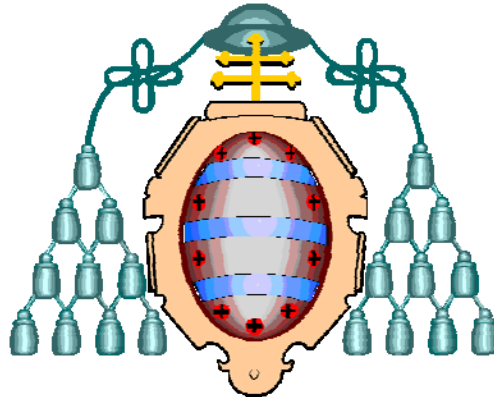


UNIVERSIDAD DE OVIEDO



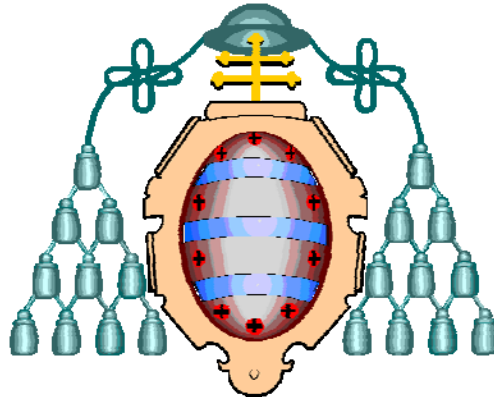
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA FUNCIONAL
PROGRAMA DE DOCTORADO
BIOLOGÍA FUNCIONAL Y MOLECULAR

***Proceso apoptótico y respuesta simpática en
tejido cardiaco durante la muerte encefálica***

Silvia Pérez López

2012

UNIVERSIDAD DE OVIEDO



DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA FUNCIONAL
PROGRAMA DE DOCTORADO
BIOLOGÍA FUNCIONAL Y MOLECULAR

***Proceso apoptótico y respuesta simpática en
tejido cardiaco durante la muerte encefálica***

Silvia Pérez López

2012

Agradecimientos

En primer lugar, agradecer al Dr. Jesús Otero que me haya permitido realizar la Tesis en su laboratorio y la confianza de todos estos años.

A FICYT y al proyecto IB05-135 “Estudio de las lesiones cardíacas en los donantes multiorgánicos, secundarias a la muerte encefálica” gracias a cuya financiación se desarrolló el trabajo que ahora se presenta en forma de memoria.

Al Área de Fisiología del Departamento de Biología Funcional.

A la Dra. Elena Díaz Rodríguez, Directora de tesis y amiga, por darme una lección de vida que nunca olvidaré y por su apoyo y ánimo de todos estos años. Gracias por estar ahí en los momentos más duros.

A la Dra. Aurora Astudillo González, Directora de tesis, por su optimismo y su energía positiva.

A Natalia Vázquez Moreno, porque sin su colaboración esto no hubiera sido posible.

Agradecer, también, a la gente del Laboratorio de Trasplante y Terapia Celular el trabajo y los cafés compartidos.

Agradecer a la Dra. Escudero la cesión de sus imágenes y al Dr. Vega su interés y su ayuda.

Gracias a la Dra. Messina y al Dr. Giacomello por hacer de mi estancia en Roma una experiencia inolvidable.

Gracias a la gente del SERIDA de Deva, Enrique y Félix, porque es estupendo saber que siempre puedo contar con ellos.

A Ana, Ángela y Raquel, gracias por estar ahí cuando más lo necesitaba, que ese fin de semana sea el primero de muchos.

A Nuria, Ramón y María por hacerme sentir su amistad, especialmente en estos últimos meses.

Algo más que gracias a mi familia por su apoyo incondicional.

Finalmente, a Iván y a Lucas. Por las horas que he dejado de dedicaros. Nada de lo que pueda escribir aquí está a la altura de lo que merecéis. A Lucas porque sin querer, me ha dado los mejores ánimos que podía necesitar y a Iván por su comprensión, su paciencia y su ayuda. Sin vosotros nunca hubiera sido capaz de lograrlo. Gracias.

Hoy es el primer día del resto de nuestros días. Paremos el reloj de nuestra vida para revisar lo que hicimos y encontrar el camino que nos lleve a lo que queremos hacer.

Abreviaturas

AB0	Grupos sanguíneos A,B,0
ACTH	Hormona adrenocorticotropa
ACV.....	Accidente cerebro vascular
ADH	Hormona antidiurética
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ATP.....	Adenosín trifosfato (<i>Adenosine TriPhosphate</i>)
BIS	Índice biespectral
Ca ²⁺	Calcio
CARD.....	Dominios de reclutamiento de caspasas
CO ₂	Dióxido de carbono
COMT	Catecol-O-metiltransferasa
Ct	Ciclo umbral (<i>threshold cycle</i>)
DD.....	Dominio de muerte
DED	Dominios efectores de muerte
DISC	Complejo inducido por señales
dNTPs.....	Desoxirribonucleótidos trifosfato
DOPA.....	Dihidroxifenilalamina
DTC.....	Doppler transcraneal
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético (<i>Ethylendiaminetetraacetic acid</i>)

EEGElectroencefalograma

FADDProteína con dominio de muerte asociada a Fas

HgMercurio

HPLCCromatografía líquida de alta resolución

HRPPeroxidasa de rábano

HUCA.....Hospital Universitario Central de Asturias

IAM.....Infarto agudo de miocardio

MAOMonoamino oxidasa

mCi.....Millicurie

ME.....Muerte encefálica

NFnFactores de normalización

PaCO₂.....Presión arterial de dióxido de carbono

PCRReacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*)

PEPotenciales evocados

PEAT.....Potenciales evocados auditivos trocoencefálicos

PEEPPresión positiva al final de la espiración

PES.....Potenciales evocados somestésicos

PEV.....Potenciales evocados visuales

pHPotencial de hidrógeno

PNMTFeniletanolamina-N-metiltransferasa

qPCRPCR cuantitativa (*Quantitative Polymerase Chain reaction*)

RTTiempo real

SNCSistema nervioso central

SNP.....Sistema nervioso periférico
SNS.....Sistema nervioso simpático
T^aTemperatura
TCE.....Traumatismo craneoencefálico
TdT.....Deoxinucleotidil transferasa terminal
TNFRReceptor del factor necrosis tumoral
TRADD.....Proteína con dominio de muerte asociada al receptor del TNF
TRAIL.....Ligando inductor de apoptosis
TSH.....Tirotropina
TUNELTerminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP-biotin
UCI.....Unidad de cuidados intensivos
VIHVirus de la inmunodeficiencia humana
VMATS.....Transportadores vesiculares monoaminos

Índice

INTRODUCCIÓN	3
1. EL TRASPLANTE CARDIACO	3
1.1 Criterios del donante óptimo.....	4
2.- MUERTE ENCEFÁLICA	5
2.1 Diagnóstico clínico de la muerte encefálica.....	5
2.2 Pruebas instrumentales.....	9
2.2.1 Pruebas diagnósticas instrumentales electrofisiológicas	9
2.2.2 Pruebas diagnósticas instrumentales de estudio de la circulación sanguínea cerebral	11
3. CAMBIOS FISIOLÓGICOS COMO CONSECUENCIA DE LA MUERTE ENCEFÁLICA	14
3.1 Sistema Nervioso Simpático	14
3.2 Sistema cardiovascular.....	14
3.2.1 Morfología cardíaca.....	16
3.3 Otros órganos y/o sistemas	18
4. CATECOLAMINAS.....	19
4.1 Síntesis.....	19
4.2 Almacenamiento y Secreción.....	20
4.3 Acciones de las catecolaminas.....	21
4.4 Metabolismo e Inactivación.....	22
5. APOPTOSIS.....	23
5.1 Características morfológicas de la apoptosis	24
5.2 Moléculas apoptóticas y antiapoptóticas.....	25
5.2.1 Caspasas	25
5.2.1.1 Caspasas y tejido cardíaco.....	27
5.2.2 Familia Bcl-2.....	28
5.2.2.1 Familia Bcl-2 y tejido cardíaco	29
5.3 Vías apoptóticas	30

