results: various types of catheters (3,34), different types of perfusion liquid (9,26,44), or the addition of drugs, such as trifluoroperazine (3), tolazoline (27) or phentolamine (7), to the perfusate. However, the results with the use of this technique are far from optimum. Although PNF was slightly higher in our series (22.5%), the DGF rate (55%) and graft survival (71,8% at one year and 50% at five years) in kidneys harvested through *in situ* perfusion was similar to other groups.

Other techniques, such as intraperitoneal surface cooling (3,33,42) and isolated mechanical ventilation combined with cardiac massage until organ extraction (20) have also been used with the same purpose.

After the favourable results obtained with the total body perfusion through extracorporeal circulation in the preservation of the heart and lungs, and in cases of multiorgan extraction (6,10), several groups have used the technique of TBC through CPB in non-heart-beating human donors with good results, either for procurement of kidneys (2,32,50), livers (24,31) or other organs (16). Between 1990 and 1996 we have used a portable CPB device for TBC to improve kidney viability. With this technique we were not able to reduce the rate of DGF, compared to *in situ* perfusion kidneys, but we could significantly reduce the delay in the recovery of graft function from 22.3 ± 16.1 days in the *in situ* group to 13.4 ± 4.4 days in the TBC group. Moreover, all kidneys functioned in this group, compared to 9 out of 40 kidneys which never functioned in the *in situ* group. Better quality hypothermia, induced progressively and smoothly, compared with simple perfusion, has been hypothesised as the main factor for improving viability (10). Higher pressure perfusion of the preservation liquid has been related to an improvement in post-transplant renal function (30), since low perfusion pressure would cause an increase in the renal vascular resistance, and thereby a reduction in renal flow and inadequate hypothermia (3). Moreover, temperature decrease is more rapid and effective when perfusion pressure is over 70 mmHg (3). Besides these factors, TBC provides the additional benefit of continuously oxygenating the organs during the cooling period (24).

Normothermic recirculation has shown the best results in our series, reducing DGF and improving viability. All organs perfused with this technique are functioning, and DGF

only appeared in 1 out of 8 kidneys transplanted. This dramatic reduction in the DGF rate can be explained by various reasons: firstly, blood has been shown to be a better preservation solution than crystalloids for recovering from tissue damage (24,35,38,43,52). In previous studies, Van der Wijk et al (52) improved preservation and viability of three-day cold preserved kidneys by means of an ex vivo organ perfusion with normothermic blood for 3-4 hours. These results were confirmed by other authors (17,35). Mayfield et al (38) demonstrated an improvement in the capacity of the blood perfused kidneys to control tissue oedema and ion pump activity, suggesting better membrane integrity than in kidneys not preserved with this technique. Since cell metabolism decreases rapidly at temperatures below 37°C, Schon et al, in an experimental study with ex-vivo perfused pig livers, postulates that normothermic oxygenated perfusion after extraction could offers the possibility of restoring metabolic processes and repairing damaged cells, thus resuscitating ischemically injured livers (47). Some other experimental studies in liver and kidney transplantation have demonstrated the utility of normothermic recirculation to recover adenine nucleotide levels after warm ischemia (4,21,25,40), to increase reduced glutathione levels in both the liver and the kidney before cold storage (4) and to improve post transplant viability (19,25,51). In this way, Rijkmans et al state that it is possible to prevent irreversible damage through normothermic blood perfusion (43). Accordingly to these studies, we have found a clear improvement in graft function when there was a period of normothermic recirculation during organ procurement.

The results of our study, however, must be carefully analysed since some limitations are clear. Donors' groups were not randomly distributed. The choice of the perfusion technique, has evolved over the years in our hospital. *In situ* perfusion was the only

technique used from 1986 to 1989, TBC was incorporated from 1990 to 1996 and, lastly, normothermic recirculation has been used from 1997 till now. Other factors influenced the choice of the technique: *in situ* perfusion was the only technique used in the IV-Maastrich category-NHBD. This factor would enhance the results in this group since “controlled” NHBD have shown better results than “non controlled” NHBD (12). On the other hand, when difficulties in obtaining good venous blood return appeared, TBC was aborted and *in situ* perfusion was started. For this reason, since 1995, we have not used neither TBC nor normothermic recirculation when the cause of death was a polytraumatism. The higher number of polytraumatism in the *in situ* group could alter the results. In spite of this, there are authors who obtain similar or even better rates of graft function and graft survival in kidneys harvested from non-heart-beating trauma donors (1,13).

In situ perfusion requires a high volume of perfusate, at least initially, to perfuse the organs and wash out the deleterious blood constituents. For this reason, Collins’ solution was used for this purpose in our series. In contrast, University of Wisconsin solution was used to wash out the organs prior to cold storage when TBC or normothermic recirculation were used. This difference could affect the results since several authors (9,26,44) have pointed out the benefits of Wisconsin solution over Collins solution.

Finally, the small number of patients, especially in the groups using CPB could also explain the lack of differences in survival rate between the groups (in spite of statistical differences which appeared in the comparison of the DGF rate).

An ethical concern exist about when death may be pronounced. Although there is no universal consensus about how long heart has to be stopped to assure the death of the

brain and about when cardiac function has been “irreversibly” lost, the “ten-minute rule” has been widely accepted. According to the “Maastricht recommendations” the diagnosis of death in our NHBD series was made by physicians independent of the procurement team. On the other hand, category III NHBD, where statement of death is quite more difficult, are not permitted in Spain, so none of these donors were included in our series.

In conclusion, kidneys obtained through normothermic recirculation, showed a lower degree of DGF, a zero incidence of PNF kidneys and a trend towards an improvement in long-term survival. Consequently, extracorporeal circulation with a period of normothermic recirculation may be the method of choice for the procurement of organs from NHBD, although further studies have to be performed to validate our results.

REFERENCES

- 1.-Alvarez J, Del Barrio R, Martín M, Rodríguez G, Blesa AL, Ramos J, Nieto M and Martin-Santos F (1997) Factors Influencing Short and long term survival of kidneys transplanted from non heart beating donors. *Transplant Proc* 29:3490
- 2.- Alvarez-Rodriguez J, Del Barrio-Yesa R, Torrente-Sierra J, Prats-Sanchez MD, Barrientos Guzman A (1995) Posttransplant long term outcome of kidneys obtained from asystolic donors maintained under extracorporeal cardiopulmonary bypass. *Transplant Proc* 27(5):2903-2905
- 3.-Anaise D, Yland MJ, Waltzer WC, Frischer Z, Hurley S, Eychmuller S and Rapaport FT (1988) Flush Pressure requirements for optimal cadaveric donor Kidney preservation. *Transplant Proc* 20(5):891-894
- 4.-Arias-Diaz J, Alvarez J, Gomez M, Del Barrio R, García-Carreras C, Gonzalez P, and Balibrea JL (1997) Changes in adenine nucleotides and lipid hydroperoxides during normothermic cardiopulmonary bypass in a porcine model of type II non-heart-beating donor. *Transplant Proc* 29:3486-3487
- 5.- Banowsky LH, Sullivan M, Moorehouse J (1971) In mortuo renal perfusion for cadaver kidney preservation. *Investigative Urology* 9(3):199-205
- 6.- Baumgartner WA, Williams GM, Fraser CD, Cameron DE, Gardner TJ, Burdick JF, Augustine S, Gaul PD, Reitz BA (1989) Cardiopulmonary bypass with profound hypothermia. *Transplantation* 47:123-127
- 7.-Booster MH, Wijnen RMH, Ming Y, Vroemen JPAM, Kootstra G (1993) In situ perfusion of kidneys from non-heart beating donors: The Maastricht protocol. *Transplant Proc* 25: 1503-1504.
- 8.- Booster MH, Yin M, Stubenitsky BM, Kemerink GJ, Van Kroonenburgh MJPG, Heidendal GAK, Halders SGEA, Heineman E, Buurman WA, Wijnen RMH, Tiebosch ATM, Bonke H, Kootstra G (1993) Beneficial effect of machine perfusion on the preservation of renal microcirculatory integrity in ischemically damaged kidneys. *Transplant Proc* 25: 3012-3016
- 9.-Booster MH, Van der Vusse GJ, Wijnen MH, Yin M, Stubenitsky BM, Kootstra G (1994) University of Wisconsin solution is superior to histidine tryptophan ketoglutarate for preservation of ischemically damaged kidneys. *Transplantation* 58:979-984

- 10.-Cachera JP, Loisanca DY, Tavolaro O, Aubry Ph, Rosanval O (1986) Hypothermic perfusion of the whole cadaver: a response to the question of multiple-organ procurement. *Transplant Proc* 18:1407-1409
- 11.-Canafax DM, Torres A, Fryd DS, Heil JE, Strand MH, Ascher NL, Payne WD, Sutherland DER, Simmons RL, Najarian JS (1986) The effect of delayed function on recipients of cadaver renal allografts. *Transplantation* 41:177-181
- 12.-Casavilla A, Ramirez R, Shapiro R, Nghiem D, Miracle K, Fung JJ and Starzl TE (1995) Liver and kidney transplantation from non-heart beating donors: the Pittsburgh experience. *Transplant Proc* 27:710-712
- 13.- Cho YW, Terasaki PI, Cecka JM, Gjertson DW (1998) Transplantation of kidneys from donors whose hearts have stopped beating. *N Engl J Med* 338 (4):221-225
- 14.-Daemen JH, De Vries B, Oomen AP, De Meester J, Kootstra G (1997) Effect of machine perfusion preservation on delayed graft function in non-heart beating donor kidneys-early results. *Trasplant Int* 10(4):317-322
- 15.- D'Alessandro A, Hoffmann RM, Knechtle SJ, Eckhoff DE, Love RB, Kalayoglu M, Sollinger HW, and Belzer FO (1995) Successful extrarenal transplantation from non-heart-beating donors. *Transplantation* 59(7): 977-982
- 16.- Fukushima N, Shirakura R, Chang J, Izutani H, Inoue M, Yamaguchi T, Kobayashi Y, Yoshitatsu M, Ahamet I, Saito S, and Matsuda H (1998) Successful multiorgan transplants from non-heart-beating donors using percutaneous cardiopulmonary support. *Tranplant Proc* 30: 3783-3784
- 17.- Gaber AO, Yang HC, Haag BW, Buckingham FC, Lloyd DM, Thistlethwaite JR, Stuart FP (1987) Intermediate normothermic hemoperfusion doubles safe cold preservation of rat kidneys. *Transplant Proc* 19: 1369-1371
- 18.- García-Rinaldi R, Lefrak EA, Defore WW, Feldman L, Noon GP, Jachimczyk JA, Debakey ME (1975) In situ preservation of cadaver Kidneys for transplantation: Laboratory observations and clinical application. *Ann Surg* 182(5):576-584
- 19.- García Valdecasas JC, Tabet J, Valero R, Taurà P, Rull R, García F, Montserrat E, González FX, Ordi J, Beltran J, López-Boado MA, Deulofeu R, Angás J, Cifuentes A, Visa J (1998) Liver conditioning after cardiac arrest: the use of normothermic recirculation in an experimental animal model. *Transplant Int* 11:424-432

- 20.-Gómez M, García-Buitrón JM, Fernadez-Garcia A, Vilela D, Fernández-Sells C, Corbal R, Fraguera J, Suárez F, Otero A, Alvarez J, Mánez R (1997) Liver transplantation with organs from non-heart-beating donors. *Transplant Proc* 29:3478-3479
- 21.-Gonzalez FX, García Valdecasas JC, López Boado MA, Tabet J, Net M, Grande L, Cifuentes A, Rull R, Valero R, Beltrán J, Elena M, Cabrer C, Palacín J, and Visa J (1997) Adenine nucleotide liver tissue concentrations from non-heart-beating donor pigs and organ viability after liver transplantation. *Transplant Proc* 29:3480-3481
- 22.- Gonzalez-Segura C; Castela AM; Torras J; Moreso F; Riera L; Lopez-Costea MA; Pascual M; Grinyo JM; Alsina J (1998) A good alternative to reduce kidney shortage. Kidneys from nonheartbeating donors. *Transplantation* 65: 1465-1470
- 23.-Henry ML (1997) Pulsatile preservation in renal transplantation. *Transplant Proc* 29:3575-3576
- 24.-Hoshino T, Maley WR, Stump KC, Tuttle TM, Burdick JF, Williams GM (1987) Evaluation of core cooling technique for liver and kidney procurement. *Transplant Proc* 19(5):4123-4128
- 25.- Hoshino T, Koyama I, Taguchi Y, Kazui M, Neya K, Omoto R (1994) A new method for safe liver transplantation from non heart beating donors: In situ liver oxygenation by cardiopulmonary bypass. *Proceedings of World congress of the transplantation society. Kyoto. Japan: 280*
- 26.- Ishibashi M, Kokado Y, Takahara S, Okuyama A, Kurita T, Amemiya H, Sagawa S, Kishimoto T, Nagano S, Okajima E, Ohkawa T, Ikoma f, Isurugi K, and Sonoda T (1994) Randomized Multicenter study for comparison of university of Wisconsin solution vs Euro-collins solution on early renal allograft function in the non-heart-beating cadaver donor. *Transplant Proc* 26 (4):2405-2408
- 27.-Kaneko H, Schweizer RT (1989) Venous flushing with vasodilators aids recovery of vasoconstricted and warm ischemic injured pig kidneys. *Transplant Proc* 21: 1233-1235
- 28.- Kievit JK, Nederstigt AP, Oomen APA, Rizvi SAH, Naqvi A, Thiel G, De Meester J, Kooststra G (1998) Outcome of machine-perfused non heart beating donor kidneys, not allocated within the Eurotransplant area. *Transplant Int* 11 (suppl 1): S421-423
- 29.-Kootstra G, Daemen JHC, Oomen APA (1995) Categories of non-heart beating donors. *Transplant Proc* 27: 2893-2895

- 30.-Koyama I, Hoshino T, Nagashima N, Adachi H, Ueda K, Omoto R (1989) A new approach to kidney procurement from non-heart-beating donors: core cooling on cardiopulmonary bypass. *Transplant Proc* 21(1):1203-1205
- 31.-Koyama I, Ogawa N, Watanabe T, Taguchi Y, Asami H, Nagashima N, Shinozuka N, and Omoto R (1996) Utilization of warm ischemic livers from non-heart-beating donors by portable cardiopulmonary bypass and heterotopic transplantation. *Transplant Proc* 28:1878-1879
- 32.- Koyama I, Shinozuka N, Watanabe T, Ogawa N, Nagashima N, Asami H, Ozaki S, Adachi R and Omoto R (1997) Utilization of kidneys from non-heart-beating donors by portable cardiopulmonary bypass. *Transplant Proc* 29:3550-3551
- 33.- Light JA, Kowalski AE, Sasaki TM, Barhyte DY, Ritchie WO, Gage F, and Harviel JD (1997) A rapid organ recovery program from non-herat beating donors. *Transplant Proc* 29:3553-3556
- 34.-Lloveras J, Puig JM, Cerdà M, Rico N, Mir M, Rovira A, Munné A, Quintana S, Aubia J, Masramon J (1993) Optimization of in situ renal perfusion of non-heart-beating donors: Four-lumen catheter developed for continuous perfusion pressure determination. *Transplant Proc* 25: 3169-3170
- 35.- Maessen JG, Van der Vusse GJ, Vork M, Kooststra G (1989) The beneficial effect of intermediate normothermic perfusion during cold storage of ischemically injured kidneys. *Transplantation* 47 (3): 409-414
- 36.- Matsuno N, Sakurai E, Tamaki, Furuhashi K, Saito A, Zhang S, Kozaki K, Shimada A, Miyamoto K, and Kozaki M (1994) Effectiveness of machine perfusion preservation as a viability determination method for kidneys procured from non-heart-beating-donors. *Transplant Proc* 26(4):2421-2422
- 37.- Matsuno N, Sakurai E, Kubota K, Kozaki K, Uchiyama M, Nemoto T, Degawa H, Kozaki M, Nagao T (1997) Evaluation of the factors related to early function in 90 kidneys tranplants from non.-heart beating donors. *Transplant Proc* 29:3569-3570
- 38.-Mayfield KB, Ametani M, Southard JH, Belzer FO (1987) Mechanism of action of ex vivo blood rescue in six-day preserved kidneys. *Transplant Proc* 19(1):1367-1368
- 39.- Net M, García Valdecasas JC, Deulofeu R, Gonzalez X, Palacín J, Almenara R, Valero R, López-Boado MA, Angàs J, Elena M, Ballesta AM, and Visa J (1999) S-

- adenosyl l-methionine effect on hepatic allografts procured from non heart beating donor pigs. *Transplant Proc* 31:1063-1064
- 40.- Ohkohchi N, Tsukamoto S, Endoh T, Fukumori T, Susumu S (1999) Can we transplant a liver graft from an agonal non heart beating donor? (Evaluation of effectiveness of graft conditioning by an artificial heart and lung machine and drugs on graft injury). *Organs and Tissues* 1:23-30
- 41.- Ojo AO, Wolfe RA, Held PJ, Port FK, and Schmouder RL (1997) Delayed graft function: Risk factors and implications for renal allograft survival. *Transplantation* 63:968-974
- 42.- Paprocki S, Kruk R, Erturk E, Cerilli J (1992) A technique for successful transplantation of organs from non-heartbeating cadaver donors. *Transplantation* 54: 381-383
- 43.- Rijkmans BG, Buurman WA, Koostra G (1984) Six day canine kidney preservation. *Transplantation* 37(2): 130-134
- 44.- Sakagami K, Takasu S, Kawamura T, Saito S, Haisa M, Oiwa T, Kurozumi Y, Hasuoka H, Inagaki M, Niguma T, Shiozaki S, Tanaka S, Orita K (1990) A comparison of university of wisconsin and euro-collins' solutions for simple cold storage in non-heart-beating cadaveric kidney transplantation. *Transplantation* 49:824-826
- 45.- Schlumpf R, Candinas D, Zollinger A, Keusch G, Retsch M, Decurtins M, and Largiadèr F (1992) Kidney procurement from non-heartbeating donors: transplantation results. *Transplant Int* 5 (suppl 1): S424-S428
- 46.- Schlumpf R, Candinas D, Weder W, Röthlin M, Zollinger A, Bleisch, J, Retsch M, and Largiadèr F (1993) Acute vascular rejection with hemolytic uremic syndrome in kidneys from non-heart-beating donors: associated with secondary grafts and early cyclosporina treatment. *Transplant Proc* 25:1518-1521
- 47.- Schon MR, Hunt CJ, Pegg David E, Wight DG (1993) The possibility of resuscitating livers after warm ischemic injury. *Transplantation* 56 (1):24-31
- 48.- Tanabe K; Oshima T; Tokumoto T; Ishikawa N; Kanematsu A; Shinmura H; Koga S; Fuchinoue S; Takahashi K; Toma H (1998) Long term renal function in non heart beating donor kidney transplantation. *Transplantation* 66(12): 1708-1713

- 49.- Troppmann C, Gillingham KJ, Benedetti E, Almond PS, Gruessner RWG, Najarian JS, Matas AJ (1995) Delayed graft function, acute rejection, and outcome after cadaver renal transplantation. *Transplantation* 59:962-968
- 50.- Valero R, Sanchez J, Cabrer C, Salvador L, Oppenheimer F, Manyalich M (1995) Organ procurement from non-heart-beating donors through in situ perfusion or total body cooling. *Transplant Proc* 27:2899-2900
- 51.- Valero R, García Valdecasas JC, Tabet J, Taurà P, Rull R, Beltrán J, García F, González FX, López-Boado MA, Cabrer C, and Visa J (1998) Hepatic blood flow and oxygen extraction ratio during normothermic recirculation and total body cooling as viability predictors in non heart beating donor pigs. *Transplantation* 66 (2):170-176
- 52.- Wijk J van der, Sloof MJ, Rijkmans BG, Kootstra G (1980) Successful 96- and 144-hour experimental kidney preservation: a combination of standard machine preservation and newly developed normothermic ex vivo perfusion. *Cryobiology* 17(5):473-477
- 53.- Wijnen RMH, Booster MH, Stubenitsky BM, de Boer J, Hrinrmsn R, Kootstra G (1995) Outcome of transplantation of non-heart-beating donor kidneys. *Lancet*, 346:53
- 54.- Wijnen RMH, Booster MH, Nieman FHM, Daemen JHC, Heineman E, Kootstra G (1995) Retrospective analysis of the outcome of transplantation of non-heart beating donor kidneys. *Transplant Proc* 27(5):2945-2946

Transplant International

Official Journal
of the European Society
for Organ Transplantation

Ricard Valero, M.D.
Department of Anaesthesiology
Hospital Clínic de Barcelona
Villarroel 170
E-08036 Barcelona
Spain

Editor-in-Chief
Prof. Dr. Ferdinand Mühlbacher
Vienna Transplantation Center
Department of Surgery
Ebene 9.D5.18
Währinger Gürtel 18-20
A-1090 Vienna
Austria
Telefax +43 1 40400 6767
e-mail: transplant.int@akh-wien.ac.at

MT-April 17, 2000

Editorial No.: revised 1705
Author(s): R. Valero et al.
Title: Normothermic recirculation reduces primary graft dysfunction of kidneys obtained from non-heart-beating donors

Dear Colleague,

Thank you for the revised version of your manuscript. I am satisfied with the revision and have decided to accept it for publication. The paper will be edited and sent to the publisher in Heidelberg. After it has been typeset, page proofs will be sent to you for correction.

We expect the paper to be published in one of the upcoming numbers of *Transplant International*, due out this summer.

Sincerely yours,



for Prof. Dr. F. Mühlbacher
Editor-in-Chief



Springer

Recerca experimental en el trasplantament hepàtic
de donants d'òrgans a cor parat

HEPATIC BLOOD FLOW AND OXYGEN EXTRACTION RATIO DURING NORMOTHERMIC RECIRCULATION AND TOTAL BODY COOLING AS VIABILITY PREDICTORS IN NON-HEART-BEATING DONOR PIGS¹

RICARD VALERO,² JUAN C. GARCÍA-VALDECASAS, JEANINE TABET, PILAR TAURÁ, RAMÓN RULL, JOAN BELTRAN, FÉLIX GARCÍA, FRANCISCO X. GONZÁLEZ, MIGUEL A. LÓPEZ-BOADO, CATIANA CABRER, AND JOSEP VISA

Departments of Anesthesiology, Surgery, and Transplant Coordination, Hospital Clinic of Barcelona, and Department of Surgery, School of Veterinary, University of Barcelona, Barcelona, Spain

Background. Our aim was to evaluate the hepatic blood flows and oxygen metabolism of non-heart-beating donor (NHBD) pigs, with the use of cardiopulmonary bypass (CPB) and normothermic recirculation (NR) before total body cooling, and its relationship with recipient survival.

