

Preservación hipotérmica del intestino delgado: un estudio morfológico mediante microscopía electrónica de barrido

Hypothermic preservation of small bowel: a morphological scanning electron microscopy study

María Ángeles Muñoz Miguelsanz¹, Ricardo Fernández Valadés¹, Eduardo Fernández Segura²

¹Servicio de Cirugía Pediátrica. Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada

²Departamento de Histología. Facultad de Medicina de la Universidad de Granada

Resumen

Introducción: El objetivo del presente estudio es analizar el efecto de soluciones cristaloides simples (solución salina y solución de Ringer Lactato) y una solución de preservación de órganos compleja (solución Celsior) sobre la pared intestinal de ratones mediante el empleo de microscopía electrónica de barrido tras su preservación hipotérmica.

Material y Métodos: Los segmentos intestinales de íleon procedentes de ratones CD1 fueron perfundidos por vía vascular e intraluminal con soluciones cristaloides simples como el suero salino (grupo 2) o solución de Ringer-Lactato (grupo 3), y con soluciones complejas como la solución Celsior (grupo 4). Los segmentos fueron almacenados durante 14 horas a 4° C con la misma solución empleada para su perfusión. Las diferentes muestras fueron procesadas utilizando protocolos convencionales para microscopía electrónica de barrido.

Resultados: Nuestros resultados muestran que el grupo 2 se caracterizó por presentar un patrón vellositario y microvellositario compatible con el grupo control (grupo 1). El grupo 3 mostró lesiones focales caracterizadas por pérdidas epiteliales a nivel del vértice vellositario y exposición del eje conjuntivo-vascular de la vellosidad. Finalmente, el grupo 4 presentó un patrón vellositario desestructurado con hendiduras subepiteliales extensas, así como destrucción de células enterocíticas hasta la base.

Discusión: El estudio demuestra que las soluciones cristaloides simples administradas por vía vascular e intraluminal mantienen la integridad morfológica de la mucosa intestinal tras su preservación hipotérmica. La microscopía electrónica de barrido constituye una metodología óptima en la valoración topográfica del daño tisular inducido por diferentes protocolos de preservación.

Abstract

Introduction: The aim of this study is to analyze the effect of simple crystalloid solutions (saline and Ringer lactate solution) and an organ preservation solution (Celsior) on murine intestinal ileal mucosa by scanning electron microscopy after hypothermic preservation.

Material and Methods: The intestinal segments of ileum from CD1 mice were intravascularly and intraluminally flushed with 3 different preservation solutions. The used solutions were the simple crystalloid solution normal saline -group 2- and Lactated Ringer (LR) -group 3-. As organ preservation solution, the solution Celsior -group 4- was used. The segments were stored for 14 hours at 4 ° C with the same solution used for perfusion. The samples were processed using standard protocols for scanning electron microscopy.

Results: Our results show that group 2 was characterized by villous and microvilli pattern similar to the control group (group 1). The group 3 showed focal lesions characterized by missing epithelium at the apex level and the exposure of the connective-vascular axis of the villi. Finally, group 4 presented a disrupted villous pattern with extensive subepithelial clefts as well as complete denuded villi.

Discussion: This study shows that simple crystalloid solutions administered via vascular and intraluminal maintain morphological integrity of the intestinal mucosa after hypothermic preservation. In addition, scanning electron microscopy is an optimal methodology to evaluate the topographical tissue damage induced by various preservation protocols.

Palabras clave: Trasplante intestinal pediátrico; Celsior; Ringer Lactato; Suero salino; Microscopía electrónica de barrido.

Keywords: Pediatric intestinal transplant; Celsior solution; Ringer Lactate; Saline Solution; Scanning Electron Microscopy.

INTRODUCCIÓN

El trasplante intestinal pediátrico, a pesar de no haber tenido una evolución paralela a la de otros trasplantes de órganos sólidos, se ha convertido en una realidad en las dos últimas décadas gracias al desarrollo de nuevas técnicas quirúrgicas y diferentes formas de injertos intestinales, así como a la aparición de algunos inmunosupresores, y la evolución del concepto de fallo intestinal (1-3). No obstante, la preservación del intestino continúa siendo inadecuada, suponiendo un reto debido a la naturaleza hueca del mismo, a sus necesidades metabólicas especiales, a la facilidad para el desarrollo de edema bajo mínimas condiciones de estrés así como a su ambiente bacteriano (4-6). En este sentido, y a diferencia de lo que ocurre con el resto de órganos utilizados para trasplante, se ha observado un daño significativo de la pared intestinal tras 12 horas de isquemia fría. Este daño se incrementa durante la fase de la isquemia-reperusión siendo la responsable de las complicaciones en el postoperatorio inmediato como la perforación, fistulización y translocación bacteriana, pudiendo contribuir en el rechazo del injerto en el postoperatorio tardío (7).