5.3.1	Vía extrínseca	30
5.3.2	Vía intrínseca	32
5.4	Apoptosis en tejido cardíaco	33
6.	MUERTE ENCEFÁLICA Y APOPTOSIS	34
7.	EXPRESIÓN GÉNICA	35
7.1	PCR a tiempo real	35
7.1.1.	Cuantificación del producto	36
7.1.2.	Identidad del producto	37
7.1.3.	Validación de un protocolo de PCR a tiempo real	38
7.2	Expresión relativa	40
7.3	Métodos de normalización	41
7.3.1	Métodos de selección de genes de referencia	43
	OBJETIVOS.....	49
	MATERIAL Y METODOS	53
1.	SUJETOS DE ESTUDIO	55
2.	OBTENCIÓN DE MUESTRAS	57
2.1	Muestras de tejido cardíaco	57
2.2	Muestras sanguíneas	59
3.	BIOLOGÍA MOLECULAR	60
3.1	Extracción de ARN	60
3.2	Síntesis de ADN complementario (ADNc). Transcripción inversa	61
3.3	Calidad del ADNc	63
3.4	Protocolos de PCR a tiempo real	64
3.4.1	Detección de la expresión génica en el Experimento 1	65
3.4.2	Detección de la expresión génica en el Experimento 2	66
3.4.3	Eficiencias, Coeficientes de correlación y T ^a s de melting	68
3.4.4	Normalización	69
4.	HISTOLOGÍA	70
4.1	Lesiones asociadas a la muerte encefálica	71
4.1.1	Bandas de contracción	71
4.1.2	Necrosis de los cardiomiocitos y lesiones cardíacas necróticas	72

4.1.3 Infiltrados inflamatorios	72
4.2 APOPTOSIS	72
4.2.1 Tunel.....	72
4.2.2 Inmunohistoquímica.....	74
4.2.3 Histoquímica	76
5. HPLC (Cromatografía líquida de alta resolución).....	78
6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	79
RESULTADOS	83
1. EXPERIMENTO 1	83
2. EXPERIMENTO 2	95
3. EXPERIMENTO 3	103
DISCUSION	113
CONCLUSIONES.....	131
CONCLUSIONS	135
RESUMEN.....	139
BIBLIOGRAFÍA.....	145

Índice Figuras

Figura 1.	<i>Diagnóstico clínico de la muerte encefálica</i>	8
Figura 2.	<i>Imagen de Angio-TC Helicoidal</i>	12
Figura 3.	<i>Imagen de cráneo hueco de Angiogammagrafía cerebral con ⁹⁹Tc-HMPAO.</i>	13
Figura 4.	<i>Imágenes características de la ME en tejido cardiaco</i>	17
Figura 5.	<i>Síntesis de catecolaminas.</i>	20
Figura 6.	<i>Degradación de las catecolaminas</i>	23
Figura 7.	<i>Cambios morfológicos en la célula apoptótica</i>	24
Figura 8.	<i>Estructura de la molécula de caspasa</i>	26
Figura 9.	<i>Familia Bcl-2. Clasificación y estructura</i>	28
Figura 10.	<i>Vía extrínseca de la apoptosis</i>	31
Figura 11.	<i>Vía intrínseca de la apoptosis</i>	32
Figura 12.	<i>Curvas de amplificación</i>	37
Figura 13.	<i>Esquema representando la obtención de muestras</i>	37
Figura 14.	<i>Obtención de muestras sanguíneas</i>	59
Figura 15.	<i>Curva de melting</i>	69

Índice Tablas

Tabla 1. <i>Reflejos troncoencefálicos utilizados en el diagnóstico de muerte encefálica</i>	7
Tabla 2. <i>Efectos fisiológicos de las catecolaminas</i>	22
Tabla 3. <i>Tipos de caspasas y su función</i>	27
Tabla 4. <i>Características del grupo de donantes</i>	55
Tabla 5. <i>Nombre y función de los genes de referencia estudiados</i>	65
Tabla 6. <i>Nombre y función de los genes apoptóticos estudiados</i>	67

Introducción

1. EL TRASPLANTE CARDIACO

El trasplante cardiaco es, actualmente, el tratamiento de elección en pacientes con cardiopatías evolucionadas en situación funcional avanzada, no mejorables de forma suficiente con otros procedimientos médicos y/o quirúrgicos (Kriett y Kaye., 1991).

La práctica totalidad de los trasplantes se realizan con órganos procedentes de donantes en muerte encefálica (ME), lo cual en España supone un porcentaje de aproximadamente el 80% (ONT, Memoria Anual, 2010), estando regulada esta práctica por el Real Decreto 2070/1999 del 30 de Diciembre, por el que se definen tanto el diagnóstico de la ME como las actividades relacionadas con la donación de órganos para trasplantes. Sin embargo, la principal limitación del trasplante cardiaco es la disminución del número de corazones disponible, debido a que aproximadamente un 30% de los fallecidos en situación de ME se excluyen como potenciales donantes de órganos (Chamorro y cols., 2006); se trata de sujetos en ME y sin evidencias de contusión cardiaca o traumas torácicos, que presentan una disfunción miocárdica lo suficientemente grave como para que sus corazones sean excluidos debido a inestabilidad hemodinámica o a disfunciones cardiacas primarias (Gilbert y cols., 1988). Si además se tiene en cuenta que aproximadamente un 20% de los trasplantes cardiacos muestran rechazo debido a disfunción del injerto a consecuencia del daño tisular y de los cambios electrocardiográficos y hemodinámicos que tienen lugar antes y durante la ME (Novitzky y cols., 1989) el número de órganos que cumplen los requisitos para ser trasplantados disminuye notablemente.

Los criterios generales de aceptabilidad de un donante para trasplante cardiaco son los siguientes:

1.1 Criterios del donante cardíaco

Generales

- Serología negativa para VIH, hepatitis B y C.
- Sin infección activa o neoplasia.
- Sin enfermedad cardíaca o traumatismo cardíaco.
- Compatibilidad ABO con el receptor.
- Masa corporal del donante dentro del 25-30% superior o inferior al receptor.
- Si el panel de anticuerpos antilinfocitarios es positivo (> 10-15%) realizar la prueba cruzada donante-receptor.
- Tiempo de isquemia del injerto menor de 4-5 horas.

Edad

- Edad por encima de los 55 años.
- Dada la escasez de donantes, distintos grupos de trasplante han llegado a aceptar donantes de hasta 65 años.
- Se realiza ecocardiograma, a todo donante. Quedará a criterio del equipo extractor la aceptabilidad.

Tamaño

El rango ideal es aquel en el que la masa corporal del donante no difiera por exceso o por defecto más de un 25-30% del receptor. Sin embargo, en la bibliografía se describen donantes por encima o por debajo de estos límites, con resultados clínicos similares a los emparejamientos con tamaño óptimo. No obstante:

- a) En pacientes críticos utilizar un corazón pequeño reduce la supervivencia.
- b) En pacientes con cifras de hipertensión pulmonar altas hay que procurar utilizar corazones concordantes o superiores en tamaño.

