

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR III



TESIS DOCTORAL

**Diferencias en la expresión de mediadores inflamatorios,
niveles de Glicocálix y perfiles de MicroRNA en páncreas
humanos de donantes en parada cardiaca no controlada y
donantes en muerte encefálica**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Yoko Lucía Olmedilla Ishishi

DIRECTORES

Elena Vara Ameigeiras
José María Balibrea del Castillo
Lisa Rancan

Madrid, 2018

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III



**Diferencias en la Expresión de Mediadores Inflamatorios,
Niveles de Glicocálix y Perfiles de MicroRNA en Páncreas
Humanos de Donantes en Parada Cardíaca No Controlada
y Donantes en Muerte Encefálica**

Yoko Lucía Olmedilla Ishishi

Madrid, 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III



**Diferencias en la Expresión de Mediadores Inflamatorios,
Niveles de Glicocálix y Perfiles de MicroRNA en Páncreas
Humanos de Donantes en Parada Cardíaca No Controlada
y Donantes en Muerte Encefálica**

Doctorando:

Yoko Lucía Olmedilla Ishishi

Directores:

Elena Vara Ameigeiras
José María Balibrea del Castillo
Lisa Rancan

Madrid, 2017



DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y
BIOLOGÍA MOLECULAR III

FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
Ciudad Universitaria, s/n - 28040 - MADRID

Tfno: 91 394 14 56 Fax: 91 394 16 91

Elena Vara, Catedrática de Bioquímica y Biología Molecular; Facultad de Medicina (UCM)
José María Balibrea, Profesor Asociado de Cirugía; Facultad de Medicina (UAB) y Lisa
Rancan, Investigadora Contratada Doctor; De Bioquímica y Biología Molecular; Facultad de
Medicina (UCM)

CERTIFICAN:

Que el trabajo titulado **“Diferencias en la Expresión de Mediadores Inflamatorios, Niveles de Glicocáliz y Perfiles de MicroRNA en Páncreas Humanos de Donantes en Parada Cardíaca No Controlada y Donantes En Muerte Encefálica”** del que es autora Dña. Yoko Lucía Olmedilla Ishishi, ha sido realizado bajo nuestra dirección.

Yoko ha participado activamente con nosotros como investigadora en diferentes proyectos de investigación subvencionados lo que le ha permitido realizar una serie de actividades experimentales, conducentes a la obtención del Grado Académico de Doctor. En este período ha obtenido una serie de logros y resultados que se han materializado hasta la fecha en 2 publicaciones en revistas indexadas en el Journal of Citation Reports y una tercera en preparación. También ha participado en diversos congresos científicos tanto nacionales como internacionales, donde se han presentado los resultados de su trabajo. Por todo ello, consideramos que el trabajo realizado reúne las características necesarias de originalidad, planteamiento adecuado de la hipótesis de trabajo, desarrollo metodológico adecuado y discusión crítica de los resultados para ser defendida como tesis doctoral.

Madrid, a 28 de Febrero de 2017

Fdo.: E. Vara

J.M. Balibrea

L. Rancan

A mis padres, que lo han dado todo por sus hijos, y me han enseñado a construir lo que soy.

A mis hermanos, por su comprensión y cariño incondicionales.

Agradecimientos.

Deseo expresar mi más profundo agradecimiento,

A la Dra. Elena Vara Ameigeiras, Catedrática del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, por introducirme en el mundo de la investigación, y por su apoyo y estímulo constantes desde mi primer año de universidad. Ella ha representado, a lo largo de todos estos años, un auténtico ejemplo a seguir.

Al Dr. José María Balibrea del Castillo, Profesor Asociado de Cirugía de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Barcelona, por sus consejos y su ayuda, sin los cuales no hubiera sido posible la realización de esta tesis doctoral.

A la Dra. Lisa Rancan, Investigadora Contratada Doctor del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, por su dedicación y por toda la ayuda que me ha brindado siempre en el laboratorio y en la realización de esta tesis doctoral.

A la Dra. M^a Cruz García Martín, Profesora Titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, por haberme enseñado, con gran paciencia y siempre una sonrisa, a manejarme en el laboratorio.

Al Dr. Sergio Damián Paredes Royano, y a los estudiantes que han participado en este proyecto, porque han hecho posible con su esfuerzo el desarrollo del mismo.

A todos mis compañeros del Servicio de Endocrinología y Nutrición del Hospital General Universitario Gregorio Marañón, por tantas horas y experiencias compartidas.

A los amigos que he ido haciendo a lo largo de la residencia en el Hospital General Universitario Gregorio Marañón, por cada momento de complicidad.

A mis amigos de la universidad y del colegio, especialmente a Mónica O., Verónica R., María de los Ángeles C., Myriam S., y Belén R., por su apoyo en todo momento y por estar siempre cerca.

A mi familia, a la cual nunca podré terminar de agradecer todo lo que han hecho y siguen haciendo cada día por mí.

Abreviaturas y Acrónimos.

- ATP: Adenosín trifosfato.
- BDD: Donación en muerte cerebral (Del inglés: *brain-dead donation*).
- CAT: Catalasa.
- CNHBD: Donación en parada cardíaca controlada (Del inglés: *controlled non-heart-beating donation*).
- CO: Monóxido de carbono.
- CV: Coeficiente de variación.
- DA: Donación en asistolia.
- DGP: Donación a corazón parado.
- DE: Desviación estándar.
- DM: Diabetes mellitus.
- DM1: Diabetes mellitus tipo 1.
- DM2: Diabetes mellitus tipo 2.
- ECV: Enfermedad cardiovascular.
- EEM: Error estándar de la media.
- EGL: Glicocalix endotelial (Del inglés: *endothelial glycocalyx layer*).
- GAG: Glicosaminoglicano (Del inglés: *glycosaminoglycan*).
- GM-CSF: Factor estimulante de colonias granulocítico/monocíticas (Del inglés: *granulocyte macrophage colony-stimulating factor*).
- GODT: Observatorio Global de Donación y Trasplante (Del inglés: *Global Observatory on Donation and Transplantation*).
- GPx: Glutación peroxidasa (Del inglés: *glutathion peroxidase*).
- GR: Glutación reductasa (Del inglés: *glutathion reductase*).
- HCSC: Hospital Clínico San Carlos.
- HO: Hemoxigenasa (Del inglés: *heme oxygenase*).
- HO-1: HO inducible.
- HO-2: HO constitutiva.
- H₂O₂: Peróxido de hidrógeno.
- HS: Heparán sulfato (Del inglés: *heparan sulphate*).
- HSPG: Proteoglicanos portadores de HS (Del inglés: *heparan sulphate proteoglycans*).
- ICAM: Molécula de adhesión intercelular (Del inglés: *intercellular adhesion molecule*).
- IF: Interferón.
- IL: Interleuquina.
- IL-1R: Receptor de IL-1 (Del inglés: *IL-1 receptor*).
- IRAK1: Proteína quinasa asociada al receptor (Del inglés: *receptor-associated kinase 1*).
- I/R: Isquemia-Reperfusión.
- LPS: Lipopolisacárido bacteriano.
- MAPK: Proteínas quinasas activadas por mitógenos (Del inglés: *mitogen-activated protein kinases*).
- MCE: Masaje cardíaco externo.

- miRNA: microRNA.
- ME: Muerte encefálica.
- mRNA: RNA mensajero.
- NF- κ B: Factor nuclear κ B (Del inglés: *nuclear factor κ B*).
- NHBD: Donación en parada cardiaca (Del inglés: *non-heart-beating donation*).
- NO: Óxido nítrico (En inglés: *nitric oxide*).
- NOS: Óxido nítrico sintasa (Del inglés: *nitric oxide synthase*).
- eNOS: NOS endotelial o constitutiva.
- iNOS: NOS inducible.
- OONO⁻: Peroxinitrito.
- O₂⁻: Radical superóxido.
- .OH: Radical hidroxilo.
- 8-OHG: 8-hidroxiguanina (Del inglés: *8-hydroxyguanine*).
- ONT: Organización Nacional de Trasplantes.
- PAF: Factor activador de las plaquetas (Del inglés: *platelet-activating factor*).
- PTA: Trasplante de páncreas aislado (Del inglés: *pancreas transplantation alone*).
- Pdcd4: Proteína proinflamatoria supresora de tumores 4 (Del inglés: *pro-inflammatory protein programmed cell death 4*).
- pre-miRNA: miRNA precursor (Del inglés: *precursor miRNA*).
- qRT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa tras transcriptasa inversa, cuantitativa o en tiempo real (Del inglés: *quantitative real time - polymerase chain reaction*).
- RCP: Reanimación cardiopulmonar.
- RII: Respuesta inflamatoria inespecífica.
- ROS: Especies reactivas de oxígeno (Del inglés: *reactive oxygen species*).
- SIRS: Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (Del inglés: *systemic inflammatory response syndrome*).
- SOCS1: Del inglés: *suppressor of cytokine signaling 1*.
- SOD: Super-óxido dismutasa.
- SRE: Sistema retículo-endotelial.
- STAT: Del inglés: *signal transducer and activator of transcription*.
- SYND1: Sindecán-1 (Del inglés: *syndecan-1*).
- TIP: Trasplante de islotes pancreáticos.
- TLR: Receptor tipo Toll (Del inglés: *Toll-like receptor*).
- TNF- α : Factor de necrosis tumoral α (Del inglés: *tumor necrosis factor α*).
- TNFR: Receptor transmembrana para TNF (Del inglés: *TNF receptor*).
- TRAF6: Factor 6 asociado a TNFR (Del inglés: *TNF receptor-associated factor 6*).
- UCI: Unidad de cuidados intensivos.
- UNHBD: Donación en parada cardiaca no controlada (Del inglés: *uncontrolled non-heart-beating donation*).
- VM: Ventilación mecánica.

Índice.

Agradecimientos	7
Abreviaturas y Acrónimos	11
Resumen / Summary	19
I. Introducción.....	27
Diabetes mellitus	29
Definición y antecedentes históricos	29
Clasificación etiológica y complicaciones crónicas	30
Impacto socio-sanitario.....	33
Trasplante de páncreas e islotes	36
Hitos históricos y conceptos actuales del trasplante de órgano sólido	36
Donación en parada cardíaca no controlada como alternativa	41
Evolución y situación actual del trasplante de páncreas e islotes.....	45
Marcadores biomoleculares del estado tisular.....	52
Respuesta inflamatoria inespecífica	52
Generación de estrés oxidativo.....	59
Apoptosis	63
MicroRNAs.....	65
Glicocálix endotelial.....	68
II. Hipótesis y Objetivos	71
III. Material y Métodos	75
Diseño.....	77
Métodos	79
Análisis bioquímico.....	81
Expresión de RNA mensajero	81
Expresión de microRNAs	83
Expresión de proteínas.....	85
Niveles de enzimas antioxidantes y de 8-hidroxiguanina.....	87
Análisis estadístico	89
IV. Resultados.....	91
Expresión de mediadores inflamatorios	92
Expresión de marcadores de estrés oxidativo.....	94
Expresión de marcadores de apoptosis.....	98
Perfil de microRNAs	99
Expresión de marcadores de degradación del glicocálix.....	102
V. Discusión.....	103
VI. Conclusiones.....	123
VII. Bibliografía.....	127

VIII. Anexos	147
Artículos	149
BALIBREA JM, GARCIA-MARTIN MC, CUESTA-SANCHO S, OLMEDILLA Y, ARIAS-DIAZ J, FERNANDEZ-SEVILLA E, et al. Tacrolimus modulates liver and pancreas nitric oxide synthetase and heme-oxygenase isoforms and cytokine production after endotoxemia. <i>Nitric Oxide</i> 2011;24(2):113-122	149
BALIBREA JM, NUNEZ-PENA JR, GARCIA-MARTIN MC, OLMEDILLA Y, MARTIN-ANTONA E, BERTHUIIN J, et al. The differential tissue expression of inflammatory, oxidative stress, and apoptosis markers in human uncontrolled non-heart-beating donors. <i>Transplantation</i> 2013;95(11):1346-1353	160
Congresos	169
CALVO A, OLMEDILLA Y, RANCAN L, GARCÍA C, SHAHANU P, LÓPEZ DE HONTANAR G, et al. Different lung microRNA profiling in human uncontrolled non-heart-beating donors and braindead donors. <i>Eur Surg Res</i> 2016;57(suppl 1):40(OP-92)	169
HUELIN F, OLMEDILLA Y, GARCÍA C, RANCAN L, CORRAL P, CALVO M, et al. Differences on glycocalyx levels and microRNA profiling in pancreas obtained from human uncontrolled non-heart-beating donors and brain-dead donors. <i>Eur Surg Res</i> 2016;57(suppl 1):71(MP-63)	170

Resumen / Summary.

RESUMEN.

Introducción.

La diabetes mellitus tiene importantes implicaciones a nivel médico y socio-económico. Las limitaciones en su tratamiento impulsan el desarrollo de terapias orientadas a la curación de la misma.

El trasplante de páncreas, tanto completo como de islotes, representa una alternativa al abordaje con insulina. Sin embargo, la escasa disponibilidad de órganos susceptibles de donación en muerte encefálica (*brain-dead donation*; BDD) limita su aplicabilidad. Así, la donación en parada cardiaca no controlada (*uncontrolled non-heart-beating donation*; UNHBD) se ha postulado como una alternativa válida. No obstante, poco se conoce sobre el estado tisular real de los órganos así obtenidos. La UNHBD se realiza bajo condiciones desfavorables e implica una exposición de los injertos a estímulos dañinos desencadenantes de respuestas inflamatorias, estrés oxidativo y fenómenos de apoptosis. Esto explicaría las tasas mayores de disfunción primaria del injerto tradicionalmente observadas en la UNHBD.

Hipótesis.

Existen diferencias en la expresión de los marcadores biomoleculares del estado tisular en los páncreas humanos obtenidos de la UNHBD, en comparación con los obtenidos de la BDD, considerada de referencia. La investigación acerca de tales diferencias avalaría la viabilidad de los páncreas de la UNHBD, y en consecuencia su utilización a nivel clínico.

Objetivos.

Objetivo general. Evaluar a nivel biomolecular la viabilidad de los páncreas humanos obtenidos de la UNHBD frente a los obtenidos de la BDD.

Objetivos específicos. Evaluar la expresión diferencial en las biopsias de páncreas obtenidos de UNHBD y BDD, de: mediadores inflamatorios, marcadores de estrés oxidativo, marcadores de apoptosis, perfiles de miRNAs, y componentes del glicocálix.

Material y Métodos.

Se reclutaron 56 pacientes, 48 UNHBDs y 18 BDDs, del Hospital Clínico San Carlos. Las biopsias de tejido pancreático fueron analizadas en el Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular III de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid.

Análisis bioquímico. Se determinó la expresión de mRNA (de IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-10, eNOS, iNOS, HO-1, HO-2, Bax y Bcl-2) y de miRNAs (miR 16, miR 21, miR 103, miR 107, miR 126, miR 142-5p, miR 145, miR 146, miR 152, miR 155, miR 182, miR 92, miR 223 y Let-7) mediante qRT-PCR. La expresión de proteínas (de IL-1 β , TNF- α , eNOS, iNOS, HO-1, HO-2, SYND1 y HS) se determinó mediante Western Blotting. La actividad de enzimas antioxidantes (CAT, GR, GPx) se determinó mediante kits comerciales específicos; y los niveles de 8-OHG, mediante ELISA.

Análisis estadístico. Para identificar diferencias entre ambos grupos de donantes, se empleó el test U de Mann-Whitney. Se consideró significativo un intervalo de confianza del 95%. Los resultados se expresan como media \pm error estándar de la media (EEM).

Resultados.

Los UNHBDS mostraron una expresión similar (IL-10) o menor (IL-1 β , TNF- α e IL-6) de mediadores de la inflamación. La expresión de marcadores de estrés oxidativo y de apoptosis fue semejante en ambos tipos de donantes (CAT, GR y GPx; Bax y Bcl-2), o incluso menor en los UNHBDS (8-OHG). Se observaron diferencias en la expresión de mRNA y de proteínas de las isoformas enzimáticas de NOS y de HO. Se objetivó un descenso de algunos miRNAs (miR 103, miR 126 y miR 152) y un incremento de otros (Let-7, miR 16, miR 145, miR 182 y miR 192) en los UNHBDS, y una expresión similar de otros (miR 21, miR 107, miR 142-5p, miR 146, miR 155 y miR223) en ambos tipos de donantes. Aunque la expresión de HS fue semejante, la de SYND1 fue mayor en los UNHBDS.

Conclusiones.

Estos resultados sugieren que el daño pancreático generado durante la UNHBD es asumible. Aunque serían necesarios estudios adicionales para esclarecer sus consecuencias clínicas, estos hallazgos refuerzan el papel de los UNHBDS como alternativa para aumentar el número de donantes.

SUMMARY.

Introduction.

Diabetes mellitus has vast medical and socio-economical implications. Its treatment's limitations prompt the development of new possible therapies oriented towards its cure.

Both whole-organ and islet pancreatic transplant represent an alternative besides management with insulin. However, its applicability is limited by the scarcity of available organs for brain-dead donation (BDD). Therefore, uncontrolled non-heart-beating donation (UNHBD) could represent a major opportunity to solve organs' shortage. Even so, little is known about the status of pancreas obtained from this type of donors. UNHBD is performed under unfavorable conditions and involves exposure to harmful stimuli that trigger inflammatory responses, oxidative stress, and apoptotic phenomena. This adverse scenario could explain the higher rates of graft dysfunction, due to primary non-function, traditionally observed in NHBD.

Hypothesis.

The expression of tissue status biomolecular markers in human pancreata obtained from UNHBD can be different if compared to those from BDD, considered as the gold standard. Basic research on these differences would endorse UNHBD pancreata's viability, and accordingly, it would open the possibility to take them into consideration for clinical use.

Objectives.

General objective. To evaluate the biomolecular viability of human pancreata obtained from UNHBDs, compared to those from BDDs.

Specific objectives. To assess the differential expression in pancreas' biopsies obtained from UNHBDs and BDDs, of: inflammatory mediators, oxidative stress markers, apoptosis markers, miRNAs profiles and glycocalyx components.

Material y Methods.

Fifty-six patients were recruited, 48 UNHBDs and 18 BDDs, from Clínico San Carlos Hospital. Pancreatic tissue biopsies were analyzed at the Department of Biochemistry and Molecular Biology III, Faculty of Medicine, Universidad Complutense de Madrid.

Biochemical analysis. Expressions of mRNAs (IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-10, eNOS, iNOS, HO-1, HO-2, Bax y Bcl-2) and miRNAs (miR 16, miR 21, miR 103, miR 107, miR 126, miR 142-5p, miR 145, miR 146, miR 152, miR 155, miR 182, miR 92, miR 223 y Let-7) were determined by qRT-PCR. Proteins expression (IL-1 β , TNF- α , eNOS, iNOS, HO-1, HO-2, SYND1 y HS) was determined using Western Blotting. Antioxidant enzymes activities (CAT, GR, GPx) was determined using specific commercial kits; and 8-OHG levels, using ELISA.

Statistical analysis. Mann-Whitney U test was performed to identify differences between both groups of donors. A confidence interval of 95% was considered significant. Results were expressed as mean \pm standard error of mean (SEM).

Results.

UNHBDs showed similar (IL-10) or lower (IL-1 β , TNF- α and IL-6) expression of inflammation mediators. Expression of oxidative stress and apoptosis markers was similar in both types of donors (CAT, GR y GPx; Bax and Bcl-2), or even lower in UNHBDs (8-OHG). Significant differences were observed in both mRNA and protein expression of NOS and HO enzymatic isoforms. Some miRNAs showed a decrease (miR 103, miR 126 and miR 152) while others showed an increase (Let-7, miR 16, miR 145, miR 182 and miR 192) in UNHBDs. Others showed a similar expression (miR 21, miR 107, miR 142-5p, miR 146, miR 155 and miR223) in both types of donors. Although HS expression was comparable, higher SYND1 was observed in UNHBDs.

Conclusions.

These results suggest that the pancreas damage generated during the UNHBD is assumable. Although additional studies would be necessary to clarify their clinical consequences, these findings reinforce UNHBDs' role as an alternative to increase the donor pool.

I. Introducción.

Diabetes mellitus.

Definición y antecedentes históricos.

La **diabetes mellitus** (DM) se define como el conjunto de trastornos metabólicos crónicos de diversa etiología que tienen como nexo común la hiperglucemia crónica que resulta de defectos en la síntesis o la secreción de insulina por las células β del páncreas y/o defectos en la acción de la insulina sobre los tejidos diana (en esencia, el hígado, el tejido adiposo y el músculo esquelético). Frecuentemente coexisten en un mismo paciente defectos a ambos niveles; no siendo evidente por lo común qué anormalidad, si aislada, es la causa primaria de la hiperglucemia. Así, en el desarrollo de la DM intervienen múltiples procesos patogénicos en uno o más puntos de las complejas vías de acción de la hormona, que generan alteraciones en el metabolismo de los carbohidratos, los lípidos y las proteínas.

Conocida desde hace más de 4500 años, se acepta que la primera referencia escrita de esta entidad corresponde al papiro de Ebers (1550 a.C., Nuevo Imperio Egipcio). En los textos de Areteo de Capadocia (siglo I d.C.) se encuentra la primera constatación del término “diabetes”; del griego “sifón”, en el sentido etimológico de “tránsito, paso”, aludiendo a la excesiva emisión de orina. Más de quince siglos después, Thomas Willis (1674) describió por primera vez en Occidente el carácter dulce de la orina de los pacientes con diabetes e introdujo el término “mellitus” del latín, que significa “miel” (1). Sin embargo, no fue hasta 1788, que Thomas Cawley vinculó por primera vez el páncreas con la diabetes. Posteriormente, en 1900, Eugene Opie estableció la asociación entre esta entidad y la destrucción de los islotes pancreáticos descubiertos por Paul Langerhans (1869). Esta observación estimuló el estudio de los efectos derivados de la administración de “extractos

pancreáticos”, finalmente denominados por Edward Albert Sharpey-Schafer (1910) “insulina”, del latín “insula” (2). El aislamiento de la insulina en 1921 por Frederick Banting y Charles Best, y su posterior empleo en la clínica representaron la primera gran revolución en el manejo de la diabetes, que hasta entonces se había mantenido como una enfermedad de pronóstico infausto y prácticamente nulas opciones terapéuticas. Este hito precedió en varias décadas al descubrimiento por Marcel Janbon (1942) del primer fármaco oral para la terapia de la diabetes, una sulfonilurea.

Clasificación etiológica y complicaciones crónicas.

La mayoría de los casos de diabetes se encuadran en dos grandes categorías etiopatogénicas. La asignación de un tipo de diabetes a nivel individual frecuentemente depende de las circunstancias presentes en el momento del diagnóstico, y muchos individuos no se encuadran perfectamente en una categoría específica. Así, para el clínico y para el paciente, es menos importante etiquetar el tipo particular de diabetes, que entender la patogénesis de la hiperglucemia y tratarla de manera efectiva.

En la **diabetes tipo 1** (DM1), que representa el 5-10% de los casos de DM, existe una destrucción de células β que conduce a un déficit absoluto de insulina, precisando insulino terapia para la supervivencia. De manera alternativa, estos individuos pueden optar al trasplante pancreático o de islotes. Los individuos con riesgo incrementado de desarrollar este tipo de DM pueden a menudo identificarse mediante evidencia serológica de autoinmunidad contra los islotes pancreáticos y mediante marcadores genéticos, distinguiéndose dos subcategorías. En la **DM1A o autoinmune** están implicadas la inmunidad celular, mediada por linfocitos T y macrófagos, y humoral, a través de diferentes

anticuerpos: autoanticuerpos frente a las células de los islotes (*islet-cell antibodies*; ICA), anti-insulina (*anti-insulin antibodies*; AAI), anti-GAD (frente a la decarboxilasa del ácido glutámico) y anti-IA2 (frente a la tirosín-fosfatasa de los islotes). Existe una fuerte asociación a los alelos HLA-DQ y DR, que puede ser predisponente o protectora. La destrucción autoinmune de células β tiene, por tanto, múltiples predisposiciones genéticas (en el cromosoma 6 reside el 50% de la susceptibilidad para la enfermedad, que muestra clara agregación familiar), si bien también se ha relacionado con factores epigenéticos poco definidos aún. Así, parece que estímulos ambientales (infecciones virales, componentes de la dieta...) podrían activar la autoinmunidad de un huésped genéticamente susceptible. En una segunda subcategoría, la **DM1B o idiopática**, se engloban una minoría de formas de DM1 sin etiología conocida. Esta otra forma de DM presenta una fuerte herencia, sin evidencia de autoinmunidad ni asociación HLA, siendo más frecuente en pacientes de origen africano y asiático (3).

La categoría de mayor prevalencia, la **diabetes tipo 2 (DM2)**, supone el 90-95% de las formas de DM. Combina en grado variable una resistencia a la acción de la insulina sobre los tejidos periféricos y una inadecuada secreción insulínica compensatoria, especialmente como respuesta al estímulo de la glucosa. Por tanto, este tipo de DM incluye a los individuos que presentan una pérdida de la sensibilidad a la insulina y un déficit generalmente relativo (más que absoluto) de insulina, si bien sigue existiendo controversia sobre cuál de estas alteraciones representa el defecto primario de la DM2. Estos individuos pueden no precisar insulino terapia para su supervivencia, sobre todo al inicio del proceso. Se cree que la DM2 tiene una predisposición genética, sobre la cual la exposición a una serie de influencias ambientales precipita el inicio de la enfermedad clínica. Su herencia es poligénica, si bien presenta mayor influencia genética que la DM1. Los genes que determinan el riesgo de DM2

más estudiados son *calpaina-10*, *Kir6.2* y *PPAR γ 2*. Desde el punto de vista fisiopatológico, la DM2 se ve precipitada ante la imposibilidad de la célula β de adaptarse a las reducciones de la sensibilidad a la insulina que se producen a lo largo de la vida. Los factores más frecuentes que imponen un aumento de la carga secretora a la célula β son la pubertad, la gestación, y un estilo de vida sedentario asociado o no a un consumo calórico excesivo, que conducen al aumento de peso (3).

Por último, se distinguen **otros tipos** específicos de diabetes, menos prevalentes, y la diabetes gestacional (DMG).

El grado de hiperglucemia puede cambiar con el tiempo, reflejando la gravedad del proceso metabólico subyacente, más que la etiología específica de éste. De este modo, la hiperglucemia crónica de los pacientes con DM sin un manejo adecuado, incluso en ausencia de síntomas, se asocia con daño y disfunción de diferentes órganos. Las **complicaciones** a largo plazo de la DM incluyen: la retinopatía, con pérdida potencial de la visión; la nefropatía, que conduce a fracaso renal; la neuropatía periférica, con riesgo de úlceras en los pies, amputaciones y articulaciones de Charcot; y la neuropatía autonómica, causando síntomas gastrointestinales, genitourinarios, cardiovasculares y disfunción sexual. Además, la DM se asocia a una incidencia incrementada de enfermedad cardiovascular (ECV), arterial periférica y cerebrovascular ateroscleróticas; tanto por sí misma como por su asociación a la hipertensión y a anomalías del metabolismo lipoproteico. Estas potenciales complicaciones suponen una disminución de la calidad de vida de los pacientes con DM, e incluso una reducción de su esperanza de vida.

Impacto socio-sanitario.

La DM ejerce un considerable impacto sobre la salud pública, debido esencialmente a su elevada prevalencia y a sus frecuentes complicaciones asociadas. Es una de las enfermedades crónicas más prevalentes en todo el mundo y constituye una de las principales causas de morbilidad en nuestra sociedad. Así, las complicaciones crónicas asociadas a la DM constituyen una de las principales causas de minusvalía y mortalidad prematura en la mayoría de los países desarrollados. En definitiva, la DM representa una de las principales partidas presupuestarias de los Sistemas de Salud.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) vaticina una progresión en la **prevalencia** de la enfermedad, hasta alcanzar proporciones epidémicas. Se ha estimado, sobre la población adulta mundial, una prevalencia de DM del 6,4% (afectando a 285 millones de adultos) en 2010, con un incremento al 7,7% (439 millones de adultos) en 2030. Este incremento será del 69% en países en desarrollo y del 20% en países desarrollados (4). El aumento de DM2 es desproporcionadamente mayor en las poblaciones de origen no europeo, especialmente de países menos desarrollados o con reciente crecimiento económico. Igualmente, si bien en menor proporción, está aumentando la incidencia de DM1A en países de todo el mundo, especialmente a edades más precoces. Para la población de EEUU se ha estimado un incremento de la prevalencia de DM del 165%, desde los 11 millones en el 2000 (4% de prevalencia) hasta los 29 millones en el 2050 (7,2% de prevalencia). Este aumento porcentual será mayor en los individuos de 75 años o más (271% en mujeres y 437% en varones). Del incremento estimado de 18 millones de casos adicionales de DM para 2050, se ha calculado que el 37% será secundario a cambios en la composición demográfica, el 27% se deberá al crecimiento de la población, y el 36% a cambios en las tasas de prevalencia (5). En Europa, la prevalencia de DM varía entre estudios

por múltiples razones, que incluyen diferencias en las metodologías empleadas. Las estimaciones de prevalencia en España oscilan entre el 4,8% y el 18,7% para la DM2, y entre el 0,08% y el 0,2% para la DM1. En cuanto a la incidencia anual, se estima entre 146 y 820 casos nuevos por 100.000 habitantes para la DM2, y entre 10 y 17 por 100.000 habitantes para la DM1 (6). Cabe destacar los resultados del estudio di@bet.es, que sitúan la prevalencia total de DM ajustada por edad y sexo en el 13,8%. De éstos, casi la mitad (6%) desconocían padecer la enfermedad. Además, la prevalencia de DM era mayor con la edad y en el sexo masculino (7).

La DM se sitúa entre la cuarta y la octava causa de **mortalidad** en países desarrollados. Así, en Europa, las tasas de mortalidad oscilan entre 7,9 defunciones por 100.000 personas/año en Grecia y 32,2 en Italia (6). En España, dicha tasa es de aproximadamente 20,2 defunciones por 100.000 personas/año (8). Por otro lado, la DM es una de las pocas causas que provoca mayor mortalidad en las mujeres que en los varones; representa la tercera causa de muerte en mujeres y la séptima en varones (6). En cualquier caso, la mortalidad incrementada en los pacientes adultos con DM es frecuentemente secundaria a sus complicaciones. En este sentido, la causa más frecuente de mortalidad de los pacientes con DM es la ECV, presente en el 69,5% de los certificados de defunción de estos pacientes (9).

En el estudio dirigido por la Asociación Americana de Diabetes, el **coste** total estimado de la DM diagnosticada fue de 245.000 millones de dólares en 2012, lo cual supuso un incremento del 41% respecto a la estimación de 2007 (174.000 millones de dólares). Esta cantidad incluye 176.000 millones de dólares en costes médicos directos y 69.000 millones de dólares por productividad reducida. Para la mayoría de las categorías analizadas, la atención a los pacientes diagnosticados con DM supone más de uno de cada cinco dólares

invertidos en atención sanitaria en EEUU, y más de la mitad de dicho gasto es directamente atribuible a la DM (10). Este estudio no incluye los componentes adicionales que contribuyen a la carga social asociada a la DM, como los daños intangibles derivados del dolor y el sufrimiento, la atención proporcionada por cuidadores no remunerados, y el gasto asociado a la DM no diagnosticada. En nuestro país, el estudio SECCAID (*Spain Estimated Cost Ciberdem-Cabimer in Diabetes*) ha indicado que los costes directos anuales de la DM en España representan 5.809 millones de euros (el 8,2% del gasto sanitario total) (11).

Hasta la fecha, el tratamiento disponible para la DM implica generalmente medidas farmacológicas de por vida, ya que ninguno de estos fármacos ha conseguido la resolución permanente de esta alteración metabólica. A pesar del amplio arsenal desarrollado para el tratamiento de la DM, no se dispone, por tanto, de terapias etiológicas que curen definitivamente la enfermedad. Como se comentó previamente, el pilar del tratamiento de la DM1 y de un porcentaje considerable de pacientes con DM2 sigue siendo la administración de múltiples inyecciones diarias de insulina. En este sentido, ya hace casi 25 años que el *Diabetes Control and Complication Trial* demostró que la terapia intensiva con insulina es efectiva en la prevención del inicio y de la progresión de las complicaciones a largo plazo de la DM, si bien con la contrapartida de incrementar sustancialmente el riesgo de hipoglucemias graves (12). En definitiva, las limitaciones del tratamiento actual de la DM hacen necesario desarrollar nuevas estrategias terapéuticas que a largo plazo deben orientarse a conseguir la curación de la enfermedad, con el consecuente beneficio socioeconómico.

Trasplante de páncreas e islotes.

Hitos históricos y conceptos actuales del trasplante de órgano sólido.

El trasplante de órgano sólido representa uno de los avances terapéuticos más reseñables del último siglo. Se ha convertido en una terapia consolidada que salva la vida o mejora su calidad a miles de pacientes en todo el mundo. Así, para el año 2014, el Observatorio Global de Donación y Trasplante (*Global Observatory on Donation and Transplantation*; GODT) estimó un total de 119.873 órganos trasplantados anualmente (13).

Los primeros alotrasplantes se realizaron con riñones provenientes de donantes cadáveres, por el cirujano ucraniano Voronoy en 1936 (14). Debido a la escasa noción acerca de los efectos deletéreos de la isquemia caliente, así como del rechazo por mediación inmunológica, los trasplantes renales efectuados en las siguientes décadas (donación “en asistolia”; DA) culminaban invariablemente en fallo del aloinjerto. En la década de 1950, empezaron a emplearse riñones de donantes vivos, en un intento de evitar un daño isquémico excesivo. Murray y Merrill publicaron en 1954 el primer caso exitoso de trasplante renal, entre gemelos vivos univitelinos. A partir de 1960, tras el primer trasplante renal con inmunosupresión meramente farmacológica (con ciclofosfamida y metotrexato) (15), se realizaron importantes avances terapéuticos en relación con la inmunología del trasplante. Por otro lado, en 1968 el *Harvard Ad Hoc Committee* definió el concepto de “muerte encefálica” (ME) en base a criterios neurológicos (16). La aceptación social del concepto y la aplicación legal de los criterios para el diagnóstico de la ME hicieron que la donación tras el fallecimiento en estas circunstancias reemplazara casi totalmente a la DA. Así, los donantes “cadáveres con corazón latiente” pasaron a constituir la principal fuente de

donación de órganos. Sin embargo, la demanda creciente de órganos ha impulsado, a partir de la década de 1990, distintos métodos para ampliar el *pool* de donantes de órganos. En dicho contexto, se ha reavivado el interés por la donación tras la “muerte cardiaca” (17, 18).

Actualmente, el diagnóstico de **muerte** a efectos de la donación se encuentra regulado en España por el 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* (19). De acuerdo con la legislación española, el fallecimiento puede diagnosticarse mediante la confirmación del cese irreversible de las funciones cardiorrespiratorias (muerte por parada cardiorrespiratoria) o de las funciones encefálicas (ME). En lo que respecta a los criterios de diagnóstico de muerte por parada cardiorrespiratoria, la condición de irreversibilidad exige respetar un periodo de observación sin maniobras de cardiocompresión (masaje cardiaco externo; MCE) ni soporte ventilatorio (ventilación mecánica; VM) durante el cual se constate el cese de la función cardiorrespiratoria, que en España se encuentra estipulado en 5 minutos.