Para la preservación del intestino delgado se han desarrollado múltiples soluciones, ninguna de las cuales han sido capaces de mantener la integridad tisular en condiciones de hipotermia similares a las utilizadas en otro tipo de trasplante (8). La solución más empleada en la clínica en el momento actual es la solución de la Universidad de Wisconsin® (UW), dado que la mayoría de las extracciones de intestino delgado se llevan a cabo en donantes multiorgánicos y dicha solución constituye la técnica de preservación estándar para dicho tipo de trasplante (9-14). Existen otras soluciones de preservación (solución de Eurocollins, solución de Bretschneider o Custodiol, solución IGL-1) aunque ninguna de ellas muestra resultados consistentes (15-17). Estudios experimentales han demostrado que la solución de preservación fría Celsior® (CL) es tan efectiva como UW para la preservación de riñones. Dicha solución ha sido utilizada para la preservación de injertos intestinales en animales, obteniéndose un mejor resultado en la recuperación tras la isquemia en cuanto a integridad estructural y funcional de la mucosa intestinal, que en el grupo de UW (18).

En los últimos años algunos autores proponen la utilización conjunta de la perfusión vascular y luminal del intestino (5-7). El propósito de estos estudios es una mejora en la preservación de la mucosa intestinal en relación a la energética tisular. No obstante, son escasos los estudios experimentales llevados a cabo que han tratado de analizar la morfología de la mucosa intestinal tras dicho tipo de preservación hipotérmica (5). El mantenimiento de la integridad morfológica de la mucosa intestinal está directamente correlacionado al sustento de los parámetros de actividad metabólica y funcional que desempeña tras el trasplante. Asimismo, dicha integridad tisular es primordial para prevenir la translocación bacteriana y posibles complicaciones infecciosas (19).

El objetivo del presente estudio, por tanto, es analizar la integridad de la mucosa intestinal, desde una perspectiva morfológica, tras su preservación hipotérmica (fría) con diferentes soluciones de preservación mediante el empleo de microscopía electrónica de barrido (MEB).

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales de experimentación

En nuestro estudio hemos utilizado ratones hembra CD1 (Charles River, Barcelona, España) con un peso de 25-30 g. Los animales de experimentación (n=12) fueron sometidos a dieta absoluta de alimentos sólidos, permitiéndose solamente la ingesta de agua, durante 24 horas previas a su intervención quirúrgica. Los animales fueron manipulados de acuerdo con la Directiva del Consejo de Comunidades Europeas (86/609/ECC).

Procedimiento quirúrgico y obtención de intestino delgado

Los animales de experimentación fueron anestesiados con isoflurano procediendo a continuación a su perfusión intracardiaca con cada una de las soluciones de preservación.

Para ello se canuló el ventrículo izquierdo del animal, inoculando 30 ml de la solución de preservación fría mediante una bomba de inyección, accediendo a la circulación sistémica del animal. Tras la perfusión, se accedió a la cavidad abdominal y se localizó el ciego y la válvula ileocecal, situados en el cuadrante abdominal inferior izquierdo. Se extirparon 10 cm de íleon (desde válvula ileocecal hacia íleon proximal) de cada uno de los ratones. Una vez realizada la disección y sobre una placa de Petri, se procedió a la canulación del segmento de íleon obtenido por su extremo proximal. A continuación el segmento intestinal fue perfundido, por vía intraluminal, con 7-10 ml de la solución correspondiente a 4°C. Tras el lavado de la luz intestinal y la obtención de un flujo continuo de la solución de preservación por el extremo distal, se procedió a la sutura del mismo con seda de 4/0 (Silkam, Braun Aesculap, Rubí, Barcelona, España). Posteriormente, se continuó perfundiendo la solución evitando la sobredistensión del segmento intestinal y se procedió a la sutura del extremo proximal (Figura 1A). Los segmentos intestinales perfundidos de forma vascular e intraluminal fueron introducidos en frascos universales de cultivo (25 ml) rellenos de la misma solución de preservación utilizada. Los segmentos intestinales de íleon fueron almacenados en estas condiciones durante 14 h a 4°C (Figura 1B).

