

Jorge Escartín Valderrama

Efectos del tratamiento con melatonina en el alotrasplante de páncreas en el cerdo

Departamento
Cirugía, Ginecología y Obstetricia

Director/es

García Gil, Francisco Agustín
García García, José Joaquín

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>



Universidad
Zaragoza

Tesis Doctoral

EFECTOS DEL TRATAMIENTO CON MELATONINA EN EL ALOTRASPLANTE DE PÁNCREAS EN EL CERDO

Autor

Jorge Escartín Valderrama

Director/es

García Gil, Francisco Agustín
García García, José Joaquín

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

Cirugía, Ginecología y Obstetricia

2013

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA, GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA

**Efectos del tratamiento con melatonina en el
alotrasplante de páncreas en el cerdo**

Tesis Doctoral presentada por:

Jorge Escartín Valderrama

Directores de la tesis doctoral:

Prof. Dr. Francisco Agustín García Gil

Prof. Dr. José Joaquín García García

Los Dres. D. Fco Agustín García Gil y D. José Joaquín García García

Certifican:

Que D. Jorge Escartín Valderrama, licenciado en Medicina y Cirugía, ha realizado bajo su dirección el presente trabajo de investigación sobre: “EFECTOS DEL TRATAMIENTO CON MELATONINA EN EL ALOTRASPLANTE DE PÁNCREAS EN EL CERDO”, que va a ser presentado como Tesis Doctoral, que han revisado dicho trabajo, estimando que cumple las condiciones científicas y formales que deben serle exigidas.

Zaragoza, a 27 de febrero 2012

Fdo. Dr. D. Fco Agustín García Gil

Fdo. Dr. D. José Joaquín García García

A mi hija, Irene, porque representa el amor de mi esposa, padres y hermano y porque es el mejor ejemplo de que las mejores cosas de la vida vienen sin manual de instrucciones.

AGRADECIMIENTOS

Quiero mostrar mi agradecimiento al profesor y director de esta tesis Dr. Fco Agustín García Gil. Muchas son las razones para ello. Primero, porque como profesor me atrapó con su ilusión por la cirugía. Segundo, como cirujano me ha servido de modelo por su entrega incondicional al trabajo bien hecho. Y tercero, como director de mi Tesis Doctoral, pues sin su ilusión ni su tesón no hubiera sido yo capaz de llevarla a buen puerto.

También deseo mostrar mi gratitud al Prof. José Joaquín García García, Catedrático de Fisiología, codirector de esta Tesis, y a todos los entusiastas colaboradores de su grupo de investigación. Sin su ayuda, este trabajo no se hubiera podido llevar a cabo.

INDICE

I	INTRODUCCIÓN	10
1	DIABETES MELLITUS Y TRASPLANTE DE PÁNCREAS	11
2	LA LESIÓN DE ISQUEMIA-REPERFUSIÓN Y EL RECHAZO AGUDO	15
3	EL ESTRÉS OXIDATIVO/NITROSATIVO	15
4	BASES PARA EL ESTUDIO DE LA ADMINISTRACIÓN DE MELATONINA EN EL TRASPLANTE DE ÓRGANOS	18
II	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	22
II	HYPOTHESIS AND OBJECTIVES	25
III	MATERIAL Y MÉTODOS	28
1	MODELO QUIRÚRGICO	29
1.1	Animales	29
1.2	Procedimiento anestésico	29
1.3	Procedimientos quirúrgicos y preservación del injerto	33
2	CUIDADO GENERAL DE LOS ANIMALES RECEPTORES EN EL POSTOPERATORIO	58
3	DISEÑO EXPERIMENTAL.	58
3.1	Grupos experimentales	58
3.2	Muestras de sangre	59
3.3	Muestras tisulares para estudio del estrés oxidativo	60
3.4	Muestras tisulares para estudio histopatológico	60
4	DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS	61
4.1	Estudio de la función pancreática	61
4.2	Medición de la concentración sérica de la pMAP/ITIH ₄	61
5	ESTUDIO DEL ESTRÉS OXIDATIVO	61
5.1	Cuantificación de MDA+4-HDA	61
5.2	Cuantificación de los restos carbonilo de las proteínas	62
6	EXAMEN HISTOPATOLÓGICO	62

7	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	63
IV	RESULTADOS	65
1	PROCEDIMIENTO ANESTÉSICO	66
2	TIEMPO DE ISQUEMIA	67
3	PESO DE LOS INJERTOS	67
4	SUPERVIVENCIA DEL INJERTO PANCREÁTICO	69
5	FUNCIÓN ENDOCRINA DESPUES DEL TRASPLANTE DE PÁNCREAS	70
6	FUNCIÓN EXOCRINA DESPUES DEL TRASPLANTE DE PÁNCREAS	73
7	CONCENTRACIONES DE MDA y 4-HDA EN LOS INJERTOS PANCREÁTICOS	75
8	CONCENTRACIÓN DE LOS RESTOS CARBONILO EN LOS INJERTOS PANCREÁTICOS	77
9	RESPUESTA DE LA pMAP/ITIH ₄ AL TRASPLANTE DE PÁNCREAS	78
10	ESTUDIO ANATOMOPATOLÓGICO	79
V	RESULTADOS INDIVIDUALIZADOS DE LOS ALOTRASPLANTES DE PÁNCREAS EN EL CERDO	84
VI	DISCUSIÓN	109
	MODELO QUIRÚRGICO EXPERIMENTAL	110
1.	Animal de experimentación	110
2.	Procedimiento quirúrgico	111
3.	Procedimiento anestésico	116
	INFLUENCIA DE LA MELATONINA EN LA EVOLUCIÓN DEL ALOTRASPLANTE DE PANCREAS EN EL CERDO	120
	RESPUESTA DE FASE AGUDA EN EL ALOTRASPLANTE DE PÁNCREAS EN EL CERDO EVALUADA POR LAS CONCENTRACIONES SÉRICAS DE LA pMAP/ITIH ₄ . INFLUENCIA DEL TRATAMIENTO CON MELATONINA	125

OTRAS PROPIEDADES DE LA MELATONINA QUE JUSTIFICAN SU APLICACIÓN EN EL TRASPLANTE DE ÓRGANOS	128
VII CONCLUSIONES	129
VII CONCLUSIONS	132
VIII BIBLIOGRAFÍA	135

ABREVIATURAS

- 4-HDA: 4-Hidroxiálquenos
- AA: Ácido ascórbico
- ADN: Ácido desoxirribonucleico
- AGD: Arteria Gastroduodenal
- AMS Arteria Mesentérica Superior
- ARN: Ácido ribonucleico
- ATP: Adenosín Trifosfato
- CAM: Concentración alveolar mínima
- ERNs: Especies Reactivas del nitrógeno
- EROs: Especies Reactivas de Oxígeno
- EO: Estrés oxidativo
- H₂O₂: Peróxido de hidrógeno
- iNOS: Óxido nítrico sintasa inducible
- IPTR: International Pancreas Transplant Registry
- IR: Isquemia Reperfusión
- IV: Vía intravenosa
- LDP: Lóbulo Derecho del Páncreas
- LIP: Lóbulo Izquierdo del Páncreas
- LMP: Lóbulo Medio del Páncreas
- MDA: Malonildialdehido
- NF-κB: Factor nuclear-kappaB
- •O₂⁻: Anión superóxido
- •OH: Radical hidroxilo
- ON: Óxido nítrico.
- ONOO⁻: Peroxinitrito
- ONT: Organización Nacional de Trasplantes
- PCR: Proteína C-reactiva
- PFA: Proteínas de Fase Aguda
- PL: Peroxidación lipídica
- RL: Radicales libres
- RA: Rechazo agudo

- RFA: Respuesta de fase aguda
- SMP: Segmento Medio del Páncreas
- TC: Tronco Celiaco
- TP: Trasplante de páncreas
- TPDR: Trasplante de páncreas después del trasplante renal
- TPS: Trasplante de páncreas sólo
- TPSR : Trasplante de páncreas simultáneo con el trasplante de riñón
- UW: Universidad de Wisconsin
- VDP: Vasos PancreáticoDuodenales
- VGD: Venas GastroDuodenal
- VPPI: Ventilación a presión positiva intermitente
- VRI: Vena renal izquierda
- VMS: Vena Mesentérica Superior
- XD: Xantina Deshidrogenada
- XO: Xantina-Oxidasa

I INTRODUCCIÓN

1 DIABETES MELLITUS Y TRASPLANTE DE PÁNCREAS

La diabetes mellitus es la principal causa de daño renal crónico y ceguera en adultos y conduce a la amputación de algún miembro o a la impotencia en más casos que ninguna otra enfermedad. La diabetes mellitus tipo I o insulino dependiente es la causa más frecuente de enfermedad crónica en niños.

La diabetes mellitus no es únicamente un desorden en el metabolismo intermedio, es también la causa de lesiones específicas en los vasos sanguíneos y en el sistema nervioso, como la retinopatía, nefropatía o neuropatía. Las descompensaciones agudas metabólicas pueden ser evitadas mediante la administración exógena de insulina y su inyección adecuada, en tiempo y dosis, puede prevenir muchas de las complicaciones. Sin embargo, incluso en pacientes bien controlados, las inyecciones de insulina no siempre consiguen mantener la euglucemia de una forma tan exacta como la secreción de insulina endógena.

El trasplante de páncreas (TP) es un tratamiento eficaz para la diabetes mellitus insulino-depediente. Su función es restaurar la normoglucemia con seguridad aportando suficiente masa de células de islotes de Langerhans. Actualmente el TP es el único tratamiento que proporciona un estado normoglucémico a largo plazo sin requerimiento de inyecciones de insulina y que puede normalizar los niveles de hemoglobina glicada. El TP es el tratamiento de elección para los pacientes diabéticos con fracaso renal terminal (1-3); proporciona, además de una mejora en la calidad de vida, una ayuda para la corrección de las complicaciones secundarias a la diabetes mellitus.

El trasplante de islotes celulares aislados es un tratamiento atractivo y poco invasivo, pero actualmente el trasplante alogénico de islotes no consigue mantener una independencia de la insulina exógena a largo plazo. Los datos muestran que incluso

pacientes que reciben múltiples infusiones de islotes, pocos permanecen euglicémicos, con lo que hoy en día la opción de referencia es el TP completo (4).

Desde el 16 de diciembre de 1966 hasta el 31 de diciembre de 2010 se han presentado más de 35.000 TP en el *International Pancreas Transplant Registry* (IPTR), que incluyen más de 24.000 realizados en los EEUU (5) y 12.000 (6) fuera de los EEUU. El TP en pacientes diabéticos se divide en tres categorías: el TP simultáneo con el trasplante de riñón (TPSR) que supone el 75%, el TP después de un trasplante renal (TPDR) que suma el 18% y el TP sólo (TPS) que es el menos frecuente y que supone el 7%. Actualmente, la tasa de supervivencia del paciente trasplantado es mayor del 95% al año en las tres modalidades de TP.

En nuestro ámbito, según la memoria de actividad de la Organización Nacional de Trasplantes (ONT) (7), en el año 2010 se realizaron 94 TP. Desde 1984, año del primer TP realizado en España, se han practicado un total de 1168 trasplantes. La tasa de TP en nuestro país es de 2 por millón de población, en línea con la media europea y por debajo de cifras de los EEUU (3,9 pmp) y del Reino Unido (3,4 pmp). La insuficiencia renal crónica diabética es la causa más frecuente de indicación correspondiendo al 85 % de los trasplantes. Otras causas son la diabetes mellitus sin insuficiencia renal, el retrasplante y el trasplante multivisceral.

Un aspecto fundamental del TP es el manejo de la secreción exocrina. A diferencia de otros tipos de trasplantes, en el TP sólo una parte del tejido trasplantado se encamina hacia el objetivo, es decir, al aporte continuado de insulina endógena, ya que el componente endocrino de la glándula es menor del 5% y el tejido exocrino más del 95% (8). Sucede que el reemplazamiento exocrino no sólo no es el propósito del TP, sino que además es fuente de importantes complicaciones quirúrgicas postoperatorias. En consecuencia, prevenir estas complicaciones ha sido siempre un tema de preocupación.

A lo largo de la historia del TP se han desarrollado clínica y experimentalmente numerosos métodos de manipulación de la secreción exocrina: ligadura del conducto pancreático (9-14); obliteración del conducto pancreático con diversos polímeros sintéticos tales como neoprene (15-18), prolamina (19, 20), silicona (21) y cianocrilatos (22, 23); drenaje libre del jugo pancreático en la cavidad peritoneal (24, 25); mantenimiento de la secreción exocrina mediante la anastomosis del sistema ductal al estómago (26), esófago (27), uréter (28, 29) y pelvis renal (30, 31).

Estos procedimientos mencionados han sido abandonados y, en la actualidad, prácticamente sólo se utiliza la derivación de la secreción exocrina a vejiga urinaria y a intestino delgado (yeyuno o íleon), con evidente preferencia en los últimos años por la derivación entérica en combinación con el drenaje sistémico del retorno venoso del injerto (32).

El drenaje exocrino a vejiga urinaria ha sido el método preferido en la mayoría de los centros de TP hasta algo más de mediados de los años 90 (32). Nosotros también lo utilizamos experimentalmente en aquella época (33). El procedimiento es seguro, permite la monitorización urinaria de la secreción pancreática encaminada al diagnóstico del rechazo (descenso de las amilasas y lipasas urinarias como marcador de rechazo) (34), proporciona el acceso a la biopsia cistoscópica del injerto, es más accesible a la biopsia percutánea por su emplazamiento en el cuadrante abdominal inferior y facilita el tratamiento conservador de los problemas anastomóticos con la colocación de una sonda vesical (35, 36). Sin embargo, la derivación a vejiga urinaria se asocia con una morbilidad significativa, fundamentalmente por no ser un anastomosis fisiológica, tal como hematuria, infección recidivante del tracto urinario (37, 38), uretritis -irritación genitourinaria-, deshidratación (39), acidosis metabólica secundaria a la pérdida por orina del bicarbonato excretado por el injerto, pancreatitis de reflujo (40,

41) y fuga de anastomosis (35, 42, 43). Se requirió una conversión del drenaje vesical a drenaje entérico en un 9% al año y 17% a los 3 años de los receptores con TP registrados entre los años 2000-2003 (32).

Debido a las mencionadas complicaciones del drenaje a vejiga urinaria y su impacto negativo en la calidad de vida y a los buenos resultados con la conversión entérica después del drenaje vesical, el drenaje exocrino a intestino delgado ha resurgido desde la segunda mitad de los años noventa. Efectivamente, según el IPTR, antes del año 1996 menos del 10% de todos los TP fueron realizados con derivación entérica. Desde entonces, la proporción de este procedimiento se incrementa constantemente de manera que en los años 2002-2003 el 82 % de los TPSR, el 72% de los TPDR y el 57 % de los TPS, se realizaron con derivación entérica de la secreción exocrina y, la mayoría de ellos, con una anastomosis directa del segmento duodenal del injerto al intestino delgado del receptor, es decir, sin asa desfuncionalizada en Y de Roux (32). Se ha señalado una menor incidencia de complicaciones con la duodenoenterostomía directa que con la Y de Roux (44).

El drenaje exocrino a intestino delgado es un procedimiento sencillo, más fisiológico, con menor morbilidad, no presenta las complicaciones metabólicas ni urológicas y no requiere la conversión de la derivación urinaria (42, 45). Los principales inconvenientes incluyen la imposibilidad de monitorizar la amilasa urinaria como marcador de rechazo, una tasa sólo ligeramente superior de abscesos abdominales, aunque con mayor gravedad y difusión intraperitoneal puesto que sucede en un terreno intestinal contaminado y en un injerto con emplazamiento medioabdominal, y menor accesibilidad a las biopsias percutáneas.

2 LA LESIÓN DE ISQUEMIA-REPERFUSIÓN Y EL RECHAZO AGUDO: DOS OBSTÁCULOS DEL TRASPLANTE DE PÁNCREAS

Durante la última década se han alcanzado importantes progresos en el TP debido a los avances en la terapia inmunosupresora, refinamientos en los procedimientos quirúrgicos, mejor tratamiento postoperatorio y mejoras de los protocolos de preservación (2, 3, 32, 46). Sin embargo, la disfunción precoz aguda del injerto todavía representa una morbilidad postoperatoria significativa. La no función primaria del injerto se ha descrito en el 3-5% de los receptores (32); la pancreatitis del injerto, un factor de alto riesgo de trombosis vascular, se ha observado en el 20% de los receptores (47). Además, el rechazo agudo (RA) se sigue produciendo en 13-22% de los TP en los primeros tres meses (48) y es la causa más frecuente de pérdida del injerto entre los días 8 y 30 post-trasplante (49). La no función primaria y la pancreatitis del injerto son dos causas importantes de pérdida del injerto y pueden ser desencadenadas por una grave lesión de isquemia-reperfusión (IR) (50, 51). El daño de IR también puede aumentar la inmunogenicidad del injerto haciéndolo más susceptible al RA ácido ascórbico (52-55). Hasta donde hoy sabemos, una lesión tisular no inmune-específica puede llevar a la aloactivación de células T y, por tanto, inducir la respuesta aloinmune (56).

3. EL ESTRÉS OXIDATIVO/NITROSATIVO: MEDIADOR CLAVE EN LA ISQUEMIA-REPERFUSIÓN Y EN EL RECHAZO AGUDO

La IR inicia una cascada de eventos no inmunológicos antígeno independientes en el injerto. Estos eventos incluyen disfunción de la microcirculación que conlleva un fallo de la perfusión vascular, liberación de mediadores proinflamatorios que provocan la

infiltración de los tejidos con leucocitos, necrosis celular y apoptosis que ponen en peligro la supervivencia del injerto (51, 57). La lesión pancreática por IR también involucra el estrés oxidativo (EO) que surge del desequilibrio entre la producción excesiva de radicales libres (RL) y una insuficiente defensa antioxidante (50, 56, 58). Los mecanismos específicos por los que se produce la formación de RL en la IR no están suficientemente explicados. Sin embargo, se han propuesto varias fuentes potenciales que causan sobreproducción de RL, tales como defectos en la cadena de transferencia de electrones mitocondrial, activación de la xantina/xantina oxidoreductasa y la combustión fagocítica de los leucocitos polimorfonucleares que, por quimiotaxis, se concentran en el área tisular de lesión (57, 59-61).

Hay gran evidencia de que el exceso de producción de especies reactivas del oxígeno (EROs) y del nitrógeno (ERNs) juega un papel fundamental en las alteraciones que se producen durante la reperfusión postisquémica de los órganos trasplantados (51, 56, 62-64). Se ha demostrado también que la isquemia fría promueve la producción de EROs, probablemente debido al daño mitocondrial (65, 66). Durante la isquemia fría se produce descenso del adenosín trifosfato (ATP) celular, degradación del ATP a adenosina, inosina e hipoxantina, y conversión de la xantina deshidrogenasa en xantina oxidasa (62). En la reperfusión, los metabolitos del ATP acumulados sirven como sustrato para la producción y liberación de EROs: la xantina oxidasa en presencia de oxígeno cataliza la degradación de hipoxantina a xantina y ácido úrico y formación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y anión superóxido ($\bullet O_2^-$) (67, 68). A partir de estas dos EROs, en presencia de metales de transición (Fe, Cu), se forma radical hidroxilo ($\bullet OH$) que es un radical libre extremadamente reactivo. El hierro libre o chelatable no es sólo un catalizador de la formación de EROs, sino que también contribuye directamente a la lesión inducida por la hipotermia por mediación de daño mitocondrial y la inducción de

la apoptosis (69-71). El $\cdot\text{OH}$ extrae un átomo de hidrógeno de un ácido graso poliinsaturado de los fosfolípidos de membrana, lo que inicia la peroxidación lipídica (PL), produciéndose una reacción en cadena de oxidaciones sucesivas que se propagan por toda la bicapa lipídica de la membrana (72) (Figura A). El daño de los EROs también se extiende gravemente a las proteínas y a los ácidos nucleicos (73-74). El mecanismo de muerte celular posterior parece ser dependiente del ATP. El ATP es necesario para la ejecución del programa de muerte celular apoptótica, mientras que el completo agotamiento de ATP dará lugar a necrosis (75, 76).

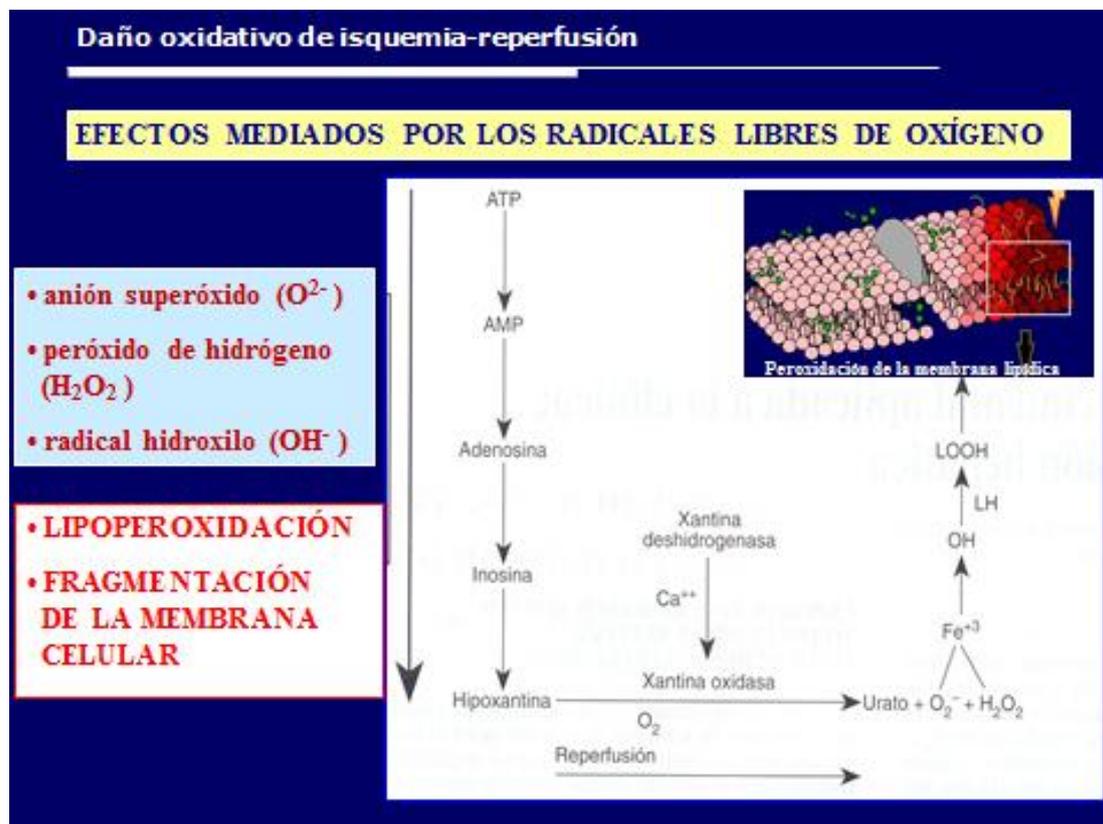


Fig. A. Efectos mediados por los RL derivados del oxígeno.

También se acepta que el estrés oxidativo y nitrosativo ejerce un papel perjudicial en el proceso patogénico del rechazo (77-81). Las EROs y ERNs dañan el aloinjerto, activan el sistema inmune innato tanto del donante como del receptor, e inician e inducen la respuesta adaptativa aloimmune (rechazo agudo) predominantemente a través de las células presentadoras de antígeno (56). Se ha observado experimental y clínicamente que la expresión de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y la generación de óxido nítrico (ON) están incrementadas durante el desarrollo del RA del injerto pancreático (77, 82), renal (83, 84), cardíaco (85-88), hepático (89-93), pulmonar (94) e intestinal (95). El ON, generado en exceso, reacciona con el $\bullet\text{O}_2^-$ para formar ERNs, tal como peroxinitrito (ONOO^-) que tiene efectos tóxicos que conducen a la PL de los fosfolípidos de la membrana celular, oxidación de proteínas y daños en el ácido desoxirribonucleico (ADN) (96). La PL altera la fluidez normal y la permeabilidad de las membranas celulares provocando edema celular, sobrecarga masiva de Ca^{2+} y Na^+ y lisis celular.

Sin duda, la IR es una de las principales cuestiones a resolver en trasplante de órganos y en consecuencia hay un enorme interés en las moléculas antioxidantes que limitan el daño causado por los RL y que pueden prevenir los efectos deletéreos de la IR, incluyendo la PL (78).

4. BASES PARA EL ESTUDIO DE LA ADMINISTRACIÓN DE MELATONINA EN EL TRASPLANTE DE ÓRGANOS

La melatonina (N-acetil-5-metoxi-triptamina) es un derivado indólico del triptófano que se produce en la glándula pineal de los mamíferos. La melatonina tiene influencia en los ritmos biológicos y es, así como sus metabolitos, un importante componente del sistema de defensa antioxidante (97-99). Estas moléculas proporcionan una protección

sustancial frente a los RL generados en una variedad de condiciones experimentales como las lesiones de IR (100-104).

La melatonina es actualmente la única molécula disponible que reúne en sus acciones la capacidad de depurar EROs, como el anión superóxido y el radical hidroxilo, y ERNs, incluyendo el peroxinitrito, así como la capacidad de inhibir enzimas pro-oxidantes como la iNOS, de activar los enzimas antioxidantes a nivel de la expresión ácido ribonucleico (ARN) y de bloquear los factores de transcripción como el factor nuclear-kappaB (NF-kB) que inducen citoquinas proinflamatorias (96). La melatonina también aumenta la eficiencia de la cadena respiratoria disminuyendo la formación de RL y aumentando la síntesis de ATP (105), procesos muy alterados en la fisiopatología de la IR.

La vitamina C o ácido ascórbico (AA) es otro “barredor” de RL y antioxidante ampliamente conocido (106, 107). Gracias a su hidrosolubilidad el AA puede acceder al ambiente acuoso de la célula y por tanto proteger los componentes citosólicos contra el daño oxidativo, pero el hecho de que el AA no sea liposoluble limita su capacidad para proteger la membrana celular. En cambio la melatonina es altamente soluble en lípidos (108), además de poseer una considerable capacidad hidrosoluble (109). Así, la melatonina supera fácilmente las barreras fisiológicas y puede alcanzar una concentración suficiente para proporcionar protección frente a los EROs (97, 98).

La melatonina tiene también propiedades anti-inflamatorias (110, 111). En estudios *in vivo* se ha demostrado que esta indolamina reduce el edema y la peroxidación lipídica causados por pancreatitis aguda inducida por ceruleína o por IR del páncreas (112, 113).

En los últimos años se ha destacado la importante relación de la melatonina con el sistema inmune. Se ha documentado ampliamente la existencia de receptores de membrana y receptores nucleares de melatonina en las células inmunocompetentes y se

han estudiado sus implicaciones (114-122). Se ha evidenciado la síntesis de melatonina por los linfocitos humanos (123). También se ha observado que la melatonina participa en la regulación de la apoptosis de las células T (124) y B (125). En distintos modelos experimentales, la administración exógena de melatonina ha tenido un efecto modulador positivo de la respuesta inmune celular (126), de la respuesta inmune humoral (127), de la producción de citoquinas (128-130) y de la respuesta inmune no específica (131). Estas acciones inmunopotenciadoras de la melatonina han sido más evidentes en situaciones en las que el sistema inmune está deprimido que en situaciones de normalidad (132). Contrariamente, también se ha atribuido a la melatonina una acción inmunosupresora. En estudios *in vitro*, la melatonina ha ejercido un efecto inhibitorio sobre la producción de citoquinas (133) y sobre la proliferación de linfocitos (134). En un modelo de trasplante cardiaco en ratas, el tratamiento con melatonina a dosis elevadas ocasionó un retraso en el advenimiento del RA y una disminución de la respuesta inmune humoral y celular (135). No están claras las razones de estas propiedades aparentemente opuestas de la melatonina sobre la respuesta inmune. En este contexto puede estar implicada la cantidad administrada, dosis bajas serían inmunopotenciadoras y dosis altas ejercerían un efecto contrario inmunodepresor (98, 135, 136).

Debido a que se piensa que la melatonina es un importante modulador del sistema inmune y un antioxidante eficaz, se ha propuesto recientemente la idea de que la melatonina podría aplicarse al trasplante de órganos (70, 98, 137). Sin embargo, la aplicabilidad de la melatonina en el trasplante de órganos ha sido poco estudiada. Hasta el momento sólo se han dado a conocer tres estudios, realizados todos en ratas. En los tres se han observado efectos favorables con la administración de melatonina: 1) retraso en el advenimiento del RA, con prolongación significativa de la supervivencia del

injerto, en un modelo de trasplante cardiaco (135); 2) protección de las lesiones de reperfusión después de isquemia prolongada en un modelo de trasplante ortotópico de pulmón (138); 3) efecto beneficioso sobre la recuperación de la función renal y celular después de la reperfusión e incremento de la supervivencia del receptor en un modelo de trasplante renal (139).

II HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El EO debido a una generación excesiva de RL es una vía fundamental del daño de IR en el trasplante de órganos. La melatonina, una indolamina derivada del triptófano, tiene una potente acción antioxidante a la que se suman propiedades antiinflamatorias e inmunomoduladoras. Nuestro planteamiento se basa en estas acciones de la melatonina que sugieren fuertemente que esta indolamina puede ser de eficacia en la prevención de las lesiones de IR en el trasplante de órganos. Sin embargo, existe poca documentación en este sentido.

En el presente trabajo, evaluamos la eficacia del tratamiento con melatonina en el alotrasplante de páncreas en el cerdo y comparamos sus efectos con el ácido ascórbico, cuyas propiedades antioxidantes son bien conocidas. Este es el primer estudio, salvo mejor conocimiento, sobre la utilidad terapéutica de la melatonina en el TP y en el trasplante de órganos en una especie animal grande, como es el cerdo.

Objetivo principal del estudio.

Evaluar la influencia de la administración de melatonina en la supervivencia del aloinjerto pancreático, estimada por el mantenimiento de la normogluemia.

Objetivos secundarios.

Conocer si la administración de melatonina, en las condiciones experimentales del estudio, conlleva una mejora en:

1. La función endocrina y exocrina del aloinjerto pancreático.
2. La peroxidación lipídica del daño oxidativo de IR evaluada por las concentraciones tisulares en el injerto pancreático de malonildialdehído (MDA) + 4-hidroxiálquenos (4-HDA), productos finales de la peroxidación lipídica.
3. La oxidación de las proteínas de la membrana celular según las concentraciones tisulares en el injerto pancreático de restos carbonilo de las proteínas.

4. La respuesta de fase aguda al alotrasplante de páncreas en el cerdo cuantificada por las concentraciones séricas de la pMAP/ITIH₄, una proteína de fase aguda positiva dependiente de la IL-6 (tipo II).

II HYPOTHESIS AND OBJECTIVES

Oxidative stress, due to the production of free radicals and/or reactive oxygen species, is known to be one of the main causes of ischemia-reperfusion injury during organ transplantation. Melatonin, an indol derivative from tryptophan, has a strong antioxidant activity, but also some anti-inflammatory and immunomodulation properties. Our approach is based on these properties of melatonin, which suggest that can be effective in the prevention of I-R injury in organ transplantation. Nevertheless, we hardly have found data about this fact.

In this study, we have evaluated the effectiveness of melatonin in a model of pancreas allotransplantation in pigs. We have compared the effects of melatonin with those the ascorbic acid, a well-known antioxidant drug. As far as we know, this is the first research about the therapeutic use of melatonin in pancreas transplantation and, also, in the use in organ transplantation in big animals, such as pigs.

Main objective

To evaluate the influence of the administration of melatonin in the survival rate of the pancreatic allograft in pigs, estimated by measuring the level of glycaemia.

Other objectives

To determinate if the administration of melatonin in experimental conditions leads to an improvement in:

1. Exocrine and endocrine function of the pancreatic graft.
2. Lipid peroxidation due to I-R injury, estimated by the tissue concentrations in the pancreatic graft of malondialdehyde (MDA) and 4-hydroxyalkenals (4-HDA), as end products of lipid peroxidation.
3. Oxidation of the cell membrane proteins by determination of carbonyl groups of the proteins.

4. The acute-phase response to the pancreas allotransplantation in pigs, quantified by serum concentrations of pMAP/ITI_{H4}, an interleukin 6 (IL-6)-dependent acute-phase protein (type II).

III MATERIAL Y MÉTODOS

1 MODELO QUIRÚRGICO

1.1 Animales

Hemos utilizado 48 cerdos Landrace hembras (24 donantes y 24 receptores) de 40 ± 5 kg de peso para realizar 24 alotrasplantes de páncreas con derivación entérica de la secreción exocrina y drenaje venoso sistémico.

Todos los procedimientos se llevaron a cabo bajo Licencia del Proyecto PI036/09 aprobado por Comisión Ética Asesora para la Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza. El cuidado y uso de los animales se realizaron de acuerdo con la Política Española de Protección de los Animales RD1201/05, que cumple con la normativa de la Unión Europea (*Directive* 86/609/EEC) sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos.

1.2 Procedimiento anestésico

1.2.1 Evaluación preoperatoria

La fase experimental se llevó a cabo en las instalaciones de la Unidad Mixta de Investigación de la Universidad de Zaragoza.

La evaluación preoperatoria se llevó a cabo valorando el estado de salud de los cerdos, mediante el registro de los siguientes parámetros fisiológicos: temperatura rectal, frecuencia cardíaca, color de las mucosas, tiempo de relleno capilar, peso corporal y auscultación torácica, evaluando tanto la frecuencia como la profundidad de la respiración. Los valores de los parámetros fisiológicos resultaron ser normales, dentro de los límites fisiológicos de la especie porcina, en todos los animales. Se sometió a los mismos a un ayuno previo de 12 horas para sólidos y 6 horas para líquidos.

1.2.2 Premedicación anestésica

Debido al difícil manejo de los animales, y a la imposibilidad de cateterizar una vía periférica sin una sedación previa, la premedicación para lograr una inmovilización farmacológica de los mismos se realizó en la jaula de estabulación mediante la administración intramuscular de los siguientes fármacos:

- Tiletamina-zolazepam, (Zoletil®), a dosis de 3,5 mg/kg; y
- Medetomidina, (Domtor®), a dosis de 0,03 mg/kg.

Estos fármacos se asociaron a atropina (Atropina Braum®) 0,02 mg/kg, para evitar el exceso de secreción salivar, bradicardia y arritmias cardíacas durante la anestesia. La administración se realizó con una jeringa conectada a una aguja hipodérmica con prolongador, para evitar la movilidad de la misma durante la inyección intramuscular en la región cervical posterior del animal.

Una vez conseguida la inmovilización y decúbito lateral del animal (5-10 minutos), se procedió a su traslado hasta la mesa de quirófano para realizar el acceso a venas periféricas. Para evitar la hipotermia y prevenir la aparición de piasias o úlceras cutáneas por decúbitos prolongados durante la intervención, se colocó al cerdo en decúbito dorsal sobre un lecho mullido con una manta eléctrica.

1.2.3 Cateterización intravenosa

La punción se realizó en la vena auricular de la cara dorsal de la oreja, con catéteres intravenosos (Abbocatt®) de calibre 18-20 G. Tras cateterizar la vía, ésta se fijó con cinta adhesiva para evitar su salida accidental y se conectó a una llave de tres vías y línea de infusión para la administración de fluidoterapia y fármacos.

1.2.4 Intubación endotraqueal y anestesia inhalatoria

A los 10 minutos de la premedicación, se procedió a la intubación de cada animal, con tubos endotraqueales de los números 7-7,5, ayudados de laringoscopio con pala recta de Miller del nº 3, y en posición de decúbito prono. Si fuese necesario, se emplearía una dosis reducida de propofol para completar las maniobras de intubación. Se procedió a inflar el balón de neumotaponamiento y se fijó el tubo con cinta adhesiva. Posteriormente el tubo se conectó a un circuito circular cerrado de un sistema de anestesia general (mod. Aestiva/5, Datex-Ohmeda) equipado con ventilador mecánico. Se administró sevoflurano a 0,75 veces la concentración alveolar mínima (CAM), $Et_{SEVO} = 2,0\%$, en oxígeno, con su vaporizador específico (Sevotec, Datex-Ohmeda), en un flujo de gas fresco de 2 l/min.

1.2.5 Fluidoterapia y analgesia intraoperatoria

La analgesia intraoperatoria se proporcionó mediante la administración intravenosa de un bolus de 2 mcg/kg de fentanilo (Fentanest ®), seguido de una infusión intravenosa continua a dosis de 4,5-6,5 mcg/kg/hora, cubriendo los requerimientos necesarios y manteniendo la frecuencia cardiaca y la presión arterial media dentro de los límites considerados como normales.

Durante la intervención se administró la fluidoterapia adecuada con solución ringer lactato (Ringer Lactato, B/Braun ®) a un ritmo de infusión de 10 ml/kg/hora.

1.2.6 Ventilación mecánica

Se instauró la ventilación a presión positiva intermitente (VPPI), fijando la frecuencia respiratoria en el ventilador (modelo 7100, Datex-Ohmeda) a 10 resp/min, con una relación inspiración:expiración de 1:2, con una presión media en vías aéreas de 6 cm H₂O, y variando el volumen tidal para mantener estables los valores de saturación de

oxígeno en hemoglobina (95-100 %) y normocapnia (34-36 mm Hg) durante todo el periodo anestésico.

1.2.7 Monitorización anestésica

Se procedió a la instalación y monitorización completa de cada animal, tanto de los parámetros cardiacos y hemodinámicos (frecuencia cardiaca, electrocardiograma, presión arterial), como respiratorios (frecuencia respiratoria, volumen minuto y tidal, saturación de oxígeno en hemoglobina, fracción inspirada de oxígeno y fracción espirada de dióxido de carbono), que fueron registrados por un monitor de parámetros cardiorrespiratorios (Cardiocap/5, Datex-Ohmeda) (Tabla 1). La monitorización de la dosificación de sevoflurano se realizó mediante la concentración final espirada del mismo. Otro parámetro monitorizado durante el periodo anestésico fue la temperatura rectal.

Se realizó la aspiración gástrica continua mediante una sonda gastroesofágica colocada por vía oral.

La cirugía se inició con la cateterización de la vena yugular externa en el lado derecho, para mantener una vía venosa permeable durante todo el periodo de seguimiento del animal en el postoperatorio y extracción de muestras de sangre.

1.2.8 Fin de la anestesia y analgesia postoperatoria

Al finalizar la intervención, se cerró el vaporizador de sevoflurano, cesando la anestesia. Durante la recuperación inmediata, se procedió a la extubación tras comprobar que respiraba espontáneamente y mantenía una ventilación y una saturación adecuadas.

Para continuar la analgesia durante el periodo postoperatorio, se administró buprenorfina a dosis de 10 mcg/kg a los 15 minutos antes de cerrar el vaporizador y

finalizar la infusión de fentanilo y, posteriormente, se colocó un parche transdérmico de buprenorfina (Transtec® 35 mcg/h) en la región cervical posterior.

A continuación se trasladó a la jaula de estabulación individual en el animalario, donde tuvo lugar la recuperación postoperatoria en condiciones de luminosidad y homeotermia adecuadas.

Tabla 1: parámetros fisiológicos a mantener durante la anestesia

Parámetros	
<i>Frecuencia cardiaca</i>	50-160 latidos/minuto M
<i>Frecuencia respiratoria</i>	8-15 respiraciones /minuto
<i>Saturación O₂</i>	95-100%
<i>Volumen Tidal corriente</i>	10 ml/kg T
<i>Volumen minuto</i>	4,5/7,5 l/min
<i>Relación inspiración/expiración</i>	1:2, 1:3
<i>Presión en vías aéreas</i>	Máxima 15-20 cm de agua
	Mínima 1 cm de agua
	Media 5-8 cm de agua
<i>Et CO₂</i>	34-36 mm Hg
<i>FiO₂</i>	85-99
<i>Temperatura</i>	36-39 grados centígrados
<i>Presión de insuflación</i>	15-20 cm de agua

1.3 Procedimientos quirúrgicos y preservación del injerto

1.3.1 Intervención en el donante

Del animal donante extraemos en bloque un injerto pancreático-duodenal que comprende la totalidad del páncreas, un segmento del duodeno con la desembocadura de los conductos pancreáticos, un parche de aorta que incluye el tronco celíaco (TC) y la arteria mesentérica superior (AMS) con las ramas que irrigan el injerto (arteria esplénica, arteria hepática común, arteria gastroduodenal (AGD) y arterias pancreático-

duodenales superiores e inferiores), y el drenaje venoso constituido por las venas mesentérica superior, esplénica y porta.