2.- MUERTE ENCEFÁLICA

La ME es una situación clínica caracterizada por la ausencia total e irreversible de las funciones del encéfalo debido a una lesión de naturaleza estructural, a causa de la cual aparece una hipertensión intracraneal grave que bloquea el flujo sanguíneo encefálico. El diagnóstico clínico de la muerte encefálica se basa en tres pilares fundamentales: la observación de coma estructural de etiología conocida y carácter irreversible, la apnea y la ausencia de reflejos troncoencefálicos (Wijdicks, 1995). Antes de realizar la exploración neurológica que permita emitir un diagnóstico, hay que comprobar que el paciente se encuentra en una situación adecuada a fin de evitar el falseamiento de los hallazgos clínicos; es decir, que presente estabilidad hemodinámica, oxigenación y ventilación óptimas y ausencia de hipotermia grave (según los criterios de la Academia Americana de Neurología). En la legislación española se acepta como válida una T^a por encima de 32°, pero es preferible mantenerla por encima de 35° para evitar los efectos indeseables de la propia hipotermia y para realizar mejor el test de apnea, ya que si hay hipotermia se genera muy poco CO₂ lo que dificulta alcanzar unos niveles de PaCO₂ > 60 mm de Hg. Asimismo, es necesario que no presente alteraciones metabólicas ni intoxicaciones, y que no se encuentre bajo la acción de fármacos o sustancias depresoras del sistema nervioso central (SNC), ni de bloqueantes neuromusculares.

2.1 Diagnóstico clínico de la muerte encefálica

El coma profundo arreactivo con hipotonía muscular generalizada se traduce en la ausencia de respuestas motoras o vegetativas al estímulo algésico. Este estímulo se realiza en el territorio de los nervios craneales provocando dolor intenso a nivel supraorbitario, labio superior o en la articulación temporomandibular.

La ausencia de respiración espontánea es demostrada mediante el **Test de apnea**, por el que se comprueba que no existen movimientos respiratorios torácicos ni

abdominales durante un tiempo de desconexión del respirador suficiente para que la PCO₂ en sangre arterial sea superior a 60 mm de Hg.

Para valorar la ausencia de **reflejos troncoencefálicos** (Tabla 1) se explora la actividad de los pares craneales y su integración en los núcleos correspondientes del troncoencéfalo. Los reflejos troncoencefálicos tienen que estar siempre ausentes y la exploración debe ser bilateral.

REFLEJO	PROCEDIMIENTO	VÍA AFERENTE	VÍA EFERENTE	NIVEL ANATÓMICO EXPLORADO
Fotomotor	Se realiza la estimulación con un foco de luz potente y se observa, en condiciones normales, una contracción pupilar. En ME las pupilas siempre son arreactivas a la luz	Nervio óptico	Nervio motor ocular común	Mesencéfalo
Corneal	Se realiza estimulación corneal con una gasa o torunda de algodón, observándose en condiciones normales una contracción palpebral, objetivándose también lagrimeo. En ME no existe ningún tipo de respuesta.	Nervio trigémino	Nervio facial	Protuberancia
Oculocefálico	Manteniendo abiertos los ojos del paciente, se realizan giros rápidos de la cabeza en sentido horizontal, observándose una desviación ocular opuesta al lado del movimiento, volviendo los ojos posteriormente a su posición de reposo. En ME no existe ningún tipo de movimiento ocular.	Nervio auditivo	Nervio motor ocular común y nervio motor ocular externo	Unión bulbo-protuberancia
Oculovestibular	Con el otoscopio se comprueba que no existen tapones de cerumen ni perforación timpánica. Colocar la cabeza elevada 30°. Se inyectan en el conducto auditivo externo 50 cc de suero frío, manteniendo abiertos los ojos del paciente durante 1 minuto y observándose en condiciones normales un nistagmo con el componente lento hacia el oído irrigado y el componente rápido alejado del conducto irrigado. El nistagmo es regular, rítmico y dura menos de 2-3 minutos. En ME no existe ningún tipo de movimiento ocular.	Nervio auditivo	Nervio motor ocular común y nervio motor ocular externo	Unión bulbo-protuberancia
Nauseoso	Se realiza estimulación del velo del paladar blando, úvula y orofaringe, observándose la aparición de náuseas. En ME no existe ningún tipo de respuesta.	Nervio glossofaríngeo	Nervio vago	Bulbo
Tusígeno	Se introduce una sonda a través del tubo endotraqueal, observándose en condiciones normales la aparición de tos. En ME no existe ningún tipo de respuesta.	Nervio glossofaríngeo y nervio vago	Nervio vago	Bulbo

Tabla 1.- Reflejos troncoencefálicos utilizados en el diagnóstico de muerte encefálica.

Introducción

Finalmente, se realiza el **Test de atropina** que explora farmacológicamente la actividad del nervio vago y de sus núcleos troncoencefálicos, evaluando la respuesta cardíaca a la infusión intravenosa de 0.04 mg/kg de sulfato de atropina mediante la comprobación de la frecuencia cardíaca pre y postinyección. En ME la frecuencia cardíaca no debe superar el 10% de la frecuencia cardíaca basal. No se debe administrar atropina por la misma vía venosa donde se están infundiendo catecolaminas ya que esto puede producir taquicardia (Figura 1).

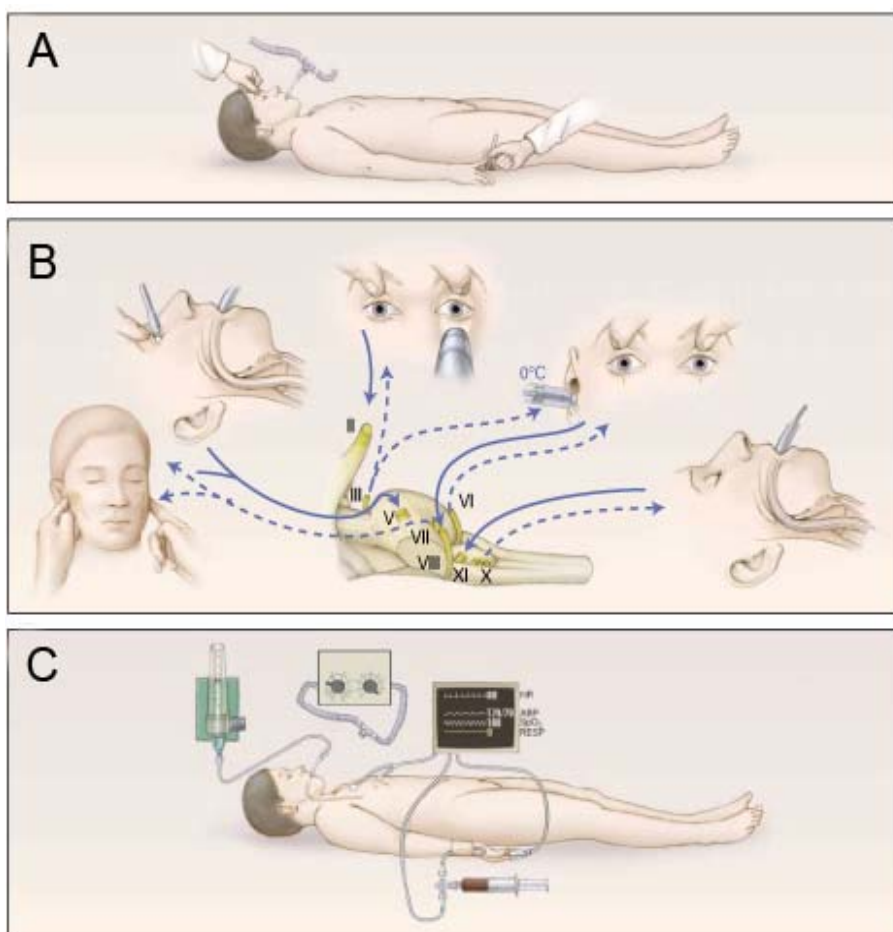


Figura 1. Diagnóstico clínico de la muerte encefálica. *Modificada de The Diagnosis of Brain Death. Wijdicks, 2001.*

A Ausencia de respuesta motora. **B** Estudio de los reflejos troncoencefálicos. **C** Test de apnea

Esta diagnosis se completaría con pruebas instrumentales que son recomendables en todos los casos y pueden ser obligatorias en algunos otros:

- Pacientes con graves destrozos del macizo craneofacial o cualquier otra circunstancia que impida la exploración de los reflejos troncoencefálicos.
- Intolerancia al Test de la apnea.
- Hipotermia (T^a central inferior a 32°C).
- Intoxicación o tratamiento previo con dosis elevadas de fármacos o sustancias depresoras del SNC.
- Niños menores de un año de edad.
- Ausencia de lesión destructiva cerebral demostrable por evidencia clínica o por neuroimagen.
- Lesión causal primariamente infratentorial.