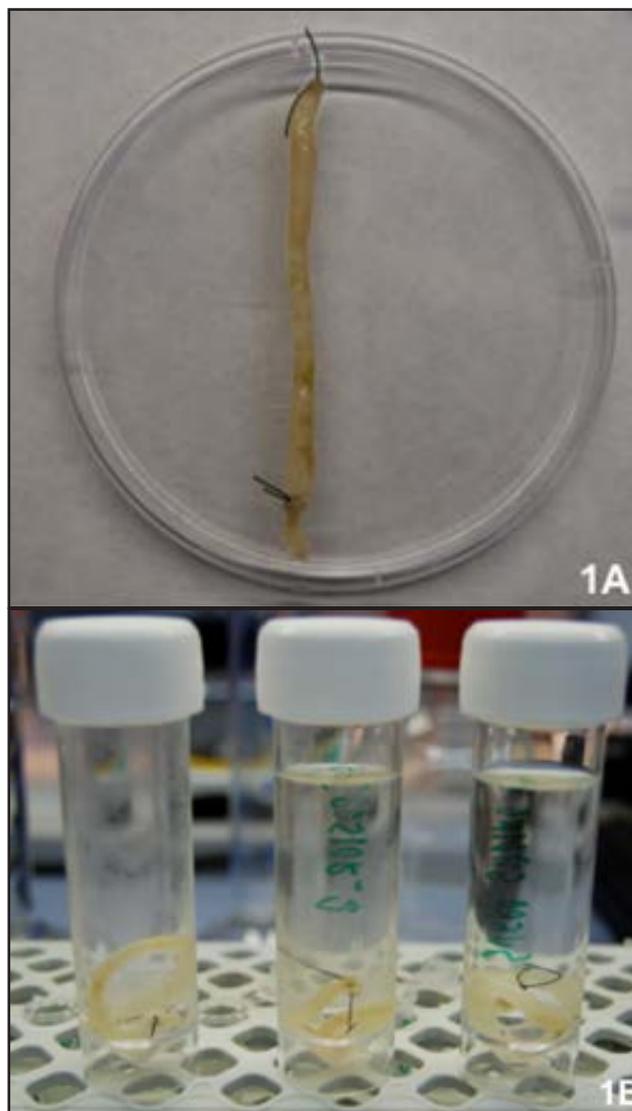


Figura 1. Almacenamiento de los fragmentos de íleon. (A) Segmento intestinal con ambos cabos cerrados conteniendo la solución de preservación en el espacio intraluminal. (B) Tubos de almacenamiento de las muestras de los grupos 2, 3 y 4, conteniendo los segmentos intestinales y la solución de preservación.

Soluciones de preservación empleadas

Las soluciones de preservación empleadas han sido el suero Fisiológico Mein (Fresenius Kabi, Barcelona, España), el Apiroserum Ringer Lactato (Fresenius Kabi, Barcelona, España) y la solución Celsior (Genzyme Corporation, Cambridge, Mass, EEUU). En la Tabla 1 se observa la composición de las soluciones previamente mencionadas.

	SOLUCION SALINA 0.9%	RINGER LACTATO	CELSIOR
K ⁺ (mmol/l)	-	4	15
Na ⁺ (mmol/l)	154	130	100
Mg ²⁺ (mmol/l)	-	-	13
Ca ²⁺ (mmol/l)	-	0.75	0.25
Cl ⁻ (mmol/l)	154	109	-
HCO ³⁻ (mmol/l)	-	-	-
Glucosa	-	-	-
Manitol	-	-	60
Osmolaridad (mOsm/kg)	308	272	360
pH (25 ^o)	5.5	6	7.3

Tabla 1: Composición de las soluciones de preservación.

Grupos experimentales

Los ratones CD1 fueron clasificados en 4 grupos experimentales. Todos los grupos fueron perfundidos vascularmente con una solución de preservación y a continuación se procedió a la infusión intraluminal de la misma, a excepción del grupo control, de la siguiente forma:

- Grupo 1: no vascular/ no intraluminal
- Grupo 2: solución salina (SS)
- Grupo 3: solución de Ringer-Lactato (RL)
- Grupo 4: solución de Celsior (Celsior)

Microscopía electrónica de barrido

Tras 14 horas de preservación hipotérmica con las distintas soluciones de preservación, se procedió al procesamiento de las muestras para microscopía electrónica de barrido (MEB)(20). Para ello, se aislaron pequeños segmentos de íleon (0.4 x 0.4 nm) procediendo a su fijación inmediata con 2.5 % de glutaraldehído grado ME (Sigma-Aldrich, Barcelona, España) en tampón fosfato 0.1M, pH 7.2 a 4°C durante 24 horas. Tras la fijación, se procedió al lavado de las muestras (3 veces, 10 min) con tampón fosfato 0.1M, pH 7.2. A continuación, las muestras fueron deshidratadas con concentraciones de alcohol etílico crecientes y desecadas mediante la técnica del punto crítico utilizando CO₂ (Balzers CPD30, Bal-Tec AG, Liechtenstein). Posteriormente, las muestras fueron montadas sobre portamuestras de Al, utilizando planchas de grafito autoadhesivas de 12 mm de diámetro (EMS, Hatfield, USA). Finalmente, se procedió a la metalización de las muestras mediante Au/Pd utilizando un metalizador Quorum SC7620 (Quorum Technologies Ltd, Kent, UK). Las muestras fueron observadas en modo convencional utilizando un microscopio electrónico de barrido Phillips XL 30 (FEI, Eindhoven, Holanda) a 15 kV.

RESULTADOS

En la figura 2 se muestra la superficie de la mucosa intestinal del íleon distal de ratones CD1 controles observados mediante MEB. La superficie muestra una imagen ortotípica caracterizada por un patrón vellositario digitiforme con vellosidades intactas en sus vértices, ausencia de exudados epiteliales y patrón microvellositario conservado. En las figuras 3, 4 y 5 se muestra el efecto de las distintas soluciones de preservación sobre la superficie intestinal. Tras 14 horas de almacenamiento hipotérmico a 4^o C, el grupo 2 se caracterizó por mostrar un patrón vellositario similar al grupo control (Figura 3A). No obstante, es posible observar un aumento de la pérdida de células en el vértice de las vellosidades intestinales (Figura 3B). Las células epiteliales se caracterizan por mostrar un patrón microvellositario normal (Figura 3C).