Incisión. Se aborda la cavidad peritoneal a través de una laparotomía media suprainfraumbilical (Figura 1).

Preparación del injerto a nivel del hilio hepático. Manteniendo levantada la cara ántero-inferior del hígado, se expone el hilio hepático (Figura 2)

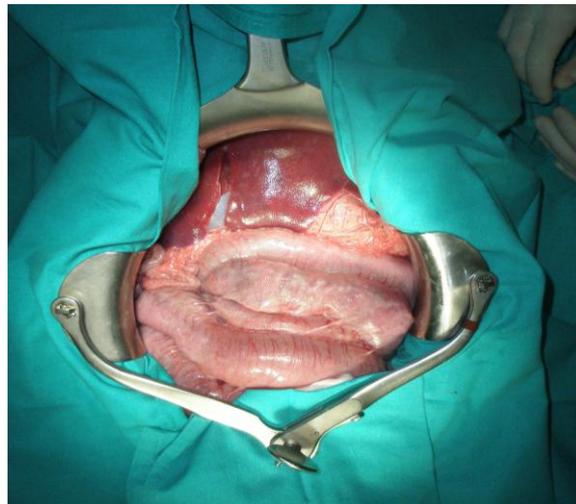


Fig. 1. Aspecto de la cavidad abdominal porcina tras la laparotomía

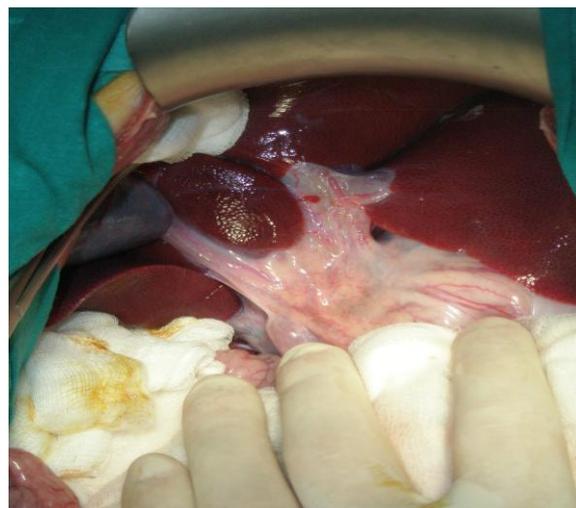


Fig. 2. Exposición del hilio hepático

Se disecciona el colédoco (Figura 3) que se secciona entre ligaduras de seda 2/0 en la proximidad del borde superior del duodeno (Figura 4).

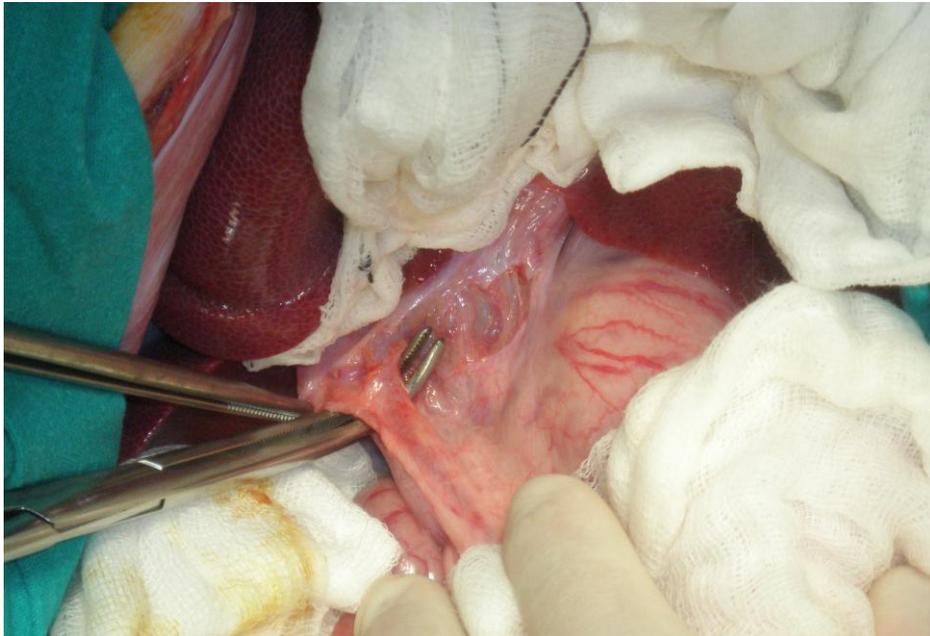


Fig. 3. Disección del colédoco en el hilio hepático

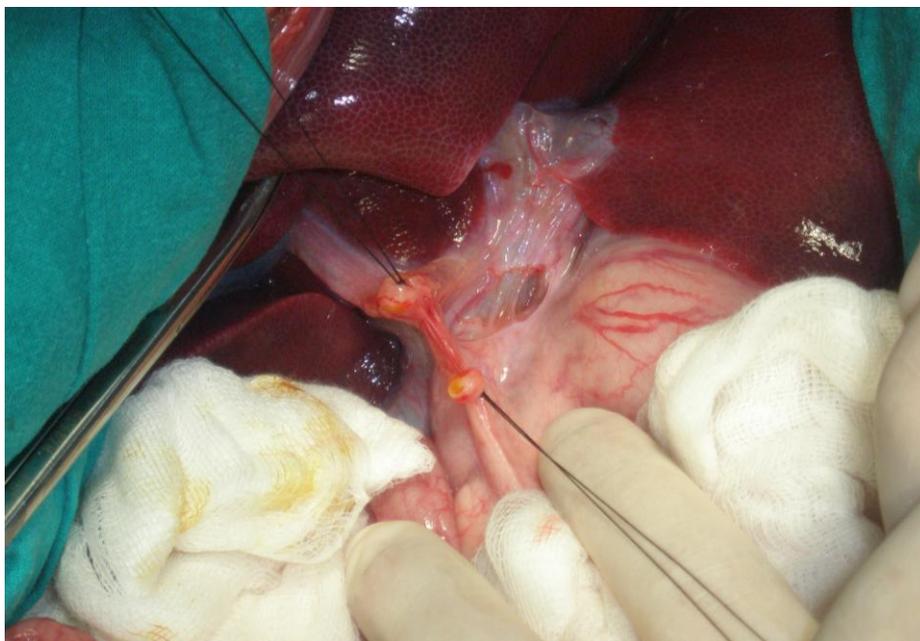


Fig. 4. Sección del colédoco entre ligaduras

Se liberan y seccionan entre ligaduras de seda 3/0 las ramas de la arteria hepática propia (Figura 5) y las ramas que desde esta arteria se dirigen hacia la curvatura menor del

estómago. Es imprescindible conservar AGD ya que de ella depende fundamentalmente el riego del duodeno y del lóbulo derecho del páncreas. Se disecciona la vena porta (Figura 6) en la proximidad del hígado, con cuidado de preservar la vena gastroduodenal (VGD). Se ha de ligar también una pequeña rama arterial que transcurre por la cara posterior de la porta.

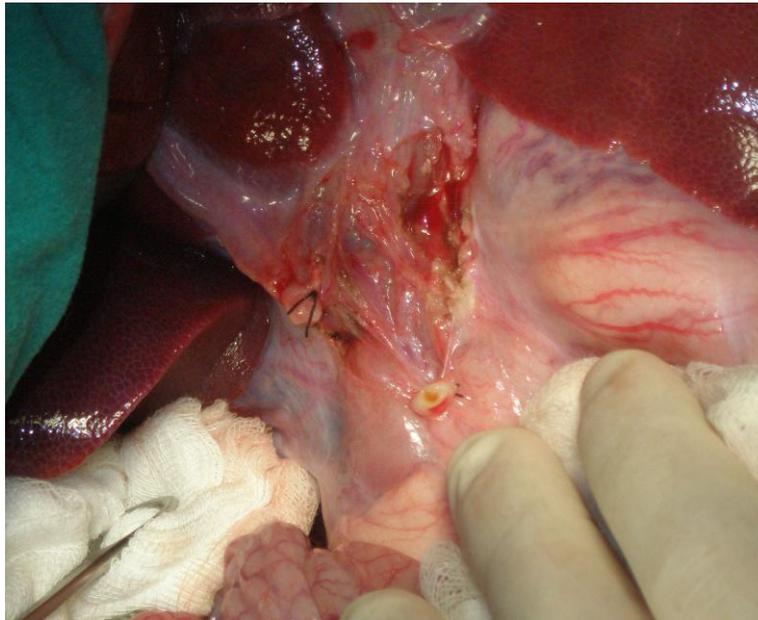


Fig. 5. Disecación de las ramas de la arteria hepática propia previamente a su ligadura

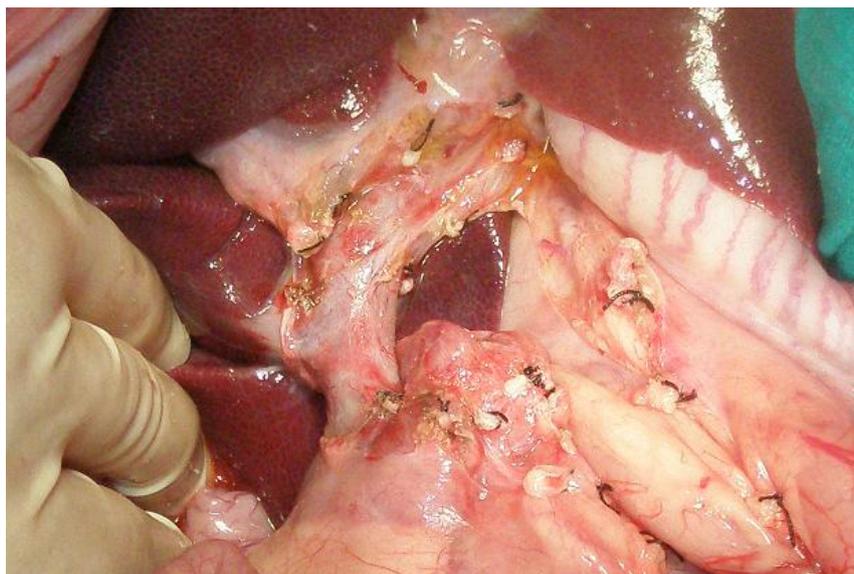


Fig. 6. Se han seccionado las ramas de la arteria hepática propia. Se ha diseccionado la vena porta. La preparación del injerto a nivel del hilio hepático ha quedado ultimada.

Preparación del cuerpo y cola (lóbulo izquierdo) del páncreas y su vascularización.

El lóbulo izquierdo del páncreas (LIP) es largo y se extiende transversalmente de izquierda a derecha desde la proximidad del hilio esplénico hasta la vena mesentérica superior. En una anatomía comparada, el LIP porcino correspondería al cuerpo y cola del páncreas humano.

Traccionando del estómago cranealmente, del colon transversal en sentido caudal y del bazo, que es muy grande, alargado y móvil, hacia la izquierda, se ponen tensos los epiplones gástrico y gástricoesplénico (Figura 7) que son finos, tenues, carentes de grasa, por lo que siendo transparentes dejan ver a su través el páncreas. Se secciona el epiplon mayor, así como los vasos gastroepiplóicos izquierdos y los vasos gástricoesplénicos (vasos cortos) para acceder al LIP, que yace fijo a la pared dorsal de la cavidad abdominal (Figura 8), adherido a las estructuras adyacentes por finísimas capas avasculares de tejido conjuntivo.

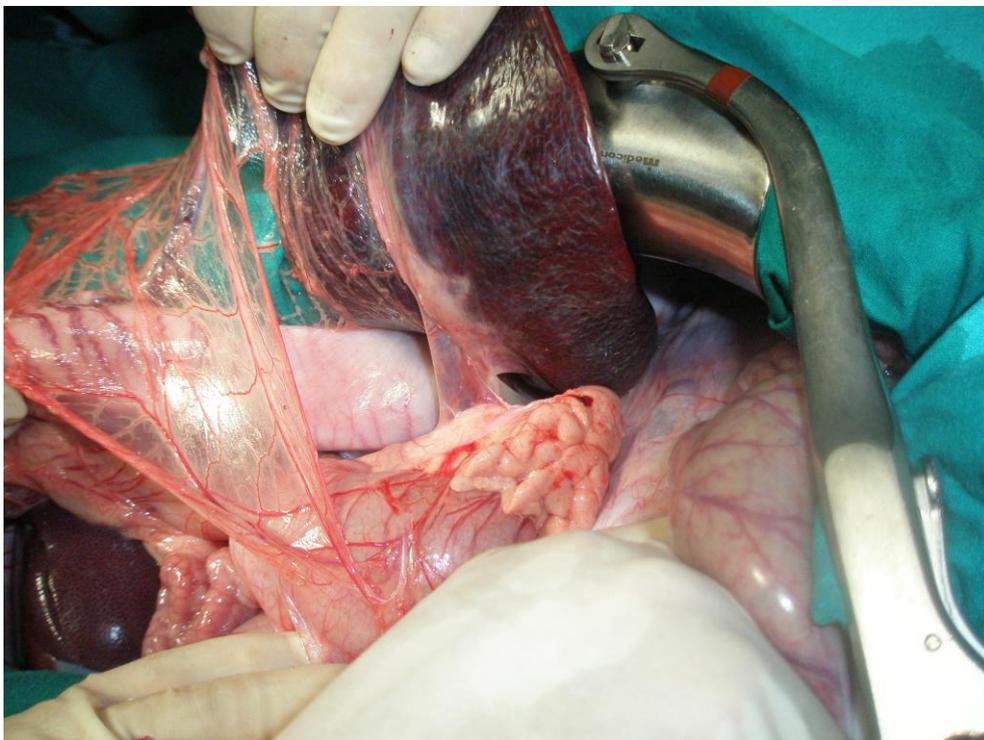


Fig. 7. Epiplon gástrico y gástricoesplénico. Bazo. Lóbulo izquierdo del páncreas.

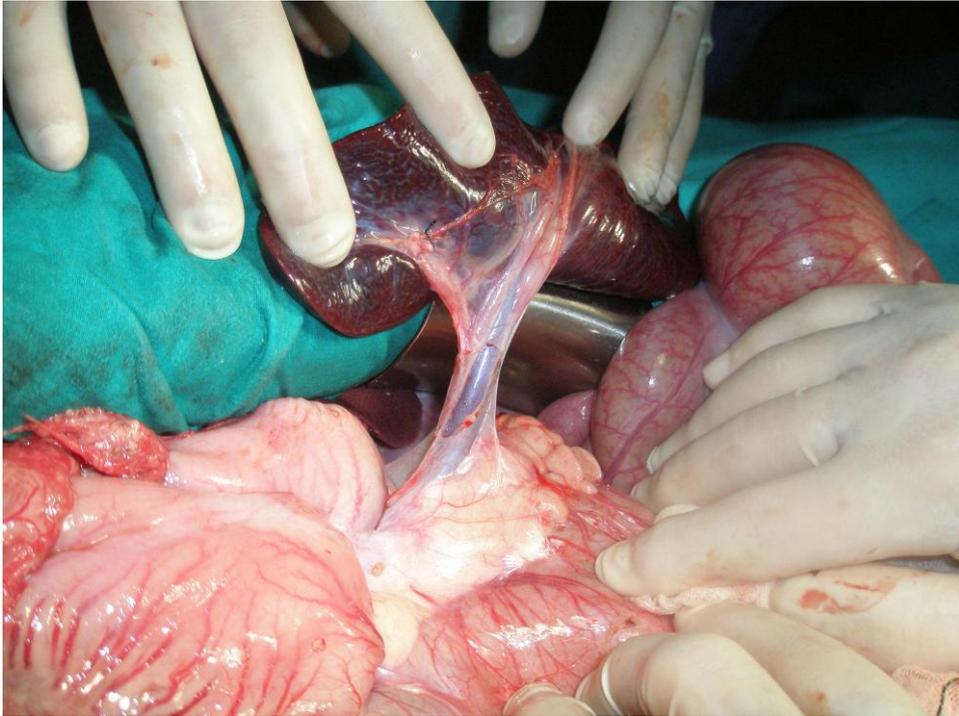


Fig. 8. Bazo, ya liberado, con los vasos esplénicos en su hilio. El lóbulo izquierdo del páncreas yace fijo en la pared abdominal dorsal.

En el hilio esplénico se disecan y seccionan entre ligaduras la arteria (Figura 9) y la vena esplénicas por separado (Figuras 10). De esta manera queda ultimada la esplenectomía y libre el extremo izquierdo del páncreas.

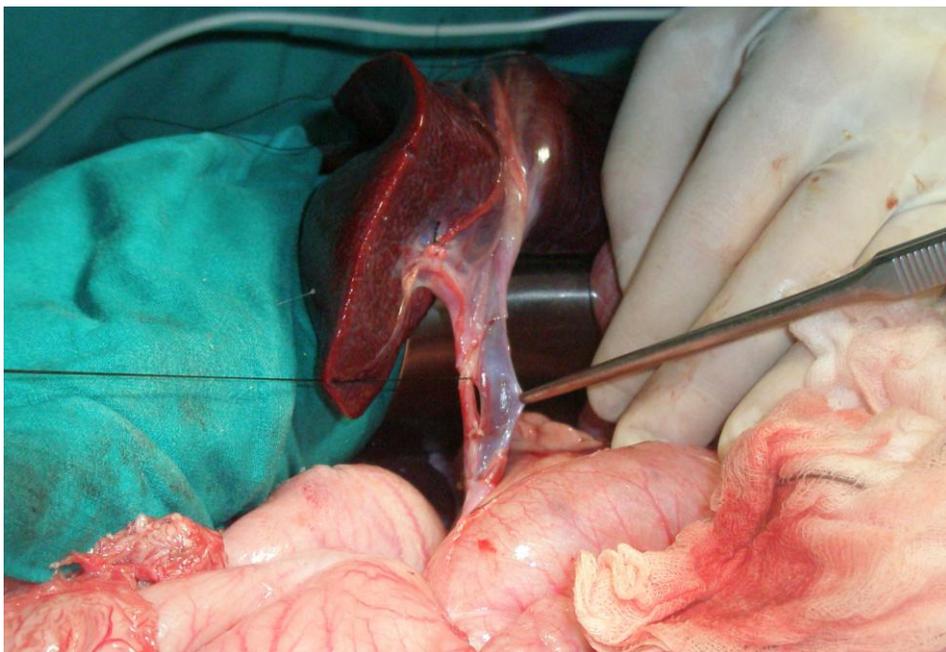


Fig. 9. Ligadura, para su sección, de la arteria esplénica.

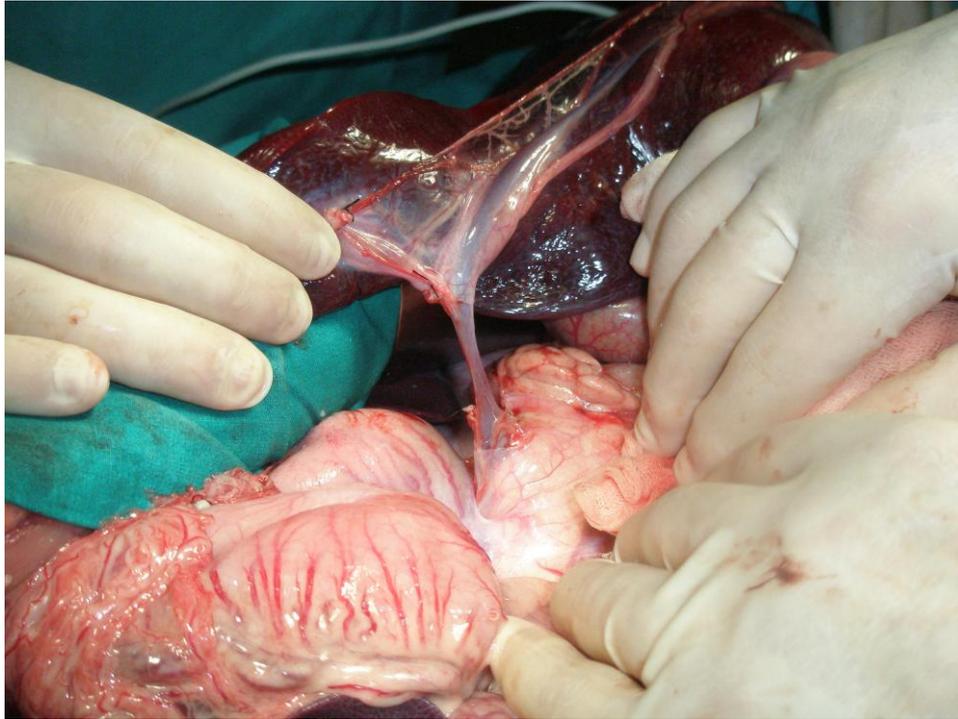


Fig. 10. Vena esplénica después de la sección de la arteria esplénica.

Se libera, a continuación, el LIP seccionando las finas conexiones que lo fijan al colon y al retroperitoneo, especialmente en la proximidad de la glándula suprarrenal izquierda. A este nivel, rechazando delicadamente el LIP hacia la izquierda, se identifica y libera el TC, se secciona el plexo celíaco adyacente al mismo y se disecciona y circunda la aorta abdominal cranealmente al TC. Distalmente se identifica y libera la vena renal izquierda (VRI); su borde superior está en íntima relación con la AMS. Con precaución, se deben separar VRI y AMS y a nivel del espacio interpuesto, distalmente a la AMS, se disecciona y circunda la aorta abdominal. De esta manera, la aorta abdominal queda preparada para ser seccionada por encima del TC y por debajo de la AMS en el momento final de la extracción del injerto (Figura 11). Se deja descansar el LIP en su posición anatómica (Figura 12).

Traccionando al cémit del estómago, se ponen tensos los llamados vasos diverticulares que discurren verticalmente entre el fundus gástrico y los vasos esplénicos a nivel de la

parte medial del LIP. Se liberan los vasos diverticulares del abundante tejido conjuntivo y linfograso que los cubre y luego se seccionan entre ligaduras (Figura 13).

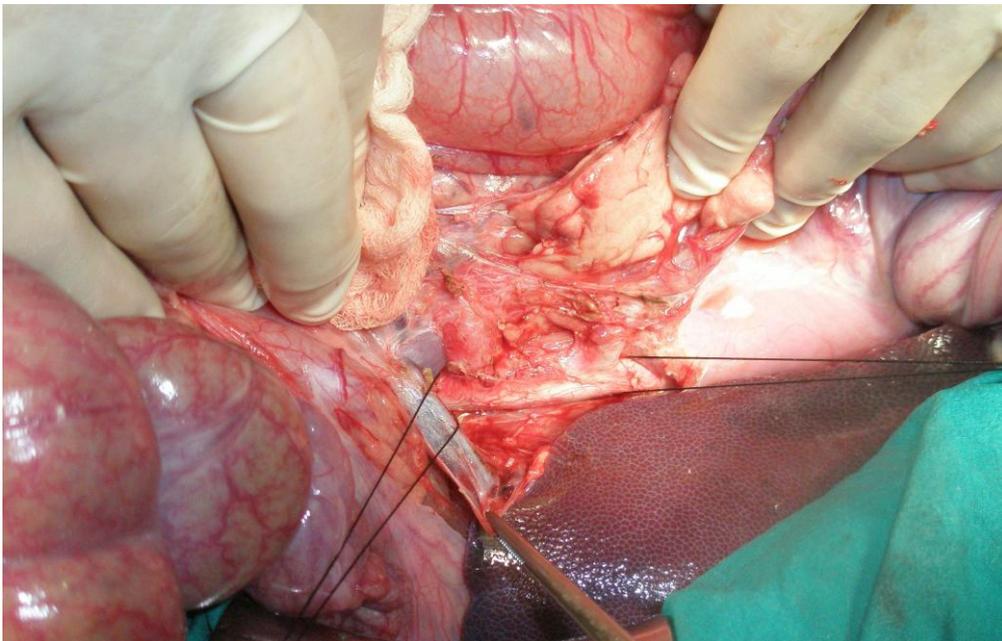


Fig. 11. Aorta abdominal circundada por encima del tronco celiaco y por debajo de la arteria mesentérica superior. Se observa la relación de esta arteria con el borde superior de la vena renal izquierda. El lóbulo izquierdo del páncreas se ha rechazado hacia la izquierda.

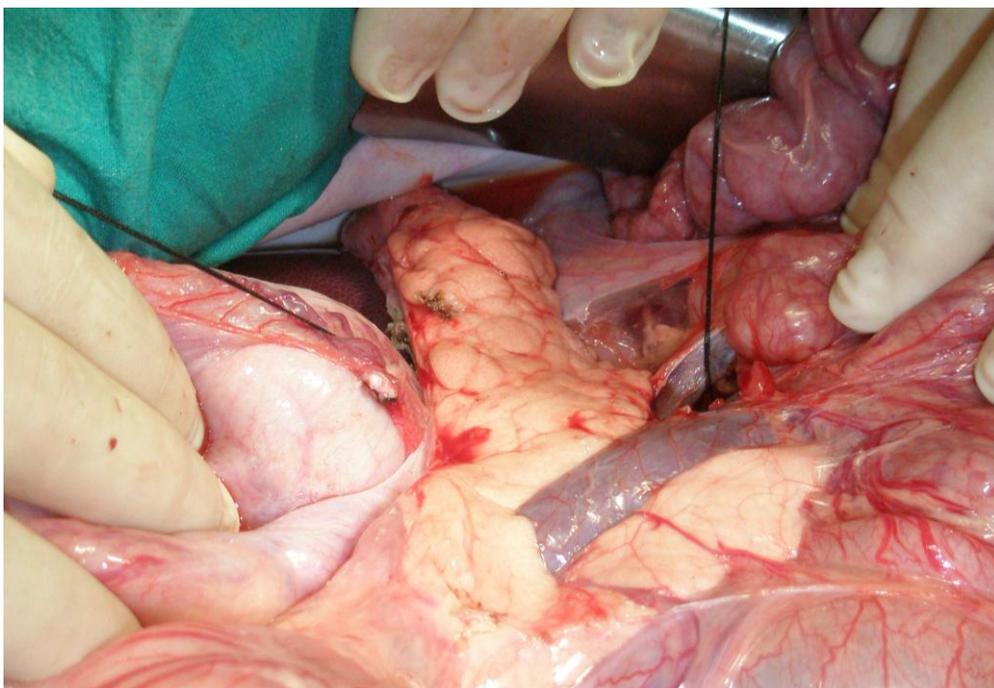


Fig. 12. Lóbulo izquierdo del páncreas en su posición anatómica normal.

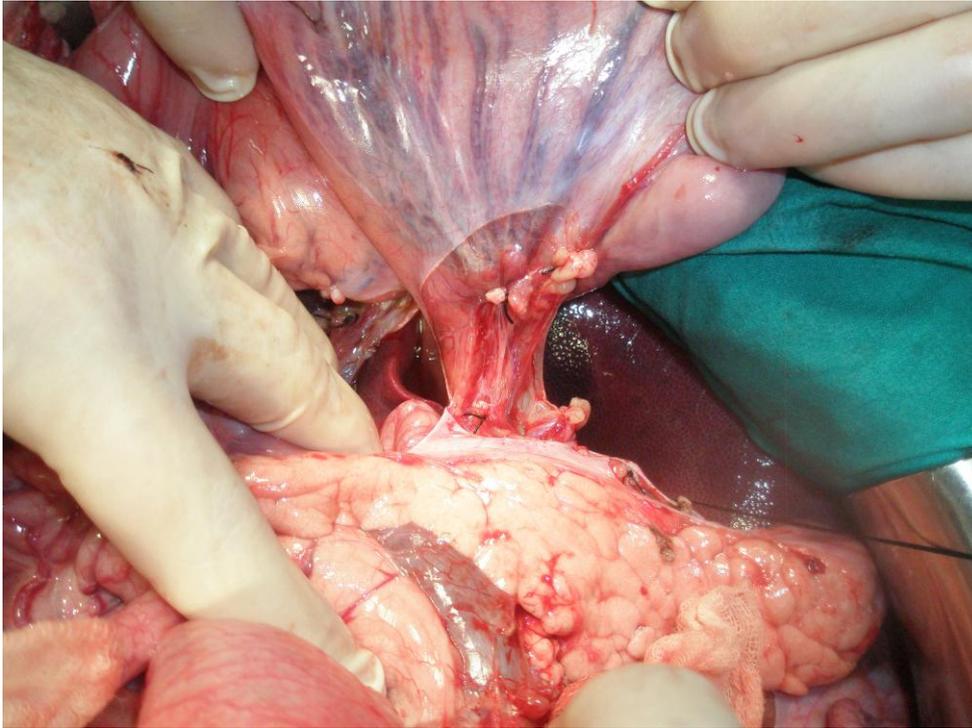


Fig. 13. Diseción, ligadura y sección de los vasos diverticulares que desde los vasos esplénicos se dirigen hacia el fundus gástrico.

Preparación de los lóbulos derecho y medio del páncreas y su vascularización

El lóbulo derecho del páncreas (LDP) es pequeño, continuación del segmento medio del páncreas (SMP) (istmo pancreático en anatomía humana) y sigue el borde mesentérico de la segunda porción duodenal, que es móvil e intraperitoneal. El LDP está unido al lóbulo medio del páncreas (LMP) por un meso translúcido por el que discurren los vasos pancreaticoduodenales (VPD). Estos vasos van dando ramitas para el duodeno y para el parénquima pancreático; seccionando estas ramitas, puede separarse el páncreas del duodeno sin comprometer la irrigación e integridad de la pared duodenal. Los VPD superiores se continúan de manera inaparente con los VPD inferiores que discurren por el meso antes mencionado se dirigen hacia la AMS y VMS.

El LMP, más corto y grueso que el LIP, y en cierto modo verticalizado, se extiende desde el SMP hasta el final de la tercera porción duodenal. El LMP por su cara medial está en contacto prácticamente en toda su longitud con la VMS (Figura 14). Por su cara

lateral se relaciona con la vena cava inferior infrahepática, glándula suprarrenal derecha y VRI de las que puede separarse a través de un buen plano de clivaje (Figura 15). El LDP y el LMP corresponderían a la cabeza del páncreas y al proceso uncinado respectivamente en el hombre.

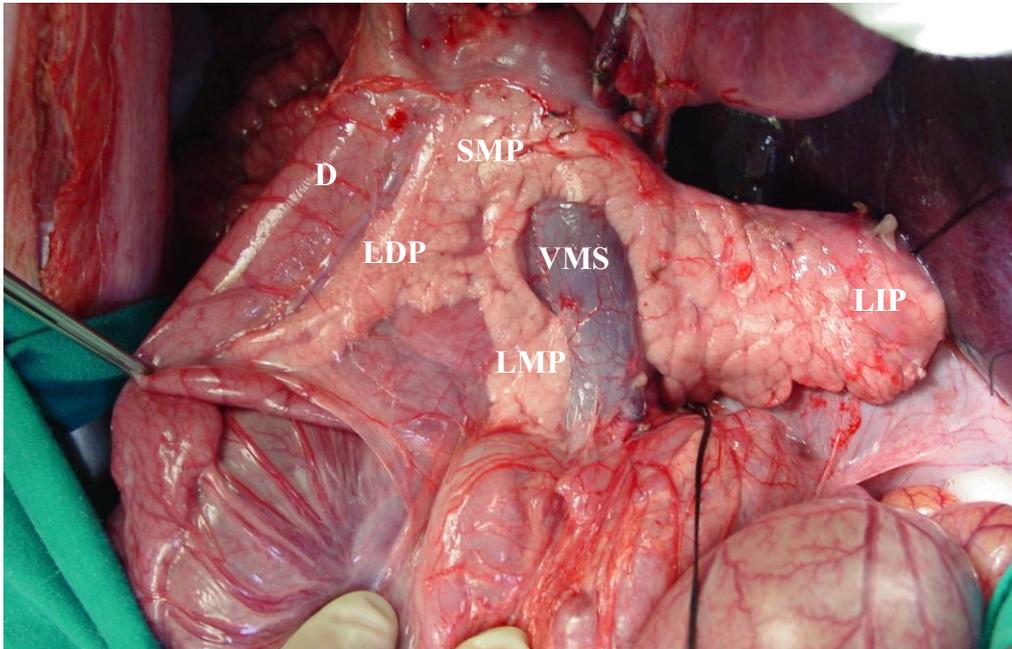


Fig. 14. Anatomía del páncreas porcino. LIP: lóbulo izquierdo pancreático. SMP: segmento medio (istmo) del páncreas. LDP: lóbulo derecho pancreático. LMP: lóbulo medio del páncreas. D: duodeno. VMS: vena mesentérica superior.

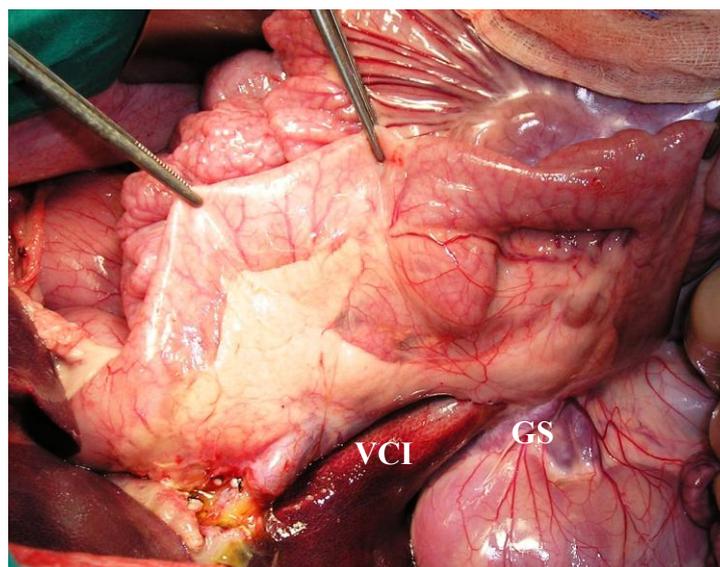


Fig. 15. Relaciones de los lóbulos derecho y medio del páncreas con estructuras vecinas. GS: glándula suprarrenal derecha; VCI: vena cava inferior.

La preparación del injerto pancreático-duodenal se prosigue con la adecuación del LDP y LMP. Se secciona el meso que une estos dos lóbulos y se ligan y seccionan los vasos pancreático-duodenales a nivel de la confluencia distal del LDP y el duodeno.

El LMP se libera por su borde inferior mediante sección del peritoneo parietal posterior, y se separa sucesivamente de la glándula suprarrenal derecha, vena cava inferior infrahepática y VRI. Asimismo, se separa su extremo más caudal de la tercera porción del duodeno.

La liberación del LMP se completa mediante la sección entre ligaduras de las primeras ramas arteriales y venosas yeyunales (Figura 16). También se disecan la AMS y la vena mesentérica superior (VMS) en 1-2 cm por debajo del borde caudal del LMP (Figuras 17). De esta manera queda preparado este lóbulo con la AMS hasta su origen en la aorta y la VMS.

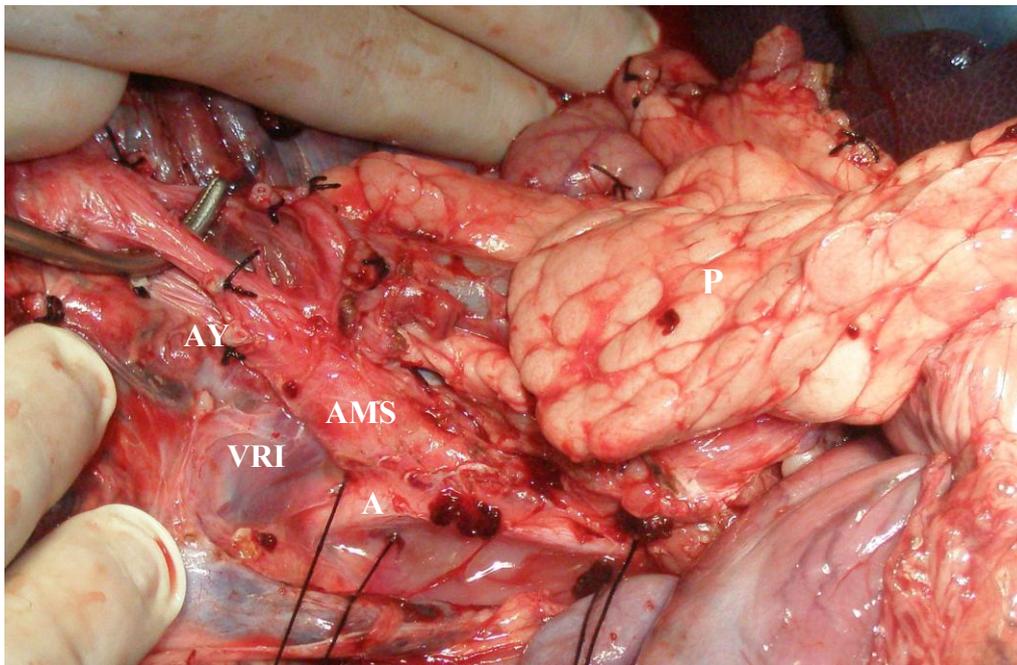


Fig. 16. Ligadura y sección de las ramas arteriales yeyunales para liberar en bloque el lóbulo medio del páncreas con la AMS y sus ramas pancreáticas.
A: aorta. AMS: arteria mesentérica superior. AY: arteria yeyunal. VRI: vena renal izquierda. P: páncreas.

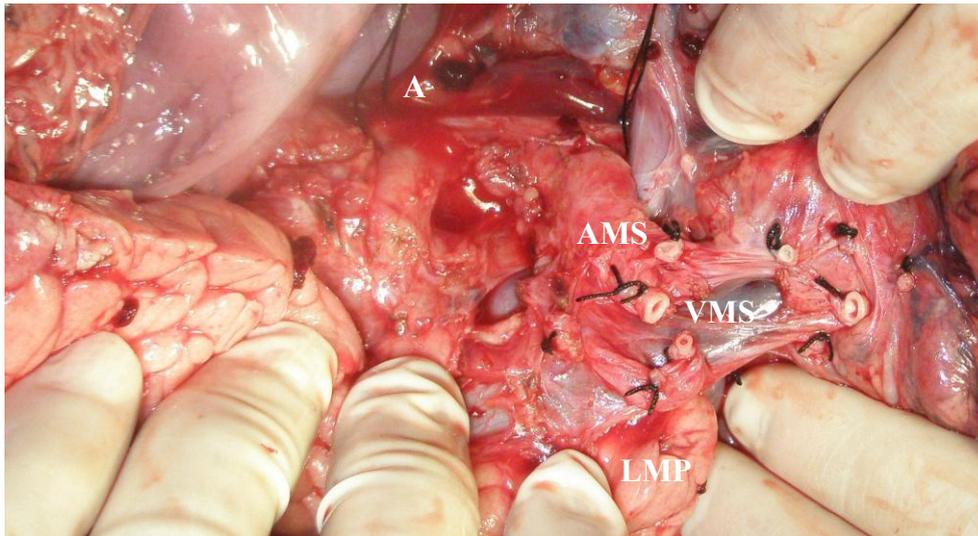


Fig. 17. Diseción de la arteria mesentérica superior (AMS) y vena mesentérica superior (VMS), 1-2 cm distalmente al lóbulo medio pancreático LMP

Preparación del segmento duodenal incluido en el injerto

Ultimada la liberación del páncreas, se secciona distalmente el duodeno en el lugar donde se ligaron los vasos pancreático-duodenales inferiores, en la confluencia del LDP y el duodeno. El cabo duodenal se cierra mediante sutura continua de seda 3/0 (Figura 18). Se ligan y seccionan los vasos pilóricos y gastroepiplóicos derechos duodeno inmediatamente por debajo del píloro. A este nivel se secciona el duodeno y se cierra su cabo con sutura continua seda 3/0 (Figura 19). El duodeno queda unido en bloque al SMP y LDP, incluyendo en su luz el abocamiento de los conductos pancreáticos.

Extracción del injerto

Se administra heparina sódica por vía intravenosa (IV) a dosis de 3 mg/kg de peso antes del clampaje y sección de las estructuras vasculares principales.

Para obtener el injerto pancreático duodenal no queda sino seccionar los pedículos vasculares: la AMS y la VMS caudalmente al LMP, un segmento de la aorta abdominal que incluye el TC y la AMS y la vena porta en la proximidad del hígado.