2.2 Pruebas instrumentales

Las pruebas diagnósticas instrumentales son de dos tipos: las que evalúan la función neuronal, como el electroencefalograma (EEG) y los potenciales evocados y las que evalúan el flujo sanguíneo cerebral, como es el caso de la arteriografía cerebral de los 4 vasos o la angiografía cerebral por sustracción digital, que se emplean en pacientes tratados con fármacos sedantes.

2.2.1 Pruebas diagnósticas instrumentales electrofisiológicas

Electroencefalograma (EEG)

Es un método de diagnóstico sencillo, no invasivo, rápido y fácil de realizar, por ello es el más utilizado para llevar a cabo el diagnóstico de ME. El EEG estudia la actividad bioeléctrica de la corteza cerebral en la convexidad de los hemisferios cerebrales. Los registros se obtienen durante al menos 30 minutos utilizando un instrumento de 16 o 18 canales. Su principal limitación es que interfiere con los

fármacos depresores del SNC. El EEG ha de realizarse siguiendo las recomendaciones internacionales (Guidelines of American Clinical Neurophysiology Society, 2006).

Índice Biespectral (BIS)

Durante años, el Índice Biespectral, un parámetro derivado del EEG, se ha considerado adecuado para estimar la profundidad de la sedación y el grado de consciencia durante y después de la anestesia general (Gan y cols., 1997), así como la profundidad de la sedación en las Unidades de Cuidados Intensivos (U.C.I.) (Simmons y cols., 1999). Además, también han sido descritas buenas correlaciones entre el BIS y el estado neurológico en pacientes comatosos no sedados (Gilbert y cols., 2001). Se trata de un método no invasivo, que se registra mediante la colocación en la frente de un sensor compuesto por varios electrodos. El BIS tiene una escala de valores que oscila entre 0 y 100, siendo el valor 0 la ausencia de actividad eléctrica cerebral. Los valores de BIS caen a 0 inmediatamente después de la tormenta simpática catecolamínica previa a la parada circulatoria cerebral. Es por ello que puede utilizarse para establecer el inicio de la ME, optimizando el tiempo empleado para el diagnóstico y facilitando la extracción de órganos para trasplante (Escudero y cols., 2005). Posteriormente, se confirma el diagnóstico con EEG o Angiografía (Vivien y cols., 2002). Sin embargo, al ser un estudio regional de la actividad eléctrica, no puede ser utilizado exclusivamente como test confirmatorio de ME.

Potenciales evocados (PE)

Los Potenciales Evocados son pequeñas variaciones características en el EEG que se hallan sincronizadas con algún suceso sensorial, motor o cognitivo, y que constituyen un indicador neurofisiológico del proceso subyacente a esos sucesos (Chiappa, 1988; Regan, 1989). Clásicamente, se ha distinguido entre dos tipos diferenciados de PE: los PE sensoriales o exógenos y los PE endógenos o cognitivos (Donchin y cols., 1978). Según el estímulo sensorial provocado podemos obtener PE visuales (PEV), PE auditivos troncoencefálicos (PEAT) y PE somestésicos (PES). En

ME para los PEAT desaparecen todas las respuestas evocadas de origen encefálico, persistiendo únicamente las que se generan a nivel extracraneal. En cuanto a los PES, en ME sólo persisten las ondas generadas en plexo braquial y médula espinal. Se trata de una técnica no invasiva.

2.2.2 Pruebas diagnósticas instrumentales de estudio de la circulación sanguínea cerebral

Doppler transcraneal (DTC)

El DTC fue introducido en la práctica clínica por Aaslid y cols. en 1982, ha posibilitado el uso de técnicas de flujo no invasivas en el diagnóstico de ictus, hipertensión intracraneal y ME (Ducrocq y cols., 1998). El diagnóstico de ME mediante DTC se basa en demostrar el cese de flujo cerebral efectivo (FCE) en las arterias cerebrales durante un intervalo de 30 minutos, determinación que tiene una sensibilidad y una especificidad altas (Petty y cols., 1990). La ausencia de FCE se produce cuando fallan los mecanismos de autorregulación y aumenta la presión intracraneal (por hemorragia, edema cerebral, etc.) hasta igualar o superar la presión arterial media (Hekmatpanah, 1989). Se detectan alteraciones del FCE por cambios en la morfología y características (velocidad media, pico sistólico, área, etc.) de la curva de velocidad de las arterias cerebrales basales (Paolin y cols., 1995).

Arteriografía cerebral convencional

Esta técnica ha sido considerada como el estándar de referencia para la determinación del flujo sanguíneo cerebral (Bradac y Simon, 1974; Nau y cols., 1992). Además de la clásica arteriografía de cuatro vasos con cateterización selectiva de las dos arterias carótidas internas y las dos arterias vertebrales, se puede realizar una arteriografía cerebral de troncos supraaórticos. El contraste se inyecta a través de la aorta ascendente, con lo que se evitan cambios que pudieran modificar las condiciones reales del flujo sanguíneo cerebral (Escudero, 2009). También se pueden realizar angiografías por sustracción digital que proporciona una mayor sensibilidad de

contraste, y éste se puede inyectar tanto por vía intraarterial como intravenosa (Braun y cols., 1997).

Angio-TC Helicoidal

La validez de la Angiografía para el diagnóstico de ME fue demostrada por primera vez por Dupas y cols., en el año 1998, aportando unos datos de sensibilidad y especificidad del 100%. Sin embargo estos altos porcentajes no se han descrito en estudios posteriores, en los que se determinó una sensibilidad entre el 63% y el 86% (Frampas y cols., 2009), estos porcentajes se obtienen al adaptar los criterios de Dupas a la opacificación de los segmentos corticales de las arterias medias cerebrales y de las venas internas cerebrales. Siendo la ausencia de señal en las venas internas cerebrales el criterio angiográfico más relevante para el diagnóstico de ME (Leclerc y cols., 2006). Sin embargo, la angiografía es una técnica invasiva, que implica tiempo y que necesita un neurorradiólogo experimentado además de la disponibilidad de una sala acondicionada a tal efecto (van der Lugt, 2010).



Figura 2.- Imagen de Angio-TC Helicoidal. *Cedida por la Dra. Dolores Escudero.
Hospital Universitario Central de Asturias.*

Angiogramografía cerebral con radiofármacos

El radiofármaco más utilizado es el ^{99}Tc -HMPAO, por su menor coste y su mayor disponibilidad en los servicios de medicina nuclear (González y cols., 2000). A través de un catéter venoso central se inyecta el radiofármaco utilizando una dosis de 20 mCi en adultos y al menos 5 mCi en niños.

El diagnóstico de ME se basa en dos criterios: la ausencia de perfusión por las arterias carótidas internas durante la fase angiogramagráfica y ausencia completa de captación del radiotrazador en los hemisferios cerebrales y en la fosa posterior, imagen que se conoce como el signo del “cráneo hueco” (Figura 3). Técnica con una sensibilidad y especificidad del 100%, poco invasiva, pero de uso limitado.