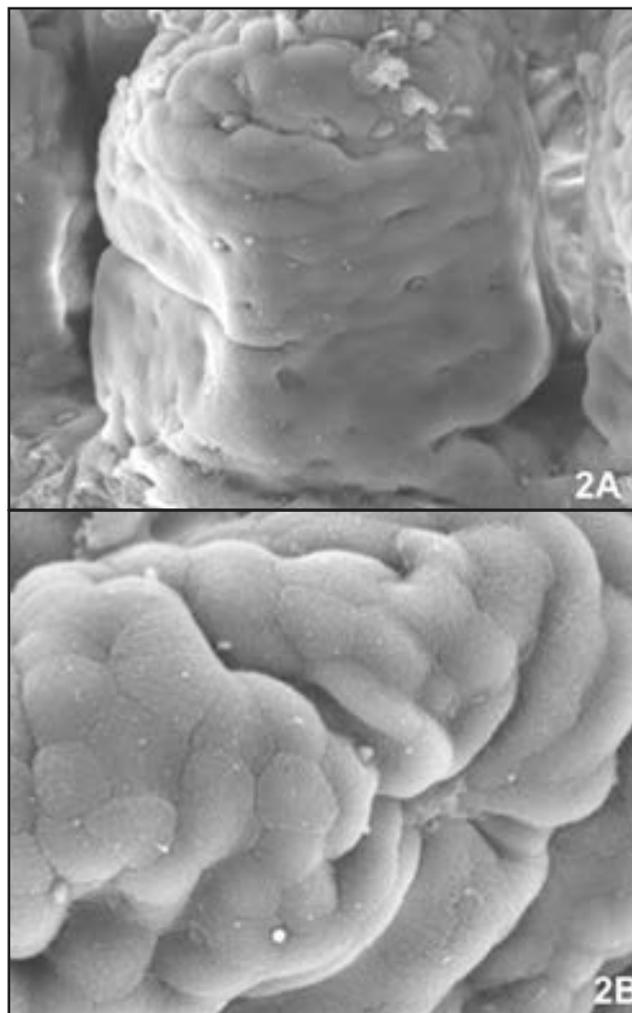


Figura 2. Microscopía electrónica de barrido de íleon de ratón control. (A) Imagen ortotípica del patrón digitiforme vellositario. (B) Enterocitos bien delimitados conformando el epitelio vellositario con ausencia de exudados epiteliales y patrón microvellositario conservado.

El grupo 3 se caracterizó por mostrar un patrón vellositario conservado de manera no uniforme con mayor definición de los enterocitos y apreciación de las criptas de Lieberkühn (Figura 4A) hallando algunos grupos de vellosidades con pérdida de células epiteliales, sobre todo en la región apical (Figura 4B) con el eje conjuntivo-vascular preservado y apareciendo hendiduras subepiteliales de moderada amplitud (Figura 4C); los enterocitos mostraban un patrón microvellositario compacto y uniforme (Figura 4D). El grupo 4 presenta un patrón vellositario desestructurado con extensas zonas de pérdida casi total del eje longitudinal (tanto eje conectivo como epitelial) (Figura 5A).

Aparecen claramente unos espacios cavernosos amplios entre las vellosidades desestructuradas que corresponden con las criptas de Lieberkühn, expuestas por la pérdida del suelo epitelial y exposición de la lámina propia (Figura 5B). Asimismo, en las vellosidades conservadas es posible observar una separación subepitelial extensa, así como destrucción de células enterocíticas y exposición del eje conjuntivo (Figura 5C y 5D).