Methods. Thirty-five pigs were transplanted with an allograft from NHBDs. After warm ischemia (WI) time (20, 30, or 40 min), CPB and NR were run for 30 min. After this period, the animals were cooled to 15°C. In the control group (20 min of WI), the period of NR was excluded. Liver procurement was then performed.

Results. Survival rate was 100% in the 20WI, 70% in the 30WI, and 50% in the 40WI. Control group survival rate was 0%. Hepatic artery blood flow and portal blood flow recovered during NR. Pump blood flow during CPB increased rapidly during NR and was significantly higher in the 20WI. When donors of the livers transplanted in "surviving pigs" (DSP) were compared with donors of the livers transplanted in "nonsurviving pigs" (DNSP), hepatic artery blood flow, portal blood flow, and pump blood flow were higher in the DSP. Hepatic oxygen extraction ratio increased in the three groups with respect to baseline values. Hepatic oxygen extraction ratio was lower in the 20WI than in the other groups and was lower in the DSP than in the DNSP.

Conclusions. The use of a NR period before total body cooling improves survival of liver transplantation in NHBDs. Portal blood flow and pump blood flow measurements can predict the viability of the grafts.

Non-heart-beating donors (NHBDs*) have been considered as a potential source of organs for clinical transplantation (1-8) and different methods to procure the organs from these donors have been described. "Total body cooling" (TBC) through cardiopulmonary bypass (CPB), as a method of pro-

curement of kidneys from NHBDs, based on a shortened warm ischemia (WI) time to minimize ischemic damage, has demonstrated its effectiveness in the procurement of organs viable for transplantation (9, 10). With this method, first described by Koyama et al. (11), the body temperature is reduced steadily but quickly, also giving enough time to obtain harvesting permission. Kidneys obtained by this method seemed to be of better quality with a reduced incidence of acute tubular necrosis.

As a result of the fact that the demand for liver donors continues to exceed supply, the interest in the use of NHBDs has been increasing over time. However, up to now, the experience in liver transplantation with this type of donor has been limited and has only been considered in donors for whom the time of cardiac arrest is known and determined within several minutes (12, 13). This is mainly a result of the lack of knowledge about reversibility of the histological damage and because liver function remains unpredictable after transplantation. Thus, the consequences of transplanting a liver that is unable to provide immediate life support are unacceptable.

TBC may ameliorate the damage caused by cardiac arrest, presumably a result of the continuous oxygenation of donor livers by CPB throughout procurement (14, 15). Recently, it has been suggested that "extracorporeal circulation with cardiopulmonary bypass and tissue oxygenation at 37°C" during a period of time before TBC, may improve this compromised cellular energetic status that appears after a period of cardiac arrest, thus improving the viability of the graft (16). The period of recirculation time at 37°C may provide a mean of measuring organ quality, before considering the organ for transplantation, and parameters obtained during this period can become predictors of viability.

Optimization of the flow perfusion of organs obtained from NHBDs is one of the main objectives of any perfusion procedure used. The ability to measure and monitor tissue perfusion effectively is important in the ongoing assessment of organ viability. In this way, some studies have been designed to measure the perfusion pressure during the in situ perfusion of kidneys from NHBDs (17).

On the other hand, it has been suggested that perfusion of these organs with oxygenated blood could correlate with a better survival of the grafts (11, 14, 18, 19). However, the tissue oxygen consumption has not been studied in the livers after prolonged periods of ischemia.

¹ This work was supported in part by FIS grants 94/1227 and 96/1047.

² Address correspondence to: Ricard Valero, MD, Department of Anesthesiology, Hospital Clínic, Villarroel 170, E-08036 Barcelona, Spain.

* Abbreviations: CPB, cardiopulmonary bypass; DSP, donor of the liver transplanted to surviving pigs; DNSP, donor of the liver transplanted to nonsurviving pigs; HDO₂, hepatic oxygen delivery; HO₂ER, hepatic oxygen extraction ratio; HVO₂, hepatic oxygen uptake; NHBD, non-heart-beating donor; NR, normothermic recirculation; TBC, total body cooling; WI, warm ischemia.

The aim of this study is to evaluate the relationship between hepatic blood flows and hepatic oxygen metabolism in livers obtained from NHBD pigs after different periods of WI, with the use of CPB and recirculation at 37°C during 30 min (normothermic recirculation [NR]) before TBC, as well as its relation to recipient survival.

MATERIALS AND METHODS

Thirty-five outbred weanling pigs, weighting 25–35 kg, underwent transplants with an allograft from a NHBD with the following characteristics.

Donor. Animals had fasted for 36 hr before surgery. They were sedated with intramuscular injection of azaperone (10 mg/kg). A small venous catheter was inserted into the ear vein; anesthesia was then induced with 15 mg/kg sodium pentobarbital. After orotracheal intubation, the lungs were mechanically ventilated (Siemens Servo 900 D) at a tidal volume of 10–15 ml/kg with oxygen (FiO₂ 1). The respiratory rate was initially adjusted to maintain an end-tidal carbon dioxide of 30–35 mmHg (Hewlett-Packard, 78342-A). Anesthesia was maintained with isoflurane (0.5–1 MAC), 3 µg/kg fentanyl, and muscle paralysis was obtained with 0.3 mg/kg atracurium besilate. The electrocardiograph was continuously monitored. Exposure of the right external jugular vein and carotid artery was performed by a longitudinal incision on the right side of the neck; a catheter (16-gauge, Arrow) was placed into the carotid artery for blood sampling and arterial pressure recording (Hewlett-Packard, 78342-A). After opening the abdomen, the hepatic hilum was exposed. A noninvasive Transonic flowmeter (Transonic Systems Inc. HT207, Ithaca, NY) was placed around the hepatic artery and portal vein. Baseline flow values were determined. At that time, heparin was given intravenously (3 mg/kg). Jugular vein, aorta, and the inferior vena cava were cannulated (22, 16, and 28 Fr, respectively) and then were connected to a blood oxygenator (William-Harvey blood oxygenator, H-1700, CR Bard Inc.), a heat exchanger (Marcusor, Sorin), and a nonpulsatile roller pump (Stöckert-Shiley). The circuit was primed with 500 ml of saline serum, 0.5 g/kg mannitol, and 500 ml of Haemoce. Liver and esophageal temperature were also monitored (Mon-A-Therm; Mallinckrodt Medical Inc.). Cardiac arrest was then produced by intravenous injection of KCl (10–15 ml, 2 M).

Pigs were divided into three groups (20WI, 30WI, and 40WI group) according to their WI time. After 20, 30, and 40 min of WI, NR (extracorporeal circulation and tissue oxygenation at 37°C) was initiated and maintained for 30 min at the maximum pump flow rate, trying to achieve 2.2 L/m² body surface, depending on venous blood return. This pump flow rate was recorded during the whole NR period, and mean pump flow rate was calculated. Sodium bicarbonate was added to the circuit to correct metabolic acidosis but no other liquid was introduced in the circuit. After this period, TBC by extracorporeal circulation was started and continued until the animal progressively reached a liver temperature of 15°C. At that moment, liver procurement was performed in a standard manner with UW perfusion through the aorta and portal vein and then cooled and preserved at 4°C for 6 hr.

A fourth group, with 20 min of WI, with a period of TBC by extracorporeal circulation, but without the NR period, was considered as the control group (C group).

Mean arterial pressure, liver and esophageal temperatures, and the temperature of the heat exchanger were recorded at least every 5 min. Portal and hepatic artery blood flows were continuously registered before cardiac arrest, during the 30-min period of NR and during TBC until UW solution perfusion was started. Flow data was calculated in reference to the animal body surface.

Blood samples from portal vein, suprahepatic vein, and carotid artery were taken for blood gas, electrolytes and hemoglobin analysis (Analyzer 288, blood gas system, Ciba-Corning Diagnostics) at baseline, 5 min after the beginning of NR, 15 min after the beginning of

NR, and at the end of NR. The time needed to reach 15°C was also registered.

With this data, arterial (CaO₂), portal (CpO₂), and suprahepatic (CshO₂) oxygen content was calculated as follows:

$$\text{Oxygen content} = pO_2 \times 0.0023 + (\text{hemoglobin} \times (O_2 \text{ saturation} / 100) \times 1.31).$$

$$\text{Oxygen delivery (HDO}_2\text{) of the liver} = (\text{CaO}_2 \times \text{arterial flow}) + (\text{CpO}_2 \times \text{portal flow}).$$

$$\text{Suprahepatic flow} = \text{arterial flow} + \text{portal flow}.$$

$$\text{Oxygen uptake (HVO}_2\text{) of the liver} = \text{HDO}_2 - (\text{CshO}_2 \times \text{suprahepatic flow}).$$

$$\text{Hepatic oxygen extraction ratio (HO}_2\text{ER)} = (\text{HVO}_2 / \text{HDO}_2) \times 100.$$

Recipient operation. The anesthetic management was similar to that of the donor group. Exposure of the right external jugular vein and carotid artery was also performed in the same way. Electrocardiogram, arterial pressure, and central venous pressure were recorded continuously. Blood gas, electrolytes, and hemoglobin analysis were made during the procedure to correct metabolic imbalance. Once the abdomen was opened, a standard hepatectomy was performed as previously described (20). The allograft was placed in the recipient, and the anastomosis were performed in the following order: first the suprahepatic vena cava and portal vein, immediately revascularizing the liver, then the infrahepatic vena cava and the hepatic artery, and finally the biliary tract, leaving the gallbladder in place. No veno-venous bypass was performed because the duration of the anhepatic stage was no longer than 20 min in any case. The hepatic arterial blood flow was reconstructed between the donor celiac axis and the recipient's hepatic artery by means of magnifying lenses. Biliary reconstruction was performed with an intraluminal stent externally secured with two silk stitches. Cold ischemia time from the beginning of the TBC to reperfusion in the recipient was 6 hr. The abdominal wall was closed in two layers and the skin with a running silk suture.

Postoperative care. The animals were tracheally extubated between 20 and 35 min after the operation. They were placed in metabolic cages with warm lamps. Blood gas monitoring was done postoperatively for several hours. Analgesia was given by means of intramuscular injection of 100 mg of meperidine, 1 hr after tracheal extubation. Immunosuppressive regimen included 500 mg of methylprednisolone and 1.5 mg/kg azathioprine before liver reperfusion, and 25 mg/kg oral cyclosporine daily after the first postoperative day. Fluid were permitted orally on the first postoperative day, and the animals were fed with commercial pig food and yogurt after the second day. The animals were sacrificed on the fifth postoperative day by an intravenous overdose of sodium pentobarbital.

Statistical analysis. This was carried out according to Kruskal-Wallis test, Friedman analysis of variance test, Mann-Whitney *U* test, Wilcoxon test, and Spearman correlation test. *P*-values of 0.05 or less were taken as significant. Results are expressed as mean ± standard deviation.

RESULTS

Pig characteristics in the four groups are shown in Table 1. Survival rate was 100% (10/10) in the 20WI group, 70% (7/10) in the 30WI group, and decreased to 50% (5/10) in the 40WI group. Survival rate of the control group was 0% (0/5).

TABLE 1. Characteristics of the animals in the different groups and survival on the fifth postoperative day after liver transplantation

	Control	20WI	30WI	40WI
n	5	10	10	10
Weight	25.8±3.6	28.3±3.4	28.0±2.1	24.93±2.96
Corporal surface	0.79±0.006	0.83±0.05	0.84±0.04	0.78±0.04
Survival	0/5	10/10	7/10	5/10

Flows during NR. Hepatic artery blood flow was significantly lower, after asystolia, with respect to baseline measurements. It progressively recovered during NR in the three groups, but it did not reach baseline values. However, the arterial flow was only significantly lower during NR with respect to baseline values in the 30WI group ($P < 0.05$) (Fig. 1). The portal blood flow was also lower at all stages during the NR period with respect to baseline data in the three groups, but these differences were only statistically significant in the 30WI and 40WI group ($P < 0.05$). No differences were found among the groups (Fig. 1). Pump blood flow increased quickly during NR, improving during the first 15 min in all three groups, after which it began to decrease slightly. This decrease was only significant in the 30WI ($P < 0.01$) and 40WI group ($P < 0.05$). Higher flows were recorded in the 20WI compared to both 30WI and 40WI, in all periods studied (Fig. 2). Mean pump blood flow was also higher during NR in the 20WI (2.00 ± 0.48 L/min/m²) than in the 30WI (1.88 ± 0.22 L/min/m²) and the 40WI (1.75 ± 0.31 L/min/m²). The differences, however, were not statistically significant.

Pump blood flow did not correlate with hepatic artery blood flow during the NR. However, pump blood flow correlated with portal blood flow well at 5 min ($P < 0.0001$; $R = 0.76$), 15 min ($P < 0.001$; $R = 0.64$), and 30 min ($P < 0.005$; $R = 0.59$) of the NR period.

When the donors of the livers transplanted to "surviving pigs" (DSP) were compared with those donors of the livers transplanted to "nonsurviving pigs" (DNSP), hepatic artery blood flow was higher in the DSP after 15 min of NR, but differences were not significant (Fig. 3). However, portal blood flow was significantly higher in the DSP at 15 min of NR ($P < 0.05$) and 30 min of NR ($P < 0.05$) (Fig. 3). Pump blood flow was also higher in the DSP, these differences being statistically significant during the whole NR period ($P < 0.001$) (Fig. 4). When analyzing the mean pump blood flow, the best "cut-off point" was found to be at 1.7 L/min/m² with a specificity of 87.5% and a sensibility of 82% (Fig. 5).

Oxygen metabolism. Oxygen content, regional oxygen delivery, and oxygen consumption of the liver in the three groups are shown in Table 2. Oxygen content globally decreased in the three groups with respect to baseline values during the NR, as a result of the hemodilution produced in this period. Suprahepatic oxygen content was significantly higher in the 20WI group than in the other groups during NR. Hepatic HDO₂ was significantly lower during NR in all

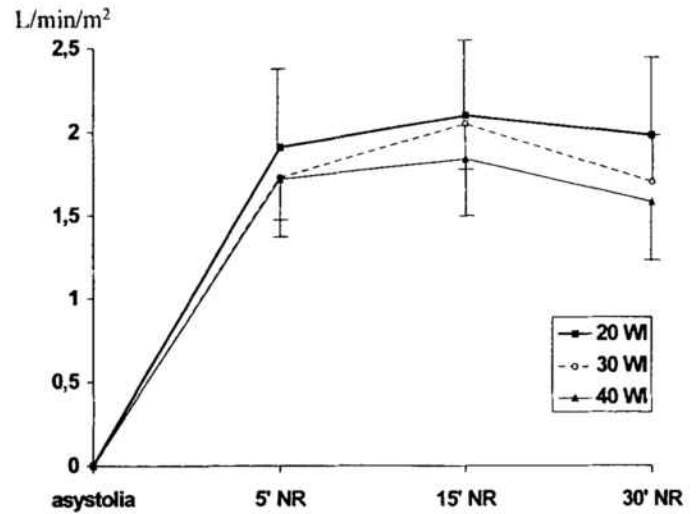


FIGURE 2. Extracorporeal pump blood flow in the three groups, during NR at 5, 15, and 30 min.

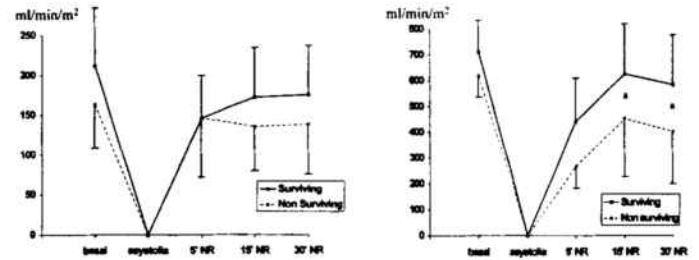


FIGURE 3. Hepatic artery blood flow (left), and portal blood flow (right) in the group of donors of the livers transplanted to surviving pigs (DSPs) and in the group of donors of the livers transplanted to nonsurviving pigs (DNSPs), at baseline and at 5, 15, and 30 min during NR (a, $P < 0.05$ between groups.)

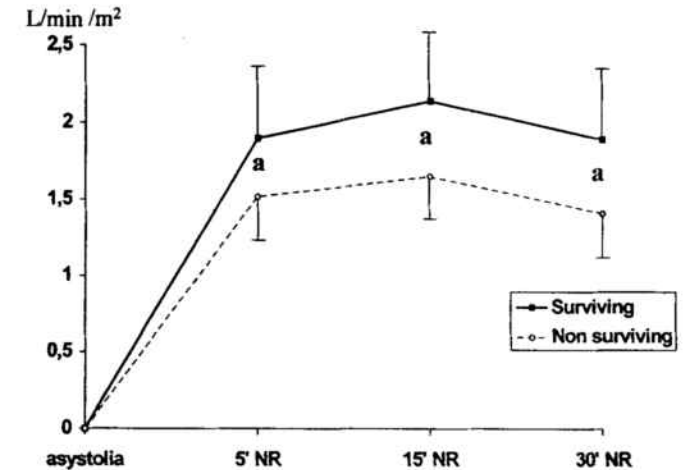


FIGURE 4. Extracorporeal pump blood flow in the group of DSPs and in the group of DNSPs, during NR at 5, 15, and 30 min (a, $P < 0.005$ between groups.)

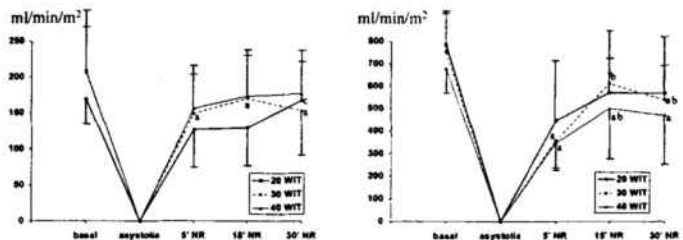


FIGURE 1. Hepatic artery blood flow (left) and portal blood flow (right) in the three groups, as baseline and at 5, 15, and 30 min during the normothermic recirculation period (NR). (20WI, 20-min warm ischemia (WI) group; 30WI, 30-min WI group; 40WI, 40-min WI group) (a, $P < 0.05$ with respect to basal data; b, $P < 0.05$ with respect to 5NR; c, $P < 0.05$ with respect to 5NR and 15NR).

three groups with respect to baseline values, but no differences were found among the groups. Hepatic HVO₂ did not show differences among the groups. However, HO₂ER was significantly lower in the 20WI group than in the other groups (Fig. 6).

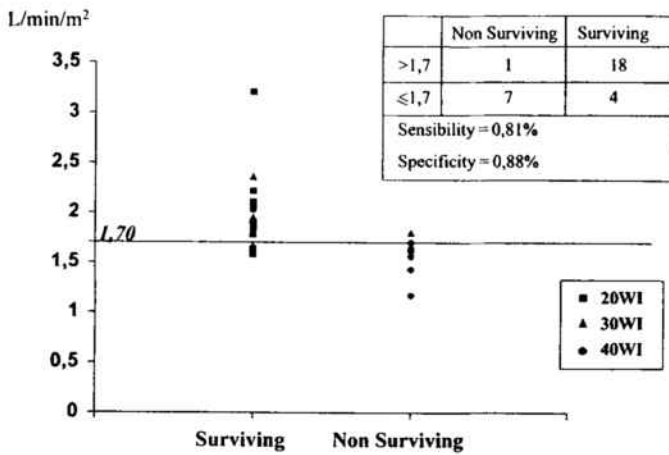


FIGURE 5. Mean pump blood flow rate during NR in the pigs of the three groups. The best cut-off point was found at 1.7 L/min/m² with an specificity of 87.5% and a sensibility of 81% (surviving, pigs which survived at 5 days; nonsurviving, pig which did not survive at 5 days.)

TABLE 2. Arterial (CaO₂), portal (CpO₂), and suprahepatic (CshO₂) oxygen content, oxygen delivery (HDO₂) and consumption (HvO₂) in the three groups, at baseline (b) and at 5, 15, and 30 min during the normothermic recirculation

	20WI	30WI	40WI
CaO₂			
Baseline	13.99±2.09	14.80±2.01	12.67±1.56
5 min	9.99±1.39	9.36±1.99	8.47±1.00
15 min	8.88±0.86	8.31±1.12	8.08±1.16
30 min	9.37±0.40	8.29±1.68	7.82±1.42
CpO₂			
Baseline	11.35±2.00	12.23±1.96	10.04±1.30
5 min	5.19±0.86	4.91±1.21	4.92±0.76
15 min	5.34±0.50	5.55±1.04	4.92±0.89
30 min	5.40±1.16	4.85±1.73	4.67±0.98
CshO₂			
Baseline	10.46±1.81	11.46±1.35	8.81±1.14
5 min	3.96±1.50	2.78±1.53	2.96±1.16
15 min	4.09±0.53 ^a	3.21±0.91	2.60±1.32
30 min	4.35±1.26 ^a	2.62±1.34	2.17±0.52
HDO₂			
Baseline	113.98±33.00	124.85±35.70	97.66±21.83
5 min	36.01±16.51	31.43±13.58	29.62±10.93
15 min	42.85±20.26	47.80±10.57	39.15±9.16
30 min	47.96±27.42	38.77±12.31	33.68±7.46
HvO₂			
Baseline	15.77±10.12	14.86±11.77	17.13±7.83
5 min	10.83±8.63	16.46±2.72	14.41±4.98
15 min	13.73±8.14	22.74±5.23	20.73±5.72
30 min	14.16±10.74	20.30±8.23	19.57±3.50

^a P<0.05 with respect to 30WI and 40WI.

No differences were found in the oxygen content when the DSPs were compared with the DNSPs (Table 3). HDO₂ was higher in the DSP than in the DNSP, but there were no statistical differences. HO₂ER was significantly higher in the DNSP than in the DSP (Fig. 7).