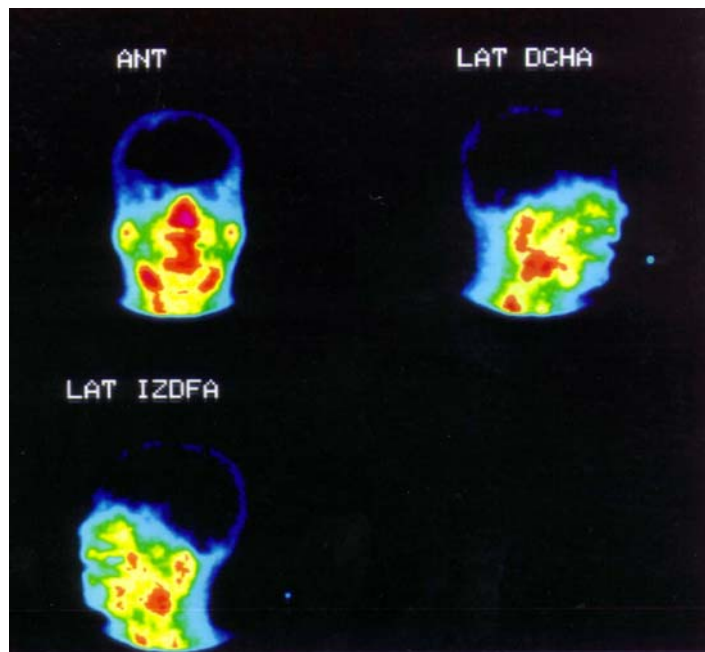


Figura 3.- Imagen de “cráneo hueco” de Angiogramografía cerebral con ^{99}Tc -HMPAO. Cedita por la Dra. Dolores Escudero. Hospital Universitario Central de Asturias.

3. CAMBIOS FISIOLÓGICOS COMO CONSECUENCIA DE LA MUERTE ENCEFÁLICA

3.1 Sistema Nervioso Simpático

La intensa estimulación que acompaña a la ME provoca, a nivel del Sistema Nervioso Simpático (SNS), un aumento sustancial de los niveles de catecolaminas circulantes (Mertes y cols., 1994a). En modelos animales de ME, estos niveles se incrementaban hasta un 800% para la dopamina, un 700% para la adrenalina y un 100% para la noradrenalina (Chen y cols., 1996) siendo estos niveles similares a los que aparecían en situaciones clínicas (Powner y cols., 1992). La cinética de liberación hormonal establecida incluye un pico en el momento de la ME, con niveles en torno a la normalidad inmediatamente después y seguido de una caída hasta niveles por debajo de los normales (Chen y cols., 1996). Se observa un segundo pico 45 minutos después de la muerte (Mertes y cols., 1994b) e incluso tras varias horas (Bittner y cols., 1995; Christé y cols., 2006). Este pico tardío de catecolaminas podría atribuirse a la respuesta adrenal a la ME, como ha sido sugerido por investigadores como Chen y cols (1996).

3.2 Sistema cardiovascular

En los momentos anteriores a la ME es frecuente que los pacientes presenten inestabilidad cardiovascular y respiratoria, mostrando alteraciones electrocardiográficas que se traducen en cambios en los segmentos ST y T, arritmias auriculares/ventriculares o alteraciones en la conducción. Esta inestabilidad puede provocar isquemia miocárdica y alteraciones en el equilibrio electrolítico, además de una disfunción autónoma con desacoplamiento simpático/parasimpático (Smith, 2004). Los experimentos pioneros en este campo fueron realizados con el modelo de muerte encefálica del *Chacma baboon* y demostraron que la elevada presión intracraneal y la ME provocan severos cambios hemodinámicos (Cooper y cols., 1989). Asimismo, en estudios más recientes, se pone de manifiesto un incremento significativo en las presiones sanguíneas sistólicas y diastólicas en el momento

inmediatamente anterior a la ME (Marthol y cols., 2010) lo que conduce con cierta frecuencia a la disfunción del injerto tras el trasplante (Bittner y cols., 1999). La denominada '**reacción de Cushing**' que aparece como consecuencia del aumento de la presión intracraneal que se observa en ME y que, inicialmente, se traduce en un dramático incremento de la presión sistólica, diastólica y de la presión arterial media; junto con taquicardia seguida de un corto periodo de bradicardia (Cushing, 1901) implica complejos mecanismos neurohumorales y metabólicos cuyas conexiones e interrelaciones todavía no son del todo comprendidas. La presión sistólica se eleva por encima de los 400 mm de Hg, la presión diastólica se incrementa por encima de los 250 mm de Hg y la frecuencia cardíaca se eleva por encima de los 250 latidos/min. Simultáneamente, el gasto cardíaco se multiplica por 3 y se acompaña de un incremento de la resistencia sistémica vascular de un 50%. Tras estos cambios iniciales los parámetros disminuyen progresivamente, de forma, que tras 6 horas retornan a los niveles normales. De forma similar, la resistencia vascular sistémica y pulmonar presenta una disminución progresiva hasta alcanzar niveles por debajo del 50% de los niveles basales.

La llamada '**tormenta simpática**' provoca en las etapas iniciales efectos inotrópicos positivos, así como una intensa vasoconstricción de las arterias coronarias que provoca hipertensión, taquicardia y, en consecuencia, un incremento de la demanda de oxígeno. Sin embargo, no se observa un incremento simultáneo de la liberación de oxígeno a partir del músculo cardíaco, de forma que puede aparecer isquemia subendocárdica (Seguin y cols., 2001). Esta descompensación entre el aporte y la demanda está implicada en la alteración temprana del metabolismo miocárdico que aparece en la función cardíaca de donantes de ME (Halejcio-Delophont y cols., 1998). El aumento de catecolaminas, o lo que es lo mismo, la actividad simpática incrementada, puede causar daño directo en el miocardio y disfunción ventricular, incluso traer como consecuencia un colapso hemodinámico (White y cols., 1995) lo que es relativamente frecuente incluso en corazones jóvenes, previamente sanos. Esta respuesta cardiovascular inicial implica efectos relacionados con receptores α y β

adrenérgicos (Sebening y cols., 1995). Como ha demostrado Shivalkar y cols. (1993), la intensidad y la rapidez del estímulo (elevación de la presión intracraneal) determinan la intensidad de la respuesta cardiovascular. Es decir, la ME resulta en una inestabilidad hemodinámica severa y la intensidad de la misma parece estar directamente relacionada con la severidad del daño y el grado resultante de disfunción autónoma.

Sin embargo, datos recientes sugieren que estos mecanismos patofisiológicos que en el pasado se postulaban como posible explicación para el deterioro hemodinámico que aparece tras la ME, no parecen tener que ver en la disfunción cardiaca (Szabo, 2004); sino que como consecuencia de la ME aparece, inicialmente, una isquemia a consecuencia de la cual surge una estimulación mixta, tanto vagal como simpática, que provoca la **‘reacción de Cushing’**. Tras el periodo inicial de actividad autónoma intensa aparece una pérdida del tono simpático y una reducción masiva de la resistencia vascular. Este colapso cardiovascular secundario aparece inicialmente como resultado de una profunda vasodilatación más que como consecuencia de un daño cardiaco primario.

Según la isquemia va progresando hasta la parte inferior de la médula, los núcleos cardiomotores comienzan a volverse isquémicos, provocando una estimulación simpática mayor. Finalmente, existe una pérdida progresiva de inervación y de actividad en las vías simpáticas espinales además de una afectación isquémica del eje hipotálamo-hipófisis, de forma que existe una pérdida de la mayoría de mecanismos de control homeostáticos.

3.2.1 Morfología cardiaca

A nivel microscópico, el daño que aparece de forma característica en corazones tras un episodio de ME, se traduce en miocitolisis, necrosis de los cardiomiocitos, bandas de contracción, hemorragia subendocárdica, formación de edema y aparición de infiltrados intersticiales de células mononucleares (Shivalkar y cols., 1993).