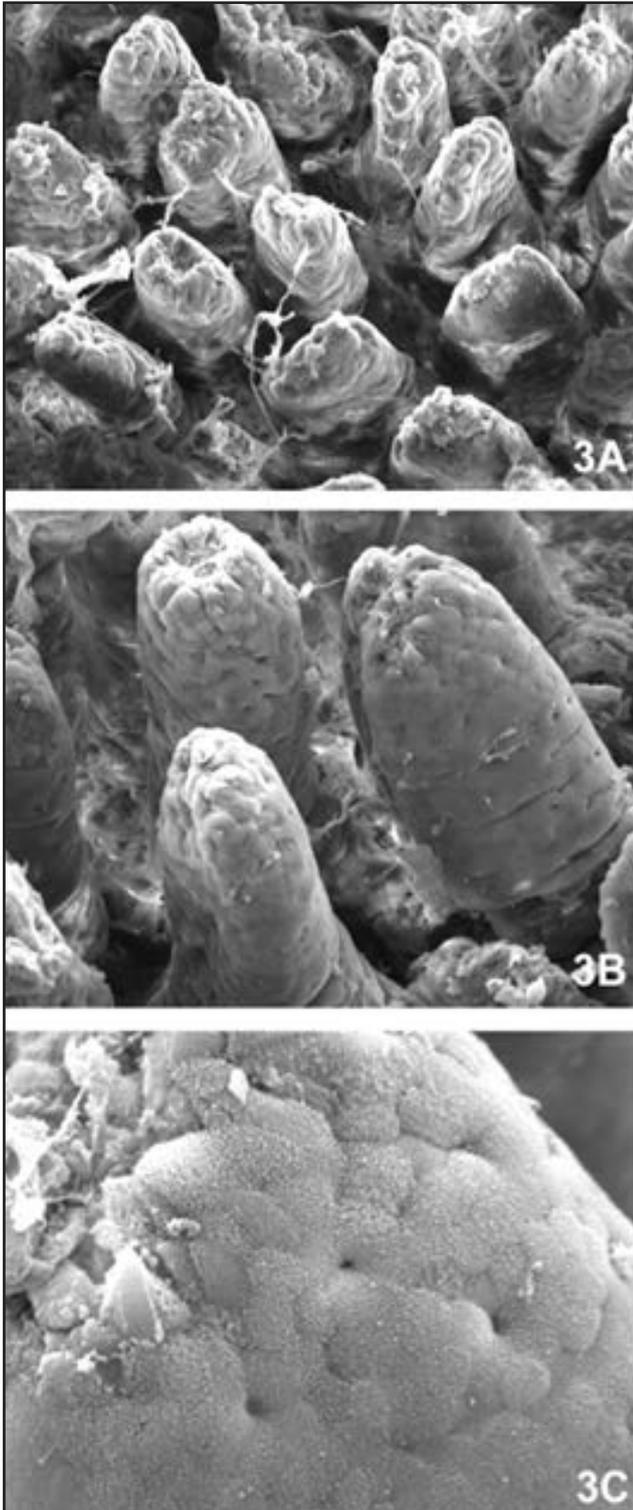


Figura 3. Microscopía electrónica de barrido de íleon de ratón preservado con la solución salina 0.9% durante 14 horas a 4^o C. (A) Patrón vellositario ortotípico. (B) Recambio celular a nivel del vértice vellositario. (C) Patrón microvellositario normal.

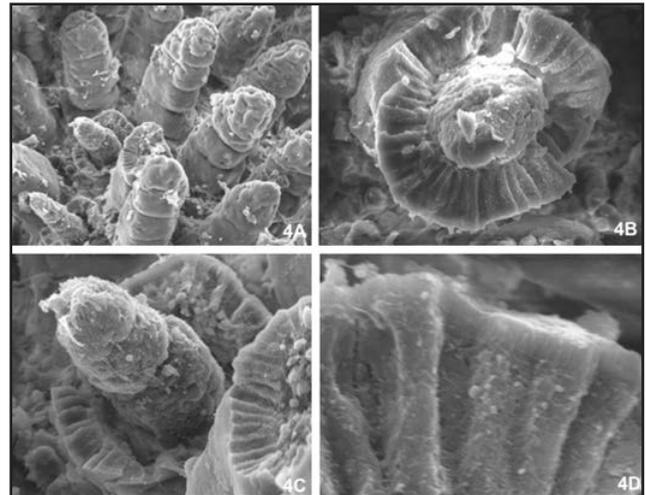


Figura 4. Microscopía electrónica de barrido de íleon de ratón preservado con la solución de Ringer-Lactato durante 14 horas a 4^o C. (A) Patrón vellositario conservado de manera no uniforme. (B) Pérdida de enterocitos en la región apical vellositaria. (C) Hendidura subepitelial de moderada amplitud. (D) Patrón microvellositario compacto y uniforme.

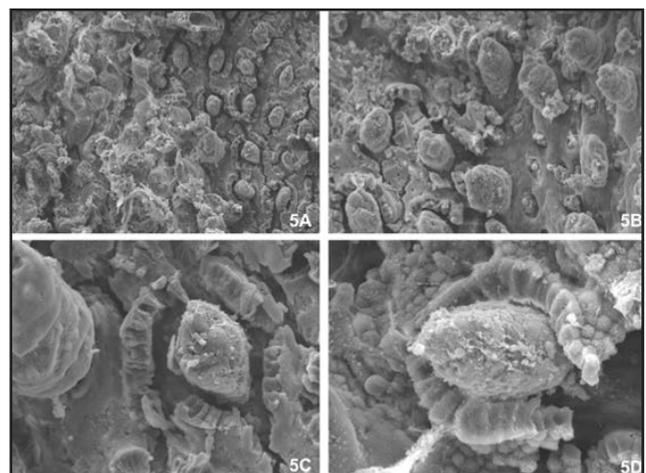


Figura 5. Microscopía electrónica de barrido de íleon de ratón preservado con la solución de Celsior durante 14 horas a 4^o C. (A) Patrón vellositario desestructurado con pérdida del eje conjuntivo y revestimiento epitelial. (B) Espacios cavernosos amplios entre las vellosidades desestructuradas que se corresponden con las criptas de Lieberkühn. (C) Hendidura subepitelial amplia. (D) Pérdida epitelial y exposición del eje conjuntivo vellositario.

DISCUSIÓN

En este estudio se ha analizado la integridad de la mucosa del íleon intestinal tras un proceso de isquemia fría como consecuencia de su almacenamiento hipotérmico en diferentes soluciones de preservación. La integridad de la mucosa ha sido evaluada desde una perspectiva morfológica utilizando microscopía electrónica de barrido.