Cooling time. The time the liver needed to reach 15°C was shorter in the 20WI (12.57±4.15 min) and 30WI (12.40±2.67

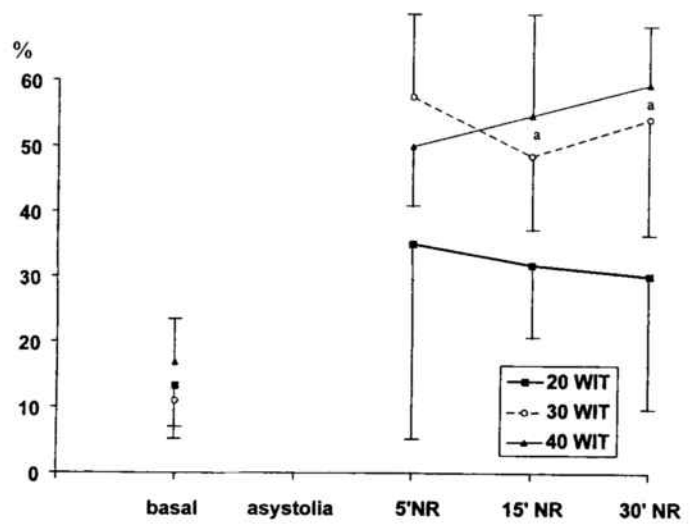


FIGURE 6. Hepatic oxygen extraction ratio in the three groups, at baseline and at 5, 15, and 30 min during the NR (a, P<0.05 between 20WI, 30WI, and 40WI groups).

TABLE 3. Arterial (CaO₂), portal (CpO₂), and suprahepatic (CshO₂) oxygen content, hepatic oxygen delivery (HDO₂), and consumption (HvO₂) in the group of donors of the livers transplanted to surviving pigs (DSP) and non-surviving pigs (DNSP), at baseline (b) and at 5, 15, and 30 min during the normothermic recirculation

	DSP	DNSP
CaO₂		
Baseline	13.94±2.33	14.10±1.81
5 min	9.32±1.90	9.09±0.88
15 min	8.31±1.17	8.55±0.83
30 min	8.30±1.65	8.70±0.89
CpO₂		
Baseline	11.52±2.34	11.11±1.55
5 min	4.95±1.08	5.09±0.71
15 min	5.22±0.93	5.51±0.83
30 min	4.74±1.54	5.42±0.83
CshO₂		
Baseline	10.59±2.10	10.26±1.35
5 min	3.26±1.54	2.83±1.25
15 min	3.43±0.99	2.83±1.28
30 min	3.09±1.56	2.42±0.68
HDO₂		
Baseline	129.02±32.59	91.43±18.23
5 min	34.37±13.97	26.59±9.87
15 min	46.15±14.07	38.91±9.38
30 min	41.51±18.05	34.53±9.44
HvO₂		
Baseline	18.94±11.77	11.03±4.49
5 min	14.51±5.96	14.29±4.91
15 min	19.52±7.31	20.74±6.55
30 min	17.75±8.01	20.86±8.06

min) groups than in the 40WI group (15.37±3.96 min). In the control group liver cooling time was 13±3.08 min. No statistically significant differences were found. Cooling time was also longer in the DNSP (15.43±4.19 min) than in the DSP (12.61±3.23 min), but differences were not statistically significant.

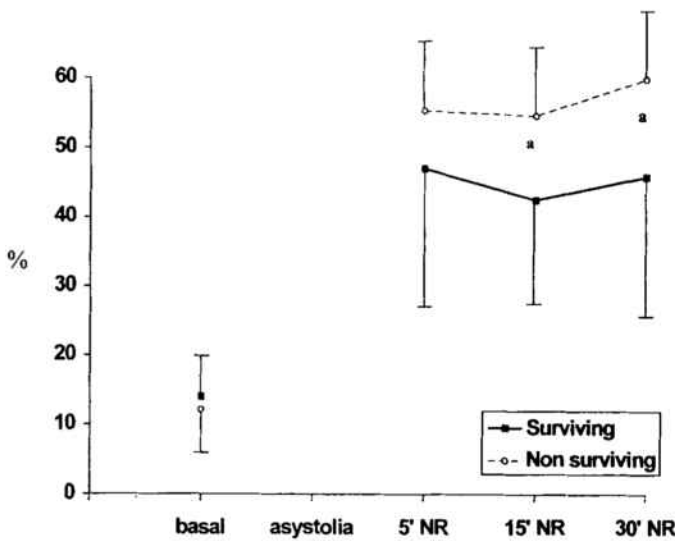


FIGURE 7. Hepatic oxygen extraction ratio in the group of DSPs and in the group of DNSPs, at baseline and at 5, 15, and 30 min during NR (a, $P < 0.05$ between groups).

DISCUSSION

Livers from NHBDs are being considered as a potential source for liver transplantation (9, 12, 13, 21-23). Procurement of these organs offer difficulties because the liver does not tolerate long periods of WI. Although there are some clinical and experimental reports suggesting that the liver can tolerate substantial WI time, even for periods up to 60 min, they are limited and sometimes poorly documented (24-27). Any method applicable for the procurement of livers from NHBDs must arrest the process of ischemic injury, and preferably reverse it (28). In this way, some different techniques for procurement of organs from NHBDs have been used to improve organ viability (29, 30). TBC, using a CPB, has been suggested as a useful method (14, 31, 32). However, recovery of the liver has been only possible, even with this technique, after a short WI time (10 min) (14).

As previously suggested, "extracorporeal normothermic recirculation with cardiopulmonary bypass and tissue oxygenation," during a period of time before "total body cooling," may improve the compromised cellular energetic status that appears after a period of cardiac arrest, thus improving the viability of the graft (32-34). Moreover, in our study, we have confirmed that survival of the liver allograft after 20-40 min of cardiac arrest is feasible. Posttransplant liver viability was determined by recipient's survival during the first 5 days. After 6 hr of cold preservation, a high proportion of the pigs retained life-sustaining graft function immediately after transplantation and survived for 5 days. This survival rate is very high, contrary to other experiences (35). These results suggest that, although there may be a compromised viability of the graft, liver transplantation is feasible up to 40 min of WI and the liver organ is capable of sustaining life immediately after transplantation. A long WI time of 40 min, however, has been related with severe necrosis of the biliary tract in surviving pigs (36), and, although the hepatocyte function may be preserved during liver procurement (34), the sensibility of the biliary tract to the ischemic injury impairs long-term survival.

Quality assessment of the organ is a requirement that any procurement technique must satisfy, before any recipient operation is started (28). The period of recirculating time at 37°C may provide a means of measuring organ quality, before considering the organ for transplantation. The parameters obtained during this period can become predictors of viability and can be useful in considering longer periods of WI. Optimization of the flow perfusion of organs obtained from NHBDs is one of the main objectives of any perfusion procedure used. The ability to measure and monitor tissue perfusion effectively is important in the ongoing assessment of organ viability. In this way, some studies have been designed to measure the perfusion pressure during the in situ perfusion of kidneys from NHBDs (17). Anaise et al. (17) demonstrated that a perfusion pressure over 70 mmHg produces a quicker and more effective decrease in temperature (up to 15°C in 5 min) and it correlates with better viability of the kidney graft. It was suggested that low perfusion pressure may result in a release of renin and angiotensin, with a subsequent increase in renal vascular resistance. In our study, the recovery of higher values of portal blood flow during NR was correlated with a higher graft survival. The achievement of such high blood flows, probably secondary to minor endothelial and microcirculatory damage (34), allowed those donors to recover from the previous ischemic lesions.

Better recovery of the hepatic blood flow evolved parallel to the achievement of better pump flows. Important differences were found between the pigs whose livers sustained life in the recipient and those whose liver did not. This is especially remarkable because the monitoring of this parameter in a clinical setting is quite easy, and its usefulness to assess the viability of the graft is clear.

In a clinical setting, the blood flow achieved can be temporarily increased by the addition of fluids into the oxygenator-container (10, 23), when venous blood return is not sufficient to maintain a correct perfusion of the organ and donor. However, the excessive hemodilution significantly reduces the delivery of oxygen to the tissues and the beneficial effect of the oxygenation is impaired. Another disadvantage to the excessive priming of the circuit during the NR could be the loss of information that the value of the pump blood flow gives us about the viability of the graft.

In the clinical situation, heparinization is actually done after pronouncement of death. This is one of the differences with our model. Although nonexperimental studies omitting administration of heparin until the initiation of CPB have been performed, we suspect that this would impair the recovery of circulation after a long period of WI. However, the value of CPB for kidney procurement from NHBDs has been documented in the clinical setting, even when heparin is administered after the WI period (9, 11, 18, 23).

Furthermore, it has been suggested that perfusion of NHBDs with oxygenated blood could correlate with a better survival of the graft (10, 14, 18, 19, 37). Tissue oxygen consumption, however, has not been studied in livers after prolonged periods of ischemia. The relationship between oxygen uptake and supply is an indirect measure of tissue oxygenation. The O_2 extraction ratio increases to maintain oxygen uptake at baseline levels and appears to be an early indicator of inadequate oxygen delivery. It has been suggested by several researchers (14, 27, 38) that the nonviability of organs after prolonged warm ischemic time is related to an

impairment of energy metabolism. In our study, the longer the ischemia time was, the higher hepatic oxygen extraction ratio. This dramatic elevation noted in our study, suggests that the liver tries to restore the energy metabolism lost after the ischemic period. The livers with severe ischemic damage, which showed a higher HO_2ER , were not able to recover the energetic status and showed poor viability. In donors with less severe ischemic insult, the progress of damage caused by WI should be rapidly arrested and metabolic repair initiated during NR. The latter data might explain the beneficial effect of the normothermic blood perfusion in our experiments.

As already stated (28), the quick reduction of temperature occurred in the control group dramatically reduces the cellular metabolism but without time to recover the reduced cellular energetic status as a result of the preceding ischemia. It could probably explain the difference in the survival rate of the control group without the NR period.

From this study, it can be concluded that it is possible to increase the survival of liver transplantation after prolonged warm ischemic time in NHBDS, up to 30–40 min, with the use of a period of NR before TBC. This technique can be transferred to the clinical setting, as reported previously (10, 23), so the direct application of our results is feasible. Although catheterization was done previous to cardiac arrest in our experiments, the vascular approach in the human donor through femoral vessels, after diagnosis of death, is possible and easier. Furthermore, by using this technique, measurement of the portal blood flow and the extracorporeal pump blood flow, which can be done during the procurement procedure, can be useful predictors of viability of the graft.

Finally, the possible modifications during the period of NR, by the use of drugs, such as vasodilators, or by changing the duration or characteristics of this phase, could permit the improvement of graft viability and the widening of the allowed WI time that guarantees the safety of the recipient.

REFERENCES

- Garcia-Rinaldi R, Lefrak E, Defore W, et al. In situ preservation of cadaver kidneys for transplantation. *Ann Surg* 1975; 182(5): 576.
- Wijnen R, Booster M, Stubenitsky B, Boer J, Heineman E, Kootstra G. Outcome of transplantation of non-heart-beating donor kidney. *Lancet* 1995; 345(29): 1067.
- Kootstra G, Ruers TJM, Vroemen JPAM. The non-heart-beating donor: contribution to the organ shortage. *Transplant Proc* 1986; 18(5): 1410.
- Kozaki M, Matsuno N, Tamaki T, et al. Procurement of kidney grafts from non-heart-beating donors. *Transplant Proc* 1991; 23: 2575.
- Castelao AM, Griño JM, González C, et al. Update of our experience in long-term renal function of kidneys transplanted from non-heart beating cadaver donors. *Transplant Proc* 1993; 25: 1513.
- Paprocki S, Kruk R, Erturk E, Cerilli J. A technique for successful transplantation of organs from non-heart beating cadaver donors. *Transplantation* 1992; 54: 381.
- Didlake RH, Raju S, Smith GV, Krueger RP, Kirchner KA. Utilization and function of kidneys obtained from non heart beating donors. *Transplantation* 1984; 38: 90.
- Cho YW, Terasaki PI, Cecka JM, Gjertson DW. Transplantation of kidneys from donors whose hearts have stopped beating. *N Engl J Med* 1998; 338(4): 221.
- Valero R, Manyalich M, Cabrer C, Salvador L, Garcia-Fages LC. Organ procurement from non-heart-beating donors by total body cooling. *Transplant Proc* 1993; 25(6): 3091.
- Gómez M, Alvarez J, Arias J, et al. Cardiopulmonary bypass and profound hypothermia as a means for obtaining kidney grafts from irreversible cardiac arrest donors: cooling technique. *Transplant Proc* 1993; 25(1): 1501.
- Koyama I, Hoshino T, Nagashima N, Adachi H, Ueda K, Omoto R. A new approach to kidney procurement from non-heart-beating donors: core cooling on cardiopulmonary bypass. *Transplant Proc* 1989; 21(1): 1203.
- Casavilla A, Ramirez C, Shapiro R, et al. Experience with liver and kidney allografts from non-heart-beating donors. *Transplantation* 1995; 59(2): 197.
- Yanaga K, Kakizoe S, Ikeda T, Podesta LG, Demetris AJ, Starzl TE. Procurement of liver allografts from non-heart beating donors. *Transplant Proc* 1990; 22: 275.
- Hoshino T, Koyama I, Nagashima N, Kadokura M, Kazui M, Omoto R. Transplantation of livers from non-heart beating donors is possible by core cooling technique. *Transplant Proc* 1989; 21(3): 3519.
- Koyama I, Ogawa N, Watanabe T, et al. Utilization of warm ischemic livers from non-heart beating donors by portable cardiopulmonary bypass and heterotopic transplantation. *Transplant Proc* 1996; 28(3): 1878.
- Tabet J, Garcia Valdecasas JC, Rull R, et al. Non-heart beating donor pigs: the feasibility of liver donation. *Transplant Proc* 1997; 29: 1374.
- Anaise D, Yland MJ, Waltzer WC, et al. Flush pressure requirements for optimal cadaveric donor kidney preservation. *Transplant Proc* 1988; 20(5): 891.
- Koyama I, Taguchi Y, Watanabe T, Nagashima N, Otsuka K, Omoto R. Development of a reliable method for procurement of warm ischemic kidneys from non-heart-beating donors. *Transplant Proc* 1992; 24: 1327.
- Hoshino T, Maley WR, Stump KC, Tuttle TM, Burdick JF, Williams GM. Evaluation of core cooling technique for liver and kidney procurement. *Transplant Proc* 1987; 19: 4123.
- Calne R. Technique in the pig. In: Calne RY, ed. *Liver transplantation*. London: Grune and Stratton, 1983: 9.
- Ericzon BG, Lundgren G, Wilczek H, Groth CG. Experience with human liver grafts obtained after donor cardiac standstill. *Transplant Proc* 1987; 19: 3862.
- D'Alessandro A, Hoffmann RM, Knechtle SJ, et al. Successful extrarenal transplantation from non-heart-beating donors. *Transplantation* 1995; 59: 977.
- Valero R, Sánchez J, Cabrer C, Salvador L, Oppenheimer F, Manyalich M. Organ procurement from non-heart-beating donors through in situ perfusion or total body cooling. *Transplant Proc* 1995; 27(5): 2899.
- Schon M, Hunt C, Pegg D, Wion D. The possibility of resuscitating liver after warm ischemic injury. *Transplantation* 1993; 56: 24.
- Huguet C, Nordlinger B, Bloch P, Conard J. Tolerance of the human liver to prolonged normothermic ischemia. *Arch Surg* 1978; 113: 1448.
- Harris K, Wallace A, Wall W. Tolerance of the liver to ischemia in the pig. *J Surg Res* 1982; 33: 524.
- Takada Y, Taniguchi H, Fukunaga K, et al. Hepatic allograft procurement from non-heart-beating donors: limits of warm ischemia in porcine liver transplantation. *Transplantation* 1997; 63: 369.
- Schön MR, Hunt CJ, Pegg E, Wight DG. The possibility of resuscitating livers after warm ischemic injury. *Transplantation* 1993; 56: 24.
- Tojimbata T, Garcia R, Burns W, et al. The use of non heart beating cadaver donors in experimental liver transplantation. *Transplantation* 1995; 60(10): 1179.

30. Matsuno N, Uchiyama M, Sakurai E, Kozaki K, Ikeda T, Kozaki M. Liver transplantation from non-heart-beating donors: liver procurement without in situ portal flush. *Transplant Proc* 1996; 28(1): 203.
31. Shirakura R, Kamiike W, Matsumura A, et al. Multiorgan procurement from non-heart-beating donors by use of Osaka University cocktail, Osaka rinse solution, and the portable cardiopulmonary bypass machine. *Transplant Proc* 1993; 25: 3093.
32. Shirakura R, Matsuda H, Nakata S, et al. A new method to harvest multiple organs from non-heart-beating donors by use of a percutaneous cardiopulmonary support machine. *Transplant Proc* 1992; 24(4): 1329.
33. Tsukamoto S, Ohkohchi N, Endoh T, Seya K, Satomi S, Mori S. Procurement of livers by an artificial heart-lung machine using leukocyte-depleted washed red blood cells in non-heart-beating donors. *Transplant Proc* 1996; 28(1): 197.
34. Tabet J, Garcia-Valdecasas JC, Net M, et al. Evaluation of the ischemic liver injury during graft procurement from non heart beating donor pigs (NHBD). *Transplant Proc* 1997; 29: 3482.
35. Endoh T, Ohkohchi N, Katoh H, et al. Graft conditioning of liver in non-heart beating donors by an artificial heart and lung machine in situ. *Transplant Proc* 1996; 28(1): 110.
36. Lopez-Boado MA, Garcia-Valdecasas JC, Ordi J, et al. Histological changes during and after liver transplantation from NHBD pig. *Transplant Proc* 1997; 29: 3471.
37. Rijkmans BG, Buurman WA, Kootstra G. Six-day canine kidney preservation. *Transplantation* 1984; 37(2): 130.
38. Marubayashi S, Takenaka M, Dohi K, Ezaki H, Kawasaky T. Adenine nucleotide metabolism during hepatic ischemia and subsequent blood reflow periods and its relation to organ viability. *Transplantation* 1980; 30: 294.

Received 25 November 1997.

Accepted 1 April 1998.

**L-ARGININE REDUCES LIVER AND BILIARY TRACT DAMAGE AFTER
LIVER TRANSPLANTATION FROM NON-HEART-BEATING DONOR PIGS ¹**

Ricard Valero², Juan C. García-Valdecasas³, Marc Net⁴, Joan Beltran², Jaume Ordi⁵,
Francisco X. González³, Miguel A. López-Boado³, Raul Almenara³, Pilar Taurá²,
Montserrat Elena⁴, Lluís Capdevila², Martí Manyalich⁶ and Josep Visa³.

Department of Anesthesiology, Surgery, Biochemistry, Pathology and Transplant
Coordination of the Hospital Clínic of Barcelona.

University of Barcelona.

Institut D'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS)

Hospital Clínic de Barcelona. Villarroel 170. 08036. Barcelona. Spain.

Mailing address for proofs:

Ricard Valero

Department of Anesthesiology

Hospital Clínic

Villarroel 170

E-08036. Barcelona. Spain.

FOOTNOTES

¹ This study has partially been supported by “F.I.S.” grant number 96/1047

² Department of Anesthesiology of the Hospital Clínic of Barcelona. University of Barcelona. E-mail: rvalero@medicina.ub.es

³ Address correspondence to: JC. García-Valdecasas, M.D. Institut de Malalties Digestives. Hospital Clínic de Barcelona. Villarroel 170, E-08036. Barcelona. Spain. Telephone: 34.93.227.57.71. Fax: 34.93.227.54.52. E-mail: jcvalde@medicina.ub.es

⁴ Department of Biochemistry. Hospital Clínic de Barcelona

⁵ Department of Pathology. Hospital Clínic de Barcelona

⁶ Transplant Coordination Department. Hospital Clínic de Barcelona

Acknowledgment: We would like to thank Dr J J Aponte from the “Unidad de Epidemiología y Bioestadística del Hospital Clínic” for assistance and Mrs Dolores Cano for her assistance in the histological process.

ABBREVIATIONS

CaO₂ : Arterial oxygen content

CpO₂ : Portal oxygen content

CshO₂ : Suprahepatic oxygen content

CPB: Cardiopulmonary bypass

FiO₂: Inspiratory fraction of oxygen

HA: Hyaluronic acid

HDO₂ : Oxygen delivery of the liver

NHBD: Non heart beating donor

NO: Nitric oxide

α-GST: α-glutathione-S-transferase levels

ABSTRACT

Background: To evaluate whether L-Arginine reduces liver and biliary tract damage after transplantation from non heart-beating donor pigs.

Methods: Twenty-five animals received an allograft from non heart-beating donors. After 40 min of cardiac arrest, normothermic recirculation was run for 30 min. The animals were randomly treated with L-Arginine ($400 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ during normothermic recirculation) or saline (control group). Then, the animals were cooled and their livers were transplanted after 6 hr of cold ischemia. The animals were sacrificed on the 5th day, liver damage was assessed on wedged liver biopsies by a semi-quantitative analysis and by morphometric analysis of the necrotic areas, and biliary tract damage by histological examination of the explanted liver.

Results: Seventeen animals survived the study period. The histological parameters assessed (sinusoidal congestion and dilatation, sinusoidal infiltration by polymorphonuclear cells and lymphocytes, endothelitis, dissociation of liver cell plates, and centrilobular necrosis) were significantly worse in the control group. The necrotic area affected $15.9\pm 14.5\%$ of the liver biopsies in the control group and $3.7\pm 3.1\%$ in the L-arginine group ($p<0.05$). Six out of 8 animals in the control group and only 1 out of 8 survivors in the L-arginine group developed ischemic cholangitis ($p<0.01$). L-arginine administration was associated with higher portal blood flow (676.9 ± 149.46 vs $475.2\pm 205.6 \text{ mL}\cdot\text{min}\cdot\text{m}^{-2}$; $p<0.05$), higher hepatic hyaluronic acid extraction at normothermic recirculation ($38.8\pm 53.7\%$ vs $-4.2\pm 18.2\%$; $p<0.05$) and after reperfusion ($28.6\pm 55.5\%$ vs $-10.9\pm 15.5\%$; $p<0.05$) and lower levels of α -glutathion-s-transferase at reperfusion ($1325\pm 1098\%$ respect to baseline vs $6488\pm 5612\%$; $p<0.02$).

Conclusions. L-Arginine administration during liver procurement from non heart beating donors prevents liver and biliary tract damage.

INTRODUCTION

The reduced number of donors in comparison with the number of potential recipients remains the main limitation in liver transplantation. Among the different strategies to increase the donor pool, the use of non-heart-beating donors (NHBD), which is widely accepted for kidney transplantation(1,2), is particularly attractive(3-7). The use of NHBD has increased the number of kidney donors by approximately 20%(8).