Se han empleado distintos **términos** en el mundo anglosajón para hacer referencia a la “Donación en Asistolia (DA)” o “Donación a Corazón Parado (DCP)”; como “*Donation after Cardiac Death (DCD)*”, “*Donation after Circulatory Death*”, “*Donation after Cardio Circulatory Death*” o el más antiguo “*Non Heart Beating Donation (NHBD)*”. Actualmente se reconoce como más apropiado el término “*Donation after the Circulatory Determination of Death (DCDD)*” (20); al considerar que el fallecimiento no viene determinado por la pérdida irreversible de la función cardiaca, sino por la pérdida irreversible de la función circulatoria (y respiratoria). Así, podrían introducirse los términos “Donación tras Muerte Constatada por Criterios Circulatorios” o “Donación tras Muerte Circulatoria” para hacer referencia a este tipo de donación, en contraposición a la “Donación tras Muerte Encefálica”

(21). No obstante, todavía no se ha unificado la terminología en el ámbito internacional. En el presente documento se emplean los términos “Donación en Parada Cardíaca (*Non-Heart-Beating Donation*; NHBD)” y “Donación en Muerte Cerebral (*Brain-Dead Donation*; BDD)”, ampliamente integrados en la literatura, para hacer referencia a estos conceptos.

Los **NHBDs** han sido considerados tradicionalmente como “donantes marginales” y se incluyen con frecuencia dentro del grupo de los “donantes con criterios expandidos”, debido a la presencia de unos tiempos de isquemia prolongados que *a priori* pueden condicionar la viabilidad de los órganos y por tanto los resultados postrasplante. Así, en comparación con los órganos procedentes de la BDD, los órganos de la NHBD se asociaron de inicio a una alta incidencia de función retardada o incluso de fallo primario del injerto, así como a una baja supervivencia de éste en relación con complicaciones más tardías pero específicas. La falta de irrigación de los órganos durante la parada cardiorrespiratoria (isquemia caliente), la preservación en frío de los órganos (isquemia fría) y la posterior reoxigenación de los mismos tras el trasplante (reperfusión) se consideran los principales factores responsables de los malos resultados obtenidos inicialmente con estos trasplantes. El progresivo conocimiento durante los últimos años acerca de los mecanismos implicados en la lesión por isquemia-reperfusión (I/R), ha permitido configurar protocolos que desarrollan estrategias protectoras frente a los daños que se producen en estos órganos (21).

El Primer Taller Internacional sobre NHBD (Maastricht, 1995) identificó cuatro categorías de NHBD, según las circunstancias en las que se produce el fallecimiento. Los tipos 1 (muerte a la llegada) y 2 (resucitación infructuosa) se han denominado conjuntamente como “Donación en Parada Cardíaca No Controlada (*Uncontrolled Non-Heart-Beating Donation*; UNHBD)”. Los tipos 3 (a la espera de la parada cardiorrespiratoria) y 4 (parada cardiorrespiratoria en ME) se han denominado igualmente como “Donación en Parada

Cardiaca Controlada (*Controlled Non-Heart-Beating Donation*; CNHBD)” (22). Si bien la clasificación de Maastricht sigue siendo ampliamente utilizada en el ámbito internacional, se ha considerado necesario adaptar dicha clasificación a la experiencia española. La clasificación de Maastricht modificada (Madrid 2011) se describe en la tabla 1 (21), junto con las especificaciones propuestas previamente por Sánchez-Fructuoso et al. (23).

Tabla 1. Clasificación de Maastricht modificada (Madrid 2011) de los NHBDs, adaptada del Documento de Consenso Nacional 2012 de la ONT (21), con las especificaciones de Sánchez-Fructuoso et al. (23).

	Categoría	Descripción
UNHBD	1	<i>Muerte a la llegada</i> Muerte súbita, traumática o no, fuera del hospital, sin inicio de RCP.
	2	<i>Resucitación infructuosa</i> Parada cardiorrespiratoria con inicio de maniobras de RCP que resultan no exitosas. Se diferencian dos subcategorías:
	2.a.	<i>Extrahospitalaria</i> Parada en el ámbito extrahospitalario, atendida por el servicio de emergencias extrahospitalario, que traslada al paciente con MCE y VM al hospital.
	2.b.	<i>Intrahospitalaria</i> Parada en el ámbito intrahospitalario, presenciada por el personal sanitario, con inicio inmediato de maniobras de RCP.
	5	<i>Resucitación infructuosa en UCI</i> Parada cardiorrespiratoria inesperada en la UCI.
CNHBD	3	<i>A la espera de la parada cardiorrespiratoria</i> LTSV* tras acuerdo entre el equipo sanitario y con los familiares o representantes del paciente.
	4	<i>Parada cardiorrespiratoria en ME</i> Parada cardiorrespiratoria mientras se establece el diagnóstico de ME o después de haberse establecido, pero antes del traslado a quirófano.

*Incluye la retirada de cualquier tipo de asistencia ventricular o circulatoria (como la ECMO)

CNHBD, donación en parada cardiaca controlada (*controlled non-heart-beating donation*); ECMO, oxigenación con membrana extracorpórea (*extracorporeal membrane oxygenation*); LTSV, limitación del tratamiento de soporte vital; MCE, masaje cardiaco externo; NHBD, donación en parada cardiaca (*non-heart-beating donation*); ONT, Organización Nacional de Trasplantes; RCP, reanimación cardiopulmonar; UCI, unidad de cuidados intensivos; UNHBD, donación en parada cardiaca no controlada (*uncontrolled non-heart-beating donation*); VM, ventilación mecánica.

La clasificación de Maastricht modificada (Madrid, 2011) mantiene los dos subgrupos relativos a la UNHBD (tipos 1 y 2) y la CNHBD (tipos 3 y 4), previamente propuestos en la clasificación de Maastricht. A continuación, se describen los tipos de NHBDs (21):

Dado su potencial de donación de tejidos, se ha decidido mantener en la clasificación el **tipo 1**; a pesar de que actualmente las personas fallecidas tras parada cardiorrespiratoria sin haber sido sometidas a maniobras de RCP no son consideradas como posibles donantes de órganos por el daño ocasionado por la isquemia.

La NHBD mayoritaria en España es la **tipo 2**, que se produce en personas fallecidas tras considerarse infructuosas las maniobras de RCP aplicadas. Debido a que el tiempo de parada y los tiempos hasta la perfusión de los órganos serán menores cuando la parada cardiorrespiratoria acontece en el medio intrahospitalario, con el consiguiente menor estrés isquémico para los órganos obtenidos; dentro del tipo 2 se han establecido dos subcategorías, según la parada cardiorrespiratoria haya ocurrido en el ámbito extrahospitalario (2.a.) o intrahospitalario (2.b.). Además, de todos los órganos procedentes de NHBDs, los de los donantes sin patologías conocidas antes de sufrir la parada cardiorrespiratoria son los que obtienen mejores resultados. Así, se ha enfatizado la diferencia entre la parada cardiorrespiratoria que ocurre en el ámbito extrahospitalario o en el servicio de urgencias de aquella que ocurre en un paciente ingresado en el hospital, con patología aguda asociada a probables comorbilidades previas. Incluso, el grupo del Hospital Clínico San Carlos (HCSC) ha propuesto la distinción de un **tipo 5**, al observar peores supervivencias en los injertos renales procedentes de UNHBD fallecidos en una unidad de cuidados intensivos (UCI) (23).

En el donante **tipo 3** el cese de la función circulatoria y respiratoria tiene lugar tras la limitación del tratamiento de soporte vital (LTSV), por considerarse dicho tratamiento

fútil. La LTSV incluye la retirada de cualquier tipo de asistencia ventricular o circulatoria, incluyendo la oxigenación con membrana extracorpórea (*extracorporeal membrane oxygenation*; ECMO).

Por último, el **tipo 4** hace referencia a los pacientes que, en el proceso del diagnóstico de ME o tras realizarse éste, sufren una parada cardiorrespiratoria. Es probable que primero se trate de restablecer la actividad cardíaca (maniobras de RCP) pero, cuando no se consigue, puede optarse por activar el proceso de NHBD.

Donación en parada cardíaca no controlada como alternativa.

Durante el año 2015, se registró en España una tasa de donación de órganos sólidos de 39,7 donantes por millón de población, correspondiente a un total de 1851 donantes reales (24). A pesar de esta importante actividad de donación, existe una carencia relativa que impide cubrir las crecientes listas de espera para trasplante de nuestra población. Al igual que en el resto del mundo, la actividad de trasplante en España hasta el momento se fundamenta mayoritariamente en la donación de personas fallecidas en ME. En dicho contexto, y a pesar del paulatino incremento en el número de donantes de edad avanzada, se está produciendo en nuestro país un descenso progresivo en el potencial de BDD. Este último es secundario a, por un lado, cambios epidemiológicos que determinan una menor mortalidad relevante para la donación (entendiendo como tal la mortalidad por accidentes de tráfico y por enfermedad cerebrovascular) y, por otro lado, modificaciones en el abordaje del paciente neurocrítico (25). De ahí la necesidad de desarrollar estrategias médicas que incrementen la disponibilidad de órganos para trasplante, como la búsqueda de fuentes alternativas a la donación de órganos de personas en ME, la optimización de los órganos

obtenidos y la extensión de los criterios de donación. En concreto, la NHBD, en creciente expansión en España y en otros países de nuestro entorno, se considera una alternativa no solo válida sino complementaria para la donación de órganos (26).

La **NHBD** se ha desarrollado a lo largo de los años de manera diferente según la localización geográfica considerada. Según datos del GODT, se estimó que en 2014 el 9,3% de los donantes fallecidos en el mundo fueron NHBD (13). Sin embargo, el trasplante de órganos procedentes de este tipo de donantes se realiza en un número limitado de países, predominando en la mayoría la donación de la categoría 3 de Maastricht. En EEUU, la NHBD, que en 2008 representó el 10,6% de toda la actividad de donación (27), ha aumentado progresivamente durante los últimos años. En Europa, únicamente 10 países habían desarrollado alguna actividad de NHBD hasta 2011; siendo ésta significativa en Reino Unido, Holanda y Bélgica (principalmente CNHBD), y España y Francia (principalmente UNHBD) (28). En este sentido, España ha desarrollado un modelo pionero de UNHBD que es reconocido como una referencia a nivel internacional.

De esta manera, la NHBD se ha afianzado durante los últimos años en **España** como la vía más clara de expansión del número de donantes. Este tipo de donación representó en 2016 el 24,4% del total de donantes fallecidos; es decir, prácticamente 1 de cada 4 donantes lo fue en parada cardíaca (29). De éstos, el tipo predominante corresponde a la categoría 2 de Maastricht (25), gracias al desarrollo durante las últimas décadas de múltiples programas de UNHBD en las distintas comunidades autónomas españolas, cuyo marco legal específico es proporcionado por el Real Decreto 2070/1999 (19). En el *ranking* de actividad por hospitales, el HCSC registró en 2016 la mayor actividad de NHBD (29). Fue precisamente este hospital el primer centro español que puso en marcha, en 1989, los protocolos de NHBD (30).

El HCSC, pionero y líder nacional a lo largo de los últimos años en la UNHBD, desarrolló para ello un programa específico, denominado “**código 9**”. Este programa sigue los pasos descritos a continuación (31):

1. Maniobras de RCP en el lugar de la parada cardiorrespiratoria, según los protocolos de la European Resuscitation Council (ERC) y la American Heart Association (AHA). Tras 30 minutos de RCP infructuosa, el personal médico evalúa la muerte por criterios cardiorrespiratorios, y comprueba el cumplimiento de los criterios generales de donación (los mismos que se contemplan para la BDD) y de los criterios específicos de selección del potencial UNHBD:
 - Tiempo desde la parada cardiorrespiratoria hasta el inicio del soporte vital avanzado (SVA) (tiempo de parada) menor de 10 minutos;
 - Edad entre 7 y 55 años (ampliable según estudios de viabilidad y para la donación de tejidos);
 - Causa de muerte conocida (o sospechada);
 - Ausencia de lesiones sangrantes en tórax o abdomen;
 - Aspecto externo sano, sin datos indicativos de factores de riesgo para SIDA;
 - Tiempo de asistencia (incluyendo el traslado al hospital) menor de 90 minutos.
2. Aviso al Coordinador de Trasplantes del HCSC, que a su vez alerta al equipo de trasplante completo.
3. Traslado del paciente al hospital por una UCI móvil; con VM, MCE y perfusión de líquidos.
4. Certificación de la muerte por el intensivista de guardia. Obtención de una radiografía de tórax y muestras de sangre para analítica, grupo sanguíneo, Rh, y serología.

5. Obtención del permiso por parte del Juzgado de Guardia para iniciar las maniobras de preservación del cadáver.
6. Administración de un bolo de heparina (500 UI/Kg).
7. Traslado del cadáver al quirófano para la realización de un bypass arteriovenoso con oxigenación de membrana e hipotermia profunda. El tiempo desde la parada cardiorrespiratoria hasta el establecimiento de las maniobras de preservación debe ser inferior a 120 minutos (tiempo de isquemia caliente).
8. Preservación específica para los pulmones (32).
9. Extracción de los órganos, tras la obtención del consentimiento familiar y el permiso judicial. El tiempo desde la parada cardiorrespiratoria hasta el inicio de la extracción debe ser inferior a 240 minutos.
10. Tras finalizar la extracción de órganos y tejidos, se seleccionan los receptores de injertos de la lista de espera del HCSC o de otros hospitales a través de la Organización Nacional de Trasplantes (ONT).

Las maniobras de **preservación** incluyen la realización de una laparotomía con canulación de la aorta y de la cava inferior, y la perfusión posterior de una solución de conservación. El propósito de estas maniobras es alcanzar por enfriamiento bajas temperaturas del órgano, y así evitar la progresión de los cambios celulares deletéreos secundarios a la isquemia. En ausencia de circulación, las células inician rápidamente un metabolismo anaeróbico, que requiere 19 veces más glucosa como sustrato para generar adenosín trifosfato (ATP) que el metabolismo aeróbico. Se produce en consecuencia una rápida depleción de los almacenes intracelulares de energía y una acumulación de metabolitos tóxicos y ácido láctico. La hipoxia lesiona los canales de calcio, permitiendo mayores concentraciones del catión en el citoplasma. Además, ante el progresivo fallo de

las bombas iónicas de membrana por la falta de ATP, la membrana celular se despolariza según el sodio entra y el potasio sale de la célula, con la subsiguiente degeneración hidrónica de la misma. A 10 °C la tasa metabólica se reduce a la mitad de la correspondiente a la normotermia, y a 4 °C a <10%. Por otro lado, las soluciones de conservación se han diseñado para minimizar los efectos de la isquemia prolongada y de la reperfusión. Contienen un tampón fisiológico (de fosfato o citrato) que mantiene el pH ante la acumulación de ácido láctico, y moléculas de gran tamaño (como manitol) que mantienen el potencial osmótico intravascular en ausencia de sangre, minimizando además el edema celular. La solución de Wisconsin, empleada en la donación de páncreas entre otros, es además rica en potasio y pobre en sodio, lo que minimiza la difusión de estos electrolitos. En cualquier caso, algunos trabajos relativamente recientes sugieren la idoneidad de emplear soluciones con una composición más afín al medio extracelular (14).

Los distintos órganos presentan una tolerancia diferente a los **tiempos** de isquemia caliente y fría, en parte según la naturaleza del órgano en sí, y en parte según las demandas del órgano tras el trasplante. En el caso del páncreas, se considera preferente el trasplante antes de las 12 horas si procede de BDD, o antes de las 6 horas si es de NHBD (14). De cualquier manera, se trata de un continuo, por lo que una de las prioridades es minimizar estos tiempos en lo posible.

Evolución y situación actual del trasplante de páncreas e islotes.

Desde 1984, año en el que se efectúa el primer trasplante de páncreas en **España**, se han practicado un total de 1632; prácticamente todos ellos trasplantes de órgano sólido, ya que el trasplante de islotes pancreáticos en nuestro país se ha reducido a casos anecdóticos.

En cuanto a los últimos datos disponibles en relación con la evolución de la lista de espera del trasplante de páncreas en España, al inicio del 2015 se encontraban en lista de espera 111 pacientes. Durante ese año se incluyeron 86 pacientes, lo cual supuso un total de 197 pacientes en lista durante el año 2015. Se excluyeron de la lista 23 pacientes, se realizaron 97 trasplantes y fallecieron 5, quedando a final del año 72 receptores en lista (33).

El **trasplante de páncreas** se desarrolló inicialmente como alternativa al abordaje de la DM con múltiples inyecciones diarias de insulina. El objetivo de partida era la curación de la DM restaurando la masa de células β para alcanzar así una reposición fisiológica de insulina. Como se comentó previamente, la DM1 es debida a la destrucción autoinmune de las células β , y la restauración de esta masa β se ha planteado como objetivo terapéutico desde hace años. La demostración de la reducción de la masa β en los pacientes con DM2, con disfunción β celular e incapacidad de superar la demanda de insulina generada por la situación de resistencia insulínica, plantea que estos pacientes también sean candidatos a recibir terapias que restauren su masa β con un objetivo curativo. El trasplante de páncreas completo consigue mantener la normoglucemia de forma consistente, y a largo plazo en la mayoría, y ha demostrado mejorar la supervivencia y la calidad de vida de los pacientes con DM (34-36). Sin embargo, la escasa disponibilidad de órganos susceptibles de trasplante y la necesidad de inmunosupresión limitan de manera considerable su aplicabilidad.

El trasplante de páncreas es un tratamiento establecido para los pacientes con DM1 y nefropatía diabética en estadio de insuficiencia renal crónica terminal que reciben un trasplante de riñón (37). El doble trasplante renopancreático puede realizarse de forma simultánea (*simultaneous pancreas and kidney transplantation*; SPK) o secuencial, con trasplante del páncreas tras un periodo de recuperación después del renal (*pancreas after kidney transplantation*; PAK) (38). Por otro lado, el trasplante de páncreas aislado (*pancreas*

transplantation alone; PTA) se plantea ante la inestabilidad metabólica grave, con hipoglucemias graves recurrentes por falta de percepción de las mismas, o ante las complicaciones de la DM. Sin embargo, el posible beneficio obtenido del PTA es mucho más controvertido (39), y en consecuencia aún no tiene unas indicaciones bien establecidas.

Por su parte, el **trasplante de islotes pancreáticos** (TIP) es particularmente atractivo como tratamiento definitivo de la DM. Frente al trasplante de órgano sólido (páncreas), tiene la ventaja de ser una técnica mínimamente invasiva con escasa morbilidad y prácticamente nula mortalidad, y en consecuencia un coste económico previsiblemente menor.

La era moderna en la historia del TIP comenzó con la descripción, por Paul Lacy en 1967, de un método reproducible para el aislamiento de islotes mediante la digestión del páncreas con colagenasa (40). Pese a los múltiples avances técnicos desarrollados en las siguientes décadas, a finales del siglo XX, los resultados en cuanto al mantenimiento de una función β residual del injerto (definida por unos niveles de péptido C detectables) de manera sostenida eran muy desalentadores (41). Finalmente, la publicación en el año 2000 de la serie del grupo de Edmonton, que consiguió la independencia sostenida de insulina exógena en el 100% de 7 pacientes trasplantados (42), supondría el paso definitivo hacia la consideración del TIP como una alternativa válida en el tratamiento de la DM. Los cambios más relevantes introducidos en el protocolo de Edmonton, que condicionaron la mejoría de los resultados, fueron la modificación del régimen de inmunosupresión, en el que se prescindió de los glucocorticoides y se incluyó sirolimus (rapamicina), bajas dosis de tacrolimus (FK-506) y daclizumab (un anticuerpo monoclonal frente al receptor de la interleuquina 2); y el trasplante de una masa β superior a la empleada previamente, con una media de más de 4.000 equivalentes de islotes por Kg de peso y múltiples infusiones de islotes procedentes de diferentes donantes (43).

El aislamiento de los islotes es un procedimiento notablemente más complejo que la obtención del órgano sólido para el trasplante vascularizado de páncreas. La técnica quirúrgica empleada en la extracción del páncreas y la perfusión *in situ* es la misma en ambos casos. El objetivo es mantener la integridad del órgano y su cápsula, y lograr una perfusión e hipotermia adecuadas. Tras la extracción, el órgano es transportado en frío desde el quirófano al laboratorio. La conservación del páncreas se lleva a cabo por el “método de doble capa”, que consiste en alojar el páncreas extraído sobre un lecho de perfluorocarbono, con alta saturación de oxígeno, y una capa superior con solución de Wisconsin. La conservación con doble capa proporciona concentraciones de pO₂ y de ATP en el tejido pancreático significativamente mayores que con la solución de Wisconsin aislada (44, 45). En el laboratorio, primero se limpia el órgano, eliminando los restos de otros tejidos; y se inyecta una solución con enzimas (colagenasa/liberasa) a través del ducto pancreático. A continuación, el páncreas se coloca en la cámara de Ricordi conectada a un circuito cerrado. Así, la combinación de la acción enzimática y la agitación suave de la cámara digiere el páncreas hasta la separación de los islotes del páncreas exocrino. La preparación obtenida es purificada mediante gradientes de densidad; y posteriormente, la preparación de islotes es trasplantada o mantenida durante 1-3 días en cultivo (43). El trasplante de los islotes se realiza mediante embolización al hígado tras su infusión en la vena porta (41).

Durante los primeros días tras el trasplante se produce una significativa pérdida inicial de islotes, de origen multifactorial, en parte secundaria a las lesiones derivadas de la agresión que supone el proceso de aislamiento y el del propio trasplante (46). Así, tras la infusión intraportal de los islotes, el contacto con las células sanguíneas da lugar a una destrucción de los mismos mediada por la inmunidad inmediata o innata. También influye la inflamación inespecífica en el lugar de implantación, con una sobreexpresión de

citoquinas proinflamatorias. Igualmente, la hipoxia a la que están sometidos, especialmente durante las primeras horas. Incluso, se ha cuestionado que el hígado sea un buen órgano para facilitar la revascularización de los islotes (43). Finalmente, los islotes que logran implantarse se ven sometidos a la agresión debida al rechazo inmunológico al tejido alogénico, a la recurrencia del proceso autoinmune que originó la DM, a la toxicidad de los inmunosupresores y a la probable toxicidad metabólica derivada de su implantación en el hígado. La ubicación intrahepática de los islotes implantados implica una exposición a concentraciones mayores, y en consecuencia probablemente tóxicas, de glucosa y ácidos grasos tras su absorción a nivel intestinal. Adicionalmente, los islotes intrahepáticos pierden capacidad para liberar glucagón durante la hipoglucemia (47, 48); y aunque eventualmente no se mantuviese la insulinoindendencia, estos pacientes se beneficiarían igualmente de la respuesta con glucagón. Por otro lado, tanto el rechazo inmunológico como la eventual recurrencia de la autoinmunidad frente a los islotes hacen necesario el uso crónico de inmunosupresores. El tratamiento inmunosupresor, sin embargo, representa una de las principales limitaciones para la generalización del TIP. A pesar de la mejoría de los resultados con la eliminación de los corticoides en el protocolo de Edmonton, tacrolimus y sirolimus ejercen una demostrada toxicidad sobre la célula β , acentuada además por sus elevadas concentraciones en la sangre portal con respecto a la circulación periférica tras su administración oral. Los múltiples inconvenientes asociados a la implantación hepática de los islotes (eventual compromiso de la revascularización de los islotes trasplantados, pérdida de la capacidad de respuesta con glucagón, y presencia de concentraciones mayores de metabolitos y fármacos inmunosupresores) ha impulsado la búsqueda de lugares alternativos de implantación más favorables para su supervivencia (46, 49).

Las indicaciones del TIP se centran en los pacientes que ya requieren inmunosupresión por la presencia de otro trasplante (esencialmente renal), o en pacientes con función renal conservada pero gran inestabilidad metabólica e hipoglucemias graves repetidas. Por tanto, el objetivo actual del TIP es alcanzar la estabilidad metabólica y evitar las hipoglucemias graves (50-52). El 83% de los pacientes trasplantados mantienen un injerto funcionante (definido según niveles de péptido C detectables) a los 3 años (53), resultados que mejoran los del PTA. La supervivencia del injerto permite mantener reducciones significativas de los requerimientos de insulina con respecto a las dosis pretrasplante, y un mejor control metabólico (en términos de hemoglobina glicosilada; A1c), con estabilidad de la glucemia y reducción de los episodios de hipoglucemia grave. La independencia de la insulina exógena, que en los últimos estudios se mantiene en un 44% de los pacientes a los 3 años (53), no representa un objetivo primario actualmente (54). Sin embargo, es de esperar que, en un futuro cercano, dada la continua mejoría de los resultados (55), la mayoría de estos pacientes puedan mantener también la insulino independencia a medio y largo plazo.

Las mejorías alcanzadas en el proceso de obtención de islotes pancreáticos en las últimas décadas, junto con los recientes esquemas de inmunosupresión, han hecho del TIP una potencial alternativa terapéutica de prometedor futuro. Sin embargo, todavía necesita superar importantes limitaciones en su aplicación. Estas limitaciones incluyen, al igual que en el trasplante de páncreas completo, la escasez de tejido donante y la toxicidad del tratamiento inmunosupresor crónico. La baja disponibilidad de órganos para la donación queda en este caso acentuada además por la necesidad de realizar múltiples infusiones de islotes procedentes de diferentes donantes. Son imprescindibles, además, equipos

profesionales e infraestructuras capaces de asumir el reto que supone el proceso global del TIP (56).

Como se comentó previamente, una de las estrategias propuestas para solucionar el problema de la falta de donantes es la utilización de donantes conocidos en la literatura como “marginales”, por ser desechados en condiciones ideales. Entre ellos se encuentran los NHBDs (26), comúnmente excluidos por los grupos de trabajo por estar expuestos a unos tiempos de isquemia prolongados que *a priori* pueden condicionar la viabilidad de los órganos. Si bien se dispone de estudios que avalan el empleo de NHBDs como fuente tanto de páncreas completo (57-60) como de TIP (61, 62) en condiciones semejantes a los BDD, su uso todavía está lejos de ser ampliamente aceptado.

Marcadores biomoleculares del estado tisular.

Respuesta inflamatoria inespecífica.

Conceptualmente, la disfunción primaria y eventual pérdida precoz del aloinjerto, bien sea de islotes o del páncreas completo, es el producto de una suma multifactorial en la que la **respuesta inflamatoria inespecífica** (RII) y el daño inducido por la I/R, de manera interrelacionada, juegan un papel esencial. Se asociarían además posibles factores técnicos que reduzcan la viabilidad del injerto. Adicionalmente en el caso de los TIP, los fenómenos químicos y mecánicos que suceden durante el aislamiento, las posibles contaminaciones de las sustancias empleadas en el mismo, un eventual número inadecuado de islotes y la mala vascularización durante las primeras horas tras el TIP pueden contribuir a la activación de un deletéreo entorno proinflamatorio. De este modo, en su recorrido hacia la plena funcionalidad, el injerto pancreático hacer frente en primer término a una tempestad inflamatoria. Por otro lado, la recurrencia del proceso autoinmune que originó la DM, la toxicidad de los inmunosupresores y el rechazo mediado por células o clásico, no formarían parte de esta RII (63). A continuación, se desarrollan brevemente los principales elementos que intervienen en esta RII.

1. Principales células implicadas en la RII.

Los efectores celulares de la RII; esencialmente macrófagos, granulocitos y linfocitos *natural killer* (NK); llevan a cabo la destrucción inmediata del hipotético agente agresor que desencadenó la RII. Para ello, reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (*pathogen-associated molecular patterns*; PAMPs), que son moléculas comunes a grupos de patógenos, altamente conservadas a lo largo de la evolución de la especie.

Durante la RII que determina el fallo primario del injerto, son principales protagonistas las células del sistema retículo-endotelial (SRE) o fagocítico mononuclear, que incluye los macrófagos tanto ya existentes en el tejido pancreático como los presentes en el receptor, en el caso concreto del TIP en el hígado, las células de Kupffer. El macrófago es diana de estímulos directos (como los exógenos, p. ej. LPS bacteriano) y posteriormente de la tormenta de mediadores que envuelve la RII. Es la principal fuente de TNF- α , el mediador fundamental de la RII; y es además el responsable de la producción inmediata de otras citoquinas, tanto pro (como IF- γ , IL-1, IL-6 e IL-8) como antiinflamatorias (como IL-10).

Los macrófagos “residentes” en el injerto pancreático completo o en los islotes (64) son aquellos que han sobrevivido al proceso del trasplante. Eso supone que, además de ser efectores de los fenómenos lesivos propios de la RII y una fuente de mediadores, alcanzan su destino final tras experimentar múltiples estímulos, tanto mecánicos como químicos, que amplifican tal respuesta. En presencia de IF- γ , LPS o TNF- α , estos macrófagos secretan, entre otros, grandes cantidades de IL-1 así como de NO (65). Además, el propio parénquima pancreático es capaz de secretar mediadores proinflamatorios independientemente de los macrófagos (66, 67), lo cual contribuye a amplificar y perpetuar la liberación de citoquinas.

Por otro lado, se han detectado niveles elevados de mediadores (TNF- α , IL-1 β , NO...) procedentes de las células de Kupffer, que constituyen más de la mitad de los macrófagos totales del organismo, tras el TIP (68). Además, en el TIP, juegan un papel primordial también tanto los hepatocitos como las células endoteliales del hígado receptor. Así, la generación de estrés oxidativo (fundamentalmente producción de NO) procedente de los hepatocitos en presencia de mediadores proinflamatorios e islotes es unas 30 veces mayor que la observada en condiciones normales (69). Las células endoteliales de los sinusoides hepáticos, por su parte, resultan esenciales en la angiogénesis en torno a los islotes, ya que

tras el aislamiento éstos están virtualmente desprovistos de neo-red capilar propia hasta pasadas casi 2 semanas del implante (70, 71).

2. Agentes exógenos desencadenantes de la RII.

El **lipopolisacárido bacteriano** (LPS), también conocido como endotoxina, es uno de los componentes principales de la membrana externa de las bacterias gram-negativas. Se trata de uno de los estímulos proinflamatorios más importantes, y es considerado como el mediador exógeno más relevante en situaciones de shock séptico. Es un glicolípido que une un complejo lipofílico denominado lípido-A, principal responsable de los efectos del LPS, y un polisacárido variable en función de la cepa bacteriana, que confiere la antigenicidad.

El LPS tiene un receptor plasmático proteico constitutivo (*LPS binding-protein*; LBP) que, en unión al LPS, estimula diferentes células inmunitarias, principalmente macrófagos/monocitos mediante su unión a receptores de membrana (CD14). Son necesarias, además, al menos dos proteínas intermediarias: el receptor de tipo Toll 4 (*Toll-like receptor 4*; TLR-4) y la proteína de diferenciación mieloide 2 (*myeloid differentiation protein*; MD-2) (72). Los receptores tipo Toll (*Toll-like receptors*; TLR) son proteínas transmembrana receptoras que reconocen moléculas estructuralmente conservadas derivadas de patógenos durante una infección y activan la cascada de la inmunidad innata (73, 74). El reconocimiento de los ligandos patogénicos por los TLRs inicia un amplio espectro de respuestas inflamatorias e inmunes, que incluyen la fagocitosis y la producción de citoquinas. De este modo, el LPS activa las células inflamatorias, principalmente macrófagos tisulares, que producen rápidamente grandes cantidades de mediadores endógenos como TNF- α e IL-1 amplificando, así, la respuesta inflamatoria. No obstante, se han propuesto otras vías en efectoras para el LPS, como son la activación del complemento, la liberación del factor activador de las plaquetas (*platelet-activating factor*; PAF), la inducción de la

síntesis de metabolitos del ácido araquidónico o la activación de la cascada de la coagulación.

En el TIP, la presencia accidental de LPS en las soluciones enzimáticas con colagenasa empleadas en el aislamiento de los islotes o en los gradientes de densidad ha sido implicada en la producción de mediadores como TNF- α , IL-1 β e IL-6 así como en una mayor actividad apoptótica (75, 76).

3. Principales mediadores endógenos desencadenantes de la RII.

La RII se pone en marcha, se amplifica y se perpetúa mediante la liberación de sustancias químicas endógenas que activan células o desencadenan fenómenos celulares lesivos. Los mediadores endógenos más importantes son las citoquinas, aunque existen otros también de gran relevancia; entre otros, el sistema del complemento, la cascada de la coagulación, el sistema kaliceína-quinina, el PAF, los neuropéptidos/endorfinas, los derivados del ácido araquidónico y las ROS (63).

Las **citoquinas** son glicoproteínas de bajo peso molecular secretadas principalmente por células inmunitarias, fundamentalmente del SER o también linfocitos entre otros; pero igualmente por las células endoteliales o las del parénquima de algunos órganos, incluido el páncreas. La producción de citoquinas suele ser limitada al lapso de tiempo que dura el estímulo; siendo su modo de acción auto, yuxta o paracrino. Se unen a receptores de membrana específicos y activan cascadas de transducción intracelular que alteran la expresión de determinados genes, lo cual finalmente produce una respuesta biológica concreta. Dentro del concepto de citoquinas se agrupan sustancias como interleuquinas (IL), interferones (IF), quimioquinas, factores estimulantes de colonias o factores de crecimiento. Tienen un papel central en el control de la respuesta inmunitaria, tanto innata como

adaptativa; si bien participan igualmente en otros fenómenos, como la diferenciación y el crecimiento celular. Poseen un marcado pleiotropismo ya que, con frecuencia, tienen más de una acción biológica y pueden actuar sobre distintos tipos celulares. Además, cada citoquina puede sintetizarse por más de un tipo de célula y cada célula puede expresar receptores para distintas citoquinas. Así mismo, muchas citoquinas comparten efectos e igualmente pueden generar la liberación de otras citoquinas. Todo ello explica la complejidad de la caracterización del proceso regulatorio. Algunas de las citoquinas particularmente implicadas en la regulación de la RII son TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-10.

- **Factor de necrosis tumoral α** (*tumor necrosis factor α* ; TNF- α). Es considerado como la principal citoquina proinflamatoria. Muy numerosos estímulos desencadenan la producción de TNF; por un lado, la práctica totalidad de citoquinas proinflamatorias y otros factores endógenos relacionados, y por otro, múltiples antígenos procedentes de microorganismos (siendo el LPS el más potente). Algunas de las vías que median las acciones de TNF incluyen el sistema Fas/FasL (proteína Fas y Fas-ligando), el activador del receptor del factor nuclear κ B (*receptor activator of nuclear factor κ B*; RANK), el sistema CD40/CD40L (receptor CD40 y CD40-ligando), el ligando asociado a la activación de la apoptosis similar al TNF (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*; TRAIL), y las proteínas quinasas activadas por mitógenos (*mitogen-activated protein kinases*; MAPK). Se conocen varios receptores transmembrana para TNF (*TNF receptor*; TNFR). Los mejor conocidos, TNFR1 (p55) y 2 (p75), coinciden en su estructura extracelular, si bien la presencia de dominios intracitoplasmáticos diferentes sugiere vías de señalización interna distintas. Tras la unión de TNF a TNFR1, se activa el dominio de muerte celular asociado a TNFR (*TNF receptor-associated death domain protein*; TRADD). Posteriormente se activan y reclutan la proteína de interacción con el receptor

(*receptor interacting protein*; RIP), el dominio de muerte celular asociado a Fas (*Fas-associated death domain*; FADD) y el factor 2 asociado a TNFR (*TNF receptor-associated factor 2*; TRAF2) (77). En el caso de la unión TNF-TNFR2, se activa directamente TRAF2, que se asocia a TRAF1 (*TNF receptor-associated factor 1*). Una vez reclutados los dominios de muerte, la cascada de acontecimientos es dual, con inducción de la apoptosis y/o de la respuesta inflamatoria. Los efectos proapoptóticos de TNF incluyen la interacción de los dominios de muerte con caspasas iniciadoras, principalmente activando la caspasa 8 de la vía extrínseca. En cuanto a los efectos proinflamatorios de TNF, es predominante la activación del factor nuclear κ B (*nuclear factor κ B*; NF- κ B) y de dos vías dependientes de MAPK: p38 y la quinasa del dominio N-terminal de c-Jun (*c-Jun N-terminal kinase*; JNK) (78).