El intestino delgado es un órgano peculiar con múltiples funciones entre las que se encuentran la de barrera protectora, así como una función de absorción y digestión, siendo la mucosa intestinal (enterocitos, microvilli, uniones intercelulares y criptas de Lieberkühn) la responsable de llevar a cabo esta función. En el proceso de preservación, la hipoperfusión e isquemia producidos por la hipotermia son los principales responsables de la alteración del complejo funcional constituido por los constituyentes de la mucosa intestinal (8-21). Por este motivo, el desarrollo de nuevas soluciones de preservación con el objetivo de minimizar las

lesiones de la mucosa intestinal inducidas por el almacenamiento hipotérmico (isquemia fría) y que faciliten la regeneración de la barrera epitelial constituye un área de gran interés.

Los protocolos de preservación actuales utilizando la solución estándar UW son adecuados pero probablemente subóptimos para la preservación intestinal. Asimismo, ninguna de las soluciones existentes (solución de Eurocollins, solución de Bretschneider o Custodiol, solución IGL-1) han demostrado su completa efectividad en la disminución de las lesiones anteriormente comentadas tras 6-10 h de almacenamiento en frío (15-17). En este sentido, estudios iniciales mostraron resultados morfológicos e histológicos equivalentes tras el empleo de soluciones cristaloides simples y complejas (17-19,21,22). De acuerdo a estos estudios, en el presente estudio hemos utilizado dos soluciones cristaloides simples como el suero salino (SS) y la solución de Ringer-Lactato (RL), ambas de amplio uso hospitalario y bajo coste económico. Por otra parte, el empleo de la solución Celsior en el presente estudio se basa en el hecho de que diferentes autores han mostrado buenos resultados en preservación cardíaca, pulmonar, hepática, pancreática y recientemente en intestino delgado (21). Algunos estudios ponen de relieve la no existencia de diferencias histológicas en el empleo de Celsior y UW tras perfusión vascular y 24 h de almacenamiento en frío (23-24). Esta solución ofrece diferentes ventajas como es su composición con un contenido en potasio bajo, utilizar la histidina como tampón, la presencia de glutatión como scavenger de radicales libres, manitol como monosacárido impermeable, además de su baja viscosidad en comparación con la solución UW (25).

Una característica distintiva del intestino es el componente intraluminal en comparación al resto de los órganos parenquimatosos en los cuales sólo se describe un componente intracelular (extravascular) y extracelular (intravascular). El componente intraluminal tiene una osmolaridad variable, una composición compleja y potencialmente está contaminado con bacterias. Además, como hemos mencionado anteriormente, está revestido por un complejo estructural y funcional muy susceptible a la isquemia. En este sentido, tras varios minutos de isquemia aparece un edema subepitelial que puede originar una ruptura de la mucosa (19). Por ello el mantenimiento de la integridad estructural del complejo funcional del intestino delgado - mucosa intestinal - conduce al éxito de la preservación del injerto, y por tanto del trasplante intestinal.

La lesión intestinal inducida por la preservación hipotérmica consiste en la aparición de un edema subepitelial (espacio de Gruenhagen) progresivo que se extiende hacia la submucosa. Dicho edema se origina a partir del intersticio de la pared intestinal y, fundamentalmente, desde el componente luminal como consecuencia de la entrada de agua y electrolitos desde la luz hacia la pared intestinal. Con el objetivo de evitar esta última, un grupo de investigación de la Universidad de Alberta propuso la perfusión intraluminal de la solución de preservación con el objetivo de minimizar dicho edema (8, 15). Diversos autores han mostrado y confirmado una disminución de la lesión a nivel de la mucosa intestinal tras la infusión luminal de diferentes soluciones de preservación (19,24,26,27).

La mayoría de estos estudios han tratado de valorar el estado energético de la mucosa intestinal así como su capacidad funcional de absorción, siendo muy escaso aquellos estudios que han tratado de valorar la integridad de la mucosa desde una perspectiva estructural. En este sentido, recientemente se ha descrito la des-localización y degradación de ZO-1 y claudina-3 a nivel de las uniones estrechas de enterocitos tras la infusión vascular y luminal de diferentes soluciones de preservación (19). Nuestro estudio ha permitido valorar, mediante el empleo de MEB, el efecto de las soluciones SS, RL y Celsior infundidas de forma vascular y intraluminal sobre la integridad de la mucosa intestinal. Los resultados muestran que los segmentos intestinales de íleon almacenados en solución salina durante 14 h a 4°C presentan una superficie intestinal semejante al grupo control. Por el contrario, los segmentos almacenados en la solución Celsior mostraron una superficie intestinal desestructurada, con

pérdida del patrón vellositario, pérdida del recubrimiento epitelial y exposición de la lámina propia de la mucosa. La preservación hipotérmica en RL mostró un patrón intermedio entre el obtenido con la solución SS y Celsior. Hasta nuestro conocimiento, este constituye el primer trabajo que ha tratado de valorar la integridad de la mucosa intestinal mediante MEB tras la perfusión de soluciones de preservación por vía vascular y luminal. La mayoría de los estudios han evaluado las lesiones inducidas por el almacenamiento en frío mediante técnicas histológicas convencionales (8,15,19,26-27). A diferencia de dicha metodología, el empleo de MEB ha permitido obtener información de extensas zonas topográficas de la superficie intestinal. En este sentido, nuestros resultados han confirmado que las lesiones de la mucosa ocurren de forma focal y no de manera uniforme a lo largo de los segmentos de íleon analizados (28-29). La elección de realizar el presente estudio a nivel del íleon radica en el hecho de que ha sido demostrado que no existe diferencias en la susceptibilidad de lesión entre los injertos de yeyuno e íleon tras 24 h de isquemia fría (29) siendo más confortable la selección de este último por su facilidad técnica y quirúrgica.