During the past few years, several studies in experimental animals have raised important issues which could be essential for the clinical application of NHBD grafts. The outcome of animals transplanted with NHBD grafts is critically dependent on the duration of cardiac arrest (9). The method used for liver procurement is also extremely important. Total body cooling through cardiopulmonary bypass (CPB) prior to graft extraction improves graft function after transplantation from NHBD (10-12). Normothermic recirculation (extracorporeal circulation with CPB at 37°C) for 30 min prior to total body cooling further improves graft function and survival even after long periods (40 min) of cardiac arrest (9,13). This procedure is associated with a reduction in endothelial and hepatocellular damage (9,14). However, despite these advances, the results of NHBD grafts in experimental animals are still not optimal. When cardiac arrest is relatively prolonged, fifty per cent of animals die soon after transplantation due to graft failure (9,13). On the other hand, severe and irreversible damage of the intrahepatic biliary tract is the rule in the survivors (15).

There is an increasing number of studies showing that impaired activity of nitric oxide (NO) is involved in the ischemia-reperfusion injury. On the other hand, L-arginine (the substrate of NO synthase)(16) as well as NO donors have been shown to be very effective in reducing liver damage during reperfusion (17-22). Therefore, the aim of the

current study was to assess whether the addition of L-arginine administration to coincide with normothermic recirculation during liver procurement from NHBD pigs improves the results obtained with CPB and normothermic recirculation alone.

MATERIALS AND METHODS

Twenty-five outbred weanling pigs, weighing 20-25 Kg, were transplanted with an allograft from a NHBD.

Donor Procedures

Animals had fasted for 36 hours prior to surgery. They were sedated with an intramuscular injection of azaperone $10 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$. A small venous catheter was inserted into the ear vein; anesthesia was then induced with $15 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ sodium pentobarbital. After orotracheal intubation, the lungs were mechanically ventilated (Siemens Servo 900 D®, Siemens-Elema AB; Sweden) at a tidal volume of $10\text{-}15 \text{ ml}\cdot\text{Kg}^{-1}$ with oxygen (FiO_2 1). The respiratory rate was initially adjusted to maintain an end-tidal carbon dioxide level of 30-35 mmHg (Hewlett-Packard, M1046A, 71034 Boeblingen, Germany). Anesthesia was maintained with isoflurane (0.5-1 Minimum Alveolar Concentration), fentanyl $3 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$ and muscle paralysis was obtained with atracurium besilate $0.3 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$. The electrocardiograph was monitored continuously. Exposure of the right external jugular vein and carotid artery was performed by a longitudinal incision on the right side of the neck; a catheter (16G) was placed into the carotid artery for blood sampling and arterial pressure monitoring (Hewlett-Packard, M1046A, 71034 Boeblingen, Germany). After opening the abdomen, the hepatic hilum was exposed. A non-invasive flowmeter (Transonic Systems Inc. HT207. Ithaca, New York 14850, USA) was placed around the hepatic artery and portal vein. Baseline flow values were determined. At this point, heparin was given intravenously ($3 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$). The jugular vein, aorta and the inferior vena cava were cannulated (22 Fr, 16 Fr, 28 Fr respectively) and connected to a blood oxygenator (Bard Quantum Oxygenator and Venous reservoir, HF6000 - H6770VR, CR Bard Inc®; Haverhill, MA 01832, USA), a heat exchanger

(Módulo Normo-hipotermia Palex S.A., Barcelona, Spain) and a non-pulsatile roller pump (Stöckert-Shiley®, Munich, Germany). The circuit was primed with saline solution 500 ml, mannitol 0.5 g/Kg and Haemoce® (saline solution of polygeline) 500 ml. Liver and esophageic temperature were also monitored (Mon-A-Therm; Mallinckrodt Medical Inc®; St Louis, MO 63134, USA). Cardiac arrest was then produced by intravenous injection of KCl (10-15 ml 2M).

After 40 min of cardiac arrest, normothermic recirculation (extracorporeal circulation and tissue oxygenation at 37°C) was begun. The pigs were then randomly treated (sealed envelopes) with L-arginine or saline. *L-arginine group*: This consisted of 10 animals treated with a rapid (1 min) administration of 400 mg·Kg⁻¹ L-arginine in 150 mL of saline introduced into the venous reservoir of the oxygenator at the start of normothermic recirculation; *Control group*: This consisted of 15 animals only treated with 150 ml of saline.

Normothermic recirculation was maintained for 30 minutes at the maximum pump flow rate permitted by the venous blood return, with a target of 2.2 L·min⁻¹·m⁻² body surface. The pump flow rate was recorded, as an indirect estimate marker of circulatory function, during the whole normothermic recirculation period, and the mean pump flow rate calculated. Sodium bicarbonate was added to the circuit to correct metabolic acidosis but no other fluids were introduced into the circuit. At this point, total body cooling by extracorporeal circulation was started and it continued until the animal progressively reached a liver temperature of 15°C. The time needed to reach 15°C was registered. Liver procurement was then performed as described elsewhere (23) with University of Wisconsin solution perfusion through the aorta and portal vein. The liver was then cooled and preserved at 4°C for six hours.

The mean arterial pressure, liver and esophageal temperatures, and the temperature of the heat exchanger were recorded every five minutes. Portal and hepatic artery blood flows were continuously registered before cardiac arrest, during the 30 minutes period of normothermic recirculation and during total body cooling. Flow data are corrected to the animal body surface.

Recipient operation

The anesthetic management was similar to that of the donors. Exposure of the right external jugular vein and carotid artery was also performed. The electrocardiograph, arterial pressure and central venous pressure were recorded continuously. Blood gas, electrolytes and hemoglobin analyses were performed during the procedure, and metabolic disturbances were corrected. Once the abdomen was opened, a standard hepatectomy was performed as previously described (23). The donor liver was flushed in the back table with saline solution at room temperature. The allograft was placed in the recipient and anastomosis were performed in the following order: first the suprahepatic vena cava and portal vein, immediately revascularizing the liver, then the infrahepatic vena cava and the hepatic artery and finally the biliary tract, leaving the gallbladder in place. No veno-venous bypass was performed because the duration of the anhepatic stage lasted no longer than twenty minutes in any case. The hepatic arterial blood flow was reconstructed between the donor celiac axis and the recipient's hepatic artery by means of magnifying lenses. Biliary reconstruction was performed with an intraluminal stent externally secured with 2 silk stitches. The cold ischemia time, from the end of total body cooling to reperfusion in the recipient, ranged from 5 to 6 hr. The abdominal wall was closed in two layers and the skin was closed with a running silk suture.

Postoperative care

The animals were tracheally extubated between 20 to 35 minutes after the operation. They were placed in metabolic cages with heat lamps. Blood gas was monitored postoperatively for several hours. Analgesia was given by means of intramuscular injection of meperidin 100 mg one hour after tracheal extubation. The immunosuppressive regimen consisted of metilprednisolone 500 mg and azathioprine 1.5 mg·Kg⁻¹ before liver reperfusion, and oral cyclosporine 25 mg·Kg⁻¹ daily after the first postoperative day. Fluids were permitted orally on the first postoperative day and the animals were fed with commercial pig food and yogurt after the second day. The animals were sacrificed on the 5th postoperative day by an i.v. overdose of sodium pentobarbital.

The study was approved by the Investigation and Ethics Committee of the Hospital Clínic. The animal experiments have followed the “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” (NIH publication No.86-23, 1985).

Blood samples and measurements

Blood samples from portal, suprahepatic vein and carotid artery were taken for blood gas, electrolytes and hemoglobin analysis (288 Blood Gas System, Ciba-Corning Diagnostics Corp. Medfield MA 02052, USA) at baseline, five and fifteen minutes after the beginning of normothermic recirculation and at the end of normothermic recirculation. With these data the following parameters were calculated: Oxygen content in hepatic artery (CaO₂), portal vein (CpO₂) and suprahepatic vein (CshO₂) blood = pO₂ x 0,0023 + (Hemoglobin x (O₂ Saturation/100) x 1,31); the values are expressed as mL O₂·dL⁻¹.

Oxygen delivery (HDO₂) to the liver = (CaO₂ x arterial flow) + (CpO₂ x portal flow).

In the donor, blood samples for biochemical assays were taken at the beginning of the procedure, after 40 minutes of cardiac arrest and after 30 minutes of recirculation at 37°C. In the recipient, samples were taken immediately after reperfusion and one hour after reperfusion. Blood was immediately centrifuged and the plasma distributed in aliquots frozen and stored at -20°C for future testing. Hepatocellular and endothelial damage, as estimated by the plasma concentration of α -glutathione-S-transferase (α -GST) (24) and by hyaluronic acid (HA) (25-27), respectively, were assessed at the times stated above. The values of HA, and α -GST given in the results are expressed as a percent increase with respect to baseline values. Enzyme analyses were carried out using the standard laboratory methods (α -GST: Biotrin HEPKIT™ - α -porcine GST- α ; Biotrin LTD. Dublin, Ireland). HA was measured by a radiometric assay (Pharmacia Diagnostics®, Uppsala, Sweden). The extraction of HA by the liver was calculated by the following equation (28): HA Extraction = (Arterial HA - Suprahepatic vein HA) * 100 / Arterial HA.

Histological evaluation of liver damage

Five different 0.5 cm² wedge liver biopsies were taken from the left lobe of the donor liver at five different points in the surgical procedure (beginning of the procedure, after 40 minutes of cardiac arrest, at the end of normothermic recirculation, before the reperfusion in the recipient, and one hour after reperfusion). After the animal was sacrificed on the 5th postoperative day, a large sample, including a whole hepatic segment, was sent for pathological evaluation. Serial sections perpendicular to the hepatic capsule were carried out every 0.5 cm. A careful macroscopic inspection was performed and two different randomly selected samples (1.5 cm²) were submitted for histologic evaluation. A third sample was chosen from the hilar area, including large

hilar portal tracts. In case of macroscopically evident infarcted areas a fourth sample was taken. All the specimens for histology were fixed in 10% neutral buffered formalin and embedded in paraffin. Four- μm -thick sections were routinely stained with hematoxylin and eosin and Masson's trichrome. Sinusoidal congestion and dilatation, sinusoidal infiltration by polymorphonuclear cells and lymphocytes, endothelitis, dissociation of liver cell plates, ischemic cholangitis and centrilobular necrosis were evaluated in all specimens (29-32). All the histological parameters were semi-quantitatively evaluated according to the following criteria: absence (0), mild or focal (1), moderate (2) and severe (3). The pathologist was not aware of the times at which biopsies had been carried out or the treatment animals had been submitted. The reproducibility of the histological analysis, assessed by repeated blinded examination of 25% of the biopsies obtained at each time, showed 93% of agreement.

Morphometric analysis of the necrotic area

Quantitative analysis was performed with the digital image processing software MIP (Microm, Spain), using an Olympus BH2 microscope (Olympus, Tokio, Japan) at a magnification of 40x, with an eyepiece with a field of view of 26.5, with an intermediate device, each field resulting in the area of 15.45 mm^2 . Three randomly selected areas representing a total area of 46.35 mm^2 were measured in each case. Necrotic areas were semi-automatically evaluated, manually drawing the necrotic areas with a clear camera. The results were expressed as percentage (mm^2 of necrotic parenchyma per mm^2 of total area).

Statistical analysis

The statistical analysis of the results was performed using the Fisher exact test, unpaired Student t test, MANOVA test, Bonferroni test and Spearman correlation test when

necessary. Values of $p < 0.05$ were considered to be statistically significant. Results are expressed as mean \pm standard deviation.

RESULTS

Both groups were similar as regard weight (Control group= 25.25 ± 2.65 Kg; L-Arginine group= 24.27 ± 0.77 Kg) and body surface area (Control group = 0.79 ± 0.04 m² ; L-Arginine group = 0.77 ± 0.03 m²). Two out of ten animals in the L-arginine group and six out of fifteen in the control group died within the first 48 hours after transplantation ($p=0,29$). Data regarding post-liver transplantation, therefore, refer to 8 animals in the L-arginine group and 9 animals in the control group who survived for 5 days.

Histological changes:

The semi-quantitative histological evaluation of liver biopsies obtained after normothermic recirculation and immediately after reperfusion in the recipient showed that all histological parameters studied were similar in both groups, except for the degree of sinusoidal infiltration by polymorphonuclear cells and lymphocytes at the time of reperfusion, which was significantly more intense in the control group (1.4 ± 0.8 vs. 0.7 ± 0.5 ; $p=0.05$).

Seventeen animals surviving up to the end of the study were investigated to assess postoperative histological changes in samples obtained at necropsy. Sinusoidal congestion and dilatation, sinusoidal infiltration by polymorphonuclear cells and lymphocytes, endothelitis, dissociation of liver cell plates, ischemic cholangitis and centrilobular necrosis were significantly worse in the control group (FIG 1).

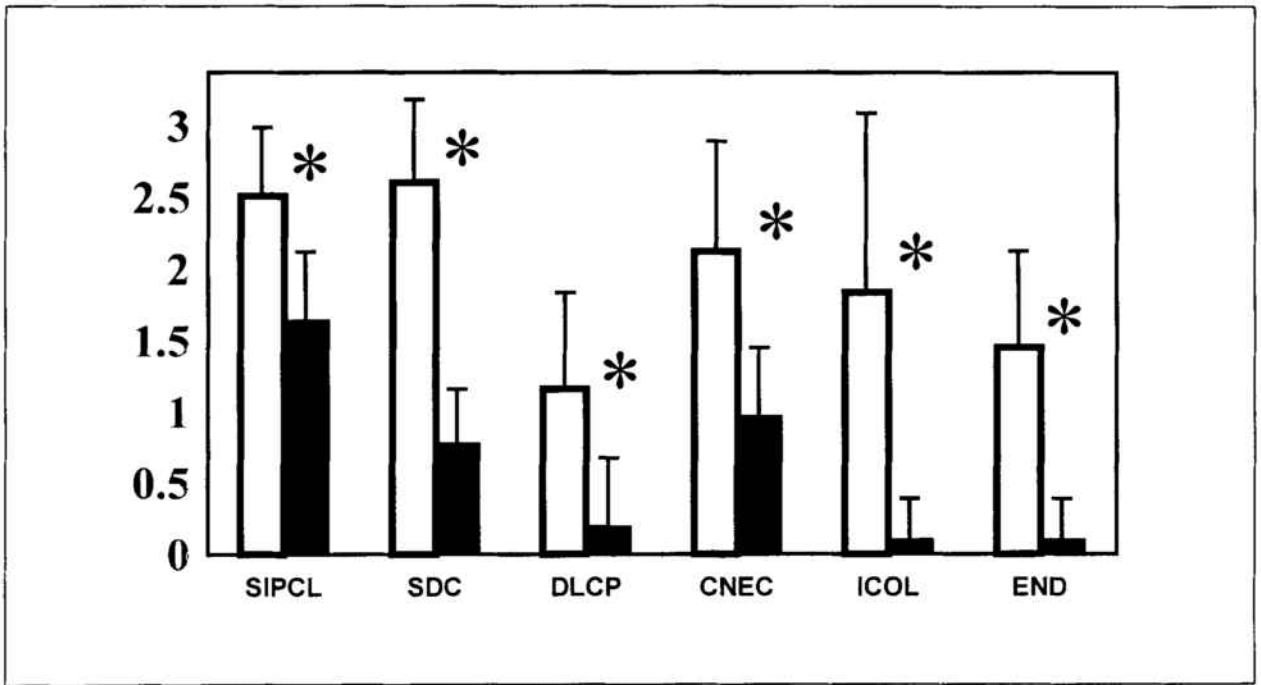
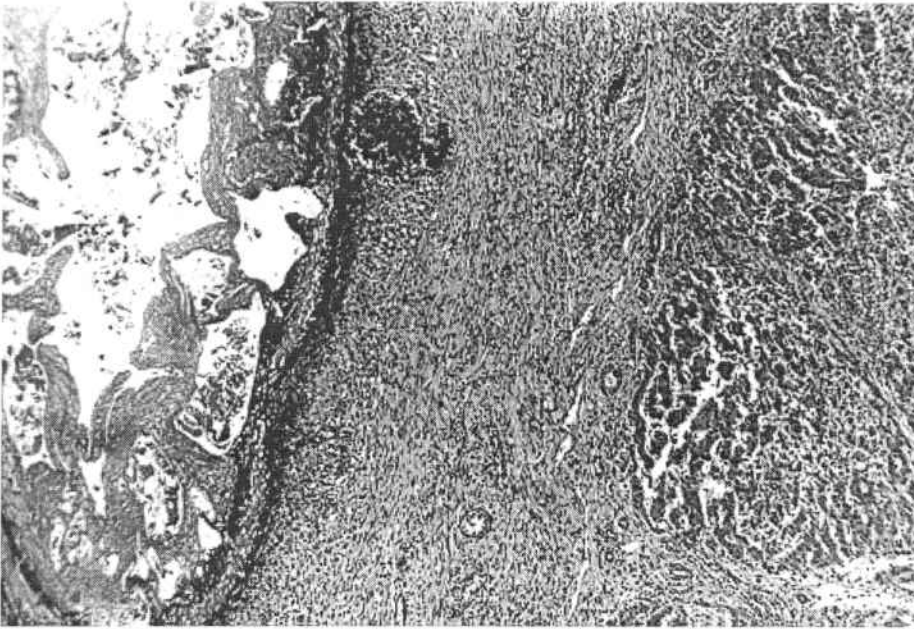
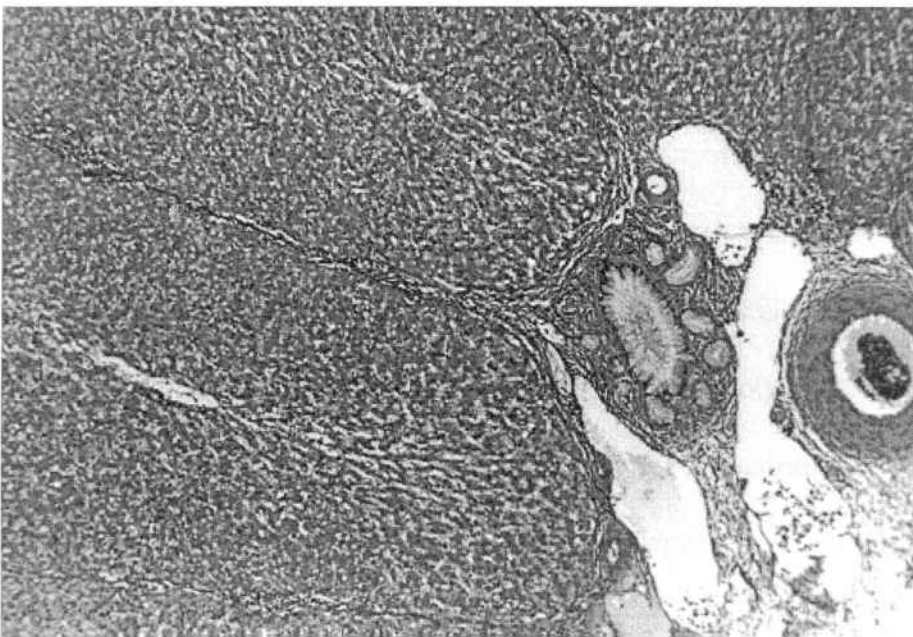


Figure 1: Histological findings evaluated on 5th postoperative day in L-arginine group (shaded bars) and control group (open bars). The intensity of these changes was evaluated by a semi-quantitative scoring system as absent (0), mild or focal (1), moderate (2) and severe (3). (SIPCL: sinusoidal infiltration by polymorphonuclear cells and lymphocytes; SCD: sinusoidal congestion and dilatation; DLCP: dissociation of liver cell plates; CN: centrilobular necrosis, ICOL: ischemic cholangitis; END: endothelitis.). Values expressed as mean \pm standard deviation). * = $p < 0.05$

Morphometric analysis of the liver specimens revealed a significantly greater percentage of necrotic parenchyma in the control group (15.9 ± 14.5 %) than in the L-arginine group (3.7 ± 3.1 %) ($p < 0.05$). Six out of nine animals in the control group and only one out of eight in the L-arginine group developed ischemic cholangitis ($p < 0.01$). Ischemic cholangitis, in several portal tracts was characterized by a focal necrosis of the bile duct, but in most cases, the necrosis affected the whole portal area and extended into the adjacent parenchyma (FIG 2).



2A



2B

Figure 2: *A)* Ischemic cholangitis in a case from the control group. The parenchyma shows sinusoidal dilatation, inflammation and necrosis. *B)* Normal liver in a case from the L-arginine group. (Hematoxylin & eosin, 40x)

Hepatic extraction of hyaluronic acid, plasma levels of α -GST and hepatic tissue energy charge

There were no differences between the two groups when comparing baseline plasma levels of HA ($124.5 \pm 90.7 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ in the control group vs. $144.2 \pm 80.5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ in the L-arginine group) and α -GST ($4.3 \pm 2.5 \text{ IU}\cdot\text{L}^{-1}$ vs. $11.6 \pm 7.6 \text{ IU}\cdot\text{L}^{-1}$), hepatic extraction of HA ($2.3 \pm 13.7 \%$ vs. $15.2 \pm 45.9 \%$) and energy charge (0.27 ± 0.1 vs. 0.25 ± 0.1). Table 1 shows the changes in these parameters during the procedure in the two groups of animals. A significant impairment in hepatic extraction of HA during the procedure was observed in both groups of animals. In the control group hepatic extraction of HA at the end of normothermic recirculation and one hour after reperfusion was negative indicating a net production of HA in the liver. In contrast, animals in the L-arginine group showed a positive hepatic extraction of HA. These differences were statistically significant ($p < 0.05$). The impairment in hepatic extraction of HA was associated with a marked increase in the plasma levels of this substance in both groups. Although the increase in HA plasma levels was lower in the L-arginine group, these differences were not significant. Since extraction of HA by the liver is made by the endothelial cells, these results indicate a significantly greater endothelial cell damage in the control group. The plasma levels of α -GST, which provide an estimation of the hepatocellular damage, increased throughout the procedure in both groups reaching the peak value one hour after reperfusion in the recipient. The values were similar in both groups prior to reperfusion. However, after reperfusion there was a strikingly sharp increase in α -GST values in the control group, a feature not observed in the L-arginine group. The difference in α -GST at the time of reperfusion between groups was statistically significant ($p = 0.02$).

The energy charge significantly drops after cardiac arrest and cold ischemia (ischemic periods) and recover after normothermic recirculation and reperfusion ($p < 0,01$). These changes were similar during the study in the two groups.