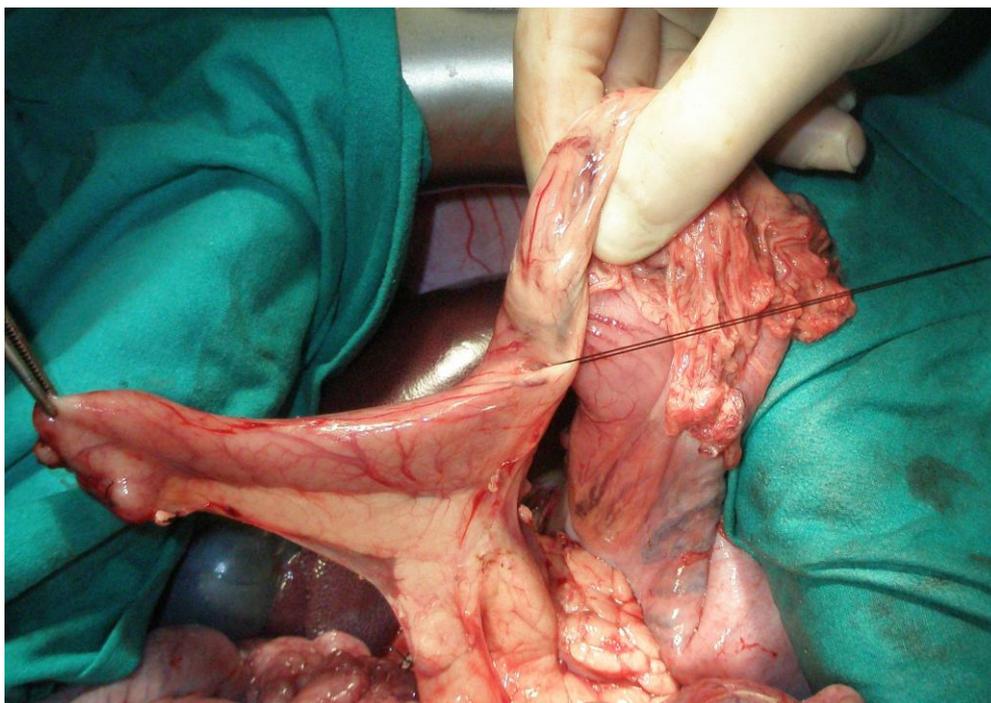


Fig. 18. Extremo distal del duodeno seccionado y suturado, donde están ligados los vasos pancreático-duodenales inferiores. Debajo del píloro, se han preparado los vasos gastroepioplícos derechos para su inmediata ligadura y sección.

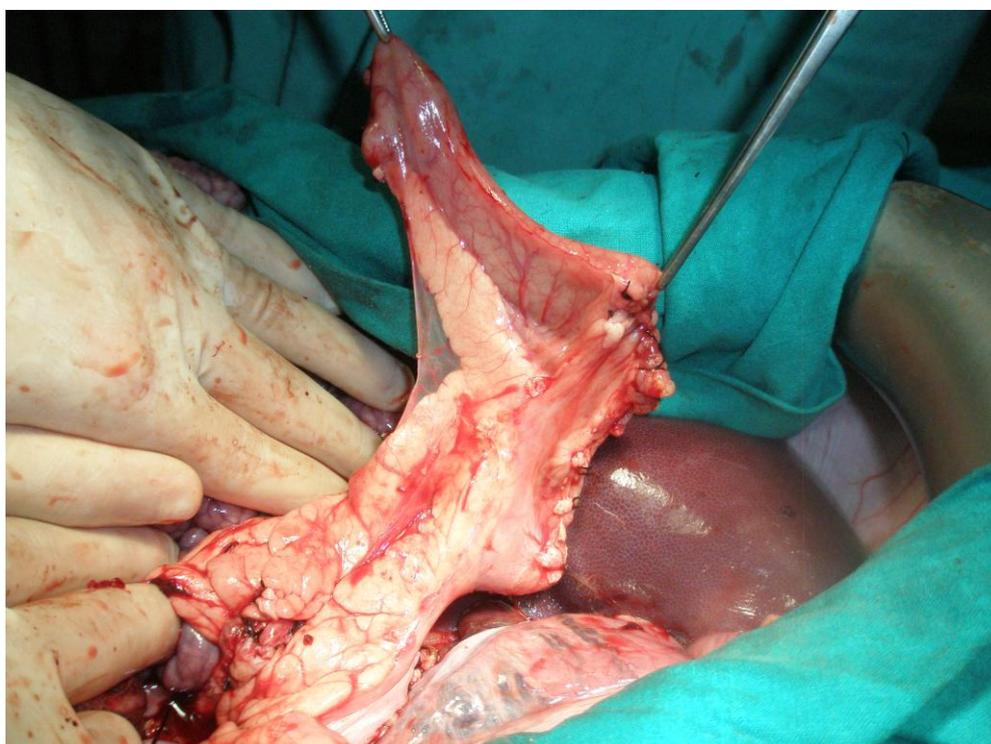


Fig. 19. Segmento duodenal, incluido en el injerto, completamente preparado.

1.3.2 Perfusión-lavado *ex situ* y almacenamiento frío del injerto

Una vez extraído, el injerto se pesa (Figura 20). Se coloca en un recipiente metálico estéril y se procede a su lavado y perfusión a través del TC y de la AMS con la solución de preservación de la Universidad de Wisconsin (UW) (Viaspan®) a 4°C, a una presión de 100 cm H₂O y con un volumen suficiente (150-200 cc) hasta que el líquido de perfusión que drena a través de la porta sale completamente limpio (Figura 21).

Después de la perfusión, se vuelve a pesar el injerto pancreático-duodenal (Figura 20) y luego se almacena sumergido en UW dentro de una convencional bolsa estéril que cerramos herméticamente. El injerto se embala en otra bolsa estéril y ésta en una tercera. De esta manera los injertos son almacenados durante 8 horas a 4° C.



Fig. 20. Se ha pesado el injerto pancreático-duodenal inmediatamente después de su extracción (izquierda) y después del lavado-perfusión *ex situ* con la solución de preservación UW (derecha). Nótese en la pantalla de la balanza que después del lavado-perfusión el peso del injerto ha disminuido.

1.3.3 Intervención en el receptor

El aloinjerto pancreático-duodenal se implanta mediante anastomosis del parche de aorta y de la vena porta del injerto a la aorta y vena cava infrarrenales del receptor. El duodeno del injerto se anastomosa a una asa ileal del receptor.

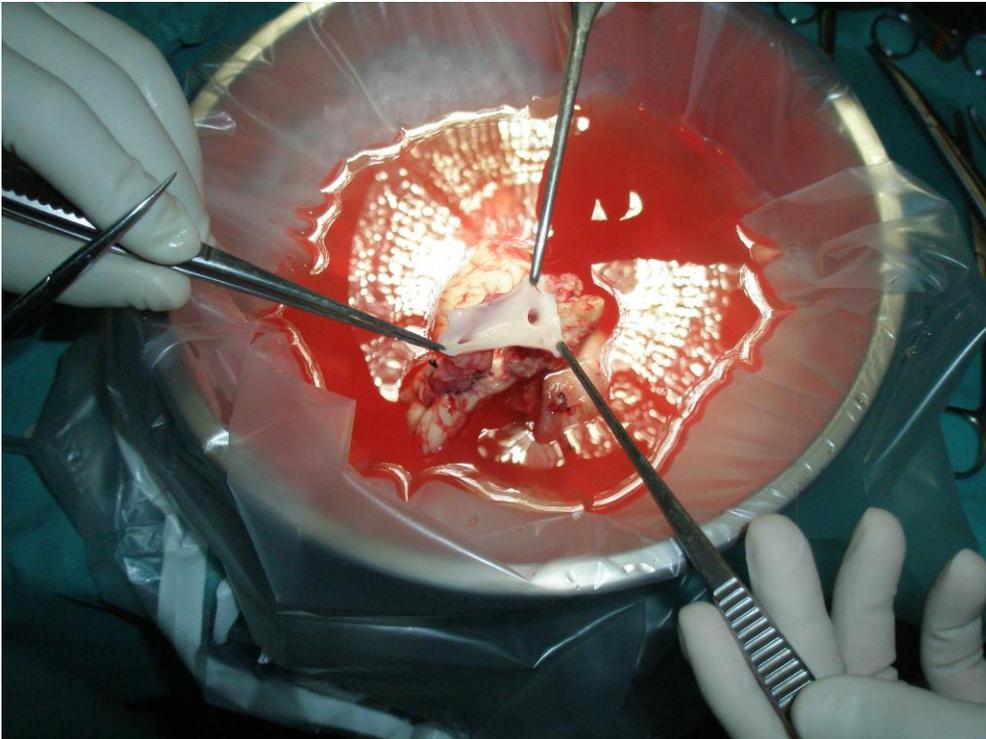


Fig. 21. Injerto pancreático-duodenal después del lavado-perfusión *ex situ*. Parche de aorta con los orificios del tronco celíaco y de la arteria mesentérica superior.

1.3.3.1 Canalización de la vía venosa central

Una vez realizada la inducción anestésica y la intubación endotraqueal, se procede a canular la vena yugular externa en el lado derecho.

Se realiza una incisión vertical en la cara anterolateral del cuello a unos dos traveses de dedo de la línea media y unos 3-4 cm por encima del cartílago tiroides. Se secciona el platisma y en la cara posterolateral del músculo esternocéfálico se identifica la vena yugular externa, que se disecciona y se liga distalmente con seda 3-0.

A continuación se realiza una incisión en la vena, se introduce el catéter en dirección de la vena cava superior (Certofix®) y se fija con una ligadura doble de seda 3-0.

El extremo distal del catéter se tuneliza por el tejido subcutáneo hasta la región cervical posterior, donde se fija con puntos de seda 2-0 (Figura 22). La vía venosa se mantendrá durante todo el postoperatorio.



Fig. 22. Catéter venoso central insertado en la vena yugular externa y exteriorizado por la región póstero-lateral cervical derecha.

1.3.3.2 Preparación de la zona del implante

El aloinjerto pancreático-duodenal se coloca en posición heterotópica en la cavidad peritoneal.

Se realiza una laparotomía media supra-infraumbilical (Figura 23). A continuación, se disecan la aorta y la vena cava inferior distalmente a los vasos renales. Rechazando las asas intestinales en sentido craneal y el recto lateralmente hacia la izquierda, se expone el peritoneo parietal posterior que cubre la cava y la aorta infrarrenales. Por delante de la cava inferior, distalmente a las venas renales, se secciona el peritoneo parietal posterior hasta cerca de la bifurcación iliaca, disecando dicha vena cava por sus caras anterior y lateral en una extensión de 4-5 cm. De igual forma, se procede a la

disección de la aorta infrarrenal, algo más distalmente que la de la cava, para facilitar las anastomosis vasculares (Figura 24).

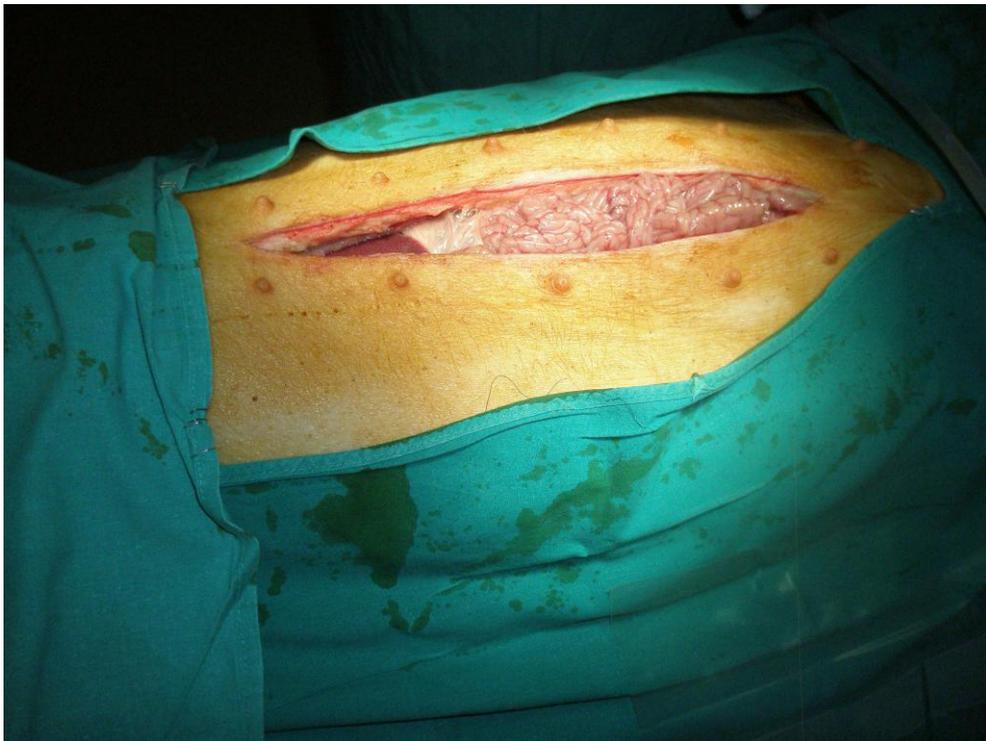


Fig. 23. Laparotomía media supra-infraumbilical en el receptor

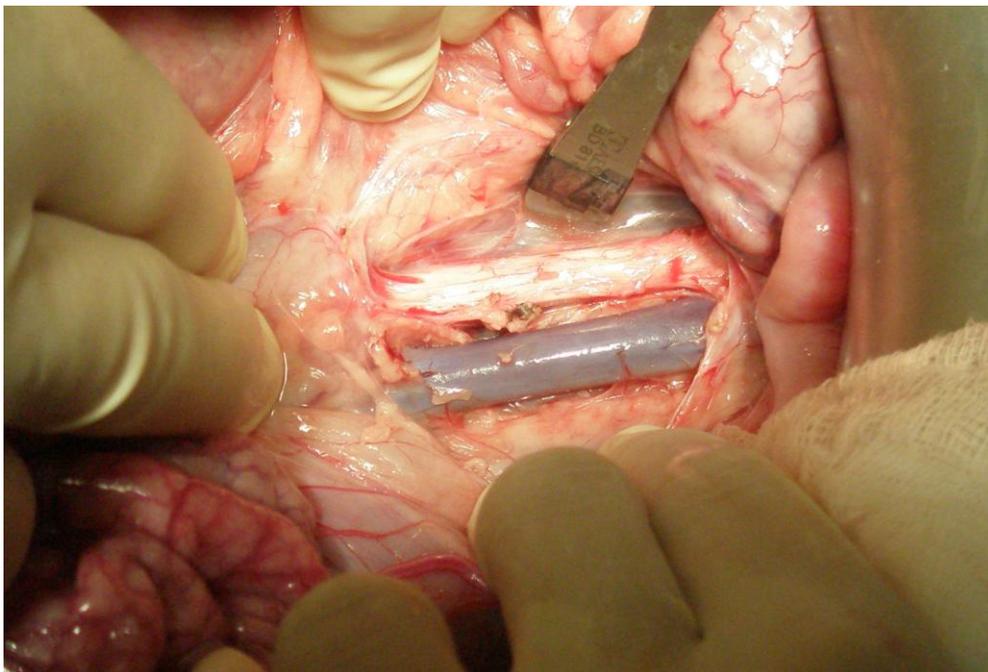


Fig. 24. Vena cava inferior y aorta abdominal disecadas por debajo de los vasos renales.

1.3.3.3 Preparación del pedículo arterial del injerto

Tras extraer el injerto pancreático-duodenal de su almacenamiento con la solución fría de preservación UW y colocarlo en un recipiente sumergido en dicha solución, se prepara un parche de Carrel de la aorta que engloba el TC y la AMS (Figuras 25 y 26).

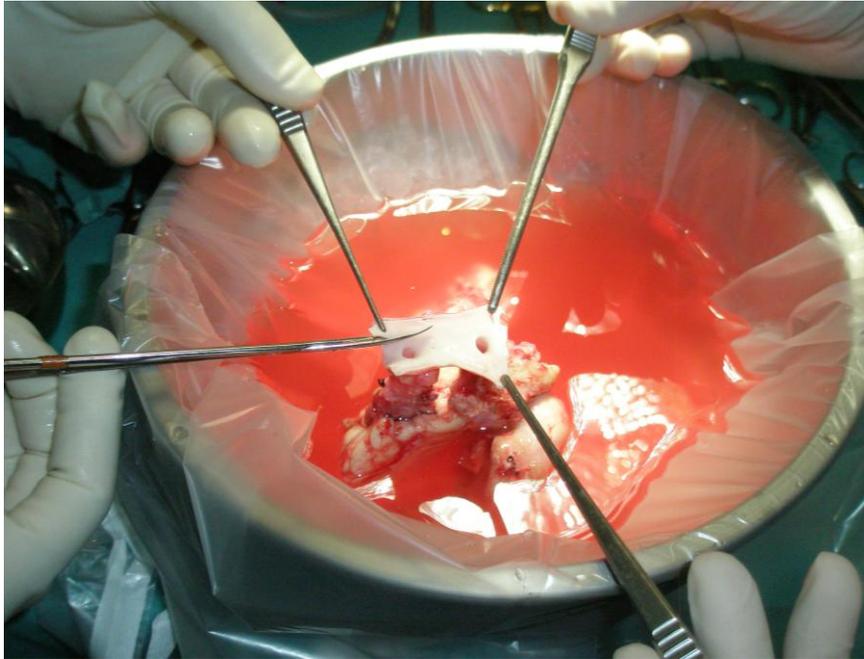


Fig. 25. Preparación de un parche de Carrel de la aorta que engloba el TC y la AMS.



Fig. 26. Injerto pancreático duodenal con el parche de aorta un momento antes de implantarlo en el receptor.

1.3.3.4 Realización del implante

Se coloca el injerto en la cavidad peritoneal del receptor de manera que el duodeno quede orientado en sentido craneal.

Se procede al clampaje lateral de la aorta infrarrenal del receptor con un clamp de Satinsky (Figura 27). Se efectúa un corte longitudinal en la cara anterior de la aorta y se procede a la anastomosis término-lateral entre el parche de Carrel aórtico del injerto y la aorta infrarrenal del receptor con suturas continuas de polipropileno 4/0 (Figuras 28 y 29).

Se coloca a continuación un clamp de Satinsky en la vena cava infrarrenal, se efectúa una venotomía elíptica anterior longitudinal y se confecciona la anastomosis término-lateral entre la vena porta del injerto y la vena cava receptora, mediante suturas continuas de polipropileno 5/0, un poco por encima del lugar de la anastomosis arterial (Figuras 30-32).

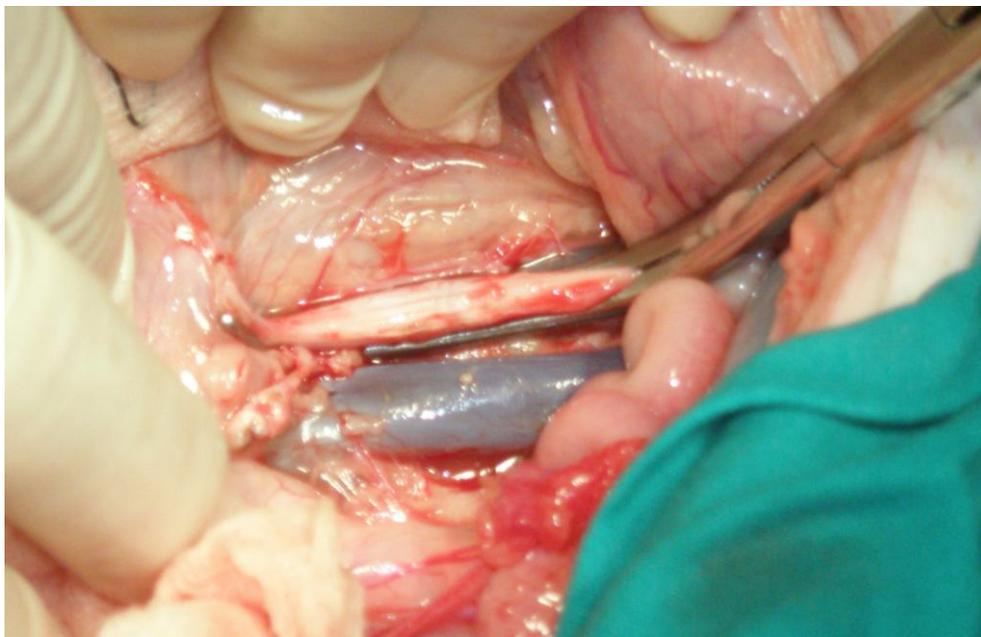


Fig. 27. Clampaje de la aorta abdominal infrarrenal.

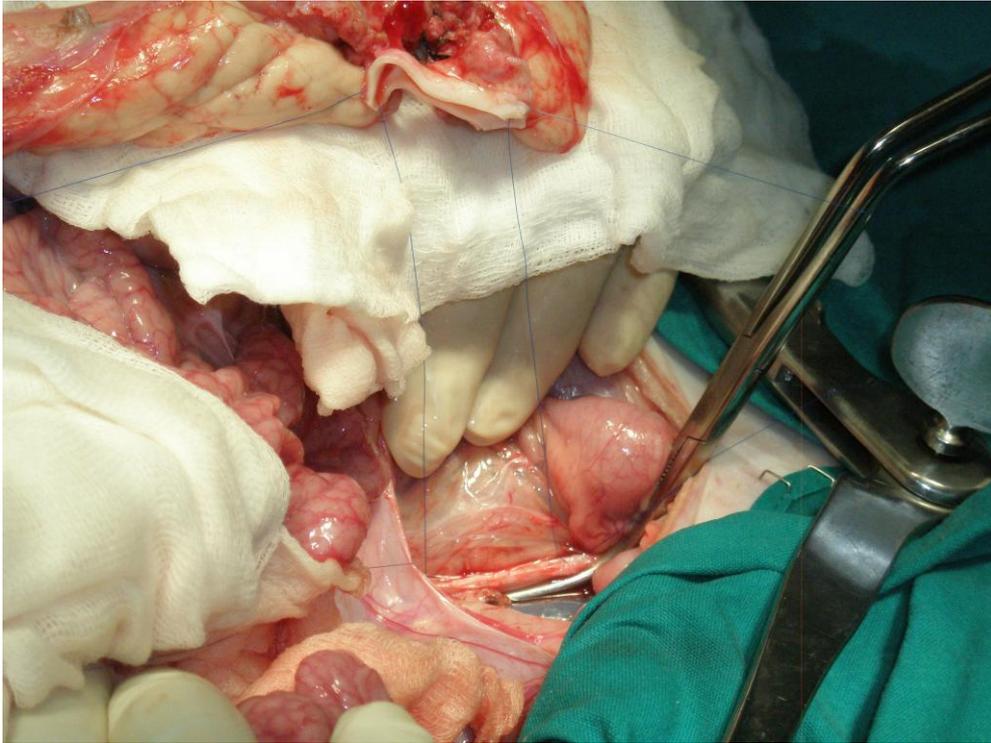


Fig. 28. Anastomosis entre el parche de aorta del injerto y la aorta infrarrenal del receptor. Puntos de polipropileno 4/0 en los extremos de la anastomosis.

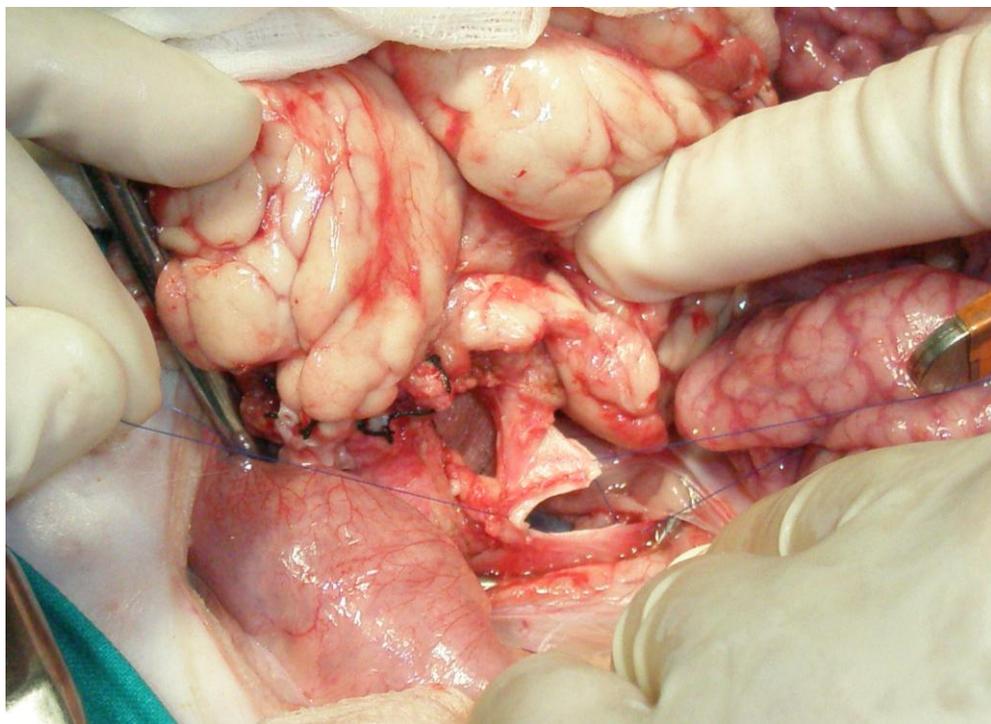


Fig. 29. Anastomosis entre el parche de aorta del injerto y la aorta infrarrenal del receptor. Se está realizando la sutura de la cara posterior.

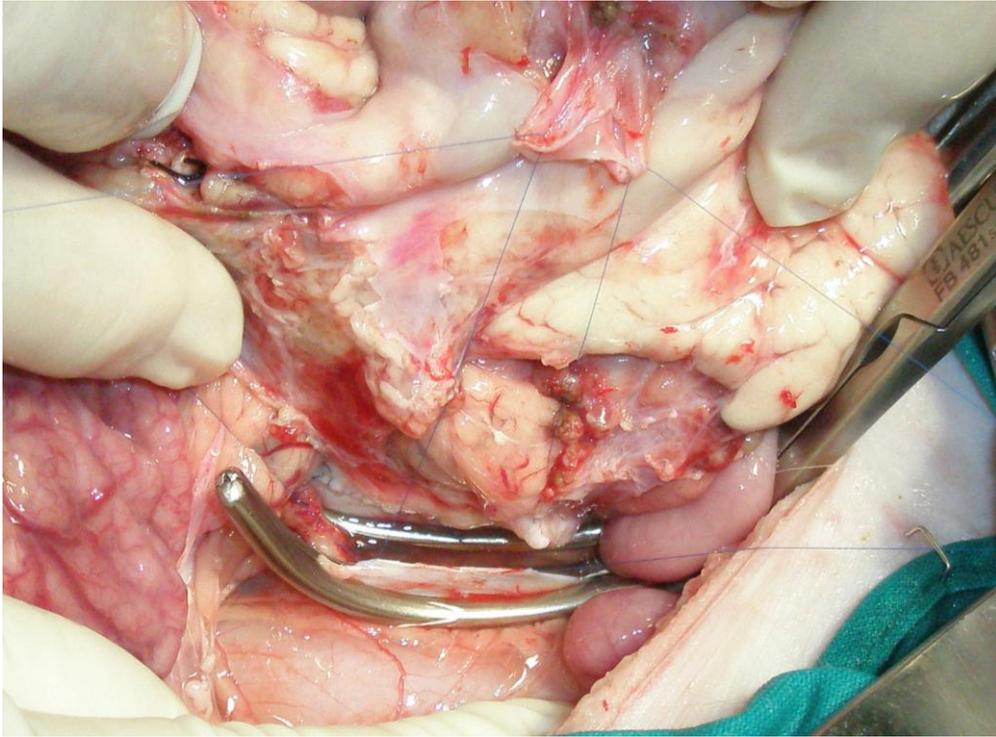


Fig. 30. Anastomosis entre la vena porta del injerto y la cava infrarrenal del receptor.
Puntos de polipropileno 5/0 en los extremos de la anastomosis.

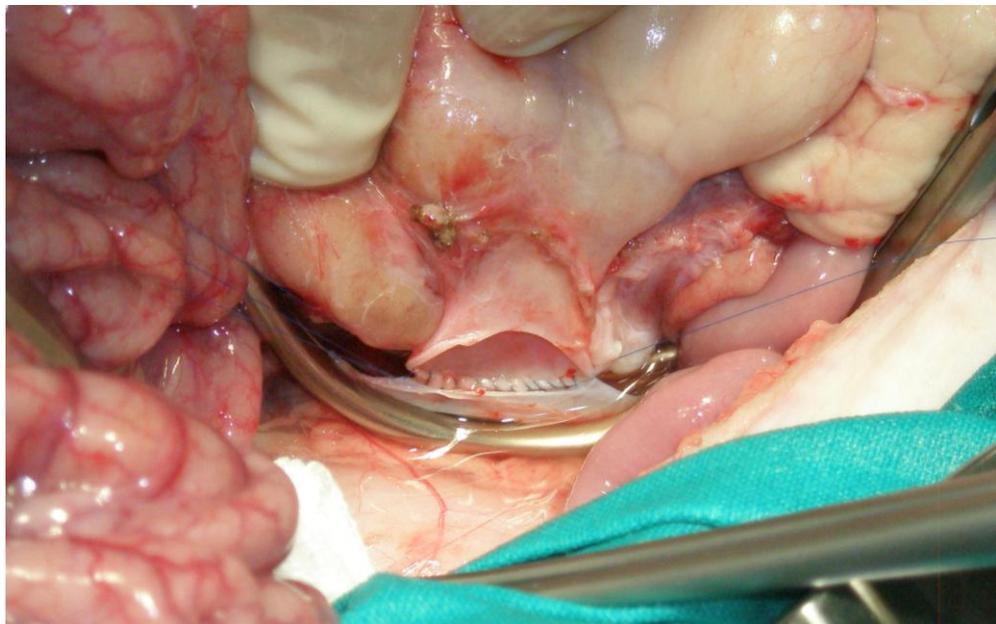


Fig. 31. Anastomosis entre la vena porta del injerto y la cava infrarrenal del receptor.
Se está realizando la sutura de la cara posterior.

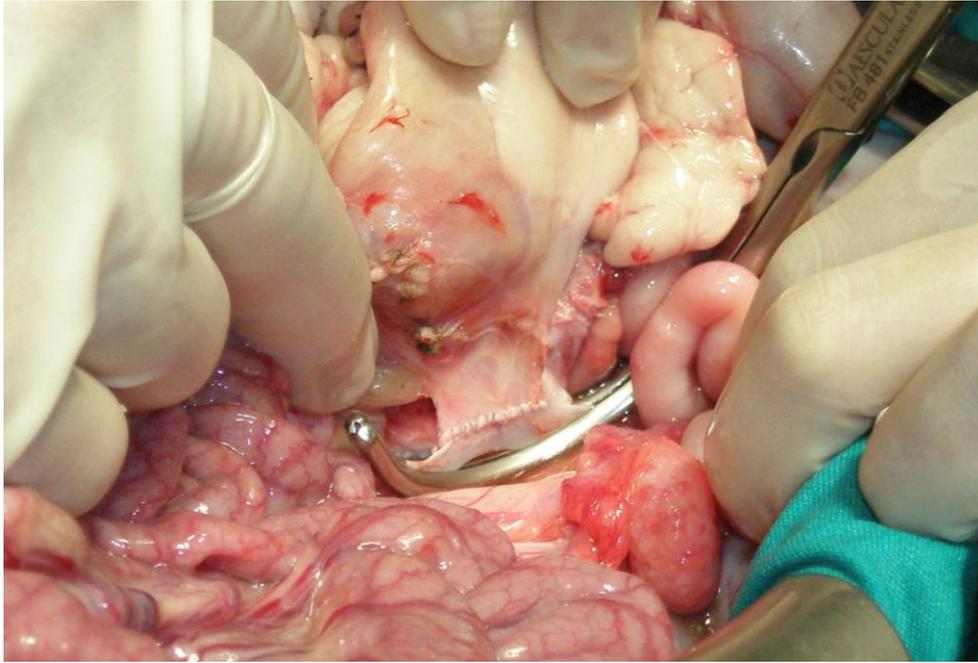


Fig. 32. Anastomosis ultimada entre la vena porta del injerto y la cava del receptor.

Terminadas las anastomosis se retiran los clamps vasculares, primero el de la vena cava y luego el de la aorta, y se observa la recuperación del latido arterial, el adecuado drenaje venoso y la buena coloración del injerto (Figura 33).

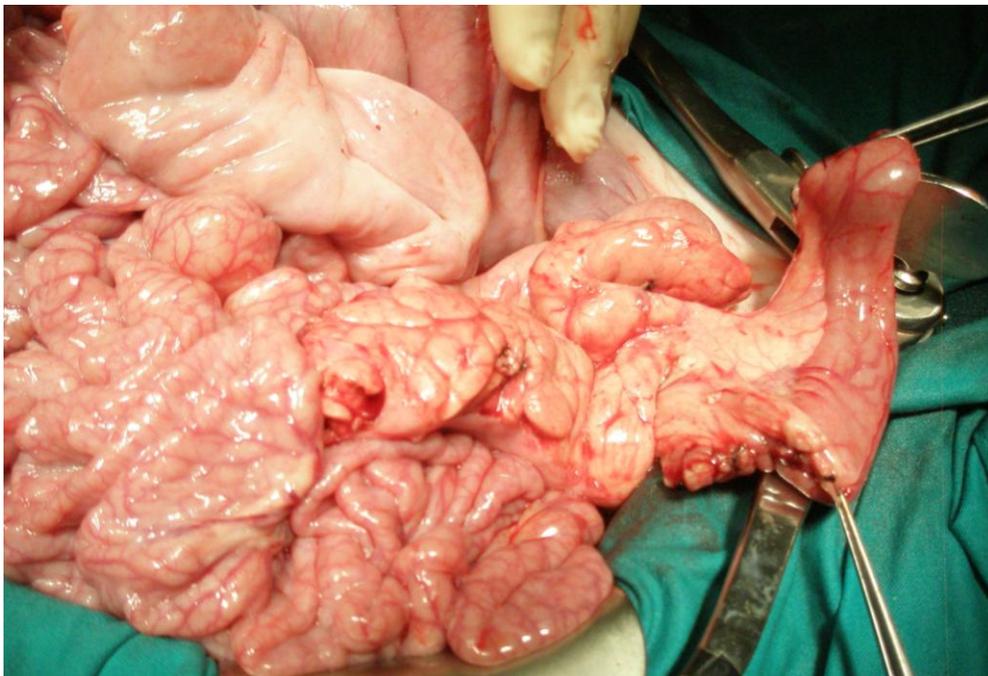


Fig. 33. Tras el desclampaje, la excelente coloración del injerto pancreático-duodenal, similar a la de las estructuras vecinas, testimonia la adecuada perfusión del injerto.

1.3.3.5 Derivación entérica de la secreción exocrina del injerto pancreático-duodenal

Finalmente, el duodeno se anastomosa látero-lateralmente a un asa ileal a unos 40 centímetros de la válvula ileocecal, con suturas continuas de seda 3/0 (Figuras 34 y 35).

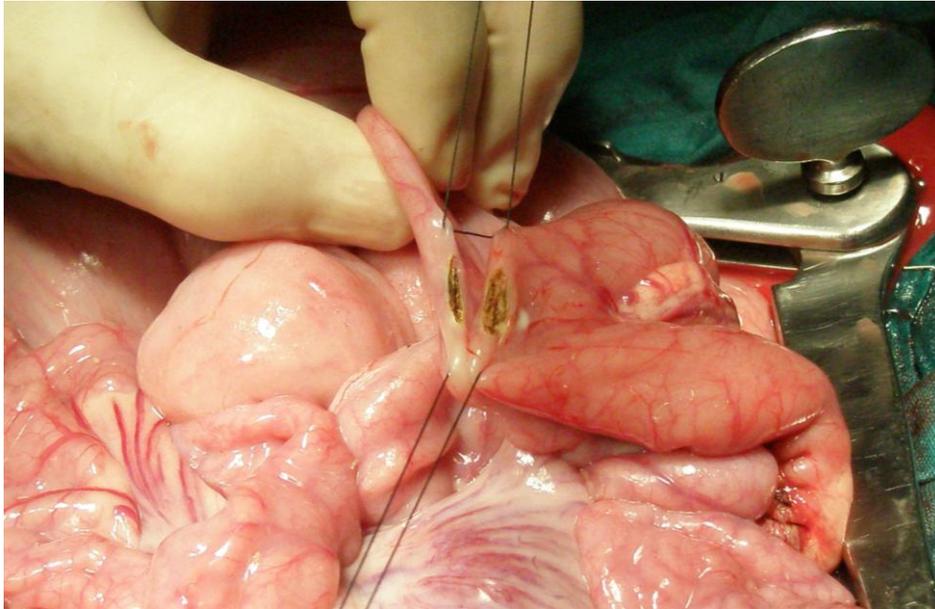


Fig. 34. Anastomosis látero-lateral entre el duodeno del injerto y el íleon del receptor.

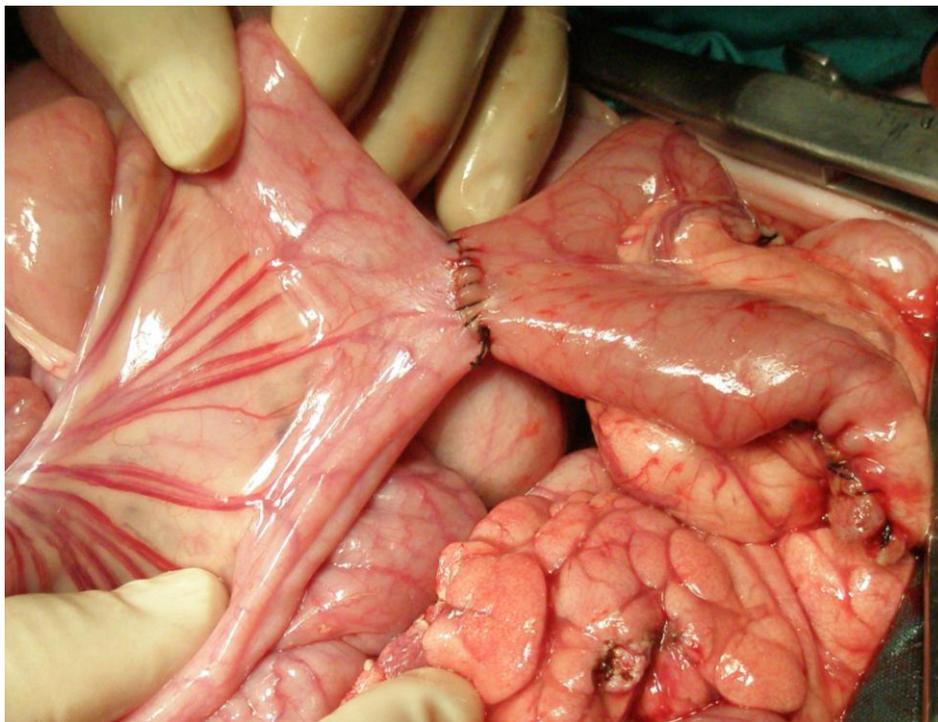


Fig. 35. Anastomosis ultimada entre el duodeno del injerto y el íleon del receptor.

1.3.3.6 Pancreatectomía del receptor

Con objeto de que la única fuente de insulina sea la aportada por el injerto pancreático-duodenal, se extirpa la totalidad del páncreas del animal receptor con conservación del duodeno y de su irrigación (Figuras 36-41).



Fig. 36. Pancreatectomía del receptor. Liberación del lóbulo izquierdo pancreático.

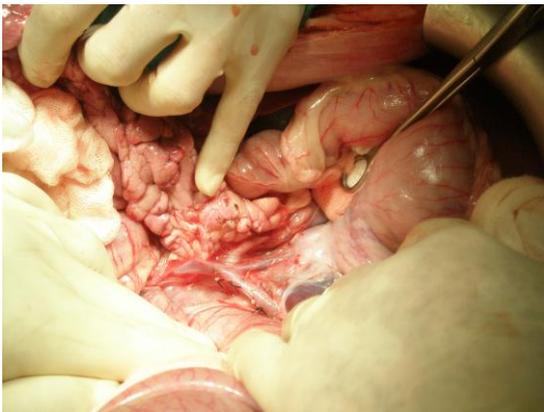


Fig. 37. Pancreatectomía en el receptor. Liberación del lóbulo izquierdo del páncreas. Se observan los vasos esplénicos respetados.