Por otra parte, está bien documentado que las lesiones estructurales del intestino delgado tras isquemia ocurren de una forma estereotipada. Park et al (30) establece una clasificación histológica de dichas lesiones la cual ha sido extensamente utilizada para valorar las lesiones inducidas por isquemia fría (preservación hipotérmica). Dicha clasificación establece 9 grados (grado 0: mucosa normal; grado 1: espacio subepitelial en el vértice de la vellosidad; grado 2: espacio subepitelial moderado; grado 3: pérdida epitelial a lo largo de la vellosidad intestinal; grado 4: vellosidad desnuda; grado 5: pérdida de vellosidades; grado 6: lesión a nivel de las criptas; grado 7: lesión que sobrepasa la mucosa; y grado 8: lesión transmural).

La aplicación de MEB para valorar las lesiones inducidas por las diferentes soluciones de preservación no permite realizar una estrecha correlación entre las lesiones observadas y la clasificación de Park. Sin embargo, es evidente cierto rango de compatibilidad. En nuestra opinión MEB permite valorar hasta el grado 5 (pérdida de vellosidades) de la clasificación de Park. En este sentido los hallazgos microscópicos analizados en el grupo experimental 2 (SS) son compatibles con el grado 0 (mucosa normal con patrón vellositario ortotípico), no siendo posible descartar el grado 1 (espacio subepitelial). En relación al grupo experimental 3 (RL) los resultados mostrados (vértices de las vellosidades desestructurados con pérdida epitelial parcial y aumento de la hendidura subepitelial) son compatibles con un grado 2. En nuestra opinión estos resultados son compatibles con la descripción del espacio de Gruenhagen, uno de los cambios histológico más tempranos que acontecen tras la isquemia fría como consecuencia de la entrada de agua y electrolitos en el espacio intercelular originando alteraciones en las propiedades adhesivas de las células epiteliales que revisten la vellosidad. Finalmente, los resultados microscópicos del grupo experimental 4 (Celsior) son compatibles con un grado 5 (pérdida de vellosidades) de la clasificación de Park.

CONCLUSIONES

En conclusión, nuestros resultados ponen de relieve que la microscopía electrónica de barrido permite valorar el efecto de la isquemia fría sobre la mucosa intestinal tras su conservación hipotérmica con diferentes soluciones de preservación. Nuestros resultados demuestran que algunas soluciones simples cristaloides como la solución salina (SS) son efectivas en el mantenimiento de la integridad de la mucosa intestinal durante su preservación hipotérmica tras su infusión vascular e intraluminal en comparación con soluciones de preservación complejas.

Este estudio presenta ciertas limitaciones. En primer lugar, el número y tipo de soluciones empleadas. El número de soluciones es escaso y es necesario el empleo de otras soluciones de preservación como la solución de Wisconsin -gold standard-. En segundo lugar, el reducido número de animales y grupos

experimentales utilizados. Ambas limitaciones hace necesaria la precaución en la interpretación de los resultados. A pesar de estas limitaciones, nuestro estudio contribuye a la necesidad de replantear nuevos estudios en el diseño y mejora de nuevas soluciones de preservación que cumplan los requerimientos de la infusión intraluminal en la preservación del intestino delgado y posterior éxito del trasplante. El empleo y modificación de soluciones de amplio uso hospitalario (SS y RL) pueden constituir, en nuestra opinión, en excelente punto de partida. Finalmente, hasta donde sabemos, es pionero en la utilización de la MEB en la valoración topográfica del daño tisular inducida por la isquemia fría.