	B	CA	NR	IR	RP
Plasma HA (%)					
Control	100	200.3±80.2	473.2±391.9	760.1± 362.8	1337.7±679.5
L-Arginine	100	169.1±66.5	385.3±262.4	575.9±426.1	984.7±717.1
Hepatic HA extraction					
Control	2.3±13.7	n.d.	-4.2±18.2	n.d.	-10.9±15.5
L-Arginine	19.2±40.8	n.d.	38.8±53.7 ^a	n.d.	28.6±55.5 ^a
α-GST (%)					
Control	100	85.4±40.7	515.6±328.4	1009± 413	6488±5612
L-Arginine	100	101.4±21.1	354.9±439.5	1304±1225	1325±1098 ^a
Energy charge					
Control	100	82.1±18.0	106.9±27.7	90.4±23.3	119.8±38.2
L-arginine	100	87.9±23.8	102.9±38.3	90.8±28.4	133.6±31.9

Table 1: Changes in the plasma levels of hyaluronic acid and α-Glutathione-s-transferase, hepatic extraction of hyaluronic acid and hepatic tissue energy charge in control group and L-arginine group.

Hyaluronic acid (HA); α-Glutathione-s-transferase (α-GST); Baseline (B), after cardiac arrest (CA), at the end of normothermic recirculation (NR), immediately after reperfusion (IR) and one hour after reperfusion (RP). Non-determined value (n.d.); Values of plasma levels of hyaluronic acid and α-Glutathione-s-transferase, and hepatic tissue energy charge are expressed as percentage variation respect to baseline. Extraction of HA by the liver was calculated by the following equation (28) : HA Extraction = (Arterial HA - Suprahepatic vein HA) * 100 / Arterial HA. (^a p<0.05 respect control group).

Flows and oxygen metabolism during normothermic recirculation

Pump blood flow increased quickly during normothermic recirculation in both groups. However, higher flows were recorded throughout the study period in the L-arginine group as compared to the Control group (FIG 3). Mean pump blood flow during the whole normothermic recirculation period were $2.94 \pm 0.40 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ in the L-arginine group and $1.75 \pm 0.31 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ in the Control group ($p < 0.001$). Portal blood flow and hepatic artery blood also rapidly recovered during normothermic recirculation in both groups. However, whereas portal blood flow was significantly higher at all stages during the normothermic recirculation period in the L-arginine group ($F = 3.6$; $p < 0.05$), no differences were observed in the hepatic artery blood flow between groups (FIG 3).

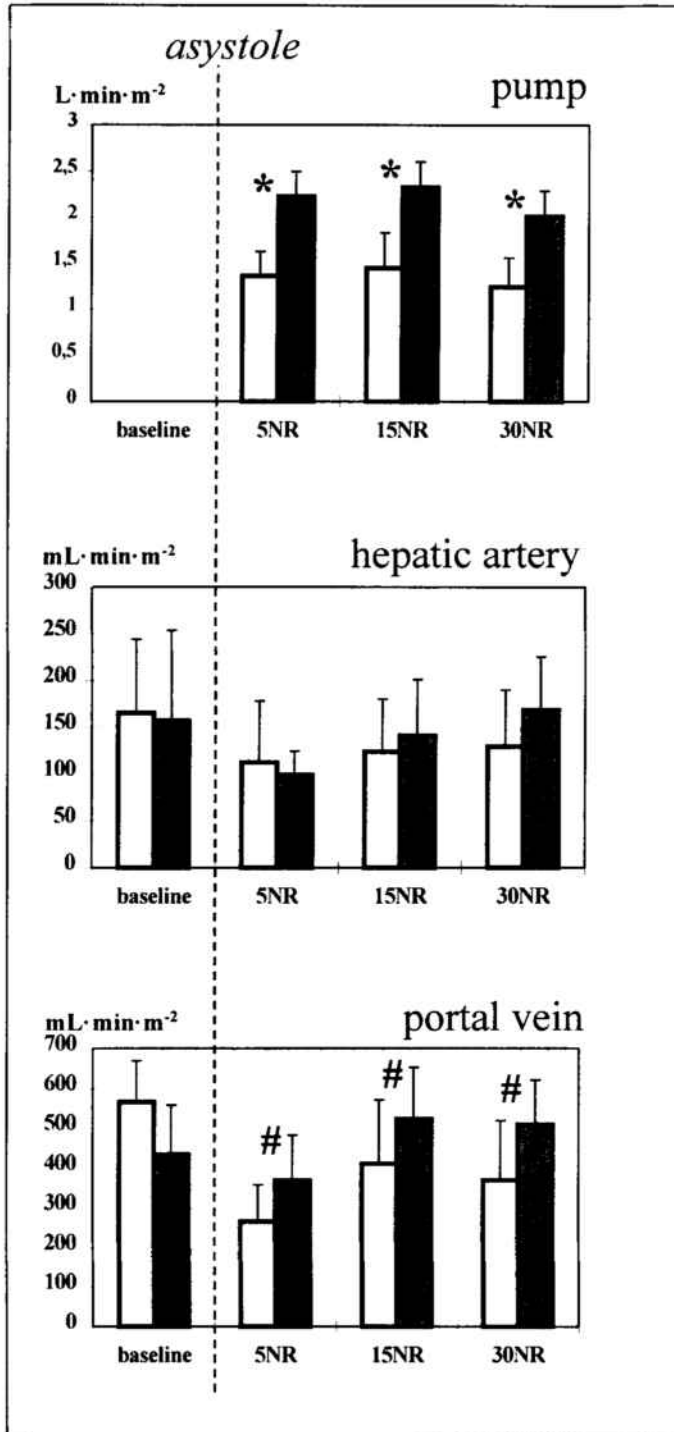


Figure 3: Extracorporeal pump blood flow, portal blood flow and hepatic artery blood flow in L-arginine group (shaded bars) and control group (open bars). B: Baseline values; 5NR, 15NR, 30NR: values obtained 5, 15 and 30 minutes after the onset of normothermic recirculation. (Values expressed as mean \pm standard deviation). *

comparison between groups: ($F= 20.9$; $p<0.001$); # comparison between groups: ($F= 3.6$; $p<0.05$).

During normothermic recirculation there was a strong relationship between pump blood flow and portal blood flow ($r=0,64$; $p<0,001$) and total hepatic blood flow ($r=0.59$; $p<0.001$)(FIG 4). Such relationship, however was not observed with hepatic artery blood flow. As expected considering the higher hepatic blood flow, the time the liver needed to reach 15°C (cooling time) was shorter in the L-arginine group (8.44 ± 2.30 min vs. 14.40 ± 4.06 min; $p=0.001$).

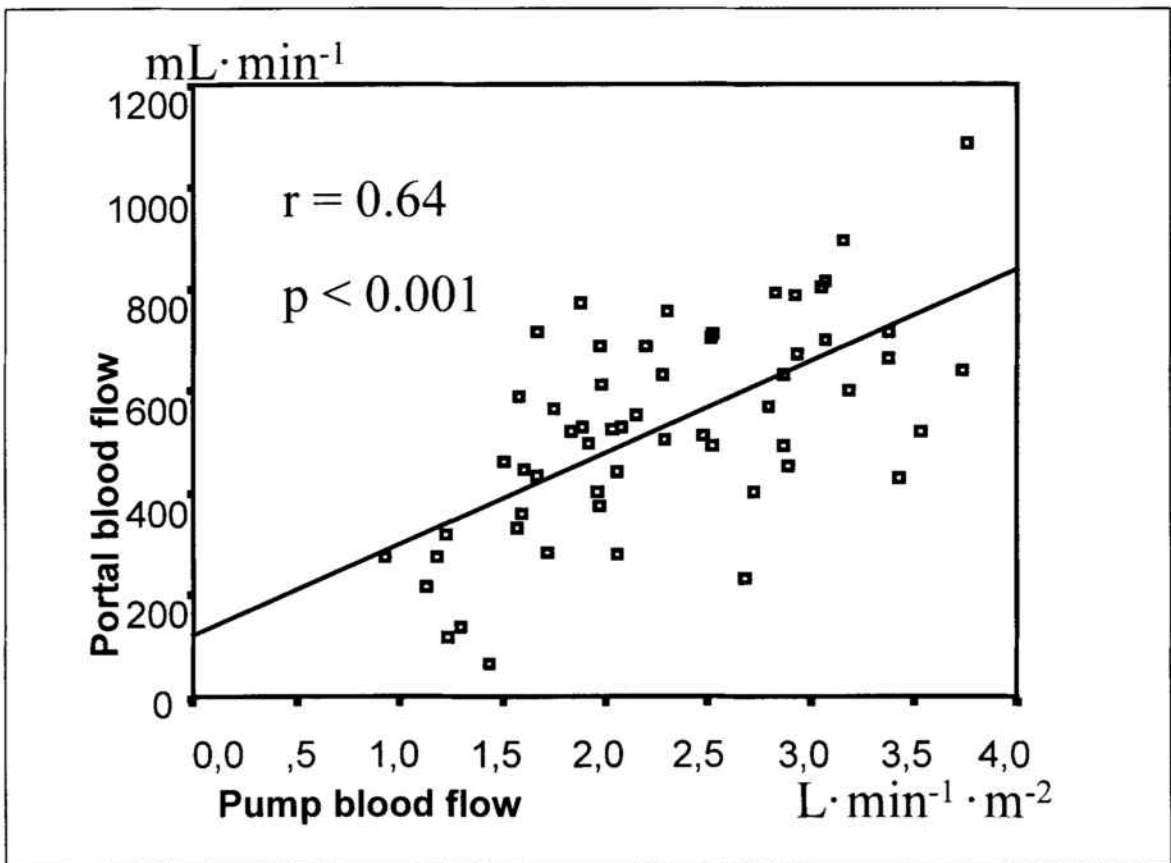


Figure 4: Significant Correlation (Spearman test) between pump blood flow and portal blood flow during normothermic recirculation.

The oxygen content in the portal vein and hepatic artery during normothermic recirculation was markedly decreased as compared to baseline in L-arginine and control animals, with no significant differences between both groups at any time period (5, 15 and 30 minutes) (FIG 5).

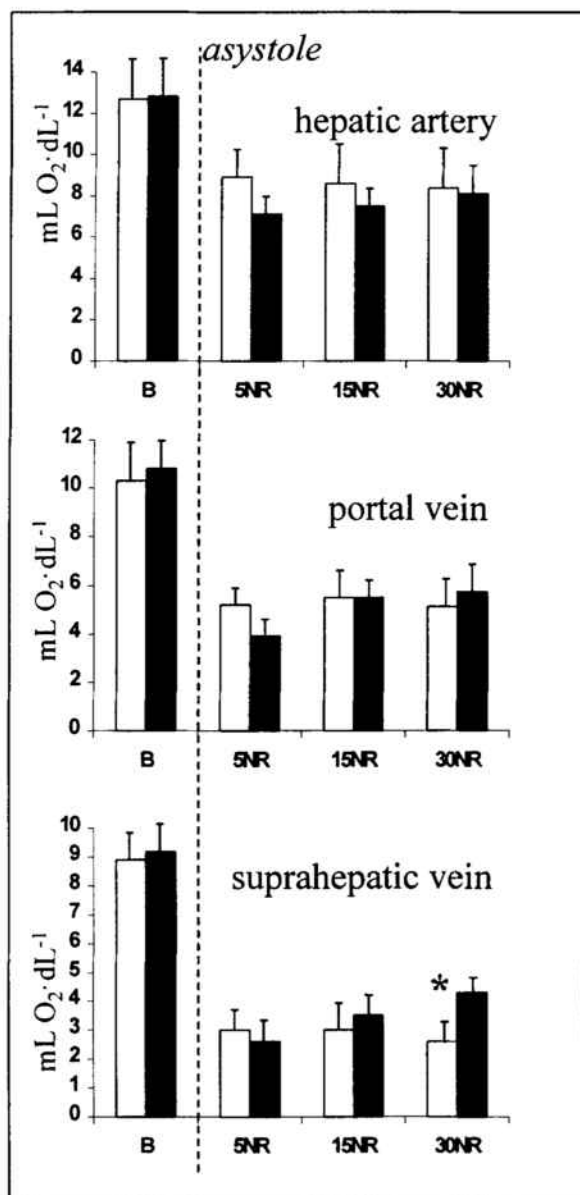


Figure 5: Oxygen content in hepatic artery, portal vein and suprahepatic vein in L-arginine group (shaded bars) and control group (open bars). B: Baseline values; 5NR, 15NR, 30NR: values obtained 5, 15 and 30 minutes after the onset of

normothermic recirculation. (Values expressed as mean \pm standard deviation). * comparison between groups: ($F= 5,99$; $p<0.001$).

Oxygen delivery to the liver also decreased markedly during normothermic recirculation. However, since the hepatic blood flow was lower in the control group, the percent decrease in oxygen delivery to the liver was significantly greater in this group of animals ($F: 7,69$; $p<0,01$) (FIG 6). Consequently, suprahepatic oxygen content was significantly higher in the L-arginine group than in the Control group at the end of normothermic recirculation ($F=5.99$; $p=0,001$). (FIG 5).

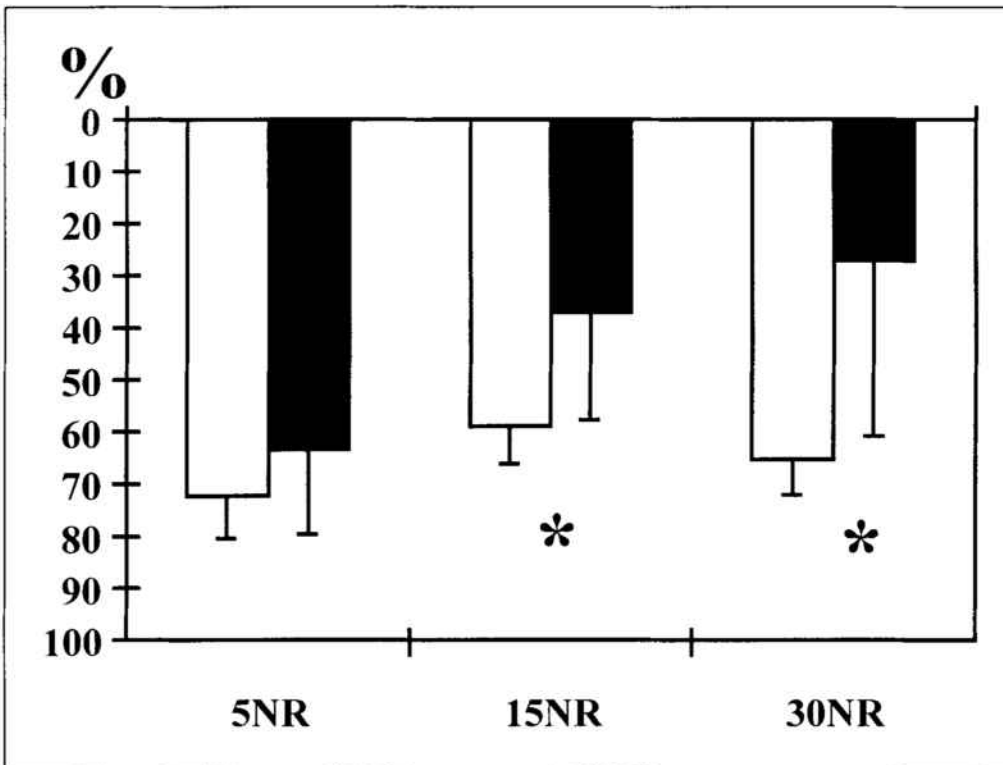


Figure 6: Percentage decrease in oxygen delivery to the liver in L-arginine group (shaded bars) and control group (open bars) respect to baseline values. 5NR, 15NR, 30NR: values obtained 5, 15 and 30 minutes after the onset of normothermic recirculation. (Values expressed as mean \pm standard deviation). * comparison between groups: ($F= 7,69$; $p<0.01$).

DISCUSSION

Before discussing the study, it is important to point out that our experimental model has been designed to assess the beneficial effect of the administration of L-arginine during liver procurement of grafts obtained from non heart beating donor with the use of normothermic recirculation. This complex model has been previously described elsewhere (13,14). It introduces two periods of ischemia: a first 40-minute period of warm ischemia and a second 5-hour period of cold ischemia. Between these two periods a 30 minute normothermic recirculation period is interposed. In addition a period of reperfusion is produced following implantation in the recipient. Finally, the surgical procedure during procurement and transplantation introduces additional variables in the model. Therefore, this is an experimental liver transplantation model from non-heart beating donors and should not be regarded as a pure model of ischemia reperfusion injury, although ischemia reperfusion may be an important mechanism of liver damage. Liver damage following ischemia reperfusion is a complex process with many pathophysiological mechanisms including impairment of microcirculatory function, leukocyte adhesion and platelet aggregation, increased oxygen free radical production, lipoperoxidation, and hipoxia (33-36). Several lines of evidence suggest that a reduced activity of NO may be involved in the pathogenesis of ischemia reperfusion injury. NO synthesis may be reduced during ischemia reperfusion due to endothelial cell damage and low L-arginine availability secondary to a high amount of arginase release from the ischemic liver (37). NO inhibition aggravates ischemia reperfusion injury (19,21,35,38). L-arginine administration improves ischemia reperfusion injury in several pure models of ischemia reperfusion (17-19,22). It has been shown that L-arginine given during reperfusion in the recipient produces an increase in portal venous blood flow (39) and hepatic tissue blood flow (17,34,35). Finally, NO is known to be a powerful portal and

arterial vasodilator, inhibits leukocyte adhesion and platelet aggregation, and may act as a cytotoxic superoxide radical scavenger (35). The current study was designed on the basis of these data. We wanted to investigate whether the administration of L-arginine, the precursor of NO synthesis, improves the results of liver transplantation from non heart beating donor using normothermic recirculation.

The results of the current study clearly shows that the use of exogenous L-arginine markedly reduces liver damage following experimental liver transplantation from NHBD. First, all hepatic histological parameters obtained five days after transplantation were significantly worse in the control group than in the L-arginine group. Particular attention should be given to the extension of liver necrosis which was four times lower in the L-arginine group. These results are in agreement with those regarding the plasma levels of α -GST which reach significantly higher levels at the time of reperfusion in the recipient in the control group as compared to L-arginine group. Endothelial cell damage as estimated from the hepatic HA extraction was also significantly higher in the control group.

The most important problem of liver transplantation from NHBD is the extremely frequent development of severe and irreversible damage of the intrahepatic biliary tract in the graft of those pigs which survives after transplantation (15). The results of the current study confirms this feature, since this complication developed in eight out of nine pigs from the control group who survived the study period. The administration of L-arginine was also very effective in preventing the occurrence of biliary lesions following transplantation. Only one out of eight survivors in this group showed necrosis of the biliary tract.

Pump blood flow during cardiopulmonary bypass mainly depends on venous blood return and this is probably related to microcirculatory function (40,41). In the current study, L-arginine administration was associated with a significantly higher pump blood flow. On the other hand, pump blood flow was directly related to hepatic blood flow. Considered together, these data suggest that during liver procurement from NHBD there is an impairment in systemic circulatory function that adversely affect hepatic blood flow and that these events are prevented by the administration of L-arginine. Therefore, it is possible that the beneficial effect of L-arginine administration on liver and biliary tract damage after transplantation may be related to an improvement in the circulatory changes associated to the procedure. The observation that changes in HA extraction (endothelial damage) precede the increase in the plasma levels of GST (hepatocellular damage) is consistent with this contention. These results confirm previous findings which suggest a difference in onset of warm ischemia-reperfusion injury between parenchymal and endothelial cells of the liver (42).

Unfortunately, we did not measure any marker of nitric oxide production such as nitrite and nitrate determination. In that way, we can just suggest but not demonstrate that the actual effect of L-arginine was due to the enhanced nitric oxide production. However, some studies in the reviewed literature support our findings, suggesting NO production as the most feasible way to explain L-arginine improvement over the ischemia reperfusion injury, although no modification of the nitrite/nitrate system have been demonstrated by these studies (38,39).

In summary, the administration of L-arginine in an experimental model of liver procurement and transplantation from NHBD, was associated with a dramatic decrease in hepatic cell necrosis and biliary tract damage. The most likely mechanism of this

beneficial effect is an improvement in systemic circulatory function and increase in hepatic blood flow. Further studies are needed to assess whether this effect of L-arginine administration is long standing. The results suggest that L-arginine administration may be useful during liver procurement and transplantation from non heart beating donors through normothermic recirculation in the human setting.

REFERENCES

- 1.-Cho YW, Terasaki PI, Cecka JM, Gjertson DW. Transplantation of kidneys from donors whose hearts have stopped beating. *N Engl J Med* 1998; 338:221-5.
- 2.-Valero R, Sánchez J, Cabrer C, Salvador L, Oppenheimer F, Manyalich M. Organ procurement from non-heart-beating donors through in situ perfusion or total body cooling. *Transplant Proc* 1995; 27: 2899-900.
- 3.-Casavilla A, Ramirez C, Shapiro R, et al. Experience with liver and kidney allografts from non-heart-beating donors. *Transplantation* 1995; 59: 197-203.
- 4.-Schon M, Hunt C, Pegg D, Wion D. The possibility of resuscitating liver after warm ischemic injury. *Transplantation* 1993;56:24-31.
- 5.-D'Alessandro A, Hoffmann RM, Knechtle SJ, et al. Successful extrarenal transplantation from non-heart-beating donors. *Transplantation* 1995; 59: 977-82.
- 6.-Takada Y, Taniguchi H, Fukunaga K, et al. Hepatic allograft procurement from non-heart-beating donors. Limits of warm ischemia in porcine liver transplantation. *Transplantation* 1997;63: 369-73.
- 7.-Tojimbara T, Kennedy RG, Burns W, et al. The use of non heart beating cadaver donors in experimental liver transplantation. *Transplantation* 1995; 60:1179-86.
- 8.-Wijnen RMH, Booster MH, Stubenitsky BM, de Boer J, Heineman E, Kootstra G. Outcome of transplantation of non-heart-beating donor kidneys. *Lancet* 1995; 345:1067-1070.
- 9.-Tabet J, Garcia-Valdecasas JC, Net M, et al. Evaluation of the ischemic liver injury during graft procurement from non heart beating donor pigs (NHBD). *Transplant Proc* 1997; 29:3482-3.
- 10.-Hoshino T, Koyama I, Nagashima N, Kadokura M, Kazui M, Omoto R. Transplantation of livers from non-heart beating donors is possible by core cooling technique. *Transplant Proc* 1989, 21:3519.
- 11.-Koyama I, Ogawa N, Watanabe T, et al. Utilization of warm ischemic livers from non-heart beating donors by portable cardiopulmonary bypass and heterotopic transplantation. *Transplant Proc* 1996; 28:1878-9.
- 12.-Shirakura R, Kamiike W, Matsumura A, et al. Multiorgan procurement from non-heart-beating donors by use of Osaka University cocktail, Osaka Rinse Solution, and the portable cardiopulmonary bypass machine. *Transplant Proc* 1993; 25: 3093-4.