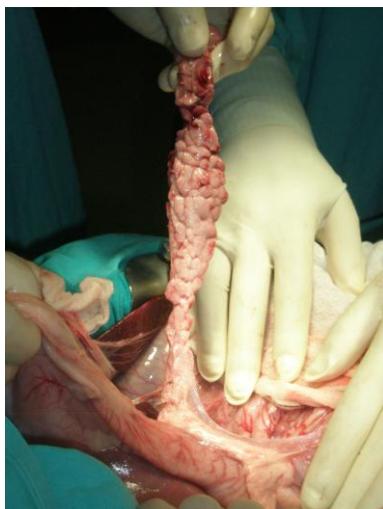


Fig. 38. Pancreatectomía en el receptor. Se ha ultimado la liberación del lóbulo izquierdo del páncreas nativo.

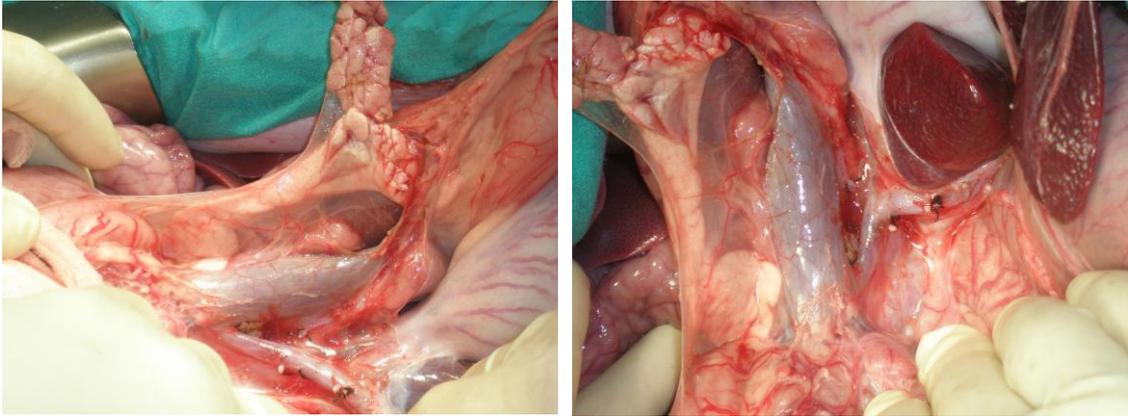


Fig. 39. Pancreatectomía en el receptor. Vena porta, vasos esplénicos y vasos diverticulares respetados

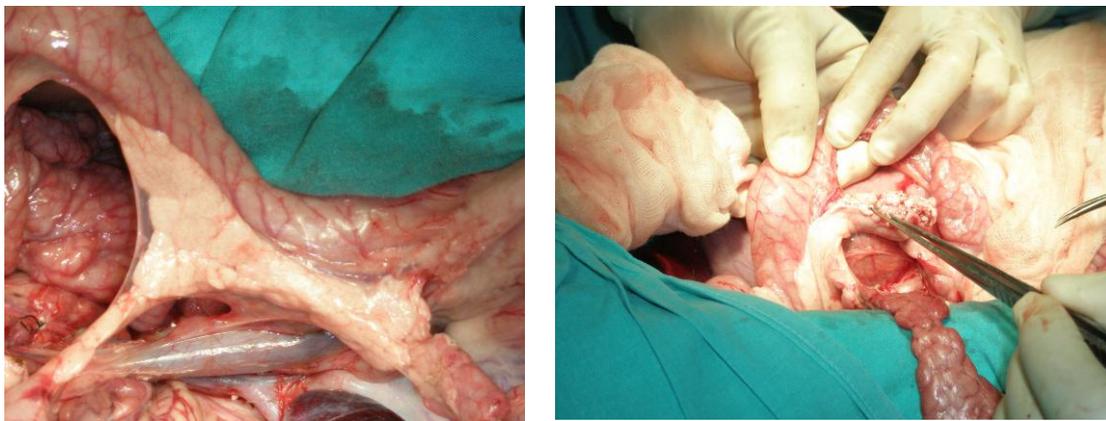


Fig. 40. Pancreatectomía en el receptor. En la imagen de la izquierda se muestran el segmento medio y el lóbulo derecho pancreáticos. En la imagen de la derecha se ha comenzado su liberación respetando el duodeno y su vascularización.

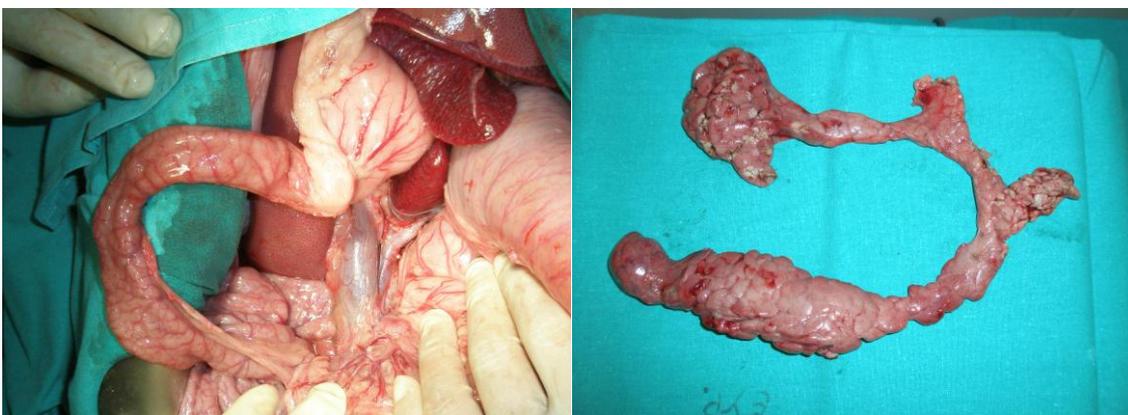


Fig. 41. Exéresis del páncreas nativo terminada; el duodeno y su vascularización están preservados (imagen izquierda). Pieza de exéresis de la totalidad del páncreas (derecha).

1.3.3.7 Fin del procedimiento del trasplante

Tras el lavado con suero fisiológico templado y posterior aspirado de la cavidad abdominal, se revisa la hemostasia y se procede al cierre de la laparotomía en dos planos (peritoneo- aponeurosis y tejido celular subcutáneo) con suturas continuas de ethylon nº 1 y de la piel con grapas.

2. CUIDADO GENERAL DE LOS ANIMALES RECEPTORES EN EL POSTOPERATORIO

No se administró inmunosupresión ni se realizó tratamiento del rechazo cuando este se produjo.

Después del trasplante los animales se trasladaron a la jaula de estabulación individual con temperatura regulable y luz natural. Para continuar con la analgesia, se colocó un parche transdérmico de buprenorfina (Transtec® 35 mcg/h) en la región cervical posterior. El primer día del postoperatorio se les permitía acceso al agua y recibieron 1500 mL de solución Ringer Lactato por vía intravenosa. A partir del segundo día se les permitió libre acceso a la alimentación oral con piensos comerciales. En los siete primeros días se les administró cefoxitina 2 g/día IV. Todos los días se comprobó su estado general, consciencia, hidratación, frecuencia respiratoria, la ingesta de agua y alimentos y las características organolépticas y frecuencia de heces y orina.

3 DISEÑO EXPERIMENTAL

3.1 Grupos experimentales

Los animales fueron divididos en tres grupos (n= 16 cada grupo, 8 donantes y 8 receptores), de acuerdo con los siguientes tratamientos antioxidantes:

- Sin tratamiento antioxidante: control
- Melatonina, a la dosis de 10 mg/kg de peso corporal
- AA: ácido ascórbico, a la dosis de 10 mg/kg de peso corporal

Melatonina y AA fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

En los donantes, melatonina o AA fueron administrados intravenosamente 30 minutos antes del clampaje vascular. En los receptores, melatonina o AA fueron administrados intravenosamente 30 minutos antes y 30 minutos después de la reperfusión vascular del injerto. Además, durante una semana después del TP, los antioxidantes se administraron intravenosamente una vez al día a las 8 de la mañana. Finalmente, en el lavado-perfusión *ex situ* del injerto y durante el almacenamiento frío, se añadieron 5mM de melatonina o AA a la solución UW. La melatonina fue disuelta en etanol absoluto y suero salino para los procedimientos *in vivo* o en la solución UW para los procedimientos *ex vivo* (perfusión-lavado del injerto y almacenamiento frío). La concentración de etanol fue de 2% (v/v) en la mezcla final. El AA se diluyó en suero salino para su administración *in vivo* o en la solución UW para su administración *ex vivo*. Todas las soluciones fueron inmediatamente preparadas antes de su uso.

3.2 Muestras de sangre

Se obtuvieron muestras de sangre (10 mL) en condiciones basales a través del catéter de la vena yugular externa cada día después del TP para evaluar la función pancreática. Esta se llevó a cabo mediante la determinación de las concentraciones séricas de glucosa, insulina, c-péptido, lipasa y amilasa. Además, durante los cuatro primeros días después del TP, se analizaron las concentraciones séricas de *pig-major acute-phase protein/inter- α -trypsin inhibitor heavy chain 4* (pMAP/ITIH₄). Esta molécula es una proteína de fase aguda interleucina 6 (IL-6)-dependiente que se toma como un indicador

de inflamación y respuesta de fase aguda sistémica al estrés quirúrgico (140); así, sirve como un biomarcador de RA en el alotrasplante de páncreas en el cerdo (141).

3.3 Muestras tisulares para estudio del estrés oxidativo

Se tomaron muestras de tejido (500 mg) del lóbulo izquierdo del páncreas para monitorizar su estado en los momentos siguientes:

- a) en el donante, inmediatamente antes del clampaje vascular;
- b) en el injerto, inmediatamente después del lavado-perfusión *ex situ* (0 h de isquemia fría);
- c) en el injerto, después de 8 h de almacenamiento frío;
- d) en el receptor, 30 minutos después de la reperfusión.

Estas muestras se homogeneizaron en tampón Tris-HCL 50 mm frío (pH 7,4) y se midieron las concentraciones de malonildialdehido (MDA) + 4-hidroxi-alquenos (4-HDA) en los homogeneizados. MDA y 4-HDA son productos finales de la lipoperoxidación y pueden ser utilizados para cuantificar la extensión de la lipoperoxidación debida al estrés oxidativo (142).

Asimismo, en los homogeneizados se midieron los restos carbonilo de las proteínas.

3.4 Muestras tisulares para estudio histopatológico

Cuando la glucemia excedió de 150 mg/dL en dos días consecutivos, los animales receptores fueron anestesiados, se exploró el aloinjerto pancreaticoduodenal vía laparotomía y se tomaron muestras para estudio histopatológico dirigido al diagnóstico y gradación de RA de acuerdo con los criterios de Drachenberg *et al* (143). A continuación, permaneciendo anestesiados, los animales fueron sacrificados.

4 DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS

4.1 Estudio de la función pancreática

La concentración de glucosa se determinó por análisis enzimático con hexoquinasa, y las concentraciones de amilasa y lipasa por técnicas enzimáticas colorimétricas, realizadas todas ellas en un autoanalizador Roche/Hitachi Cobas c 711 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). La insulina y el péptido-C se midieron por técnicas de radioinmunoensayo (RIA) con kits comerciales (LINCO Research, Missouri, USA).

Los injertos se consideraron funcionantes cuando se detectó normoglucemia al menos los cinco primeros días del postoperatorio. Asimismo, se diagnosticó que un animal estaba diabético cuando la glucosa sanguínea en ayunas era superior a 150 mg/dL en dos días consecutivos.

4.2 Medición de la concentración sérica de la pMAP/ITIH₄

Las concentraciones séricas de la pMAP/ITIH₄ se determinaron por inmunodifusión radial con gel de agarosa al 1% que contenía el antisuero específico (144) y utilizando un suero porcino como estándar secundario. La concentración de pMAP/ITIH₄ en este suero se determinó previamente por inmunodifusión radial usando la proteína purificada como estándar referencia primaria.

5 ESTUDIO DEL ESTRÉS OXIDATIVO

5.1 Cuantificación de MDA+4-HDA

Se utilizó para la medición de la peroxidación lipídica un kit Calbiochem LPO-586. Este protocolo consiste en un reactivo cromogénico que reacciona con el MDA y 4-

HDA a 45° C para producir un cromóforo estable con una absorbancia máxima a 586 nm de longitud de onda. Se utilizó 1,1,3,3-tetrametoxipropano como estándar. Los resultados se expresaron como nmol de MDA + 4-HDA por mg de proteínas totales. Las concentraciones de proteínas se midieron por el método de Bradford (145) con albúmina bovina como estándar

5.2 Cuantificación de los restos carbonilo de las proteínas

Este test se realizó en homogeneizados de los tejidos extraídos. El contenido de restos carbonilo se valorará utilizando la metodología de Levine y cols. (146). Se trata de un test espectrofotométrico que se lee a 350 nm. La concentración se expresará en nmol de grupos carbonilo / mg de proteína.

6 EXAMEN HISTOPATOLÓGICO

Para el estudio histológico las muestras se fijaron en formaldehído tamponado al 10% durante 36 horas y posteriormente fueron laminadas y procesadas para su inclusión en parafina. Se realizaron secciones de 4 micras, que se tiñeron con técnica de la hematoxilina-eosina para su visualización al microscopio. Las imágenes fueron captadas con una cámara Olympus DP71 a través de un microscopio Olympus Provis. El diagnóstico de RA y su gradación se realizó de acuerdo con el esquema de Banff (143, 147,148).

Definimos el fracaso del injerto por RA como el estado diabético (glucemia > 150 mg/dL) del receptor en ausencia de trombosis vascular (arterial o venosa) del injerto u otras complicaciones técnicas en las reintervenciones y con demostración histopatológica de signos de rechazo celular agudo en las biopsias.

7 ANALISIS ESTADÍSTICO

Para controlar la homogeneidad de los grupos determinados por el tratamiento antioxidante, se han utilizado distintos contrastes según la escala de medida de las variables: para las categóricas se ha considerado el contraste de Chi-Cuadrado con la corrección por continuidad de Yates o la prueba exacta de Fisher, en caso necesario. Para las variables de tipo cuantitativo se ha examinado la normalidad de la distribución mediante el contraste de Kolmogorov-Smirnov con la modificación de Lilliefors; si la normalidad es asumible se ha aplicado el test de la t-Student, en caso contrario el test no paramétrico de la U de Mann-Whitney.

El comportamiento de las determinaciones analíticas tras el trasplante se ha evaluado utilizando el análisis de la varianza de medidas repetidas con un factor entre-sujeto que es el tratamiento antioxidante utilizado, y un factor intra-sujeto que son las determinaciones en los días posteriores a la operación; también se ha considerado la interacción entre ambos. Para llevar a cabo estos análisis se han escogido contrastes polinomiales, para así contrastar relaciones lineales y cuadráticas. Se ha escogido el enfoque univariante debido a que las condiciones para el mismo se cumplían y siendo el tamaño de muestra escaso, sus resultados tienen más potencia que el enfoque multivariante. Para contrastar si la matriz de varianzas-covarianzas es similar en los grupos (control, melatonina y AA) se utilizó la generalización multivariante del contraste M de Box. Para contrastar que las varianzas de las variables creadas para los contrastes polinomiales es la misma y su covarianza nula, se utilizó el test de esfericidad de Mauchly; en caso de que esta última hipótesis no se cumpliera se han corregido los grados de libertad de la F de los contrastes mediante la Epsilon de Huynh-Feldt.

Para el análisis de la supervivencia, definida como días de normoglucemia, se ha utilizado un conjunto de técnicas estadísticas denominadas “análisis de supervivencia”. Estas técnicas son de tipo no paramétrico, ya que únicamente se pretende contrastar cómo se modifica el riesgo de fallo por efecto de variables externas. En primer lugar, se ha procedido a analizar la función de supervivencia y la función de riesgo acumulado (estimador producto límite de Kaplan-Meier), contrastando si la función de riesgo cambia dependiendo del tratamiento antioxidante utilizado. Para ello, se ha considerado el estimador producto límite de Kaplan-Meier, haciendo el contraste de Mantel-Haenszel (log-rank) entre los grupos.

$P \leq 0.05$ fue considerado significativo. Los datos se expresan como media \pm error estándar.

IV RESULTADOS

1 PROCEDIMIENTO ANESTÉSICO

Después de la administración de la asociación tiletamina/zolazepam/medetomidina, en menos de 5 minutos se produjo la inmovilización farmacológica de todos los animales, permitiendo su manejo y manipulación. Además, a los 10 minutos después de administrar la premedicación, se pudo intubar a todos los animales en condiciones idóneas.

El tiempo medio de anestesia, desde la intubación e inicio de la anestesia con sevoflurano hasta el cierre del vaporizador, fue de 234 ± 31 minutos, siendo el tiempo medio de cirugía, desde la primera incisión hasta el último punto de sutura, de 205 ± 16 minutos.

La concentración en aire espirada de sevoflurano, necesario para obtener el plano anestésico adecuado, fue próxima o igual a 0,75 veces la CAM. La dosis media de fentanilo por infusión continua intravenosa para todos los animales, necesario para mantener los requerimientos analgésicos intraoperatorios durante el TP, fue de $5,7 \pm 0,7$ mcg/kg/hora (intervalo de confianza al 95 %: 5,2-6,1).

Hubo una disminución significativa ($P = 0,0065$) de la frecuencia cardiaca en el minuto 60 en comparación con el inicio de la anestesia. Desde el minuto 120 hasta el final de la anestesia, no se presentaron más diferencias en la misma.

La presión arterial media presentó medias significativamente menores desde el minuto 120 hasta el final de la anestesia, siendo muy significativas, con respecto al inicio de la anestesia, en los minutos 120 ($P = 0,0047$) y 180 ($P = 0,0046$).

La temperatura disminuyó significativamente, con respecto al inicio, desde el minuto 60 hasta el final de la anestesia, siendo muy significativo el descenso de la misma en los minutos 120 ($P = 0,0057$), 180 ($P = 0,0043$) y final ($P = 0,009$).

La disminución de estos parámetros durante el mantenimiento de la anestesia no tiene relevancia clínica, ya que se encuentran siempre dentro de los límites considerados como normales. Además, las medias de la frecuencia cardíaca y de la presión arterial, durante ningún momento de la anestesia, mostraron valores elevados, lo cual indica que no se apreciaron signos clínicos de dolor durante el procedimiento anestésico-quirúrgico.

En los 24 receptores intervenidos, no se presentó ninguna complicación grave relacionada con el procedimiento anestésico. No hubo ningún animal que presentara despertar intraoperatorio o movimientos durante la anestesia. En los 24 receptores se pudo finalizar la intervención y efectuar el seguimiento postoperatorio del animal trasplantado.

2 TIEMPOS DE ISQUEMIA

El tiempo de isquemia fría fue de 8 horas. El tiempo de isquemia caliente (desde la substracción del injerto de la solución fría hasta su revascularización) varió de 30 a 60 minutos, siendo de $51,7 \pm 3$ minutos en el grupo control, de $48,7 \pm 2$ minutos en el grupo melatonina y de $49,5 \pm 1$ minutos en el grupo AA ($P=0,8$).

3 PESO DE LOS INJERTOS

El peso de los injertos pancreático-duodenales, perfundidos y preservados con la solución UW, se midió en tres momentos diferentes: inmediatamente después de la extracción, tras la perfusión-lavado *ex situ* con la solución de preservación, y tras las 8 horas de preservación fría. En los tres grupos el peso de los injertos experimentó una disminución significativa tras la perfusión-lavado y un descenso todavía más acusado tras las 8 horas de almacenamiento hipotérmico ($P < 0,001$). Entre los grupos no hubo

diferencia estadística significativa en el peso de los injertos en los tres momentos mencionados ($P > 0,8$) (Tabla 2, Figura 42).

Tabla 2: peso del injerto pancreático-duodenal

	Después de la extracción	Después del lavado <i>ex situ</i>	Después de 8 horas de preservación fría
GC	141,3 ± 9	136,3 ± 8,2*	126,7 ± 8,4*†
GA	135,3 ± 6,9	129,9 ± 7*	121,3 ± 6,2*†
GM	136,5 ± 5,8	130,1 ± 5,3*	121,9 ± 5*†

Se muestran los resultados en gramos, como media ± error estándar. GC (n = 8), grupo control; GA (n = 8), grupo ácido ascórbico; GM (n = 8), grupo melatonina. * $P < 0.001$ vs el peso después de la extracción del injerto. † $P < 0.001$ vs el peso después del lavado *ex situ* del injerto.

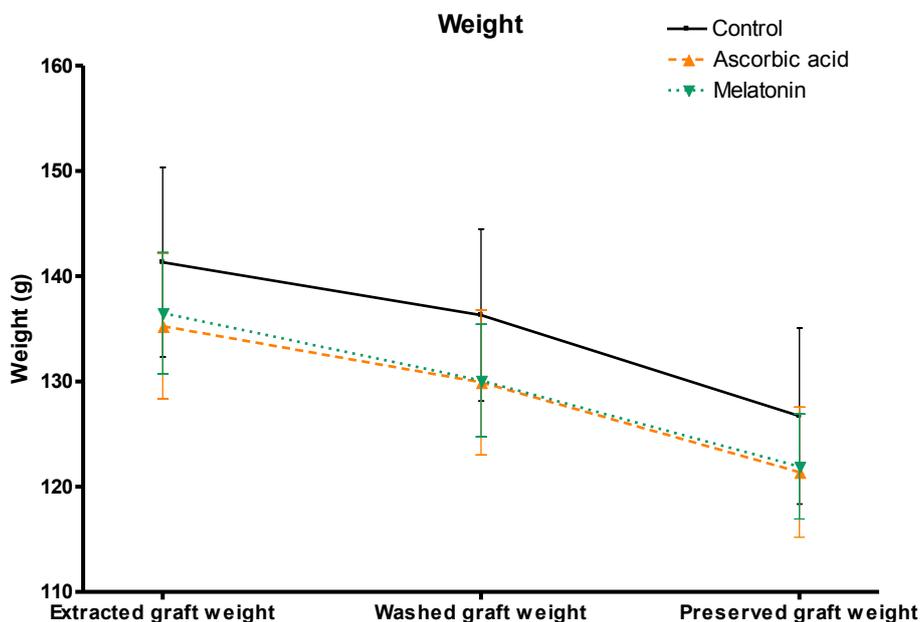


Fig. 42. Evolución del peso de los injertos pancreático-duodenales: inmediatamente después de la extracción, tras el lavado-perfusión *ex situ* y después de de 8 horas de almacenamiento hipotérmico con la solución UW

4 SUPERVIVENCIA DEL INJERTO PANCREÁTICO

Inmediatamente después del trasplante los 24 aloinjertos funcionaron normalmente. El RA del injerto, confirmado por estudio histopatológico, acabó sobreviniendo en todos los TP. Los animales del grupo control rechazaron el aloinjerto pancreaticoduodenal entre los día 7 y 12 postoperatorios (media de supervivencia de 8.1 ± 0.8 días). El grupo AA fracasó sustancialmente en modificar el curso del RA y la supervivencia del injerto (9.4 ± 1.6 días) fue similar a la del grupo control ($P=0.457$). El tratamiento con melatonina difirió el comienzo del RA (25.1 ± 7.7 días) e incrementó significativamente la supervivencia del aloinjerto ($P=0.013$ y $P=0.049$ vs animales no tratados y con AA, respectivamente) (Figuras 43 y 44). El 50% de los aloinjertos en el grupo melatonina fueron normofuncionantes después del día 16 postrasplante, 37.5% después de 30 días, y 25% después de 50 días. Ninguno de los injertos de los grupos control y AA alcanzó 16 días de normoglucemia, excepto uno del grupo AA que fue normofuncionante durante 17 días.

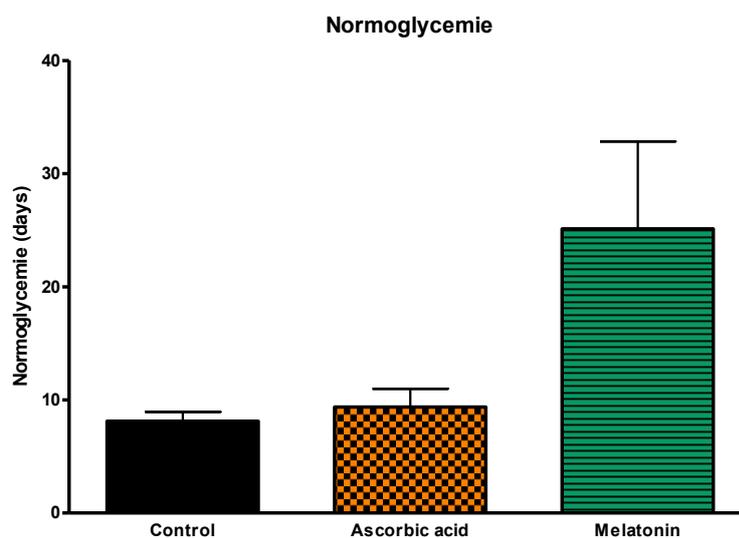


Figura 43. El tratamiento con melatonina incrementó significativamente la supervivencia del aloinjerto pancreático respecto al grupo control ($P=0.013$) y al grupo tratado con ácido ascórbico ($P=0.049$).

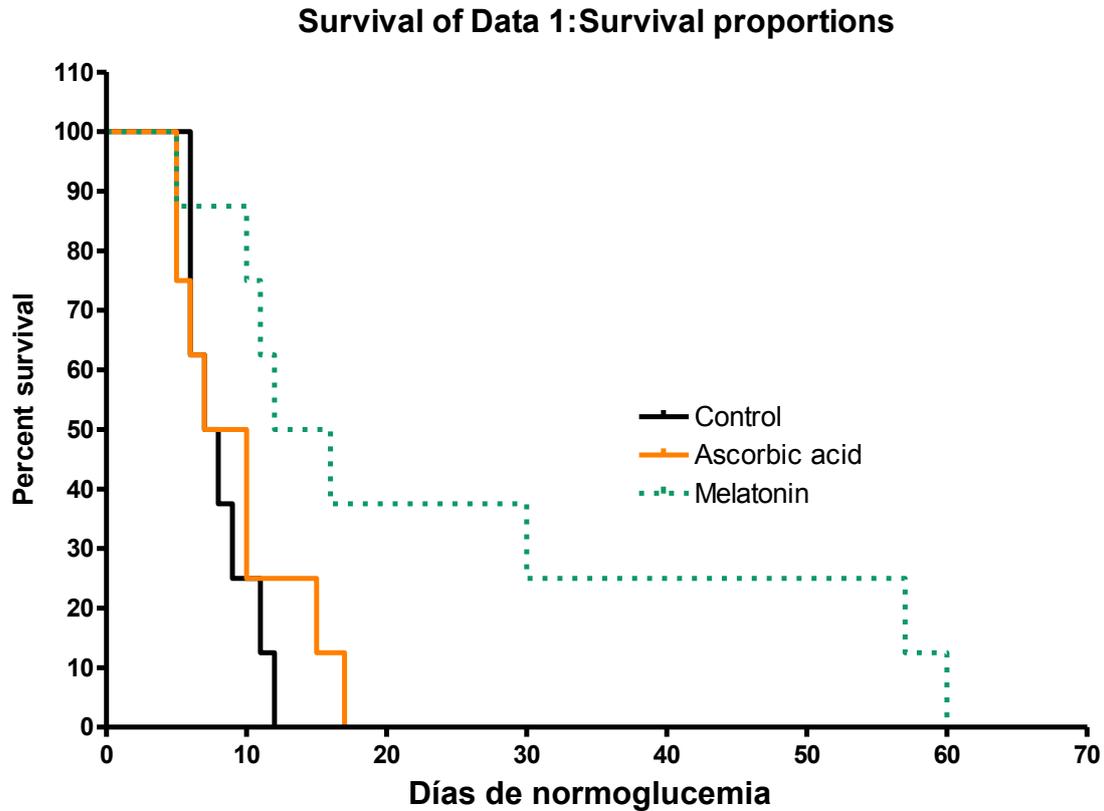


Figura 44. Supervivencia, expresada como días de normoglucemia, de los aloinjertos pancreático-duodenales. Todos los animales receptores del grupo control sin tratamiento rechazaron el aloinjerto antes del día 12 postoperatorio. La terapia con melatonina difirió el rechazo agudo y prolongó la supervivencia de los aloinjertos. El tratamiento con ácido ascórbico no modificó significativamente el curso del rechazo agudo.

5. FUNCIÓN ENDOCRINA DESPUES DEL TRASPLANTE DE PÁNCREAS

La media de glucemia basal (preoperatoria) fue de 89.6 ± 2.6 mg/dL en el grupo control, 80.1 ± 4 mg/dL en el grupo melatonina y 86.3 ± 5.5 mg/dL en el grupo AA. La figura 45 ilustra los niveles de glucosa sérica observados los días 1-10 postoperatorios. Durante los cinco primeros días los niveles de glucosa tendieron a estar más bajos que

los niveles basales en todos los grupos. La glucemia entonces comenzó un lento y progresivo incremento, alcanzando en los grupos control y AA un estado diabético en los días 8 y 9 respectivamente. Sin embargo, en el grupo melatonina todavía se mantenía el estado normoglucémico el día 10 (Figura 45).

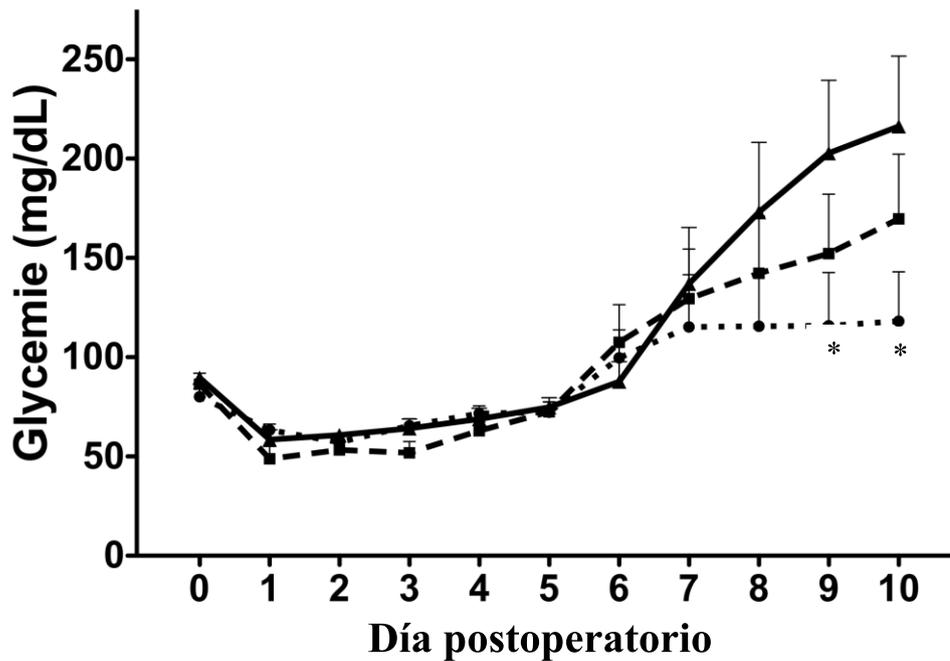


Figura 45. Niveles de glucosa sanguínea después del alotrasplante de páncreas en el cerdo, sin inmunosupresión, con 8 horas de preservación fría en solución UW. Grupo control (▲) y grupos de tratamiento con ácido ascórbico (■) y melatonina (●) (n=8 cada grupo). Los datos se expresan como media \pm error estándar. *Denota diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$) vs grupos control o ácido ascórbico.

Los niveles séricos basales de insulina (promedio global de los tres grupos: 1.75 ± 0.12 μ U/ml) y de c-peptido (promedio global: 0.12 ± 0.02 ng/mL) y el patrón evolutivo postoperatorio de ambos parámetros no revelaron diferencias estadísticas significativas entre ellos ($P > 0.05$) (Figuras 46 y 47). La insulinemia y c-peptidemia mostraron un

brusco incremento después del TP, con pico el primer día donde el valor promedio fue siete y cuatro veces respectivamente mayor que los valores basales ($P < 0.05$). Al segundo día, ambos parámetros experimentaron un descenso gradual, aunque permanecieron significativa y consistentemente más altos que los niveles basales ($P < 0.05$) a lo largo del periodo postoperatorio.

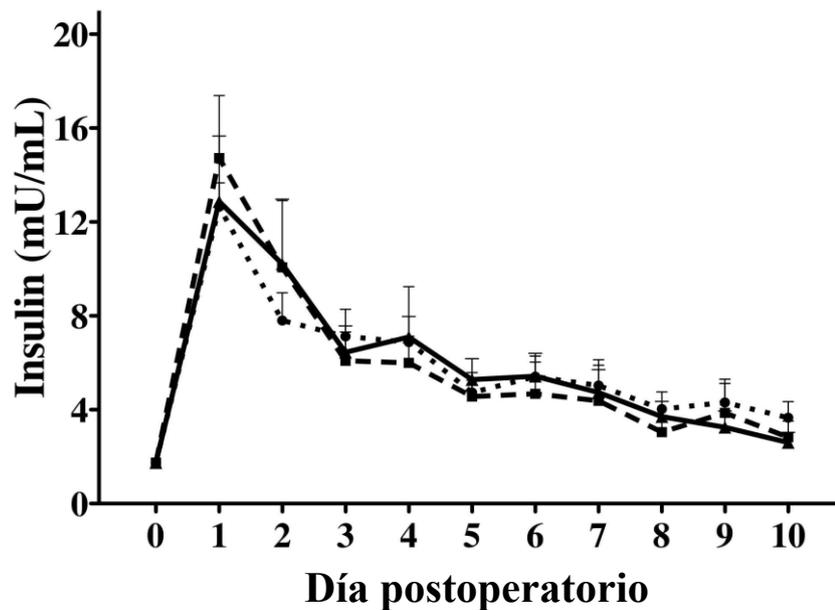


Figura 46. Niveles séricos de insulina basales y después del alotrasplante de páncreas en el cerdo, sin inmunosupresión, con 8 horas de preservación fría en solución UW. Grupo control (▲) y grupos de tratamiento con ácido ascórbico (■) y melatonina (●) (n=8 cada grupo). Los datos se expresan como media \pm error estándar.

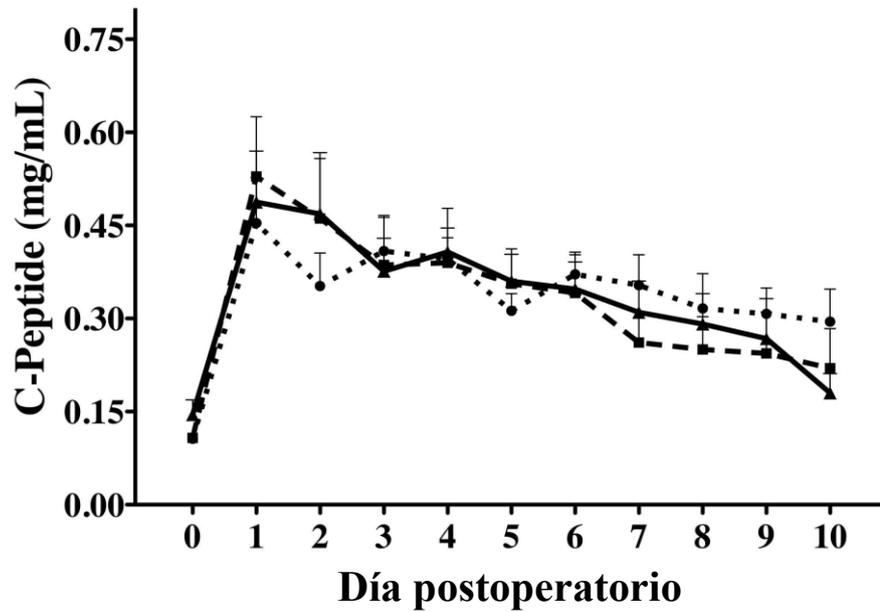


Figura 47. Niveles séricos de péptido-C basales y después del alotrasplante de páncreas en el cerdo, sin inmunosupresión, con 8 horas de preservación fría en solución UW. Grupo control (▲) y grupos de tratamiento con ácido ascórbico (■) y melatonina (●) (n=8 cada grupo). Los datos se expresan como media \pm error estándar.

6. FUNCIÓN EXOCRINA DESPUÉS DEL TRASPLANTE DE PÁNCREAS

La media de las concentraciones séricas basales de amilasa (908 ± 4 UI/mL, 817 ± 7 UI/ mL y 857 ± 1 UI/mL, en los grupos control, melatonina y AA, respectivamente) y las curvas de respuesta al TP fueron similares en los tres grupos. La amilasemia se incrementó significativamente en el periodo postoperatorio inmediato, con pico máximo el primer día postoperatorio de 8 veces los valores basales. Desde el 2º día la amilasemia experimentó un descenso progresivo y, a partir del 5º, día los valores fueron inferiores a los basales (Figura 48).

La lipasa sérica (valores basales de 8.2 ± 1.4 UI/mL, 8.3 ± 1.3 UI/mL y 6.3 ± 0.5 UI/mL, en los grupos control, melatonina y AA respectivamente) mostró una tendencia similar a la amilasemia, aunque el incremento postoperatorio de la lipasemia fue más acusado y prolongado (Figura 49). Si bien los picos de la lipasa sérica en los grupos melatonina y AA fueron 40% más bajos que el de los controles, las diferencias entre los grupos no fueron significativas.

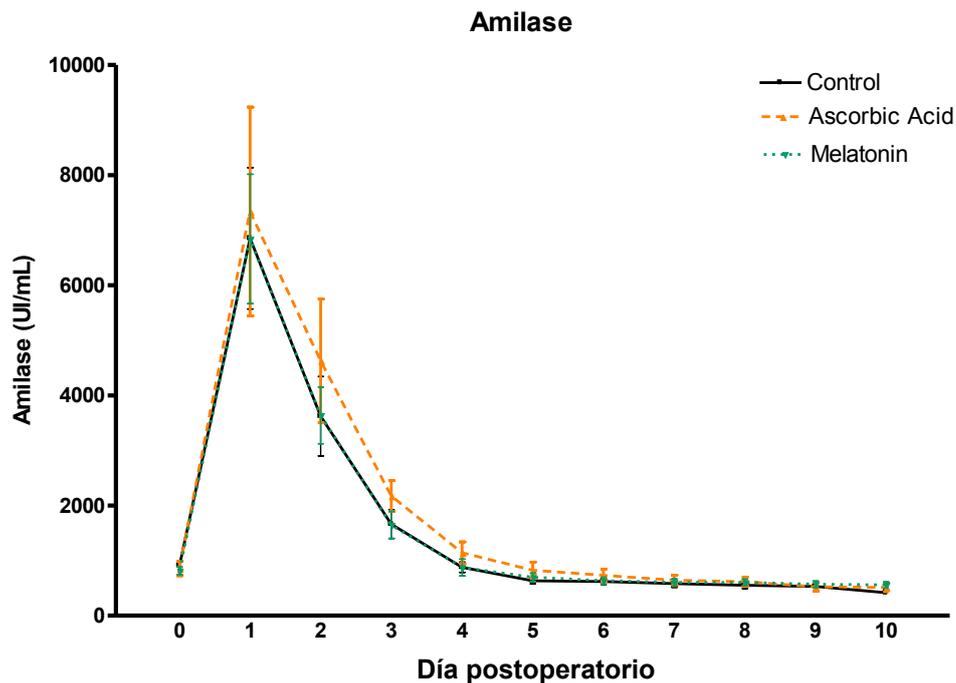


Figura 48. Niveles séricos de amilasa en el alotrasplante de páncreas en el cerdo, sin inmunosupresión, con 8 horas de preservación fría en solución UW.