- **Interleuquina 1 (IL-1).** Codificada en el cromosoma 2, presenta tres formas: IL-1 α , intracelular o adherida a la membrana celular y con efectos paracrinos; IL-1 β , secretada a la circulación y que interacciona con receptores de tipo I (*type I IL-1 receptor*; IL-1RI) (en la mayoría de las células del organismo) y de tipo II (*type II IL-1 receptor*; IL-1RII) (en las células del sistema inmune); y el antagonista del receptor de IL-1 (*IL-1 receptor antagonist*; IL-1RA). Aunque con importantes diferencias estructurales, IL-1 β e IL-1 α son consideradas funcionalmente como un mismo mediador. Como ocurre con TNF- α , la variedad de estímulos inductores es enorme, si bien de nuevo los estímulos exógenos procedentes de microorganismos (especialmente LPS) son los más potentes. Como mediadores endógenos relacionados, destacan tanto el TNF- α como la propia IL-1, así como el factor estimulante de colonias granulocítico/monocíticas (*granulocyte macrophage colony-stimulating factor*; GM-CSF). La similitud estructural entre los dominios intracitoplasmáticos de los receptores de IL-1 (*IL-1 receptor*; IL-1R) y los

TLRs permite el uso de la misma cascada de señalización intracelular durante la respuesta inflamatoria (79). Así, IL-1R activa, con la colaboración de la proteína MyD88 (*myeloid differentiation primary response gene 88*), a la proteína quinasa asociada al receptor (*receptor-associated kinase 1*; IRAK1), que es liberada tras fosforilación. De este modo, se activa el factor 6 activado por el TNFR (*TNF receptor-associated factor 6*; TRAF6), desencadenando la transcripción de NF- κ B y activando la cascada de MAPK (80).

- **Interleuquina 6** (*interleukin 6*; **IL 6**). Es una citoquina pluripotencial que actúa en fenómenos de RII fundamentalmente. Sus activadores principales son IL-1, TNF- α , LPS y las ROS. La unión de IL-6 a su receptor específico (IL-6R), y así a su componente de transducción intracelular gp130, desencadena la activación de tirosin quinasas de la familia JAK (*Janus kinases*), receptores proteicos con dominios útiles tanto hacia la vertiente externa como a la interna de la célula, que activan mediante fosforilación a una proteína señalizadora denominada STAT3. Al igual que otras proteínas STAT (*signal transducer and activator of transcription*), STAT3 se dimeriza tras ser activada y se transloca al núcleo, donde se une a regiones del DNA promotoras de genes que transcriben otras citoquinas.
- **Interleuquina 10** (*interleukin 10*; **IL 10**). Clásicamente se la ha considerado, junto con IL-4 e IL-13, como una citoquina inhibidora o antiinflamatoria. Es sintetizada fundamentalmente por las células del SRE y, en menor medida, por otros tipos celulares como los linfocitos Th2. Regula a la baja la producción de TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 y GM-CSF ante situaciones de respuesta inmunitaria innata. Cuando predomina la inmunidad celular, también disminuye la producción de IF- γ , IL-2 e IL-12. A su vez, IF- γ inhibe la producción de IL-10. El papel contrarregulador de IL-10 parece necesario para mantener la producción de mediadores proinflamatorios en niveles óptimos que

conducirían a una respuesta adecuada capaz de contrarrestar la agresión, pero no de desencadenar un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (*systemic inflammatory response syndrome*; SIRS).

Generación de estrés oxidativo.

El “estrés oxidativo”, que representa una de las vías efectoras del daño tisular en la RII, es el desbalance entre la producción de **especies reactivas de oxígeno** (*reactive oxygen species*; **ROS**) y los mecanismos fisiológicos encargados de su neutralización. Las ROS con algún electrón desapareado en un orbital, lo cual las hace altamente reactivas a pesar de su corta vida media, son denominadas genéricamente “radicales libres de oxígeno” (81). Tienden a unirse a otras moléculas para aparear los electrones libres y estabilizarse. Tal asociación puede comprometer tanto la estructura como la función de determinadas macromoléculas implicadas en el correcto funcionamiento de la célula (DNA, lípidos estructurales, proteínas...), y así, provocar la eventual muerte de ésta. Aunque se ha enfatizado el papel de las ROS en relación con múltiples condiciones patológicas incluida la propia DM, la fuente principal de ROS endógenos es el metabolismo celular normal.

En el trasplante, el aumento de las ROS surge fundamentalmente tras la reperfusión. En tal situación es predominante la acción de la enzima xantino-oxidasa, de tal modo que se producen tanto peróxido de hidrógeno (H_2O_2) como radical superóxido ($O_2\bullet^-$). Éstos, en combinación con iones metálicos (cobre, hierro), acaban por transformarse en especies todavía más reactivas, como el radical hidroxilo ($\bullet OH$). Todas estas moléculas determinan profundas alteraciones de la permeabilidad de la membrana celular de las células,

destrucción de la misma y degradación de los ácidos nucleicos (63). A continuación, se describen algunos de los componentes del equilibrio prooxidante/antioxidante.

1. Óxido nítrico (*nitric oxide*; NO) y óxido nítrico sintasa (*nitric oxide synthase*; NOS).

El NO procede de la deaminación de la L-Arginina por parte de la NOS. Como resultado, un átomo de nitrógeno queda libre y es oxidado por el oxígeno. Para que esta reacción se lleve a cabo, son necesarios numerosos cofactores, como NADPH, flavín-nucleótidos, el grupo hemo y la tetrahidrobiopterina. El NO, un compuesto inorgánico, no es estrictamente un radical libre. Se trata de un gas simple sobre el cual actúa el radical $O_2\cdot^-$, generándose peroxinitrito ($OONO^-$). Dicho compuesto es lesivo *per se* y también puede contribuir a la generación de lipoperóxidos.

Se han identificado tres isoformas de NOS: endotelial o constitutiva (eNOS), inducible (iNOS) y neural (nNOS). La eNOS proporciona una secreción basal de NO, y está codificada en los cromosomas 2 (endotelio) y 12 (neuronas, plaquetas). La iNOS predomina en las células del SRE, y está codificada en el cromosoma 17. Esta última se activa fundamentalmente por la liberación endógena de citoquinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1, IF- γ) o por mediadores exógenos (como el LPS), produciéndose grandes cantidades de NO, con efecto citotóxico y citostático sobre las células diana. La interacción del NO con otras moléculas, fundamentalmente proteínas, es la responsable de la mayoría de sus acciones fisiopatológicas, ya que muchas de ellas son enzimas con importantes funciones.

2. Monóxido de carbono (*carbon monoxide*; CO) y hemoxigenasa (*heme oxygenase*; HO).

El CO es también una molécula gaseosa producida por la acción, en este caso de la HO, en el metabolismo normal en pequeñas cantidades. Está constituido por un átomo de carbono y uno de oxígeno unidos mediante un enlace covalente doble, a través de la

degradación del grupo hemo. Este proceso produce cierta cantidad de carboxihemoglobina. El CO actúa como neurotransmisor, además de estar implicado en la modulación de la RII. Es igualmente un segundo mensajero involucrado en múltiples procesos, como la apoptosis o la contracción vascular.

La HO es la principal enzima implicada en el catabolismo del grupo hemo, que dará lugar a la producción de biliverdina, hierro (Fe) libre y CO. Se han identificado tres isoformas de esta enzima: inducible (HO-1), constitutiva (HO-2) y la isoforma catalíticamente inactiva (HO-3). A diferencia de la HO-2, que se produce bajo condiciones homeostáticas, la HO-1 aumenta considerablemente en presencia de hipoxia, hiperoxia, endotoxinas bacterianas, radiaciones ionizantes, citoquinas, ROS, etc. A la HO-1, conocida también como HSP-32 (*heat shock protein-32*), se le atribuyen propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y anti-apoptóticas. En los procesos inflamatorios, la HO-1 previene del daño oxidativo a las células endoteliales y reduce la migración leucocitaria a través de la inhibición de la síntesis y de la liberación de mediadores inflamatorios. Así, la inducción de la enzima disminuye la expresión de la molécula de adhesión intercelular ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule 1*) endotelial y regula la generación de oxidantes intracelulares en células endoteliales, inhibiendo la adhesión leucocitaria generada por ROS, además de inhibir hemoproteínas como la ciclooxigenasa y la iNOS.

3. Enzimas antioxidantes.

Existen diversos sistemas que contrarrestan los efectos de la producción de ROS, bien previniendo su desarrollo o bien interceptando las ROS. En el ser humano predominan los mecanismos que neutralizan los compuestos reactivos una vez formados: super-óxido dismutasa (SOD), catalasa y sistema glutatión reductasa/peroxidasa (GR/GPx). Las alteraciones en la actividad de estos complejos enzimáticos tienen un claro efecto negativo

en el balance de óxido-reducción celular, con una implicación demostrada en múltiples procesos patológicos.

- La **catalasa** (*catalase*; **CAT**) es una enzima de ubicación peroxisomal encargada de neutralizar el H_2O_2 , proveniente sobre todo de la actividad de la SOD presente en los neutrófilos y empleado en la destrucción de agentes lesivos en el contexto de reacciones inflamatorias agudas.
- La **glutación reductasa** (*glutathion reductase*; **GR**) es una flavoenzima NADPH-dependiente que cataliza la reducción del glutati6n oxidado a glutati6n reducido. Este 6ltimo es a su vez utilizado por la **glutati6n peroxidasa** (*glutathion peroxidase*; **GPx**) para la reducci6n de H_2O_2 y lipoper6xidos principalmente.

4. **8-hidroxi6uanina** (*8-hydroxyguanine*; **8-OHG**).

El DNA es una de las m6s relevantes dianas celulares del estr6s oxidativo, ya que lesiones del mismo pueden conducir a alteraciones heredables o estar implicadas en la carcin6genesis, entre otros. Uno de los principales productos de da6o oxidativo del DNA es la 8-hidroxideoxiguanosina (8-OHdG), generada a partir de la oxidaci6n de la 2'-deoxiguanosina (dG). La 8-OHdG se forma como resultado del ataque de $\cdot OH$ sobre el DNA (82), siendo su producci6n independiente de otras posibles fuentes como la muerte celular (83). De esta manera, su base libre, la 8-OHG, es un biomarcador 6til del estr6s oxidativo celular y probablemente el m6s estudiado de la reparaci6n del DNA (81, 83, 84).

En relaci6n con el da6o inducido por la I/R en el trasplante, la xantino-deshidrogenasa es convertida a xantino-oxidasa durante el periodo de isquemia. Esta segunda, aumenta sustancialmente su actividad con la reperfusi6n. Sin embargo, en lugar de transferir

electrones al NAD^+ , los transfiere al oxígeno, generando $\text{O}_2\cdot^-$, con el subsecuente daño oxidativo del DNA (81).

Apoptosis.

La apoptosis o “muerte celular programada” es un fenómeno fisiológico esencial en el mantenimiento de la homeostasis tisular (85). Está implicado tanto en el desarrollo embrionario y fetal, como en la muerte celular inducida por los linfocitos T o la destrucción de células inmunes autorreactivas, entre otros. No obstante, la disregulación de la apoptosis también media otros procesos, como pueden ser la muerte celular tras la I/R o en el contexto de la SIRS. Se acompaña de condensación del material nuclear y del contenido citoplasmático; la membrana plasmática se mantiene intacta, y así los productos intracelulares no son liberados al espacio extracelular. De este modo, a diferencia de la necrosis, en la cual se produce una pérdida de la integridad de las membranas y una liberación del contenido celular, la apoptosis carece del cortejo inflamatorio local de la primera. Sin embargo, puede ser producto de una RII, ya que es una vía final común a la liberación de los principales mediadores proinflamatorios (86).

Muchas de las vías apoptóticas convergen en complejas cascadas de señalización intracelular con activación de unas proteasas, denominadas caspasas, que llevan a la disrupción del DNA y a la muerte celular (87). Se distinguen, en líneas generales, dos vías fundamentales de activación: extrínseca e intrínseca. Por un lado, en la vía extrínseca, la apoptosis se desencadena ante estímulos extracelulares (como citoquinas, NO o factores de crecimiento). La activación de receptores transmembrana de la familia TNF (como el Fas) activa una cascada intracelular con la participación de caspasas. Por otro lado, en la

intrínseca o mitocondrial, se produce una liberación de citocromo C mitocondrial en respuesta a estímulos intracelulares que implican un estrés celular (radiación, hipoxia, calor, etc.), con la activación de una cascada de señalización en la que también intervienen caspasas.

Superfamilia Bcl-2. Con el nombre genérico de Bcl-2 se denomina una superfamilia de proteínas, codificada por genes homónimos, estrechamente relacionados con el control del ciclo celular. Esta superfamilia constituye uno de los reguladores principales de la vía intrínseca de la apoptosis, mediante la formación de unos canales denominados MAC (*mitochondrial apoptosis-induced channel*), a través de los cuales se libera citocromo C de las mitocondrias. Inicialmente se describió Bcl-2 en neoplasias linfoides, de ahí su nombre y el de su proto-oncogen homónimo (*B-cell lymphoma 2*). Sin embargo, actualmente se conocen multitud de neoplasias en las que la expresión de Bcl-2 está alterada.

Esta superfamilia se compone de al menos 15 proteínas identificadas, que pueden dividirse en dos subgrupos diferenciados en cuanto a su efecto sobre la apoptosis, siendo unas inductoras (Bax, Bak, Bok, Bad, Bid, Bik, Bcl-XS...) y otras inhibidoras (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W...). Las “señales de supervivencia celular” previenen la activación de la apoptosis, en parte, inhibiendo a la subfamilia proapoptótica de Bcl-2 a nivel post-traducciona. Por otro lado, estas proteínas forman heterodímeros, lo cual resulta en la pérdida de la capacidad antiapoptótica. Así, tras una señal de daño celular, por un lado, las proteínas proapoptóticas tienden a situarse alrededor de la membrana mitocondrial, que es donde constitutivamente se encuentran las antiapoptóticas. Posteriormente, se produce una heterodimerización, al unirse las variantes pro y antiapoptóticas. Como resultado, se desencadena la cascada de la apoptosis fundamentalmente por la vía mitocondrial, en el caso de que sean mayores las concentraciones de las formas proapoptóticas. Por el contrario, altas

concentraciones de las variantes antiapoptóticas confieren a la célula una resistencia a la muerte celular programada, que puede llevar a la persistencia de la célula incluso en presencia de alteraciones nucleares que en condiciones normales significarían su eliminación (63).

MicroRNAs.

Los **microRNAs (miRNAs)**, inicialmente identificados en *C. elegans*, son un grupo de cadenas únicas de RNA no codificante de pequeña extensión, aproximadamente 21-24 nucleótidos, que han sido identificadas en un amplio número de especies (88-91). Actúan como reguladores post-transcripcionales de genes codificantes de proteínas por medio de su unión complementaria con el extremo 3'UTR del mRNA diana (92), si bien en algunos casos interaccionan con el extremo 5'UTR o con regiones codificantes del mRNA. Para ello, la secuencia “seed” del miRNA, que corresponde a un pequeño segmento de 2-8 nucleótidos, se une específicamente a su diana correspondiente formándose así un complejo miR-mRNA (93). El modo de acción de los miRNA incluye tanto la degradación de los productos de la transcripción como la inhibición de la traducción (94, 95), resultando en un silenciamiento de la expresión génica. Uno u otro destino del mRNA quedaría determinado según la presencia de proteínas de unión al RNA específicas (96). De este modo, mediante el sistema de la “ribointerferencia”, cada tipo celular controla qué genes están activos y en qué grado de activación en cada momento determinado (97).

La biogénesis de los miRNAs implica la coordinación de múltiples complejos reguladores. En primer lugar, el gen específico es transcrito en el núcleo por la RNA polimerasa II a un transcripto miRNA primario (*primary miRNA*; pri-miRNA). Éste es

procesado en el núcleo por Drosha, una enzima de doble cadena de unión a RNA tipo RNasa III, para producir un miRNA precursor (*precursor miRNA*; pre-miRNA), con unos 70 pares de bases dispuestos en forma de horquilla (*stem-loop structure*) (98, 99). El pre-miRNA es exportado al citoplasma por la Exportina-5 (100), donde es escindido por Dicer, otra endonucleasa tipo RNasa III, para formar el dúplex bicatenario de miRNA maduro de 21-24 nucleótidos (101). Para ejercer su acción específica, una de las hebras de miRNA es degradada por la helicasa de RNA ATP-dependiente, dando lugar al miRNA monocatenario, que a su vez es incorporado al complejo silenciador inducido por RNA (*RNA-induced silencing complex*; RISC). La hebra de miRNA se une al extremo 3' del mRNA diana para llevar a cabo el silenciamiento génico post-transcripcional mediante represión translacional, deadenilación y/o una degradación incrementada de mRNA (102).

Mientras que los mRNA deben ser traducidos a proteínas para poder desempeñar funciones biológicas, los miRNAs son biológicamente activos *per se*. Adicionalmente, un solo miRNA tiene como objetivo un grupo concreto de mRNAs funcionalmente relacionados entre sí, y a su vez el silenciamiento de un mRNA puede ser realizado por varios miRNAs. Ello complica la identificación de una función concreta y aislada en cada miRNA de forma específica. En cualquier caso, los miRNAs representan así un reflejo más realista del complejo control de las vías metabólicas (103). En desórdenes multifactoriales, un simple miRNA, debido a su acción selectiva sobre varios mRNA específicos, permite inferir conclusiones más globales y significativas que las obtenidas del estudio de los mRNAs (104, 105). En este sentido, se han desarrollado varias bases de datos y programas informáticos para registrar los miRNAs conocidos y predecir sus dianas potenciales (106). Algunos de éstos son, por ejemplo, “miRBase” (<http://www.mirbase.org>) o “TargetScanHuman” (<http://targetscan.org/>).

El mecanismo de regulación génica ejercido por los miRNAs modula múltiples procesos tanto fisiológicos como patológicos, incluso desde etapas preclínicas, lo cual los convierte en potenciales biomarcadores en distintas circunstancias. De esta manera, los miRNAs son el centro de numerosas investigaciones que han permitido conocer mejor su papel central en la fisiología celular; dirigiendo entre otros el metabolismo, la señalización, la regulación inmune, la progresión en el ciclo celular y la apoptosis de las células (90, 91, 107-109). Dada la enorme capacidad de los miRNAs de influenciar la expresión de gran parte del genoma y el complejo sistema de control en que están inmersos, es comprensible que la disregulación del perfil de miRNAs pueda tener repercusiones significativas en la homeostasis del organismo. De este modo, se ha relacionado la pérdida de este mecanismo de regulación vía miRNA con múltiples grupos de enfermedades de gran relevancia, tales como el cáncer, los procesos neurodegenerativos, o la patología cardiovascular (110, 111). Además, diferentes estudios han puesto en evidencia la implicación de los miRNAs en la respuesta inmune innata y adquirida, indicando la existencia de una fuerte correlación entre la expresión de los miRNAs y las vías de señalización implicadas en la respuesta inflamatoria (112, 113). Los miRNAs modulan a los mediadores inflamatorios y son modulados por los mismos, dando lugar a un círculo vicioso de generación y amplificación del daño celular con una subsecuente pérdida de función. De este modo, juegan un papel crucial en enfermedades inflamatorias (114-116), vasculares (117) y en la DM (118-121).

Como se ha comentado, la regulación por miRNAs interviene en las principales vías de señalización, incluyendo el rechazo a los aloinjertos. En este sentido, el análisis de los niveles de miRNAs específicos, tanto circulantes como tisulares, puede tener importantes implicaciones terapéuticas y pronósticas. Distintos avances técnicos han permitido la determinación de “perfiles de miRNAs” tanto en los donantes como en los receptores, que

podrían constituir biomarcadores del rechazo en el alotrasplante. Así, es cada vez mayor el conocimiento acerca de las vías regulatorias con miRNAs implicadas en las respuestas inmunes y, por tanto, parece factible el desarrollo de terapias basadas en miRNAs (122). La modulación artificial del perfil de miRNAs se puede realizar a través de imitadores de miRNAs (*miRNAs mimics*), pequeñas secuencias sintéticas monocatenarias de RNA que mimetizan los miRNAs endógenos maduros (123), o a través de antagonistas de miRNAs (*miRNAs antagonists*; “antagomirs”), químicamente diseñados para inhibir la actividad miRNA (124). Esta modulación de la expresión génica vía imitadores y antagonistas de miRNAs tiene un tremendo potencial, pendiente de ser desarrollado a nivel clínico para, entre otros, prevenir el rechazo en los alotransplantes.

Glicocálix endotelial.

El **glicocálix endotelial** (*endothelial glycocalyx layer*; EGL) está constituido por una red de glicoproteínas y proteoglicanos unidos a cadenas de glicosaminoglicanos (*glycosaminoglycan*; GAG), anclada a la superficie de las células endoteliales. Participa en el mantenimiento de la integridad vascular, y desempeña una función fundamental en la regulación de la resistencia y la permeabilidad vasculares, y en la migración celular a su través (125, 126). Diferentes agresiones, incluyendo la cirugía mayor, la inflamación sistémica, y el daño por I/R, pueden alterar la integridad del EGL, provocando su ruptura y desprendimiento (127, 128). Esto, a su vez, provoca un aumento de la permeabilidad vascular (129) con pérdida de la capacidad de respuesta vascular, un incremento del reclutamiento leucocitario (126) y de plaquetas, con extravasación de neutrófilos, y mayor inflamación perivascular. En este sentido, el EGL desempeña un papel importante en el

desarrollo de múltiples patologías vasculares, incluidas algunas complicaciones de la DM (130).

El **sindecan-1** (*syndecan-1*; **SYND1**) o CD138 es un proteoglicano transmembrana portador de GAGs de tipo **heparán sulfato** (*heparan sulphate*; HS). Pertenece, por tanto, al denominado grupo de los proteoglicanos portadores de HS (*heparan sulphate proteoglycans*; HSPG). Ambos forman parte integral del EGL, siendo el HS el GAG más común en el mismo (131). A nivel general, la familia de proteoglicanos “*Syndecan*” intervienen en fenómenos de señalización celular, unión celular y organización del citoesqueleto (132). En concreto, SYND1 participa en los procesos de proliferación y migración celular, así como en la interacción de la célula con la matriz extracelular mediante receptores específicos. Parece que tiene un papel fundamental en la modulación de las interacciones leucocito-endotelio y en la extravasación de los primeros (133), así como en la actividad de las citoquinas y los distintos factores de crecimiento. Estas interacciones otorgan al EGL un papel clave en la regulación de la respuesta inflamatoria (134).

II. Hipótesis y Objetivos.

Hipótesis.

Existen diferencias en la expresión de los marcadores biomoleculares del estado tisular en los páncreas humanos obtenidos de la UNHBD, en comparación con los obtenidos de la BDD, considerada de referencia. La investigación básica acerca de tales diferencias avalaría la viabilidad de los páncreas de la UNHBD, y en consecuencia su utilización a nivel clínico, con repercusiones significativas para el trasplante de los mismos.

Objetivos.

Objetivo general.

Evaluar a nivel biomolecular la viabilidad de los páncreas humanos obtenidos de UNHBD en comparación con los obtenidos de BDD.

Objetivos específicos.

- Evaluar la expresión diferencial de mediadores de la inflamación, de marcadores de estrés oxidativo y de marcadores de apoptosis en las muestras de páncreas obtenidos de UNHBD y de BDD.
- Evaluar las diferencias en los perfiles de microRNAs de las muestras de páncreas obtenidos de UNHBD y de BDD.
- Evaluar las diferencias en la degradación del glicocálix endotelial de las muestras de páncreas obtenidos de UNHBD y de BDD.

III. Material y Métodos.

Diseño.

Se incluyeron en el estudio pacientes con parada cardiaca no controlada (*uncontrolled non-heart-beating donors*; UNHBD) o en muerte encefálica (*brain-dead donors*; BDD) del Hospital Clínico San Carlos (HCSC) (Madrid, España). El estudio fue aprobado por la comisión de ética y la comisión de investigación del HCSC. Número de referencia IRB (*Institutional Review Board*): 15/480-E.

El análisis bioquímico del estudio se desarrolló en 2 fases:

- Fase 1: Determinación de la expresión de mediadores inflamatorios, marcadores de estrés oxidativo y marcadores de apoptosis en un primer grupo de pacientes (grupo 1).
- Fase 2: Determinación de los perfiles de microRNAs, y de los niveles de marcadores de daño del glicocáliz y de 8-hidroxiguanina en un segundo grupo de pacientes (grupo 2).

Control de sesgos.

Si bien fue imposible cegar el grupo al que pertenecía cada paciente, los responsables del análisis de las muestras fueron ciegos al grupo de pertenencia de cada muestra.

Variables recogidas.

- Sexo, hombre/mujer;
- Edad, en años naturales;
- Peso, en kilogramos;
- Talla, en centímetros;

- Índice de masa corporal (IMC), calculado mediante la siguiente fórmula: $IMC = \text{peso (Kg)} / \text{talla (m)}^2$
- Duración de la ventilación mecánica (VM), en días;
- Necesidad de soporte vasoactivo, sí/no;
- Muerte por traumatismo, sí/no;
- Desarrollo de infección activa, sí/no;
- Sodio en plasma, en mg/dL;
- Presencia de hipotensión, definida como presión arterial sistólica (PAS) <50 mmHg;
- Tiempo de isquemia caliente, desde la parada cardiorrespiratoria hasta el inicio de las maniobras de preservación, en minutos;
- Tiempo de isquemia fría, desde el inicio de las maniobras de preservación hasta la obtención de las muestras de los órganos, en minutos.

Las maniobras de preservación de los UNHBDS incluyeron la realización de un bypass arteriovenoso con oxigenación de membrana e hipotermia profunda (límite 240 min). La obtención de los tejidos no se realizó hasta tener el consentimiento familiar y la autorización judicial.

Métodos.

Reclutamiento de donantes.

El reclutamiento de los pacientes en el estudio fue consecutivo. Se reclutaron un total de 56 pacientes, 48 UNHBDs y 18 BDDs. La obtención de las muestras de los BDDs se restringió solo a aquellos casos sin un receptor adecuado en base a los protocolos de la Organización Nacional de Trasplantes (ONT). La asistencia a los UNHBDs se realizó siguiendo el programa de donación específico del HCSC denominado “código 9”, descrito previamente (31). Las características clínicas de los donantes figuran en las tablas 2 y 3. La tabla 2 hace referencia a los pacientes del grupo 1 (n=40), en los que se determinaron mediadores inflamatorios, oxidativos y apoptóticos. La tabla 3 hace referencia a los pacientes del grupo 2 (n=26), en los que se determinaron microRNAs, marcadores de daño del glicocáliz y 8-hidroxiguanina.

Obtención de las muestras de tejido.

De cada paciente se obtuvieron muestras de tejido pancreático. Las biopsias se depositaron en criotubos y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido. Tras su congelación, se procedió al transporte de las muestras hasta el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid (UCM). En esta última localización, las muestras fueron almacenadas a -80°C hasta el momento de las determinaciones.

Tabla 2. Características de los donantes del grupo 1.

Parámetros clínicos	UNHBD (n=30)	BDD (n=10)
Sexo, H/M	22/8	4/6
Edad, años (media ± DE)	45,16 ± 5,44	63 ± 11,09
IMC, Kg/m ² (media ± DE)	26,05 ± 5,3	32,41 ± 3,72
Ventilación mecánica, días (media ± DE)	N/A	2,2 ± 1,5
Soporte vasoactivo, sí/no	N/A	8/2
Muerte por traumatismo, sí/no	N/A	3/7
Infección activa, sí/no	N/A	1/9
Sodio en plasma, mg/dL (media ± DE)	137 ± 5,6	144 ± 2,3
Hipotensión (PAS <50 mmHg)	N/A	0
Tiempo de isquemia caliente, min (media ± DE)	108 ± 27,9	0
Tiempo de isquemia fría, min (media ± DE)	177,59 ± 51,73	329,34 ± 86,21

BDD, donantes en muerte encefálica (*brain-dead donors*); DE, desviación estándar; IMC, índice de masa corporal; N/A, no apropiado; PAS, presión arterial sistólica; UNHBD, donantes en parada cardiaca no controlada (*uncontrolled non-heart-beating donors*).

Tabla 3. Características de los donantes del grupo 2.

Parámetros clínicos	UNHBD (n=18)	BDD (n=8)
Sexo, H/M	14/4	6/2
Edad, años (media ± DE)	41,2 ± 6,7	56,7 ± 5,46
IMC, Kg/m ² (media ± DE)	26,7 ± 2,12	29,3 ± 4,73
Ventilación mecánica, días (media ± DE)	N/A	1,85 ± 0,78
Soporte vasoactivo, sí/no	N/A	7/1
Muerte por traumatismo, sí/no	N/A	2/6
Infección activa, sí/no	N/A	0
Sodio en plasma, mg/dL (media ± DE)	135,38 ± 3,44	141,22 ± 4,29
Hipotensión (PAS <50 mmHg)	N/A	0
Tiempo de isquemia caliente, min (media ± DE)	110,5 ± 23,62	0
Tiempo de isquemia fría, min (media ± DE)	144,32 ± 49,78	284,83 ± 75,16

BDD, donantes en muerte encefálica (*brain-dead donors*); DE, desviación estándar; IMC, índice de masa corporal; N/A, no apropiado; PAS, presión arterial sistólica; UNHBD, donantes en parada cardiaca no controlada (*uncontrolled non-heart-beating donors*).

Análisis bioquímico.

Expresión de RNA mensajero.

Para determinar la expresión de RNA mensajero (mRNA) se empleó la reacción en cadena de la polimerasa tras transcriptasa inversa, cuantitativa o en tiempo real (*quantitative real time - polymerase chain reaction*; qRT-PCR).

El aislamiento de RNA se realizó mediante el kit comercial TRITM (Molecular Research Center, Cincinnati, OH), basado en el método de Chomczynski y Sacchi (135). Tras homogeneizar aproximadamente 50 mg de tejido en 500 μ L de buffer TRITM (Molecular Research Center, Cincinnati, OH), se procedió a la incubación de la mezcla durante 5 min a temperatura ambiente, con posterior centrifugación a 10.000 g durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante resultante se transfirió a otro tubo, con adición de 100 μ L de cloroformo y, tras una breve agitación, se procedió a la incubación durante 6 minutos a temperatura ambiente, con una nueva centrifugación a 10.000 g durante 15 minutos a 4 °C. Se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo, y se añadieron 250 μ L de isopropanol. Tras una incubación de 7 minutos a temperatura ambiente, las muestras se centrifugaron a 10.000 g durante 10 minutos a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y se añadieron 500 μ L de etanol al 75%. Finalmente, las muestras se centrifugaron a 10.000 g durante 5 minutos a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 30 μ L de H₂O libre de RNAsas.

Se midió la concentración de RNA presente en cada muestra mediante espectrofotometría, empleando el equipo Biodrop μ L (Isogen Life Science, De Meern, Holanda). El mismo equipo se empleó para determinar la pureza del RNA, a través del

análisis del ratio A 260nm / A 280 nm (ratio ≥ 1.8), que posteriormente se confirmó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Se utilizaron 2 μg de RNA, por cada muestra, para la síntesis de DNA cíclico (cDNA) mediante transcripción inversa. El proceso se llevó al cabo utilizando un kit comercial (Reverse Transcription System, Promega, Madison, WI, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante, y una mezcla de random primers pd(N)6. El cDNA obtenido se conservó a -80 °C hasta su utilización.

Para la qRT-PCR se utilizaron 2 μL de cDNA, que se mezclaron con los primers específicos a una concentración de 300 nmol/L. Las secuencias (5'-3') de los primers específicos se muestran en la tabla 4. Como fluoroforo, se utilizó el agente inespecífico SYBR Green (SYBR Green PCR Master Mix, Applied Biosystems, Warrington, UK). La reacción se llevó a cabo en un termociclador 7500 Fast de Applied Biosystems (Applied Biosystems, Warrington, UK), siguiendo el siguiente protocolo de amplificación: 2 minutos a 50 °C, 10 minutos a 95 °C, seguido de 40 ciclos en 15 segundos a 95 °C, 1 minuto a 60 °C, 15 segundos a 95 °C, 30 segundos a 60 °C, y 15 segundos a 95 °C. Se utilizó el gen endógeno 18S como control interno para la normalización de los resultados. Los cambios en la expresión del mRNA se analizaron siguiendo el método $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ (136).

Tabla 4. Primers específicos (secuencias 5'-3').

IL-1 β	Forward-AACAGGCTGCTCTGGGATTCTCTT, Reverse-ATTTCACTGGCGAGCTCAGGTACT
TNF- α	Forward-AGCCCATGTTGTAGCAAACC, Reverse-TCTCAGCTCCACGCCATT
IL-6	Forward-AAATTCGGTACATCCTCGACGGCA, Reverse-AGTGCCTCTTTGCTGCTTTCACAC
IL-10	Forward-AAGCTGAGAACCAAGACCCAGACA, Reverse-AAAGGCATTCTTCACCTGCTCCAC
eNOS	Forward-TTTAAAGAAGTGGCCAACGCCGTG, Reverse-AGCCATACAGGATTGTGCGCTTCA
iNOS	Forward-GCTCAAATCTCGGCAGAATC, Reverse-GCCATCCTCACAGGAGAGTT
HO1	Forward-AACTTTCAGAAGGGCCAGGT, Reverse-CCTCCAGGGCCACATAGAT
HO2	Forward-GGACTTCTTGAAAGGCAACATTA, Reverse-TGAAGTAAAGTGCCGTGGTG
Bax	Forward-CAAGACCAGGGTGGTTGG, Reverse-CACTCCC GCCACAAAGAT
Bcl-2	Forward-TACCTGAACCGGCACCTG, Reverse-GCCGTACAGTTCCACAAAGG

Expresión de microRNAs.

Se determinó la expresión de los microRNAs miR 16, miR 21, miR 103, miR 107, miR 126, miR 142-5p, miR 145, miR 146, miR 152, miR 155, miR 182, miR 92, miR 223 y Let-7 mediante qRT-PCR.