Clásicamente estas lesiones (figura 4) han sido atribuidas a la toxicidad de las catecolaminas liberadas durante la ‘tormenta simpática’ ya que el daño histopatológico no se observaba cuando esta liberación se abolía mediante una simpatectomía cardiaca total antes del daño central (Chen y cols., 1996). Los espasmos microvasculares debidos a las áreas focales de necrosis miocárdica representan un posible mecanismo patofisiológico por el cual las catecolaminas pueden desempeñar estos efectos detrimentales en el miocardio (Chen y cols., 1996; Pratschke y cols., 1999). La alta incidencia relativa de daño miocárdico tras el fenómeno de ME ha sido confirmada mediante un estudio en el que aparece hasta un 89% de necrosis de bandas de contracción en pacientes sin patología cardiaca previa (Baroldi y cols., 1997). La extensión del daño se ha correlacionado con la velocidad y la severidad del incremento de la presión intracraneal así como con la cantidad de catecolaminas secretadas. Un incremento gradual causaría una menor liberación hormonal y solo un daño leve al miocardio (McBride y cols., 1997). Estudios de microscopía electrónica revelan que el daño miocárdico es más notable en la mitocondria y los sarcómeros, el ventrículo derecho e izquierdo parecen afectarse por igual y el mantenimiento en isquemia fría no causa daño adicional (Novitzky y cols., 1987).

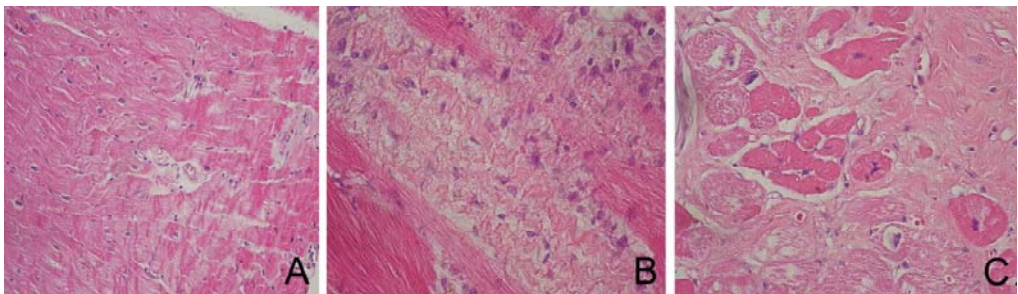


Figura 4. - Imágenes características de la ME en tejido cardiaco. *Pérez S. y cols. Datos sin publicar*

A. Bandas de contracción. **B.** Infiltrado inflamatorio. **C.** Necrosis de los cardiomicitos.

3.3 Otros órganos y/o sistemas

La ME provoca daños en otros órganos que contribuyen a la inestabilidad cardiovascular. Así, a nivel del **sistema respiratorio**, existe una alta incidencia de complicaciones que incluyen neumonía o edema asociadas con daño cerebral severo (Bratton y Davis, 1997). Asimismo, los niveles altos de catecolaminas asociados a la ME provocan daños directos a nivel pulmonar como vasoconstricción, incremento de presión en el lecho capilar y daño endotelial, provocando una respuesta inflamatoria generalizada que ocasiona un incremento de la permeabilidad capilar, de forma que estos pacientes presentan un alto riesgo de edema pulmonar (Pennefather y cols., 1993). Tras la ME, se requieren niveles altos de concentración de oxígeno inspirado y una presión positiva al final de la espiración (PEEP) para mantener una oxigenación adecuada, sin embargo, niveles altos de PEEP provocan la liberación de vasopresina, activando el sistema renina/angiotensina, lo que deriva en una vasoconstricción que altera la perfusión de los órganos a trasplantar.

A nivel **hormonal** existe una liberación temprana de Hormona Antidiurética (ADH) y un desarrollo de diabetes insípida en al menos el 80% de este tipo de donantes. Estos cambios provocan edema neurogénico pulmonar y conducen a una hipoperfusión del tejido. También se observa una rápida disminución de T3 libre como resultado de la secreción alterada de TSH y de la alteración de la conversión periférica a T4. Sin embargo, existen resultados contradictorios acerca del papel de las hormonas tiroideas en la ME, ya que algunos autores recomiendan suplementar a los donantes con T3 para realizar la resucitación cardiaca (Wheeldon y cols., 1995; Novitzky y cols., 1987; Rosendale y cols., 2003), mientras que en otros casos no se encontró que la administración exógena de la misma tuviera una repercusión importante (Randell y Höckerstedt, 1992). Por otra parte, los niveles de insulina caen tras la ME, provocando una disminución de la concentración intracelular de glucosa, un déficit de energía y un desfase entre el metabolismo anaerobio y la acidosis. Asimismo, los niveles de cortisol decrecen tras la ME, influyendo en la respuesta al estrés, y asociándose con una menor liberación de ACTH (Chen y cols., 1996).

4. CATECOLAMINAS

El término catecolaminas se refiere a las sustancias que contienen catecol (orto-dihidroxibenceno) y una cadena lateral con un grupo amino (Dluhy y cols., 2003) e incluyen a la adrenalina, noradrenalina y dopamina. La adrenalina se sintetiza y almacena en la médula adrenal y se libera a la circulación sistémica. En cambio, la noradrenalina es sintetizada y almacenada, no solo en la médula adrenal sino también en las terminaciones simpáticas periféricas. Por último la dopamina, precursor de la noradrenalina, se encuentra en la médula y en las terminaciones simpáticas periféricas, actuando fundamentalmente como neurotransmisor en el SNC.

4.1 Síntesis

Las catecolaminas se sintetizan a partir del aminoácido tirosina. La tirosina se obtiene a partir de la ingesta o se sintetiza en el hígado a partir de la fenilalanina. La síntesis de catecolaminas tiene lugar en las vesículas sinápticas de neuronas adrenérgicas localizadas en el SNC y sistema nervioso periférico (SNP) y en las células cromafines de la médula adrenal.

Las catecolaminas se sintetizan por reacciones de hidroxilación y descarboxilación. La tirosina se convierte en 3,4-dihidroxifenilalanina (Dopa) por acción de la enzima tirosina hidroxilasa, siendo éste el paso limitante en la síntesis de catecolaminas. Por ello, se encuentra altamente regulado, así los altos niveles intracelulares de catecoles ejercen una retroalimentación negativa en la actividad de la tirosina hidroxilasa, mientras que su transcripción está estimulada por glucocorticoides y por diferentes tipos de protein-quinasas.

Una descarboxilación e hidroxilación sucesivas convierten al precursor Dopa en Dopamina (aminoácido aromático-1 descarboxilasa) y Noradrenalina (dopamina- β -hidroxilasa). En algunas células de la médula adrenal el proceso de síntesis se detiene a nivel de la noradrenalina, pero en la mayoría de células (particularmente las que se

encuentran en la unión corticomedular) ésta continúa hasta adrenalina por la feniletanolamina-N-metiltransferasa (PNMT) (Figura 5). En un tejido adrenal normal aproximadamente el 80% de las catecolaminas liberadas son adrenalina.