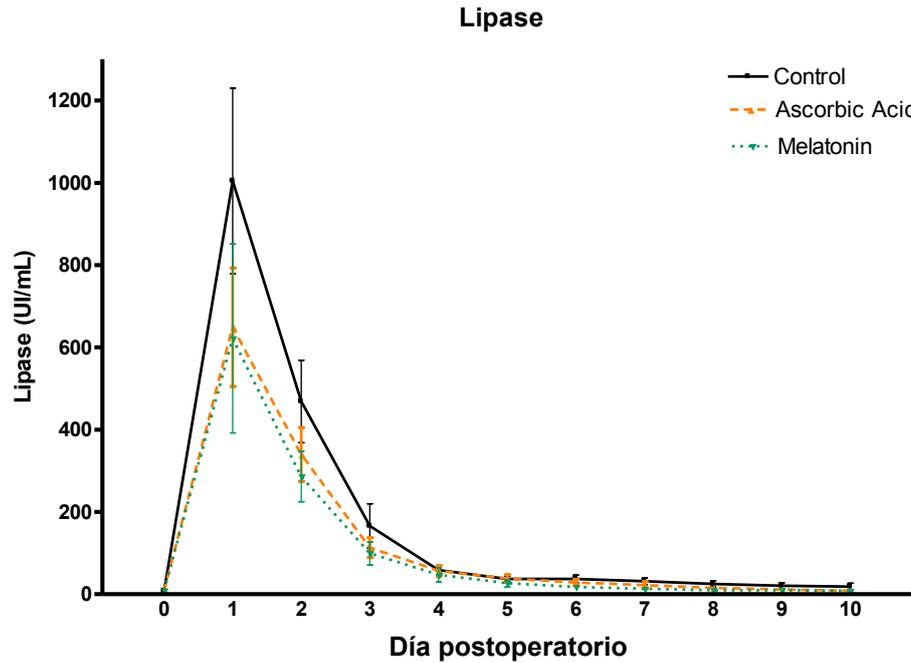


Figura 49. Niveles séricos de lipasa basales y después del alotrasplante de páncreas en el cerdo, sin inmunosupresión, con 8 horas de preservación fría en solución UW.

7. CONCENTRACIONES DE MDA y 4-HDA EN LOS INJERTOS PANCREÁTICOS

Se analizaron las concentraciones de MDA + 4-HDA para evaluar el estrés oxidativo (Figura 50). Todos los homogeneizados de páncreas mostraron un incremento en las concentraciones de MDA + 4-HDA a los 30 minutos de la reperusión en comparación a los niveles observados inmediatamente antes del clampaje vascular del injerto en el donante y después de 0 h y 8 h de isquemia fría. Este incremento en la reperusión fue significativa en los grupos control y AA ($P=0.010$ y $P=0.040$, respectivamente), pero no en los animales tratados con melatonina ($P=0.060$).

En general, la peroxidación lipídica en el grupo melatonina fue mucho menor que en el control, tanto antes ($P=0.001$ inmediatamente antes del clampaje en el donante;

$P=0.007$ inmediatamente después de la perfusión-lavado *ex situ* del injerto; $P=0.006$ después de 8 h de isquemia fría) como después del trasplante ($P=0.017$ a los 30 minutos tras la reperfusión). En contraste, la peroxidación lipídica en el grupo AA fue sólo significativamente menor que en el grupo control después de la reperfusión ($P=0.037$).

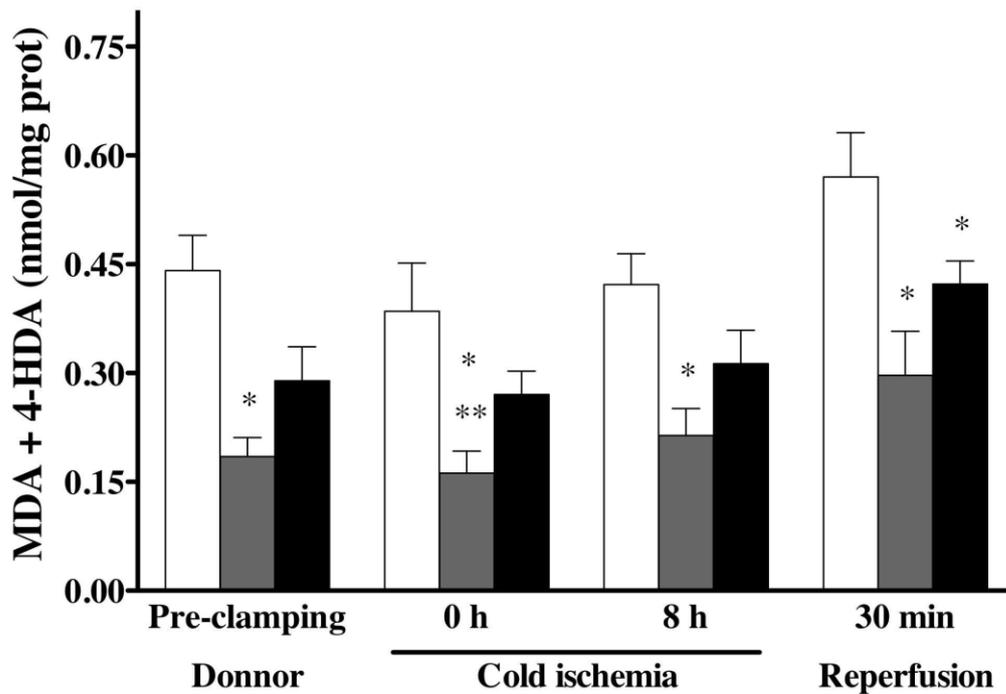


Figura 50. Concentraciones de malonildialdehido (MDA) y 4-hidroxiacetaldehidos (4-HDA) en los aloinjertos pancreáticos. Las concentraciones máximas se detectaron en homogeneizados de páncreas después de 30 minutos de la reperfusión. El tratamiento con melatonina (■) o ácido ascórbico (■) redujo significativamente el estrés oxidativo durante la reperfusión en comparación con el grupo control sin tratamiento (□) (44.13 y 25.92% respectivamente). Antes del clampaje en el donante, o después de 0 y 8 horas de isquemia fría, sólo la melatonina protegió contra la peroxidación lipídica (58.05, 56.88 y 48.58%, respectivamente). Los datos se expresan como media \pm error estándar ($n=8$ trasplantes de páncreas por grupo). Se muestran las diferencias significativas ($P \leq 0.05$); * denota vs grupo control, y ** vs grupo tratado con ácido ascórbico.

8. CONCENTRACION DE LOS RESTOS CARBONILO DE LAS PROTEÍNAS EN LOS INJERTOS PANCREÁTICOS

Globalmente, los valores tisulares pancreáticos de los restos carbonilo experimentaron una moderada elevación después del lavado del injerto “ex situ” (tiempo B) respecto a los valores basales (tiempo A). La elevación se acentuó tras las 8 horas de preservación fría (tiempo C) ($p \leq 0,05$). A los 30 minutos de la revascularización del injerto (tiempo D) los restos carbonilos descendieron respecto a los tiempos de almacenamiento frío (Figura 51).

Según el tratamiento antioxidante, el menor incremento de los restos carbonilos se observó tras las 8 horas de preservación fría en el grupo de animales tratados con melatonina. Asimismo, el menor descenso tras la revascularización sucedió en este grupo. Sin embargo, no hubo diferencias significativas entre los grupos.

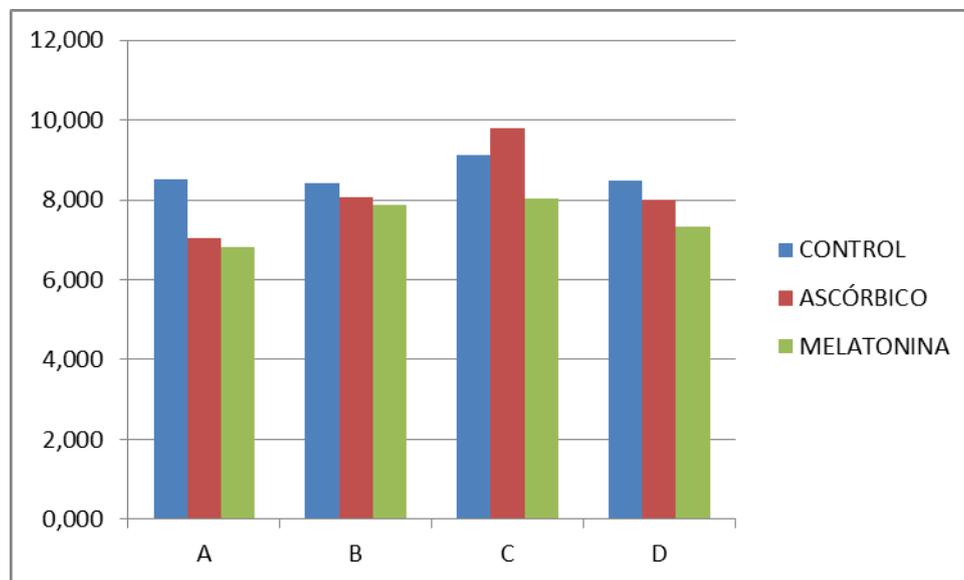


Figura 51. Concentración de los restos carbonilo de las proteínas (nmol / mg proteína) en los aloinjertos pancreáticos. Se observa una elevación de los carbonilos durante la isquemia fría y un descenso de los mismos a los 30 minutos de la reperfusión.

9. RESPUESTA DE LA pMAP/ITIH₄ AL TRASPLANTE DE PÁNCREAS

La media basal (antes del trasplante) de los niveles séricos de pMAP/ITIH₄ fueron 1.07 ± 0.09 mg/mL en el grupo control, 0.82 ± 0.19 mg/mL en el grupo melatonina y 0.86 ± 0.15 mg/mL en el grupo AA ($P > 0,05$). Después del TP se observó un acusado incremento en la concentración sérica de la proteína en todos los grupos. El incremento comenzó el día 1, donde fue cinco-seis veces los valores basales, y continuó hasta alcanzar un pico el día 3. Este pico de la pMAP/ITIH₄ alcanzó ocho-nueve veces el nivel basal en el grupo control (8.72 ± 1.26 mg/mL) y en el grupo AA (9.95 ± 1.86 mg/mL), pero sólo alrededor de 5 veces el nivel basal en el grupo melatonina (5.39 ± 0.61 mg/mL). Así, en el día 3 postrasplante, la pMAP/ITIH₄ en el grupo melatonina fue significativamente inferior que en el grupo control ($P=0.049$) y el grupo AA ($P=0.021$).

La figura 52 ilustra los niveles de pMAP/ITIH₄.

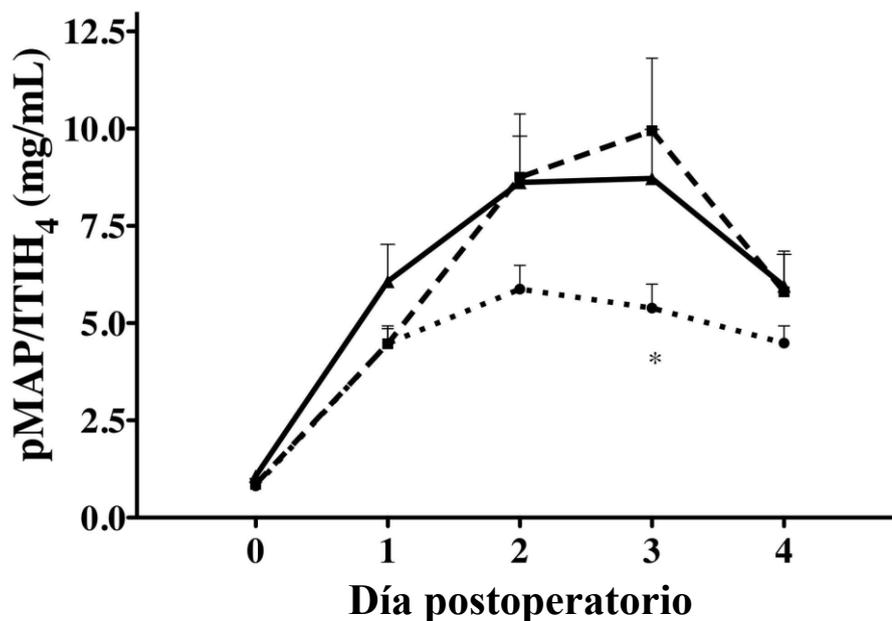


Figura 52. Concentraciones séricas de la pig-major acute-phase protein/inter- α -trypsin inhibitor heavy chain 4 (pMAP/ITIH₄) basales y en los cuatro primeros días después del alotrasplante de páncreas en el cerdo, sin inmunosupresión, con 8 horas de preservación fría en solución UW. Grupo control (\blacktriangle) y grupos de tratamiento con melatonina (\bullet) y ácido ascórbico (\blacksquare) (n=8 cada grupo). Los datos se expresan como media \pm error estándar. *Denota diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$) vs animales controles y animales tratados con ácido ascórbico.

10 ESTUDIO ANATOMOPATOLÓGICO

En las reintervenciones de los receptores, realizadas cuando la glucemia era mayor de 150 mg/dL durante dos días consecutivos, los hallazgos fueron constantes: el injerto pancreático se encontraba endurecido, aumentado de grosor dos-tres veces lo normal, de color rosa-grisáceo, sin trombosis arterial ni venosa; la anastomosis duodeno-ileal era normal y sin fugas, pero el duodeno estaba adelgazado y de coloración rosa-purpúrea. El aloinjerto pancreático-duodenal estaba fuertemente adherido a estructuras vecinas y a asas intestinales que lo circundaban.

El estudio histopatológico mostró en todos los aloinjertos hallazgos acordes con rechazo celular agudo, mayoritariamente de grado severo (grado III en la clasificación con esquema de Banff) (143), con áreas de grado moderado (grado II): inflamación acinar difusa, con pérdida de estructuras acinares secundarias a necrosis confluyente y fibrosis resolutive, permeación linfocitaria del epitelio ductal (Figuras 53 y 54), y signos de arteritis severa, con afectación de capas intimal, medial, y adventicial (Figuras 55 y 56), sin llegar a configurar un cuadro de arteritis necrotizante.

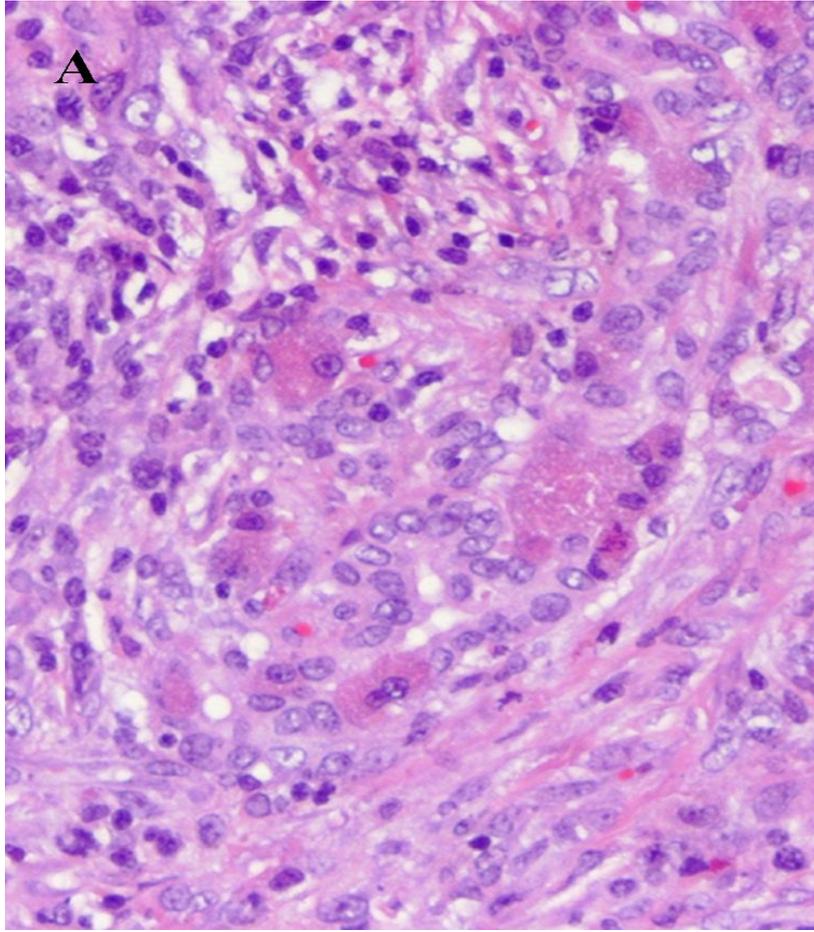


Figura 53. Rechazo celular agudo de acuerdo con el esquema de Banff en aloinjerto de páncreas porcino, sin inmunosupresión, con 8 horas de preservación fría en solución UW. Pérdida del parénquima exocrino con infiltrado linfoide y atrofia acinar (hematoxilina-eosina, 400x).

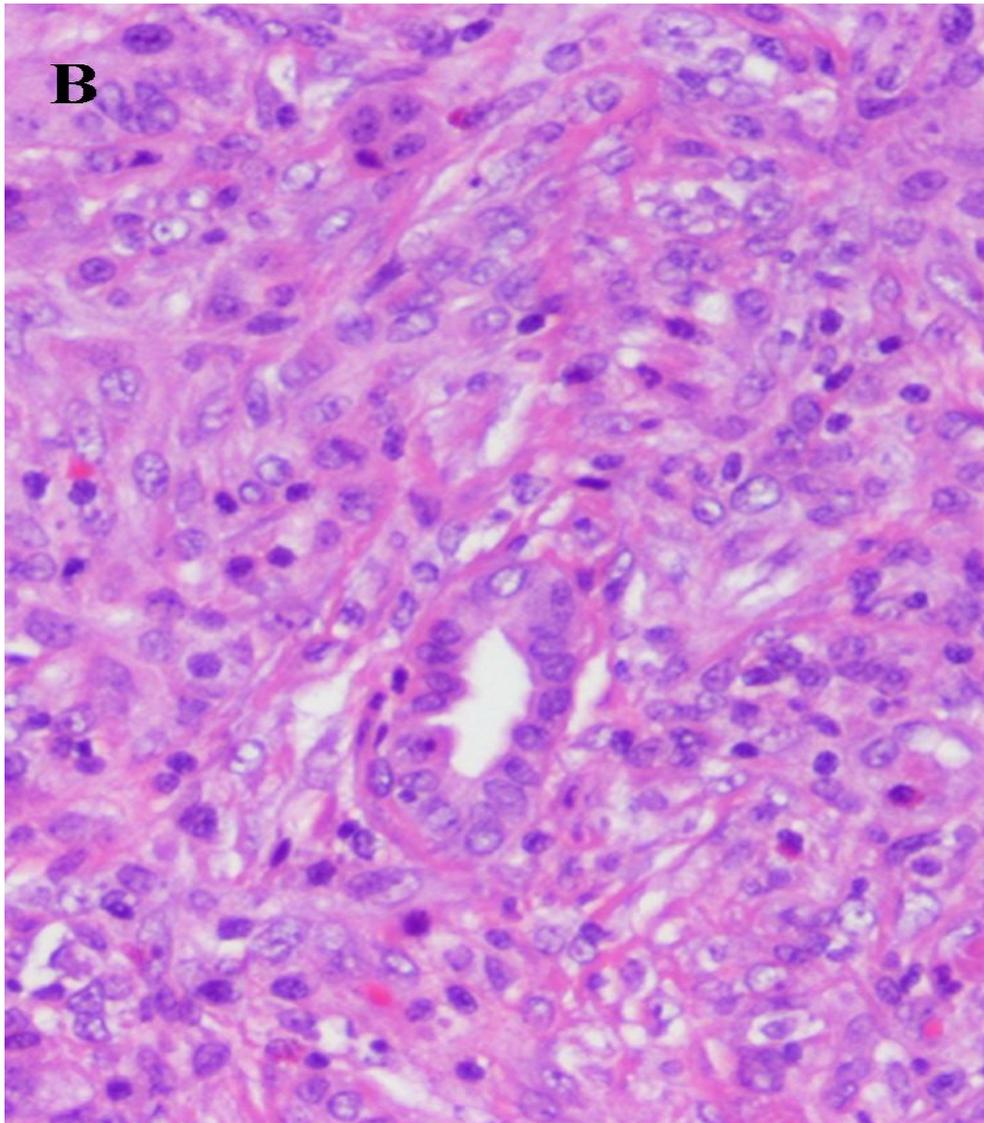


Figura 54. Rechazo celular agudo de acuerdo con el esquema de Banff en aloinjerto de páncreas porcino, sin inmunosupresión, con 8 horas de preservación fría en solución UW. Infiltrado linfoide ductal y cambios reactivos asociados (hematoxilina-eosina, 400x).

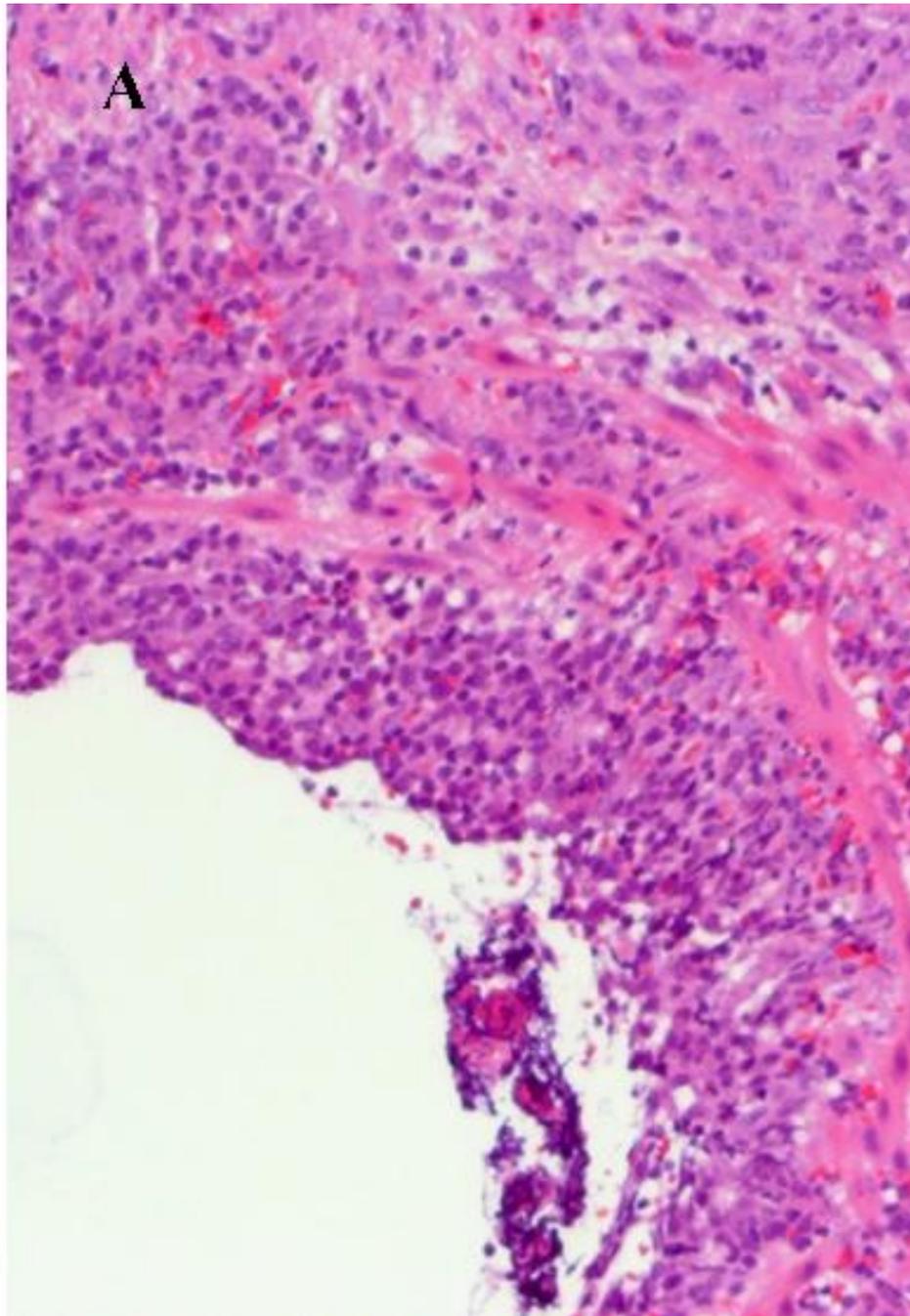


Figura 55. Rechazo celular agudo grado III de acuerdo con el esquema de Banff en aloinjerto de páncreas porcino, sin inmunosupresión, con 8 horas de preservación fría en solución UW. Infiltrado linfoide de la pared vascular reflejando arteritis (hematoxilina-eosina, 400x).

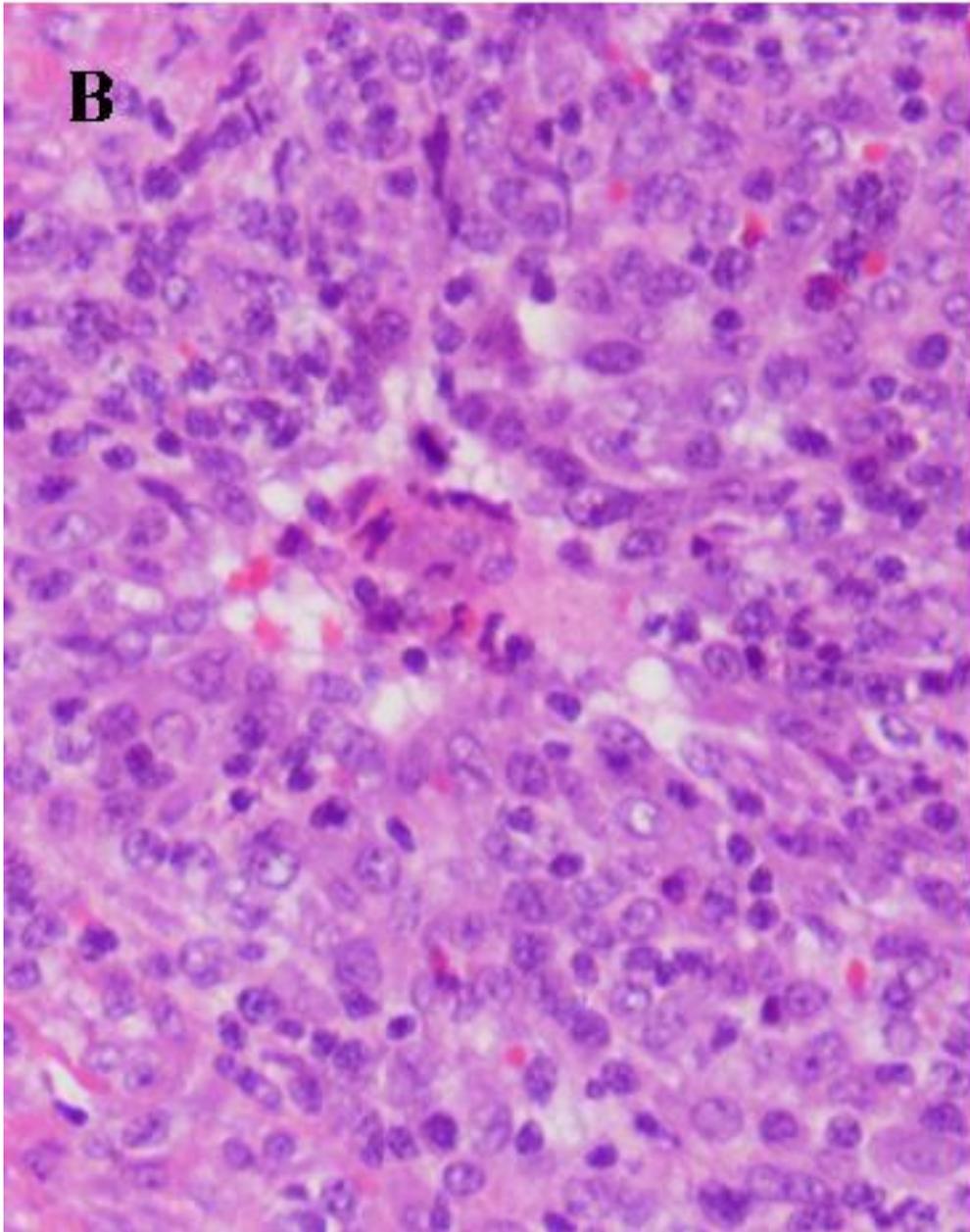


Figura 56. Rechazo celular agudo grado III de acuerdo con el esquema de Banff en aloinjerto de páncreas porcino, sin inmunosupresión, con 8 horas de preservación fría en solución UW. Detalle de la vasculitis de la capa íntima y medial de un mismo vaso (hematoxilina-eosina, 400x).

V

**RESULTADOS INDIVIDUALIZADOS
DE LOS
ALOTRASPLANTES DE PÁNCREAS
EN EL CERDO**

ALOTRASPLANTE DE PÁNCREAS CON DERIVACIÓN ENTÉRICA EN EL CERDO (1)

Antioxidante	Tiempo preservación	Solución preservación	Isquemia caliente
Melatonina	8 horas	Viaspan	45 min

Peso injerto tras extrac.	Peso injerto tras lavado	Peso injerto tras preserv	Aspecto injerto postreperusión
119,3 g	112,8 g	105,5 g	Muy bueno

LI (cm) ant-post donante	LD (cm) ant-post donante	LI ant-post post-reperusión	LD ant-post post-reperusión	Grado edema 0, 1, 2, 3, 4	Días normogluc.
1,1	1,4	1,6	2,1	2 LI; 2-3LD	11

Parámetro	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 9	Día 10
Glucemia	93	62	59	72	78	84	93	99	101	113	112
Amilasas	849	4279	2941	1337	685	724	635	547	570	560	543
Lipasas	13,8	604,9	397,5	80,2	25,7	14,2	9,4	9,6	8,4	7,4	5,1
Insulina	1,75	15,4	11,9	3,5	3,5	3,6	3,2	2,9	2,6	2,2	1,75
C-péptido	0,1	0,61	0,42	0,23	0,25	0,27	0,27	0,29	0,25	0,23	0,21
PIG-MAP	0,82	2,88	3,17	2,88							

Parámetro	Día 11	Día 12									
Glucemia	148	289									
Amilasas	480	439									
Lipasas	5	4,7									
Insulina	1,70	1,75									
C-péptido	0,19	0,11									

	MUESTRA A	MUESTRA B	MUESTRA C	MUESTRA D
MDA + 4HDA	0,428	0,225	0,364	0,551
Carbonilos	8,864	9,790	10,820	11,385

ALOTRASPLANTE DE PÁNCREAS CON DERIVACIÓN ENTÉRICA EN EL CERDO (2)

Antioxidante	Solución preservación	Tiempo preservación	Isquemia caliente
Melatonina	Viaspan	8 horas	55 min

Peso injerto tras extrac.	Peso injerto tras lavado	Peso injerto tras preserv	Aspecto injerto postreperusión
144 g	137,7 g	128,8 g	bueno

LI (cm) ant-post donante	LD (cm) ant-post donante	LI ant-post post-reperusión	LD ant-post post-reperusión	Grado edema 0, 1, 2, 3, 4	Días normogluc.
0,90	1,4	1,5	1,5	2-3 LI; 1-2 LD	10

Parámetro	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 9	Día 10
Glucemia	87	78	57	51	61	69	97	93	96	112	116
Amilasas	924	8673	5143	2729	1700	1083	814	763	719	619	600
Lipasas	8	470	370,5	258,2	149	81,9	51,4	43	19,8	15,6	11,3
Insulina	1,75	10	4,8	6,5	11,75	2,5	2,3	4	3,9	2,6	1,75
C-péptido	0,1	0,12	0,13	0,28	0,28	0,28	0,29	0,34	0,31	0,3	0,28
PIG-MAP	0,59	5,3	8,19	7,81	4,44						

Parámetro	Día 11	Día 12									
Glucemia	252	318									
Amilasas	543	433									
Lipasas	10,2	9,6									
Insulina	1,75	1,75									
C-péptido	0,12	0,14									

Parámetro	MUESTRA A	MUESTRA B	MUESTRA C	MUESTRA D
MDA + 4HDA	0,192	0,290	0,158	
Carbonilos	6,009	8,207	7,973	6,340

ALOTRASPLANTE DE PÁNCREAS CON DERIVACIÓN ENTÉRICA EN EL CERDO (3)

Antioxidante	Solución preservación	Tiempo preservación	Isquemia caliente
Melatonina	Viaspan	8 horas	50 min

Peso injerto tras extrac.	Peso injerto tras lavado	Peso injerto tras preserv	Aspecto injerto postreperusión
106,6 g	100,9 g	97 g	Excelente

LI (cm) ant-post donante	LD (cm) ant-post donante	LI ant-post post-reperusión	LD ant-post post-reperusión	Grado edema 0, 1, 2, 3, 4	Días normogluc.
1,10	1,3	1,75	2	2 LI; 1-2 LD	5

Parámetro	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7			
Glucemia	76	62	50	68	61	62	195	298			
Amilasas	989	8147	2996	1556	763	628	784	627			
Lipasas	7,4	444,5	134,5	41,2	15	11,2	10,9	6,9			
Insulina	1,75	10,1	2,3	5,5	2,6	5,3	6,3	1,75			
C-péptido	0,1	0,29	0,17	0,31	0,18	0,26	0,4	0,1			
PIG-MAP	1,08	4,27	6,6	6,8							

Parámetro	MUESTRA A	MUESTRA B	MUESTRA C	MUESTRA D
MD A + 4HDA	0,206	0,183	0,328	0,593
Carbonilos	8,004	9,583	11,366	9,321

ALOTRASPLANTE DE PÁNCREAS CON DERIVACIÓN ENTÉRICA EN EL CERDO (4)

Antioxidante	Solución preservación	Tiempo preservación	Isquemia caliente
Melatonina	Viaspan	8 horas	45 min

Peso injerto tras extrac.	Peso injerto tras lavado	Peso injerto tras preserv	Aspecto injerto postreperusión
115,9 g	112,3 g	105,8 g	Excelente

LI (cm) ant-post donante	LD (cm) ant-post donante	LI ant-post post-reperusión	LD ant-post post-reperusión	Grado edema 0, 1, 2, 3, 4	Días normogluc.
1	1,4	1,5	1,9	3 LI; 3 LD	30

Parámetro	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 9	Día 10
Glucemia	92	64	55	56	78	70	61	69	71	81	81
Amilasas	726	5706	4515	1654	858	582	446	402	379	417	436
Lipasas	14,5	356,6	283,3	85,8	43,5	24	12,3	8,4	6,5	5,6	5,9
Insulina	1,75	12	8,3	4,6	22	6,6	5,1	2,4	4,8	4,6	3,5
C-péptido	0,1	0,24	0,4	0,48	0,85	0,46	0,35	0,4	0,25	0,23	0,15
PIG-MAP	0,55	3,79	4,95	4,44	5,48						

Parámetro	Día 11	Día 12	Día 13	Día 14	Día 15	Día 23	Día 29	Día 30			
Glucemia	83	86	104	115	121	110	179	235			
Amilasas	440	426	430	437	443	389	350	364			
Lipasas	5,7	5,1	5,4	5	5,2	4,7	4,3	4,5			
Insulina	1,75	1,75	1,75	1,75	1,75	1,75	1,75	1,75			
C-péptido	0,13	0,37	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,1			

Parámetro	MUESTRA A	MUESTRA B	MUESTRA C	MUESTRA D
MDA + 4HDA	0,121	0,126	0,135	0,171
Carbonilos	8,373	11,227	9,482	10,191

ALOTRASPLANTE DE PÁNCREAS CON DERIVACIÓN ENTÉRICA EN EL CERDO (5)

Antioxidante	Solución preservación	Tiempo preservación	Isquemia caliente
Melatonina	Viaspan	8 horas	50 min

Peso injerto tras extrac.	Peso injerto tras lavado	Peso injerto tras preserv	Aspecto injerto postreperusión
99,5 g	96,7 g	92,3 g	Bueno

LI (cm) ant-post donante	LD (cm) ant-post donante	LI ant-post post-reperusión	LD ant-post post-reperusión	Grado edema 0, 1, 2, 3, 4	Días normogluc.
1,1	1,5	1,7	2	2 LI; 2-3LD	16

Parámetro	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 9	Día 10
Glucemia	68	47	48	62	78	85	88	94	97	98	96
Amilasas	433	5818	2696	1491	521	3383	345	386	460	396	384
Lipasas	5,2	271,2	217	151,7	87,7	48,4	32,8	15,1	24,1	29,6	21,8
Insulina	1,75	12,1	8,4	4,7	3,2	6,5	5,5	6,5	3,8	5,1	3,8
C-péptido	0,1	0,51	0,4	0,29	0,22	0,31	0,34	0,39	0,29	0,41	0,27
PIG-MAP				7,4	6,03						

Parámetro	Día 11	Día 12	Día 13	Día 14	Día 15	Día 16	Día 17	Día 18	Día 19		
Glucemia	93	110	122	132	99	123	212	259	233		
Amilasas	374	383	356	341	315	267	252	212	193		
Lipasas	9,5	9,7	8,9	8,6	4,3	4,7	5,1	3,6	3,7		
Insulina	1,75	1,75	1,75	1,75	1,75	1,75	1,75	1,75	1,75		
C-péptido	0,19	0,16	0,17	0,25	0,16	0,16	0,27	0,1	0,11		

Parámetro	MUESTRA A	MUESTRA B	MUESTRA C	MUESTRA D
MDA + 4HDA	0,080	0,068	0,076	0,227
Carbonilos	12,457	11,199	11,378	9,625

ALOTRASPLANTE DE PÁNCREAS CON DERIVACIÓN ENTÉRICA EN EL CERDO (6)

Antioxidante	Solución preservación	Tiempo preservación	Isquemia caliente
Melatonina	Viaspan	8 horas	45 min

Peso injerto tras extrac.	Peso injerto tras lavado	Peso injerto tras preserv	Aspecto injerto postreperusión
166,2 g	159 g	148,3 g	Excelente

LI (cm) ant-post donante	LD (cm) ant-post donante	LI ant-post post-reperusión	LD ant-post post-reperusión	Grado edema 0, 1, 2, 3, 4	Días normogluc.
1,1	1,8	1,8	2	2-3 LI; 1-2 LD	12

Parámetro	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 9	Día 10
Glucemia	68	65	61	73	81	80	89	99	96	87	90
Amilasas	692	7642	3927	955	700	576	505	459	479	493	469
Lipasas	6,9	493,8	250,9	32,1	11,9	7,1	4,7	5,3	4,8	5,2	4,8
Insulina	11,75	16,8	10,5	8,5	4,3	3,3	9,8	10,5	8,6	8,7	8
C-péptido	0,1	0,69	0,4	0,4	0,3	0,21	0,48	0,5	0,66	0,47	0,4
PIG-MAP	1,79	6,03	7	4,44	3,95						

Parámetro	Día 11	Día 12	Día 13	Día 14	Día 15						
Glucemia	72	120	201	196	250						
Amilasas	452	408	387	394	377						
Lipasas	5,2	5,8	7,4	7,1	4,9						
Insulina	4,8	5,6	4,4	1,6	1,75						
C-péptido	0,31	0,35	0,27	0,21	0,1						

Parámetro	MUESTRA A	MUESTRA B	MUESTRA C	MUESTRA D
MDA + 4HDA	0,292	0,311	0,330	0,430
Carbonilos	5,293	6,012	6,469	7,378

ALOTRASPLANTE DE PÁNCREAS CON DERIVACIÓN ENTÉRICA EN EL CERDO (7)

Antioxidante	Solución preservación	Tiempo preservación	Isquemia caliente
Melatonina	Viaspan	8 horas	45 min

Peso injerto tras extrac.	Peso injerto tras lavado	Peso injerto tras preserv	Aspecto injerto postreperusión
129,8 g	122,4 g	115,6 g	estupendo

LI (cm) ant-post donante	LD (cm) ant-post donante	LI ant-post post-reperusión	LD ant-post post-reperusión	Grado edema 0, 1, 2, 3, 4	Días normogluc.
1,1	1,6	1,6	1,8	1-2 LI; 1 LD	57

Parámetro	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 9	Día 10
Glucemia	68	62	61	81	82	86	86	85	82	62	83
Amilasas	865	1647	1226	805	756	712	686	781	863	895	886
Lipasas	5,4	162,7	68,2	18,3	8	6,3	5,1	5,1	5	4,8	4,9
Insulina	1,75	15,5	5,4	12,1	9,1	5,2	7,5	8,3	3	6	4,1
C-péptido	0,1	0,57	0,3	0,66	0,55	0,38	0,52	0,54	0,33	0,35	0,4
PIG-MAP	0,6	4,27	5,85	4,52	3,17						

Parámetro	Día 11	Día 12	Día 15	Día 30	Día 55	Día 57	Día 58	Día 59			
Glucemia	83	71	80	95	147	149	193	234			
Amilasas	956	892	851	874	438	457	416	409			
Lipasas	4,9	4,9	4,5	4,8	4,9	4,1	4,3	4,1			
Insulina	16	8,9	1,75	1,75	1,75	1,75	1,75	1,75			
C-péptido	0,81	0,55	0,24	0,27	0,18	0,2	0,11	0,1			