El aislamiento de los microRNAs se realizó mediante kit comercial mirVanaTM para miRNA (Ambion Life Technologies, Texas, USA), siguiendo el protocolo de enriquecimiento para RNAs de pequeño tamaño de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Tras homogeneizar aproximadamente 50 mg de tejido en 500 μ L de buffer de

lisis, se añadieron 50 μL de miRNA Homogenate Additive y se procedió a la incubación de la mezcla durante 10 min a temperatura ambiente. Se añadieron 500 μL de ácido-fenol-cloroformo y, tras agitación en vortex durante 60 segundos, se procedió a centrifugar las muestras a 10.000 g durante 5 minutos a 4 °C. El sobrenadante resultante se transfirió a otro tubo y se añadió etanol al 100% en proporción 1:3 con respecto al volumen de sobrenadante recogido anteriormente. Tras mezclar las muestras invirtiendo varias veces el tubo, se transfirieron éstas a otro tubo en el que previamente se había colocado un filtro. Las muestras se centrifugaron a 10.000g durante 15 segundos. Tras eliminación del precipitado y posterior adición de 700 μL de miRNA Wash Solution 1 al filtro, se centrifugó a 10.000g durante 5 segundos. Se eliminó nuevamente el eluido y se añadieron 500 μL de Wash Solution 2/3, con nueva centrifugación a 10.000g durante 5 segundos. Este lavado se repitió dos veces. Finalmente, el filtro se transfirió a un tubo limpio, y tras añadir 100 μL de H_2O libre de RNAsas, se centrifugó a 10.000 g durante 20 segundos. Las muestras se conservaron a -80 °C hasta las posteriores determinaciones.

Se midió la concentración de ácidos nucleicos extraídos mediante espectrofotometría, empleando el equipo Biodrop μL (Isogen Life Science, De Meern, Holanda). El mismo equipo se empleó para determinar la pureza del RNA, a través del análisis del ratio A 260nm / A 280 nm (ratio ≥ 1.8), que posteriormente se confirmó mediante electroforesis en gel de acrilamida al 15% siguiendo las recomendaciones del kit mirVanaTM para miRNA.

Se realizó la transcripción inversa de 350-1000 ng de microRNA utilizando el kit de transcripción inversa de microRNA Taqman® (Ambion Life Technologies, Texas, USA), según el protocolo para ensayos individuales (Custom Reverse Transcription Pools).

Para la qRT-PCR se utilizaron 2 μ L de cDNA, que se mezclaron con 1 μ L del correspondiente test MicroRNA 20X. Se añadió Taqman® Universal Master Mix II (Applied Biosystems, Warrington, UK) y se llevó a cabo la reacción en un termociclador 7500 Fast de Applied Biosystems (Applied Biosystems, Warrington, UK), siguiendo el siguiente protocolo de amplificación: 2 minutos a 50 °C, 10 minutos a 95 °C, seguido de 40 ciclos en 15 segundos a 95 °C, 1 minuto a 60 °C, 15 segundos a 95 °C, 30 segundos a 60 °C, y 15 segundos a 95 °C. Se realizó la amplificación del miR 92a como control interno para la normalización de los resultados. Los cambios en la expresión del microRNA se analizaron siguiendo el método 2- $\Delta\Delta$ CT (136).

Expresión de proteínas.

La expresión de dos citoquinas (IL-1 β , TNF- α), de las isoformas endotelial e inducible de la óxido nítrico sintetasa (eNOS, iNOS), de dos isoformas de la hemoxigenasa (HO-1, HO-2), y de dos proteoglicanos componentes del glicocálix (sindecan-1, heparán sulfato), se determinó mediante Western Blotting utilizando anticuerpos específicos.

Las muestras (50-60 mg) se homogenizaron en tampón de lisis [(100 mmol/L NaCl, 10 mmol/L Tris-Cl (trishidroximetilaminometano) (pH 7,6), 1 mmol/L EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) (pH 8), 1 μ g/mL aprotinina, 100 μ g/mL PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo)]. Tras sonicar las muestras y centrifugarlas a 10.000g durante 10 minutos a 4 °C, se recogió el sobrenadante y se transfirió a otro tubo. Todas las muestras se diluyeron (1:1) con tampón 2X (100 mmol/L Tris-HCl (pH 6,8), 4% SDS (dodecilsulfato sódico), 20% glicerol, 0,1% azul de bromofenol, 200 mmol/L ditiotreitól) y se hirvieron 10 minutos a 100 °C. Se determinó la cantidad de proteínas mediante un kit colorimétrico

específico basado en el método de Lowry (DCTM Protein Assay, Bio-Rad, Mississauga, Ontario).

Cantidades equivalentes de proteína (30 µg) de cada muestra se sometieron a electroforesis en gel de SDS poliacrilamida al 10%. Una vez separadas, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad, Mississauga, Ontario), a la que quedan unidas irreversiblemente y donde son más accesibles a los anticuerpos específicos. A continuación, las membranas se incubaron 90 minutos a 37 °C en una solución de bloqueo [20 mmol/L Tris (pH 7,5), 150 mmol/L NaCl, 0,01% Tween y 5% leche desnatada] para prevenir posibles uniones inespecíficas. Después, se incubaron 60 minutos a temperatura ambiente en presencia de anticuerpos primarios específicos, para: IL-1β y TNF-α (Peprotech, Rock Hill, USA), NOS y HO (Chemicon, UK), SYND1 (Proteintech, UK) y HS (Abcam, USA). Tras varios lavados posteriores para eliminar la presencia de los anticuerpos unidos de forma inespecífica o no unidos, las membranas se incubaron de nuevo durante 60 minutos a temperatura ambiente en presencia de un anticuerpo secundario que reconoce inmunoglobulinas de conejo, acoplado covalentemente a una peroxidasa (*horseradish peroxidase-conjugated polyclonal anti-rabbit IgG secondary antibody*, Transduction Lab, Lexington KY). Tras un nuevo lavado de las membranas, la expresión proteica se visualizó mediante quimioluminiscencia (ECL Plus system, Amersham Life Sciences, Buckinghamshire, UK) en películas fotográficas (Amersham Life Sciences, Buckinghamshire, UK). Las películas fueron posteriormente escaneadas mediante densitometría (GS 800; Bio-Rad, Hercules, CA). Se utilizaron marcadores pre-teñidos (All Blue Prestained Protein Standards, Bio-Rad, Hercules, CA) en cada medida para determinar el peso molecular de cada proteína analizada. La reproductibilidad entre ensayos se evaluó

mediante 4 experimentos independientes. Se calculó que el coeficiente de variación (CV) intra-ensayo fuera <5% e inter-ensayo <6%.

Niveles de enzimas antioxidantes y de 8-hidroxiguanina.

Los niveles de las enzimas antioxidantes catalasa (CAT), glutatión reductasa (GR) y glutatión peroxidasa (GPx) se determinaron mediante kits comerciales (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI). El Catalase Assay Kit utiliza la función de peroxidación de la CAT para su determinación. El método se basa en la reacción de esta enzima con metanol en presencia de H₂O₂. El formaldeído producido se puede determinar espectrofotométricamente con 4-amino-3-hidrazino-5-mercapto-1,2,4-triazol (Purpald) como cromógeno. El Glutathione Reductase Assay Kit determina la actividad de la enzima GR midiendo el ratio de oxidación de NADPH. La oxidación de NADPH a NADP⁺ se acompaña de una disminución de la absorbancia a 340 nm. Debido a que la GR está presente en concentraciones limitadas, el ratio de disminución de absorbancia a 340nm es directamente proporcional a la actividad de la enzima GR en la muestra. El Glutathione Peroxidase Assay Kit determina la actividad de la enzima GPx de manera indirecta a través de una reacción acoplada a la enzima GR. El glutatión oxidado (GSSG), producido mediante reducción de un hidroperóxido inorgánico por la enzima GPx, es reciclado a su estado reducido por la enzima GR y NADPH. La oxidación de NADPH a NADP⁺ se mide, como en el caso anterior, mediante espectrofotometría a 340 nm.

El daño oxidativo del RNA se determinó mediante un kit ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) que se basa en un ensayo competitivo para la determinación cuantitativa de 8-hidroxiguanina (*8-hydroxyguanin*; 8-OHG) (Cell Biolabs, Inc., CA, USA).

El fundamento de este método se basa en la unión específica de la proteína contenida en la muestra pipeteada a anticuerpos monoclonales específicos inmovilizados sobre la superficie de placas de titulación. Para ello, las muestras, así como el estándar de 8-OHG, se incuban en una placa en presencia de un conjugado 8-OHG/BSA durante 2 horas a 37 °C. Tras ello, se lavan con tampón fosfato salino al 0,05% y se agrega el anticuerpo monoclonal para 8-OHG conjugado con biotina y se incuban otras 2 horas a 37 °C. Tras un nuevo lavado para eliminar la presencia de anticuerpos no unidos de forma específica, se incuban en presencia de un anticuerpo secundario conjugado con un complejo estreptavidina-HRP (*horseradish peroxidase*). Tras otro lavado para eliminar cualquier reactivo de peroxidasa conjugada con avidina no unido, se añade una solución con sustrato. Tras 10 minutos, se administra una solución de parada de la reacción colorimétrica, y se cuantifican los niveles de 8-OHG mediante espectrofotometría a 450 nm. La precisión intra-ensayo fue CV% <8% y la inter-ensayo CV% <10%.

Análisis estadístico.

Se realizaron comparaciones entre ambos tipos de donantes, analizándose cada parámetro por separado. Para identificar diferencias entre grupos se empleó un test no paramétrico para muestras independientes (test U de Mann-Whitney). El análisis estadístico se realizó con el programa informático SPSS 22.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) para Microsoft Windows. Se consideró como significativo un intervalo de confianza del 95%. Los resultados se expresan como media \pm error estándar de la media (EEM).

IV. Resultados.

Expresión de mediadores inflamatorios.

Interleuquina 1 β (*interleukin 1 β* ; **IL-1 β**). Se observó una disminución significativa tanto en la expresión de mRNA ($p < 0,01$) (Figura 1A) como en la expresión de proteínas ($p < 0,05$) (Figura 1B) de IL-1 β en los UNHBDS, en comparación con los BDDs.

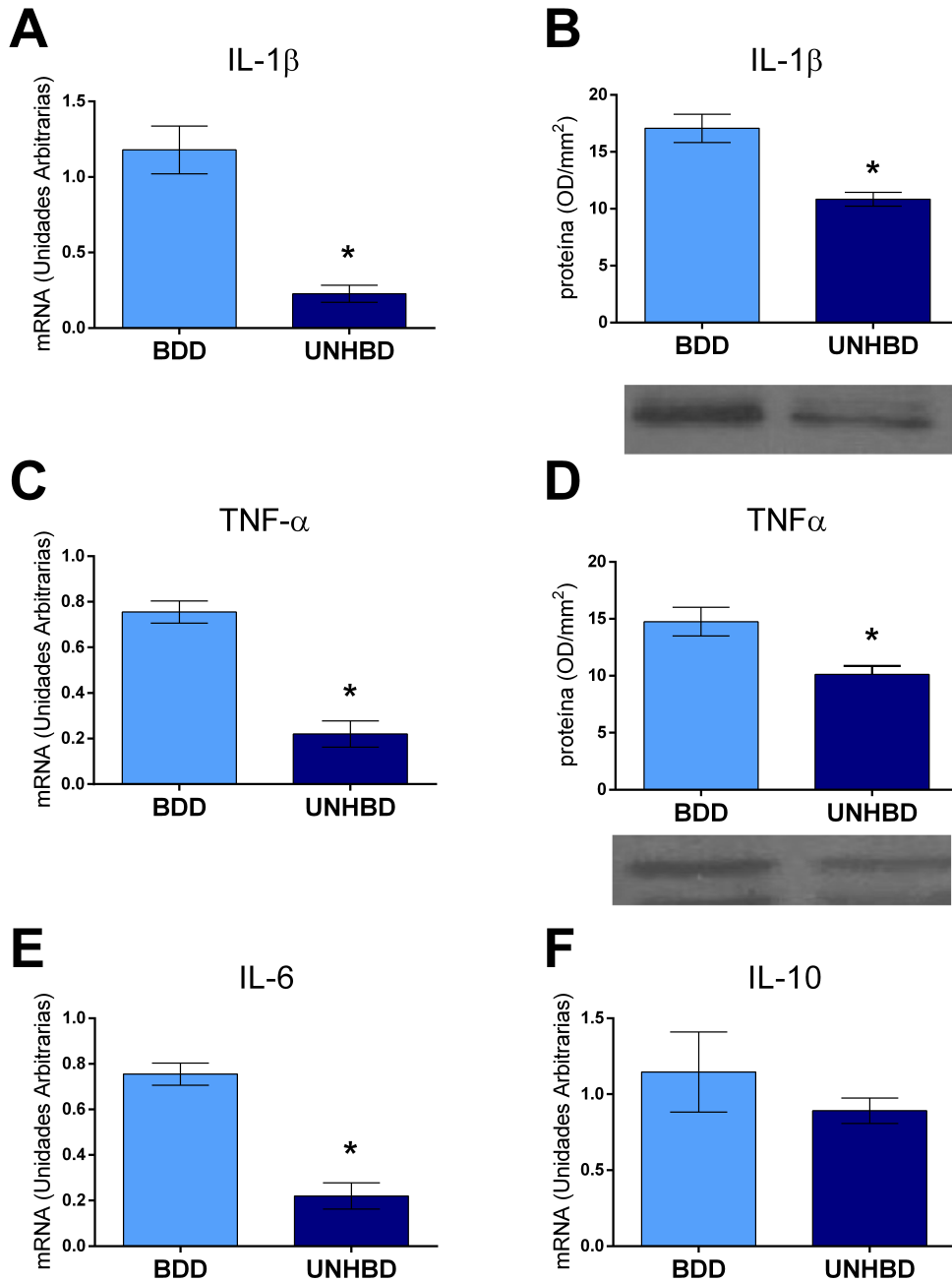
Factor de necrosis tumoral α (*tumor necrosis factor α* ; **TNF- α**). Se obtuvieron resultados parecidos, con niveles significativamente menores de mRNA ($p < 0,001$) (Figura 1C) y de proteína ($p < 0,01$) (Figura 1D) de TNF- α en los UNHBDS, en comparación con los BDDs.

Interleuquina 6 (*interleukin 6*; **IL-6**). Igualmente, los niveles de mRNA ($p < 0,0001$) de IL-6 fueron significativamente menores en los UNHBDS (Figura 1E).

Interleuquina 10 (*interleukin 10*; **IL-10**). Se observaron expresiones similares de mRNA de IL-10 tanto de UNHBDS como de BDDs (Figura 1F).

Figura 1. Expresión de mRNA y proteínas de mediadores inflamatorios.

IL-1 β (A y B), TNF- α (C y D), IL-6 (E) e IL-10 (F) de los UNHBDs y los BDDs, determinados mediante qRT-PCR o WB según estuviese indicado. * $p < 0.05$ vs. BDD.



Expresión de marcadores de estrés oxidativo.

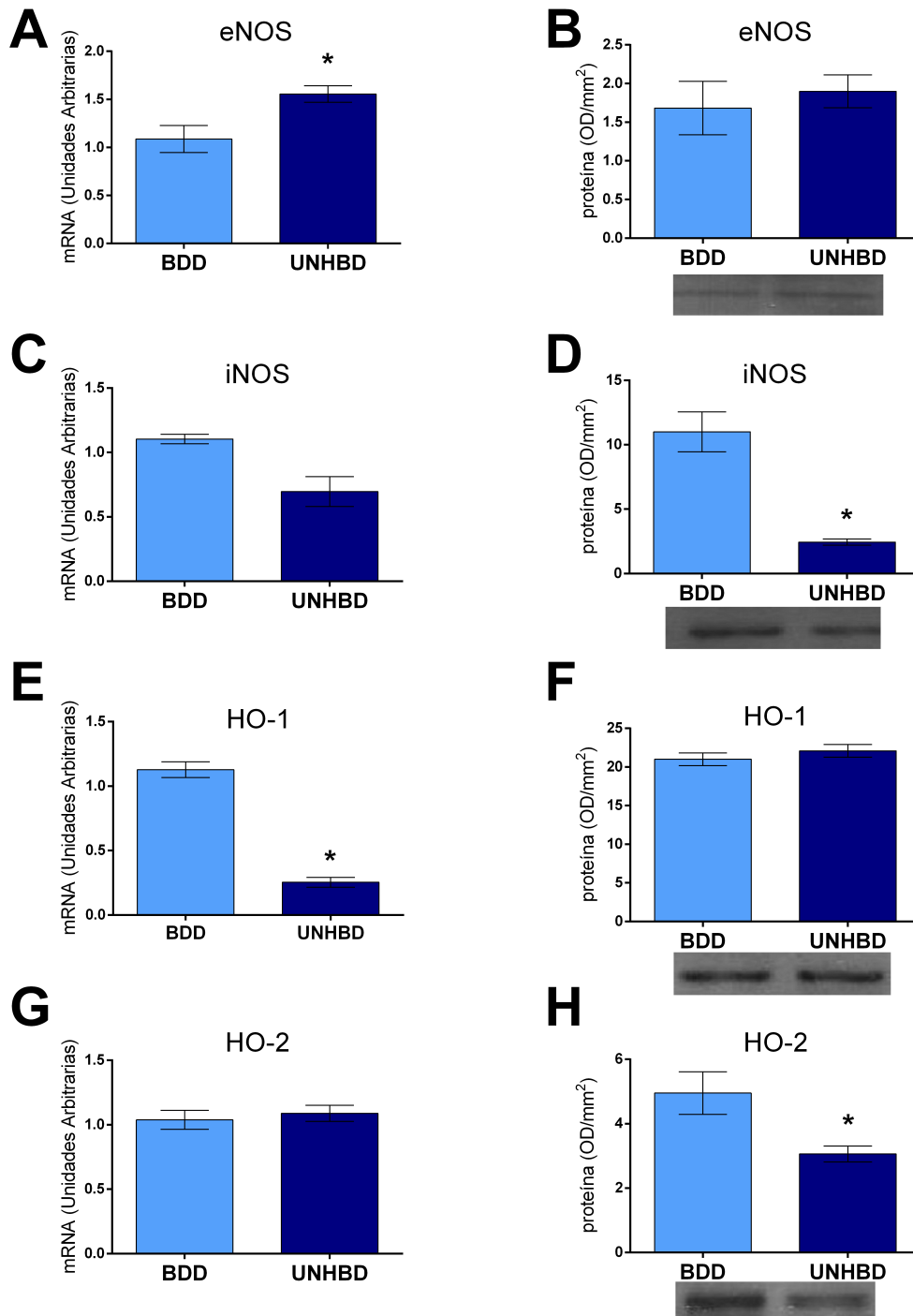
Expresión de enzimas de estrés oxidativo.

Óxido nítrico sintasa (*nitric oxide synthase*; **NOS**). La expresión de mRNA de la **isoforma endotelial** de la NOS (**eNOS**) fue significativamente mayor en los UNHBDs, en comparación con los BDDs ($p < 0,01$) (Figura 2A). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la expresión de proteína de eNOS (Figura 2B). Se obtuvieron resultados opuestos en las determinaciones de la **isoforma inducible** de la NOS (**iNOS**). Así, se observó un descenso muy significativo de la expresión de proteína de iNOS en los UNHBDs ($p < 0.0001$) (Figura 2D), mientras que no hubo diferencias significativas en la expresión de mRNA de esta isoforma en ambos grupos (Figura 2C).

Hemoxigenasa (*heme oxygenase*; **HO**). Se observó una disminución significativa en la expresión de mRNA de la **isoforma 1** de la HO (**HO-1**) en los UNHBDs, en comparación con los BDDs ($p < 0,01$) (Figura 2E). Sin embargo, los niveles proteicos de esta enzima fueron similares en ambos grupos (Figura 2F). De manera análoga a lo observado con las isoformas de NOS, también se obtuvieron resultados opuestos en las determinaciones de la **isoforma 2** de la HO (**HO-2**), en comparación con los obtenidos con HO-1. Así, se observó una expresión de proteína significativamente menor de HO-2 en los UNHBDs ($p < 0,01$) (Figura 2H), mientras que la expresión de mRNA fue comparable en ambos tipos de donantes (Figura 2G).

Figura 2. Expresión de mRNA y proteínas de enzimas de estrés oxidativo.

eNOS (A y B), iNOS (C y D), HO-1 (E y F) y HO-2 (G y H) de los UNHBDS y los BDDs, determinados mediante qRT-PCR o WB según indicado. * $p < 0.05$ vs. BDD.

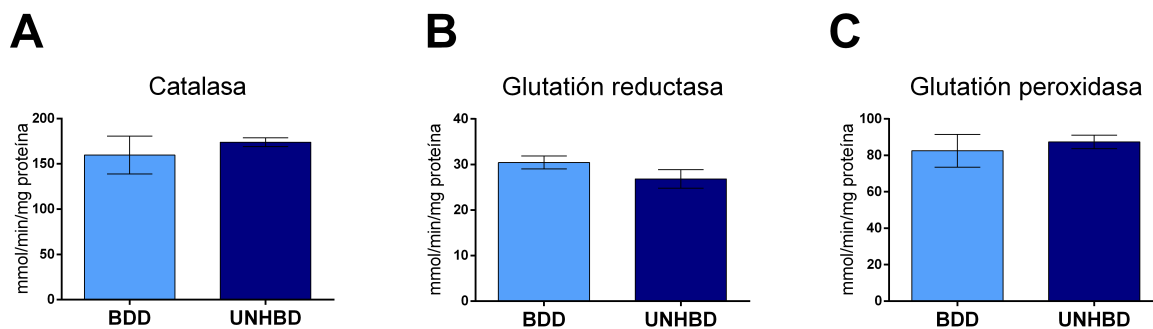


Actividad de enzimas antioxidantes.

Catalasa (*catalase*; **CAT**), **glutación reductasa** (*glutathione reductase*; **GR**) y **glutación peroxidasa** (*glutathione peroxidase*; **GPx**). No se observaron diferencias significativas en los niveles de estas enzimas antioxidantes en los UNHBD, en comparación con los BDD (Figura 3).

Figura 3. Actividad enzimática antioxidante.

Actividad de CAT (A), GR (B) y GPx (C) de los UNHBDs y los BDDs, determinada mediante kits específicos. * $p < 0.05$ vs. BDD.

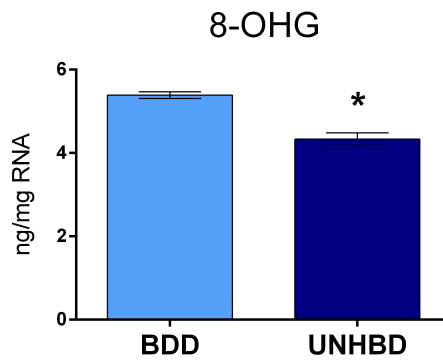


Niveles de otros marcadores de estrés oxidativo.

8-hidroxi guanina (*8-hydroxyguanine*; **8-OHG**). Se observaron niveles significativamente menores de 8-OHG en el páncreas de los UNHBDS, en comparación con los BDDs ($p=0,0002$) (Figura 4).

Figura 4. Niveles de 8-hidroxi guanina.

8-OHG de los UNHBDS y los BDDs, determinada mediante ELISA. * $p<0.05$ vs. BDD.

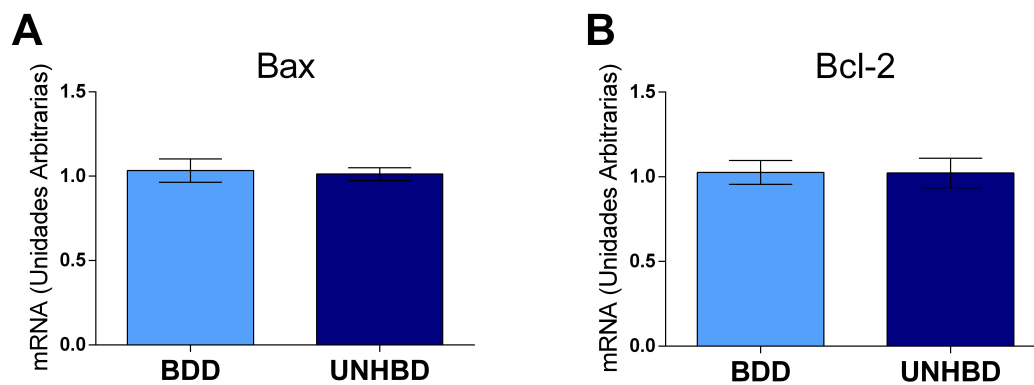


Expresión de marcadores de apoptosis.

Bax y Bcl-2. No se observaron diferencias significativas en la expresión de mRNA ni del marcador proapoptótico Bax ni del marcador antiapoptótico Bcl-2 en ambos tipos de donantes (Figura 5).

Figura 5. Expresión de mRNA de marcadores de apoptosis.

Bax (A) y Bcl-2 (B) de los UNHBDS y los BDDs, determinados mediante qRT-PCR.
* $p < 0.05$ vs. BDD.



Perfil de microRNAs.

El perfil de microRNAs obtenido fue diferente en el páncreas de los UNHBDS frente al obtenido en el páncreas de los BDDs. Concretamente, se observó un descenso significativo de algunos (miR 103, miR 126 y miR 152) ($p=0,027$, $p=0,041$ y $p=0,049$, respectivamente) en los UNHBDS (Figura 6). Mientras que otros (Let-7, miR 16, miR 145, miR 182 y miR 192) ($p=0,034$, $p=0,018$, $p=0,002$, $p=0,0002$, y $p=0,028$, respectivamente) presentaron un incremento significativo en los UNHBDS, en comparación con los BDDs (Figura 7). Por último, algunos microRNAs (miR 21, miR 107, miR 142-5p, miR 146, miR 155 y miR 223) no mostraron diferencias significativas entre los dos grupos de donantes (Figura 8).

Figura 6. Expresión de microRNAs.

Expresión de miRNAs, determinada mediante qRT-PCR. Los miRNAs disminuidos en los UNHBDS en comparación con los BDDs fueron: miR 103 (A), miR 126 (B) y miR 152 (C). * $p<0.05$ vs. BDD.

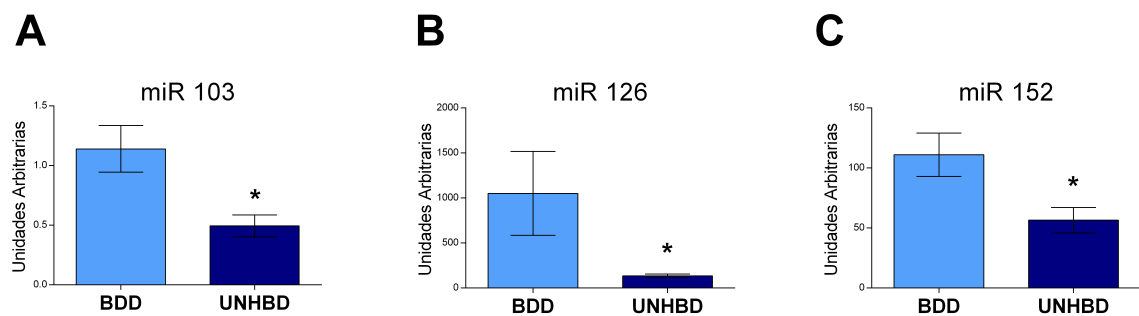


Figura 7. Expresión de microRNAs.

Expresión de miRNAs, determinada mediante qRT-PCR. Los miRNAs aumentados en los UHBDs en comparación con los BDDs fueron: Let-7 (A), miR 16 (B), miR 145 (C), miR 182 (D) y miR 192 (E). * $p < 0.05$ vs. BDD.

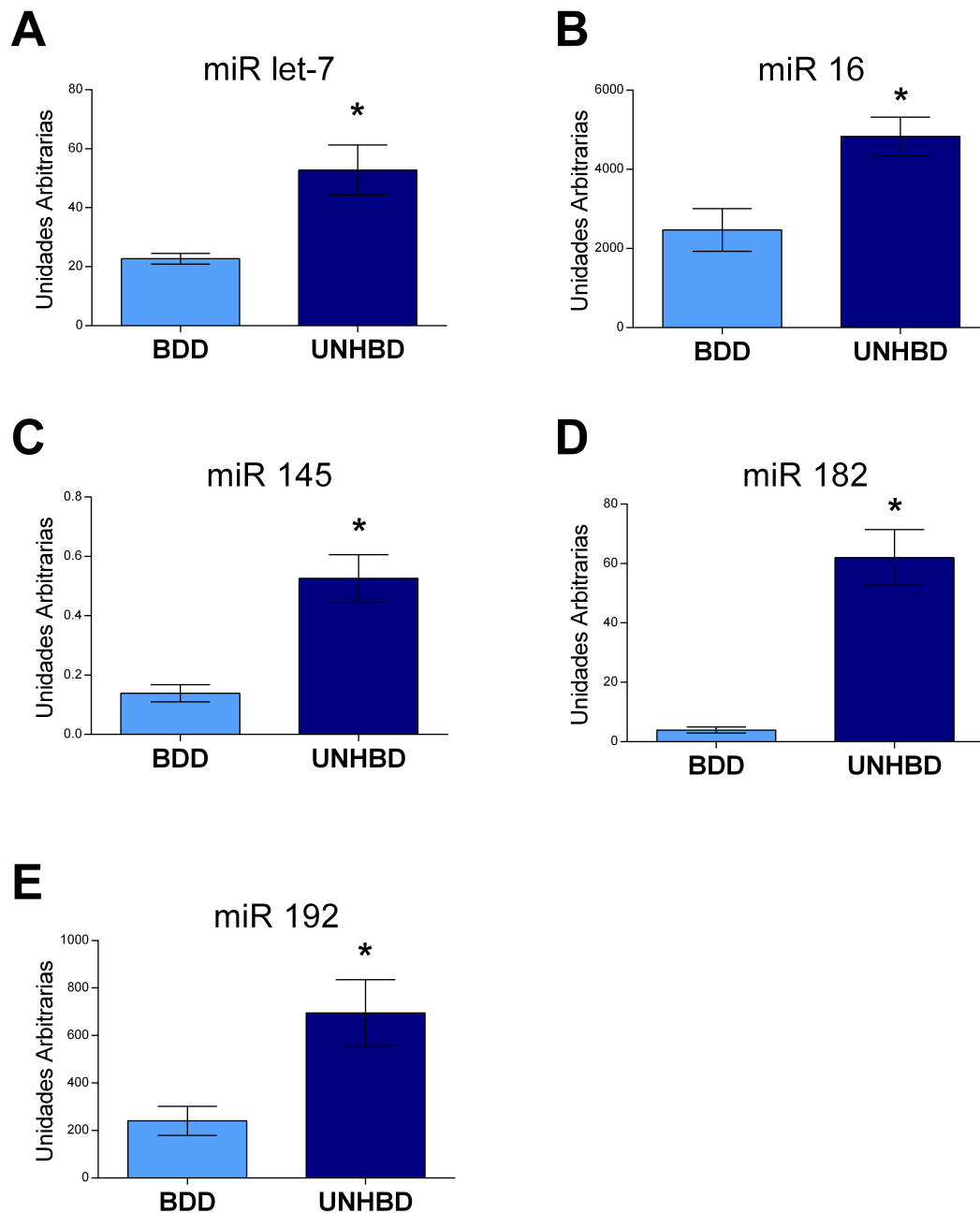
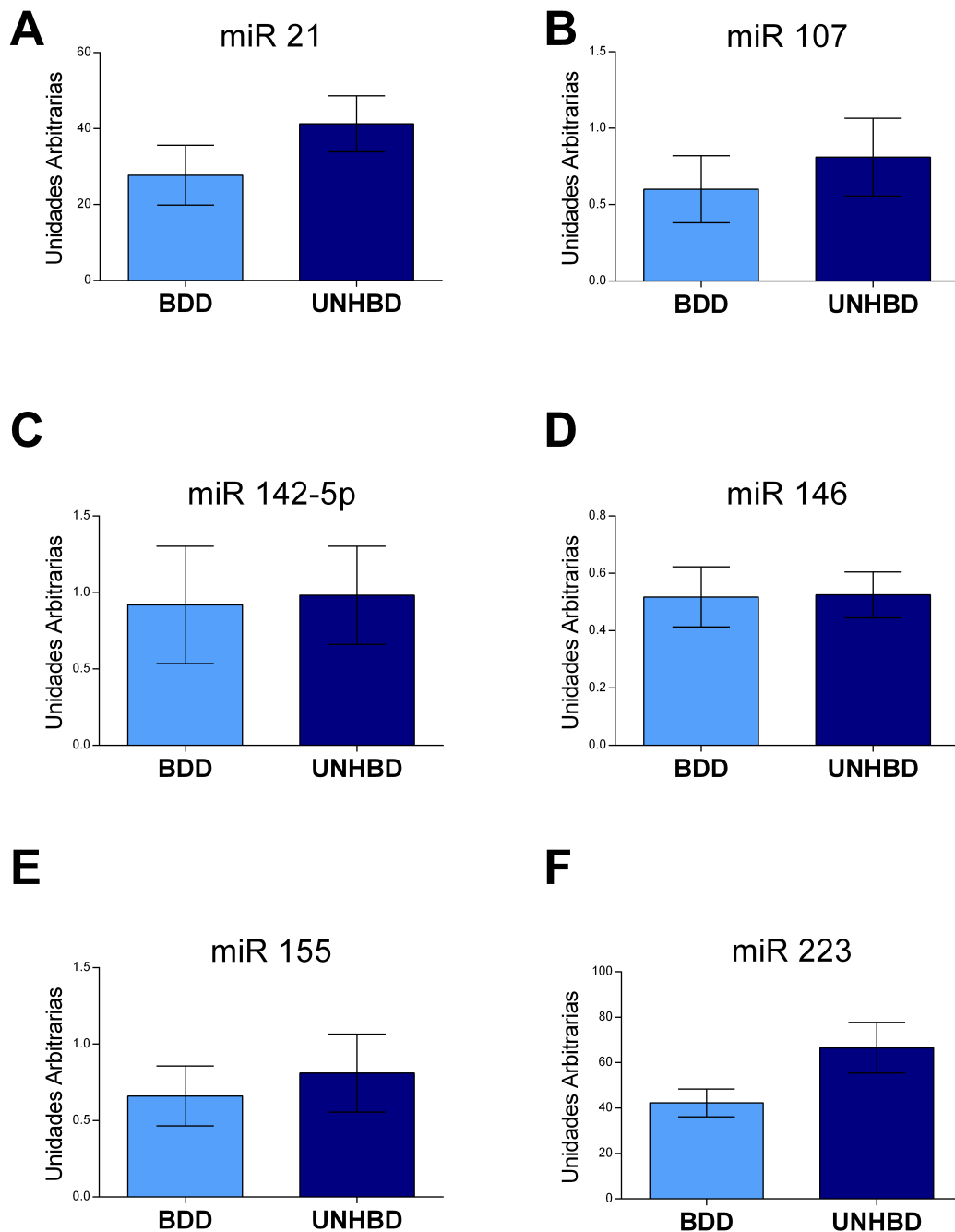


Figura 8. Expresión de microRNAs.

Expresión de miRNAs, determinada mediante qRT-PCR. Los miRNAs sin diferencias significativas entre ambos grupos de donantes fueron: miR 21 (A), miR 107 (B), miR 142-5p (C), miR 146 (D), miR 146 (E) y miR 223 (F). * $p < 0.05$ vs. BDD.