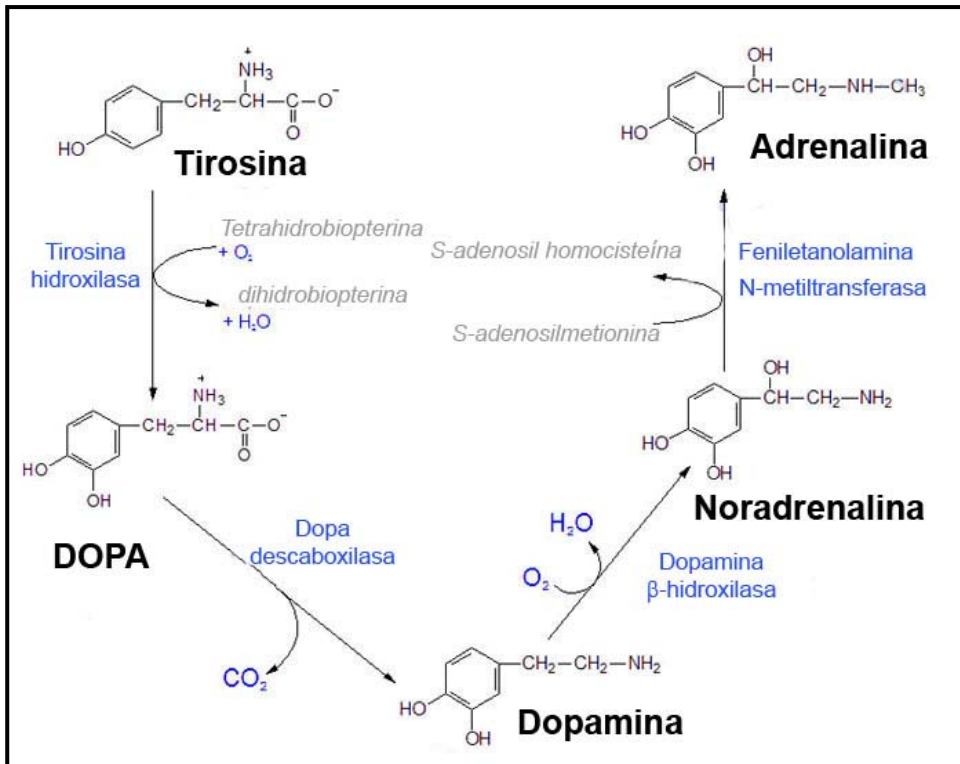


Figura 5.- Síntesis de catecolaminas. Modificado de "Catecholamines synthesis".

www.themedicalbiochemistrypage.org

4.2 Almacenamiento y Secreción

Podemos encontrar catecolaminas en la médula adrenal y en los órganos inervados por el SNS, donde se localizan en gránulos densos que también contienen ATP, neuropéptidos, calcio, magnesio y cromograninas. El almacenamiento en vesículas se facilita por un transporte activo que utiliza transportadores vesiculares monoaminos (VMATS) (Flatmark y cols., 2002); estos almacenamientos son dinámicos (Eisenhofer, y cols., 2004) y ante un estímulo estresante (hipoglucemia, infarto agudo

de miocardio [IAM], etc) se provoca la secreción de catecolaminas desde la médula adrenal. La acetilcolina de las fibras simpáticas preganglionares estimula a los receptores nicotínicos colinérgicos y causa despolarización de las células cromafines adrenomedulares. Esta despolarización provoca una activación de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje que provoca la liberación del contenido de la vesícula secretora al espacio extracelular.

4.3 Acciones de las catecolaminas

Las catecolaminas intervienen en muchos procesos metabólicos y cardiovasculares, entre los que se incluyen incrementos de la frecuencia cardiaca y de la presión sanguínea, dilatando los bronquios, movilizando la glucosa y estimulando lipólisis. Asimismo, provocan un incremento del volumen sistólico, de la contractilidad miocárdica y de la velocidad de conducción.

Las catecolaminas ejercen su función en los tejidos diana a través de receptores de membrana tipo proteína G. Estos receptores se clasifican como α o β en función de los efectos fisiológicos o farmacológicos inducidos por la unión hormonal. La subclasificación en α_1 , α_2 , β_1 , β_2 , β_3 , DA_1 , DA_2 , responde a la activación o inhibición de diferentes vías de transducción de señal (Tabla 2).

Tipo de Receptor	Localización	Función
α_1	postsináptico	Vasoconstricción músculo liso. Incremento presión arterial
α_2	presináptico	Inhibición de la liberación de noradrenalina Disminución presión arterial
β_1	postsináptico	Efectos cronotrópicos e inotrópicos positivos en el corazón
β_2	presináptico	Relajación músculo liso. Vasodilatación Incremento de la liberación de noradrenalina de las terminales simpáticas
β_3	postsináptico	Gasto energético y lipólisis
DA ₁	postsináptico	Vasodilatación a nivel cerebral y coronario
DA ₂	presináptico	Inhibe la liberación de noradrenalina

Tabla 2.- Efectos fisiológicos de las catecolaminas.

4.4 Metabolismo e Inactivación

Mientras que la mayoría de las catecolaminas que se liberan desde los nervios simpáticos se recuperan en la terminal presináptica, siendo metabolizadas en la misma célula en la que se sintetizan (Eisenhofer y cols., 2004); las que se liberan a la circulación se captan por tejidos no neuronales y son metabolizadas por la catecol-O-metiltransferasa (COMT) que convierte la adrenalina en metadrenalina, y la noradrenalina en normetadrenalina. Estos metabolitos son transformados en productos desaminados como el ácido vanililmandélico o el ácido homovanílico por la monoamino oxidasa (MAO) (Figura 6). Pudiendo ser conjugados con glucurónico o sulfato y excretados en la orina.

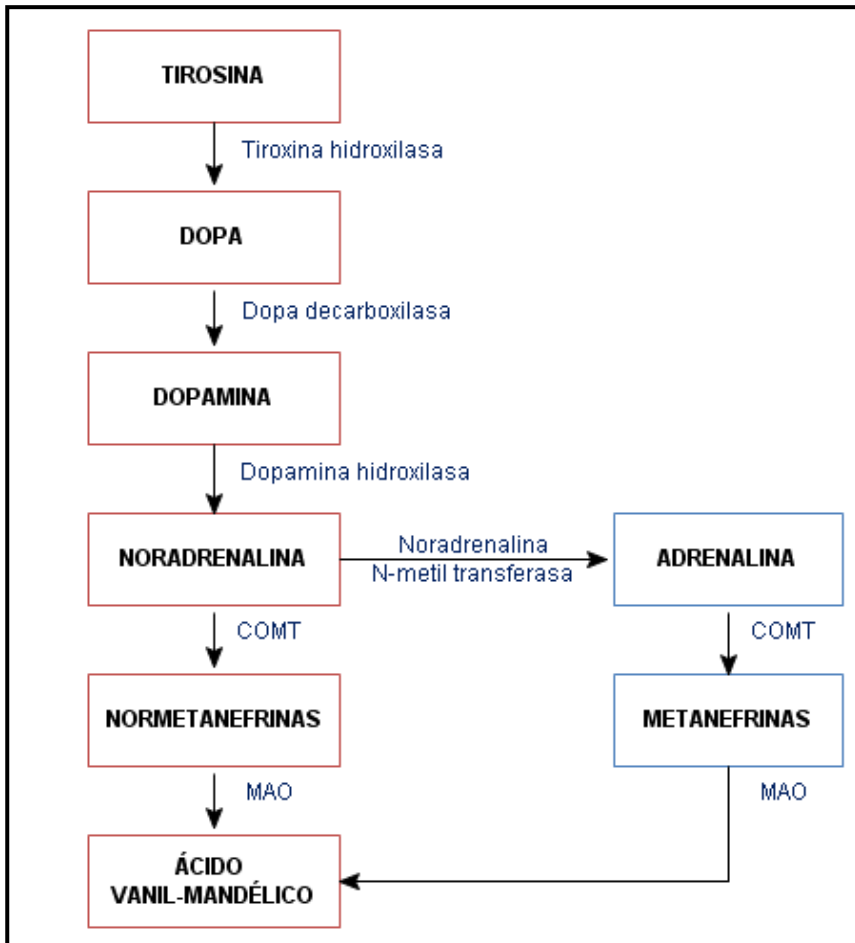


Figura 6.- Degradación de las catecolaminas.

5. APOPTOSIS

Las primeras referencias bibliográficas respecto al término ‘Apoptosis’ aparecen en 1972 (Kerr y cols.). Apoptosis es un término de origen griego que significa ‘deterioro’ o ‘declinar’ y que describe diversos procesos destinados a lograr la eliminación celular. La apoptosis tiene un claro significado biológico, estando implicada en los procesos de desarrollo, diferenciación y proliferación. El desarrollo y mantenimiento, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas, de los sistemas biológicos multicelulares depende de una compleja interacción entre las células que

forman el organismo, de manera que muchas de ellas se producen en exceso, y por ello se someten a procesos de muerte celular programada necesarios para la formación de órganos y tejidos (Meier y cols., 2000).