Parámetro	MUESTRA A	MUESTRA B	MUESTRA C	MUESTRA D
MDA + 4HDA	0,301	0,263	0,283	
Carbonilos	2,492	2,122	2,661	2,843

ALOTRASPLANTE DE PÁNCREAS CON DERIVACIÓN ENTERICA EN EL CERDO (8)

Antioxidante	Solución preservación	Tiempo preservación	Isquemia caliente
Melatonina	Viaspan	8 horas	55 min

Peso injerto tras extrac.	Peso injerto tras lavado	Peso injerto tras preserv	Aspecto injerto post-reperusión
150,2 g	138,9 g	130 g	Excelente

LI (cm) ant-post donante	LD (cm) ant-post donante	LI ant-post post-reperusión	LD ant-post post-reperusión	Grado edema 0, 1, 2, 3, 4	Días normogluc.
1,1	1,4	1,8	1,3	1-2 LI; 1 LD	60

Parámetro	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 9	Día 10
Glucemia	89	67	66	61	54	42	88	85	84	76	78
Amilasas	1058	12819	5661	2641	1354	878	845	825	778	670	650
Lipasas	5,4	2189,9	611,6	164,9	33,8	18,7	11	8,3	5,7	4,9	4,8
Insulina	1,75	9,3	10,8	11,6	8,6	4,8	3,6	3,9	3,8	3,5	3,6
C-péptido	0,15	0,6	0,6	0,62	0,54	0,33	0,32	0,27	0,34	0,37	0,42
PIG-MAP	0,3	4,77	5,37	4,81	3,85						

Parámetro	Día 16	Día 17	Día 18	Día 19	Día 20	Día 30	Día 50	Día 56	Día 59	Día 60	Día 62
Glucemia	61	90	86	88	89	130	126	102	124	165	175
Amilasas	899	774	821	769	977	1035	1013	788	745	763	756
Lipasas	4,4	4,6	4,6	4,7	4,7	4,6	4	6,2	4,4	4,3	4,1
Insulina	1,75	5,6	1,75	2,2	3	1,75	4	7,1	2,5	4	11
C-péptido	0,47	0,56	0,23	0,34	0,31	0,35	0,28	0,28	0,28	0,28	0,73

Parámetro	MUESTRA A	MUESTRA B	MUESTRA C	MUESTRA D
MDA + 4HDA	0,22	0,203	0,191	0,289
Carbonilos	3,157	4,847	4,068	1,427

ALOTRASPLANTE DE PÁNCREAS CON DERIVACIÓN ENTÉRICA EN EL CERDO (9)

Solución preservación	Tiempo preservación	Antioxidante	Isquemia caliente
Viaspan	8 horas	Ac. ascórbico	55 min

Peso injerto tras extrac.	Peso injerto tras lavado	Peso injerto tras preserv	Aspecto injerto postreperusión
193,3 g	188,3 g	176,3	Bueno

LI (cm) ant-post donante	LD (cm) ant-post donante	LI ant-post post-reperusión	LD ant-post post-reperusión	Grado edema 0, 1, 2, 3, 4	Días normogluc.
-	-	-	-	2 LI; 2-3LD	10

Parámetro	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 9	Día 10
Glucemia	74	36	57	49	53	60	86	93	98	116	127
Amilasas	1641	1969	2239	1898	1020	713	654	554	517	487	434
Lipasas	5,9	993	402,3	250,6	127,5	51	34,4	21,6	15	10,4	7,2
Insulina	1,75	14,8	18,4	10,2	4	3,2	2,4	3,9	3,2	2,5	1,75
C-péptido	0,1	0,85	0,96	0,81	0,4	0,44	0,34	0,5	0,51	0,3	0,21
PIG-MAP	1,52	4,73	15,97	16,75	10,41						

Parámetro	Día 11	Día 12									
Glucemia	216	224									
Amilasas	389	376									
Lipasas	5,4	4,9									
Insulina	1,75	1,75									
C-péptido	0,11	0,11									

Parámetro	MUESTRA A	MUESTRA B	MUESTRA C	MUESTRA D
MDA + 4HDA	0,313	0,324	0,424	0,284
Carbonilos	10,217	11,584	14,534	15,027

**ALOTRASPLANTE DE PÁNCREAS CON DERIVACIÓN ENTÉRICA
EN EL CERDO (10)**

Antioxidante	Solución preservación	Tiempo preservación	Isquemia caliente
Ac. ascórbico	Viaspan	8 horas	45 min

Peso injerto tras extrac.	Peso injerto tras lavado	Peso injerto tras preserv	Aspecto injerto postreperusión
172,8 g	-	148,5 g	Muy bueno

LI (cm) ant-post donante	LD (cm) ant-post donante	LI ant-post post-reperusión	LD ant-post post-reperusión	Grado edema 0, 1, 2, 3, 4	Días normogluc.
1,1	1,3	1,9	1,9	3 LI; 1 LD	15

Parámetro	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 9	Día 10
Glucemia	90	36	44	62	66	68	77	75	66	59	80
Amilasas	1067	12.470	7.519	2818	971	679	748	758	708	482	653
Lipasas	4,5	1083,5	437,5	102,8	80,8	73	69	77,4	44	30	20
Insulina	1,75	14,3	9,8	2,9	8	7	10,2	14,5	6,4	13,4	8
C-péptido	0,11	0,44	0,38	0,23	0,38	0,48	0,59	0,47	0,46	0,64	0,64
PIG-MAP	1,29	2,53	7,42	9,04	6,49						

Parámetro	Día 11	Día 12	Día 13	Día 14	Día 15	Día 16	Día 17				
Glucemia	78	98	109	114	119	212	280				
Amilasas	662	687	729	634	575	537	462				
Lipasas	12,8	8,7	6,8	6,5	6,2	5,6	4,1				
Insulina	6,5	7,5	13,6	5,4	4,3	2,3	2,2				
C-péptido	0,68	0,58	0,38	0,24	0,17	0,11	0,11				

Parámetro	MUESTRA A	MUESTRA B	MUESTRA C	MUESTRA D
MDA + 4HDA	0,473	0,445	0,572	0,591
Carbonilos	8,603	9,855	11,891	9,854

**ALOTRASPLANTE DE PÁNCREAS CON DERIVACIÓN ENTÉRICA
EN EL CERDO (11)**

Antioxidante	Solución preservación	Tiempo preservación	Isquemia caliente
Ac. ascórbico	Viaspan	8 horas	50 min

Peso injerto tras extrac.	Peso injerto tras lavado	Peso injerto tras preserv	Aspecto injerto postreperusión
126 g	-	108,6 g	Bueno

LI (cm) ant-post donante	LD (cm) ant-post donante	LI ant-post post-reperusión	LD ant-post post-reperusión	Grado edema 0, 1, 2, 3, 4	Días normogluc.
1,3	1,4	2,1	2,2	4	5

Parámetro	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 9	Día 10
Glucemia	85	73	46	59	82	92	156	179	196	199	247
Amilasas	731	7377	4610	3146	2038	1425	846	716	669	393	350
Lipasas	6,4	183,7	423	99,3	58,6	29	18,4	11,5	8	6,3	4,4
Insulina	11,75	14,1	9,6	2,8	8,3	2,5	3	1,75	1,75	1,75	1,75
C-péptido	0,12	0,49	0,28	0,18	0,48	0,36	0,22	0,13	0,1	0,1	0,1
PIG-MAP	0,99	3,65		9,7	4,73						

Parámetro	MUESTRA A	MUESTRA B	MUESTRA C	MUESTRA D
MDA + 4HDA	0,361	0,204	0,201	0,455
Carbonilos	8,285	7,196	6,686	5,883

ALOTRASPLANTE DE PÁNCREAS CON DERIVACIÓN ENTÉRICA EN EL CERDO (12)

Antioxidante	Solución preservación	Tiempo preservación	Isquemia caliente
Ac. ascórbico	Viaspan	8 horas	48 min

Peso injerto tras extrac.	Peso injerto tras lavado	Peso injerto tras preserv	Aspecto injerto postreperusión
125,5 g	121 g	114,9 g	Muy bueno

LI (cm) ant-post donante	LD (cm) ant-post donante	LI ant-post post-reperusión	LD ant-post post-reperusión	Grado edema 0, 1, 2, 3, 4	Días normogluc.
1	1,5	1,2	1,7	1	10

Parámetro	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 9	Día 10
Glucemia	96	61	58	53	55	67	87	81	79	74	74
Amilasas	609	6004	3.600	1981	1065	744	605	490	462	417	397
Lipasas	5,9	292,1	132,8	50	29	10	6,4	5,3	5,5	5,2	4,5
Insulina	1,75	20,4	24,1	10,7	10,9	7,8	11,2	5,3	6	8,7	5,3
C-péptido	0,1	0,58	0,76	0,45	0,45	0,45	0,45	0,35	0,37	0,37	0,28
PIG-MAP	0,9	6,18	8,95	5,33							

Parámetro	Día 11	Día 12									
Glucemia	216	372									
Amilasas	382	348									
Lipasas	3,8	4,2									
Insulina	6,7	1,75									
C-péptido	0,42	0,12									

Parámetro	MUESTRA A	MUESTRA B	MUESTRA C	MUESTRA D
MDA + 4HDA	0,440	0,276	0,354	0,441
Carbonilos	0,865	7,381	10,435	8,866

ALOTRASPLANTE DE PÁNCREAS CON DERIVACIÓN ENTÉRICA EN EL CERDO (13)

Antioxidante	Solución preservación	Tiempo preservación	Isquemia caliente
Ac. ascórbico	Viaspan	8 horas	48 min

Peso injerto tras extrac.	Peso injerto tras lavado	Peso injerto tras preserv	Aspecto injerto postreperusión
85,5 g	80,5 g	74,9 g	Muy bueno

LI (cm) ant-post donante	LD (cm) ant-post donante	LI ant-post post-reperusión	LD ant-post post-reperusión	Grado edema 0, 1, 2, 3, 4	Días normogluc.
1,3	1,4	2	1,9	3-4 LI; 1 LD	6

Parámetro	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 9	Día 10
Glucemia	76	60	46	43	47	68	103	218	238	252	254
Amilasas	609	5586	3831	1823	898	627	803	710	663	625	666
Lipasas	9,2	1011,1	488,9	148	51,8	26	22,3	10,2	7	8	9
Insulina	1,75	8,9	2,3	1,75	1,75	1,75	1,75	1,75	1,75	1,75	1,75
C-péptido	0,1	0,35	0,14	0,19	0,2	0,16	0,1	0,1	0,1	0,1	0,13
PIG-MAP	0,83	3,3	3,85		2,78						

Parámetro	MUESTRA A	MUESTRA B	MUESTRA C	MUESTRA D
MDA + 4HDA	0,106	0,224	0,272	0,435
Carbonilos	9,728	11,160	10,406	10,869

ALOTRASPLANTE DE PÁNCREAS CON DERIVACIÓN ENTÉRICA EN EL CERDO (14)

Antioxidante	Solución preservación	Tiempo preservación	Isquemia caliente
Ac. ascórbico	Viaspan	8 horas	45 min

Peso injerto tras extrac.	Peso injerto tras lavado	Peso injerto tras preserv	Aspecto injerto postreperusión
122,4 g	115,4 g	105,4 g	Bueno

LI (cm) ant-post donante	LD (cm) ant-post donante	LI ant-post post-reperusión	LD ant-post post-reperusión	Grado edema 0, 1, 2, 3, 4	Días normogluc.
1,1	1,3	1,5	1,5	3 LI; 3 LD	5

Parámetro	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 9	Día 10
Glucemia	68	63	69	72	74	95	219	239	260		
Amilasas	460	5979	2812	1562	368	193	176	191	201		
Lipasas	6,7	567,2	193,3	87,3	22,4	11	7,4	5,3	4,7		
Insulina	1,75	7,9	3,7	5,7	4,7	1,75	1,75	1,75	1,75		
C-péptido	0,1	0,31	0,28	0,26	0,26	0,11	0,1	9,1	0,1		
PIG-MAP	0,33	4,91	7,67		5,34						

Parámetro	MUESTRA A	MUESTRA B	MUESTRA C	MUESTRA D
MDA + 4HDA	0,197	0,158	0,207	0,408
Carbonilos	6,563	7,468	8,802	1,724

ALOTRASPLANTE DE PÁNCREAS CON DERIVACIÓN ENTÉRICA EN EL CERDO (15)

Antioxidante	Solución preservación	Tiempo preservación	Isquemia caliente
Ac. ascórbico	Viaspan	8 horas	55 min

Peso injerto tras extrac.	Peso injerto tras lavado	Peso injerto tras preserv	Aspecto injerto postreperusión
128 g	124,2 g	118,8 g	Bueno

LI (cm) ant-post donante	LD (cm) ant-post donante	LI ant-post post-reperusión	LD ant-post post-reperusión	Grado edema 0, 1, 2, 3, 4	Días normogluc.
1,2	1,7	1,9	2	3 LI; 2 LD	7

Parámetro	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 9	Día 10
Glucemia	118	40	40	19	54	57	64	87	151	178	204
Amilasas	815	17670	11043	3162	1934	1441	1322	1120	1046	986	780
Lipasas	6,9	950	579	137,8	70	78,2	52	32,7	22,8	15,9	11,1
Insulina	1,75	7,5	3,6	8,7	7,8	3,6	2,5	2,6	1,75	1,75	1,75
C-péptido	0,13	0,21	0,38	0,54	0,55	0,29	0,41	0,41	0,38	0,16	0,1
PIG-MAP	0,47	6,18		8,93							

Parámetro	MUESTRA A	MUESTRA B	MUESTRA C	MUESTRA D
MDA + 4HDA	0,271	0,321	0,227	0,342
Carbonilos	4,960	1,872	5,735	4,727

**ALOTRASPLANTE DE PÁNCREAS CON DERIVACIÓN ENTÉRICA
EN EL CERDO (16)**

Solución preservación	Tiempo preservación	Antioxidante	Isquemia caliente
Viaspan	8 horas	Ac. ascórbico	50 min

Peso injerto tras extrac.	Peso injerto tras lavado	Peso injerto tras preserv	Aspecto injerto postreperusión
138,4 g	132,8 g	123,6 g	Muy bueno

LI (cm) ant-post donante	LD (cm) ant-post donante	LI ant-post post-reperusión	LD ant-post post-reperusión	Grado edema 0, 1, 2, 3, 4	Días normogluc.
1,1	1,4	1,45	1,55	2-3 LI; 1-2 LD	17

Parámetro	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 9	Día 10
Glucemia	84	22	66	58	73	73	68	64	50	67	68
Amilasas	924	1674	1380	1004	825	768	704	596	649	612	546
Lipasas	5,2	112,5	62	29,8	17,3	27,9	18,8	11,8	12,6	8,8	6,1
Insulina	1,75	29,9	14	5,9	2,5	8,9	4,6	3,5	1,75	2,3	2,1
C-péptido	0,1	1	0,51	0,43	0,4	0,56	0,52	0,35	0,18	0,18	0,18
PIG-MAP	0,53	4,27	8,65		5,08						

Parámetro	Día 11	Día 15	Día 16	Día 17	Día 18	Día 19					
Glucemia	68	132	149	145	160	224					
Amilasas	536	561	543	490	460	457					
Lipasas	7,4	5,8	5,3	5,9	4,7	4,6					
Insulina	1,75	2,9	1,75	1,75	1,75	1,75					
C-péptido	0,18	0,26	0,11	0,1	0,1	0,1					

Parámetro	MUESTRA A	MUESTRA B	MUESTRA C	MUESTRA D
MDA + 4HDA	0,154	0,210	0,260	0,428
Carbonilos				

**ALOTRASPLANTE DE PÁNCREAS CON DERIVACIÓN ENTÉRICA
EN EL CERDO (17)**

Antioxidante	Solución preservación	Tiempo preservación	Isquemia caliente
No	Viaspan	8 horas	45 min

Peso injerto tras extrac.	Peso injerto tras lavado	Peso injerto tras preserv	Aspecto injerto postreperusión
143,6 g	143,1 g	131,8 g	Muy bueno

LI (cm) ant-post donante	LD (cm) ant-post donante	LI ant-post post-reperusión	LD ant-post post-reperusión	Grado edema 0, 1, 2, 3, 4	Días normoglu.
0,9	1,5	1,6	2,4	4 LI; 1 LD	11

Parámetro	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 9	Día 10
Glucemia	92	46	47	50	53	65	67	71	70	68	89
Amilasas	788	9749	3588	1708	1229	799	696	507	580	453	335
Lipasas	4,6	2084	503,9	154	100,2	50	50	50,1	42	26,2	19,8
Insulina	1,75	6,3	9,2	7,3	5,4	5,8	6,3	6,4	6,4	6,5	5,4
C-péptido	0,11	0,38	0,4	0,4	0,4	0,44	0,36	0,5	0,51	0,55	0,31
PIG-MAP	1,16	4,75	8,86	9,29	7,25						

Parámetro	Día 11	Día 12	Día 13								
Glucemia	125	189	204								
Amilasas	339	326	343								
Lipasas	9,3	6,4	5,7								
Insulina	4,3	1,75	1,75								
C-péptido	0,21	0,11	0,11								

Parámetro	MUESTRA A	MUESTRA B	MUESTRA C	MUESTRA D
MDA + 4HDA				
Carbonilos				

**ALOTRASPLANTE DE PÁNCREAS CON DERIVACIÓN ENTÉRICA
EN EL CERDO (18)**

Antioxidante	Solución preservación	Tiempo preservación	Isquemia caliente
No	Viaspan	8 horas	40 min

Peso injerto tras extrac.	Peso injerto tras lavado	Peso injerto tras preserv	Aspecto injerto postreperusión
123,3 g	118 g	109,2g	muy bueno

LI (cm) ant-post donante	LD (cm) ant-post donante	LI ant-post post-reperusión	LD ant-post post-reperusión	Grado edema 0, 1, 2, 3, 4	Días normogluc.
1,2	1,4	1,4	1,4	1 LI; 1 LD	6

Parámetro	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 9	
Glucemia	85	61	63	78	84	81	80	203	203	272	
Amilasas	980	2572	1527	1060	755	705	750	774	631	527	
Lipasas	5,7	226,1	92,6	48,1	26,7	18,5	71	51	14	6,2	
Insulina	1,75	14,2	5,8	8,9	10,4	6,7	8,1	1,75	1,75	1,75	
C-péptido	0,1	0,83	0,38	0,5	0,54	0,41	0,46	0,16	0,1	0,1	
PIG-MAP	0,68	3,29	5,5	5,57	4,15						

Parámetro	MUESTRA A	MUESTRA B	MUESTRA C	MUESTRA D
MDA + 4HDA				
Carbonilos				

ALOTRASPLANTE DE PÁNCREAS CON DERIVACIÓN ENTÉRICA EN EL CERDO (19)

Antioxidante	Solución preservación	Tiempo preservación
No	Viaspan	8 horas

Isquemia caliente	Peso injerto tras extrac.	Peso injerto tras lavado	Peso injerto tras preserv	Aspecto injerto postreperusión
50 min	125 g	118 g	99,3 g	Bueno, gran edema

LI (cm) ant-post donante	LD (cm) ant-post donante	LI ant-post post-reperusión	LD ant-post post-reperusión	Grado edema 0, 1, 2, 3, 4	Días normogluc.
1,1	1,5	2,1	2,3	4 LI; 4 LD	12

Parámetro	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 9	Día 10
Glucemia	80	75	62	62	84	80	77	86	84	66	51
Amilasas	1.005	11.481	6350	2283	731	529	836	847	750	860	677
Lipasas	5,9	748,2	415,9	85,1	33,3	19	25,4	24,4	23,3	66,6	72,9
Insulina	1,75	20,4	5,3	1,75	6,2	5,2	4,2	8,5	5,1	6	5,3
C-péptido	0,12	0,85	0,42	0,28	0,34	0,38	0,47	0,48	0,38	0,55	0,31
PIG-MAP	1,45	10,69	14,12	13,23	5,42						

Parámetro	Día 11	Día 12	Día 13								
Glucemia	99	135	210								
Amilasas	534	576	497								
Lipasas	23,2	8,3	5,5								
Insulina	4,6	4	3,8								
C-péptido	0,34	0,11	0,11								

Parámetro	MUESTRA A	MUESTRA B	MUESTRA C	MUESTRA D
MDA + 4HDA				
Carbonilos				

ALOTRASPLANTE DE PÁNCREAS CON DERIVACIÓN ENTÉRICA EN EL CERDO (20)

Antioxidante	Solución preservación	Tiempo preservación	Isquemia caliente
no	Viaspan	8 horas	60 min

Peso injerto tras extrac.	Peso injerto tras lavado	Peso injerto tras preserv	Aspecto injerto postreperusión
152 g	147,2 g	141,1 g	Bueno

LI (cm) ant-post donante	LD (cm) ant-post donante	LI ant-post post-reperusión	LD ant-post post-reperusión	Grado edema 0, 1, 2, 3, 4	Días normogluc.
1	1,8	1,7	1,5	4 LI; 0 LD	9

Parámetro	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 9	Día 10
Glucemia	81	58	48	39	40	44	50	67	95	120	210
Amilasas	988	7821	3239	1836	899	699	613	643	651	529	391
Lipasas	5,7	775,4	264,7	138,1	54,4	43,7	20,5	20,9	20,8	21,1	16
Insulina	1,75	10,1	25,1	1,75	3,4	5,1	9,5	4,1	4,1	3,1	2,5
C-péptido	0,3	0,39	0,71	0,1	0,23	0,22	0,42	0,31	0,3	0,23	0,21
PIG-MAP	0,91	9,89	12,36	14,57	10,29						

Parámetro	Día 11										
Glucemia	234										
Amilasas	374										
Lipasas	7,4										
Insulina	1,75										
C-péptido	0,1										

Parámetro	MUESTRA A	MUESTRA B	MUESTRA C	MUESTRA D
MDA + 4HDA	0,297	0,343	0,329	0,406
Carbonilos	8,674	8,350	8,368	8,220

**ALOTRASPLANTE DE PÁNCREAS CON DERIVACIÓN ENTÉRICA
EN EL CERDO (21)**

Solución preservación	Tiempo preservación	Antioxidante	Isquemia caliente
Viaspan	8 horas	No	55 min

Peso injerto tras extrac.	Peso injerto tras lavado	Peso injerto tras preserv	Aspecto injerto postreperusión
101,2 g	99 g	94,1 g	Muy bueno

LI (cm) ant-post donante	LD (cm) ant-post donante	LI ant-post post-reperusión	LD ant-post post-reperusión	Grado edema 0, 1, 2, 3, 4	Días normogluc.
-	-	-	-	2 LI; 2-3LD	6

Parámetro	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 9	
Glucemia	91	68	61	67	73	85	124	203	240	267	
Amilasas	746	3766	1774	913	768	556	496	430	380	405	
Lipasas	13,3	651,6	287,7	108,7	61,8	35	21	19,6	15,9	13,4	
Insulina	1,75	11,8	5,9	6,6	5	1,75	1,75	1,75	1,75	1,75	
C-péptido	0,11	0,4	0,27	0,41	0,34	0,38	0,16	0,1	0,13	0,11	
0,1PIG-MAP	1,02	4,91	9,5	5,41	4,73						

Parámetro	MUESTRA A	MUESTRA B	MUESTRA C	MUESTRA D
MDA + 4HDA				
Carbonilos				

**ALOTRASPLANTE DE PÁNCREAS CON DERIVACIÓN ENTÉRICA
EN EL CERDO (22)**

Antioxidante	Solución preservación	Tiempo preservación	Isquemia caliente
No	Viaspan	8 horas	54 min

Peso injerto tras extrac.	Peso injerto tras lavado	Peso injerto tras preserv	Aspecto injerto postreperusión
124,3 g	122,4 g	114,8 g	Muy bueno

LI (cm) ant-post donante	LD (cm) ant-post donante	LI ant-post post-reperusión	LD ant-post post-reperusión	Grado edema 0, 1, 2, 3, 4	Días normogluc.
1	1,5	1,3	1,8	1 LI; 1 LD	7

Parámetro	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 9	Día 10
Glucemia	101	71	71	76	72	79	87	118	277	281	282
Amilasas	1081	8340	6025	2983	1275	872	711	836	727	778	575
Lipasas	7,5	1035,8	905,1	534,6	118,8	71,8	81,3	69	69	20,3	14,8
Insulina	1,75	28	5,1	10,5	8	2,1	5,6	6,3	3,5	1,9	1,75
C-péptido	0,12	0,25	0,17	0,36	0,43	0,34	0,41	0,68	0,38	0,16	0,1
PIG-MAP	0,83	4,33	4,98	6,41	4,98						

Parámetro	MUESTRA A	MUESTRA B	MUESTRA C	MUESTRA D
MDA + 4HDA	0,492	0,528	0,528	0,701
Carbonilos	8,280	8,701	8,085	7,971

ALOTRASPLANTE DE PÁNCREAS CON DERIVACIÓN ENTÉRICA EN EL CERDO (23)

Solución preservación	Tiempo preservación	Antioxidante	Isquemia caliente
Viaspan	8 horas	No	40 min

Peso injerto tras extrac.	Peso injerto tras lavado	Peso injerto tras preserv	Aspecto injerto postreperusión
184,8 g	175,1 g	166,2 g	Muy bueno

LI (cm) ant-post donante	LD (cm) ant-post donante	LI ant-post post-reperusión	LD ant-post post-reperusión	Grado edema 0, 1, 2, 3, 4	Días normogluc.
1,5	1,2	1,9	1,8	2-3 LI; 2-3LD	8

Parámetro	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 9	Día 10
Glucemia	96	32	62	71	79	79	82	71	93	218	228
Amilasas	867	9268	5165	1702	879	561	499	413	393	444	484
Lipasas	15,6	1851,8	857,2	139,6	41,3	16	11,6	8	6,3	6	4,9
Insulina	1,75	4,6	31,6	7	8,6	5,9	6,2	7,3	5,3	3,3	2,6
C-péptido	0,12	0,28	0,95	0,35	0,42	0,34	0,34	0,59	0,32	0,26	0,16
PIG-MAP	1,37	5,5	8,39	9,24							

Parámetro	MUESTRA A	MUESTRA B	MUESTRA C	MUESTRA D
MDA + 4HDA	0,468	0,220	0,386	0,582
Carbonilos	6,714	6,883	11,120	7,401

ALOTRASPLANTE DE PÁNCREAS CON DERIVACIÓN ENTÉRICA EN EL CERDO (24)

Antioxidante	Solución preservación	Tiempo preservación	Isquemia caliente
No	Viaspan	8 horas	60 min

Peso injerto tras extrac.	Peso injerto tras lavado	Peso injerto tras preserv	Aspecto injerto postreperusión
167,4 g	157,6 g	147,2 g	muy bueno

LI (cm) ant-post donante	LD (cm) ant-post donante	LI ant-post post-reperusión	LD ant-post post-reperusión	Grado edema 0, 1, 2, 3, 4	Días normogluc.
1,1	1,4	1,5	1,8	2 LI; 2 LD	6

Parámetro	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8		
Glucemia	91	57	72	70	66	85	135	277	322		
Amilasas	814	1808	1303	819	499	358	352	344	313		
Lipasas	7,2	664,8	421,6	118,3	32	24,6	17,8	8,3	7,4		
Insulina	1,75	7,6	23,7	7,8	9,8	9,7	1,75	1,75	1,75		
C-péptido	0,18	0,52	0,85	0,61	0,56	0,57	0,16	0,23	0,21		
PIG-MAP	1,13	5,22	5,22	6,07	4,89						

Parámetro	MUESTRA A	MUESTRA B	MUESTRA C	MUESTRA D
MDA + 4HDA	0,508	0,449	0,445	0,593
Carbonilos	10,394	9,779	8,867	10,280

VI DISCUSIÓN

MODELO QUIRÚRGICO EXPERIMENTAL

1. Animal de experimentación

Hemos empleado el cerdo en nuestro modelo experimental de alotrasplante pancreático-duodenal con derivación entérica de la secreción exocrina y drenaje venoso sistémico.

El empleo de un animal de experimentación de especie grande, por su mayor similitud con la especie humana, permite que los resultados obtenidos en el laboratorio estén más próximos a ser extrapolables a la clínica.

La mayoría de los TP experimentales en grandes animales han sido realizados en perros y en cerdos. Desde el primer trasplante experimental funcionante realizado en 1957 por Lichtenstein y Barschak (149) hasta el año 1990 el modelo canino ha sido el más ampliamente utilizado (8). Luego, al menos en los países occidentales, el modelo porcino ha adquirido una mayor preponderancia por razones anatómicas, fisiológicas y prácticas.

El cerdo ofrece numerosas ventajas. Es un animal de cómodo manejo, fácil de obtener en granjas autorizadas a un precio asequible, su aporte nutritivo es simple pues está habituado a los piensos comerciales y alcanza un peso óptimo en breve plazo de tiempo. Muchos órganos y sistemas de esta especie, así como las respuestas fisiológicas y fisiopatológicas, se asemejan a la especie humana. La anestesia no ofrece grandes dificultades. El catéter de la yugular externa, que sistemáticamente colocamos, puede mantenerse durante un periodo prolongado, lo que facilita las extracciones sanguíneas y la administración de fármacos.

El páncreas es compacto, de estructura bien definida; su anatomía y las relaciones con otras vísceras guardan cierta semejanza a las del hombre y, presentando como en éste alguna complejidad, permite adquirir y mantener una buena destreza quirúrgica.

Por último, debido a que la diabetes mellitus *tipo 1-like* espontánea es muy rara en los cerdos, la diabetes debe ser inducida quirúrgica o químicamente (150); en el cerdo la pancreatectomía total para inducir la diabetes nos parece el procedimiento más eficaz y puede efectuarse conservando el duodeno y su irrigación (33, 141, 151, 152).

2. Procedimiento quirúrgico

Nuestro modelo experimental se asemeja al tipo de TP clínicamente más utilizado en la actualidad. La técnica que empleamos tiene varias fases bien definidas:

1. Extraemos en el animal donante un injerto que incluye la totalidad del páncreas, un segmento de duodeno donde desembocan los conductos pancreáticos, un pedículo arterial constituido por un parche aorta que incluye el TC y la AMS, y un pedículo venoso con las venas mesentérica superior, esplénica y porta.

El 99% de los TP clínicos se realizan actualmente con un injerto total de páncreas y un segmento duodenal (2^a-3^a porciones) donde drenan los conductos pancreáticos (1). El injerto segmentario, que comprende el cuerpo y la cola de páncreas vascularizados por los vasos esplénicos, prácticamente no se utiliza en la clínica humana salvo en el trasplante de donante vivo, que sólo representa el 1% de todos los TP (1, 48).

2. Efectuamos “ex situ” la perfusión-lavado del injerto con la solución fría de preservación. En este estudio, el tiempo de almacenamiento frío ha estado en torno a las 8 horas y la solución de preservación utilizada ha sido la de la Universidad de Wisconsin (UW).

El páncreas, por su peculiar microarquitectura, es particularmente lábil a las maniobras de extracción y perfusión. El edema se desarrolla rápidamente incluso después de una manipulación quirúrgica menor. El flujo sanguíneo a través del

parénquima es bajo y una elevación en la presión de perfusión durante el lavado puede causar edema y disrupción del endotelio vascular. El tejido exocrino parece ser más susceptible a la lesión de preservación que el tejido endocrino.

Tanto experimental como clínicamente, la perfusión del injerto pancreático-duodenal con la solución fría de preservación puede realizarse *in situ*, que es lo habitual en una extracción multiorgánica de un donante en muerte encefálica, o bien *ex situ* una vez extraído el injerto y colocado en un recipiente estéril, como se hace en caso de trasplante de donante vivo.

En la extracción aislada del páncreas en el cerdo nos parece mejor la perfusión *ex situ* del injerto y así procedemos en nuestro modelo experimental. La perfusión se efectúa a través del TC y de la AMS con la solución de preservación a 4°C, infundida por la acción de la gravedad a una altura de 80-100 cm y con un volumen suficiente (150-200 cc) hasta que el líquido que drena a través de la vena porta sale completamente limpio. Con la perfusión *ex situ* se puede observar la velocidad del goteo, el inmediato retorno por la vena porta y el limpio aspecto del líquido frío de preservación y la decoloración del páncreas (153).

La perfusión y el almacenamiento frío los hemos realizado con la solución de preservación UW que es la estándar y universalmente aceptada en la preservación de órganos abdominales. Descrita en 1986 por Folkert O. Belzer y James H. Southard en la Universidad de Wisconsin (154), fue diseñada inicialmente para la preservación experimental del páncreas canino, consiguiendo una supervivencia del 100% de los animales con 72 horas de isquemia fría (155). La solución UW es el paradigma de las “soluciones intracelulares” así denominadas por poseer una composición electrolítica

parecida a la que existe en el interior de las células, con una elevada concentración de potasio y baja en sodio. La solución UW fue formulada para contrarrestar los efectos perjudiciales clásicamente descritos del almacenamiento frío y de la reperfusión: edema celular, expansión del espacio intersticial, acidosis intracelular, reducción del metabolismo energético celular y generación de RL derivados del oxígeno (156). Así, contiene lactobionato y rafinosa para la prevención del edema celular, hidroxietil-almidón para luchar contra la expansión del espacio intersticial, fosfato potásico como sustancia tampón (buffer) para contrarrestar la acidosis intracelular, glutatión y alopurinol para la prevención del daño por RL de oxígeno, y adenosina para proporcionar sustratos en la regeneración de los fosfatos de alta energía (157).

3. Revascularizamos el alotrasplante pancreático-duodenal anastomosando el TC y la AMS con parche aórtico de Carrel del injerto a la aorta infrarrenal del receptor.

Experimentalmente en el cerdo es mucho mejor efectuar la anastomosis entre el pedículo arterial del injerto y la aorta infrarrenal del receptor que con la arteria iliaca. Las arteria ilíacas porcinas son de poco diámetro y por tanto el riesgo de trombosis es muy alto si la anastomosis arterial se realizara con cualquiera de ellas. Preferimos utilizar el tramo infrarrenal de la aorta receptora por buena ubicación, gran amplitud de la luz de la anastomosis y muy buen aporte sanguíneo. De esta manera, en este estudio no se ha presentado caso alguno de trombosis arterial del injerto.

4. Realizamos el drenaje venoso en la circulación sistémica, practicando la anastomosis de la porta del injerto con la cava infrarrenal del receptor.

En la mayoría de los TP realizados en el mundo los injertos se han colocado heterotópicamente en la pelvis con anastomosis de los vasos del injerto a la arteria y a la vena iliaca receptora, por tanto, con flujo venoso en la circulación sistémica.

En nuestro modelo experimental el drenaje venoso también ha sido efectuado en la circulación sistémica, pero practicando la anastomosis de la porta del injerto en la cava infrarrenal del receptor en lugar de realizarlo en la vena iliaca que es con la que habitualmente se efectúa. Preferimos realizar la anastomosis en la cava infrarrenal receptora porque se confecciona de manera más sencilla, el injerto queda mejor ubicado en la cavidad peritoneal, con menos compromiso de espacio, es más fácil su manipulación, se obtiene gran amplitud de anastomosis y muy buen drenaje venoso. Así, no hemos observado caso alguno de trombosis venosa del injerto en nuestro modelo.

En la clínica, los TP con derivación de la secreción exocrina a vejiga urinaria se realizan con drenaje venoso sistémico, mientras que los TP con derivación entérica pueden realizarse con drenaje venoso sistémico o portal. La tasa de drenaje venoso portal se ha incrementado del 6% en 1995 al 18% en 2001, pero sólo supone todavía el 24% de los TP con drenaje entérico (32, 158).

5. El drenaje entérico de la secreción exocrina del páncreas lo efectuamos mediante anastomosis látero-lateral del duodeno del injerto a un asa ileal del receptor.

El TP tiene la particularidad de que la masa insular, fundamento del trasplante, sólo supone menos del 5 % de la glándula pancreática. El objetivo del trasplante no radica en el tejido exocrino del injerto y, sin embargo, es causa de importantes complicaciones después del mismo. Se han realizado grandes esfuerzos en el manejo quirúrgico del componente exocrino del injerto.

En nuestro modelo actual de TP en el cerdo hemos empleado el drenaje entérico de la secreción exocrina mediante la anastomosis látero-lateral del duodeno del injerto a un asa ileal del receptor. La elección de este procedimiento se justifica por ser un procedimiento sencillo, relativamente fisiológico, que no ocasiona problemas en nuestra experiencia experimental y que se adapta a la tendencia más extendida en la época actual.

Además de los beneficios antes señalados, el drenaje entérico en el TP porcino tiene la ventaja añadida de que se vierten los fermentos pancreáticos al intestino, con lo que no se requiere el aporte oral de los mismos para compensar la insuficiencia pancreática exocrina provocada por la exéresis del páncreas nativo del receptor, que sistemáticamente realizamos con objeto de que la secreción de insulina dependa exclusivamente de la función del injerto.

6. Efectuamos en el animal receptor una pancreatectomía total con conservación del duodeno para que la única fuente de insulina sea la proporcionada por el aloinjerto de páncreas.

La pancreatectomía del órgano nativo es la mejor forma de inducir la diabetes y, dadas las características anatómicas del páncreas y duodeno porcinos, se puede extirpar la totalidad de la glándula pancreática respetando la integridad del duodeno y su vascularización. Requiere el procedimiento cierta meticulosidad pero es perfectamente factible (151). En nuestra experiencia y en el presente estudio, la pancreatectomía para inducir la diabetes no se ha seguido de complicación alguna permaneciendo el duodeno del receptor perfectamente viable a lo largo de todo el seguimiento.

3. Procedimiento anestésico

Como hemos mencionado en líneas anteriores, en la actualidad la mayoría de los TP experimentales en grandes animales se realizan en cerdos (152); muchos órganos y sistemas de esta especie, así como las respuestas fisiológicas y fisiopatológicas, se asemejan a los del hombre. Sin embargo, el empleo del cerdo en investigación biomédica es costoso en personal, espacio y equipamiento técnico. Por otra parte, el TP en el cerdo puede requerir bastante tiempo, de 3 a 4 horas. En consecuencia, se requiere un procedimiento anestésico seguro y eficaz, que evite muertes intraoperatorias o en el postoperatorio inmediato que supondrían un gasto improductivo y una pérdida de los objetivos de los distintos estudios (159-161).

El cerdo se considera difícil de inmovilizar y anestésiar comparado con otras especies animales. La falta de cooperación en la inmovilización física del cerdo hace necesaria la administración de fármacos que proporcionen la sedación adecuada para el manejo del mismo (162). Para obtener este propósito, en estudios anteriores se ha empleado la asociación tiletamina/zolazepam (Zoletil®) junto a otro antagonista alfa-2-adrenérgico, como la xilacina (162, 163), pero en pocos estudios se ha asociado tiletamina/zolazepam con medetomidina (Domtor®) (164).

Los resultados obtenidos en nuestro modelo demuestran la gran eficacia y seguridad de la técnica anestésica practicada, aunque los descensos observados en la presión arterial y la temperatura sugieren que la misma puede mejorarse.

La premedicación intramuscular asociando tiletamina/zolazepam/medetomidina consigue la inconsciencia del animal en 1-2 minutos, manteniéndola el tiempo necesario para efectuar la intubación endotraqueal y la cateterización intravenosa (162, 163, 165). Esta asociación permite cierto grado de analgesia por el efecto de la tiletamina, fármaco disociativo de la familia de las fenciclidinas, a la que pertenece también la ketamina, por

antagonización de los receptores del ácido N-metil-D-aspartico (NMDA). Además, su administración conjunta con el zolazepam, de la familia de las benzodiazepinas, permite una relajación muscular adecuada (1162, 163) con una duración de efecto mayor que otras similares como el midazolam o el diazepam, sin necesidad de emplear agentes bloqueantes neuromusculares durante el periodo postoperatorio. La asociación de tiletamina/zolazepam/medetomidina (Zoletil® + Domtor®) potencia la inmovilidad y contención del animal para acceder a una IV sin movimientos. La medetomidina posee efecto analgésico al ser un antagonista alfa-2-adrenérgico (166-170), potenciando la acción de los anestésicos inhalatorios, como el empleado en nuestro método, el sevoflurano. Esto aporta una disminución de la dosis de sevoflurano espirada (2,0-2,1%), necesaria para el mantenimiento anestésico seguro y eficaz, y reduce de un 20 a un 25% su concentración alveolar mínima, que en la especie porcina es 2,66% (171, 172). De esta forma, evitamos el riesgo de sobredosificación de anestésico, además de disminuir la aparición de efectos adversos y, por tanto, de complicaciones. Por otra parte, la medetomidina cuenta con antagonista, el atipamezol, que se puede administrar en caso de aparición de efectos adversos, como una bradicardia intensa.