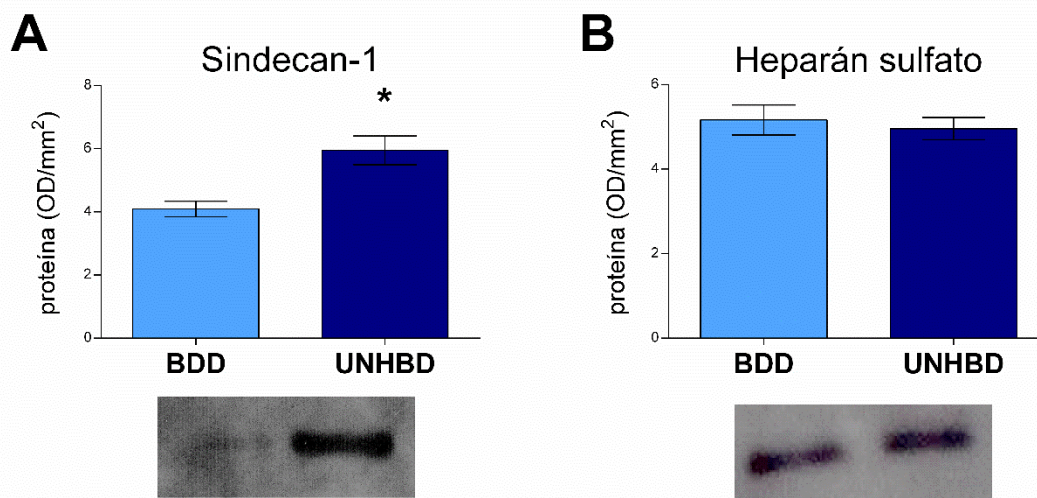


Expresión de marcadores de degradación del glicocálix.

Sindecán-1 (*syndecan 1*; **SYND1**), y **heparán sulfato** (*heparan sulphate*; **HS**). Se observó una concentración significativamente mayor de SYND1 en el páncreas de los UNHBDS, en comparación con el de los BDDs ($p < 0,01$). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en los niveles de HS (Figura 9).

Figura 9. Expresión de proteínas marcadoras de daño del glicocálix.

SYND1 (A) y HS (B) de los UNHBDS y los BDDs, determinados mediante WB. * $p < 0.05$ vs. BDD.



V. Discusión.

Los UNHBDs representan una gran oportunidad para incrementar el pool de donantes y así hacer frente a la escasez de órganos disponibles para trasplante. No obstante, este tipo de donación requiere una infraestructura compleja y apoyo tanto a nivel popular como legislativo, lo cual dificulta el desarrollo de programas clínicos estables y eficientes. Si bien los resultados obtenidos hasta la fecha en relación al trasplante de distintos órganos sólidos procedentes de la UNHBD son alentadores, poco se ha esclarecido acerca del daño tisular real presente en los órganos obtenidos, en especial el páncreas, de los donantes tipo 2 de Maastricht. Es, incluso, todavía mayor la falta de conocimiento acerca del daño específico ejercido sobre los islotes pancreáticos procedentes de la UNHBD.

El trasplante de órganos procedentes de UNHBDs se desarrolla bajo condiciones desfavorables que pueden afectar no solo la viabilidad de los órganos trasplantados y los resultados clínicos inmediatos, sino que también están relacionadas con el desarrollo de complicaciones tardías. Si bien la obtención de órganos de BDDs se realiza en un ambiente proinflamatorio deletéreo asociado a la ME, los injertos de la NHBD están también expuestos a estímulos que han sido identificados como desencadenantes de respuestas inflamatorias inmediatas, estrés oxidativo y fenómenos de apoptosis (137). Este escenario adverso podría explicar las tasas mayores de disfunción primaria del injerto tradicionalmente observadas en todos los tipos de NHBD (138). Adicionalmente, las complicaciones a largo plazo observadas tras el trasplante de UNHBDs, como la estenosis biliar y el síndrome de bronquiolitis obliterante, podrían también estar relacionadas con esos eventos fisiopatológicos perniciosos (139, 140).

En España, con vistas a aumentar el número de órganos disponibles, se han desarrollado varios programas de trasplante de órganos utilizando NHBDs. Así, este tipo de donación representó en 2016 el 24,4% del total de donantes fallecidos (29). En este sentido,

se ha observado que la supervivencia y la función a largo plazo del injerto renal procedente de la UNHBD son comparables a las del obtenido de la BDD (141). Además, se han evidenciado resultados a medio y largo plazo prometedores tanto de trasplantes hepáticos como pulmonares de UNHBDs (139, 142, 143). Más aún, el éxito obtenido a la hora de llevar a cabo el aislamiento tanto de hepatocitos como de islotes pancreáticos de CNHBDs (144, 145) sugiere que los UNHBDs podrían ser también una fuente importante de trasplante no solo de órganos sino también de trasplante celular.

Si bien en el momento actual los NHBDs no se consideran adecuados en la práctica clínica habitual para el trasplante de páncreas, podrían suponer una fuente significativa de tanto del órgano sólido (57-60) como de islotes pancreáticos (61, 62). En relación con los segundos, en 1994, Rilo et al. aislaron por primera vez islotes de páncreas de un NHBD humano (146), aunque no prosiguieron su investigación a posibles aplicaciones clínicas de los mismos. Posteriormente, el grupo de trabajo de la Universidad de Leicester (147) y el de la Universidad de Pennsylvania (61) demostraron por separado cómo los NBHD representaban una alternativa más que posible para la obtención de islotes pancreáticos. Este último grupo efectuó además el primer TIP de un NHBD a un paciente con DM1, protagonizando así un hito en la historia del trasplante con NHBD. Poco después comenzó su andadura el grupo de trabajo japonés conocido como el “Kyoto group”, que llevó a cabo el primer TIP de NHBD en Japón en 2004 (148).

Sin embargo, la posible utilización de páncreas procedentes de UNHBDs para el trasplante de órgano sólido o de islotes pancreáticos sigue siendo objeto de discusión. En este sentido, aunque la mayoría de los trabajos se han centrado en el estudio de la respuesta inflamatoria, el estrés oxidativo y la apoptosis en la NHBD tipos 3 y 4, poco se ha esclarecido en relación con el daño órgano-específico de estos fenómenos en la UNHBD. Menos aún se

ha descrito la influencia de otros marcadores más sensibles, como los microRNA o la degradación del glicocálix endotelial, en este contexto. De esta manera, si bien los resultados obtenidos en los trasplantes de órganos procedentes de UNHBDs son prometedores, poco se sabe acerca de las circunstancias específicas en que se obtienen los órganos, en especial el páncreas, de este tipo de donantes.

Conceptualmente, la pérdida precoz de islotes tras el implante es el producto de una suma multifactorial en la que la RII es el factor más importante. El proceso de la donación activa fenómenos íntimamente relacionados con la respuesta inflamatoria, así como con las consecuencias de la I/R. En este sentido, los órganos procedentes de NHBDs presentan ventajas frente a los procedentes de BDDs o cadáveres “a corazón latiente”. Estos últimos, si bien presentan un mejor control de los tiempos de isquemia, pueden experimentar una “tormenta de citoquinas” (149), con liberación de sustancias inflamatorias que dañan el endotelio vascular, y subsecuentemente los órganos. Los órganos procedentes de los NHBDs, por el contrario, podrían experimentar menor daño secundario a la “tormenta inflamatoria” típicamente asociada a la ME. Sin embargo, no se controla tanto el fenómeno de I/R. Más aún, tanto el tejido pancreático endocrino como el exocrino son fuentes importantes de citoquinas durante la respuesta inflamatoria aguda secundaria al trasplante de tejido pancreático. Múltiples factores, como la duración de la isquemia, contribuyen a la activación de las vías de señalización inducidas por estrés y a la generación de mediadores inflamatorios (150). Finalmente, las condiciones de extracción del órgano, de aislamiento de los islotes y de conservación previos al propio trasplante modulan también las consecuencias de la liberación de mediadores. En definitiva, si bien trabajos experimentales previos han mostrado cómo la ME puede disminuir el número de islotes aislados debido a una liberación masiva de citoquinas y quimioquinas (151), el impacto de esta liberación en los injertos

pancreáticos de UNHBDs no se ha estudiado exhaustivamente todavía. El objetivo de este estudio es, precisamente, evaluar la viabilidad del tejido pancreático obtenido de la UNHBD. Para ello, se ha comparado la expresión diferencial de distintos marcadores biomoleculares en el páncreas de los UNHBDs frente al de los BDDs, considerados de referencia.

En la primera fase de este estudio (152), el páncreas de los UNHBDs mostró una expresión menor de todas las citoquinas proinflamatorias determinadas. Más aún, los valores generales de los indicadores de daño oxidativo y los marcadores de apoptosis fueron, al menos, comparables a los obtenidos en los BDDs. Estos hallazgos son particularmente interesantes, ya que tanto el trasplante de páncreas completo como el TIP, y por ende la supervivencia subsecuente del injerto correspondiente, se ven seriamente afectados en estados proinflamatorios.

La inflamación es el denominador común de múltiples condiciones patológicas, incluidas la DM1 y la DM2. Se ha vinculado una plétora de mediadores proinflamatorios con la toxicidad ejercida sobre la célula β y el deterioro subsecuente de su función (153). Contribuye, además, como se ha comentado previamente, al rechazo inmune tras el trasplante. La RII generada en el microambiente del injerto desencadena respuestas inmunes adaptativas, que ejercen una influencia negativa sobre la supervivencia de éste (154). La liberación incrementada, local y sistémica, de citoquinas proinflamatorias como TNF- α e IL-1, y los eventos proapoptóticos, desencadenan diferentes fenómenos de daño tisular tras el trasplante de un órgano abdominal, por efectos directos o indirectos como la magnificación del estrés oxidativo (155, 156), que conducen a la disfunción primaria tras el trasplante.

La disminución en la expresión pancreática tanto de mRNA como de proteínas de varias de las principales citoquinas proinflamatorias (IL-1 β , TNF- α e IL-6) observada en

este estudio en los UNHBDs, en comparación con los BDDs, resultaría favorable para la viabilidad de las células β (157). De estas citoquinas, IL-1 β , cuyos niveles se elevan precozmente tanto en el trasplante de páncreas sólido, fundamentalmente tras la reperfusión (158), como en el TIP, es la que más influye en la destrucción específica de las células β (155, 159). El mecanismo por el cual la IL-1 β induce la disfunción y eventual destrucción de las células pancreáticas es multimodal. Por un lado, IL-1 β disminuye significativamente la expresión tanto del receptor GLUT-2, imprescindible para el transporte de la glucosa a través de la membrana celular, como de la glucoquinasa. La *down-regulation* de GLUT-2 conlleva una mala detección de glucemias elevadas por parte del islote y así una inadecuada secreción insulínica. Por otro lado, la unión a IL-1R activa a IRAK1, que a su vez activa al TRAF6, que degrada al inhibidor de NF- κ B (*inhibitor of kappa B*; I κ B). Así, NF- κ B queda libre y activo, promoviendo la transcripción de los genes de la propia IL-1, pero también de TNF- α , IL-6, ICAM-1 e iNOS, entre otros. Por tanto, parece lógico que el bloqueo ya no de la propia IL-1 β sino del NF- κ B sea una potencial diana terapéutica para la prevención del fallo primario del injerto.

Además, en este estudio, la ausencia de diferencias sustanciales en los niveles de mRNA de la citoquina antiinflamatoria IL-10 entre ambos tipos de donantes indicaría la indemnidad del potencial de reparación tras el daño inducido por I/R (160, 161).

Por otro lado, en situaciones de RII, la liberación de mediadores proinflamatorios por los macrófagos, los linfocitos T activados y el propio páncreas, promueve la expresión de iNOS (162). La subsecuente producción local incrementada de NO, con efectos citotóxicos, y procedente sobretodo de la activación de esta isoforma, es uno de los mecanismos más estudiados en el fracaso primario tras el trasplante. El NO en grandes cantidades puede provocar, entre otros, la inhibición de enzimas implicadas en la respiración mitocondrial, la

unión a los *clusters* de hierro-sulfato (FeS) de enzimas como la aconitasa, y la fragmentación del DNA. En este sentido, el aumento de la expresión de mRNA de eNOS y la disminución de la expresión de proteína de iNOS observados en este estudio en los UNHBDs podrían indicar un daño oxidativo moderado o compensado. Esta cuestión es de especial relevancia, ya que la sobreexpresión pancreática de iNOS se ha relacionado con la apoptosis de las células acinares y el rechazo agudo en modelos animales (163), y juega un papel importante en el daño agudo por hipoxia sobre las células β pancreáticas (164).

En cuanto a la producción de CO, en este estudio se observó una expresión de proteína equivalente de HO-1 con unos niveles de mRNA disminuidos, y una proteína HO-2 disminuida sin cambios en la expresión de mRNA. Este hallazgo podría indicar la alteración de algunos mecanismos citoprotectores, ya que la HO-1 juega un papel clave en la recuperación pancreática tras la I/R y en la supervivencia del injerto (165-167). Se ha demostrado que la inducción de esta isoforma mejora el cuadro clínico del rechazo, con un perfil de mediadores de la inflamación más favorable (167). De este modo, la expresión disminuida de HO-1 podría estar asociada a una respuesta antiinflamatoria menos efectiva en presencia de un ambiente dañino persistente. Además, en modelos de TIP, tanto el CO como la inducción de la HO-1 indujeron protección frente a la apoptosis (168). Por otro lado, poco se sabe en relación con la regulación de la expresión de la isoforma constitutiva HO-2 a nivel pancreático, tanto en situación basal como en condiciones patológicas (169) o tras trasplante. Aunque la expresión disminuida de la proteína podría a priori indicar un daño isquémico mayor y/o una respuesta antioxidante deficiente, se ha sugerido que la expresión reducida de HO-2 tras hipoxia en distintas líneas celulares podría representar un mecanismo adaptativo que contribuiría a preservar los niveles del grupo hemo intracelular (170).

La I/R provoca un incremento en la producción de radicales libres, una disminución de la capacidad antioxidante y la activación del sistema HO. En cualquiera de los casos, en este estudio, la capacidad global de respuesta podría estar mantenida, al haberse observado en el páncreas de los UNHBDs una actividad enzimática antioxidante y una expresión de marcadores apoptóticos similares a los observados en el de los BDDs.

Dentro de los múltiples mecanismos etiopatogénicos de la DM, la destrucción de las células β como resultado de una sobreproducción de ROS a raíz de la activación de la respuesta inflamatoria es uno de los más importantes. De hecho, las células de los islotes pancreáticos son especialmente sensibles al estrés oxidativo, ya que poseen constitutivamente niveles más bajos de enzimas antioxidantes como SOD, CAT y GPx (171). Incluso, se ha relacionado la presencia de polimorfismos con menor actividad del complejo GR/GPx con un aumento de la susceptibilidad de padecer DM2 (172). Además, la glucosa, la glucosa 6-fosfato y la fructosa provocan una inhibición “tiempo-dependiente” de la actividad GR; lo cual sugiere que la GR es una de las proteínas susceptible de ser glicosilada como consecuencia del mal control metabólico (173). De esta manera, la actividad semejante, en ambos tipos de donantes, de las enzimas antioxidantes CAT, GR y GPx, con un papel clave en la corrección del daño celular secundario a I/R, indicaría una actividad citoprotectora de neutralización de ROS conservada.

Adicionalmente, en la segunda fase de este estudio se observaron niveles pancreáticos disminuidos de 8-OHG en los UNHBDs, en comparación con los de los BDDs, lo cual sugeriría un menor daño oxidativo del DNA. La 8-OHG se ha propuesto como potencial marcador sérico de alteración del DNA secundaria al estrés oxidativo en la DM, al haberse observado que los pacientes con DM2, especialmente aquellos con complicaciones microvasculares avanzadas, presentan niveles séricos mayores de 8-OHG (174).

Finalmente, las citoquinas proinflamatorias como TNF- α e IL-1 β , así como el NO y otros radicales libres generados por los macrófagos, pueden inducir tanto apoptosis como necrosis, siendo la apoptosis la forma predominante en los islotes humanos (175). Aunque los mecanismos de transducción que median esta respuesta celular a las condiciones de estrés no son totalmente conocidos, una vía común es la reducción dependiente de NO en la expresión de la variante antiapoptótica del gen Bcl-2 (176). Otros fenómenos observados son cambios en la actividad de quinasas y/o fosfatasa (177), y la activación de factores de transcripción inactivos en citosol como el NF- κ B y STAT1 (178). Además, las citoquinas podrían inducir directamente la muerte de las células β (179, 180), o contribuir a la muerte celular por regulación de la expresión de factores implicados en la apoptosis, como Fas (175, 180, 181). En este estudio, la ausencia de diferencias significativas en la expresión de mRNA de Bax y Bcl-2 indicaría que el daño apoptótico observado en el páncreas de los UNHBDs, frente al de los BDDs, sería aceptable.

El papel emergente de los miRNAs como reguladores principales de la expresión génica ha abierto nuevas formas de entendimiento de las respuestas celulares a diferentes condiciones de estrés. Así, se está investigando el rol de los miRNAs en la inmunidad del aloinjerto, especialmente la que conduce al rechazo del órgano trasplantado. En este sentido, no se disponen en la literatura de trabajos comparativos sobre miRNAs de páncreas de la UNBHD frente a aquéllos procedentes de la BDD, por lo que este estudio permitiría incrementar notablemente nuestro conocimiento sobre la calidad de estos tejidos.

Los miRNAs juegan un papel esencial en la secuencia de eventos que suceden al trasplante, incluyendo el rechazo del aloinjerto, la recurrencia de la enfermedad y el desarrollo de tumores, con el subsiguiente impacto en el pronóstico del paciente (122). Cada vez se dispone de mayor evidencia que indica que estas secuencias de nucleótidos

desempeñan una función clave en los múltiples mecanismos celulares e inmunológicos que regulan el rechazo al órgano trasplantado (182). El silenciamiento de genes específicos por los miRNAs regula, en términos de desarrollo de inmunidad innata, de inflamación, de diferenciación celular T y B, de desarrollo de autoinmunidad, y de señalización TLR, las vías de respuesta inmune implicadas en las distintas etapas del rechazo del aloinjerto (108, 183-185). Los miRNAs también desempeñan un papel en el desarrollo de complicaciones posttrasplante como la fibrosis, la cirrosis o la carcinogénesis, que pueden conllevar la pérdida del injerto. De esta manera, los avances recientes en los métodos de detección y cuantificación de miRNA en biopsias tisulares, así como en muestras séricas y urinarias, han conducido a la identificación de perfiles de miRNAs específicos en los pacientes que desarrollan rechazo del injerto y se han empleado para predecir el estado del aloinjerto y su supervivencia a largo plazo.

En el contexto específico de la inmunobiología de los islotes, los miRNAs son potentes marcadores de la viabilidad y la calidad de éstos. De este modo, se plantea que la modulación de la expresión de miRNAs específicos en el microambiente del trasplante podría contribuir a mejorar la implantación de los islotes y promover así la funcionalidad de éstos a largo plazo (186). Como ejemplo de la complejidad de esta regulación posttranscripcional, en un modelo de TIP en ratas, 26 miRNAs fueron regulados diferencialmente de una manera citoquinas/NF- κ B-dependiente, y se identificaron 238 genes como potenciales dianas de estos miRNAs (187).

Por otro lado, investigaciones sucesivas han ido elucidando el papel de los miRNAs en la etiopatogenia de la DM (188, 189), dado que condicionan la sensibilidad a la insulina (190, 191), la producción (192) y la secreción de la misma (193), e igualmente modulan la

respuesta inmunitaria frente a los islotes pancreáticos y el desarrollo de complicaciones metabólicas como la obesidad (194, 195).

En la segunda fase de este trabajo se comparó la expresión de miRNAs de páncreas obtenidos de la UNHBD de la de páncreas de la BDD. Se investigaron 14 miRNAs comúnmente implicados en los procesos inflamatorios, sugiriendo su asociación con el mecanismo molecular vinculado al rechazo del injerto. Además, algunos de los miRNAs investigados también se han relacionado en estudios previos con la fisiopatología de la DM. De esta manera, en el presente estudio, algunos miRNAs incrementaron (*up-regulation*) su expresión (miR 16, miR 145, miR 182, miR 192 y Let-7), mientras que otros la disminuyeron (*down-regulation*) (miR 103, miR 152 y miR 126). Por último, hubo un grupo de miRNAs (miR 21, miR 107, miR 142-5p, miR 146, miR 155 y miR 223) en los cuales no se evidenciaron diferencias significativas en su expresión en los UNHBDs y los BDDs.

Se ha demostrado que distintos miRNAs pueden presentar una correlación positiva (miR 142-5p, miR 155 y miR 223) o negativa (miR 21, miR 146 y Let-7) con distintos eventos de las cascadas inflamatorias. Así, en los procesos inflamatorios, se observa un aumento de algunos miRNAs en relación con la liberación de citoquinas proinflamatorias como TNF- α e IL-1 β (114, 196).

El LPS bacteriano induce la expresión de miR 146a/b y miR 155, que se han propuesto, así, como biomarcadores en la sepsis, y que mantuvieron en este estudio niveles semejantes en el páncreas de la UNHBD y la BDD. En esta vía de activación de la inmunidad innata, NF- κ B regula la señalización de citoquinas mediada por TLRs a través de la inducción de miR 146 (197). A su vez, miR 146 establece un *feedback* negativo sobre IL-1 β y TNF- α , disminuyendo la expresión de IRAK y TRAF6, que son componentes de la cascada

de señalización de TLR4 (197, 198). Por otro lado, miR 146a controla las respuestas Th1 a través de su diana SOCS1 (*suppressor of cytokine signaling 1*), un regulador negativo de la fosforilación de STAT1 en la vía de señalización del receptor de IF- γ . De este modo, la deficiencia de miR 146a resulta en una producción incrementada del mediador proinflamatorio IF- γ , con alteración de la capacidad para preservar la tolerancia inmunológica, conduciendo a enfermedades autoinmunes (199).

El LPS regula, a través de Akt1, la expresión de Let-7, que reprime TLR4, y la de miR 155, que reprime SOCS1. Ambos genes, TLR4 y SOCS1, están implicados en la señalización TLR inducida tras LPS (200). La familia Let-7 también influiría en el control post-transcripcional de la respuesta innata al favorecer la inhibición de la expresión de IL-6 e IL-10 (201, 202). De esta manera, la mayor expresión de Let-7 en el páncreas de los UNHBDs en este estudio, estaría en consonancia con los menores niveles observados del mRNA de dicha citoquina.

Por su parte, miR 155 participa en la maduración de las células dendríticas a través de su diana directa PU.1, una proteína implicada en la expresión de moléculas de adhesión intercelular específicas (203). Además, miR 155 inhibe la vía inflamatoria de TLR/IL-1 en las células dendríticas en respuesta a estímulos microbianos (204). La inhibición de PU.1 por miR 155 también está implicada en la producción de anticuerpos de alta afinidad por las células B (205). Igualmente, miR 155 participa en la regulación de la diferenciación celular Th1/Th2 (206, 207). En un modelo en ratón de trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas, miR 155 estaba sobreexpresado en la enfermedad de injerto contra huésped aguda (208). Por último, los ratones deficientes en Dicer, la endonucleasa tipo RNasa III que escinde los pre-miRNAs hacia miRNAs maduros, desarrollan una autoinmunidad fatal, similar al fenotipo Foxp3 *knock out*, lo cual sugiere un papel de los

miRNAs en la regulación Treg (209, 210). Foxp3 regula niveles elevados de miR 155 y su deficiencia en Tregs conduce a la expresión incrementada de SOCS1 y a la activación disminuida de STAT5 (211).

El LPS también induce la expresión de miR 21, de manera NF- κ B-dependiente con la colaboración de MyD88. Por su parte, miR 21, que también mantuvo niveles comparables en los UNHBDs y los BDDs en este estudio, inhibe la expresión de la proteína proinflamatoria supresora de tumores 4 (*pro-inflammatory protein programmed cell death 4*; Pcd4), activadora de la vía NF- κ B, lo cual finalmente resulta en el incremento de la producción de la citoquina antiinflamatoria IL-10 (212). En este sentido, la inhibición de Pcd4 vía miR 21 ha sido propuesta como un modelo de prevención de la DM1 en roedores (213). Por otro lado, se ha observado una inducción de miR 21 en modelos *in vitro* de células tubulares renales de ratón tras exposición a isquemia, y cómo la supresión de este miRNA aumenta la tasa de muerte celular (214).

En un estudio con aloinjertos renales humanos, Anglichealau et al. proponen un valor diagnóstico para el rechazo agudo, con altas sensibilidad y especificidad, de los niveles de miR 142-5p y miR 223, entre otros. Así, la sobreexpresión de estos miRNAs, al estar asociada a mayores niveles de los mRNA de CD3 y CD20, sugeriría una mayor infiltración del injerto por células inmunes (215). La expresión semejante de miR 142-5p y miR 223 en los páncreas de los UNHBDs y los de los BDDs sugeriría una probabilidad similar de desarrollar un rechazo agudo.

Se ha observado una disminución de la expresión de miR 16 en la respuesta del organismo a la hipoxia (216). Este factor es de suma importancia, en tanto que esta respuesta está íntimamente ligada al proceso de angiogénesis (217), que a su vez es fundamental para el mantenimiento de un correcto microambiente que garantice la supervivencia del injerto

(218). De este modo, miR 16 juega un papel clave en tanto que su inhibición favorece la expresión de VEGF (219), el cual constituye uno de los principales estímulos de la angiogénesis. Así, el incremento en su expresión en el páncreas de los UNHBDs resultaría perjudicial para el resultado del trasplante, en tanto que dificultaría la correcta vascularización del injerto (220).

Por otro lado, la expresión disminuida de miR-126 podría contrarrestar el efecto previo, en términos de vasculogénesis. miR-126 se expresa únicamente en células endoteliales, presentes en, desde capilares hasta grandes vasos. Actúa sobre distintos transcritos para regular la angiogénesis. Una de sus principales dianas es EGFL7 (*epidermal growth factor-like domain 7*), un dominio tipo factor de crecimiento con una alta expresión tanto en células endoteliales vasculares como en tejidos altamente vascularizados, cuyos niveles proteicos disminuirían en presencia de miR 126 (221). La proteína EGFL7 desempeñaría un papel específico en el control de la vasculogénesis, y se encontraría sobreexpresada en varios tejidos adultos proliferativos, incluyendo los tumores (222, 223).

Los miembros de la familia miR 148/152, entre los que se incluye miR 152, contribuyen a regular la proliferación celular y, así, el crecimiento y el desarrollo de los tejidos normales (224). De esta manera, se ha sugerido que estos miRNAs pueden actuar potencialmente como oncogenes y como genes supresores de tumores. Además, se ha observado una expresión aberrante de los miembros de esta familia en patologías tanto neoplásicas como no neoplásicas, incluida la DM1 (225). La expresión de los miembros de la familia miR 148/152 estaría regulada negativamente por metilación a nivel de sus islas CpG. La interacción entre la metilación del DNA y los miembros de la familia miR 148/152 se establecería a través de su principal gen diana, DNMT1/3b, un gen clave en la metilación de DNA. Así, la expresión de DNMT1/3b, que favorecería la metilación del DNA, quedaría

inversamente restringida a los niveles de miR 148a/152. Esto, a su vez, favorecería la sobreexpresión de DNMT1/3b (224).

Por otro lado, la pérdida de miR-192 actúa como factor desencadenante de la nefropatía diabética, por ser un potente estímulo fibrogénico (226). De este modo, el incremento de su expresión en este estudio sugeriría un papel protector frente al desarrollo de esta complicación (227).

El descenso de miR 182 es característico en los pacientes con DM2. Este descenso, a través de una menor inhibición de la expresión de los genes FOXO1 y BHLHE22, está íntimamente ligado a la adquisición de resistencia a la insulina y a la disminución de la función de las células β . Además, generaría una tendencia proapoptótica, vía una inhibición reducida de Bax y Bcl-2, que condicionaría en última instancia el destino de las células β trasplantadas al paciente (228). Así pues, el incremento en su expresión en los páncreas de los UNHBDs actuaría como factor protector del fallo primario del injerto, aumentando la sensibilidad a la insulina y disminuyendo el riesgo de fallo del injerto.

Por su parte, también se ha relacionado miR 145 con la sensibilidad a la insulina. La expresión de este miRNA es inversamente proporcional a distintos mRNA íntimamente ligados con la resistencia insulínica, tales como la miosina-5A (*myosin-5A*; MYO5A), la lisil-oxidasa (*lysyl oxidase*; LOX) o el activador del gangliósido GM2 (*ganglioside activator GM2*; GM2A). En consecuencia, se ha demostrado cómo la sobreexpresión de miR-145 disminuye notablemente la expresión in vitro de los productos de estos tres mRNA, favoreciendo así la sensibilidad a la insulina (229). Por lo tanto, el incremento en su expresión observado en este estudio en los páncreas de UNHBDs favorecería la viabilidad del injerto, dado que se vería favorecida la insulino-independencia del paciente trasplantado.

Si bien la obesidad y la resistencia a la insulina están relacionadas (230, 231), ambas pueden ocurrir con independencia de la otra, sugiriendo factores etiológicos tanto compartidos como diferenciales. La expresión de los miRNAs paralogos 103 y 107 está incrementada en el ratón obeso (232). Modelos experimentales han mostrado como el silenciamiento de miR 103/107 en ratones ob/ob conduce a un incremento de la sensibilidad de la insulina en los adipocitos y a una mejora del control glucémico. Por el contrario, una ganancia de función en este miRNA tanto en hígado como en tejido adiposo favorece la creación de condiciones diabetogénicas que alteran la homeostasis de la glucosa en el organismo (233). El gen de la caveolina-1 (*caveolin-1*; Cav-1), componente de un importante mediador de la señalización intracelular de la insulina, ha sido identificado como la diana de miR 103 (234). Esta proteína incrementa su expresión en respuesta a la inactivación de miR 103/107 en los adipocitos, lo cual conduce a la ulterior estabilización del receptor de insulina, viéndose así reforzada las vías de señalización del mismo, con la consiguiente disminución de tamaño del adipocito e incremento de la toma de glucosa por el mismo. Si bien se ha considerado que estos miRNAs presentan una homología estructural casi completa sin grandes diferencias en su expresión, habiéndose denominado en consecuencia “paralogos” (235), este estudio evidenció expresiones diferenciales en los UNHBDs vs. los BDDs, no paralelas, de uno y otro. En consecuencia, en presencia de niveles semejantes de miR 107 en ambos tipos de donantes; adicionalmente, el decremento de miR 103 observado en los páncreas de la UNBHD facilitaría la insulino-independencia del paciente trasplantado.

Finalmente, además de Pcd4, otra diana potencial de miR 21, es el gen Piccolo (Pclo). Pclo actuaría como sensor de Ca²⁺ durante el proceso de secreción de insulina PKA-independiente vía cAMP. De este modo, la inhibición de Pclo por miR-21 interferiría con secreción de insulina vía cAMP (187, 236).

Como se comentó previamente, el daño inducido por la I/R es una de las principales causas del fallo primario del injerto. Aunque la gravedad del daño secundario a la I/R varía en los diferentes tejidos, un componente común de este proceso patológico en todos los órganos es la disfunción microvascular (237, 238). Si bien la patogénesis de la I/R no se ha esclarecido completamente, estudios tanto a nivel clínico como experimental han mostrado que la degradación del EGL podría desempeñar un papel clave en el daño secundario a la I/R (128, 239, 240). Se ha sugerido que estos efectos podrían estar modulados por un complejo sistema de señales intracelulares, sensible a cambios en los niveles de los mediadores de la inflamación, incluidas las citoquinas, y/o a estrés oxidativo. Así, se ha propuesto que el estímulo proinflamatorio inducido por citoquinas provocaría la pérdida de integridad del EGL (241, 242). También se ha descrito la degradación del EGL con niveles de oxígeno disminuidos. No obstante, poco se ha esclarecido acerca de una eventual alteración de la estructura del glicocálix en los NHBDs.

La reducción del espesor de esta capa se ha asociado con niveles plasmáticos aumentados de SYND1 y HS (243-245), constituyentes principales del EGL, que se postulan en consecuencia como posibles biomarcadores clínicos del estado del EGL.

Los HSPG funcionan a modo de barrera, impidiendo la migración e invasión de células inflamatorias. Así, se ha sugerido que su degradación por la heparinasa leucocitaria tiene un papel muy importante en la insulinitis propia de la DM1, así como en la inflamación peritrasplante (246). De este modo, aunque en este estudio la expresión de HS fue semejante en ambos tipos de donantes, los niveles más elevados de SYND1 observados en el páncreas de los UNHBDs, frente al de los BDDs, protegerían frente a la inflamación peritrasplante, sugiriendo una mayor viabilidad del injerto. Este incremento estaría en consonancia con la menor expresión de citoquinas proinflamatorias en el páncreas de los UNHBDs previamente

mencionada, y apoyaría la teoría inflamatoria de la alteración del glicocáliz. No obstante, este último resultado debe ser interpretado con cautela, puesto que existen resultados contradictorios en la literatura. Bitan et al. consideran a la heparinasa como un factor protector para el desarrollo de DM1 en un modelo experimental en ratón (247). En cualquiera de los casos, la expresión de SYND1 no tiene por qué estar directamente ligada con esta asociación.

VI. Conclusiones.

- La expresión de citoquinas proinflamatorias (IL-1 β , TNF- α e IL-6) fue menor en los UNHBDS, comparada con la observada en los BDDs. Esto, unido a que no se observaron diferencias significativas en la expresión de la citoquina antiinflamatoria IL-10 entre ambos tipos de donantes, sugiere que el balance pro/anti-inflamatorio podría ser más favorable en los UNHBDS. Adicionalmente, la expresión de marcadores de estrés oxidativo y de apoptosis fue semejante en ambos tipos de donantes, BDDs y UNHBDS.
- De acuerdo con la disminución de la expresión de citoquinas proinflamatorias observada en los páncreas de los UNHBDS, en comparación con los valores observados en los páncreas obtenidos de los BDDs, se observó una expresión diferente de varios microRNAs implicados en la regulación de genes proinflamatorios. Estos resultados son particularmente interesantes, ya que el trasplante de páncreas y/o islotes se ve seriamente afectado por un estado proinflamatorio.
- Aunque la expresión de heparán sulfato fue semejante en ambos tipos de donantes, en los UNHBDS se observó una mayor expresión de sindecan-1, lo que sugiere una menor degradación del glicocálix en estos donantes.

En conclusión, los resultados de este estudio sugieren que el daño pancreático presente durante la UNHBD es asumible. Aunque serían necesarios estudios adicionales para esclarecer sus consecuencias clínicas, estos hallazgos refuerzan el papel de los UNHBDS como alternativa para aumentar el número de donantes.