REFERENCIAS

- López Santamaría M, Hernández F. Indicaciones, técnicas y resultados del trasplante de intestino delgado. *Nutr Hosp* 2007;22(supl 2):113-123.
- Gondolesi G, Fauda M. Technical refinements in small bowel transplantation. *Curr Opin Organ Transplant* 2008;13(3):259-265.
- Andrés Moreno AM, Ramos E, Hernández F, Encinas JL, Leal N, Gámez ML, et al. Trasplante Intestinal: ¿en qué fase estamos? *Cir Pediatr* 2010;23(3):177-183.
- Belzer FO, Southard D. Principles of solid-organ preservation by cold storage. *Transplantation* 1988;45(4):673-676.
- Oltean M, Joshi M, Herlenius G, Olausson M. Improved intestinal preservation using an intraluminal macromolecular solution: evidence from a rat model. *Transplantation* 2010;89(3):285-290.
- McKeehen D, Toledo-Pereyra LH, Sonnino RE. Small bowel preservation. In: Toledo-Pereyra LH, editor. *Organ preservation for transplantation*. Austin: Landes Bioscience, 2010. pp:175-184.
- DeRoover A, de Leval L, Gilmaire J, Detry O, Coimbra C, Boniver J, et al. Luminal contact with University of Wisconsin solution improves human small bowel preservation. *Transplant Proc* 2004;36:273-275.
- Olson DW, Jijon H, Madsen KL, Al-Saguier M, Zeng J, Jewell LD et al. Human small bowel storage: the role for luminal preservation solutions. *Transplantation* 2003;76(4):709-714.
- Schweizer E, Gassel AM, Deltz E, Schroeder P. A comparison of preservation solutions for small bowel transplantation in the rat. *Transplantation* 1994;57(9):1406-1408.
- Rodríguez FJ, Toledo-Pereyra LH, Suzuki S. Total heterotopic small bowel transplantation in the rat: technical considerations in the procurement, preservation and transplantation of the graft. *Gac Med Mex* 1993;129(2):131-137.
- Rodríguez FJ, Toledo-Pereyra LH, Cejalvo D, Lloris-Carsi J. Role of neutrophils in the development of preservation injury after small bowel preservation for transplantation in the rat. *Transplant Proc* 1993;25(6):3209.
- Fabian MA, Bollinger RR, Wyble CW, Watkins WD, Canada AT. Evaluation of solutions for small intestinal preservation. *Biochemical changes as a function of storage time*. *Transplantation* 1991;52(5):794-799.
- Rodríguez FJ, Toledo-Pereyra LH, Suzuki S. Twenty-four-hours total small bowel hypothermia storage preservation and transplantation in the rat: a study of various preservation solutions. *J Invest Surg* 1994; 7(5):439-451
- Taguchi T, Zorychta E, Guttman FM. Evaluation of UW solution for preservation of small intestinal transplants in the rat. *Transplantation* 1992; 53(6):1202-1205
- Salehi P, Zhu JZJ, Castillo EG, Avila J, Lakey J, Churchill TA. Preserving the mucosal barrier during small bowel storage. *Transplantation* 2003;76(6):911-917.
- Schweizer E, Gassel A, Deltz E, Schroeder P. Morphologic and histologic alterations after small bowel transplantation: A comparison of different solutions. *Transplant Proc* 1992; 24(3):1087.
- Kokudo Y, Furuya T, Takeyoshi I, Nakamura K, Zhang S, Murase N, et al. Comparison of University of Wisconsin, Euro-Collins, and lactated Ringer's solutions in rat small bowel preservation for orthotopic small bowel transplantation. *Transplant Proc* 1994;26(3):1492-1493.
- Minor T, Vollmar B, Menger MD, Isselhard W. Cold preservation of the small intestine with the new Celsior-solution. *Transpl Int* 1998;11(1):32-37.
- Oltean M, Joshi M, Herlenius G, Olausson M. Improved intestinal preservation using an intraluminal macromolecular solution: Evidence from a rat model. *Transplantation* 2010;89(3):285-290.
- Montuenga L, Esteban FJ, Calvo A. *Técnicas en histología y biología celular*. Barcelona: Elsevier España, 2009.
- Roskott AMC, Nieuwenhuijs VB, Dijkstra G, Koudstaal LG, Leuvenink HGD, Ploeg RJ. Small bowel preservation for intestinal transplantation: a review *Transpl Int* 2011;24:107-131.
- Li YS, Li JS, Li N, Jiang ZW, Zhao YZ, Li NY, et al. Evaluation of various solutions for small bowel graft preservation. *World J Gastroenterol* 1998; 4(2):140-143.
- Leuvenink HGD, van Dijk A, Freund RL, Ploeg RJ, van Goor H. Luminal preservation of rat small intestine with University of Wisconsin or Celsior solution. *Transplant Proc* 2005;37: 445-447.
- DeRoover A, de Leval L, Gilmaire J, Detry O, Boniver J, Honoré P, et al. A new model for human intestinal preservation: comparison of University of Wisconsin and Celsior preservation solutions. *Transplant Proc* 2004;36:270-272.
- Escalante JL, Del Río F. Preservación de órganos. *Med Intensiva* 2009;33(6):282-292.
- Schlachter K, Kokotilo M, Carter J, Thiesen A, Ochs A, Khadaroo RG, et al. Redefining the properties of an osmotic agent in an intestinal-specific preservation solution. *World J Gastroenterol* 2010;16(45):5701-5709.
- Kokotilo MS, Carter J, Thiesen A, Chen MH, Ochs A, Khadaroo RG, Churchill TA. Optimizing the concentration of hydroxyethylstarch in a novel intestinal-specific preservation solution. *Cryobiology* 2010;61(3):236-42.
- Olson D, Stewart B, Carle M, Chen M, Madsen K, Zhu J, et al. The importance of impermeant support in small bowel preservation: a morphologic, metabolic and functional study. *Am J Transplant* 2001;1:236-242.
- Balaz P, Kudla M, Lodererova A, Oliverius M, Adamec M. Preservation injury of the small bowel graft: jejunum vs. ileum. *Ann Transplant* 2007;12(1):15-18
- Oltean M, Joshi M, Björkman E, Oltean S, Casselbrant A, Herlenius G, et al. Intraluminal polyethylene glycol stabilizes tight junctions and improves intestinal preservation in the rat. *Am J Transplant* 2012;12(8):2044-2051.