La dosis de propofol, como agente anestésico intravenoso inductor, hubiera sido de 3-10 mg/kg, pero ha sido evitada o reducida al mínimo, gracias al empleo inicial de la premedicación, permitiendo una pérdida de consciencia rápida en el animal y unas condiciones óptimas para la intubación endotraqueal.

Al contrario que en otros modelos (173), no ha sido preciso el empleo de agentes bloqueantes neuromusculares durante la anestesia, ni mayor grado de profundidad de la misma, para realizar la intubación, favorecido por la administración de la premedicación anestésica.

El mantenimiento anestésico, asociando sevoflurano por vía inhalatoria y fentanilo en perfusión continua, como analgesia intraoperatoria, ha conseguido mantener al animal cardiaca y hemodinamicamente dentro de los límites considerados como normales en todo momento, con ausencia de dolor y una relajación aceptable a lo largo de la intervención, a pesar de no administrar agentes bloqueantes neuromusculares, y adaptándose a la ventilación mecánica, necesaria para mantener la normocapnia durante el procedimiento.

La frecuencia cardiaca disminuyó puntualmente en el minuto 60, sólo explicable por reflejo de un estímulo vagal intenso en la primera hora de cirugía.

La disminución de la presión arterial a partir del minuto 120 indica que el descenso de la misma es debido, más que a la acción sinérgica de los fármacos anestésicos empleados, al fin del efecto de la atropina (duración de la acción de 60 a 90 minutos) administrada en la premedicación (174). Por otra parte, también sugiere que se pueda reducir las dosis tanto de sevoflurano como de fentanilo durante el mantenimiento anestésico. Así, se puede evitar ese descenso significativo de la presión arterial. Futuros trabajos son necesarios para contrastar esta hipótesis.

También, a pesar de disponer de un medio para preservar la temperatura corporal, como una manta térmica, se aprecia que en anestésias de larga duración, en este estudio, disminuyó la temperatura a partir del minuto 60, aunque dentro de los rangos clínicos, hasta el final de la misma, pero que después recuperó sus valores basales durante el periodo postoperatorio inmediato.

Al finalizar la anestesia con el cierre del vaporizador de sevoflurano y el cese de la infusión de fentanilo, los animales recuperaron de forma progresiva los reflejos y función respiratoria, levantándose a las 2-3 horas. La farmacocinética particular del sevoflurano, con un mínimo metabolismo hepático (3%) y una baja solubilidad en

sangre (0,68) (172), favorece una rápida eliminación por vía inhalatoria, que permite una rápida y suave educación anestésica. Esto contrasta con experiencias previas con otros agentes anestésicos, como el isoflurano, en las que los animales presentaban de forma casi sistemática agitación importante al despertar.

El ritmo de infusión del fentanilo (5,7 mcg/kg/hora), durante el periodo intraoperatorio, ha sido inferior al que hubiéramos necesitado para obtener los mínimos requerimientos analgésicos en una intervención de TP. En ausencia de premedicación anestésica, la dosis de infusión de fentanilo podría haber alcanzado los 25 mcg/kg/hora (175). Esto es debido a que se ha empleado, en conjunto, un método de analgesia multimodal o polimodal al asociar tiletamina, medetomidina (estos fármacos como analgesia previa o anticipada) y fentanilo, con diferentes mecanismos de acción que sinergian sus acciones. Por ello, obtenemos el beneficio de reducir la dosificación del fentanilo y, por tanto, disminuimos el riesgo de aparición de efectos adversos debidos al mismo.

Como analgesia en el postoperatorio inmediato hemos empleado buprenorfina, primera dosis administrada por vía intramuscular y seguida de la liberación continua a partir de un parche transdérmico (Transtec® 35 mcg/hora), que revierte el efecto depresor respiratorio no deseado del fentanilo, sin modificar e incluso potenciando los efectos analgésicos. Esto es debido a que al ser agonista parcial, compite por los receptores mu, al igual que el fentanilo como opioide agonista puro, pero a su vez, se une a los receptores kappa como antagonista, proporcionando una analgesia de efecto prolongado, y evitando los efectos adversos del fentanilo (160-161), de los cuales es la depresión respiratoria la más indeseable.

En conclusión, la asociación tiletamina/zolazepam/medetomidina, como premedicación de cerdos sometidos a cirugía de TP, permite reducir, de forma segura y

eficaz, los requerimientos necesarios de sevoflurano y fentanilo durante la anestesia general. Aunque la presión arterial y la temperatura disminuyeron durante el mantenimiento anestésico, todos los parámetros se mantuvieron dentro de los límites considerados como normales.

INFLUENCIA DE LA MELATONINA EN LA EVOLUCIÓN DEL ALOTRASPLANTE DE PANCREAS EN EL CERDO

Durante la última década se han realizado grandes progresos en el campo del trasplante de órganos sólidos. Sin embargo, el daño por IR sigue siendo uno de los principales obstáculos. Durante el procedimiento del trasplante el injerto sufre las consecuencias deletéreas de la IR, fenómeno por el cual el daño celular en un órgano hipóxico se acentúa tras la restauración del flujo sanguíneo y el aporte de oxígeno (176).

Numerosos trabajos recientes han demostrado el efecto protector de la melatonina en diferentes condiciones experimentales de IR y en varios órganos como riñón (177-179), páncreas (112, 113), corazón (180, 181), hígado (102, 103 182) e intestino (100, 183). El páncreas endocrino es especialmente vulnerable a los efectos deletéreos de las EROs porque recibe un alto caudal de sangre y oxígeno comparado con otros tipos de tejido (184) y porque las células beta no poseen una fuerte defensa antioxidante (185). El trasplante de páncreas presenta mayor tasa de complicaciones denominadas técnicas que cualquier otro tipo de trasplante (186). Dos estudios recientes establecieron que la melatonina proporciona una protección eficiente frente a la pancreatitis y a la necrosis inducida por el clampaje de la arteria esplénica seguida de reperfusión (112, 113). Además, la melatonina mostró efectos protectores en al menos dos modelos *ex vivo*. El primero fue en corazones aislados de ratas Wistar donde la melatonina mejoró la

recuperación de la función cardiaca y la respuesta vasodilatadora coronaria (187). El segundo fue en hígados esteatósicos y no esteatósicos de ratas Zucher, donde la melatonina redujo la actividad de la alanina y la aspartato aminotransferasa en los fluidos excretados, aumentó el débito biliar y redujo las resistencias vasculares (188). Estos modelos experimentales *in vivo* de isquemia (oclusión arterial y posterior reperfusión) y los sistemas *ex vivo* que permiten la recolección de los fluidos efluentes de un órgano son útiles para predecir la lesión del órgano y comprobar el valor potencial de las moléculas antioxidantes y los fármacos en la prevención del daño de IR. Hay, sin embargo, una crítica a estos modelos porque reproducen pocos paradigmas experimentales. Esto limita las conclusiones basadas en estos modelos comparados con los obtenidos en el más amplio contexto experimental del trasplante de órganos.

En nuestro estudio hemos encontrado en la evolución postrasplante que todos los receptores del aloinjerto pancreático mostraron una tendencia a la hipoglucemia en los primeros días del postoperatorio. Esto se acompañó de una pronunciada elevación de los niveles séricos de insulina, c-péptido, amilasa y lipasa en el primer día postoperatorio seguido de una reducción posterior. La hipoglucemia inicial con hiperinsulinemia es típica en el TP con drenaje venoso del injerto en la circulación sistémica (189-192) y se atribuye principalmente a la pérdida del primer paso hepático en el aclaramiento de la insulina (190). En condiciones fisiológicas, la insulina secretada por los islotes de Langerhans se libera en la circulación portal y alcanza directamente el hígado que extrae alrededor del 50% de la insulina en este primer paso hepático. En el TP con drenaje venoso del injerto en la circulación sistémica falta este primer paso hepático de la insulina lo que conduce a hiperinsulinemia periférica, incremento de la captación de glucosa por el músculo, descenso de la gluconeogénesis hepática y liberación de glucosa (190), efectos responsables de la tendencia a la hipoglucemia observada en los

primeros días después del trasplante. La elevación precoz de la amilasa y lipasa séricas se atribuye a los efectos de la IR y a la manipulación del páncreas en el donante y receptor (152, 193, 194]. Aunque no hubo diferencias significativas en los picos de lipasa sérica, la melatonina redujo los niveles de esta enzima en un 40% cuando se comparó con el grupo control.

El principal hallazgo de este estudio ha sido que en el grupo de animales a los que se administró melatonina, pero no AA, tanto antes como diariamente durante una semana postrasplante, mantuvieron la normoglucemia durante un periodo de tiempo tres veces mayor que el grupo control. Así, la melatonina prolongó la supervivencia del trasplante y retrasó la aparición del RA. Estos datos coinciden con los presentados por Lin y col. (195) quienes demostraron que la administración de melatonina prolongaba la supervivencia del injerto de islotes en ratones diabéticos no obesos. Nuestros resultados están de acuerdo también con otro estudio que documentó que la melatonina prolongaba la supervivencia del aloinjerto cardíaco en ratas (135). En estos estudios el tratamiento con melatonina modificó las vías de respuesta inmune celular y humoral, al inhibir la proliferación de linfocitos T helper y reducir la síntesis de inmunoglobulinas aloespecíficas.

Los resultados de nuestro estudio plantean la cuestión de por qué el tratamiento con melatonina durante un corto periodo de tiempo puede retrasar el RA y mejorar la evolución del injerto a largo plazo. Aunque el impacto de los factores no inmunológicos en el desarrollo del rechazo no está resuelto, hay creciente evidencia de que la IR puede aumentar la inmunogenicidad del injerto y llevar a una lesión del mismo más allá del periodo de reperfusión (196). El daño del aloinjerto por las EROs y ERNs durante la reperfusión post-isquémica activa la respuesta inmune innata del receptor que puede iniciar e inducir la respuesta adaptativa aloinmune con activación de las células T y

llevar al desarrollo del RA (56). La melatonina, capaz de proteger el aloinjerto pancreático contra la IRI por su potente acción antioxidante y barredora de RL, podría atenuar la respuesta innata del receptor, retrasar el desarrollo del RA y prolongar la supervivencia del injerto.

Hay consenso acerca de que las lesiones por IR constituyen uno de los principales problemas del TP. Aunque la patogenia de estas lesiones incluye un gran número de mecanismos complejos, los RL juegan un papel clave (57, 61, 197). En este estudio demostramos que la melatonina reduce los niveles acumulados de MDA + 4-HDA y previene peroxidación lipídica en los homogenados de los aloinjertos pancreáticos. Del mismo modo, estudios previos mostraron que la melatonina disminuye la formación de MDA tras el trasplante autólogo intraperitoneal de ovario en ratas sin isquemia fría; este efecto fue aun más eficiente que con la oxitetraciclina (198). Resultados similares también han sido descritos en el trasplante de pulmón (138) y riñón (139) en ratas.

Numerosos estudios en una amplia variedad de modelos bioquímicos y toxicológicos han desvelado los mecanismos moleculares de las propiedades antioxidantes de la melatonina. En primer lugar, la melatonina es un “barredor” de RL que funciona a través de la donación de electrones para detoxificar los radicales hidroxilo y peroxilo (97, 98). Segundo, la melatonina estimula varias enzimas relacionadas con el sistema de defensa antioxidante (199) e inhibe otras enzimas involucradas en la producción de RL (200). Tercero, la indolamina estabiliza la membrana celular y mitocondrial contra la peroxidación lipídica inducida por el estrés oxidativo (201). Finalmente, se ha descrito que la melatonina incrementa la eficiencia de la fosforilación oxidativa al mejorar la actividad de los complejos mitocondriales I y IV y, por tanto, fomentando la síntesis de ATP y reduciendo la formación de EROs (202).

En las condiciones experimentales de nuestro modelo de TP, la melatonina fue más potente que el AA en la reducción de la peroxidación lipídica. La melatonina redujo de forma significativa las concentraciones de MDA + 4-HDA en comparación con el grupo control durante la obtención del injerto, almacenamiento hipotérmico e implante. Por el contrario, comparado con el efecto antioxidante de la melatonina, el AA sólo limitó de forma parcial la peroxidación lipídica durante el implante del injerto. Esta observación coincide con otros trabajos que describen cómo la melatonina fue más potente que el AA en la protección contra las arritmias cardíacas inducidas por la IR al disminuir la gravedad y reducir tanto la incidencia como la duración (203). Una potencial base molecular para estas observaciones es que la actividad protectora de la melatonina puede ser debida a la molécula en sí y a sus metabolitos. Así, la capacidad de la melatonina para reducir el daño oxidativo se ve reforzada por los metabolitos producidos durante el proceso de depuración de los RL (204).

También hemos evaluado el daño oxidativo a las proteínas. Estas constituyen aproximadamente el 68% del peso seco de las células y tejidos (205), siendo por lo tanto un blanco importante para el daño oxidativo. Los RL atacan a las proteínas produciendo cambios en su estructura química que conllevan una disminución de su actividad e incluso la pérdida total de su función. Las alteraciones bioquímicas que producen los RL en las proteínas incluyen oxidaciones de las cadenas laterales, ruptura de la secuencia de aminoácidos, formación de enlaces cruzados, cambios de conformación, alteración de la hidrofobicidad y adquisición de otros grupos reactivos como por ejemplo la 3,4-dihidroxifenilalanina, los hidroperóxidos y los carbonilos (206-209).

En nuestro trabajo se ha cuantificado la aparición de los grupos carbonilos como indicador bioquímico de la oxidación de las proteínas de la membrana celular. Para ello,

se han utilizado las muestras tisulares pancreáticas obtenidas basalmente antes del clampaje en el donante, después de la perfusión-lavado del injerto, tras 8 horas de preservación hipotérmica pancreática y a los 30 minutos de la revascularización del injerto. Hemos observado que los restos carbonilos de las proteínas experimentan una moderada elevación después del lavado-perfusión del injerto y tras el tiempo de preservación de 8 horas, por tanto, durante el periodo de isquemia fría. Sin embargo, no se ha podido demostrar un incremento de los restos carbonilos después de la revascularización del injerto pancreático.

La variedad de reacciones que se pueden generar en el estrés oxidativo es muy elevada debido a que las proteínas son estructuras muy grandes y complejas, compuestas por un gran número de aminoácidos. Aunque los RL pueden reaccionar con otras macromoléculas celulares in vitro, los ácidos grasos poliinsaturados de los lípidos parece ser la diana preferida in vivo durante la reperfusión post-isquémica (210). En nuestro estudio, a pesar de la evidencia de la peroxidación lipídica en la isquemia fría y reperfusión del injerto pancreático, las proteínas no muestran aumento en el contenido de carbonilos tras la reperfusión.

RESPUESTA DE FASE AGUDA EN EL ALOTRASPLANTE DE PÁNCREAS EN EL CERDO EVALUADA POR LAS CONCENTRACIONES SÉRICAS DE LA pMAP/ITIH₄. INFLUENCIA DEL TRATAMIENTO CON MELATONINA

La respuesta de fase aguda (RFA) es una reacción generalizada y compleja de un organismo frente a la inflamación, las infecciones y/o el daño tisular. Un rasgo destacado de esta respuesta es el aumento en la síntesis hepática de las denominadas proteínas de fase aguda (PFA), término utilizado para designar las proteínas que

modifican su concentración plasmática en un 25 por ciento o más como consecuencia de estímulos inflamatorios (211). Las PFA son biomarcadores inespecíficos pero muy sensibles, cuya concentración plasmática se modifica incluso antes de la aparición de los primeros síntomas clínicos. Por esta razón, además de reflejar fielmente la evolución de los procesos patológicos, pueden servir también como marcadores precoces de los mismos (212-214).

La α_2 globulina pMAP (*pig-Major Acute-phase Protein*) es una PFA principal en la especie porcina (144), cuya concentración aumenta entre 10-30 veces en cerdos con inflamación inducida por trementina o sometidos a un trauma quirúrgico (215). Esta proteína es homóloga a la humana P-120 (*Plasma kallikrein-sensitive protein*) (215, 216), y está también presente en otras especies animales (217, 218). Todas estas proteínas presentan homología con las cadenas pesadas H1, H2, H3 de los inhibidores de tripsina inter α (ITI). Por esta razón, esta nueva proteína plasmática ha recibido el nombre de ITIH₄, es decir cadena pesada H4 de los ITI (219). La pMAP/ITIH₄ es una PFA dependiente de la IL-6 (tipo II), como se ha demostrado en estudios con cultivos primarios de hepatocitos (140). La IL-6 es una potente citocina proinflamatoria que activa el eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal y regula la síntesis de proteínas de fase aguda en el hígado (220). Estudios recientes sugieren que la ITIH₄ humana puede actuar como una proteína antiinflamatoria, ya que se ha demostrado que inhibe la polimerización de la actina y la fagocitosis de las células polimorfonucleadas (221).

El trasplante de órganos es extremadamente agresivo para el organismo receptor y desencadena una RFA similar a la producida en la inflamación pero de mayor duración (222-224). Algunos estudios han sugerido que la determinación de las PFA en trasplantes de órganos podría ser de utilidad para el seguimiento de la función del injerto y la detección temprana del RA. Entre las PFA que se han propuesto como

marcadores en trasplantes realizados en humanos están: la α_1 -glicoproteína ácida, α_1 -antitripsina, haptoglobina, proteína C-reactiva (PCR) y prealbúmina en el trasplante hepático (223-225), amiloide A sérico en el trasplante renal (222) y la PCR en el trasplante simultáneo de riñón y páncreas (47), entre otras. En estudios previos propusimos el uso de pMAP/ITIH4 como biomarcador de RA tras el TP en cerdos (141).

Nuestros resultados actuales demuestran que la concentración de pMAP/ITIH4 aumenta en los días 2-3 postrasplante y que en el grupo melatonina se produjo una reducción significativa de los niveles de esta PFA. Esto sugiere que el daño a los tejidos, que es uno de los factores que inducen la RFA, se habría reducido en los animales tratados con melatonina. Por el contrario, los niveles de pMAP/ITIH4 en el grupo del AA fueron similares a los observados en el grupo control. En sintonía con nuestros datos, un estudio previo demostró que el tratamiento con melatonina provocó una reducción de la IL-6 en neonatos humanos después de cirugía abdominal (226).

Wullstein *et al* (47) subrayan que el pico de los niveles séricos de la PCR dentro de las 72 horas después del trasplante clínico de páncreas-riñón es un buen parámetro para evaluar el grado de lesión tisular pancreática precoz. En nuestro modelo de TP en el cerdo, la concentración sérica de la pMAP/ITIH4 en los tres primeros días también se ha mostrado como un buen parámetro predictivo de la evolución del trasplante; niveles más bajos, como sucede en el grupo melatonina, se correspondieron con una mayor supervivencia del injerto.

OTRAS PROPIEDADES DE LA MELATONINA QUE JUSTIFICAN SU APLICACIÓN EN EL TRASPLANTE DE ÓRGANOS

Aparte de la eficacia de la melatonina en reducir el daño de IR mediado por el EO y su capacidad para disminuir las citokinas proinflamatorias, esta indolamina tiene otras características que podrían proporcionar beneficios adicionales antes, durante y después del trasplante. Primero, varios ensayos clínicos randomizados han demostrado que la administración preoperatoria de la melatonina reduce la ansiedad preoperatoria (227); en pacientes que se van a someter a una prostatectomía, la premedicación con melatonina disminuye el dolor y mejora la calidad del sueño y los niveles de sedación en el postoperatorio (228). Segundo, estudios previos describen la actividad antibacteriana y antiviral que posee la melatonina (229, 230). Las infecciones virales y bacterianas son una causa importante de morbilidad tras el trasplante de órganos (137). La melatonina disminuye el daño oxidativo del liposacárido bacteriano y ha sido propuesta para combatir el shock endotóxico (231, 232).

Una consideración final es la seguridad de la melatonina en el uso clínico. En estudios experimentales, dosis de melatonina de hasta 800 mg/Kg no provocaron fallecimiento en ratones; además, la dosis letal para el 50% de ratones (LD50) no ha podido ser determinada aun a pesar de los intentos para conseguirlo (233, 234). Tampoco se observó toxicidad con dosis altas de melatonina (200 mg/Kg) administradas a ratas embarazadas (235). Incluso la administración intravenosa de melatonina durante cirugía vascular no provocó cambios en los parámetros hemodinámicos, como la presión arterial o el pulso (236). Parece, por tanto, seguro asumir que la administración de melatonina podría ser protectora en la IR y podría tener un uso terapéutico en el manejo clínico del TP.

VII CONCLUSIONES

1. Nuestro modelo quirúrgico de alotrasplante pancreático-duodenal con derivación entérica de la secreción exocrina y drenaje venoso sistémico en el cerdo y el procedimiento anestésico, con premedicación mediante la asociación de tiletamina/zolazepam/medetomidina, son de gran eficacia y seguridad. Presentan una escasa incidencia de complicaciones técnicas, ausencia de pérdida de animales donantes y receptores por problemas intraoperatorios, es especialmente útil para estudios de isquemia-reperfusión y preservación de órganos, y se asemeja a los procedimientos de trasplante clínico de páncreas más empleados en la actualidad.
2. La respuesta endocrina-metabólica en nuestro modelo de alotrasplante de páncreas en el cerdo, sin inmunosupresión, se ha caracterizado en el postoperatorio inmediato por una tendencia a la hipoglucemia y por elevadas concentraciones plasmáticas de insulina y c-péptido. También es típica y universal la gran elevación de los niveles séricos de enzimas pancreáticos, amilasa y lipasa, con pico el primer día y ulterior tendencia a la normalización.
3. El tratamiento con melatonina ha demostrado un efecto muy favorable en la evolución del alotrasplante de páncreas en el cerdo. Se ha comportado de forma eficaz y segura y, de manera primordial, ha prolongado significativamente la supervivencia del aloinjerto y ha retrasado la aparición del rechazo agudo. El ácido ascórbico, otro antioxidante bien conocido, fracasó en la prolongación de la supervivencia del aloinjerto pancreático.
4. La mayor supervivencia del injerto pancreático puede explicarse por la capacidad de la melatonina para neutralizar radicales libres y la peroxidación lipídica; también por sus propiedades antiinflamatorias atenuando el daño tisular, como se desprende

de la reducción observada en las concentraciones séricas de pMAP/ITIH4, una proteína de fase aguda positiva IL-6 dependiente.

5. La concentración sérica de la pMAP/ITIH4 en los tres primeros días del alostrasplante pancreático en el cerdo puede ser un parámetro predictivo de la evolución del trasplante; niveles más bajos se corresponderían con mejor evolución del injerto.
6. Basándonos en nuestras observaciones y en artículos previos, en los efectos positivos de la administración de melatonina en procedimientos quirúrgicos mayores y en la ausencia de efectos secundarios, podemos considerar a la melatonina como una valiosa terapia coadyuvante en el trasplante de órganos. Hay que continuar con los estudios, especialmente en ensayos clínicos, para completar el ciclo de la llamada Medicina Traslacional dirigida a amortizar en beneficio social (médico y económico) todo el ingente esfuerzo dedicado a la investigación básica preclínica.

VII CONCLUSIONS

1. Our surgical model of pancreatic-duodenal allotransplant with enteric derivation of the exocrine secretion and systemic venous drainage and the anaesthetic protocol with premedication with tiletamine/zolazepam/medetomidine, is a safe and effective model. There is a low rate of technical complications, no lost of donor or recipient animals due to intraoperative complications. It is especially useful for ischemia- reperfusion injury studies, organ preservation and is pretty similar to the clinical procedure used at present.
2. The endocrine-metabolic response in our model of pancreas allotransplant in pigs without immunosuppression is characterized by a tendency toward hypoglycaemia and a high plasmatic concentration of insulin and c-peptide in the early postoperative period. It is also typical and generalized the great elevation of the pancreatic enzymes, such as amylase and lipase, with the peak during the first day and a posterior normalization.
3. The addition of melatonin has showed a positive effect in the outcome of the pancreatic allotransplant in pigs. It has been safe and effective and basically has prolonged the survival rate of the graft and delayed the onset of the acute rejection.
4. The increase of the pancreatic graft survival might be due to free radical and lipid peroxidation scavenger capacity of melatonin. Also because of some anti-inflammatory properties, with the reduction of the plasmatic concentrations of pMAP/ITIH₄, an acute-phase protein related with Interleukin-6.
5. The serum concentration of pMAP/ITIH₄ during the first three days could have a predictive value in the outcome of the transplant, where lower levels are related with a better evolution of the graft.

6. Based on these observations and on previous papers, the positive effects of melatonin administration in major surgical procedures and the lack of side effects suggest that melatonin could be a valuable co-adjuvant therapy in organ transplantation. More studies are needed, specially clinical trials, to complete cycle of the so-called Translational Medicine, the process of turning appropriate biological discoveries into drugs and medical devices that can be used in the treatment of patients.

VIII BIBLIOGRAFÍA

1. Sutherland DER, Gruessner RW, Gruessner AC. Pancreas transplantation for treatment of diabetes mellitus. *World J Surg* 2001; 25: 487-496.
2. White SA, Shaw JA, Sutherland DE. Pancreas transplantation. *Lancet* 2009; 373: 1808-1817.
3. Wai PY, Sollinger HW. Long-term outcomes after simultaneous pancreas-kidney transplant. *Curr Opin Organ Transplant* 2011; 16: 128-134.
4. Vardayan M, Parkin E, Gruessner C Rodriguez Rilo HL. Pancreas vs. islet transplantation: a call on the future. *Curr Opin Organ Transplant* 2010; 15: 124-130.
5. Gruessner AC. 2011 update on pancreas transplantation: comprehensive trend analysis of 25,000 cases followed up over the course of twenty-four years at the International Pancreas Transplant Registry (IPTR). *Rev Diabet Stud* 2011; 8: 6-16.
6. Eurotransplant International Foundation. Statistics. Annual Report 2010. Ch 7 Pancreas and islets: donation, waiting list and transplant.
7. Organización Nacional de Trasplantes. Información especializada. Datos de donación y trasplante. Memoria de actividad de donación y trasplante. Año 2010.
8. Van Schilgaarde R. Experimental pancreas transplantation: a survey of relevant issues. In Dubernard JM, Sutherland DER. *International Handbook of pancreas transplantation*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht (The Netherlands), 1989: 25-47.

9. Kelly WD, Lillehei RC, Merkel FK, Idezuki I, Goetz FC. Alotransplantation of the pancreas and duodenum along with the kidney in diabetic nephropathy. *Surgery* 1967; 7: 207-214.
10. Reemtsma K, Lucas JF, Rogers RE, Schmidt FE, Davis FH. Islet cell function of the transplanted canine pancreas. *Ann Surg* 1963; 158: 645-654.
11. Bergan JJ, Hoehn JG, Porter N, Dry L. Total pancreatic allografts in pancreatectomized dogs. *Arch Surg* 1965; 90: 521-526.
12. Idezuki Y, Goetz FC, Lillehei RC. Late effect of pancreatic duct ligation on beta cell function. *Am J Surg* 1969; 117: 33-39.
13. Najarian JS, Goetz FC, Sutherland DE. Pancreas and islet transplantation. *Jpn J Surg* 1982; 12: 391-404.
14. Toledo-Pereyra LH, Castellanos J. Role of pancreatic duct ligation for segmental pancreas autotransplantation. *Experimental studies. Transplantation* 1979; 28: 469-475.
15. Dubernard JM, Traeger J, Neyra P, Touraine JL, Traudiant D, Blanc-Brunat N. A new method for preparation of segmental pancreatic grafts for transplantation: Trials in dogs and in man. *Surgery* 1978; 84: 633-640.
16. Dubernard JM, Sanseverino R, Melandri M, Faure JL, Camozzi L, La Rocca E, LeFrancois N, Finaz J, Martin X, Touraine JL. Comparison of segmental pancreatic transplantation with duct obstruction and pancreaticoduodenal transplantation with enteric diversion. *Transplant Proc* 1987; 19: 3572-3574.
17. Dubernard JM, Traeger J, Bosi E, Gelet A, Yafi SE, Devonec M, Piatti PM, Chiesa R, Martin X, Mongin-Long D. Transplantation for the treatment of insulin-

- dependent diabetes: clinical experience with polymer-obstructed pancreatic grafts using neoprene. *World J Surg* 1984; 8: 262-266.
18. Dubernard JM, Traeger J, Neyra P, Touraine JL, Devonec M, Blanc-Brunat N, Ruitton A. A new method for the preparation of a pancreatic graft prior to transplantation: experimental data and human applications in 9 transplants in 8 diabetics. *Chirurgie* 1978; 104: 242-258.
 19. Baumgartner D, Brühlmann G, Largiader F. Technique and timing of pancreatic duct occlusion with prolamine in recipients of simultaneous renal and intraperitoneal segmental pancreas allotransplants. *Transplant Proc* 1986; 18: 1134-1135.
 20. Land W, Landgraf R, Illner WD, Abendroth D, Kampik A, Jensen U, Lenhart FP, Burg D, Hillebrand G, Castro LA. Clinical pancreatic transplantation using the prolamine duct occlusion technique-the Munich experience. *Transplant Proc* 1987; 19(Suppl 4): 75-83.
 21. Sutherland DE, Chinn PL, Goetz FC, Elick BA, Najarian JS. Minnesota experience with 85 pancreas transplants between 1978 and 1983. *World J Surg* 1984; 8: 244-252.
 22. Ekberg H, Deane SA, Grierson JM, Stewart GJ, Williamson P, Hawthorne WJ, Little JM. Long-term function and histology of duct-occluded segmental pancreatic autografts in the dog. *Transplant Proc* 1988; 20: 81-83.
 23. Ekberg H, Deane SA, Williamson P, Hawthorne WJ, Grierson JM, Eastman CJ, Stewart GJ, Little JM. Long-term duct-occluded segmental pancreatic autografts. Does fibrosis lead to graft loss? *Transplantation* 1988; 46: 21-25.

24. Kyriakides GK, Nuttal FQ, Miller Y. Segmental pancreatic transplantation in pigs. *Surgery* 1979; 85: 154-158.
25. Kyriakides GK, Rabinovitch A, Mintz D, Olson L, Rapaport FT, Miller J. Long-term study of vascularized free-draining intraperitoneal pancreatic segmental allografts in beagle dogs. *J Clin Invest* 1981; 67: 292-303.
26. Calne RY. Paratopic segmental pancreas grafting: a technique with portal venous drainage. *Lancet* 1984; 1: 595-597.
27. Kuroda Y, Orita K, Iwagaki S, Nakayama S, Suzuki Y, Kawamura T, Onoyama H, Ashida T, Yamamoto K, Tanaka T. A new technique of pancreatic exocrine diversion to the esophagus in canine segmental pancreatic autotransplantation. *Transplantation* 1987; 44: 583-855.
28. Gliedman ML, Gold M, Whittaker J, Rifkin M, Soberman R, Freed S. Clinical segmental pancreatic transplantation with ureter-pancreatic duct anastomosis for endocrine drainage. *Surgery* 1973; 74: 171-180.
29. Gliedman ML, Gold M, Whittaker J, Rifkin H, Soberman R, Freed S, Tellis V, Veith FJ. Pancreatic duct to ureter anastomosis for exocrine drainage in pancreatic transplantation. *Am J Surg* 1973; 125: 245-252.
30. Gil-Vernet JM, Fernandez-Cruz L, Caralps A, Andreu J, Figuerola D. Whole organ and pancreaticoureterostomy in clinical pancreas transplantation. *Transplant Proc* 1985; 17: 2019-2022.
31. Fernandez-Cruz L, Esmatges E, Andreu J, Targarona EM, Prieto M, Gil-Vernet JM. Advantages and disadvantages of urinary tract diversion in clinical pancreas transplantation. *Transplant Proc* 1987; 19: 3895-3898.

32. Gruessner AC, Sutherland DER. Pancreas transplant outcomes for United States (US) and non-US cases as reported to the United Network for Organ Sharing (UNOS) and the International Pancreas Transplant Registry (IPTR) as of June 2004. *Clin Transpl* 2005; 19: 433-455.
33. García Gil FA, Escartín A, Guzmán M, Viana M, Sáez-Benito A, Ortiz de Solórzano J, Abós D. Resultados endocrinos y metabólicos del trasplante pancreático-duodenal con derivación exocrina a vejiga urinaria en el cerdo. *Endocrinología* 1994; 41: 213-217.
34. Friedrich J, Charpentier K, Marsh CL, Bakthavatsalam R, Levy AE, Kuhr CS. Outcomes with the selective use of enteric exocrine drainage in pancreas transplantation. *Transplant Proc* 2004; 36: 3101-3104.
35. Nath DS, Gruessner A, Kandaswamy R, Gruessner RW, Sutherland DER, Humar A. Late anastomotic leaks in pancreas transplant recipients – clinical characteristics and predisposing factors. *Clin Transplant* 2005; 19: 220-224.
36. Stratta RJ. Pancreas transplantation. *Prob Gen Surg* 1998; 15: 43
37. Sollinger HW, Ploeg RJ, Eckhoff DE, Stegall MD, Isaacs R, Pirsch JD, D'Alessandro AM, Knechtle SJ, Kalayoglu M, Belzer FO. Two hundred consecutive simultaneous pancreas-kidney transplants with bladder drainage. *Surgery* 1993; 114: 736-43.
38. Bretan PN. Urological complications after kidney-pancreas transplantation: editorial comment. *J Urol* 1998; 159: 42-43.

39. Monroy-Cuadros M, Salazar A, Yilmaz S, McLaughlin K. Bladder vs enteric drainage in simultaneous pancreas-kidney transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 2006; 21: 483-487
40. Adamec M, Janousek L, Lipar K, Tosenovsky P, Hampl F, Saudek F, Koznarova R, Boucek P, Havrdova T. A prospective comparison of bladder versus enteric drainage in vascularized pancreas transplantation. *Transplant Proc.* 2004; 36: 1524-1525.
41. Stratta RJ, Gaber AO, Shokouh-Amiri MH, Reddy KS, Egidi MF, Grewal HP, Gaber LW. A prospective comparison of systemic-bladder versus portal-enteric drainage in vascularized pancreas transplantation. *Surgery* 2000; 127: 217-226.
42. Demartines N, Schiesser M, Clavien PA. An evidence-based analysis of simultaneous pancreas-kidney and pancreas transplantation alone. *Am J Transplant* 2005; 5: 2688-2697.
43. Sollinger HW, Messing EM, Eckhoff DE, Pirsch JD, D'Alessandro AM, Kalayoglu M, Knechtle SJ, Hickey D, Belzer FO. Urological complications in 210 consecutive simultaneous pancreas-kidney transplants with bladder drainage. *Ann Surg* 1993; 218: 561-542.
44. Steurer W, Malaise J, Mark W, Koenigsrainer A, Margreiter R; Euro-SPK Study Group. Spectrum of surgical complications after simultaneous pancreas-kidney transplantation in a prospectively randomized study of two immunosuppressive protocols. *Nephrol Dial Transplant* 2005; 20 Suppl 2: 54-62.
45. Leeser DB, Bartlett ST. Evolving surgical strategies for pancreas transplantation. *Curr Diab Rep* 2004; 4: 310-315.

46. Gruessner AC, Sutherland DE, Gruessner RW. Long-term outcome after pancreas transplantation. *Curr Opin Organ Transplant* 2012; 17: 100-105.
47. Wullstein C, Drognitz O, Woeste G, Schareck WD, Bechstein WO, Hopt UT, Benz S. High levels of C-reactive protein after simultaneous pancreas-kidney transplantation predict pancreas graft-related complications and graft survival. *Transplantation* 2004; 77: 60-64.
48. Sutherland DER, Gruessner RW, Dunn DL, Matas AJ, Humar A, Kandaswamy R, Mauer SM, Kennedy WR, Goetz FC, Robertson RP, Gruessner AC, Najarian JS. Lessons learned from more than 1000 pancreas transplants at a single institution. *Ann Surg* 2001; 233: 463-501.
49. Drachenberg CB, Papadimitriou JC, Farney A, Wiland A, Blahut S, Fink JC, Philosophe B, Schweitzer E, Lal T, Anderson L, Bartlett ST. Pancreas Transplantation: The histologic morphology of graft loss and clinical correlations. *Transplantation* 2001; 71: 1784-1791.
50. Witzigmann H, Ludwig S, Armann B, Gäbel G, Teupser D, Kratzsch J, Pietsch UC, Tannapfel A, Geissler F, Hauss J, Uhlmann D. Endothelin-A receptor blockade reduces ischemia/reperfusion injury in pig pancreas transplantation. *Ann Surg* 2003; 238: 264-274.
51. Drognitz O, Obermaier R, von Dobschuetz E, Pisarski P, Neeff H. Pancreas transplantation and ischemia-reperfusion injury: current considerations. *Pancreas* 2009; 38: 226-227.
52. Land W, Schneeberger H, Schleibner S, Illner WD, Abendroth D, Rutili G, Arfors KE, Messmer K. The beneficial effect of human recombinant superoxide

- dismutase on acute and chronic rejection events in recipients of cadaveric renal transplants. *Transplantation* 1994; 57: 211-217.
53. Kiuchi T, Schlitt HJ, Oldhafer KJ, Nashan B, Ringe B, Kitai T, Tanaka A, Wonigeit K, Yamaoka Y, Pichlmayr R. Backgrounds of early intragraft immune activation and rejection in liver transplant recipients. Impact of graft reperfusion quality. *Transplantation* 1995; 60: 49-55.
54. Halloran PF, Homik J, Goes N, Lui SL, Urmson J, Ramassar V, Cockfield SM. The “injury response”: a concept linking nonspecific injury, acute rejection, and long-term transplant outcomes. *Transplant Proc* 29: 79-81, 1997.
55. Jang HR, Rabb H. The innate immune response in ischemic acute kidney injury. *Clin Immunol* 2009; 130: 41-50.
56. Land WG. The role of postischemic reperfusion injury and other nonantigen-dependent inflammatory pathways in transplantation. *Transplantation* 2005; 79: 505-514.
57. Zaouali MA, Ben Abdennebi H, Padriisa-Altés S, Mahfoudh-Boussaid A, Roselló-Catafau J. Pharmacological strategies against cold ischemia reperfusion injury. *Expert Opin Pharmacother* 2010; 11: 537-555.
58. Petersson U, Kallen R, Montgomery A, Borgstrom A. Role of oxygen-derived free radicals in protease activation after pancreas transplantation in the pig. *Transplantation* 1998; 65: 421-426.
59. Jaeschke H. Reactive oxygen and ischemia/reperfusion injury of the liver. *Chem Biol Interact* 1991; 79: 115-136.

60. Hirata Y, Taguchi T, Nakao M, Yamada T, Hirose R, Suita S. The relationship between the adenina nucleotide metabolism and the conversion of xanthin oxidase enzyme system in ischemia-reperfusion of the rat small intestine. *J Pediatr Surg* 1996; 31: 1199-1204.
61. Casillas-Ramírez A, Mosbah IB, Ramalho F, Roselló-Catafau J, Peralta C. Past and future approaches to ischemia-reperfusion lesion associated with liver transplantation. *Life Sci* 2006; 79: 1881-1894.
62. McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 1985; 312: 159-163.
63. He SQ, Zhang YH, Venugopal SK, Dicus CW, Perez RV, Ramsamooj R, Nantz MH, Zern MA, Wu J. Delivery of antioxidative enzyme genes protects against ischemia/reperfusion-induced liver injury in mice. *Liver Transpl* 2006; 12:1869-1879.
64. Mehrabi A, Mood ZhA, Sadeghi M, Schmied BM, Müller SA, Welsch T, Kuttymuratov G, Wente MN, Weitz J, Zeier M, Morath Ch, Riediger C, Schemmer P, Encke J, Büchler MW, Schmidt J. Thymoglobulin and ischemia reperfusion injury in kidney and liver transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 2007; 22 Suppl 8: viii54-viii60.
65. Ahlenstiel T, Burkhardt G, Köhler H, Kuhlmann MK. Improved cold preservation of kidney tubular cells by means of adding bioflavonoids to organ preservation solutions. *Transplantation* 2006; 81: 231-239.
66. Salahudeen AK, Huang H, Patel P, Jenkins JK. Mechanism and prevention of cold storage-induced human renal tubular cell injury. *Transplantation* 2000; 70: 1424-1431.