VII. Bibliografía.

1. Martínez FJ, Pedrianes PB. Capítulo 54. Definición y clasificación de la diabetes mellitus. Manual de Endocrinología y Nutrición de la Sociedad Española de Endocrinología y Nutrición (SEEN): Formato digital (Webapp). ISBN 978-84-606-8570-8; 2015. p. 1-21.
2. Polonsky KS. The past 200 years in diabetes. *N Engl J Med* 2012;367(14):1332-1340.
3. American Diabetes Association. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes. *Diabetes Care* 2016;39 Suppl 1:S13-22.
4. Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract* 2010;87(1):4-14.
5. Boyle JP, Honeycutt AA, Narayan KM, Hoerger TJ, Geiss LS, Chen H, et al. Projection of diabetes burden through 2050: impact of changing demography and disease prevalence in the U.S. *Diabetes Care* 2001;24(11):1936-1940.
6. Ruiz-Ramos M, Escolar-Pujolar A, Mayoral-Sanchez E, Corral-San Laureano F, Fernandez-Fernandez I. Diabetes mellitus in Spain: death rates, prevalence, impact, costs and inequalities. *Gac Sanit* 2006;20 Suppl 1:15-24.
7. Soriguer F, Goday A, Bosch-Comas A, Bordiu E, Calle-Pascual A, Carmena R, et al. Prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose regulation in Spain: the Di@bet.es Study. *Diabetologia* 2012;55(1):88-93.
8. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Patrones de mortalidad en España, 2013. 2016; Disponible en: <http://www.msssi.gob.es/estadEstudios/estadisticas/estadisticas/estMinisterio/mortalidad/docs/PatronesMortalidadEspana2013.1.pdf>. Último acceso 02/10, 2017.
9. Gu K, Cowie CC, Harris MI. Mortality in adults with and without diabetes in a national cohort of the U.S. population, 1971-1993. *Diabetes Care* 1998;21(7):1138-1145.
10. American Diabetes Association. Economic costs of diabetes in the U.S. in 2012. *Diabetes Care* 2013;36(4):1033-1046.
11. Crespo C, Brosa M, Soria-Juan A, Lopez-Alba A, López-Martínez N, Soria B. Costes directos de la diabetes mellitus y de sus complicaciones en España (Estudio SECCAID: Spain estimated cost Ciberdem-Cabimer in Diabetes). *Av Diabetol* 2013;29(6):182-189.
12. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. *N Engl J Med* 1993;329(14):977-986.
13. Global Observatory on Donation and Transplantation. 2016; Disponible en: <http://www.transplant-observatory.org>. Último acceso 02/10, 2017.
14. Watson CJ, Dark JH. Organ transplantation: historical perspective and current practice. *Br J Anaesth* 2012;108 Suppl 1:i29-42.
15. Linden PK. History of solid organ transplantation and organ donation. *Crit Care Clin* 2009;25(1):165-84, ix.
16. A definition of irreversible coma. Report of the Ad Hoc Committee of the Harvard Medical School to Examine the Definition of Brain Death. *JAMA* 1968;205(6):337-340.

17. Alvarez J. Donantes en asistolia. Aspectos logísticos. Creación y desarrollo de un programa de donantes en asistolia. *Nefrología* 1996;Vol. XVI. Supl. 2:61-65.
18. Foley DP, Fernandez LA, Levenson G, Chin LT, Krieger N, Cooper JT, et al. Donation after cardiac death: the University of Wisconsin experience with liver transplantation. *Ann Surg* 2005;242(5):724-731.
19. 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. 2000 BOE 003 de 04/01;/Sec 1:179-190.
20. Bernat JL, Capron AM, Bleck TP, Blosser S, Bratton SL, Childress JF, et al. The circulatory-respiratory determination of death in organ donation. *Crit Care Med* 2010;38(3):963-970.
21. Organización Nacional de Trasplantes. Donación en asistolia en España: Situación actual y recomendaciones. Documento de Consenso Nacional 2012. Disponible en: <http://www.ont.es/infesp/DocumentosDeConsenso/DONACIÓN%20EN%20ASISTOLIA%20EN%20ESPAÑA.%20SITUACIÓN%20ACTUAL%20Y%20RECOMENDACIONES.pdf>. Último acceso 02/10, 2017.
22. Kootstra G, Daemen JH, Oomen AP. Categories of non-heart-beating donors. *Transplant Proc* 1995;27(5):2893-2894.
23. Sanchez-Fructuoso AI, Prats D, Torrente J, Perez-Contin MJ, Fernandez C, Alvarez J, et al. Renal transplantation from non-heart beating donors: a promising alternative to enlarge the donor pool. *J Am Soc Nephrol* 2000;11(2):350-358.
24. Organización Nacional de Trasplantes. Memoria ONT 2015; 2. Donación. Disponible en: <http://www.ont.es/infesp/Memorias/Memoria%20donantes%202015.pdf>. Último acceso 02/10, 2017.
25. Matesanz R, Dominguez-Gil B, Coll E. Uncontrolled non-heart beating donation: need, opportunity and challenge. *Med Intensiva* 2013;37(4):221-223.
26. Arias-Diaz J, Alvarez J, del Barrio MR, Balibrea JL. Non-heart-beating donation: current state of the art. *Transplant Proc* 2004;36(7):1891-1893.
27. Klein AS, Messersmith EE, Ratner LE, Kochik R, Baliga PK, Ojo AO. Organ donation and utilization in the United States, 1999-2008. *Am J Transplant* 2010;10(4 Pt 2):973-986.
28. Dominguez-Gil B, Haase-Kromwijk B, Van Leiden H, Neuberger J, Coene L, Morel P, et al. Current situation of donation after circulatory death in European countries. *Transpl Int* 2011;24(7):676-686.
29. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Nota de prensa; Balance de actividad de la Organización Nacional de Trasplantes en 2016. Disponible en: <http://www.ont.es/Documents/PresentaciónDatos2016-17.pdf>. Último acceso 02/10, 2017.
30. Alvarez J, del Barrio MR, Arias J, Gonzalez M, Cordoba L, Moreno F, et al. Five years of experience with non-heart-beating donors coming from the streets. *Transplant Proc* 2002;34(7):2589-2590.

31. del Rio Gallegos F, Nunez Pena JR, Soria Garcia A, Moreno Roy MA, Varela A, Calatayud J. Non heart beating donors. Succesfully expanding the donor's pool. *Ann Transplant* 2004;9(2):19-20.
32. Fernandez E, Calatayud J, Jarabo JR, Hernando F, Rodriguez O, Gomez AM, et al. Profitability of our lung retrieval program from non heart beating donors. *Eur J Cardiothorac Surg* 2009;35(2):287-91; discussion 291-2.
33. Organización Nacional de Trasplantes. Memoria ONT 2015; 7. Trasplante de páncreas. Disponible en: <http://www.ont.es/infesp/Memorias/Memoria%20pancreas%202015.pdf>. Último acceso 02/10, 2017.
34. Sutherland DE, Gruessner RW, Dunn DL, Matas AJ, Humar A, Kandaswamy R, et al. Lessons learned from more than 1,000 pancreas transplants at a single institution. *Ann Surg* 2001;233(4):463-501.
35. van Dellen D, Worthington J, Mitu-Pretorian OM, Ghazanfar A, Forgacs B, Pararajasingam R, et al. Mortality in diabetes: pancreas transplantation is associated with significant survival benefit. *Nephrol Dial Transplant* 2013;28(5):1315-1322.
36. Mittal S, Gough SC. Pancreas transplantation: a treatment option for people with diabetes. *Diabet Med* 2014;31(5):512-521.
37. Waki K, Terasaki PI, Kadowaki T. Long-term pancreas allograft survival in simultaneous pancreas-kidney transplantation by era: UNOS registry analysis. *Diabetes Care* 2010;33(8):1789-1791.
38. Lipshutz GS, Wilkinson AH. Pancreas-kidney and pancreas transplantation for the treatment of diabetes mellitus. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2007;36(4):1015-38; x.
39. Venstrom JM, McBride MA, Rother KI, Hirshberg B, Orchard TJ, Harlan DM. Survival after pancreas transplantation in patients with diabetes and preserved kidney function. *JAMA* 2003;290(21):2817-2823.
40. Lacy PE, Kostianovsky M. Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes* 1967;16(1):35-39.
41. Robertson RP. Islet transplantation as a treatment for diabetes - a work in progress. *N Engl J Med* 2004;350(7):694-705.
42. Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, Korbutt GS, Toth E, Warnock GL, et al. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med* 2000;343(4):230-238.
43. Montanya E. Capítulo 83. Diabetes mellitus y terapias poco frecuentes o en fase de investigación. *Manual de Endocrinología y Nutrición de la Sociedad Española de Endocrinología y Nutrición (SEEN): Formato digital (Webapp)*. ISBN 978-84-606-8570-8; 2015. p. 1-26.
44. Organización Nacional de Trasplantes. Documento de consenso sobre trasplante de páncreas e islotes. Madrid: GRUPO Aula Médica; 2005. Disponible en: <http://www.ont.es/publicaciones/Documents/pancreaseislotes.pdf>. Último acceso: 02/10, 2017.

45. Barlow AD, Hosgood SA, Nicholson ML. Current state of pancreas preservation and implications for DCD pancreas transplantation. *Transplantation* 2013;95(12):1419-1424.
46. Korsgren O, Lundgren T, Felldin M, Foss A, Isaksson B, Permert J, et al. Optimising islet engraftment is critical for successful clinical islet transplantation. *Diabetologia* 2008;51(2):227-232.
47. Gupta V, Wahoff DC, Rooney DP, Poitout V, Sutherland DE, Kendall DM, et al. The defective glucagon response from transplanted intrahepatic pancreatic islets during hypoglycemia is transplantation site-determined. *Diabetes* 1997;46(1):28-33.
48. Rickels MR, Schutta MH, Mueller R, Markmann JF, Barker CF, Naji A, et al. Islet cell hormonal responses to hypoglycemia after human islet transplantation for type 1 diabetes. *Diabetes* 2005;54(11):3205-3211.
49. Cantarelli E, Piemonti L. Alternative transplantation sites for pancreatic islet grafts. *Curr Diab Rep* 2011;11(5):364-374.
50. Ryan EA, Paty BW, Senior PA, Bigam D, Alfadhli E, Kneteman NM, et al. Five-year follow-up after clinical islet transplantation. *Diabetes* 2005;54(7):2060-2069.
51. O'Connell PJ, Hawthorne WJ, Holmes-Walker DJ, Nankivell BJ, Gunton JE, Patel AT, et al. Clinical islet transplantation in type 1 diabetes mellitus: results of Australia's first trial. *Med J Aust* 2006;184(5):221-225.
52. Bretzel RG, Jahr H, Eckhard M, Martin I, Winter D, Brendel MD. Islet cell transplantation today. *Langenbecks Arch Surg* 2007;392(3):239-253.
53. Barton FB, Rickels MR, Alejandro R, Hering BJ, Wease S, Naziruddin B, et al. Improvement in outcomes of clinical islet transplantation: 1999-2010. *Diabetes Care* 2012;35(7):1436-1445.
54. Mineo D, Pileggi A, Alejandro R, Ricordi C. Point: steady progress and current challenges in clinical islet transplantation. *Diabetes Care* 2009;32(8):1563-1569.
55. Ricordi C, Hering B, Bridges N, Eggerman T, Naji A, Posselt A, et al. Completion of the first FDA phase 3 multicenter trial of islet transplantation in type 1 diabetes by the NIH CIT consortium. *Cytotherapy* 2014;16(4):S14.
56. Rother KI, Harlan DM. Challenges facing islet transplantation for the treatment of type 1 diabetes mellitus. *J Clin Invest* 2004;114(7):877-883.
57. Fernandez LA, Di Carlo A, Odorico JS, Levenson GE, Shames BD, Becker YT, et al. Simultaneous pancreas-kidney transplantation from donation after cardiac death: successful long-term outcomes. *Ann Surg* 2005;242(5):716-723.
58. Salvalaggio PR, Davies DB, Fernandez LA, Kaufman DB. Outcomes of pancreas transplantation in the United States using cardiac-death donors. *Am J Transplant* 2006;6(5 Pt 1):1059-1065.
59. Muthusamy AS, Mumford L, Hudson A, Fuggle SV, Friend PJ. Pancreas transplantation from donors after circulatory death from the United Kingdom. *Am J Transplant* 2012;12(8):2150-2156.

60. Qureshi MS, Callaghan CJ, Bradley JA, Watson CJ, Pettigrew GJ. Outcomes of simultaneous pancreas-kidney transplantation from brain-dead and controlled circulatory death donors. *Br J Surg* 2012;99(6):831-838.
61. Markmann JF, Deng S, Desai NM, Huang X, Velidedeoglu E, Frank A, et al. The use of non-heart-beating donors for isolated pancreatic islet transplantation. *Transplantation* 2003;75(9):1423-1429.
62. Noguchi H, Matsumoto S. Islet transplantation at the Diabetes Research Institute Japan. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2008;15(3):278-283.
63. Balibrea JM. Estudio del rechazo primario en el trasplante de islotes pancreáticos. Facultad de Medicina: Universidad Complutense de Madrid; 2005.
64. Calderon B, Carrero JA, Ferris ST, Sojka DK, Moore L, Epelman S, et al. The pancreas anatomy conditions the origin and properties of resident macrophages. *J Exp Med* 2015;212(10):1497-1512.
65. Heitmeier MR, Scarim AL, Corbett JA. Interferon-gamma increases the sensitivity of islets of Langerhans for inducible nitric-oxide synthase expression induced by interleukin 1. *J Biol Chem* 1997;272(21):13697-13704.
66. Nunemaker CS. Considerations for Defining Cytokine Dose, Duration, and Milieu That Are Appropriate for Modeling Chronic Low-Grade Inflammation in Type 2 Diabetes. *J Diabetes Res* 2016;2016:2846570.
67. Heitmeier MR, Scarim AL, Corbett JA. Double-stranded RNA inhibits beta-cell function and induces islet damage by stimulating beta-cell production of nitric oxide. *J Biol Chem* 1999;274(18):12531-12536.
68. Barshes NR, Wyllie S, Goss JA. Inflammation-mediated dysfunction and apoptosis in pancreatic islet transplantation: implications for intrahepatic grafts. *J Leukoc Biol* 2005;77(5):587-597.
69. Nussler AK, Carroll PB, Di Silvio M, Rilo HL, Simmons RL, Starzl TE, et al. Hepatic nitric oxide generation as a putative mechanism for failure of intrahepatic islet cell grafts. *Transplant Proc* 1992;24(6):2997.
70. Stagner JI, Samols E. The induction of capillary bed development by endothelial cell growth factor before islet transplantation may prevent islet ischemia. *Transplant Proc* 1990 Apr;22(2):824-828.
71. Vajkoczy P, Menger MD, Simpson E, Messmer K. Angiogenesis and vascularization of murine pancreatic islet isografts. *Transplantation* 1995 Jul;60(2):123-127.
72. Arbour NC, Lorenz E, Schutte BC, Zabner J, Kline JN, Jones M, et al. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat Genet* 2000;25(2):187-191.
73. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA, Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997;388(6640):394-397.
74. Kopp EB, Medzhitov R. The Toll-receptor family and control of innate immunity. *Curr Opin Immunol* 1999;11(1):13-18.

75. Vargas F, Vives-Pi M, Somoza N, Armengol P, Alcalde L, Marti M, et al. Endotoxin contamination may be responsible for the unexplained failure of human pancreatic islet transplantation. *Transplantation* 1998;65(5):722-727.
76. Jahr H, Pfeiffer G, Hering BJ, Federlin K, Bretzel RG. Endotoxin-mediated activation of cytokine production in human PBMCs by collagenase and Ficoll. *J Mol Med (Berl)* 1999;77(1):118-120.
77. Chen G, Goeddel DV. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science* 2002;296(5573):1634-1635.
78. Sabio G, Davis RJ. TNF and MAP kinase signalling pathways. *Semin Immunol* 2014;26(3):237-245.
79. Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2001;2(8):675-680.
80. Rao N, Nguyen S, Ngo K, Fung-Leung WP. A novel splice variant of interleukin-1 receptor (IL-1R)-associated kinase 1 plays a negative regulatory role in Toll/IL-1R-induced inflammatory signaling. *Mol Cell Biol* 2005;25(15):6521-6532.
81. Cooke MS, Olinski R, Evans MD. Does measurement of oxidative damage to DNA have clinical significance? *Clin Chim Acta* 2006;365(1-2):30-49.
82. Orhan H, Vermeulen NP, Tump C, Zappey H, Meerman JH. Simultaneous determination of tyrosine, phenylalanine and deoxyguanosine oxidation products by liquid chromatography-tandem mass spectrometry as non-invasive biomarkers for oxidative damage. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2004;799(2):245-254.
83. Cooke MS, Evans MD, Dove R, Rozalski R, Gackowski D, Siomek A, et al. DNA repair is responsible for the presence of oxidatively damaged DNA lesions in urine. *Mutat Res* 2005;574(1-2):58-66.
84. Cooke MS, Evans MD, Herbert KE, Lunec J. Urinary 8-oxo-2'-deoxyguanosine--source, significance and supplements. *Free Radic Res* 2000;32(5):381-397.
85. Perl M, Chung CS, Ayala A. Apoptosis. *Crit Care Med* 2005;33(12 Suppl):S526-9.
86. Padgett LE, Broniowska KA, Hansen PA, Corbett JA, Tse HM. The role of reactive oxygen species and proinflammatory cytokines in type 1 diabetes pathogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 2013;1281:16-35.
87. Saraste A, Pulkki K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res* 2000;45(3):528-537.
88. Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 2001;294(5543):858-862.
89. Ambros V. microRNAs: tiny regulators with great potential. *Cell* 2001;107(7):823-826.
90. Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature* 2004;431(7006):350-355.
91. Kloosterman WP, Plasterk RH. The diverse functions of microRNAs in animal development and disease. *Dev Cell* 2006;11(4):441-450.

92. Xie X, Lu J, Kulbokas EJ, Golub TR, Mootha V, Lindblad-Toh K, et al. Systematic discovery of regulatory motifs in human promoters and 3' UTRs by comparison of several mammals. *Nature* 2005;434(7031):338-345.
93. Engels BM, Hutvagner G. Principles and effects of microRNA-mediated post-transcriptional gene regulation. *Oncogene* 2006;25(46):6163-6169.
94. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004;116(2):281-297.
95. Ambros V, Chen X. The regulation of genes and genomes by small RNAs. *Development* 2007;134(9):1635-1641.
96. Behm-Ansmant I, Rehwinkel J, Izaurralde E. MicroRNAs silence gene expression by repressing protein expression and/or by promoting mRNA decay. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2006;71:523-530.
97. Eulalio A, Huntzinger E, Izaurralde E. Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing. *Cell* 2008;132(1):9-14.
98. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 2003;425(6956):415-419.
99. Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA* 2004;10(12):1957-1966.
100. Bohnsack MT, Czaplinski K, Gorlich D. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA* 2004;10(2):185-191.
101. Tijsterman M, Plasterk RH. Dicers at RISC; the mechanism of RNAi. *Cell* 2004;117(1):1-3.
102. Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet* 2008;9(2):102-114.
103. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 2009;136(2):215-233.
104. van Iterson M, Bervoets S, de Meijer EJ, Buermans HP, 't Hoen PA, Menezes RX, et al. Integrated analysis of microRNA and mRNA expression: adding biological significance to microRNA target predictions. *Nucleic Acids Res* 2013;41(15):e146.
105. Selbach M, Schwanhausser B, Thierfelder N, Fang Z, Khanin R, Rajewsky N. Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature* 2008;455(7209):58-63.
106. Watanabe Y, Tomita M, Kanai A. Computational methods for microRNA target prediction. *Methods Enzymol* 2007;427:65-86.
107. Aravin A, Tuschl T. Identification and characterization of small RNAs involved in RNA silencing. *FEBS Lett* 2005;579(26):5830-5840.
108. Lodish HF, Zhou B, Liu G, Chen CZ. Micromanagement of the immune system by microRNAs. *Nat Rev Immunol* 2008;8(2):120-130.

109. Sayed D, He M, Hong C, Gao S, Rane S, Yang Z, et al. MicroRNA-21 is a downstream effector of AKT that mediates its antiapoptotic effects via suppression of Fas ligand. *J Biol Chem* 2010;285(26):20281-20290.
110. Ha TY. MicroRNAs in Human Diseases: From Cancer to Cardiovascular Disease. *Immune Netw* 2011;11(3):135-154.
111. Lu M, Zhang Q, Deng M, Miao J, Guo Y, Gao W, et al. An analysis of human microRNA and disease associations. *PLoS One* 2008;3(10):e3420.
112. Oglesby IK, McElvaney NG, Greene CM. MicroRNAs in inflammatory lung disease-master regulators or target practice? *Respir Res* 2010;11:148-9921-11-148.
113. Jardim MJ, Fry RC, Jaspers I, Dailey L, Diaz-Sanchez D. Disruption of microRNA expression in human airway cells by diesel exhaust particles is linked to tumorigenesis-associated pathways. *Environ Health Perspect* 2009;117(11):1745-1751.
114. O'Connell RM, Taganov KD, Boldin MP, Cheng G, Baltimore D. MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104(5):1604-1609.
115. Nakasa T, Miyaki S, Okubo A, Hashimoto M, Nishida K, Ochi M, et al. Expression of microRNA-146 in rheumatoid arthritis synovial tissue. *Arthritis Rheum* 2008;58(5):1284-1292.
116. Sonkoly E, Stahle M, Pivarsci A. MicroRNAs and immunity: novel players in the regulation of normal immune function and inflammation. *Semin Cancer Biol* 2008;18(2):131-140.
117. Urbich C, Kuehbacher A, Dimmeler S. Role of microRNAs in vascular diseases, inflammation, and angiogenesis. *Cardiovasc Res* 2008;79(4):581-588.
118. Guay C, Roggli E, Nesca V, Jacovetti C, Regazzi R. Diabetes mellitus, a microRNA-related disease? *Transl Res* 2011;157(4):253-264.
119. Herrera BM, Lockstone HE, Taylor JM, Ria M, Barrett A, Collins S, et al. Global microRNA expression profiles in insulin target tissues in a spontaneous rat model of type 2 diabetes. *Diabetologia* 2010;53(6):1099-1109.
120. Tang X, Tang G, Ozcan S. Role of microRNAs in diabetes. *Biochim Biophys Acta* 2008;1779(11):697-701.
121. Roggli E, Britan A, Gattesco S, Lin-Marq N, Abderrahmani A, Meda P, et al. Involvement of microRNAs in the cytotoxic effects exerted by proinflammatory cytokines on pancreatic beta-cells. *Diabetes* 2010;59(4):978-986.
122. Sarma NJ, Tiriveedhi V, Ramachandran S, Crippin J, Chapman W, Mohanakumar T. Modulation of immune responses following solid organ transplantation by microRNA. *Exp Mol Pathol* 2012;93(3):378-385.
123. Chorn G, Klein-McDowell M, Zhao L, Saunders MA, Flanagan WM, Willingham AT, et al. Single-stranded microRNA mimics. *RNA* 2012;18(10):1796-1804.
124. Stenvang J, Kauppinen S. MicroRNAs as targets for antisense-based therapeutics. *Expert Opin Biol Ther* 2008;8(1):59-81.

125. Weinbaum S, Tarbell JM, Damiano ER. The structure and function of the endothelial glycocalyx layer. *Annu Rev Biomed Eng* 2007;9:121-167.
126. Mulivor AW, Lipowsky HH. Role of glycocalyx in leukocyte-endothelial cell adhesion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;283(4):H1282-91.
127. Henrich M, Gruss M, Weigand MA. Sepsis-induced degradation of endothelial glycocalyx. *ScientificWorldJournal* 2010;10:917-923.
128. Mulivor AW, Lipowsky HH. Inflammation- and ischemia-induced shedding of venular glycocalyx. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;286(5):H1672-80.
129. Adamson RH. Permeability of frog mesenteric capillaries after partial pronase digestion of the endothelial glycocalyx. *J Physiol* 1990;428:1-13.
130. Nieuwdorp M, Mooij HL, Kroon J, Atasever B, Spaan JA, Ince C, et al. Endothelial glycocalyx damage coincides with microalbuminuria in type 1 diabetes. *Diabetes* 2006;55(4):1127-1132.
131. Savery MD, Jiang JX, Park PW, Damiano ER. The endothelial glycocalyx in syndecan-1 deficient mice. *Microvasc Res* 2013;87:83-91.
132. Bernfield M, Kokenyesi R, Kato M, Hinkes MT, Spring J, Gallo RL, et al. Biology of the syndecans: a family of transmembrane heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Cell Biol* 1992;8:365-393.
133. Voyvodic PL, Min D, Liu R, Williams E, Chitalia V, Dunn AK, et al. Loss of syndecan-1 induces a pro-inflammatory phenotype in endothelial cells with a dysregulated response to atheroprotective flow. *J Biol Chem* 2014;289(14):9547-9559.
134. Bartlett AH, Hayashida K, Park PW. Molecular and cellular mechanisms of syndecans in tissue injury and inflammation. *Mol Cells* 2007;24(2):153-166.
135. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162(1):156-159.
136. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001;25(4):402-408.
137. Jassem W, Koo DD, Muiesan P, Cerundolo L, Rela M, Fuggle SV, et al. Non-heart-beating versus cadaveric and living-donor livers: differences in inflammatory markers before transplantation. *Transplantation* 2003;75(8):1386-1390.
138. Monbaliu D, Vekemans K, Hoekstra H, Vaahtera L, Libbrecht L, Derveaux K, et al. Multifactorial biological modulation of warm ischemia reperfusion injury in liver transplantation from non-heart-beating donors eliminates primary nonfunction and reduces bile salt toxicity. *Ann Surg* 2009;250(5):808-817.
139. Gomez-de-Antonio D, Campo-Canaveral JL, Crowley S, Valdivia D, Cordoba M, Moradiellos J, et al. Clinical lung transplantation from uncontrolled non-heart-beating donors revisited. *J Heart Lung Transplant* 2012;31(4):349-353.
140. Suarez F, Otero A, Solla M, Arnal F, Lorenzo MJ, Marini M, et al. Biliary complications after liver transplantation from maastricht category-2 non-heart-beating donors. *Transplantation* 2008;85(1):9-14.

141. Sanchez-Fructuoso A, Prats Sanchez D, Marques Vidas M, Lopez De Novales E, Barrientos Guzman A. Non-heart beating donors. *Nephrol Dial Transplant* 2004;19 Suppl 3:iii26-31.
142. Gomez-de-Antonio D, Varela A. Non-heart-beating donation in Spain. *Gen Thorac Cardiovasc Surg* 2011;59(1):1-5.
143. Jimenez-Galanes S, Meneu-Diaz MJ, Elola-Olaso AM, Perez-Saborido B, Yiliam FS, Calvo AG, et al. Liver transplantation using uncontrolled non-heart-beating donors under normothermic extracorporeal membrane oxygenation. *Liver Transpl* 2009;15(9):1110-1118.
144. Hughes RD, Mitry RR, Dhawan A, Lehec SC, Girlanda R, Rela M, et al. Isolation of hepatocytes from livers from non-heart-beating donors for cell transplantation. *Liver Transpl* 2006;12(5):713-717.
145. Zhao M, Muiesan P, Amiel SA, Srinivasan P, Asare-Anane H, Fairbanks L, et al. Human islets derived from donors after cardiac death are fully biofunctional. *Am J Transplant* 2007;7(10):2318-2325.
146. Rilo HL, Carroll PB, Trucco M, Phipps J, Trucco G, Finegold D, et al. Human pancreatic islet isolation from a diabetic non-heart-beating donor. *Transplant Proc* 1994;26(2):598.
147. Clayton HA, Swift SM, Turner JM, James RF, Bell PR. Non-heart-beating organ donors: a potential source of islets for transplantation? *Transplantation* 2000;69(10):2094-2098.
148. Matsumoto S, Tanaka K. Pancreatic islet cell transplantation using non-heart-beating donors (NHBDS). *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2005;12(3):227-230.
149. Kanak MA, Takita M, Kunnathodi F, Lawrence MC, Levy MF, Naziruddin B. Inflammatory response in islet transplantation. *Int J Endocrinol* 2014;2014:451035.
150. Pileggi A, Ribeiro MM, Hogan AR, Molano RD, Cobianchi L, Ichii H, et al. Impact of pancreatic cold preservation on rat islet recovery and function. *Transplantation* 2009;87(10):1442-1450.
151. Contreras JL, Eckstein C, Smyth CA, Sellers MT, Vilatoba M, Bilbao G, et al. Brain death significantly reduces isolated pancreatic islet yields and functionality in vitro and in vivo after transplantation in rats. *Diabetes* 2003;52(12):2935-2942.
152. Balibrea JM, Nunez-Pena JR, Garcia-Martin MC, Olmedilla Y, Martin-Antona E, Berthuin J, et al. The differential tissue expression of inflammatory, oxidative stress, and apoptosis markers in human uncontrolled non-heart-beating donors. *Transplantation* 2013;95(11):1346-1353.
153. Eizirik DL, Colli ML, Ortis F. The role of inflammation in insulinitis and beta-cell loss in type 1 diabetes. *Nat Rev Endocrinol* 2009;5(4):219-226.
154. Ali JM, Bolton EM, Bradley JA, Pettigrew GJ. Allorecognition pathways in transplant rejection and tolerance. *Transplantation* 2013;96(8):681-688.
155. Mandrup-Poulsen T. The role of interleukin-1 in the pathogenesis of IDDM. *Diabetologia* 1996;39(9):1005-1029.

156. Landry DW, Oliver JA. The pathogenesis of vasodilatory shock. *N Engl J Med* 2001;345(8):588-595.
157. Wachlin G, Augstein P, Schroder D, Kuttler B, Kloting I, Heinke P, et al. IL-1beta, IFN-gamma and TNF-alpha increase vulnerability of pancreatic beta cells to autoimmune destruction. *J Autoimmun* 2003;20(4):303-312.
158. Yamamoto H, Sugitani A, Kitada H, Arima T, Nishiyama K, Motoyama K, et al. Effect of FR167653 on pancreatic ischemia-reperfusion injury in dogs. *Surgery* 2001;129(3):309-317.
159. Cailleau C, Diu-Hercend A, Ruuth E, Westwood R, Carnaud C. Treatment with neutralizing antibodies specific for IL-1beta prevents cyclophosphamide-induced diabetes in nonobese diabetic mice. *Diabetes* 1997;46(6):937-940.
160. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001;19:683-765.
161. Zhai Y, Shen XD, Gao F, Zhao A, Freitas MC, Lassman C, et al. CXCL10 regulates liver innate immune response against ischemia and reperfusion injury. *Hepatology* 2008;47(1):207-214.
162. Arnush M, Heitmeier MR, Scarim AL, Marino MH, Manning PT, Corbett JA. IL-1 produced and released endogenously within human islets inhibits beta cell function. *J Clin Invest* 1998;102(3):516-526.
163. Xiaoguang N, Zhong L, Hailong C, Ping Z, Xiaofeng B, Fenglin G. The relation between apoptosis of acinar cells and nitric oxide during acute rejection of pancreas transplantation in rats. *Transpl Immunol* 2003;11(1):15-21.
164. Ko SH, Ryu GR, Kim S, Ahn YB, Yoon KH, Kaneto H, et al. Inducible nitric oxide synthase-nitric oxide plays an important role in acute and severe hypoxic injury to pancreatic beta cells. *Transplantation* 2008;85(3):323-330.
165. von Dobschuetz E, Schmidt R, Scholtes M, Thomusch O, Schwer CI, Geiger KK, et al. Protective role of heme oxygenase-1 in pancreatic microcirculatory dysfunction after ischemia/reperfusion in rats. *Pancreas* 2008;36(4):377-384.
166. Pileggi A, Molano RD, Berney T, Ichii H, San Jose S, Zahr E, et al. Prolonged allogeneic islet graft survival by protoporphyrins. *Cell Transplant* 2005;14(2-3):85-96.
167. Becker T, Zu Vilsendorf AM, Terbish T, Klempnauer J, Jorns A. Induction of heme oxygenase-1 improves the survival of pancreas grafts by prevention of pancreatitis after transplantation. *Transplantation* 2007;84(12):1644-1655.
168. Pileggi A, Molano RD, Berney T, Cattani P, Vizzardelli C, Oliver R, et al. Heme oxygenase-1 induction in islet cells results in protection from apoptosis and improved in vivo function after transplantation. *Diabetes* 2001;50(9):1983-1991.
169. Sato H, Siow RC, Bartlett S, Taketani S, Ishii T, Bannai S, et al. Expression of stress proteins heme oxygenase-1 and -2 in acute pancreatitis and pancreatic islet betaTC3 and acinar AR42J cells. *FEBS Lett* 1997;405(2):219-223.
170. Zhang Y, Furuyama K, Kaneko K, Ding Y, Ogawa K, Yoshizawa M, et al. Hypoxia reduces the expression of heme oxygenase-2 in various types of human cell lines. *A*

- possible strategy for the maintenance of intracellular heme level. *FEBS J* 2006;273(14):3136-3147.
171. Lenzen S, Drinkgern J, Tiedge M. Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues. *Free Radic Biol Med* 1996;20(3):463-466.
 172. Amer MA, Ghattas MH, Abo-Elmatty DM, Abou-El-Ela SH. Evaluation of glutathione S-transferase P1 genetic variants affecting type-2 diabetes susceptibility and glycemic control. *Arch Med Sci* 2012;8(4):631-636.
 173. Blakytyn R, Harding JJ. Glycation (non-enzymic glycosylation) inactivates glutathione reductase. *Biochem J* 1992;288 (Pt 1)(Pt 1):303-307.
 174. Shin CS, Moon BS, Park KS, Kim SY, Park SJ, Chung MH, et al. Serum 8-hydroxy-guanine levels are increased in diabetic patients. *Diabetes Care* 2001;24(4):733-737.
 175. Eizirik DL, Mandrup-Poulsen T. A choice of death--the signal-transduction of immune-mediated beta-cell apoptosis. *Diabetologia* 2001;44(12):2115-2133.
 176. Saldeen J. Cytokines induce both necrosis and apoptosis via a common Bcl-2-inhibitable pathway in rat insulin-producing cells. *Endocrinology* 2000;141(6):2003-2010.
 177. Paraskevas S, Aikin R, Maysinger D, Lakey JR, Cavanagh TJ, Agapitos D, et al. Modulation of JNK and p38 stress activated protein kinases in isolated islets of Langerhans: insulin as an autocrine survival signal. *Ann Surg* 2001;233(1):124-133.
 178. Tak PP, Firestein GS. NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest* 2001;107(1):7-11.
 179. Hoorens A, Stange G, Pavlovic D, Pipeleers D. Distinction between interleukin-1-induced necrosis and apoptosis of islet cells. *Diabetes* 2001;50(3):551-557.
 180. Eizirik DL, Darville MI. Beta-Cell Apoptosis and Defense Mechanisms: Lessons from Type 1 Diabetes. *Diabetes* 2001;50 Suppl 1:S64-9.
 181. Kim S, Kim KA, Suk K, Kim YH, Oh SH, Lee MK, et al. Apoptosis of human islet cells by cytokines. *Immune Netw* 2012;12(3):113-117.
 182. Mas VR, Dumur CI, Scian MJ, Gehrau RC, Maluf DG. MicroRNAs as biomarkers in solid organ transplantation. *Am J Transplant* 2013;13(1):11-19.
 183. Harris A, Krams SM, Martinez OM. MicroRNAs as immune regulators: implications for transplantation. *Am J Transplant* 2010;10(4):713-719.
 184. Zhang J, Jima DD, Jacobs C, Fischer R, Gottwein E, Huang G, et al. Patterns of microRNA expression characterize stages of human B-cell differentiation. *Blood* 2009;113(19):4586-4594.
 185. Wu H, Neilson JR, Kumar P, Manocha M, Shankar P, Sharp PA, et al. miRNA profiling of naive, effector and memory CD8 T cells. *PLoS One* 2007;2(10):e1020.
 186. Pileggi A, Klein D, Fotino C, Bravo-Egana V, Rosero S, Doni M, et al. MicroRNAs in islet immunobiology and transplantation. *Immunol Res* 2013;57(1-3):185-196.