- 13.-Valero R, García Valdecasas JC, Tabet J, et al. Hepatic blood flow and oxygen extraction ratio during normothermic recirculation and total body cooling as viability predictors in non-heart-beating donor pigs. *Transplantation* 1998; 66:170-6.
- 14.- García Valdecasas JC, Tabet J, Valero R, et al. Liver conditioning after cardiac arrest: the use of normothermic recirculation in an experimental model. *Transplant Int* 1998; 11: 424-32.
- 15.-Lopez-Boado MA, García-Valdecasas JC, Ordi J, et al. Histological changes during and after liver transplantation from NHBD pig. *Transplant Proc* 1997; 29:3471.
- 16.-Palmer RMJ, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 1988;333:664-6.
- 17.- Shiraishi M, Hiroyasu S, Nagahama M, et al. Role of exogenous L-arginine in hepatic ischemia-reperfusion injury. *J Surg Res* 1997; 69:429-34.
- 18.-Uhlmann D, Scommtau S, Witzigmann H, Spiegel HU. Exogenous L-arginine protects liver microcirculation from ischemia reperfusion injury. *Eur Surg Res* 1998; 30:175-84.
- 19.-Jones SM, Thurman RG. L-arginine minimizes reperfusion injury in a low-flow, reflow model of liver perfusion. *Hepatology* 1996; 24: 163-8.
- 20.- Payne D, Kubes P. Nitric oxide donors reduce the rise in reperfusion-induced intestinal mucosal permeability. *Am J Physiol* 1993; 265:G189.
- 21.- Peralta C, Hotter G, Closa D, Gelpi E, Bulbena O, Rosello-Catafau J. Protective effect of preconditioning on the injury associated to hepatic ischemia-reperfusion in the rat: role of nitric oxide and adenosine. *Hepatology* 1997;25:934-7
- 22.-Koeppel TA, Thies JC, Schemmer P, et al. Inhibition of nitric oxide synthesis in ischemia/reperfusion of the rat liver is followed by impairment of hepatic microvascular blood flow. *J Hepatol* 1997; 27:163-9.
- 23.-Calne R. Technique in the pig. In: Calne RY, ed. *Liver transplantation*. London: Grune and Stratton, 1983 :9.
- 24.- Trull AK, Facey SP, Rees GW, et al. Serum α -glutathion s-transferasa. A sensitive marker of hepatocellular damage associated with acute liver allograft rejection. *Transplantation* 1994; 58:1345-51.
- 25.- Eriksson S, Fraser J, Laurent T, Pertoft H, Smedsrod B. Endothelial cells are a site of uptake and degradation of hyaluronic acid in the liver. *Exp Cell Res* 1983; 144:223-8.

- 26.-Soejima Y, Yanaga K, Wakiyama S, Nishizaki T, Yoshizumi T, Sugimachi K. Serum hyaluronic acid as a reliable parameter of allograft viability in porcine liver transplantation. *Hepatology* 1996; 43:590-5.
- 27.- Deaciuc I, Bagby G, Lang C, Spitzer J. Hyaluronic acid uptake by the isolated, perfused rat liver: an index of hepatic sinusoidal endothelial cell function. *Hepatology* 1993; 17:266-72.
- 28.- Kamachi H, Nakajima Y, Isai H, et al. Study of liver function in a graft suffering from warm ischemia in porcine liver transplantation. *Transplant Proc* 1996; 28:1789-91.
- 29.- Dulkanchainun TS, Goss JA, Imagawa DK, et al. Reduction of hepatic ischemia/reperfusion injury by a soluble P-selectin glycoprotein ligand-1. *Ann Surg* 1998;227: 832-40
- 30.- Cursio R, Gugenheim J, Panaia-Ferrari P, et al. Improvement of normothermic rat liver ischemia/reperfusion by muramyl dipeptide. *J Surg Res* 1998; 80:339-44.
- 31.- Turlin B, Slapak GI, Hayllar KM, Heaton N, Williams R, Portmann B. Centrilobular necrosis after orthotopic liver transplantation: a longitudinal clinicopathologic study in 71 patients. *Liver Transpl Surg* 1995;1:285-9.
- 32.- Ludwig J, Batts KP, MacCarty RL. Ischemic cholangitis in hepatic allografts. *Mayo Clin Proc* 1992; 67:519-526.
- 33.- Takei Y, Marzi I, Gao W, Gores GJ, Lemasters JJ, Thurman RG. Leukocyte adhesion and cell death following orthotopic liver transplantation in the rat. *Transplantation* 1991; 51:959-65.
- 34.- Pannen BH, Al-Adili F, Bauer M, Clemens MG, Geiger KK. Role of endothelins and nitric oxide in hepatic reperfusion injury in the rat. *Hepatology* 1998;27:755-764.
- 35.- Kobayashi H, Nonami T, Kurokawa T, et al. Role of endogenous nitric oxide in ischemia reperfusion injury in rat liver. *J Surg Res* 1995; 59:772-9.
- 36.-Vollmar B, Glasz J, Leiderer R, Post S, Menger MD. Hepatic microcirculatory perfusion failure is a determinant of liver dysfunction in warm ischemia-reperfusion. *Am J pathol* 1994; 145:1421-31.
- 37.-Roth E, Steininger R, Winkler S, et al. L-arginine deficiency after liver transplantation as an effect of arginase efflux from the graft. Influence on nitric oxide metabolism. *Transplantation* 1994; 57: 665-9.

- 38.- Cottart CH, Do L, Blanc MC, Vaubourdolle M, et al. Hepatoprotective effect of endogenous nitric oxide during ischemia reperfusion in the rat. *Hepatology* 1999; 29:809-813.
- 39.- Längle F, Steininger R, Waldmann E, et al. Improvement of cardiac output and liver blood flow and reduction of pulmonary vascular resistance by intravenous infusion of L-arginine during the early reperfusion period in pig liver transplantation. *Transplantation* 1997; 63:1225-33.
- 40.- Mora CT. Cardiopulmonary bypass. Principles and techniques of extracorporeal circulation. New York: Springer-Verlag, 1995.
- 41.- Hessel EA. Cardiopulmonary bypass circuitry and cannulation techniques. In: Gravlee GP, Davis RF, Utley JR, eds. *Cardiopulmonary bypass. Principles and practices*. Baltimore: Williams and Wilkins, 1993; 55-92.
- 42.- Nakagami M, Morimoto T, Mitsuyoshi A, Mashima S, Shimabukuro T, Yamaoka Y. Difference in onset of warm ischemia and reperfusion injury between parenchymal and endothelial cells of the liver. Evaluation by purine nucleoside phosphorylase and hyaluronic acid. *J Surg Res* 1996; 62:118-24.

TRANSPLANTATION

European Editors

Peter J Morris
James Neuberger
Kathryn J Wood

European Editorial Office

Nuffield Department of Surgery
University of Oxford
John Radcliffe Hospital
Oxford OX3 9DU
United Kingdom
Tel no +44 (0)1865 221310
Fax no +44 (0)1865 763545
Email transplantation@nds.ox.ac.uk

Reference: (please quote in all correspondence) E/1999/000544

March 22, 2000

Dr Juan C. Garcia-Valdecasas
Institut de Malalties Digestives
Hospital Clinic de Barcelona
Villarroel 170
E-08036 Barcelona
Spain

Dear Dr Garcia-Valdecasas

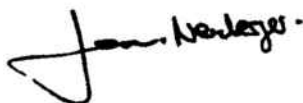
Thank you for your revised paper entitled, "L-arginine reduces liver and biliary tract damage after liver transplantation from non-heart-beating donor pigs".

You have met the referees' criticisms satisfactorily and I am happy to accept your paper for publication in "*Transplantation*".

The manuscript has been forwarded to the publishers and you should receive the proofs in a few months' time.

With best wishes.

Yours sincerely



Professor James Neuberger
EDITOR

5. DISCUSSIÓ GLOBAL

És indubtable avui en dia que els donants a cor parat representen una alternativa molt eficaç per a l'obtenció d'òrgans per a trasplantament.

El problema principal que presenten els ronyons procedents de donants a cor parat respecte als de donants en mort encefàlica consisteix en l'alta incidència de retard en el funcionament de l'empelt (RFE) i l'alt percentatge de ronyons que mai arriben a funcionar. En els grups més experimentats l'RFE oscil·la entre un 48 i un 78,4% i els ronyons que mai funcionen entre un 4 i un 19%^(124,132-138). Els nostres resultats, amb una incidència del 52% i 16%, respectivament, són molt similars als descrits. L'RFE augmenta la durada de l'ingrés hospitalari i, a més, s'ha relacionat amb un empitjorament de la funció de l'empelt a llarg termini^(150,151). Ojo i col·laboradors⁽¹⁵¹⁾ troben una forta relació entre l'RFE i la funció renal, i consideren l'RFE com un factor de risc independent per a la supervivència de l'empelt a curt i llarg termini. Altres autors, malgrat tot, no troben aquesta relació^(3,137,152).

Els fetges de donants a cor parat són igualment considerats com una font potencial d'òrgans per a trasplantament^(145,147,153,154). Malauradament, l'obtenció d'aquests òrgans presenta greus dificultats atesa la mala tolerància del fetge a períodes d'isquèmia perllongats. Encara que alguns treballs clínics i experimentals suggereixen que el fetge podria resistir temps d'isquèmia calenta fins a 60 minuts, aquestes experiències són limitades i poc documentades^(113,155-157). Qualsevol mètode aplicable a l'obtenció de fetges de donant a cor parat hauria d'aturar la lesió isquèmica, i si és possible, revertir-la⁽¹¹³⁾.

Per millorar els resultats del trasplantament d'òrgans de donant a cor parat, s'han desenvolupat diverses tècniques per a la perfusió i la preservació dels òrgans abans i després de l'extracció. En primer lloc, s'han dissenyat diferents modificacions de la tècnica de perfusió *in situ*. S'han assajat diversos tipus de catèters^(75,76), diferents tipus de líquid de perfusió^(82,158,67), o l'addició de drogues al líquid de perfusió, com ara trifluoroperazina⁽⁷⁵⁾, tolazolina⁽⁸¹⁾ o fentolamina⁽⁸⁾. Malgrat tot, els resultats amb aquesta tècnica no han estat òptims. En la nostra sèrie de ronyons perfosos amb la tècnica *in situ*, la incidència de ronyons que no van funcionar mai va ser del 22,5% (lleugerament superior al d'altres sèries), l'RFE del 55% i la supervivència de l'empelt del 71,8% al cap d'un any i del 50% al cap de cinc anys, similar a la d'altres sèries. Altres tècniques, com ara el refredament intraperitoneal de superfície^(75,135,78) o el massatge cardíac i la ventilació mecànica aïllada fins a l'extracció⁽¹⁴⁴⁾ també s'han emprat amb el mateix propòsit.

Després dels resultats favorables en la preservació de cor i pulmó amb la perfusió corporal total mitjançant circulació extracorpòria i en la seva utilització per a les extraccions multiorgàniques^(159,99), la tècnica de refredament corporal total mitjançant derivació cardiopulmonar s'ha usat en donants d'òrgans a cor parat amb bons resultats, tant per a l'obtenció de ronyons^(160,161), fetges^(97,162) o altres òrgans⁽¹⁶³⁾. Emprant aquesta tècnica, nosaltres no vam poder reduir la incidència d'RFE però sí que vam reduir-ne la durada quan apareixia, des de $22,3 \pm 16,1$ dies quan la tècnica emprada era la perfusió *in situ*, fins a $13,4 \pm 4,4$ dies amb el refredament corporal total. Encara més, tots els ronyons van funcionar en aquest grup, i cal comparar-ho amb els 9 de 40 que no ho van fer en el grup de perfusió *in situ*. Una millor qualitat de la hipotèrmia, més suau,

progressiva i ràpida i una millor pressió de perfusió poden ser els factors que expliquin aquestes diferències^(99,102,75). Tot això s'ha d'afegir al benefici addicional que implicaria l'oxigenació contínua dels òrgans durant el període de refredament⁽⁹⁷⁾.

En aquest sentit, també per al fetge, s'han dissenyat diferents tècniques amb la intenció de millorar-ne la viabilitat^(143,164). El refredament corporal total amb derivació cardiopulmonar s'ha assajat com un mètode que podria ser útil^(106,140,165). Malgrat tot, la recuperació del fetge només ha estat possible després de temps d'isquèmia calenta molt curts⁽¹⁰⁶⁾. En la nostra experiència, aquesta tècnica de refredament corporal total no és suficient per garantir la viabilitat dels empelts hepàtics després de 20 minuts d'isquèmia calenta.

Finalment, la recirculació normotèrmica ha estat la tècnica que ha demostrat millors resultats en la nostra sèrie de trasplantament renal, ja que reduïa l'RFE i millorava la viabilitat. Tots els ronyons perfosos amb la recirculació normotèrmica van funcionar i només 1 de 8 ronyons trasplantats van presentar RFE. D'altra banda, en els nostres estudis experimentals hem confirmat que la viabilitat de l'empelt hepàtic després de 20 a 40 minuts d'aturada cardíaca és possible utilitzant la recirculació normotèrmica.

La recirculació normotèrmica amb derivació cardiopulmonar i oxigenació tissular a 37°C durant un període de temps previ al refredament corporal total pot millorar l'estat energètic tissular que apareix malmès després d'un període d'isquèmia calenta, secundària en aquest cas a l'aturada cardíaca, i, d'aquesta manera, millorar la viabilitat de l'empelt^(97,106,102,165-168).

Aquesta millora de la funció de l'empelt, tant renal com hepàtica, pot explicar-se per diferents raons. En primer lloc, la sang ha evidenciat ser millor líquid de preservació que els cristal·loides, per tal de recuperar els teixits lesionats^(97,109,111,112,168). En estudis previs, Van der Wijk i col·laboradors⁽¹⁰⁹⁾ van millorar la preservació i viabilitat de ronyons preservats en fred durant tres dies mitjançant una perfusió *ex vivo* de sang normotèrmica durant 3-4 hores. Aquests resultats van ser confirmats per altres autors^(110,111). Mayfield i col·laboradors⁽¹¹²⁾ van demostrar una millora en la capacitat de controlar l'edema tissular i l'activitat de les bombes iòniques en ronyons perfosos amb sang, cosa que suggeriria una millor integritat de membrana que en els ronyons no preservats amb aquesta tècnica. Altres estudis experimentals en trasplantament renal i hepàtic han demostrat la utilitat de la recirculació normotèrmica per recuperar els nivells de nucleòtids d'adenina després de la isquèmia calenta^(114-116,169), per incrementar els nivells de glutatió en el ronyó i el fetge abans de l'emmagatzematge en fred⁽¹¹⁴⁾ i per incrementar la viabilitat posttrasplantament⁽¹¹⁵⁾. Rijkmans i col·laboradors suggereixen que és possible prevenir el dany isquèmic irreversible mitjançant la perfusió amb sang normotèrmica⁽¹⁶⁸⁾. D'acord amb aquests estudis, nosaltres hem trobat una clara millora de la funció de l'empelt quan es va afegir un període de recirculació normotèrmica durant l'obtenció dels òrgans.

Com que el metabolisme cel·lular disminueix ràpidament a temperatures per sota de 37°C, Schon i col·laboradors, en un estudi experimental amb fetges perfosos *ex vivo*, postulen que la perfusió oxigenada normotèrmica després de l'extracció podria oferir la possibilitat de restaurar els processos metabòlics i reparar el dany cel·lular, resucitant així els fetges amb lesió isquèmica⁽¹¹³⁾. En aquest sentit la normotèrmia *per se* sembla

que podria tenir avantatges afegits sobre la preservació hipotèrmica, com així ho suggereixen treballs recents ^(170,171). La perfusió normotèrmica no tan sols permetria als òrgans recuperar el seu estat metabòlic sinó que, a més, permetria la valoració d'aquests prèviament al trasplantament⁽¹⁷⁰⁾.

* * * *

Tota tècnica d'obtenció d'òrgans hauria de permetre la valoració de la qualitat d'aquests abans de fer l'empelt⁽¹¹³⁾. El període de temps que dura la recirculació a 37°C permet mesurar la qualitat de l'òrgan abans de considerar-ne el trasplantament. D'aquesta manera alguns dels paràmetres mesurats i monitoritzats durant aquest període podrien esdevenir predictors de la viabilitat dels òrgans sotmesos a la isquèmia calenta. L'optimització dels fluxos de perfusió dels òrgans procedents de donants a cor parat és un dels objectius prioritaris de les tècniques de perfusió. La capacitat de mesurar i monitoritzar la perfusió tissular és un punt important en la valoració de la viabilitat⁽⁷⁵⁾. En els nostres estudis, la recuperació de nivells alts de flux sanguini portal durant la recirculació normotèrmica es va correlacionar amb una supervivència més alta de l'empelt hepàtic. La consecució d'aquests fluxos sanguinis, probablement de manera secundària a una menor lesió endotelial i de la microcirculació, permetria a aquests donants recuperar-se de les lesions isquèmiques prèvies.

La millor recuperació dels fluxos sanguinis hepàtics va evolucionar paral·lelament als millors fluxos de bomba, i es van trobar diferències significatives entre els d'aquells que van permetre la supervivència del receptor i els d'aquells que no ho van permetre. Aquest

fet és especialment important perquè la monitorització d'aquest paràmetre en l'aplicació clínica d'aquestes tècniques és molt fàcil i pot convertir-se aleshores en un paràmetre molt útil per monitoritzar la viabilitat dels òrgans.

En la pràctica clínica, el flux sanguini es pot incrementar de manera temporal amb l'addició de líquids a l'oxigenador dipòsit del circuit de derivació cardiopulmonar⁽¹⁰⁴⁾, quan el retorn venós no és suficient per mantenir una perfusió correcta del donant. Malgrat tot, una hemodilució excessiva reduiria el transport d'oxigen i reduiria l'efecte beneficiós de l'alliberament d'oxigen tissular.

Com hem esmentat anteriorment, el coneixement de l'estat metabòlic dels teixits sotmesos a isquèmia calenta podria ser útil per valorar-ne la viabilitat. Malgrat això, el consum d'oxigen tissular hepàtic després de períodes perllongats d'isquèmia no s'ha estudiat d'una manera àmplia⁽¹⁷⁰⁾. La relació entre el consum i l'aportament d'oxigen és una mesura indirecta de l'oxigenació tissular. L'extracció tissular d'oxigen (O_2ER) s'incrementa per mantenir un consum adequat en situacions de dèficit d'aportament i és un indicador precoç d'una alliberació inadequada d'oxigen. Nombrosos autors han suggerit que la reducció de la viabilitat dels òrgans sotmesos a isquèmia calenta perllongada està relacionada amb un empitjorament del metabolisme energètic^(106,157,172). En el nostre estudi, com més llarg va ser el temps d'isquèmia, més alta va ser l'extracció d'oxigen. Això suggeriria que el fetge isquèmic tracta de restaurar els nivells energètics, malmesos durant l'episodi isquèmic. Els fetges amb lesió isquèmica més greu, que van demostrar una HO_2ER superior, no eren capaços de recuperar l'estat metabòlic adequat i van presentar menys viabilitat. En els donants amb menys lesió isquèmica, la progressió

de la lesió es va poder reparar i el nivell energètic es va restaurar durant el període de recirculació normotèrmica. Això podria explicar l'efecte beneficiós de la recirculació normotèrmica en els nostres experiments. Com ja s'ha establert prèviament en altres estudis⁽¹¹³⁾, la reducció ràpida de la temperatura en el grup de control del nostre segon estudi, en el qual no es va dur a terme el període de recirculació normotèrmica, va disminuir ràpidament el metabolisme cel·lular sense temps a recuperar l'estat energètic deteriorat en el període d'isquèmia precedent, i aquest fet podria explicar les diferències de supervivència en aquest grup.

* * * *

D'altre banda, la possibilitat de fer modificacions sobre el període de recirculació normotèrmica, amb l'ús de drogues o canviant les característiques de la perfusió amb la derivació cardiopulmonar, podria millorar encara més la viabilitat de l'empelt i perllongar el temps d'isquèmia tolerable que garantis la seguretat del receptor.

Coneixent els efectes de la síndrome d'isquèmia reperfusió sobre la funció dels òrgans trasplantats, la possibilitat de la manipulació del període de recirculació normotèrmica per influir sobre la cadena fisiopatològica d'aquesta lesió podria ser molt interessant. Aquesta va ser la raó per la qual vam dur a terme el tercer treball d'aquesta tesi. L'estudi, malgrat tot, va ser dissenyat per valorar l'efecte suposadament beneficiós de l'administració d'L-arginina durant l'obtenció de fetges procedents de donant a cor parat amb l'ús d'aquesta tècnica de recirculació normotèrmica, sense pretendre transformar-se en un model d'estudi de la síndrome d'isquèmia-reperfusió. El fet que es tracti d'un

model complex amb dos períodes d'isquèmia (una de calenta, de 40 minuts, i una de freda, de 6 hores), amb dues fases de reperfusió (la produïda per la recirculació normotèrmica i la produïda en el receptor durant l'empelt), impedeix estudiar-ho com un model pur d'isquèmia reperfusió, encara que aquesta síndrome sigui, sens dubte, un mecanisme important de la lesió de l'empelt.

La lesió hepàtica a conseqüència de la isquèmia-reperfusió és un procés complex amb molts mecanismes fisiopatològics implicats, que inclouen l'empitjorament de la microcirculació, l'adhesió leucocitària, l'agregació plaquetària, una producció augmentada de radicals lliures d'oxigen, l'aparició de lipoperoxidació i hipòxia^(30,54,47,31).

La lesió de la cèl·lula endotelial, juntament amb la reducció de la disponibilitat d'L-arginina secundària a un augment de l'alliberació d'arginasa pel fetge isquèmic, semblen responsables d'una reducció de la síntesi d'òxid nítric durant la isquèmia-reperfusió⁽⁴⁴⁾.