67. Schachter M, Foulds S. Free radicals and the xanthine oxidase pathway. In: Grace P, Mathie R, eds. *Ischaemia-Reperfusion Injury*. Boston: Blackwell Science 1999: 137-156.
68. Kuppusamy P, Zweier JL. Characterization of free radical generation by xanthine oxidase. Evidence for hydroxyl radical generation. *J Biol Chem* 1989; 264: 9880-9884.
69. Huang H, Salahudeen AK. Cold induces catalytic iron release of cytochrome P-450 origin: A critical step in cold storage-induced renal injury. *Am J Transplant* 2002; 2: 631-639.
70. Vairetti M, Ferrigno A, Bertone R, Richelmi P, Bertè F, Freitas I. Apoptosis vs. necrosis: glutathione-mediated cell death during rewarming of rat hepatocytes. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1740: 367-74.
71. Lemasters JJ. Rusty notions of cell injury. *J Hepatol* 2004; 40: 696-698.
72. Gutteridge JMC. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem* 1995; 41: 1819-1828.
73. Byrne AT, Johnson AH. Lipid peroxidation. In: Grace P, Mathie R, eds. *Ischaemia-Reperfusion Injury*. Boston: Blackwell Science, 1999: 148-156.
74. Kosieradzki M, Kuczynska J, Piwowarska J, Wegrowicz-Rebandel I, Kwiatkowski A, Lisik W, Michalak G, Danielewicz R, Paczek L, Rowinski WA. Prognostic significance of free radicals: mediated injury occurring in the kidney donor. *Transplantation* 2003; 75: 1221-1227.
75. Kang KJ. Mechanism of hepatic ischemia/reperfusion injury and protection against reperfusion injury. *Transplant Proc* 2002; 34: 2659-2661.

76. Kim JS, He L, Qian T, Lemasters JJ. Role of the mitochondrial permeability transition in apoptotic and necrotic death after ischemia/reperfusion injury to hepatocytes. *Curr Mol Med* 2003; 3: 527-35.
77. 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: 15-21.
78. Ma A, Qi S, Chen H. Antioxidant therapy for prevention of inflammation, ischemic reperfusion injuries and allograft rejection. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* 2008; 6: 20-43.
79. Shiraishi T, Kuroiwa A, Shirakusa T, Kawahara K, Yoneda S, Kitano K, Okabayashi K, Iwasaki A. Free radical-mediated tissue injury in acute lung allograft rejection and the effect of superoxide dismutase. *Ann Thorac Surg* 1997; 64: 821-825.
80. Pieper GM, Roza AM. The complex role of iNOS in acutely rejecting cardiac transplants. *Free Radic Biol Med* 2008; 44: 1536-1552.
81. Hasegawa T, Iwanaga K, Hultquist DE, Liao H, Visovatti SH, Pinsky DJ. Suppression of nitrosative and oxidative stress to reduce cardiac allograft vasculopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009; 296: H1007-H1016.
82. Tanaka S, Kamiike W, Ito T, Uchikoshi F, Matsuda H, Nozawa M, Kumura E, Shiga T, Kosaka H. Generation of nitric oxide as a rejection marker in rat pancreas transplantation. *Transplantation* 1995; 60: 713 –717.

83. Albrecht EW, van Goor H, Tiebosch AT, Moshage H, Tegzess AM, Stegeman CA. Nitric oxide production and nitric oxide synthase expression in acute human renal allograft rejection. *Transplantation* 2000; 70: 1610-1616.
84. Suzuki A, Kudoh S, Mori K, Takahashi N, Suzuki T. Expression of nitric oxide and inducible nitric oxide synthase in acute renal allograft rejection in therat. *Int J Urol* 2004; 11: 837-844.
85. Yang X, Chowdhury N, Cai B, Brett J, Marboe C, Sciacca RR, Michler RE, Cannon PJ. Induction of myocardial nitric oxide synthase by cardiac allograft rejection. *J Clin Invest* 1994; 94: 714-721.
86. Szabolcs MJ, Ravalli S, Minanov O, Sciacca RR, Michler RE, Cannon PJ. Apoptosis and increased expression of inducible nitric oxide synthase in human allograft rejection. *Transplantation* 1998; 65: 804-812.
87. Worrall NK, Misko TP, Botney MD, Sullivan PM, Hui JJ, Suau GM, Manning PT, Ferguson TB Jr. Time course and cellular localization of inducible nitric oxide synthases expression during cardiac allograft rejection. *Ann Thorac Surg* 1999; 67: 716-722.
88. Akizuki E, Akaike T, Okamoto S, Fujii S, Yamaguchi Y, Ogawa M, Maeda H. Role of nitric oxide and superoxide in acute cardiac allograft rejection in rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 2000; 225: 151-159.
89. Kuo PC, Alfrey EJ, Krieger NR, Abe KY, Huie P, Sibley RK, Dafoe DC. Differential localization of allograft nitric oxide synthesis: comparison of liver and heart transplantation in the rat model. *Immunology* 1996; 87: 647-653.

90. Yamaguchi Y, Okabe K, Matsumura F, Akizuki E, Matsuda T, Ohshiro H, Liang J, Yamada S, Mori K, Ogawa M. Peroxynitrite formation during rat hepatic allograft rejection. *Hepatology* 1999; 29: 777-784.
91. Romero M, García-Monzón C, Clemente G, Salcedo M, Alvarez E, Majano PL, Moreno-Otero R. Intrahepatic expression of inducible nitric oxide synthase in acute liver allograft rejection: evidence of modulation by corticosteroids. *Liver Transpl* 2001; 7: 16-21.
92. Shah V, Kamath PS. Nitric oxide in liver transplantation: pathobiology and clinical implications. *Liver Transpl* 2003; 9: 1-11.
93. Westerholt A, Himpel S, Hager-Gensch B, Maier S, Werner M, Stadler J, Doehmer J, Heidecke CD. Intrahepatic iNOS induction during human liver allograft rejection depresses cytochrome p450 activity. *Transpl Int* 2004; 17: 370-378.
94. Worrall NK, Boasquevisque CH, Misko TP, Sullivan PM, Ferguson TB Jr, Patterson GA. Inducible nitric oxide synthase is expressed during experimental acute lung allograft rejection. *J Heart Lung Transplant* 1997; 16: 334-339.
95. Schaefer N, Tahara K, Pech T, Websky MV, Fujishiro J, Pantelis D, Abu-Elmagd K, Kalff JC, Hirner A, Türler A. Inducible nitric oxide synthase expression in the intestinal muscularis mediates severe smooth muscle dysfunction during acute rejection in allogeneic rodent small bowel transplantation. *J Surg Res* 2008; 150: 159-168.
96. Korkmaz A, Reiter RJ, Topal T, Manchester LC, Oter S, Tan DX. Melatonin: an established antioxidant worthy of use in clinical trials. *Mol Med* 2009; 15: 43-50.

97. Tan DX, Chen LD, Poeggeler B, Manchester LC, Reiter RJ. Melatonin: a potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocr J* 1993; 1: 57-60.
98. Reiter RJ, Maestroni GJM. Melatonin in relation to the antioxidative defense and immune systems: possible implications for cell and organ transplantation. *J Mol Med* 1999; 77: 36-39.
99. Haderland R, Tan DX, Reiter RJ. Kynuramines, metabolites of melatonin and other indoles: the resurrection of an almost forgotten class of biogenic amines. *J Pineal Res* 2009; 47: 109-126.
100. Ates B, Yilmaz I, Geckil H, Iraz M, Birincioglu M, Fiskin K. Protective role of melatonin given either before ischemia or prior to reperfusion on intestinal ischemia-reperfusion damage. *J Pineal Res* 2004; 37: 149-152.
101. Kurcer Z, Oguz E, Ozbilge H, Baba F, Aksoy N, Celik H, Cakir H, Gezen MR. Melatonin protects from ischemia/reperfusion-induced renal injury in rats: this effect is not mediated by proinflammatory cytokines. *J Pineal Res* 2007; 43: 172-178.
102. Kim SH, Lee SM. Cytoprotective effects of melatonin against necrosis and apoptosis induced by ischemia/reperfusion injury in rat liver. *J Pineal Res* 2008; 44: 165-171.
103. Liang R, Nickkholgh A, Hoffmann K, Kern M, Schneider H, Sobirey M, Zorn M, Büchler MW, Schemmer P. Melatonin protects from hepatic reperfusion injury through inhibition of IKK and JNK pathways and modification of cell proliferation. *J Pineal Res* 2009; 46: 8-14.

104. Chen Z, Chua CC, Gao J, Chua KW, Ho YS, Hamdy RC, Chua BH. Prevention of ischemia/reperfusion-induced cardiac apoptosis and injury by melatonin is independent of glutathione peroxidase 1. *J Pineal Res* 2009; 46: 235-241.
105. López A, García JA, Escames G, Venegas C, Ortiz F, López LC, Acuña-Castroviejo D. Melatonin protects the mitochondria from oxidative damage reducing oxygen consumption, membrane potential, and superoxide anion production. *J Pineal Res* 2009; 46: 188-198.
106. Niki E, Noguchi N, Tsuchihashi H, Gotoh N. Interaction among vitamin C, vitamin E, and beta-carotene. *Am J Clin Nutr* 1995; 62: 1322S-1326S.
107. Block G, Jensen CD, Morrow JD, Holland N, Norkus EP, Milne GL, Hudes M, Dalvi TB, Crawford PB, Fung EB, Schumacher L, Harmatz P. The effect of vitamins C and E on biomarkers of oxidative stress depends on baseline level. *Free Radic Biol Med* 2008; 45: 377-384.
108. Costa EJ, Lopes RH, Lamy-Freund MT. Permeability of pure lipid bilayers to melatonin. *J Pineal Res* 1995; 19: 123-126.
109. Shida CS, Castrucci AM, Lamy-Freund MT. High melatonin solubility in aqueous medium. *J Pineal Res* 1994; 16: 198-201.
110. Lee YD, Kim JY, Lee KH, Kwak YJ, Lee SK, Kim OS, Song DY, Lee JH, Baik TK, Kim BJ, Kim JY, Baik HW. Melatonin attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung inflammation in sleep-deprived mice. *J Pineal Res* 2009; 46: 53-57.
111. Chahbouni M, Escames G, Venegas C, Sevilla B, García JA, López LC, Muñoz-Hoyos A, Molina-Carballo A, Acuña-Castroviejo D. Melatonin treatment normalizes plasma pro-inflammatory cytokines and nitrosative/oxidative stress in

- patients suffering from Duchenne muscular dystrophy. *J Pineal Res* 2010; 48: 282-289.
112. Jaworek J, Leja-Szpak A, Bonior J, Nawrot K, Tomaszewska R, Stachura J, Sendur R, Pawlik W, Brzozowski T, Konturek SJ. Protective effect of melatonin and its precursor L-tryptophan on acute pancreatitis induced by caerulein overstimulation or ischemia/reperfusion. *J Pineal Res* 2003; 34: 40-52.
113. Muñoz-Casares FC, Padillo FJ, Briceño J, Collado JA, Muñoz-Castañeda JR, Ortega R, Cruz A, Túnez I, Montilla P, Pera C, Muntané J. Melatonin reduces apoptosis and necrosis induced by ischemia/reperfusion injury of the pancreas. *J Pineal Res* 2006; 40: 195-203.
114. Calvo JR, Rafi-El-Idrissi M, Pozo D, Guerrero JM. Immunomodulatory role of melatonin: specific binding sites in human and rodent lymphoid cells. *J Pineal Res* 1995; 18: 119-126.
115. Pozo D, Delgado M, Fernandez-Santos JM, Calvo JR, Gomariz RP, Martin-Lacave I, Ortiz GG, Guerrero JM. Expression of the Mel1a-melatonin receptor mRNA in T and B subsets of lymphocytes from rat thymus and spleen. *FASEB J* 1997; 11: 466-473.
116. Skwarlo-Sonta K, Majewski P, Markowska M, Oblap R, Olszanska B. Bidirectional communication between the pineal gland and the immune system. *Can J Physiol Pharmacol* 2003; 81: 342-349.
117. Pozo D, García-Mauriño S, Guerrero JM, Calvo JR. mRNA expression of nuclear receptor RZR/RORalpha, melatonin membrane receptor MT, and hydroxindole-O-methyltransferase in different populations of human immune cells. *J Pineal Res* 2004; 37: 48-54.

118. Carrillo-Vico A, Guerrero JM, Lardone PJ, Reiter RJ. A review of the multiple actions of melatonin on the immune system. *Endocrine* 2005; 27: 189-200.
119. Carrillo-Vico A, Reiter RJ, Lardone PJ, Herrera JL, Fernández-Montesinos R, Guerrero JM, Pozo D. The modulatory role of melatonin on immune responsiveness. *Curr Opin Investig Drugs* 2006; 7: 423-431.
120. Karasek M, Winczyk K. Melatonin in humans. *J Physiol Pharmacol* 2006; 57 (Suppl 5): 19-39.
121. Szczepanik M. Melatonin and its influence on immune system. *J Physiol Pharmacol* 2007; 58 Suppl 6: 115-124.
122. Lardone PJ, Carrillo-Vico A, Molinero P, Rubio A, Guerrero JM. A novel interplay between membrane and nuclear melatonin receptors in human lymphocytes: significance in IL-2 production. *Cell Mol Life Sci* 2009; 66: 516-525.
123. Carrillo-Vico A, Calvo JR, Abreu P, Lardone PJ, García-Mauriño S, Reiter RJ, Guerrero JM. Evidence of melatonin synthesis by human lymphocytes and its physiological significance: possible role as intracrine, autocrine, and/or paracrine substance. *FASEB J* 2004; 18: 537-539.
124. Sainz RM, Mayo JC, Uría H, Kotler M, Antolín I, Rodríguez C, Menendez-Pelaez A. The pineal neurohormone melatonin prevents in vivo and in vitro apoptosis in thymocytes. *J Pineal Res* 1995; 19: 178-188.
125. Yu Q, Miller SC, Osmond DG. Melatonin inhibits apoptosis during early B-cell development in mouse bone marrow. *J Pineal Res* 2000; 29: 86-93.

126. Martins E Jr, Fernandes LC, Bartol I, Cipolla-Neto J, Costa Rosa LF. The effect of melatonin chronic treatment upon macrophage and lymphocyte metabolism and function in Walker-256 tumour-bearing rats. *J Neuroimmunol* 1998; 82: 81-89.
127. Moore CB, Siopes TD. Melatonin can produce immunoenhancement in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) without prior immunosuppression. *Gen Comp Endocrinol* 2002; 129: 122-126.
128. Garcia-Mauriño S, Gonzalez-Haba MG, Calvo JR, Rafii-El-Idrissi M, Sanchez-Margalet V, Goberna R, Guerrero JM. Melatonin enhances IL-2, IL-6, and IFN-gamma production by human circulating CD4+ cells: a possible nuclear receptor-mediated mechanism involving T helper type 1 lymphocytes and monocytes. *J Immunol.* 1997; 159: 574-581.
129. Garcia-Mauriño S, Gonzalez-Haba MG, Calvo JR, Goberna R, Guerrero JM. Involvement of nuclear binding sites for melatonin in the regulation of IL-2 and IL-6 production by human blood mononuclear cells. *J Neuroimmunol* 1998; 92: 76-84.
130. García-Mauriño S, Pozo D, Calvo JR, Guerrero JM. Correlation between nuclear melatonin receptor expression and enhanced cytokine production in human lymphocytic and monocytic cell lines. *J Pineal Res* 2000; 29: 129-137.
131. Currier NL, Sun LZ, Miller SC. Exogenous melatonin: quantitative enhancement in vivo of cells mediating non-specific immunity. *J Neuroimmunol* 2000; 104: 101-108.
132. Guerrero JM, Reiter RJ. Melatonin-immune system relationships. *Curr Top Med Chem* 2002; 2: 167-179.

133. Di Stefano A, Paulesu L. Inhibitory effect of melatonin on production of IFN gamma or TNF alpha in peripheral blood mononuclear cells of some blood donors. *J Pineal Res* 1994; 17: 164-169.
134. Markowska M, Waloch M, Skwarlo-Sonta K. Melatonin inhibits PHA-stimulated chicken lymphocyte proliferation in vitro. *J Pineal Res* 2001; 30: 220-226.
135. Jung FJ, Yang L, Härter L, Inci I, Schneiter D, Lardinois D, Keel M, Weder W, Korom S. Melatonin in vivo prolongs cardiac allograft survival in rats. *J Pineal Res* 2004; 37: 36-41.
136. Maestroni GJM, Conti A, Pierpaoli W. Role of the pineal gland in immunity: II. Melatonin enhances the antibody response via an opiate mechanism. *Clin Exp Immunol* 1987; 68: 384-391.
137. Fildes JE, Yonan N, Keevil BG. Melatonin - a pleiotropic molecule involved in pathophysiological processes following organ transplantation. *Immunology* 2009; 127: 443-449.
138. Inci I, Inci D, Dutly A, Boehler A, Weder W. Melatonin attenuates posttransplant lung ischemia-reperfusion injury. *Ann Thorac Surg* 2002; 73: 220-225.
139. Li Z, Nickkholgh A, Yi X, Bruns H, Gross ML, Hoffmann K, Mohr E, Zorn M, Büchler MW, Schemmer P. Melatonin protects kidney grafts from ischemia/reperfusion injury through inhibition of NF-kB and apoptosis after experimental kidney transplantation. *J Pineal Res* 2009; 46: 365-372.
140. González-Ramón N, Hoebe K, Alava MA, Van Leengoed L, Piñeiro M, Carmona S, Iturralde M, Lampreave F, Piñeiro A. Pig-MAP/ITIH4 and haptoglobin are

- interleukin-6-dependent acute-phase plasma proteins in porcine primary cultured hepatocytes. *Eur J Biochem* 2000; 267: 1878-1885.
141. García-Gil FA, Lampreave F, Fuentes-Broto L, Carpintero R, Gonzalvo E, García JJ, Alvarez-Alegret R, Alfaro J, Orden I, Roda L. Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 4 as a marker of acute rejection in pancreas allotransplantation in pigs. *Transplant Proc* 2010; 42: 3063-3069.
142. Janero DR. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic Biol Med* 1990; 9: 515-540.
143. Drachenberg CB, Odorico J, Demetris AJ, Arend L, Bajema IM, Bruijn JA, Cantarovich D, Cathro HP, Chapman J, Dimosthenous K, Fyfe-Kirschner B, Gaber L, Gaber O, Goldberg J, Honsová E, Iskandar SS, Klassen DK, Nankivell B, Papadimitriou JC, Racusen LC, Randhawa P, Reinholt FP, Renaudin K, Revelo PP, Ruiz P, Torrealba JR, Vazquez-Martul E, Voska L, Stratta R, Bartlett ST, Sutherland DE. Banff schema for grading pancreas allograft rejection: working proposal by a multi-disciplinary international consensus panel. *Am J Transplant* 2008; 8: 1237-1249.
144. Lampreave F, Gonzalez-Ramon N, Martinez-Ayensa S, Hernández MA, Lorenzo HK, García Gil FA, Piñeiro A. Characterization of the acute phase serum protein response in pigs. *Electrophoresis* 1994; 15: 672-676.
145. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-254.

146. Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Shaltiel S, Stadtman ER. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology* 1990; 186: 464-478.
147. Drachenberg CB, Papadimitriou JC, Klassen DK, Racusen LC, Hoehn-Saric EW, Weir MR, Kuo PC, Schweitzer EJ, Johnson LB, Bartlett ST. Evaluation of pancreas transplant needle biopsy: reproducibility and revision of histologic grading system. *Transplantation* 1997; 63:1579–1586.
148. Gaber LW. Pancreas allograft biopsies in the management of pancreas transplant recipients. Histopathologic review and clinical correlations. *Arch Pathol Lab Med* 2007; 131: 1192-1199.
149. Lichtenstein KL, Braschak RM. Experimental transplantation of the pancreas in dog. *J Int Coll Surg* 1957; 28: 1-6.
150. Larsen MO, Rolin B. Use of the Gottingen minipig as a model of diabetes, with special focus on type 1 diabetes research. *ILAR J* 2004; 45: 303-313.
151. Kobayashi K, Kobayashi N, Okitsu T, Yong C, Fukazawa T, Ikeda H, Kosaka Y, Narushima M, Arata T, Tanaka N. Development of a porcine model of type 1 diabetes by total pancreatectomy and establishment of a glucose tolerance evaluation method. *Artif Organs* 2004; 28: 1035-1042.
152. Garcia-Gil FA, Gonzalvo E, Garcia-Garcia JJ, Albendea CD, Güemes A, Tome-Zelaya E, Fuentes L, Santa-Clotilde E, Aso J, Bejarano C, Garrido N, Gracia C, Gómez E, Sánchez M. Lipidic peroxidation on ischemia-reperfusion oxidative injury of the graft preserved in Celsior and University of Wisconsin solutions on a pig pancreas transplantation model. *Transplant Proc* 2006; 38: 2595-2599.

153. García Gil FA, Guzmán Ariza M, Escartín Arias A, Viana Miguel M, Saez-Benito Suescun A, Calvo Sancho JJ, Esteva Díaz F. Aspectos técnicos del trasplante pancreático-duodenal con derivación exocrina a vejiga urinaria en el cerdo. Arch Fac Med Zaragoza 1994, 34: 1-5.
154. Wahlberg J, Southard JH, Belzer FO. Development of a cold storage solution for pancreas preservation. Cryobiology 1986; 23: 477-482
155. Wahlberg J.A., Love R, Landegaard L, Southard JH, Belzer FO. 72 hours preservation of the canine pancreas. Transplantation 1987; 43: 5-9
156. Belzer FO, Southard JH. Principles of solid-organ preservation by cold storage. Transplantation 1988; 45: 673-676.
157. García-Gil FA, Serrano MT, Fuentes-Broto L, Arenas J, García JJ, Güemes A, Bernal V, Campillo A, Sostres C, Araiz JJ, Royo P, Simón MA. Celsior versus University of Wisconsin preserving solutions for liver transplantation: postreperfusion syndrome and outcome of a 5-year prospective randomized controlled study. World J Surg 2011; 35: 1598-1607.
158. Gruessner AC, Sutherland DE. Report for the International Pancreas Transplant Registry-2000. Transplant Proc 2001; 33: 1643-6.
159. Swindle MM. Swine as replacements for dogs in the surgical teaching and research laboratory. Lab Anim Sci 1984; 34: 383-385.
160. Lima JR, Martín MF, Ezquerra, LJ, García MJ, Gomar C, Carrasco-Jiménez MS. Técnicas anestésicas para la cirugía toracoscópica en animales de experimentación. En: Carrasco Jiménez MS, Usón Gargallo J. editores.

- Aprendizaje y aplicación de la anestesia en cirugía toracoscópica. Barcelona: Roche Farma-EDIKA MED; 1998. p. 85-128.
161. Martín MF, Lima, JR, García MJ, Carrasco-Jiménez MS. Consideraciones fisiológicas y fármacos empleados en especies animales. En: Carrasco Jiménez, M.S., Usón Gargallo, J. editores. Aprendizaje y aplicación de la anestesia en cirugía toracoscópica. Barcelona: Roche Farma-EDIKA MED; 1998. p. 27-83.
162. Ko JCH, Williams BL, Smith VL, McGrath CJ, Jacobson JD. Comparison of Telazol-Ketamine, Telazol-Ketamine-Xylazine as chemical restraint and anesthetic induction combination in swine. *Lab Anim Sci* 1993; 45: 290-294.
163. Ko JCH, Williams BL, Rogers ER, Pablo LS, McCaine WC, McGrath CJ. Increasing xylazine dose-enhanced anesthetic properties of Telazol-xylazine combination in swine. *Lab Anim Sci* 1995; 43: 476-480.
164. Ganter Von M, Ruppert K, Kanngiesser M. Untersuchungen zur Entwicklung einer belastungsarmen Anästhesie beim Schwein. *Berl Münch Tierärztl Wschr* 1990; 103: 341-348.
165. Tendillo FJ, Álvarez Gómez de Segura I. Consideraciones especiales de la anestesia en el cerdo. *Res Surg* 1991; 7 (suppl): 17-24.
166. Sakaguchi M, Nishimura R, Sasaki N, Ishiguro T, Tamura H. Sedative effects of medetomidine in pigs. *J Vet Med Sci* 1992; 54: 643-647.
167. Sakaguchi M, Nishimura R, Sasaki N, Ishiguro T, Tamura H. Enhancing effect of butorfanol on medetomidine-induced sedation in pigs. *J Vet Med Sci* 1992; 54: 1183-1185.

168. Nishimura R, Kim H, Matsunaga S, Hayashi K, Tamura H, Sasaki N, Takeuchi A. Comparison of sedative and analgesic/anesthetic effects induced by medetomidine, acepromazine, azaperone, droperidol and midazolam in laboratory pigs. *J Vet Med Sci* 1993; 55: 687-690.
169. Nishimura R, Kim H, Matsunaga S, Hayashi K, Tamura H, Sasaki N, Takeuchi A. Sedative effect induced by combination of medetomidine and midazolam in pigs. *J Vet Med Sci* 1993; 55: 717-722.
170. Tendillo FJ, Mascías A, Santos M, Álvarez Gómez de Segura I, San Román F, Castillo-Olivares JL. Cardiopulmonary and analgesic effects of xylazine, detomidine, medetomidine, and the antagonist atipamezole in isoflurane-anesthetized swine. *Lab Anim Sci* 1996; 46: 215-219.
171. Manohar M, Parks CM. Porcine systemic and regional organ blood flow during 1.0 and 1.5 minimum alveolar concentrations of sevoflurane anesthesia without or with 50% nitrous oxide. *J Pharmacol Exp Ther* 1984; 234: 640-648.
172. Steffey, E.P. Inhalation anesthetics. In: Thurmon JC, Tranquilli WJ, Benson GJ. Editores. *Lumb and Jones' Veterinary Anesthesia*. 3rd edition. Baltimore: Williams and Wilkins 1996; p. 297-329.
173. Lima JR, Martín MF, Luis L, Lima MA, Ezquerra LJ, Carrasco MS. Manejo anestésico durante la prostatectomía radical laparoscópica en modelo experimental. En: Usón J, Sánchez FM, Roca A, Passas J, Van Velthoven R. editores. *Prostatectomía radical laparoscópica*. Cáceres: Centro de Cirugía de Mínima Invasión; 2003. p. 47-69.

174. Muir WW, Hubbell JAE, Skarda RT, Bednarski RM. Drugs used for preanesthetic medication. En: Handbook of Veterinary Anesthesia. 3rd ed. St. Louis: Mosby, Inc.; 2000. p. 19-40.
175. Smith AC, Ehler WJ, Swindle MM. Anesthesia and analgesia in swine. In: Kohn DF, Wixon SK, White WJ, Benson GJ. editores. Anesthesia and analgesia in laboratory animals. San Diego: Academic Press; 1997. p. 313-336.
176. Teoh N C, Farrell GC. Hepatic ischemia reperfusion injury: pathogenic mechanisms and basis for hepatoprotection. J Gastroenterol Hepatol 2003; 18: 891-902.
177. Ersoz N, Guven A, Cayci T, Uysal B, Turk E, Oztas E, Akgul EO, Korkmaz A, Cetiner S. Comparison of the Efficacy of Melatonin and 1400W on renal ischemia/reperfusion injury: a role for inhibiting iNOS. Ren Fail 2009; 31: 704-710.
178. Kurcer Z, Oguz E, Ozbilge H, Baba F, Aksoy N, Celik H, Cakir H, Gezen MR. Melatonin protects from ischemia/reperfusion-induced renal injury in rats: this effect is not mediated by proinflammatory cytokines. J Pineal Res 2007; 43: 172-178.
179. Sahna E, Parlakpinar H, Ozturk F, Cigremis Y, Acet A. The protective effects of physiological and pharmacological concentrations of melatonin on renal ischemia-reperfusion injury in rats. Urol Res 2003; 31: 188-193.
180. Ceyran H, Narin F, Narin N, Akgun H, Ceyran AB, Ozturk F, Akcali Y. The effect of high dose melatonin on cardiac ischemia- reperfusion injury. Yonsei Med J 2008; 49: 735-741.

181. Sahna E, Parlakpınar H, Turkoz Y, Acet A. Protective effects of melatonin on myocardial ischemia/reperfusion induced infarct size and oxidative changes. *Physiol Res* 2005; 54: 491-495.
182. Okatani Y, Wakatsuki A, Reiter RJ, Enzan H, Miyahara Y. Protective effect of melatonin against mitochondrial injury induced by ischemia and reperfusion of rat liver. *Eur J Pharmacol* 2003; 469: 145-152.
183. Kesik V, Guven A, Vurucu S, Tunc T, Uysal B, Gundogdu G, Oztas E, Korkmaz A. Melatonin and 1400 W ameliorate both intestinal and remote organ injury following mesenteric ischemia/reperfusion. *J Surg Res* 2009; 157: e97-e105.
184. Kubo S, Yamamoto K, Magata Y, Iwasaki Y, Tamaki N, Yonekura Y, Konishi J. Assessment of pancreatic blood flow with positron emission tomography and oxygen-15 water. *Ann Nucl Med* 1991; 5: 133-138.
185. Tiedge M, Lortz S, Drinkgern J, Lenzen S. Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells. *Diabetes* 1997; 46: 1733-1742.
186. Humar A, Ramcharan T, Kandaswamy R, Gruessner RW, Gruessner AC, Sutherland DE. Technical failures after pancreas transplants: why grafts fail and the risk factors--a multivariate analysis. *Transplantation* 2004; 78: 1188-1192.
187. Gao S, Li P, Pan T, Yang C. Cardioprotective effects of melatonin on recovery of rat donor hearts after 12-hour preservation. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2003; 23: 407-410.
188. Zaoualí MA, Reiter RJ, Padrişsa-Altés S, Boncompagni E, García JJ, Ben Abennebi H, Freitas I, García-Gil FA, Rosello-Catafau J. Melatonin protects

- steatotic and nonsteatotic liver grafts against cold ischemia and reperfusion injury. *J Pineal Res* 2011; 50: 213-221.
189. Bewick M, Mundy AR, Eaton B, Watson F. Endocrine function of the heterotopic pancreatic allotransplant in dogs. II. Immediate post-transplant period. *Transplantation* 1981; 31: 19-22.
190. Diem P, Abid M, Redmon JB, Sutherland DE, Robertson RP. Systemic venous drainage of pancreas allografts as independent cause of hyperinsulinemia in type I diabetic recipients. *Diabetes* 1990; 39: 534-540.
191. Earnhardt RC, Kindler DD, Weaver AM, Cornett G, Elahi D, Veldhuis JD, Hanks JB. Hyperinsulinemia after pancreatic transplantation. Prediction by a novel computer model and in vivo verification. *Ann Surg* 1993; 218: 428-441.
192. Gaber AO, Shokouh-Amiri MH, Hathaway DK, Hammontree L, Kitabchi AE, Gaber LW, Saad MF, Britt LG. Results of pancreas transplantation with portal venous and enteric drainage. *Ann Surg* 1995; 221: 613-622.
193. Tyden G, Groth CG: Exocrine function of the pancreas graft. En: Dubernard JM, Sutherland DER, eds. *International Handbook of Pancreas Transplantation*. Dordrecht (The Neherlands): Kluwer Academic Publishers; 1989: 239-255.
194. Fridell JA, Mangus RS, Powelson JA. Histidine-tryptophan-ketoglutarate for pancreas allograft preservation: the Indiana University experience. *Am J Transplant* 2010; 10: 1284-1289.
195. Lin GJ, Huang SH, Chen YW, Hueng DY, Chien MW, Chia WT, Chang DM, Sytwu HK. Melatonin prolongs islet graft survival in diabetic NOD mice. *J Pineal Res* 2009; 47: 284-292.

196. Neeff HP, von Dobschuetz E, Sommer O, Hopt UT, Drognitz O. In vivo quantification of oxygen-free radical release in experimental pancreas transplantation. *Transpl Int* 2008; 21: 1081-1089.
197. Mayer H, Schmidt J, Thies J, Ryschich E, Gebhard MM, Herfarth C, Klar E. Characterization and reduction of ischemia/reperfusion injury after experimental pancreas transplantation. *J Gastrointest Surg* 1999; 3: 162-166.
198. Sapmaz E, Ayar A, Celik H, Sapmaz T, Kilic N, Yasar MA. Effects of melatonin and oxytetracycline in autologous intraperitoneal ovary transplantation in rats. *Neuro Endocrinol Lett* 2003; 24: 350-354.
199. Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM, Antolín I, Herrera F, Martín V, Reiter RJ. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J Pineal Res* 2004; 36: 1-9.
200. Bettahi I, Pozo D, Osuna C, Reiter RJ, Acuña-Castroviejo D, Guerrero JM. Melatonin reduces nitric oxide synthase activity in rat hypothalamus. *J Pineal Res* 1996; 20: 205-210.
201. García JJ, Reiter RJ, Guerrero JM, Escames G, Yu BP, Oh CS, Muñoz-Hoyos A. Melatonin prevents changes in microsomal membrane fluidity during induced lipid peroxidation. *FEBS Lett* 1997; 408: 297-300.
202. Acuña-Castroviejo D, Martín M, Macías M, Escames G, León J, Khaldy H, Reiter RJ. Melatonin, mitochondria, and cellular bioenergetics. *J Pineal Res* 2001; 30: 65-74.

203. Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Qi W, Kim SJ, El-Sokkary GH. Ischemia/reperfusion-induced arrhythmias in the isolated rat heart: prevention by melatonin. *J Pineal Res* 1998; 25: 184-191.
204. Hardeland R, Backhaus C, Fadavi A. Reactions of the NO redox forms NO⁺, ·NO and HNO (protonated NO⁻) with the melatonin metabolite N1-acetyl-5-methoxykynuramine. *J Pineal Res* 2007; 43: 382-388.
205. Davies MJ. Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 305: 761-770.
206. Davies KJA, Delsignore ME, Lin SW. Protein damage and degradation by oxygen radicals. II. Modification of amino acids. *J Biol Chem* 1987; 262: 9902-9907.
207. Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies MJ. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J* 1997; 324: 1-18.
208. Stadtman ER. Protein oxidation in aging and age-related diseases. *Ann NY Acad Sci* 2001; 928: 22-38.
209. Headlam HA, Davies MJ. Cell-mediated reduction of protein and peptide hydroperoxides to reactive free radicals. *Free Radic Biol Med* 2003; 34: 44-55.
210. Krause GS, DeGracia DJ, Skjaerlund JM, O'Neil BJ. Assessment of free radical induced damage in brain proteins after ischemia and reperfusion. *Resuscitation* 1992; 23: 59-69.
211. Kushner I. The phenomenon of the acute phase response. *Ann N Y Acad Sci* 1982; 389: 39-48.
212. Baumann H, Gauldie J. The acute phase response. *Inmunol Today* 1994; 15: 74-80.

213. Eckersall PD. Recent advances and future prospects for the use of acute phase proteins as markers of disease in animals. *Revue Méd Vét* 2000; 151: 577-584.
214. Gruys E, Toussaint MJM, Niewold TA, Koopmans SJ. Acute phase reaction and acute phase proteins *J Zhejiang Univ SCI* 2005; 11: 1045-1056.
215. Gonzalez-Ramon N, Alava MA, Sarsa JA, Piñeiro M, Escartin A, García-Gil A, Lampreave F, Piñeiro A. The major acute phase serum protein in pigs is homologous to human plasma kallikrein sensitive PK-120. *FEBS Lett* 1995; 371: 227-230.
216. Nishimura H, Kakizaki I, Muta T, Sasaki N, Pu P X, Yamashita T, Nagasawa S. cDNA and deduced amino acid sequence of human PK-120, a plasma kallikrein-sensitive glycoprotein. *FEBS Lett* 1995; 357: 207-211.
217. Daveau M, Jean L, Soury E, Olivier E, Masson S, Lyoumi S, Chan P, Hiron M, Lebreton JP, Husson A, Jegou S, Vaudry H, Salier JP. Hepatic and extra-hepatic transcription of inter-alpha-inhibitor family genes under normal or acute inflammatory condition in rat. *Arch Biochem Biophys* 1998; 350: 315-323.
218. Piñeiro M, Andrés M, Iturralde M, Carmona S, Hirvonen J, Pyörälä S, Heegaard PM, Tjørnehøj K, Lampreave F, Piñeiro A, Alava MA. ITIH4 (inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 4) is a new acute-phase protein isolated from cattle during experimental infection. *Infect Immun* 2004; 72: 3777-3782.
219. Salier JP, Rouet P, Raguenez G, Daveau M. The inter- α -inhibitor family: from structure to regulation. *Biochem J* 1996; 315: 1-9.
220. Raeburn CD, Sheppard F, Barsness KA, Arya J, Harken AH. Cytokines for surgeons. *Am J Surg* 2002; 183: 268-273.

221. Choi Miura NH, Takahosho K, Yoda M, Saito K, Mori M, Ozaki H, Mazda T Tomita M. The novel acute phase protein IHRP inhibits actin polymerisation and phagocytosis of polymorphonuclear cells. *Inflamm Res* 2000; 49: 305-310.
222. Hartmann A, Eide TC, Fauchald P, Bentdal O, Herbert J, Gallimore JR, Pepys MB. Serum amyloid A protein is a clinically useful indicator of acute renal allograft rejection. *Nephrol Dial Transplant* 1997; 12: 161-166.
223. Burns AM, Shelly MP, Walker S, Park GR. Serum acute phase proteins after orthotopic liver transplantation. *Br J Anaesth* 1990; 65: 418-420.
224. Izumi S, Hughes RD, Langley PG, Pernambuco JR, Williams R. Acute phase response after liver transplantation for fulminant hepatic failure and cirrhosis. *Transpl Int* 1995; 8: 340-345.
225. Maury CP, Teppo AM, Hockerstedt K. Acute phase response and liver allograft rejection. *Liver* 1988; 8: 75-79.
226. Gitto E, Romeo C, Reiter RJ, Impellizzeri P, Pesce S, Basile M, Antonuccio P, Trimarchi G, Gentile C, Barberi I, Zuccarello B. Melatonin reduces oxidative stress in surgical neonates. *J Pediatr Surg* 2004; 39: 184-189.
227. Yousaf F, Seet E, Venkatraghavan L, Abrishami A, Chung F. Efficacy and safety of melatonin as an anxiolytic and analgesic in the perioperative period: a qualitative systematic review of randomized trials. *Anesthesiology* 2010; 113: 968-976.
228. Borazan H, Tuncer S, Yalcin N, Erol A, Otelcioglu S. Effects of preoperative oral melatonin medication on postoperative analgesia, sleep quality, and sedation in

- patients undergoing elective prostatectomy: a randomized clinical trial. *J Anesth* 2010; 24: 155-160.
229. Tekbas OF, Ogur R, Korkmaz A, Kilic A, Reiter RJ. Melatonin as an antibiotic: new insights into the actions of this ubiquitous molecule. *J Pineal Res* 2008; 44: 222-226.
230. Nunes Oda S, Pereira Rde S. Regression of herpes viral infection symptoms using melatonin and SB-73: comparison with Acyclovir. *J Pineal Res* 2008; 44: 373-378.
231. Escames G, Acuña-Castroviejo D, López LC, Tan DX, Maldonado MD, Sánchez-Hidalgo M, León J, Reiter RJ. Pharmacological utility of melatonin in the treatment of septic shock: experimental and clinical evidence. *J Pharm Pharmacol* 2006; 58: 1153-1165.
232. Srinivasan V, Pandi-Perumal SR, Spence DW, Kato H, Cardinali DP. Melatonin in septic shock: some recent concepts. *J Crit Care* 2010; 25: 656-666.
233. Barchas J, Dacosta F, Spector S. Acute pharmacology of melatonin. *Nature* 1967; 214: 919-920.
234. Reiter R, Tang L, García JJ, Muñoz-Hoyos A. Pharmacological actions of melatonin in oxygen radical pathophysiology. *Life Sci* 1997; 60: 2255-2271.
235. Jahnke G, Marr M, Myers C, Wilson R, Travlos G, Price C. Maternal and developmental toxicity evaluation of melatonin administered orally to pregnant Sprague-Dawley rats. *Toxicol Sci* 1999; 50: 271-279.

236. Küçükakin B, Lykkesfeldt J, Nielsen HJ, Reiter RJ, Rosenberg J, Gögenur I. Utility of melatonin to treat surgical stress after major vascular surgery—a safety study. *J Pineal Res* 2008; 44: 426-431.