187. Bravo-Egana V, Rosero S, Klein D, Jiang Z, Vargas N, Tsinoremas N, et al. Inflammation-Mediated Regulation of MicroRNA Expression in Transplanted Pancreatic Islets. *J Transplant* 2012;2012:723614.
188. Shantikumar S, Caporali A, Emanuelli C. Role of microRNAs in diabetes and its cardiovascular complications. *Cardiovasc Res* 2012;93(4):583-593.
189. Pandey AK, Agarwal P, Kaur K, Datta M. MicroRNAs in diabetes: tiny players in big disease. *Cell Physiol Biochem* 2009;23(4-6):221-232.
190. He A, Zhu L, Gupta N, Chang Y, Fang F. Overexpression of micro ribonucleic acid 29, highly up-regulated in diabetic rats, leads to insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Endocrinol* 2007;21(11):2785-2794.
191. Ling HY, Ou HS, Feng SD, Zhang XY, Tuo QH, Chen LX, et al. CHANGES IN microRNA (miR) profile and effects of miR-320 in insulin-resistant 3T3-L1 adipocytes. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2009;36(9):e32-9.
192. Tang X, Muniappan L, Tang G, Ozcan S. Identification of glucose-regulated miRNAs from pancreatic β cells reveals a role for miR-30d in insulin transcription. *RNA* 2009;15(2):287-293.
193. Poy MN, Eliasson L, Krutzfeldt J, Kuwajima S, Ma X, Macdonald PE, et al. A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature* 2004;432(7014):226-230.
194. Rottiers V, Najafi-Shoushtari SH, Kristo F, Gurumurthy S, Zhong L, Li Y, et al. MicroRNAs in metabolism and metabolic diseases. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2011;76:225-233.
195. Zhao E, Keller MP, Rabaglia ME, Oler AT, Stapleton DS, Schueler KL, et al. Obesity and genetics regulate microRNAs in islets, liver, and adipose of diabetic mice. *Mamm Genome* 2009;20(8):476-485.
196. Sethu S, Melendez AJ. New developments on the TNF α -mediated signalling pathways. *Biosci Rep* 2011;31(1):63-76.
197. Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, Baltimore D. NF- κ B-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103(33):12481-12486.
198. Liu G, Friggeri A, Yang Y, Park YJ, Tsuruta Y, Abraham E. miR-147, a microRNA that is induced upon Toll-like receptor stimulation, regulates murine macrophage inflammatory responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106(37):15819-15824.
199. Lu LF, Boldin MP, Chaudhry A, Lin LL, Taganov KD, Hanada T, et al. Function of miR-146a in controlling Treg cell-mediated regulation of Th1 responses. *Cell* 2010;142(6):914-929.
200. Androulidaki A, Iliopoulos D, Arranz A, Doxaki C, Schworer S, Zacharioudaki V, et al. The kinase Akt1 controls macrophage response to lipopolysaccharide by regulating microRNAs. *Immunity* 2009;31(2):220-231.
201. Iliopoulos D, Hirsch HA, Struhl K. An epigenetic switch involving NF- κ B, Lin28, Let-7 MicroRNA, and IL6 links inflammation to cell transformation. *Cell* 2009;139(4):693-706.

202. Schulte LN, Eulalio A, Mollenkopf HJ, Reinhardt R, Vogel J. Analysis of the host microRNA response to *Salmonella* uncovers the control of major cytokines by the let-7 family. *EMBO J* 2011;30(10):1977-1989.
203. Martinez-Nunez RT, Louafi F, Friedmann PS, Sanchez-Elsner T. MicroRNA-155 modulates the pathogen binding ability of dendritic cells (DCs) by down-regulation of DC-specific intercellular adhesion molecule-3 grabbing non-integrin (DC-SIGN). *J Biol Chem* 2009;284(24):16334-16342.
204. Ceppi M, Pereira PM, Dunand-Sauthier I, Barras E, Reith W, Santos MA, et al. MicroRNA-155 modulates the interleukin-1 signaling pathway in activated human monocyte-derived dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106(8):2735-2740.
205. Vigorito E, Perks KL, Abreu-Goodger C, Bunting S, Xiang Z, Kohlhaas S, et al. microRNA-155 regulates the generation of immunoglobulin class-switched plasma cells. *Immunity* 2007;27(6):847-859.
206. Rodriguez A, Vigorito E, Clare S, Warren MV, Couttet P, Soond DR, et al. Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function. *Science* 2007;316(5824):608-611.
207. Banerjee A, Schambach F, DeJong CS, Hammond SM, Reiner SL. Micro-RNA-155 inhibits IFN-gamma signaling in CD4+ T cells. *Eur J Immunol* 2010;40(1):225-231.
208. Ranganathan P, Heaphy CE, Costinean S, Stauffer N, Na C, Hamadani M, et al. Regulation of acute graft-versus-host disease by microRNA-155. *Blood* 2012;119(20):4786-4797.
209. Liston A, Lu LF, O'Carroll D, Tarakhovskiy A, Rudensky AY. Dicer-dependent microRNA pathway safeguards regulatory T cell function. *J Exp Med* 2008;205(9):1993-2004.
210. Zhou X, Jeker LT, Fife BT, Zhu S, Anderson MS, McManus MT, et al. Selective miRNA disruption in T reg cells leads to uncontrolled autoimmunity. *J Exp Med* 2008;205(9):1983-1991.
211. Lu LF, Thai TH, Calado DP, Chaudhry A, Kubo M, Tanaka K, et al. Foxp3-dependent microRNA155 confers competitive fitness to regulatory T cells by targeting SOCS1 protein. *Immunity* 2009;30(1):80-91.
212. Sheedy FJ, Palsson-McDermott E, Hennessy EJ, Martin C, O'Leary JJ, Ruan Q, et al. Negative regulation of TLR4 via targeting of the proinflammatory tumor suppressor PDCD4 by the microRNA miR-21. *Nat Immunol* 2010;11(2):141-147.
213. Ruan Q, Wang T, Kameswaran V, Wei Q, Johnson DS, Matschinsky F, et al. The microRNA-21-PDCD4 axis prevents type 1 diabetes by blocking pancreatic beta cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108(29):12030-12035.
214. Weiss JB, Eisenhardt SU, Stark GB, Bode C, Moser M, Grundmann S. MicroRNAs in ischemia-reperfusion injury. *Am J Cardiovasc Dis* 2012;2(3):237-247.
215. Anglicheau D, Sharma VK, Ding R, Hummel A, Snopkowski C, Dadhania D, et al. MicroRNA expression profiles predictive of human renal allograft status. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106(13):5330-5335.

216. Kulshreshtha R, Davuluri RV, Calin GA, Ivan M. A microRNA component of the hypoxic response. *Cell Death Differ* 2008;15(4):667-671.
217. Pugh CW, Ratcliffe PJ. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat Med* 2003;9(6):677-684.
218. Zhang N, Richter A, Suriawinata J, Harbaran S, Altomonte J, Cong L, et al. Elevated vascular endothelial growth factor production in islets improves islet graft vascularization. *Diabetes* 2004;53(4):963-970.
219. Hua Z, Lv Q, Ye W, Wong CK, Cai G, Gu D, et al. MiRNA-directed regulation of VEGF and other angiogenic factors under hypoxia. *PLoS One* 2006;1:e116.
220. Watada H. Role of VEGF-A in pancreatic beta cells. *Endocr J* 2010;57(3):185-191.
221. Sun Y, Bai Y, Zhang F, Wang Y, Guo Y, Guo L. miR-126 inhibits non-small cell lung cancer cells proliferation by targeting EGFL7. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;391(3):1483-1489.
222. Fitch MJ, Campagnolo L, Kuhnert F, Stuhlmann H. Egfl7, a novel epidermal growth factor-domain gene expressed in endothelial cells. *Dev Dyn* 2004;230(2):316-324.
223. Campagnolo L, Leahy A, Chitnis S, Koschnick S, Fitch MJ, Fallon JT, et al. EGFL7 is a chemoattractant for endothelial cells and is up-regulated in angiogenesis and arterial injury. *Am J Pathol* 2005;167(1):275-284.
224. Chen Y, Song YX, Wang ZN. The microRNA-148/152 family: multi-faceted players. *Mol Cancer* 2013;12:43-4598-12-43.
225. Nielsen LB, Wang C, Sorensen K, Bang-Berthelsen CH, Hansen L, Andersen ML, et al. Circulating levels of microRNA from children with newly diagnosed type 1 diabetes and healthy controls: evidence that miR-25 associates to residual beta-cell function and glycaemic control during disease progression. *Exp Diabetes Res* 2012;2012:896362.
226. Krupa A, Jenkins R, Luo DD, Lewis A, Phillips A, Fraser D. Loss of MicroRNA-192 promotes fibrogenesis in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2010;21(3):438-447.
227. Kato M, Zhang J, Wang M, Lanting L, Yuan H, Rossi JJ, et al. MicroRNA-192 in diabetic kidney glomeruli and its function in TGF-beta-induced collagen expression via inhibition of E-box repressors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104(9):3432-3437.
228. Zhou J, Meng Y, Tian S, Chen J, Liu M, Zhuo M, et al. Comparative microRNA expression profiles of cynomolgus monkeys, rat, and human reveal that mir-182 is involved in T2D pathogenic processes. *J Diabetes Res* 2014;2014:760397.
229. Kirby TJ, Walton RG, Finlin B, Zhu B, Unal R, Rasouli N, et al. Integrative mRNA-microRNA analyses reveal novel interactions related to insulin sensitivity in human adipose tissue. *Physiol Genomics* 2016;48(2):145-153.
230. Ludvik B, Nolan JJ, Baloga J, Sacks D, Olefsky J. Effect of obesity on insulin resistance in normal subjects and patients with NIDDM. *Diabetes* 1995;44(9):1121-1125.

231. Abbasi F, Brown BW, Jr, Lamendola C, McLaughlin T, Reaven GM. Relationship between obesity, insulin resistance, and coronary heart disease risk. *J Am Coll Cardiol* 2002;40(5):937-943.
232. Li S, Chen X, Zhang H, Liang X, Xiang Y, Yu C, et al. Differential expression of microRNAs in mouse liver under aberrant energy metabolic status. *J Lipid Res* 2009;50(9):1756-1765.
233. Vatandoost N, Amini M, Iraj B, Momenzadeh S, Salehi R. Dysregulated miR-103 and miR-143 expression in peripheral blood mononuclear cells from induced prediabetes and type 2 diabetes rats. *Gene* 2015;572(1):95-100.
234. Trajkovski M, Hausser J, Soutschek J, Bhat B, Akin A, Zavolan M, et al. MicroRNAs 103 and 107 regulate insulin sensitivity. *Nature* 2011;474(7353):649-653.
235. Wilfred BR, Wang WX, Nelson PT. Energizing miRNA research: a review of the role of miRNAs in lipid metabolism, with a prediction that miR-103/107 regulates human metabolic pathways. *Mol Genet Metab* 2007;91(3):209-217.
236. Fujimoto K, Shibasaki T, Yokoi N, Kashima Y, Matsumoto M, Sasaki T, et al. Piccolo, a Ca²⁺ sensor in pancreatic beta-cells. Involvement of cAMP-GEFII.Rim2. Piccolo complex in cAMP-dependent exocytosis. *J Biol Chem* 2002;277(52):50497-50502.
237. Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *J Pathol* 2000;190(3):255-266.
238. Seal JB, Gewertz BL. Vascular dysfunction in ischemia-reperfusion injury. *Ann Vasc Surg* 2005;19(4):572-584.
239. Annecke T, Chappell D, Chen C, Jacob M, Welsch U, Sommerhoff CP, et al. Sevoflurane preserves the endothelial glycocalyx against ischaemia-reperfusion injury. *Br J Anaesth* 2010;104(4):414-421.
240. Collins SR, Blank RS, Deatherage LS, Dull RO. Special article: the endothelial glycocalyx: emerging concepts in pulmonary edema and acute lung injury. *Anesth Analg* 2013;117(3):664-674.
241. Watanabe A, Mabuchi T, Satoh E, Furuya K, Zhang L, Maeda S, et al. Expression of syndecans, a heparan sulfate proteoglycan, in malignant gliomas: participation of nuclear factor-kappaB in upregulation of syndecan-1 expression. *J Neurooncol* 2006;77(1):25-32.
242. Chappell D, Jacob M, Hofmann-Kiefer K, Rehm M, Welsch U, Conzen P, et al. Antithrombin reduces shedding of the endothelial glycocalyx following ischaemia/reperfusion. *Cardiovasc Res* 2009;83(2):388-396.
243. Torres Filho IP, Torres LN, Salgado C, Dubick MA. Plasma syndecan-1 and heparan sulfate correlate with microvascular glycocalyx degradation in hemorrhaged rats after different resuscitation fluids. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2016;310(11):H1468-78.
244. Pruessmeyer J, Martin C, Hess FM, Schwarz N, Schmidt S, Kogel T, et al. A disintegrin and metalloproteinase 17 (ADAM17) mediates inflammation-induced shedding of syndecan-1 and -4 by lung epithelial cells. *J Biol Chem* 2010;285(1):555-564.

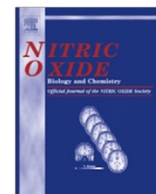
245. Snoeijs MG, Vink H, Voesten N, Christiaans MH, Daemen JW, Peppelenbosch AG, et al. Acute ischemic injury to the renal microvasculature in human kidney transplantation. *Am J Physiol Renal Physiol* 2010;299(5):F1134-40.
246. Ziolkowski AF, Popp SK, Freeman C, Parish CR, Simeonovic CJ. Heparan sulfate and heparanase play key roles in mouse beta cell survival and autoimmune diabetes. *J Clin Invest* 2012;122(1):132-141.
247. Bitan M, Weiss L, Zeira M, Reich S, Pappo O, Vlodaysky I, et al. Heparanase prevents the development of type 1 diabetes in non-obese diabetic mice by regulating T-cell activation and cytokines production. *Diabetes Metab Res Rev* 2008;24(5):413-421.

VIII. Anexos.



Contents lists available at ScienceDirect

Nitric Oxide

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yniox

Brief Communication

Tacrolimus modulates liver and pancreas nitric oxide synthetase and heme-oxygenase isoforms and cytokine production after endotoxemia

José M. Balibrea^{a,*}, M. Cruz García-Martín^{b,1}, Sara Cuesta-Sancho^b, Yoko Olmedilla^b, Javier Arias-Díaz^{c,1}, Elena Fernández-Sevilla^c, Elena Vara^{b,1}, José L. Balibrea^{c,1}

^a Department of Surgery, Germans Trias i Pujol Hospital, Universitat Autònoma, Ctra Del Canyet s/n, 08916 Badalona, Barcelona, Spain

^b Department of Biochemistry and Molecular Biology III, Universidad Complutense, Avenida Complutense s/n, 28040 Madrid, Spain

^c Department of Surgery, Faculty of Medicine, Universidad Complutense, Hospital Clínico San Carlos, C/ Prof. Martín Lagos s/n, 28040 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 September 2010

Revised 8 December 2010

Available online 19 January 2011

Keywords:

Tacrolimus

Nitric oxide synthase

Heme-oxygenase

Pancreas

Liver

ABSTRACT

Cytoprotective effects of tacrolimus are due to its unspecific anti-inflammatory and anti-oxidant properties. Neither the exact mechanisms nor if there is any organ-specificity or dose-dependent response have not been yet elucidated. Our aim was to evaluate the effect of tacrolimus on oxidative stress and mediator production in liver and pancreatic tissue secondary to endotoxemia. Wistar rats were pretreated with intraperitoneal injection of tacrolimus (0.07, 0.15, and 0.3 mg/kg) 24 h before *Escherichia coli* LPS was administrated. Animals were sacrificed 24 h after LPS administration and iNOS, eNOS, and nNOS and type 1 and 2 heme-oxygenase (HO) expression were measured. TNF- α and IL-1 tissue expression and plasmatic NO, CO, TNF- α , and IL-1 were also determined. LPS exposure increased iNOS expression in both organs, eNOS did not show variations and liver nNOS expression was significantly lower. Tacrolimus diminished both pancreas and liver iNOS and nNOS expression. Both liver and pancreatic eNOS expression augmented when tacrolimus was administrated. High doses of tacrolimus were correlated with ameliorated liver HO-1 plus HO-2 and pancreas HO-1 expression after LPS stimulation. Tacrolimus treatment diminished TNF- α but not IL-1 expression increase after LPS challenge in hepatic tissue. Pancreatic TNF- α and IL-1 values diminished partially when high doses were employed. Plasmatic NO, CO, TNF- α , and IL-1 concentrations increase after LPS challenge was diminished when highest doses of tacrolimus were given. In conclusion, tacrolimus exerts a protective effect on commonly observed harmful phenomena after LPS stimulation by modulating liver and pancreas oxidative enzyme expression and cytokine production.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Severe Gram-negative bacteria infections and septic shock still remain high-mortality conditions [1]. Bacterial lipopolysaccharide (LPS) is the principal activator of the phenomena involved in unspecific inflammatory responses during sepsis and LPS-mediated innate immune responses that can lead to multiorgan failure (MOF) [2]. Although the exact mechanisms involved in MOF secondary to sepsis are not completely understood, oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and massive cytokine release play a key role in the biomolecular pathways related to severe infection [3]. *De novo* generation of oxidative stress after

the activation of different enzymatic systems such as nitric oxide synthase (NOS) and heme-oxygenase (HO) has been observed after both liver and pancreatic injuries due to several agents like LPS or pro-inflammatory cytokine exposure or ischemia-reperfusion [4]. Although constitutive nitric oxide (NO) production from endothelial (eNOS) and neuronal (nNOS) isoforms plays a protective role, the massive release from inducible NOS (iNOS) is detrimental [5]. However, carbon monoxide (CO) production from HO isoforms has been shown to possess potent anti-inflammatory and anti-oxidative properties. Type 2 and 3 HO isozymes are constitutively expressed. The inducible form (HO-1) diminishes cellular oxidative stress during acute inflammatory responses [6].

Local and systemic increased liberation of inflammatory mediators such as interleukin 1 (IL-1) and tumoral necrosis factor alpha (TNF- α) have been determined to be a trigger of different tissue-damaging events during sepsis and severe trauma, or after abdominal organ transplantation. Massive cytokine and chemokine release can lead to tissue damage by direct or indirect effects such as magnification of oxidative stress [2].

* Corresponding author. Address: Avinguda República Argentina, 227, 08023 Barcelona, Spain. Fax: +34 934978910.

E-mail addresses: balibrea@gmail.com (J.M. Balibrea), sara5701@hotmail.com (S. Cuesta-Sancho), yoko.olmedilla@gmail.com (Y. Olmedilla), javardi@gmail.com (J. Arias-Díaz), efsevilla@gmail.com (E. Fernández-Sevilla), evaraami@med.ucm.es (E. Vara), balibrea@yahoos.es (J.L. Balibrea).

¹ Grupos de Investigación Universidad Complutense, "Investigaciones quirúrgicas básicas y clínicas", 920210.

CLINICAL AND TRANSLATIONAL RESEARCH

The Differential Tissue Expression of Inflammatory, Oxidative Stress, and Apoptosis Markers in Human Uncontrolled Non-Heart-Beating Donors

José M. Balibrea,^{1,4} José R. Núñez-Peña,² María C. García-Martín,³ Yoko Olmedilla,³ Esteban Martín-Antona,² Jeremy Berthuin,³ Lisa Rancan,³ Eleva Vara,³ and José L. Balibrea²

Background. Uncontrolled non-heart-beating donor (UNHBD) transplantation offers a major opportunity to ameliorate the effects of the donor shortage. However, little is known about the true status of the organs obtained from these donors. UNHBD transplantation is performed under unfavorable conditions and involves exposure to several harmful stimuli that have been identified as triggers for immediate inflammatory response, oxidative stress, and apoptotic phenomena. This adverse scenario could explain the higher rates of graft dysfunction due to primary nonfunction traditionally observed in NHBD. Our aim was to assess the expression of proinflammatory, oxidative, and apoptotic markers in liver, lung, and pancreas tissue samples obtained from UNHBD and to compare these expression levels with those observed in brain-dead donors (BDD).

Methods. Samples from human type 2 NHBD and BDD were obtained at the end of cold storage. Interleukin (IL)-1 β , tumor necrosis factor- α , IL-6, IL-10, endothelial nitric oxide synthase, inducible nitric oxide synthase, type 1 heme oxygenase, type 2 heme oxygenase, Bax, and Bcl-2 protein and mRNA expression, as well as catalase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase tissue activity, were determined.

Results. UNHBD showed similar or lower expression of proinflammatory mediators and apoptosis markers in all three organs without modifications to the anti-inflammatory cytokines. Although the major oxidative stress marker levels were also comparable in both types of donors, the type 1 heme oxygenase mRNA expression and antioxidant enzyme activity were slightly diminished in UNHBD.

Conclusions. The initial tissue damage generated during the UNHB donation process is at least comparable with that observed in BDD. However, although the expression of the immediate immune response and apoptosis markers is similar, a mild impairment of the local antioxidant activity was observed.

Keywords: Non-heart-beating donors, Inflammation, Apoptosis, Oxidative stress.

(*Transplantation* 2013;95: 1346–1353)

Non-heart-beating donors (NHBD) are considered not only as a valid but also a complementary alternative for organ transplantation (1). NHBDs are classified according to the Maastricht criteria as controlled (types 3 and 4) or uncontrolled (types 1 and 2) (2). In Spain, several programs of uncontrolled NHBDs (UNHBD) have been developed to increase the number of available organs, representing up to

6.7% of all transplants performed (3). The long-term graft survival and function of kidney transplantation from UNHBD are comparable with those from brain-dead donors (BDD), and recently, promising mid-term and long-term results in both liver and lung transplantation from UNHBD have also been reported (3–5). Moreover, successful isolations of both hepatocytes and pancreatic islets from controlled NHBD (6, 7) suggest that UNHBD could also be an important source for cell transplantation.

The founding source was the grant “Beca Gr58/08 Grupos de Investigación” from the Complutense University of Madrid (Spain).

The authors declare no conflicts of interest.

¹ Department of Surgery, Germans Trias i Pujol Hospital-Universitat Autònoma, Barcelona, Spain.

² Hospital Clínico San Carlos, Department of Surgery, Faculty of Medicine, Universidad Complutense, Madrid, Spain.

³ Department of Biochemistry and Molecular Biology III, Universidad Complutense, Madrid, Spain.

⁴ Address correspondence to: José M. Balibrea, M.D., Ph.D., Department of General and Digestive Surgery, Germans Trias Hospital, Carretera del Canyet s/n, 08916 Badalona-Barcelona, Spain.

E-mail: balibrea@gmail.com

J.M.B.: Grupos de Investigación Universidad Complutense, “Investigaciones quirúrgicas básicas y clínicas”/920210.

J.M.B. participated in the research design, writing of the article, data analysis, and performance of the research. J.R.N.-P. participated in the performance of the research (sample procurement) and data analysis. M.C.G.-N., J.B., and L.R. participated in the performance of the research (biochemical determinations). E.M.-A. participated in the performance of the research (sample procurement). E.V. participated in the research design, data analysis, and final approval. J.L.B. participated in the data analysis and article review and final approval (chairman).

Received 13 November 2012. Revision requested 30 November 2012.

Accepted 22 February 2013.

Copyright © 2013 by Lippincott Williams & Wilkins

ISSN: 0041-1337/13/9511-1346

DOI: 10.1097/TP.0b013e31828ee151

Nevertheless, UNHBD transplantation is performed under unfavorable conditions that not only can affect the viability of the organs and the immediate clinical outcomes but also are related to the development of later complications. Although cadaver-donor organs are obtained in a deleterious proinflammatory environment associated with brain death, grafts from NHBD are also exposed to stimuli that have been identified as triggers for immediate inflammatory responses, oxidative stress, and apoptotic phenomena (8). Thus, this adverse scenario could explain the higher rates of graft dysfunction due to primary nonfunction that have traditionally been observed in all types of NHBD (9). In addition, the long-term complications observed after UNHBD transplantation, such as biliary strictures and bronchiolitis obliterans syndrome, could also be related to those harmful pathophysiologic events (4, 10). However, although several authors have evaluated the inflammatory response, oxidative stress, and apoptosis in types 3 and 4 NHBD, little is known about the true organ-specific damage of those phenomena in UNHBD.

Therefore, our aim was to study the expression of several proinflammatory, oxidative stress, and apoptotic markers in liver, lung, and pancreas tissue samples obtained from

UNHBD and to compare the findings with those observed in cadaveric donors.

RESULTS

Inflammatory Markers Tissue Expression

Interleukin-1

Tissue interleukin (IL)-1 protein levels were significantly higher in both liver ($P<0.001$) and lung ($P<0.05$) samples from UNHBD. However, a significant decrease was observed in the pancreas specimens ($P<0.05$). When mRNA expression was measured, significantly lower values were observed in all tissue samples when compared with BDD ($P<0.01$ for all three comparisons; Fig. 1A).

Tumor Necrosis Factor- α

Although the pancreatic protein levels of tumor necrosis factor (TNF)- α were markedly lower in UNHBD ($P<0.01$), no differences were observed in the liver and lung samples from either type of donor. Cytokine liver, lung, and pancreas mRNA levels were significantly lower in UNHBD ($P<0.05$, $P<0.001$, and $P<0.001$, respectively; Fig. 1B).

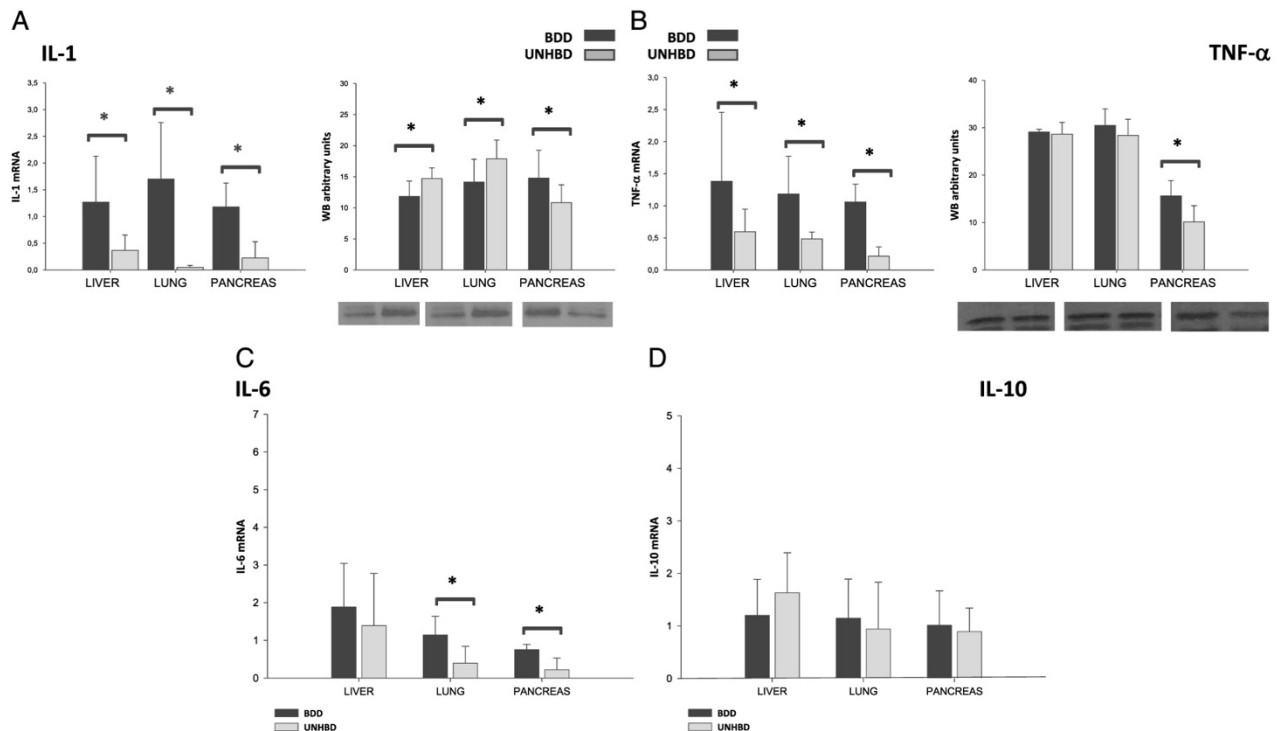


FIGURE 1. Inflammatory mediators protein and mRNA expression. IL-1 β , TNF- α , IL-6, and IL-6 values from liver, lung, and pancreas homogenates from UNHBDs and BDDs determined by either RT-PCR or Western blot assay when indicated. Each bar in the groups represents mean \pm SD. A, IL-1 protein levels were significantly higher in both liver and lung samples from UNHBD. However, a significant decrease was observed in pancreas specimens. When mRNA expression was measured, significantly lower values were observed in all tissue samples from UNHBD when compared with BDD ($*P<0.05$). B, whereas pancreatic protein levels of TNF- α were markedly lower in UNHBD, no differences in those measured in liver and lung samples from both types of donors were observed. However, liver, lung, and pancreas TNF- α mRNA levels were significantly lower in UNHBD ($*P<0.05$). C, no differences were observed in IL-6 mRNA tissue expression from liver samples. Both lung and pancreatic samples showed a significantly lower inflammatory mediator levels ($*P<0.05$). D, no differences were found when IL-10 mRNA was measured in liver, lung, or pancreas homogenates from both UNHBD and BDD. BDD, brain-dead donors; IL, interleukin; RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction; SD, standard deviation; TNF, tumor necrosis factor- α ; UNHBD, uncontrolled non-heart-beating donors.

IL-6

No differences were observed in IL-6 mRNA tissue expression from the liver samples. On the contrary, both lung and pancreatic samples showed significantly lower inflammatory mediator levels ($P<0.001$ and $P<0.0001$, respectively; Fig. 1C).

IL-10

Similar mRNA expressions of IL-10 were observed in liver, lung, and pancreas specimens from both UNHBD and BDD (Fig. 1D).

Tissue Oxidative Stress Markers**Oxidative Stress Enzyme Expression**

Endothelial nitric oxide synthase (eNOS): When the protein levels of the endothelial isoform of NOS were measured, no differences between UNHBD and BDD were found in the liver or pancreas samples. However, eNOS pulmonary values were significantly lower in UNHBD ($P<0.05$). Although liver and lung mRNA expression levels were similar in both types of donors, they were markedly higher in the pancreatic samples from UNHBD ($P<0.01$; Fig. 2A).

Inducible nitric oxide synthase (iNOS): Both lung and pancreas iNOS protein levels were significantly lower in UNHBD ($P<0.01$ and $P<0.0001$, respectively). Conversely, no differences in the mRNA expression between both types of donors were observed in any of the studied organs (Fig. 2B).

Type 1 heme oxygenase (HO1): HO1 protein expression was markedly higher in liver samples from UNHBD ($P>0.01$) but similar in lung and pancreatic samples. In contrast, the hepatic mRNA expression was similar to BDD and lower in both lung and pancreatic samples from UNHBD ($P>0.01$ for both comparisons; Fig. 2C).

Type 2 heme oxygenase (HO2): Although HO2 protein levels were significantly lower in the liver ($P<0.05$), lung ($P<0.001$), and pancreas ($P<0.01$) samples obtained from UNHBD, their mRNA expression was comparable in both types of donors (Fig. 2D).

Antioxidative Enzymatic Activity (mmol/min/protein mg)

Glutathione reductase (GR) activity was comparable in the liver and pancreatic samples from both BDD and UNHBD but lower in those obtained from the lungs of UNHBD ($P<0.0001$). Both glutathione peroxidase (GPx) and catalase (CAT) hepatic ($P<0.01$ for both comparisons) and pulmonary

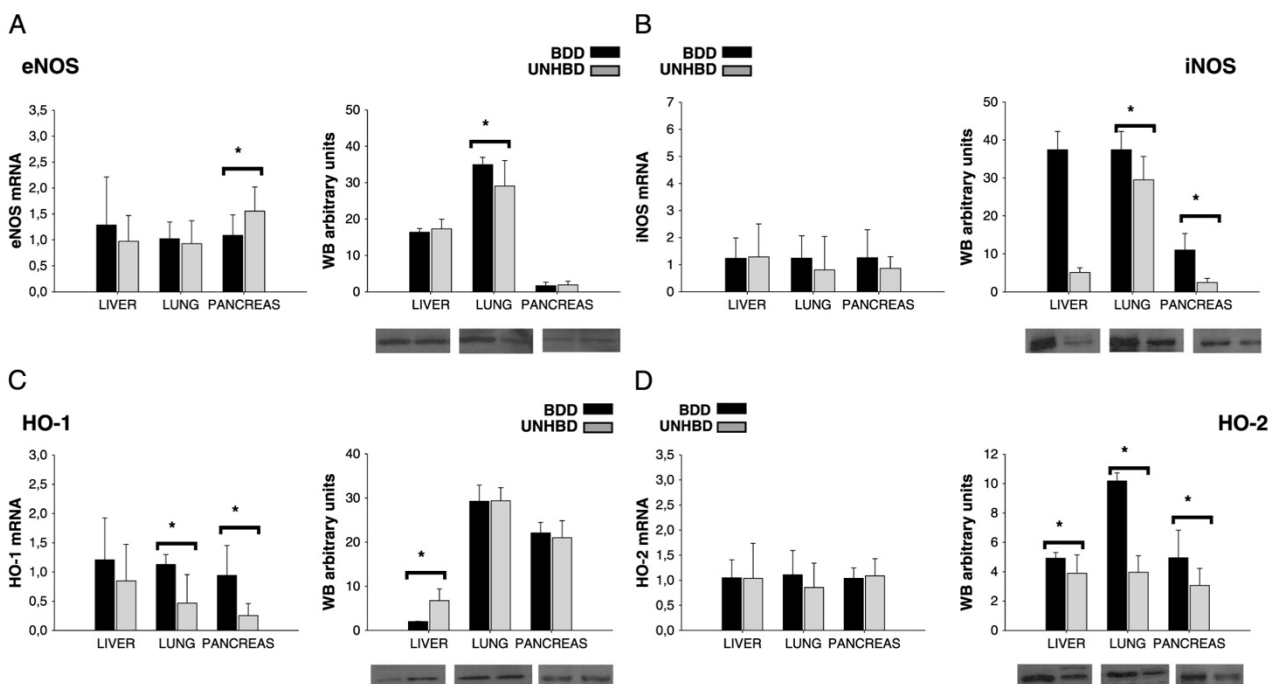


FIGURE 2. Oxidative stress markers expression. Liver, lung, and pancreas NOS and HO isoforms protein and mRNA expression (mean±SD) from UNHBDs and BDDs measured by Western blot or RT-PCR where indicated. A, no differences between UNHBD and BDD groups were found when liver and pancreas eNOS protein levels were measured. Conversely, eNOS pulmonary values were significantly lower in UNHBD. Whereas liver and lung mRNA expression was similar in both types of donors, it was markedly higher in pancreatic samples from UNHBD when compared with BDD ($*P<0.05$). B, both lung and pancreas iNOS protein levels were significantly lower in UNHBD. In contrast, no differences in mRNA expression between both types of donors were observed in any of the studied organs ($*P<0.05$). C, whereas HO1 protein expression was markedly higher in liver homogenates from UNHBD, similar values were found in lung and pancreatic samples. Nevertheless, HO1 mRNA expression lower in both lung and pancreatic samples from UNHBD ($*P<0.05$). D, although HO2 protein levels were significantly lower in liver, lung, and pancreas samples obtained from UNHBD, its mRNA expression was comparable in both types of donors in all three organs ($*P<0.05$). BDD, brain-dead donors; HO, heme oxygenase; NOS, nitric oxide synthase; RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction; SD, standard deviation; UNHBD, uncontrolled non-heart-beating donors.