La inhibició de l'òxid nítric empitjora la lesió per isquèmia-reperfusió, com s'ha demostrat en nombrosos estudis^(45,46,47,48). Al contrari, l'administració d'L-arginina

millora la lesió per isquèmia-reperfusió quan s'estudia en models purs d'isquèmia-reperfusió^(49,50,45,52). S'ha demostrat que l'L-arginina administrada durant la reperfusió en

el receptor produeix un increment del flux sanguini portal⁽⁵³⁾ i un augment del flux sanguini tissular hepàtic^(49,54,47). Finalment, l'òxid nítric és un poderós vasodilatador

arterial i portal, inhibeix l'agregació plaquetària i l'adhesió leucocitària i actua en contra dels radicals lliures superòxid⁽⁴⁷⁾. Els nostres resultats demostren clarament que l'ús d'L-

arginina exògena redueix la lesió hepàtica resultant del trasplantament del fetge provinent del donant hepàtic a cor parat. En primer lloc, va millorar tots els paràmetres histològics estudiats i, especialment, va reduir l'extensió de la necrosi hepàtica d'una

manera significativa. Aquests resultats histològics estan refermats per una lesió hepatocel·lular i endotelial menor, que es tradueixen, per un costat, en uns nivells plasmàtics d' α -GST més baixos i, per l'altre, en una afectació menor de l'extracció d'àcid hialurònic.

El problema més greu secundari al trasplantament hepàtic de donant a cor parat és el desenvolupament, de manera molt freqüent i greu, de lesió del tracte biliar intrahepàtic⁽¹⁷³⁾. Un llarg temps d'isquèmia calenta, fins a 40 minuts, s'ha relacionat amb una necrosi greu de la via biliar en aquells animals supervivents, i, encara que la funció hepatocel·lular pot estar preservada durant l'obtenció del fetge, la sensibilitat del tracte biliar a la lesió isquèmica afecta la supervivència a llarg termini. L'administració d'L-arginina durant la recirculació normotèrmica en el nostre estudi va ser igualment efectiva en la prevenció de l'aparició d'aquesta lesió biliar.

El flux de la bomba de derivació cardiopulmonar depèn fonamentalment del retorn venós que està probablement relacionat amb la funció microcirculatòria^(174,175). L'administració de L-arginina es va associar a un increment del flux de la bomba. D'altre banda, aquest flux de la bomba de derivació cardiopulmonar va estar directament relacionat amb el flux sanguini hepàtic i, especialment, el flux sanguini portal. Tot plegat fa pensar que durant el manteniment de la perfusió per a l'obtenció dels òrgans del donant a cor parat hi ha una alteració de la funció circulatoria sistèmica que afecta negativament el flux sanguini hepàtic, i que aquests efectes es poden prevenir amb l'administració d'L-arginina. Més encara, és possible que l'efecte beneficiós de

l'administració d'L-arginina pugui estar relacionada amb una millora de la microcirculació associada al procediment.

* * * *

Després d'analitzar els resultats d'aquest estudi podem extreure les conclusions que presentem tot seguit.

6. CONCLUSIONS

En relació amb el trasplantament renal:

1. La utilització dels ronyons de donants a cor parat ha augmentat el nombre de trasplantaments renals, amb una funció i supervivència posttrasplantament bones tant de l'empelt com del receptor.
2. La funció i supervivència de l'empelt renal depenen de la tècnica de perfusió emprada en l'obtenció dels ronyons.
3. La recirculació normotèrmica redueix la incidència de retard en el funcionament primari de l'empelt, presenta una incidència nul·la de fracàs primari de l'empelt i una tendència positiva a una millor supervivència a llarg termini comparada amb la perfusió *in situ* i el refredament corporal total.

En relació amb el trasplantament hepàtic:

4. La recirculació normotèrmica permet la utilització del fetge amb bona funció de l'empelt posttrasplantament, en el trasplantament hepàtic experimental.
5. Els fluxos sanguinis hepàtics, i especialment el flux de bomba, aconseguits durant la reperfusió normotèrmica depenen del temps d'isquèmia calenta, i són molt més reduïts com més llarg és el temps d'isquèmia al qual ha estat sotmès el donant a cor parat.
6. El flux sanguini portal i el flux de bomba durant la recirculació normotèrmica són més alts en els donants dels fetges que van permetre la supervivència del receptor, comparats amb els dels donants dels fetges que no van permetre la supervivència del receptor.

7. El flux de bomba durant la recirculació normotèrmica és un paràmetre predictiu de la supervivència del receptor de fetges procedents de donants a cor parat.
8. L'extracció hepàtica d'oxigen durant la recirculació normotèrmica augmenta comparat amb l'estat basal i és major com més llarg és el temps d'isquèmia calenta, com també és major en els donants dels fetges que no van permetre la supervivència del receptor, comparats amb els dels donants dels fetges que van permetre la supervivència del receptor.
9. L'addició d'L-arginina durant la recirculació normotèrmica, després de 40 minuts d'isquèmia calenta, s'associa a un augment dels fluxos sanguinis hepàtics i del flux de bomba.
10. L'addició d'L-arginina durant la recirculació normotèrmica redueix la lesió hepatocel·lular i la necrosi biliar en els fetges obtinguts de donants a cor parat després de 40 minuts d'isquèmia calenta.
11. La recirculació normotèrmica permet modificar i millorar les condicions de l'empelt hepàtic mitjançant l'addició de substàncies amb capacitat de reduir la lesió per isquèmia reperfusió.

Per tots aquests fets, la recirculació normotèrmica ha de ser la tècnica d'elecció en l'obtenció d'òrgans procedents de donant a cor parat.

7. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Kootstra G, Daemen JHC, Oomen APA. Categories of non-heart beating donors. *Transplant Proc* 1995; 27: 2893-2895.
- 2.- Kootstra G, Ruers TJM, Vroemen JPAM. The non-heart-beating donor: contribution to the organ shortage. *Transplant Proc* 1986; 18(5):1410-1412.
- 3.- Wijnen RMH, Booster Mh, Stubenitsky BM, De Boer J, Heineman E, Kootstra K. Outcome of transplantation of non-heart beating donor kidneys. *Lancet* 1995; 345:1067-1070.
- 4.- Ruers TJM, Vroemen JPAM, Kootstra G. Non-heart-Beating Donors: A successful contribution to organ procurement. *Transplant Proc* 1986; 18:408-410.
- 5.- Maessen JG, Van der Vusse GJ, Vork M, Coumans WA, Kootstra G. Assessment of warm ischemia time in donor kidneys by analysis of purine metabolism. *Transplant Proc* 1987; 19(1):1365-1366.
- 6.- Maessen JG, Van der Vusse GJ, Vork M, Coumans WA, Kootstra G. Determination of warm ischemia time at donor nephrectomy. *Transplantation* 1988; 45(1):147-152.
- 7.- Maessen JG, Van Der Vusse GJ, Vork M, Kootstra G. Inability to maintain Adenine nucleotide levels by cold storage in ischemically damaged and control Kidneys. *Transplant Proc* 1987; 19(5):4112-4115.
- 8.- Booster MH, Wijnen RMH, Ming I, Vroemen JPAM, Kootstra G. In situ perfusion of kidneys from non-heart beating donors: The Maastricht protocol. *Transplant Proc* 1993; 25:1503-1504.
- 9.- Heineman E, Daemen JHC, Kootstra G. Non-heart-beating donors: Methods and Techniques. *Transplant Proc* 1995; 27:2895-2897.
- 10.- Kozaki M, Matsuno N, Tamaki T, et al. Procurement of kidney grafts from non-heart-beating donors. *Transplant Proc* 1991; 23:2575-2578.
- 11.- Rigotti P, Morpurgo E, Comandella MG, et al. Non-heart-beating donors: an alternative organ source in kidney transplantation. *Transplant Proc* 1991; 23:2579-2580.
- 12.- Mela L. Mitochondrial function in shock, ischemia and hypoxia. In: Cowley RA TB ed. *Pathophysiology of shock, anoxia and ischemia*. Baltimore: Williams & Wilkins Company, 1982:84-94.
- 13.- Belzer F. Principles of solid organ preservation by cold storage. *Transplantation* 1988; 45:673-676.
- 14.- Belzer F. Principles of organ preservation. *Transplant Proc* 1988; 20:925-927.

- 15.- Holloway C, Harvey P, Mullen J, Starsberg S. Evidence that cold preservation-induced microcirculatory injury in liver allografts is not mediated by oxygen-free radicals or cell swelling in the rat. *Transplantation* 1989; 48:179-188.
- 16.- Parks DA, Williams TK, Beckman JS. Conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemic rat intestine: a reevaluation. *Am J Physiol* 1988; 254:G768-G774.
- 17.- Granger DN, McCord JM, Parks DA, Hollwarth ME. Xanthine oxidase inhibitors attenuate ischemia-induced vascular permeability changes in the cat intestine. *Gastroenterology* 1986; 90(1):80-84.
- 18.- Jaeschke H. Reactive oxygen and ischemia/reperfusion injury of the liver. *Chem Biol Interactions* 1991; 79:115-136.
- 19.- McCord J. Oxygen derived free radical in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 1985; 312:159-163.
- 20.- Nauta R, Tsimoyiannis E, Uribe M, Walsh D, Miller D, Butterfield A. The role of calcium ions and calcium channel entry blockers in experimental ischemia-reperfusion-induced liver injury. *Ann Surg* 1991 ;213:137-142.
- 21.- Rysma B, Wang J, Groot H. O₂⁻ release by activated Kupffer cells upon hypoxia-reoxygenation. *Am J Physiol* 1991; 261:602-607.
- 22.- Parks D. Ischemia-reperfusion injury: a radical view. *Hepatology* 1988; 83:680-682.
- 23.- Atalla S, Toledo-Pereira L, Mackenzie G, Cederna J. Influence of oxygen-derived free radical scavengers on ischemic livers. *Transplantation* 1985; 40:584-590.
- 24.- Frederiks W, James J, Bosch K, Schröder M, Schuyt H. A model for provoking ischemic necrosis in rat liver parenchyma and its quantitative analysis. *Exp Path* 1982; 22:245-252.
- 25.- Parks D, Granger D. Ischemia induced vascular changes: role of xanthine oxidase and hydroxyl radicals. *Am J Physiol* 1983; 245:285-288
- 26.- Marubayashi S, Dohi K, Ochi K, Kawasaki T. Role of free radicals in ischemic rat liver cell injury: prevention of damage by alfa-tocopherol administration. *Surgery* 1986; 99:184-191.
- 27.- Jaeschke H, Farhood E, Smith C. Neutrophils contribute to ischemia/reperfusion injury in rat liver in vivo. *FASEB J* 1990; 4:3355-3359.

- 28.- Palmblan J, Lerner R, Larson S. Signal transduction mechanism for leukotriene B4 induced hyperadhesiveness of endothelial cells for neutrophils. *J Immunol* 1994; 152:262-269.
- 29.- Simpson R, Alon R, Kobzik L, Valeri R, Shepro D, Hechtman H. Neutrophil and nonneutrophil-mediated injury in intestinal ischemia-reperfusion. *Ann Surg* 1993; 218:444-454.
- 30.- Takei Y, Marzi I, Gao W, Gores GJ, Lemasters JJ, Thurman RG. Leukocyte adhesion and cell death following orthotopic liver transplantation in the rat. *Transplantation* 1991; 51:959-965.
- 31.- Vollmar B, Glasz J, Leiderer R, Post S, Menger MD. Hepatic microcirculatory perfusion failure is a determinant of liver dysfunction in warm ischemia-reperfusion. *Am J Pathol* 1994; 145:1421-1431.
- 32.- Gonzalez-Flecha B, Cutrin J, Boveris A. Time course and mechanism of oxidative stress and tissue damage in rat liver subjected to in vivo ischemia-reperfusion. *J Clin Invest* 1993; 91:456-464
- 33.- Post S, Goering M, Otto G, Manner M, Hofmann W. Early generalized activation of eicosanoids synthesis after liver transplantation. *Transplant Proc* 1991; 23:2421.
- 34.- Lefer A, Siegfried M, Ma X. Protection of ischemia-reperfusion injury by sydnonimine NO donors via inhibition of neutrophil-endothelium interactions. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993; 22:27-33.
- 35.- Himmelreich G, Hundt K, Neuhaus P, Bechstein W, Roissant R, Riess H. Evidence that intraoperative prostaglandin E1 infusion reduces impaired platelet aggregation after reperfusion in orthotopic liver transplantation. *Transplantation* 1993; 55:819-826.
- 36.- Suzuki S, Toledo-Pereyra L, Rodriguez F, Cejalvo D. Neutrophil infiltration as an important factor in liver ischemia and reperfusion injury. *Transplantation* 1993; 55:1265-1272.
- 37.- Kubes P, Kanwar S, Niu X, Gaboury J. Nitric oxide synthesis inhibition induce leukocyte adhesion via superoxide and mast cells. *FASEB J* 1993; 7:1293-1299.
- 38.- Palmer RMJ, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 1988; 333:664-666.
- 39.- Moncada S, Radomski MW, palmer RMJ. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43:109-142.
- 40.- Lincoln TM, Cornwell TI. Intracellular cyclic GMP receptor proteins. *FASEB J* 1993; 7:328-338.

- 41.- Gaboury J, Woodman R, Granger D, Reinhardt P, Kubes P. Nitric oxide prevents leukocyte adherence: role of superoxide. *Am J Physiol* 1993; 265:862-867.
- 42.- Wang J, Komarov P, Sies H, Groot H. Inhibition of superoxide and nitric oxide release and protection from reoxygenation injury by ebselen in rat kupffer cells. *Hepatology* 1992; 15:112-116.
- 43.- Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S. An L-arginine nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:5193-5197.
- 44.- Roth E, Steininger R, Winkler S, et al. L-arginine deficiency after liver transplantation as an effect of arginase efflux from the graft. Influence on nitric oxide metabolism. *Transplantation* 1994; 57:665-669.
- 45.- Jones SM, Thurman RG. L-arginine minimizes reperfusion injury in a low-flow, reflow model of liver perfusion. *Hepatology* 1996; 24:163-168.
- 46.- Peralta C, Hotter G, Closa D, Gelpi E, Bulbena O, Rosello-Catafau J. Protective effect of preconditioning on the injury associated to hepatic ischemia-reperfusion in the rat: role of nitric oxide and adenosine. *Hepatology* 1997; 25:934-937
- 47.- Kobayashi H, Nonami T, Kurokawa T, et al. Role of endogenous nitric oxide in ischemia reperfusion injury in rat liver. *J Surg Res* 1995; 59:772-779.
- 48.- Cottart CH, Do L, Blanc MC, Vaubourdolle M, et al. Hepatoprotective effect of endogenous nitric oxide during ischemia reperfusion in the rat. *Hepatology* 1999; 29:809-813.
- 49.- Shiraishi M, Hiroyasu S, Nagahama M, et al. Role of exogenous L-arginine in hepatic ischemia-reperfusion injury. *J Surg Res* 1997; 69:429-434.
- 50.- Uhlmann D, Scommotau S, Witzigmann H, Spiegel HU. Exogenous L-arginine protects liver microcirculation from ischemia reperfusion injury. *Eur Surg Res* 1998; 30:175-184.
- 51.- Payne D, Kubes P. Nitric oxide donors reduce the rise in reperfusion-induced intestinal mucosal permeability. *Am J Physiol* 1993; 265:G189.
- 52.- Koepfel TA, Thies JC, Schemmer P, et al. Inhibition of nitric oxide synthesis in ischemia/reperfusion of the rat liver is followed by impairment of hepatic microvascular blood flow. *J Hepatol* 1997; 27:163-169.
- 53.- Längle F, Steininger R, Waldmann E, et al. Improvement of cardiac output and liver blood flow and reduction of pulmonary vascular resistance by intravenous infusion of L-arginine during the early reperfusion period in pig liver transplantation. *Transplantation* 1997; 63:1225-1233.

- 54.- Pannen BH, Al-Adili F, Bauer M, Clemens MG, Geiger KK. Role of endothelins and nitric oxide in hepatic reperfusion injury in the rat. *Hepatology* 1998;27:755-764.
- 55.- Szostek M, Danielewicz, Lagiewska B et al. Successful transplantation of kidneys harvested from cadaver donors at 71 to 259 minutes following cardiac arrest. *Transplant Proc* 1995, 27:2901-2902.
- 56.- González Martin M, García Buitrón J, García Freire C, et al. Trasplante de riñón procedente de donants en asistolia. *Actas Urol Esp* 1994, 18 (Supl):433-436.
- 57.- García-Rinaldi R, Lefrak EA, Defore WW, et al. In situ preservation of cadaver Kidneys for transplantation: Laboratory observations and clinical application. *Ann Surg* 1975, 182(5):576-584.
- 58.- Banowsky LH, Sullivan M, Moorehouse J. In mortuo renal perfusion for cadaver kidney preservation. *Investigative Urology* 1971; 9(3):199-205.
- 59.- Garvin PJ, Buttorff JD, Morgan R, Codd JE. In situ cold perfusion of kidneys for transplantation. *Arch Surg* 1980, 115:180-182.
- 60.- Schweizer RT, Sutphin BA, Bartus SA. In situ cadaver Kidney perfusion. *Transplantation* 1981, 32(6):482-484.
- 61.- Fujita T, Matsui M, Yanaoka M, Shinoda M, Naide I. Clinical application of in situ renal cooling: experience with 61 cardiac-arrest donors. *Transplant Proc* 1989, 21:1215-1217.
- 62.- Booster MH, Wijnen RMH, Vroemen JPAM, Van Hooff JP, Kootstra G. In situ preservation of kidneys from non-heart-beating donors- a proposal for a standardized protocol. *Transplantation* 1993; 56: 613-617.
- 63.- Vromen MAM, Leunissen KML, Persijn GG, Kootstra G. Short and long-term results with adult non-heart-beating donor kidneys. *Transplant Proc* 1988; 20:743-745.
- 64.- Rowinski W, Walaszewski J, Lagiewska B Pacholczyk M. Use of kidneys from marginal and Non-Heart-Beating Donors: Warm ischemia per se is not the most detrimental factor. *Transplant Proc* 1993; 25:1511-1512.
- 65.- Guillard G, Rat P, Haas O, Letourneau B, Isnardon JP, Favre JP. Renal harvesting after in situ cooling by intra-aortic double-balloon catheter. *Transplant Proc* 1993, 25:1505-1506.
- 66.- Rosental R, Strokan V, Bitsans J, Sheveliov V, Iljinsky I. Kidney harvesting from non-heart-beating donors (NHBD): a surgical approach. *Transplant Proc* 1991; 23:2588.

- 67.- Sakagami K, Takasu S, Kawamura T, et al. A comparison of university of wisconsin and euro-collins' solutions for simple cold storage in non-heart-beating cadaveric kidney transplantation. *Transplantation* 1990; 49:824-826.
- 68.- Schlumpf R, Candinas D, Zollinger A. et al. Kidney procurement from non-heartbeating donors: transplantation results. *Transplant Int* 1992, 5 (suppl 1): S424-S428.
- 69.- Colpart JJ, Bret M, Tognet E, Mercatello A, Coronel B, Moskovtchenko JF. Viabilité à un an des greffons rénaux prélevés après arrêt cardiaque irréversible. *ETCO Newsletter* 1991; 9:5-11.
- 70.- Castela AM, Griño JM, Gonzalez C, et al. Update of our experience in long-term renal function of kidneys transplanted from non-heart beating cadaver donors. *Transplant Proc* 1993, 25:1513-1515.
- 71.- Kinukawa T, Ohshima S, Fujita T, Ono I. Exploration of the system for cadaver kidney transplantation with the non-heart-beating donor: efficacy of in situ cooling and low-dose cyclosporine. *Transplant Proc* 1993; 25:1524-1526.
- 72.- Koffman CG, Bewick M, Chang RWS, et al. Comparative study of the use of systolic and asystolic kidney donors between 1988 and 1991. *Transplant Proc* 1993; 25:1527-1529.
- 73.- Johnson HK, Skelley L, Warner H, et al. Results following use of the garcía-Lefrak double balloon catheter. *Transplant Proc* 1984; 16:122-125.
- 74.- Anaise D, Yland MJ, Waltzer WC, Frischer Z, Rapaport FT. A new perfusion tube for multiple organ procurement. *Transplant Proc* 1987; 19(5):4129-4136.
- 75.- Anaise D, Yland MJ, Waltzer WC, et al. Flush Pressure requirements for optimal cadaveric donor Kidney preservation. *Transplant Proc* 1988; 20(5):891-894.
- 76.- Lloveras J, Puig JM, Cerdá M, et al. Optimization of in situ renal perfusion of non-heart-beating donors: Four-lumen catheter developed for continuous perfusion pressure determination. *Transplant Proc* 1993; 25:3169-3170.
- 77.- Anaise D, Yland MJ, Ishimaru M, et al. Organ procurement from non Heart-beating cadaver donors. *Transplant Proc* 1989; 21(1):1211-1214.
- 78.- Paprocki S, Kruk R, Erturk E, Cerilli J. A technique for successful transplantation of organs from non-heartbeating cadaver donors. *Transplantation* 1992; 54:381-383.
- 79.- Wijen RMH, Booster M, Speatgens C, et al. Long-term follow-up of transplanted non-heart-beating donor kidneys: preliminary results of a retrospective study. *Transplant Proc* 1993; 25:1522-1523.

- 80.- Anaise D, Smith R, Ishimaru M, et al. An approach to organ salvage from non-heartbeating cadaver donors under existing legal and ethical requirements for transplantation. *Transplantation* 1990; 49:290-294.
- 81.- Kaneko H, Schweizer RT. Venous flushing with vasodilators aids recovery of vasoconstricted and warm ischemic injured pig kidneys. *Transplant Proc* 1989; 21:1233-1235.
- 82.- Booster MH, Van der Vusse GJ, Wijnen MH, Yin M, Stubenitsky BM, Kootstra G. University of Wisconsin solution is superior to histidine tryptophan ketoglutarate for preservation of ischemically damaged kidneys. *Transplantation* 1994; 58:979-984.
- 83.- Hampton WW, Townsend MC, Schirmer WJ, Haybron DM, Fry DE. Effective hepatic blood flow during cardiopulmonary bypass. *Arch Surg* 1989; 124: 458-459.
- 84.- Yamada T, Nomoto S, Aota M, Nishimura K, Matsuda K, Ban T. Hepatic circulation during nonpulsatile cardiopulmonary bypass. *ASAIO J* 1995; 41: M294-M297.
- 85.- Taylor K, Bain W.H, Maxted K.J., Hutton MM., et al. Comparative studies of pulsatile and nonpulsatile flow during cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1978; 75: 569-573.
- 86.- Mathie RT, Desai JB, Taylor KM. The effect of normothermic cardiopulmonary bypass on hepatic blood flow in the dog. *Perfusion* 1986; 1:245-253.
- 87.- Mathie RT, Ohri SK, Batten JJ, Peters AM, Keogh BE. Hepatic blood flow during cardiopulmonary bypass operations: the effect of temperature and pulsatility. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1997; 114:292-293.
- 88.- Desai JB, Mathie RT, Taylor KM. Hepatic blood flow during cardiopulmonary bypass in the dog: the effect of temperature, flow rate and pulsatility. *Perfusion* 1993; 8:149-158.
- 89.- Mathie RT. Hepatic blood flow during cardiopulmonary bypass. *Crit Care Med* 1993; 21:S72-76.
- 90.- Collins JD, Bassendine MF, Ferner R, et al. Incidence and prognostic importance of jaundice after cardiopulmonary bypass, *Lancet* 1983; 1:1119-1123.
- 91.- Abel RM, Buckley MJ, Austen WG et al. Etiology incidence and prognosis of renal failure following cardiac operations. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1976; 71:323-333.