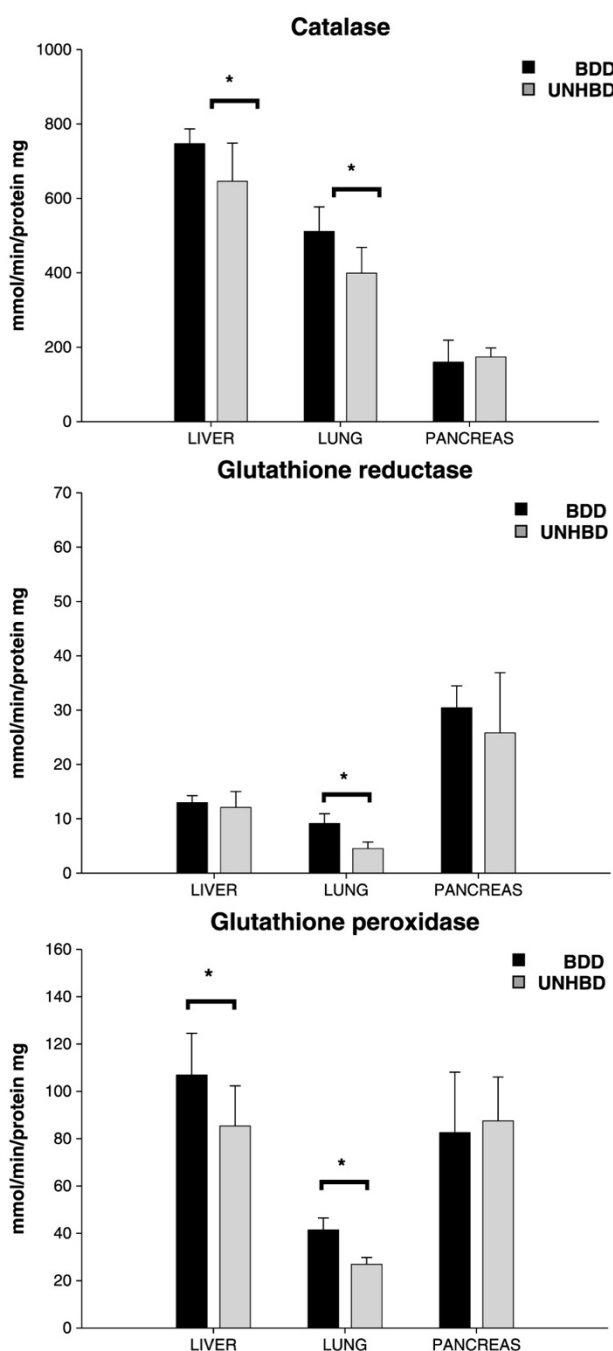


FIGURE 3. Antioxidative enzymatic activity. CAT, GR, and GPx tissue activity determined by enzyme-linked immunosorbent assay in liver, lung, and pancreas homogenates from UNHBDS and BDDs (mean \pm SD). GR activity was comparable in liver and pancreatic samples from both BDD and UNHBD but lower in those obtained from lungs of UNHBD. Both GPx and CAT hepatic and pulmonary activities were significantly lower in UNHBD. Conversely, similar values were found when pancreas samples were analyzed ($*P<0.05$). BDD, brain-dead donors; CAT, catalase; GPx, glutathione peroxidase; GR, glutathione reductase; SD, standard deviation; UNHBD, uncontrolled non-heart-beating donors.

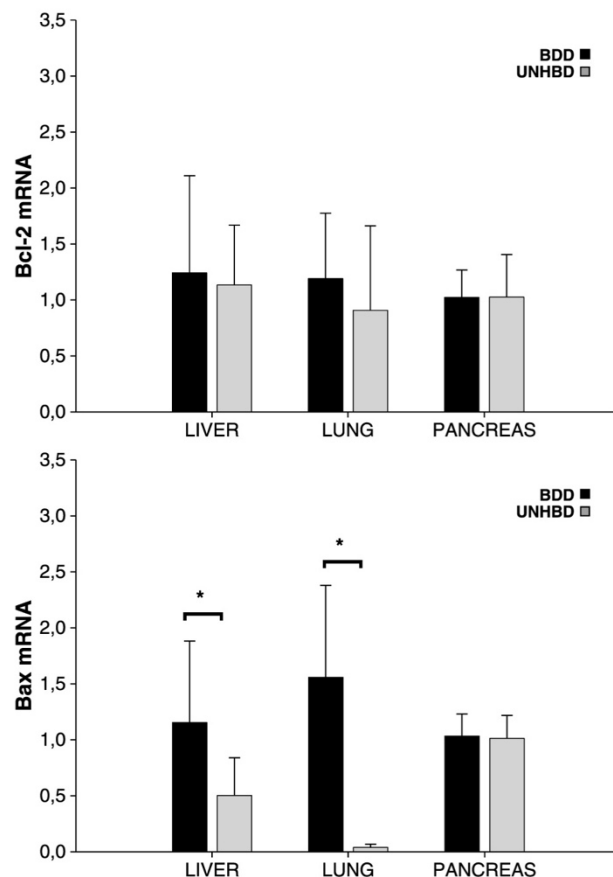


FIGURE 4. Apoptosis markers expression. Apoptosis markers (Bcl-2 and Bax) mRNA expression in liver, lung, and pancreas tissue homogenates obtained from UNHBDS and BDDs. Tissue values expressed as mean \pm SD. No differences were observed between BDD and UNHBD Bcl-2 mRNA expression in any of the studied organs. However, both liver and pulmonary Bax mRNA expressions were significantly lower in UNHBD samples ($*P<0.05$). BDD, brain-dead donors; SD, standard deviation; UNHBD, uncontrolled non-heart-beating donors.

activities were significantly lower in UNHBD ($P<0.01$ for both comparisons) but similar when pancreas samples were analyzed (Fig. 3).

Apoptosis Markers

No differences were observed between BDD and UNHBD Bcl-2 mRNA expression in any of the studied organs. Conversely, both liver and pulmonary Bax mRNA expressions were significantly lower in UNHBD samples ($P<0.01$; Fig. 4).

DISCUSSION

UNHBDS are considered to represent a major opportunity to increase the donor pool to ameliorate the effects of the donor shortage. However, UNHB donation requires a complex infrastructure and, importantly, both popular and legislative support, making it difficult to develop stable and efficient clinical programs. Although the UNHBD liver and lung transplantation results seem to be encouraging, there is a lack

of knowledge about the true cell injury status of the organs obtained from type 2 donors.

It is known that livers from NHBD are especially prone to early graft failure, mainly due to reperfusion after prolonged warm ischemia (11), and that the activation of both local and systemic inflammatory response impairs both microcirculation and hepatocyte function (12). The use of anti-inflammatory agents such as serine protease inhibitors can ameliorate warm ischemia-reperfusion injury (IRI) in experimental NHBD liver transplantation (13). Conversely, previous works report similar or even less exposure to inflammatory mediators in NHBD (8). In our study, both liver protein and mRNA expressions of pro-inflammatory mediators were similar or lower in UNHBD, thus indicating a comparable inflammatory response. However, whereas IL-1 mRNA expression was also significantly lower, its protein expression was higher. This observation could be explained by early compensatory post-transcriptional regulatory mechanisms after the stimulation of inflammatory triggers, suggesting a mild tissue damage scenario. No substantial changes in IL-10 expression were observed in UNHBD, indicating that major liver anti-inflammatory mechanisms could be preserved. IL-10 plays an important role in BDD liver transplantation due to its implications in graft tolerance via dendritic cell regulation (14) and its ischemia-reperfusion damage control that downregulates inflammatory response pathways and upregulates cytoprotective mechanisms, such as the HO1 complex (15).

Both the physiologic and iNOS liver expressions were unaltered in UNHBD. Previous studies have demonstrated the beneficial effects of eNOS-derived NO in ameliorating liver IRI, suggesting that the pharmacologic regulation of NO pathways could be useful to improve liver transplantation outcomes (16). Experimental studies have shown that NO donors can attenuate warm and cold liver IRI, increasing NO synthesis, particularly if steatosis is not present (17). This observation should be taken into account because of the high rate of fatty livers among those obtained from UNHBD. On the contrary, classic NO donors, such as L-arginine, have shown a protective effect in experimental NHBD liver transplantation (18, 19). However, the beneficial effects of L-arginine could be exerted via alternative pathways, such as an increase in the energy stores and thiol group antioxidant molecules or an improvement in microcirculation (20–22).

HO1 plays an important protective role in the liver (23), and its modulation has been associated with better results in BDD liver and NHBD kidney transplantation models (15, 24, 25). Our results indicate that the HO1 potential protective effect is preserved and could be explained in a dual manner. Liver damage associated with UNHBD is moderate and does not induce mRNA HO1 transcription, whereas enzymatic tissue stores remain disposable; on the contrary, the enhanced protein expression with stable mRNA values can indicate that the liver's response to a harmful UNHBD scenario is maintained and exerted rapidly. We have also observed diminished HO2 protein with no changes in mRNA expression. Little is known about the liver regulation of HO2 expression in either basal or posttransplantation conditions. However, although a diminished protein expression could indicate major ischemic damage or an impaired antioxidant response, previous reports have observed that

reduced HO2 expression in hepatic cells after hypoxia could be an adaptive mechanism that contributes to preserve intracellular heme levels (26).

Whereas GR liver activity in UNHBD was comparable with that in BDD, both GPx and CAT activities were significantly lower. Antioxidant enzymes play a pivotal role in ameliorating cellular damage due to ischemia-reperfusion (27), and increases in GPx and GR activity after liver transplantation have also been described (28, 29). Thus, reduced activity of cytoprotective enzymes can indicate an impaired response to eliminate reactive oxygen species. On the contrary, diminished enzymatic activity could be related to lower requirements to scavenge the reactive oxygen species, indicating less oxidative damage.

Livers from UNHBD showed a slightly diminished apoptotic activity. Cell injury in livers from NHBD is also due to apoptotic transformation via Fas receptor upregulation, among others (30). Prolonged warm ischemia and nonselective preservation solution perfusion can contribute to an increase in cell damage during the UNHBD process by generating a proapoptotic state. The implications of apoptosis in the clinical outcomes of NHBD transplantation remain obscure, and only experimental studies have shown beneficial effects from employing superoxide dismutase, venous systemic oxygen persufflation, and Bcl-2 adenoviral transfer (31–33). Our results indicate that livers from UNHBD present acceptable apoptotic damage immediately after procurement; however, this status could change in the case of prolonged organ implant delay.

When lung samples were studied, UNHBD showed a similar inflammatory profile to BDD, with similar oxidative stress and apoptotic marker levels.

Although both overall protein and mRNA cytokine expressions were comparable with BDD, it can be assumed that mediator release is similar in both types of donors, and IL-1 protein levels were significantly higher in UNHBD. This result is particularly interesting because high IL-1 β concentrations in bronchial lavage fluid have been correlated with impaired graft function in NHBD animal models (34).

Our results indicate that both eNOS and iNOS lung mRNA expressions in UNHBD and BDD were similar, suggesting that the baseline NO production is not altered. Several reports have correlated NO ventilation with an improved posttransplantation lung graft function from NHBD (35, 36). However, little is known about the importance of the local de novo NO production or the regulation of NOS isoforms during the UNHBD process. Nevertheless, comparable iNOS and eNOS expression could be associated with at least equivalent local concentrations of NO and similar tissue damage.

Lung mRNA HO1 expression was significantly lower in UNHBD. It is known that HO1 has a protective effect in a number of lung diseases, including ischemia-reperfusion. Its expression has been proposed as a tissue stress indicator that can be enhanced to ameliorate cell damage (37). Thus, although UNHBD HO1 lung protein levels are comparable with BDD, the capability to neutralize harmful inflammation-related events via HO1 overexpression could be impaired in type 2 donors.

Although supplementation by glutathione precursors, such as nebulized N-acetylcysteine, has been proposed as a protective agent of the pulmonary graft in animal NHBD

models (38) and immunotargeted CAT administration ameliorates ischemia-reperfusion lung injury (39), there is a lack of evidence about the significance of the variations in antioxidant enzymatic activity. As observed in liver samples, in our study, lungs from UNHBD showed a diminished activity of all of the studied antioxidant enzymes. In the same way, this reduced activity could indicate an impaired response to eliminate reactive oxygen species but, at the same time, an environment with less oxidative damage. However, we believe that the antioxidant activity in NHBD could be enhanced if suitable substrates were present.

The pancreas from UNHBD showed lower protein and mRNA expression of all measured proinflammatory cytokines. Furthermore, apoptotic markers and overall values of oxidative damage indicators were comparable with BDD. These findings are particularly interesting, taking into account that solid and islet pancreatic graft survival is affected by an enhanced proinflammatory response. Although previous experimental works have observed how brain death can diminish the number of isolated islets due to the massive cytokine release (40), the impact of this release on pancreatic grafts from UNHBD has not been thoroughly studied yet. We have observed an equivalent HO1 protein expression with decreased mRNA levels and a diminished HO2 protein with no changes in mRNA expression. This finding could indicate that some cytoprotective mechanisms could be affected because HO1 plays a pivotal role in pancreatic recovery after ischemia-reperfusion and graft survival (41, 42). Thus, the diminished expression of HO1 could be associated with a less effective anti-inflammatory response in the presence of a persistent damaging environment. Nevertheless, global response capacity could be maintained because UNHBD showed similar antioxidant enzymatic activity and apoptosis marker mRNA expression. The observed augmented eNOS protein expression and diminished iNOS mRNA expression could be due to a moderate or compensated oxidative damage. This issue is especially important because the pancreatic overexpression of iNOS has been related to the

apoptosis of acinar cells and acute rejection in animal models (43) and plays an important role in acute and severe hypoxic injury to pancreatic beta cells (44). To date, although solid pancreas transplantation remains challenging, successful islet isolation and transplantation from NHBD have been reported (45, 46). Our results indicate that the pancreas from UNHBD shows acceptable tissue damage. Thus, it could be considered as a reliable source of pancreatic islets if the same results are obtained after a specific endocrine tissue isolation is performed.

Our findings suggest that the initial organ damage generated during the UNHB donation process is acceptable. We are aware about the descriptive nature of our results because no correlation between markers expression and graft outcome has been performed. Moreover, because of the diversity of results, it is difficult to retrieve conclusive opinions about the importance of these markers in UNHBD. However, although the clinical significance of our findings is unknown, they could still be influential enough to consider UNHBD as an excellent opportunity to increase the donor pool.

MATERIALS AND METHODS

Donors and Tissue Samples Procurement

Liver, lung, and pancreas tissue samples were obtained from UNHBD (n=30) and BDD (n=10) from the Hospital Clinico San Carlos (Madrid, Spain) that were not offered for actual transplant programs. Samples from BDD were obtained only if no suitable recipient was found following Spanish National Transplant Organization protocols. The UNHBDs were attended following our specific program called "code 9", which has previously been described elsewhere (47). The tissue specimens were immediately dissected and frozen in dry ice and transferred to -80°C until processing. The clinically relevant data from donors are included in Table 1.

Western Blotting Analysis

Western blots were used to measure the protein expression of TNF- α , IL-1 β , HO1, HO2, eNOS, and iNOS. Homogenized tissue samples (50–60 mg) were boiled with gel-loading buffer (0.100 M Tris-HCl, 4% sodium dodecyl sulfate, 20% glycerol, and 0.1% bromophenol blue) at a 1:1 ratio, and the samples were sonicated to determine the protein concentrations by the Bradford

TABLE 1. Donor clinical parameters

Clinical parameters	UNHBD (n=30)	BDD (n=10)
Donor sex, M/F	22/8	4/6
Donor age, year \pm SD	45.16 \pm 5.44	63 \pm 11.09
Donor BMI, kg/m ² \pm SD	26.05 \pm 5.3	32.41 \pm 3.72
Ventilation support, d \pm SD	N/A	2.2 \pm 1.5
Inotropic support, yes/no	N/A	8/2
Traumatic death, yes/no	N/A	3/7
Active infection, yes/no	N/A	1/9
Plasma sodium, mM \pm SD	137 \pm 5.6	144 \pm 2.3
Hypotension, MAP>50 mm Hg	N/A	0
Warm ischemia ^a , min \pm SD	108 \pm 27.9	0
Cold ischemia ^b , min \pm SD	177.59 \pm 51.73	329.34 \pm 86.21

^a From cardiac arrest to preservation maneuvers.

^b From initiation of preservation maneuvers to organ samples procurement. In UNHBD preservation, maneuvers include an arteriovenous bypass with membrane oxygenation and deep hypothermia (240-min limit). Tissue harvesting cannot be performed until family consent and judge's permission are obtained.

BDD, brain-dead donors; BMI, body mass index; MAP, median arterial pressure; N/A, not appropriate; SD, standard deviation; UNHBD, uncontrolled non-heart-beating donors.

method. The total protein equivalents (30 mg) for each sample were separated by sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis using 10% acrylamide gels, transferred to a nitrocellulose membrane in a semidry transfer system, and immediately placed into the blocking buffer (5% nonfat milk in 20 mM Tris [pH 7.5], 150 mM NaCl, and 0.01% Tween 20). The blot was allowed to block at 37°C for 1 h. The membrane was incubated with rabbit polyclonal antibodies against TNF- α , IL-1 β , HO1, HO2, eNOS, and iNOS (Bio Genesis, Brentwood, NH) for 12 h at 4°C followed by incubation in an anti-rabbit IgG-horse radish peroxidase–conjugated antibody. After washing with Tween 20–Tris-buffered saline, the membranes were incubated with ECL Plus detection reagents (Amersham Life Sciences, Buckinghamshire, UK) and exposed to X-ray film. The films were scanned with a densitometer (GS 800; Bio-Rad, Hercules, CA). Prestained protein markers were used for molecular weight determinations. Reproducibility within the assays was evaluated in three independent experiments. The overall intra-assay coefficient of variation was calculated to be less than 5%. Assay-to-assay reproducibility was evaluated in three independent experiments. The overall interassay coefficient of variation was calculated to be less than 6%.

RNA Isolation and Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction

RNA was isolated employing the TRI Reagent Kit (Molecular Research Center, Cincinnati, OH) following the previously described methodology (48). The purity of the RNA was estimated using 1.5% agarose gel electrophoresis, and the RNA concentrations were determined by spectrophotometry (260 nm). Reverse transcription of 2 μ g RNA for cDNA synthesis was performed using the Reverse Transcription System (Promega, Madison, WI) and a pd(N)6 random hexamer. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed using an Applied Biosystems 7300 apparatus with the SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Warrington, UK) and 300 nM concentrations of specific primers (5'-3' sequences):

TNF- α (F-AGCCCATGTTGTAGCAAACC and R-TCTCAGCTCCA CGCCATT), IL-1 β (F-AACAGGCTGCTCTGGGATTCTCTT and R-ATTT CACTGGCGAGCTCAGGTA), IL-6 (F-AAATTCGGTACATCCTCGACG GCA and R-AGTGCCTCTTTGCTGCTTTCACAC), IL-10 (F-AAGCTGA GAACCAAGACCCAGACA and R-AAAGGCATCTTTCACCTGCTCCAC), HO1 (F-AACTTTCAGAAAGGGCCAGGT and R-CCTCCAGGGCCACATAGA T), HO2 (F-GGACTTCTTGAAAGGCCAACATTA and R-TGAAGTAAAGTGCC GTGGTG), eNOS (F-TTAAAGAAGTGGCCAACGCCGTG and R-AGCCAT ACAGGATTGTCGCCCTTCA), iNOS (F-GCTCAAATCTCGGCAGAATC and R-GCCATCCTCACAGGAGATT), Bax (F-CAAGACCAGGGTGGTTGG and R-CACTCCCGCCACAAAAGAT), and Bcl-2 (F-TACCTGAACCGGCACCTG and R-GCCGTACAGTCCACAAAAGG). The RT-PCR amplifications were performed as follows: 50°C for 2 min, 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of 95°C for 15 s, 60°C for 1 min, 95°C for 15 s, 60°C for 30 s, and 95°C for 15 s. For the normalization of cDNA loading in the PCR, an amplification of 18S rRNA was used for every sample. The relative changes in gene expression were calculated using the 2- $\Delta\Delta$ CT method.

Antioxidant Enzymes Activity

Antioxidant enzymes were measured in tissue homogenates with an enzyme-linked immunosorbent assay kit according to the manufacturer's instructions (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI).

Statistical Analysis

The results are expressed as the means \pm standard errors of the mean. Non-parametric tests were used (Mann-Whitney *U* test) to identify the differences between groups. A 95% confidence level was considered significant. Statistical analysis was carried out with the SPSS 14.0 package for Microsoft Windows.

REFERENCES

- Arias-Diaz J, Alvarez J, del Barrio MR, et al. Non-heart-beating donation: current state of the art. *Transplant Proc* 2004; 36: 1891.
- Kootstra G, Daemen JH, Oomen AP. Categories of non-heart-beating donors. *Transplant Proc* 1995; 27: 2893.
- Gomez-de-Antonio D, Varela A. Non-heart-beating donation in Spain. *Gen Thorac Cardiovasc Surg* 2011; 59: 1.
- Gomez-de-Antonio D, Campo-Cañaveral JL, Crowley S, et al. Clinical lung transplantation from uncontrolled non-heart-beating donors revisited. *J Heart Lung Transplant* 2012; 31: 349.
- Jiménez-Galanes S, Meneu-Díaz MJ, Elola-Olaso AM, et al. Liver transplantation using uncontrolled non-heart-beating donors under normothermic extracorporeal membrane oxygenation. *Liver Transpl* 2009; 15: 1110.
- Zhao M, Muiesan P, Amiel SA, et al. Human islets derived from donors after cardiac death are fully biofunctional. *Am J Transplant* 2007; 7: 2318.
- Hughes RD, Mitry RR, Dhawan A, et al. Isolation of hepatocytes from livers from non-heart-beating donors for cell transplantation. *Liver Transpl* 2006; 12: 713.
- Jassem W, Koo DD, Muiesan P, et al. Non-heart-beating versus cadaveric and living-donor livers: differences in inflammatory markers before transplantation. *Transplantation* 2003; 75: 1386.
- Monbaliu D, Vekemans K, Hoekstra H, et al. Multifactorial biological modulation of warm ischemia reperfusion injury in liver transplantation from non-heart-beating donors eliminates primary nonfunction and reduces bile salt toxicity. *Ann Surg* 2009; 250: 808.
- Suárez F, Otero A, Solla M, et al. Biliary complications after liver transplantation from Maastricht category-2 non-heart-beating donors. *Transplantation* 2008; 85: 9.
- Monbaliu D, Crabbé T, Roskams T, et al. Livers from non-heart-beating donors tolerate short periods of warm ischemia. *Transplantation* 2005; 79: 1226.
- Massip-Salcedo M, Roselló-Catafau J, Prieto J, et al. The response of the hepatocyte to ischemia. *Liver Int* 2007; 27: 6.
- Miyagi S, Ohkohchi N, Oikawa K, et al. Effects of anti-inflammatory cytokine agent (FR167653) and serine protease inhibitor on warm ischemia-reperfusion injury of the liver graft. *Transplantation* 2004; 77: 1487.
- Sumpter TL, Lunz JG 3rd, Demetris AJ, et al. Molecular regulation of hepatic dendritic cell function and its relation to liver transplant outcome. *Transplantation* 2009; 88: S40.
- Ke B, Shen XD, Tsuchihashi S, et al. Viral interleukin-10 gene transfer prevents liver ischemia-reperfusion injury: Toll-like receptor-4 and heme oxygenase-1 signaling in innate and adaptive immunity. *Hum Gene Ther* 2007; 18: 355.
- Abu-Amara M, Yang SY, Seifalian A, et al. The nitric oxide pathway—evidence and mechanisms for protection against liver ischaemia reperfusion injury. *Liver Int* 2012; 32: 531.
- Ben MI, Rosello-Catafau J, Franco-Gou R, et al. Preservation of steatotic livers in IGL-1 solution. *Liver Transpl* 2006; 12: 1215.
- Gong J, Lao XJ, Zhang SJ, et al. Protective effects of L-arginine against ischemia-reperfusion injury in non-heart beating rat liver graft. *Hepatobil Pancreat Dis Int* 2008; 7: 481.
- Valero R, García-Valdecasas JC, Net M, et al. L-arginine reduces liver and biliary tract damage after liver transplantation from non-heart-beating donor pigs. *Transplantation* 2000; 70: 730.
- Shimamura T, Zhu Y, Zhang S, et al. Protective role of nitric oxide in ischemia and reperfusion injury of the liver. *J Am Coll Surg* 1999; 188: 43.
- Acquaviva R, Lanteri R, Li DG, et al. Beneficial effects of rutin and L-arginine s. *Gastrointest Liver Physiol* 2009; 296: G664.
- Nilsson B, Delbro D, Wallin M, et al. Protective effect of nitric oxide and prostaglandin E(2) in ischemia/reperfusion injury of the liver. *Transplant Proc* 2001; 33: 2518.
- Wang CF, Wang ZY, Li JY. Dual protective role of HO-1 in transplanted liver grafts: a review of experimental and clinical studies. *World J Gastroenterol* 2011; 17: 3101.
- Ke B, Shen XD, Buelow R, et al. Heme oxygenase-1 gene transfer prevents CD95/FasL-mediated apoptosis and improves liver allograft survival via carbon monoxide signaling pathway. *Transplant Proc* 2002; 34: 1465.
- Lario S, Bescós M, Campos B, et al. Thrombospondin-1 mRNA expression in experimental kidney transplantation with heart-beating and non-heart-beating donors. *J Nephrol* 2007; 20: 588.
- Zhang Y, Furuyama K, Kaneko K, et al. Hypoxia reduces the expression of heme oxygenase-2 in various types of human cell lines. A possible strategy for the maintenance of intracellular heme level. *FEBS J* 2006; 273: 3136.

27. Glantzounis GK, Yang W, Koti RS, et al. The role of thiols in liver ischemia-reperfusion injury. *Curr Pharm Des* 2006; 12: 2891.
28. Hassan L, Bueno P, Ferrón-Celma I, et al. Time course of antioxidant enzyme activities in liver transplant recipients. *Transplant Proc* 2005; 37: 3932.
29. Villegas T, Olmedo C, Muffak-Granero K, et al. Perioperative levels of glutathione reductase in liver transplant recipients with hepatitis C virus cirrhosis. *Transplant Proc* 2012; 44: 1542.
30. Schnurr C, Glatzel U, Tolba R, et al. Fas receptor is upregulated in livers from non-heart-beating donors. *Eur Surg Res* 2001; 33: 327.
31. Song SW, Tolba RH, Yonezawa K, et al. Exogenous superoxide dismutase prevents peroxynitrite-induced apoptosis in non-heart-beating donor livers. *Eur Surg Res* 2008; 41: 353.
32. Tolba RH, Schildberg FA, Schnurr C, et al. Reduced liver apoptosis after venous systemic oxygen persufflation in non-heart-beating donors. *J Invest Surg* 2006; 19: 219.
33. Kienle K, Rentsch M, Muller T, et al. Expression of BCL-2 in liver grafts after adenoviral transfer improves survival following prolonged ischemia and reperfusion in rat liver transplantation. *Transplant Proc* 2005; 37: 439.
34. Rega FR, Vanaudenaerde BM, Wuyts WA, et al. IL-1beta in bronchial lavage fluid is a non-invasive marker that predicts the viability of the pulmonary graft from the non-heart-beating donor. *J Heart Lung Transplant* 2005; 24: 20.
35. Dong BM, Abano JB, Egan TM. Nitric oxide ventilation of rat lungs from non-heart-beating donors improves posttransplant function. *Am J Transplant* 2009; 9: 2707.
36. Aitchison JD, Orr HE, Flecknell PA, et al. Nitric oxide during perfusion improves posttransplantation function of non-heart-beating donor lungs. *Transplantation* 2003; 75: 1960.
37. Constantin M, Choi AJ, Cloonan SM, et al. Therapeutic potential of heme oxygenase-1/carbon monoxide in lung disease. *Int J Hypertens* 2012; 2012: 859235.
38. Rega FR, Wuyts WA, Vanaudenaerde BM, et al. Nebulized N-acetyl cysteine protects the pulmonary graft inside the non-heart-beating donor. *J Heart Lung Transplant* 2005; 24: 1369.
39. Nowak K, Weih S, Metzger R, et al. Immunotargeting of catalase to lung endothelium via anti-angiotensin-converting enzyme antibodies attenuates ischemia-reperfusion injury of the lung in vivo. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007; 293: L162.
40. Contreras JL, Eckstein C, Smyth CA, et al. Brain death significantly reduces isolated pancreatic islet yields and functionality in vitro and in vivo after transplantation in rats. *Diabetes* 2003; 52: 2935.
41. Becker T, Zu Vilsendorf AM, Terbish T, et al. Induction of heme oxygenase-1 improves the survival of pancreas grafts by prevention of pancreatitis after transplantation. *Transplantation* 2007; 84: 1644.
42. von Dobschuetz E, Schmidt R, Scholtes M, et al. Protective role of heme oxygenase-1 in pancreatic microcirculatory dysfunction after ischemia/reperfusion in rats. *Pancreas* 2008; 36: 377.
43. Xiaoguang N, Zhong L, Hailong C, et al. The relation between apoptosis of acinar cells and nitric oxide during acute rejection of pancreas transplantation in rats. *Transpl Immunol* 2003; 11: 15.
44. Ko SH, Ryu GR, Kim S, et al. Inducible nitric oxide synthase-nitric oxide plays an important role in acute and severe hypoxic injury to pancreatic beta cells. *Transplantation* 2008; 85: 323.
45. Zhao M, Muiesan P, Amiel SA, et al. Human islets derived from donors after cardiac death are fully biofunctional. *Am J Transplant* 2007; 7: 2318.
46. Markmann JF, Deng S, Desai NM, et al. The use of non-heart-beating donors for isolated pancreatic islet transplantation. *Transplantation* 2003; 75: 1423.
47. Del Río Gallegos F, Nunez Pena JR, Soria García A, et al. Non heart beating donors. Successfully expanding the donor's pool. *Ann Transplant* 2004; 9: 19.
48. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162: 156.

OP-92**Different lung microRNA profiling in human uncontrolled non-heart-beating donors and brain-dead donors**

Alberto Calvo ^a, Yoko Olmedilla ^b, Lisa Rancan ^c, Cruz García ^c, Priya Shahanu ^c, Guzmán López De Hontanar ^c, Sergio D. Paredes ^d, Irene Garcia ^c, José Maria Balibrea ^e

^a Department of Biochemistry and Molecular Biology III, School of Medicine, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain; ^b Service of Endocrinology and Nutrition, Gregorio Marañón University General Hospital, Madrid, Madrid, Spain; ^c Department of Biochemistry and Molecular Biology III, School of Medicine, Complutense University, Madrid, Spain; ^d Department of Physiology, School of Medicine, Complutense University, Madrid, Spain; ^e Service of General Surgery, Vall de Hebron Hospital, Barcelona, Spain

Background: Lung transplantation is the only treatment that can prolong life of patients with end-stage pulmonary disease. The shortage of organs has forced to consider lungs from non-heart-beating donors (NHBD), whose vulnerability to ischemia reperfusion injury (IRI) – the major cause of graft failure after immunological rejection – may be higher than that of normal lungs. The pathophysiological mechanisms of IRI are complex and not fully established. Recent studies observed that alterations in microRNA expression might be involved in the response to IRI suggesting that changes of microRNA expression could be used as a marker of organ injury. The aim of this study was to investigate the expression of some microRNAs in lung biopsies obtained from NHBD and to compare the findings with those obtained from brain-dead donors (BDD). **Material and Methods:** Lung samples from seven NHBD and seven BDD were obtained at the end of cold storage. Samples were analysed for different microRNAs (miR126, miR142-5p, miR223, miR192, miR182, miR155, miR142, miR145, miR107, miR21, miR103, miR152, miR16, and let7) using RT-qPCR. Results were normalized using miR92a. **Result:** The expression Let-7d, miR126, miR182, miR155, miR146 and miR103 was significantly higher in NHBD. By the contrary, miR192 and miR152 expression was higher in BDD. The expression of miR142-5p, miR223, miR145, miR21 and miR16 was similar in NHBD and BDD. **Conclusion:** Our results suggest that microRNAs play a role in the modulation of the cell-injury status of the lungs obtained from NHBD suggesting the possibility that changes in microRNA expression could be used as biomarkers for IRI.

MP-63**Differences on glycocalyx levels and microRNA profiling in pancreas obtained from human uncontrolled non-heart-beating donors and brain-dead donors**

Fernando Huelin ^a, Yoko Olmedilla ^b, Cruz Garcia ^a, Lisa Rancan ^a, Paula Corral ^a, Mario Calvo ^a, Priya Shahanu ^a, José Maria Balibrea ^c

^a Department of Biochemistry and Molecular Biology III, School of Medicine, Complutense University, Madrid, Spain; ^b Service of Endocrinology and Nutrition, Gregorio Marañón University General Hospital, Madrid, Spain; ^c Service of General Surgery, Vall de Hebron Hospital, Barcelona, Spain

Background: Non-heart-beating donors (NHBD) represent a valid alternative for organ transplantation. Grafts from NHBD are exposed to stimuli that trigger immediate inflammatory responses, leading to graft injury that can affect the clinical outcomes. MicroRNAs (miRNAs) can modulate the inflammatory response as well as alterations of glycocalyx integrity. This study aimed to investigate differences in the expression of glycocalyx components and microRNAs between pancreas biopsies obtained from NHBD and from brain-dead donors (BDD). **Material and Methods:** Pancreas samples from human NHBD (n=7) and BDD (n=7) were obtained at the end of cold storage. Protein expression of syndecan 1 (SYND1) and heparan sulphate (HS) was measured by Western Blotting. MicroRNAs (miR126, miR142-5p, miR223, miR192, miR182, miR155, miR142, miR145, miR107, miR21, miR103, miR152, miR16, and let7) were analysed by RT-qPCR and 8-Hydroxyguanine (8-OH-G) by ELISA. **Result:** Pancreas of NHBD showed lower levels of 8-OH-G. High levels of SYND1 were observed in pancreas of NHBD compared to BDD (p<0,01). The expression Let-7d, miR192, miR182, miR145 and miR16 was significantly higher in NHBD whereas miR106, miR103 and miR152 expression was higher in BDD. The expression of HS, miR142-5p, miR223, miR155, miR21, miR146, miR105, miR107 and miR21 was similar in NHBD and BDD. **Conclusion:** Our findings suggest that the pancreas damage generated during the NHBD donation process is acceptable. Although the clinical significance of our findings is unknown - because no correlation between markers expression and graft outcome was performed - they could be influential to consider NHBD as an opportunity to increase the pancreas donor pool.