- 92.- Corwin HL, Sprague SM, De Laria GA et al. Acute renal failure associated with cardiac operations. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1989; 98:1107-1112.
- 93.- Myers BD, Moran SW. Hemodynamically mediated acute renal failure. *N Engl J Med* 1986; 314:97-105.
- 94.- Hilberman L, Derby GC, Spencer RJ, Stinson EB. Sequential pathophysiological changes characterizing the progression from renal dysfunction to acute failure following cardiac operations. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1980; 79:838-844.
- 95.- Marchioro TL, Huntley RT, Waddell WR, Startz TE. Extracorporeal perfusion for obtaining postmortem homografts. *Surgery* 1963; 54:900-911.
- 96.- Maessen JG, Van Der Vusse GJ, Vork M, Kootstra G. New approach to preservation of non-heartbeating donor kidneys: Total body Cooling. *Transplant Proc* 1987; 19:4159-4161.
- 97.- Hoshino T, Maley WR, Stump KC, Tuttle TM, Burdick JF, Williams GM. Evaluation of core cooling technique for liver and kidney procurement. *Transplant Proc* 1987; 19(5):4123-4128.
- 98.- Williams GM, Cameron DE, Fraser CD, et al. Cardiopulmonary bypass with profound hypothermia: an optimal preservation method for multi-organ procurement. *Transplant Proc* 1989; 21:1199.
- 99.- Cachera JP, Loisanse DY, Tavolaro O, Aubry Ph, Rosanval O. Hypothermic perfusion of the whole cadaver: a response to the question of multiple-organ procurement. *Transplant Proc* 1986; 18:1407-1409.
- 100.- Adachi H, Ueda K, Koyama I, et al. Donor core cooling for multiple organ retrieval: new application of portable cardiopulmonary bypass for transplantation. *Transplant Proc* 1989; 21:1200-1202.
- 101.- Lang Ph, Romano Ph, Chopin D, et al. Renal function of transplanted kidneys harvested during cardiopulmonary bypass with profound hypothermia. *Transplant proc* 1991; 23:1332-1333.
- 102.- Koyama I, Hoshino T, Nagashima N, Adachi H, Ueda K, Omoto R. A new approach to kidney procurement from non-heart-beating donors: core cooling on cardiopulmonary bypass. *Transplant proc* 1989, 21(1):1203-1205.
- 103.- Arias J, Alvarez J, Gomez M, et al. Successful renal transplantation with kidneys from asystolic donors maintained under extracorporeal cardiopulmonary bypass: 6-month follow up. *Transplant Proc* 1991; 23: 2581-2583.
- 104.- Gómez M, Alvarez J, Arias J et al. Cardiopulmonary bypass and profound hypothermia as a means for obtaining kidney grafts from irreversible cardiac arrest donors: cooling technique. *Transplant Proc* 1993; 25(1):1501-1502.

- 105.- Alvarez J, Gómez M, Arias J, et al. One-year experience in renal transplantation with kidneys from asystolic donors. *Transplant Proc* 1992; 24:34.
- 106.- Hoshino T, Koyama I, Nagashima N, Kadokura M, Kazui M, Omoto R. Transplantation of livers from non-heart beating donors is possible by core cooling technique. *Transplan Proc* 1989; 21(3):3519.
- 107.- Hoshino T, Koyama I, Nagashima N, Kadokura M, Adachi H, Ueda K, et al. Liver transplantation from non-heart-beating donors by core cooling technique. *Transplant Proc* 1989; 21(1):1206-1208.
- 108.- Hoshino T, Maley WR, Bulkley GB, Williams GM. Ablation of free radical-mediated reperfusion injury for the salvage of kidneys taken from non-heart-beating donors. *Transplantation* 1988; 45(2):284-289.
- 109.- Wijk J van der, Sloof MJ, Rijkmans BG, Kootstra G. Successful 96- and 144- hour experimental kidney preservation: a combination of standard machine preservation and newly developed normothermic ex vivo perfusion. *Cryobiology* 1980; 17(5):473-477.
- 110.- Gaber AO, Yang HC, Haag BW, Buckingham FC, Lloyd DM, Thistlethwaite JR, Stuart FP. Intermediate normothermic hemoperfusion doubles safe cold preservation of rat kidneys. *Transplant Proc* 1987; 19:1369-1371.
- 111.- Maessen JG, Van der Vusse GJ, Vork M, Kooststra G. The beneficial effect of intermediate normothermic perfusion during cold storage of ischemically injured kidneys. *Transplantation* 1989; 47(3):409-414.
- 112.- Mayfield KB, Ametani M, Southard JH, Belzer FO. Mechanism of action of ex vivo blood rescue in six-day preserved kidneys. *Transplant Proc* 1987; 19(1):1367-1368.
- 113.- Schon MR, Hunt CJ, Pegg David E, Wight DG. The possibility of resuscitating livers after warm ischemic injury. *Transplantation* 1993; 56 (1):24-31.
- 114.- Arias-Diaz J, Alvarez J, Gomez M, Del Barrio R, García-Carreras C, Gonzalez P, et al. Changes in adenine nucleotides and lipid hydroperoxides during normothermic cardiopulmonary bypass in a porcine model of type II non-heart-beating donor. *Transplant Proc* 1997; 29:3486-3487.
- 115.- Hoshino T, Koyama I, Taguchi Y, Kazui M, Neya K, Omoto R. A new method for safe liver transplantation from non heart beating donors: In situ liver oxygenation by cardiopulmonary bypass. *Proceedings of World congress of the transplantation society. Kyoto. Japan. 1994: 280.*
- 116.- Ohkohchi N, Tsukamoto S, Endoh T, Fukumori T, Susumu S. Can we transplant a liver graft from an agonal non heart beating donor? (Evaluation of

- effectiveness of graft conditioning by an artificial heart and lung machine and drugs on graft injury). *Organs and Tissues* 1999; 1:23-30.
- 117.- Yland MJ, Anaise D, Ishimaru M, Rapaport FT. New pulsatile perfusion method for non-heart-beating cadaveric donor organs: a preliminary report. *Transplant Proc* 1993; 25: 3087-3090.
- 118.- Matsuno M, Sakurai E, Uchiyama M, Kozaki K, Tamaki I, Kozaki M. Use of in situ cooling and machine perfusion preservation for non-heart-beating donors. *Transplant Proc* 1993, 25:3095-3096.
- 119.- Booster MH, Yin M, Stubenitsky BM, et al. Beneficial effect of machine perfusion on the preservation of renal microcirculatory integrity in ischemically damaged kidneys. *Transplant Proc* 1993; 25:3012-3016.
- 120.- Booster MH, Wijnen RMH, Yin M, et al. Enhanced resistance to the effect of normothermic ischemia in kidneys using pulsatile machine perfusion. *Transplant Proc* 1993; 25:3006-3011.
- 121.- Henry ML. Pulsatile preservation in renal transplantation. *Transplant Proc* 1997; 29:3575-3576.
- 122.- Matsuno N, Sakurai E, Tamaki, Furuhashi K, Saito A, Zhang S, et al. Effectiveness of machine perfusion preservation as a viability determination method for kidneys procured from non-heart-beating-donors. *Transplant Proc* 1994; 26(4):2421-2422.
- 123.- Kievit JK, Nederstigt AP, Oomen APA, Rizvi SAH, Naqvi A, Thiel G, et al. Outcome of machine-perfused non heart beating donor kidneys, not allocated within the Eurotransplant area. *Transplant Int* 1998; 11 (suppl 1): S421-423.
- 124.- Schlumpf R, Candinas D, Weder W, et al. Acute vascular rejection with hemolytic uremic syndrome in kidneys from non-heart-beating donors: associated with secondary grafts and early cyclosporina treatment. *Transplant Proc* 1993; 25:1518-1521.
- 125.- Maessen JG, Van Der Vusse GJ, Vork M, Kootstra G. Assesment of nucleotides, nucleosides and oxypurines in human donor kidneys. *Transplant Proc* 1988; 20(5):889-890.
- 126.- Hoshino T, Maley WR, Labs JD, Clemens MG, Burdick JF, Williams GM. Useful parameters for predicting posttransplant liver viability. *Transplant Proc* 1988; 20(5):987-991.
- 127.- Sakurada M, Ohkohchi N, Kato H, et al. Mitochondrial Respiratory function, Adenine nucleotides and antioxygenic enzymes in pig liver transplantation. *Transplant Proc* 1989; 21(1):1321-1322.

- 128.- Maessen JG, Van Der Vusse GJ, Vork M, Kootstra G. Nucleotides, nucleosides, and oxypurines in human kidneys measured by use of reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Clin Chem* 1988; 34(6):1087-1090.
- 129.- Daemen JHC, Heineman E, Kootstra K. Viability assessment of non-heart beating donor kidneys during machine preservation. *Transplant Proc* 1995; 27:2906-2908.
- 130.- Castela AM, Griño JM, Gonzalez C, et al. Long-term renal function of kidneys transplanted from non-heart beating cadaver donors. *Transplant Proc* 1991; 23:2584-2586.
- 131.- Castela AM, Sabater R, Griño JM, et al. Renal function of transplanted kidneys from non-heart-beating cadaver donors. *Transplant Proc* 1988; 20:841-843.
- 132.- Cho YW, Terasaki PI, Cecka JM, Gjertson DW. Transplantation of kidneys from donors whose hearts have stopped beating. *N Engl J Med* 1998; 338 (4):221-225.
- 133.- Daemen JH, De Vries B, Oomen AP, De Meester J, Kootstra G. Effect of machine perfusion preservation on delayed graft function in non-heart beating donor kidneys-early results. *Transplant Int* 1997; 10(4):317-322.
- 134.- Gonzalez-Segura C; Castela AM; Torras J; Moreso F; Riera L; Lopez-Coste MA; et al. A good alternative to reduce kidney shortage. Kidneys from non heartbeating donors. *Transplantation* 1998; 65: 1465-1470.
- 135.- Light JA, Kowalski AE, Sasaki TM, Barhyte DY, Ritchie WO, Gage F, and Harviel JD. A rapid organ recovery program from non-heart beating donors. *Transplant Proc* 1997; 29:3553-3556.
- 136.- Matsuno N, Sakurai E, Kubota K, Kozaki K, Uchiyama M, Nemoto T, et al. Evaluation of the factors related to early function in 90 kidneys transplants from non-heart beating donors. *Transplant Proc* 1997; 29:3569-3570.
- 137.- Tanabe K, Oshima T, Tokumoto T, Ishikawa N, Kanematsu A, Shinmura H, et al. Long term renal function in non heart beating donor kidney transplantation. *Transplantation* 1998; 66(12): 1708-1713.
- 138.- Wijnen RMH, Booster Mh, Nieman FHM, Daemen JHC, Heineman E, Kootstra K. Retrospective analysis of the outcome of transplantation of non-heart beating donor kidneys. *Transplant Proc* 1995; 27:2945-2946.
- 139.- Matsuno N, Kozaki M, Sakurai E, et al. Effects of combination in situ cooling and machine perfusion preservation on non-heart beating donor kidney procurement. *Transplant Proc* 1993; 25:1516-1517.
- 140.- Shirakura R, Kamiike W, Matsumura A, et al. Multiorgan procurement from non-heart-beating donors by use of Osaka University cocktail, Osaka Rinse Solution,

- and de portable cardiopulmonary bypass machine. *Transplant Proc* 1993; 25: 3093-3094.
- 141.- Kootstra G, Wijnen R, Van Hoof JP, Van der Linden CJ. Twenty percent more kidneys through a non-heart-beating program. *Transplant Proc* 1991; 23:910-911.
- 142.- Didlake RH, Raju S, Smith GV, Krueger RP, Kirchner KA. Utilization and function of kidneys obtained from nonheartbeating donors. *Transplantation* 1984; 38: 90-91.
- 143.- Tojimbara T, García R, Burns W, Hayashi M, Krams S, Martinez O, et al. The use of non heart beating donors in experimental liver transplantation. *Transplantation* 1995; 60(10):1179-1186.
- 144.- Gómez M García-Buitrón J, Fernández-García A, Vilela D, Fernández Selles C, Corbal R, et al. Liver transplantation with organs from non heart beating donors. *Transplant Proc* 1997; 29:3478-3479.
- 145.- Yanaga K, Kakizoe S, Ikeda T, Podesta LG, Demetris AJ, Starzl TE. Procurement of liver allografts from non-heart beating donors. *Transplant Proc* 1990; 22:275-278.
- 146.- D'Alessandro AM, Hoffmann RM, Knechtle SJ, Eckhoff DE, Love RB, Kalayoglu M, et al. Controlled non heart beating donors: a potential source of extrarenal organs. *Transplant Proc* 1995; 27(1): 707-709.
- 147.- Ericzon BG, Lundgren G, Wilczek H, Groth CG. Experience with human liver grafts obtained after donor cardiac standstill. *Transplant Proc* 1987; 19:3862-3863.
- 148.- Casavilla A, Ramirez R, Shapiro R, et al. Liver and kidney transplantation from non-heart beating donors: the pittsburgh experience. *Transplant Proc* 1995; 27:710-712.
- 149.- Real decreto 2070/1999, de 30 de diciembre, por el que se regulan las actividades de obtención y utilización clínica de órganos humanos y la coordinación territorial en materia de donación y trasplante de órganos y tejidos. BOE num. 3. 4 Enero 2000. P179.
- 150.- Canafax DM, Torres A, Fryd DS, Heil JE, Strand MH, Ascher NL, et al. The effect of delayed function on recipients of cadaver renal allografts. *Transplantation* 1986; 41:177-181.
- 151.- Ojo AO, Wolfe RA, Held PJ, Port FK, and Schmouder RL. Delayed graft function: Risk factors and implications for renal allograft survival. *Transplantation* 1997; 63:968-974.

- 152.- Troppmann C, Gillingham KJ, Benedetti E, Almond PS, Gruessner RWG, Najarian JS, et al. Delayed graft function, acute rejection, and outcome after cadaver renal transplantation. *Transplantation* 1995; 59:962-968.
- 153.- Casavilla A, Ramirez C, Shapiro R, Nghiem D, Miracle K, Bronsther O, et al. Experience with liver and kidney allografts from non-heart-beating donors. *Transplantation* 1995; 59(2):197-203.
- 154.- D'Alessandro A, Hoffmann RM, Knechtle SJ, Eckhoff DE, Love RB, Kalayoglu M, et al. Successful extrarenal transplantation from non-heart-beating donors. *Transplantation* 1995; 59:977-982.
- 155.- Huguet C, Nordlinger B, Bloch P, Conard J. Tolerance of the human liver to prolonged normotermic ischemia. *Arch Surg* 1978; 113:1448-1450.
- 156.- Harris K, Wallace A, Wall W. Tolerance of the liver to ischemia in the pig. *J Surg Res* 1982; 33:524.
- 157.- Takada Y, Taniguchi H, Fukunaga K, Yuzawa K, Otsuka M, Todoroki T, et al. Hepatic allograft procurement from non-heart-beating donors. Limits of warm ischemia in porcine liver transplantation. *Transplantation* 1997; 63:369-373.
- 158.- Ishibashi M, Kokado Y, Takahara S, Okuyama A, Kurita T, Amemiya H, et al. Randomized Multicenter study for comparison of university of Wisconsin solution vs Euro-collins solution on early renal allograft function in the non-heart-beating cadaver donor. *Transplant Proc* 1994; 26 (4):2405-2408
- 159.- Baumgartner WA, Williams GM, Fraser CD, Cameron DE, Gardner TJ, Burdick JF, et al. Cardiopulmonary bypass with profound hypothermia. *Transplantation* 1989; 47:123-127.
- 160.- Alvarez-Rodriguez J, Del Barrio-Yesá R, Torrente-Sierra J, Prats-Sanchez MD, Barrientos Guzman A. Posttransplant long term outcome of kidneys obtained from asystolic donors maintained under extracorporeal cardiopulmonary bypass. *Transplant Proc* 1995; 27(5):2903-2905.
- 161.- Koyama I, Shinozuka N, Watanabe T, Ogawa N, Nagashima N, Asami H, et al. Utilization of kidneys from non-heart-beating donors by portable cardiopulmonary bypass. *Transplant Proc* 1997; 29:3550-3551.
- 162.- Koyama I, Ogawa N, Watanabe T, Taguchi Y, Asami H, Nagashima N, et al. Utilization of warm ischemic livers from non-heart-beating donors by portable cardiopulmonary bypass and heterotopic transplantation. *Transplant Proc* 1996; 28:1878-1879.
- 163.- Fukushima N, Shirakura R, Chang J, Izutani H, Inoue M, Yamaguchi T, et al. Successful multiorgan transplants from non-heart-beating donors using percutaneous cardiopulmonary support. *Tranplant Proc* 1998; 30:3783-3784.

- 164.- Matsuno N, Uchiyama M, Sakurai E, Kozaki K, Ikeda T, Kozaki M. Liver transplantation from non-heart-beating donors: liver procurement without in situ portal flush. *Transplant Proc* 1996; 28(1):203-204.
- 165.- Shirakura R, Matsuda H, Nakata S, Kaneko M, Miyagawa S, Fukushima N, et al. A new method to harvest multiple organs from non-heart-beating donors by use of a percutaneous cardiopulmonary support machine. *Transplant Proc* 1992; 24 (4):1329-1330.
- 166.- Tsukamoto S, Ohkohchi N, Endoh T, Seya K, Satomi S, Mori S. Procurement of livers by an artificial heart-lung machine using leukocyte-depleted washed red blood cells in non-heart-beating donors. *Transplant Proc* 1996; 28 (1):197-200.
- 167.- Koyama I, Taguchi Y, Watanabe T, Nagashima N, Otsuka K, Omoto R. Development of a reliable method for procurement of warm ischemic kidneys from non-heart-beating donors. *Transplant Proc* 1992; 24:1327-1328.
- 168.- Rijkmans BG, Buurman WA, Kootstra G. Six-day canine kidney preservation. *Transplantation* 1984; 37(2):130-134.
- 169.- Gonzalez FX, García Valdecasas JC, López Boado MA, Tabet J, Net M, Grande L, et al. Adenine nucleotide liver tissue concentrations from non-heart-beating donor pigs and organ viability after liver transplantation. *Transplant Proc* 1997; 29:3480-3481.
- 170.- Stubenitsky BM, Booster MH, Brasile L, Haisch CE, Singh HK, Jacobs RWA, et al. Prospective evaluation of renal function. *Transplant Proc* 2000; 32:175-176.
- 171.- Brasile L, Green E, Haisch C. Warm ex vivo perfusion prevents reperfusion injury in warm ischemically damaged kidneys. *Transplant Proc* 1997; 29:3422-3423.
- 172.- Marubayashi S, Takenaka M, Dohi K, Ezaki H, Kawasaky T. Adenine nucleotide metabolism during hepatic ischemia and subsequent blood reflow periods and its relation to organ viability. *Transplantation* 1980; 30:294-296.
- 173.- Lopez-Boado MA, García-Valdecasas JC, Ordi J, et al. Histological changes during and after liver transplantation from NHBD pig. *Transplant Proc* 1997; 29:3471.
- 174.- Mora CT. *Cardiopulmonary bypass. Principles and techniques of extracorporeal circulation.* New York: Springer-Verlag, 1995.
- 175.- Hessel EA. *Cardiopulmonary bypass circuitry and cannulation techniques.* In: Gravlee GP, Davis RF, Utley JR, eds. *Cardiopulmonary bypass. Principles and practices.* Baltimore: Williams and Wilkins, 1993; 55-92.

ALTRES ARTICLES PUBLICATS

- Organ Procurement from non-heart-beating donors by total body cooling.
Valero R, Manyalich M, Cabrer C, Salvador L, García-Fages LC.
Transplantation Proceedings 1993; 25(6): 3091-3092.
- Organ procurement from non-heart-beating donors through in situ perfusion or total body cooling.
Valero R, Sánchez J, Cabrer C, Salvador L, Oppenheimer F, Manyalich M.
Transplantation Proceedings 1995; 27(5): 2900-2901.
- Blood flow and oxygen extraction ratio during normothermic recirculation and total body cooling predict viability of liver from non-heart-beating pig donors.
Valero R, García Valdecasas JC, Tabet J, Rull R, Beltrán J, Cifuentes A, Taurà P, Gonzalez X, García F, Pou N, Manyalich M, Visa J.
Transplantation Proceedings 1997; 29:3469-3470
- Usefulness of Celsior in graft preservation of livers obtained from non-heart beating donors in experimental (pigs) liver transplantation. Comparative study with University of Wisconsin solution.
Valero R, Almenara R, G-Valdecasas JC, Beltrán J, Net M, Capdevila LL, López Boado MA, Gonzalez FX, Taurà P, Visa J, Manyalich M.
Transplantation Proceedings 1999; 31:2433-2434.
- Extracción de órganos de donantes a corazón parado.
Valero R, Mañalich M, Cabrer CA, Sanchez J, Umbert B, Salvador L.
Nefrología 1996; 16 (Supl 2): 54-60.
- Trasplante de riñones procedentes de donantes en asistolia: experiencia del Hospital Clínico de Barcelona.
Oppenheimer F, Cofán F, Valero R, Lomeña F, Setoain FJ, Mañalich M, Talbot RF, Carretero P.
Nefrología 1996; 16 (Supl 2): 73-79.
- Liver conditioning after cardiac arrest: the use of normothermic recirculation in an experimental animal model.
García-Valdecasas JC, Tabet J, Valero R, Taurà P, Rull R, García F, Elena M, González X, Ordi J, Beltrán J, López-Boado MA, Deulofeu R, Angás J, Cifuentes A, Visa J.
Transplantation International 1998; 11:424-32.

- Evaluation of ischemic injury during non heart beating donor liver procurement.
García-Valdecasas JC, Tabet J, Valero R, Deulofeu R, Taurà P, Rull R, Capdevila Ll, Cifuentes A, González FX, Net M, Beltrán J, López-Boado MA, Palacin J, García F, Visa J.
European Surgical Research 1999; 31:447-456.