En contraste con la apoptosis, la forma necrótica de muerte celular ocasiona una pérdida de integridad de la membrana, hinchazón celular y fragmentación. Durante la necrosis los contenidos celulares se liberan de forma incontrolada, lo que ocasiona daños en las células circundantes y una fuerte respuesta inflamatoria en el tejido (Leist y Jäättelä, 2001).

5.1 Características morfológicas de la apoptosis

Las células apoptóticas pueden reconocerse por los cambios morfológicos típicos: la célula disminuye de tamaño, mostrándose deformada y pierde el contacto con las células vecinas. Se observa una condensación de la cromatina, que se localiza marginalmente a nivel de la membrana nuclear. La membrana plasmática está desorganizada y la célula aparece fragmentada; se forman estructuras compactas rodeadas de membrana denominadas “cuerpos apoptóticos” que contienen citosol, cromatina condensada y orgánulos (Figura 7).

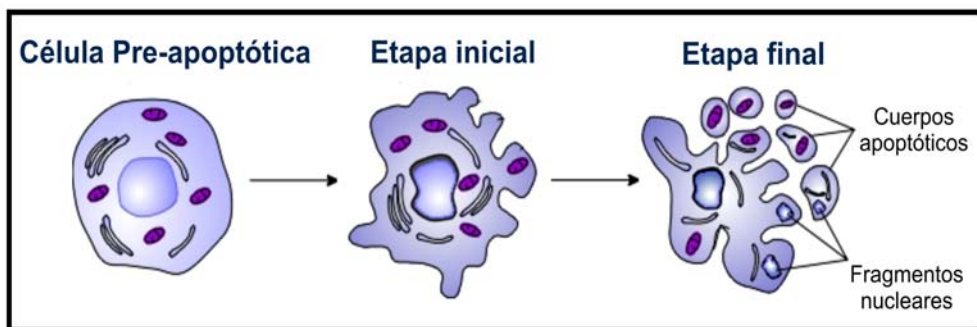


Figura 7.- Cambios morfológicos en la célula apoptótica. *Modificada de Walker y cols. 1988. Exp. Pathol.*

Los cuerpos apoptóticos son fagocitados por los macrófagos y eliminados del tejido sin causar una respuesta inflamatoria. El periodo de tiempo transcurrido desde el inicio del proceso apoptótico y la fagocitosis de la célula dañada puede oscilar entre horas y días (Cook y Poole-Wilson, 1999). Estos cambios morfológicos son consecuencia de fenómenos bioquímicos y moleculares, fundamentalmente, de la activación de enzimas proteolíticos que median la ruptura del ADN, así como la segmentación de sustratos proteicos específicos que, normalmente, son los que determinan la integridad y la forma del citoplasma o de los orgánulos (Saraste y Pulkki, 2000).

5.2 Moléculas apoptóticas y antiapoptóticas

5.2.1 Caspasas

Las caspasas son las moléculas centrales del mecanismo apoptótico (Bratton y cols., 2000). Estrictamente, la muerte celular se considera apoptosis como tal si la ejecución de la misma depende de la actividad de las caspasas (Leist y Jäätelä, 2001). El término caspasas deriva de proteasas cisteína-dependientes aspartato-específicas; su actividad catalítica depende de un residuo de cisteína con un sitio activo muy conservado (pentapéptido- QACRG), que rompe los sustratos tras un residuo de aspártico. En la célula las caspasas se sintetizan como zimógenos inactivos denominados procaspasas que en su extremo N-terminal llevan un prodominio, seguido por una subunidad larga y otra corta que, a veces, se encuentran separadas por un péptido de unión. Durante la maduración, las procaspasas sufren una ruptura proteolítica entre las subunidades larga y corta. La caspasa activa está formada por un heterotetrámero con dos subunidades pequeñas y dos grandes (Figura 8).

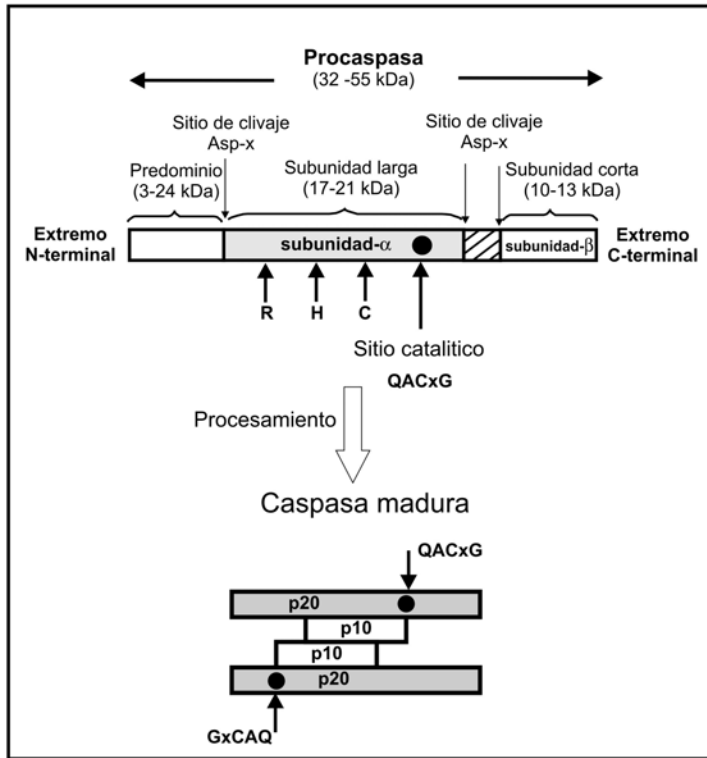


Figura 8.-Estructura de la molécula de caspasa.

Se han descrito catorce miembros de la familia en mamíferos, que se nombran en función del orden en que han sido publicadas, estando las caspasas 11 y 12 presentes únicamente en el ratón (Denault y Salvesen, 2002). En humanos se han identificado 10 isoformas (Cohen, 1998). La caspasa 1 así como las caspasas 4, 5, 11 y 12 parecen estar relacionadas con la maduración de citoquinas proinflamatorias como la pro-IL-1 β y la pro-IL-18 y su contribución al fenómeno apoptótico no está clara (Denault y Salvesen, 2002). Sin embargo, las caspasas 3, 9, 8 y adicionalmente las caspasas 2, 6, 7 y 10 se caracterizan por desempeñar un importante papel en la maquinaria apoptótica (Earnshaw y cols., 1999). Las caspasas proapoptóticas pueden dividirse en **iniciadoras**, lo que incluye a las procaspasas 2, 8, 9 y 10 y **ejecutoras** que serían las procaspasas 3, 6 y 7. Mientras que las ejecutoras solo poseen prodominios cortos, las caspasas iniciadoras presentan prodominios largos que, o bien contienen dominios

efectores de muerte (DED) en el caso de la 8 y la 10, o dominios de reclutamiento de caspasas (CARD) en el caso de las procaspasas 9 y 2 (Tabla 3).

Caspasas	Prodominio	Activadores	Posible función
Inciadoras			
casp 1	CARD	Ipaf, ASC	Maduración de IL-1 β /IL-18, apoptosis
casp 2	CARD	DEFCAP, RAIDD	Estrés premitocondrial
casp 4			Maduración de IL-1 β /IL-18
casp 5	CARD		Maduración de IL-1 β /IL-18
casp 8	DED	FADD	Receptores de muerte. Proliferación celular
casp 9	CARD	Apaf-1/cyt c	Activación caspasa 3/7 tras estrés mitocondrial
casp 10	DED	FADD	Receptores de muerte
Efectoras			
casp 3	corto	casp 9,8, otros	Ruptura de sustratos apoptóticos
casp 6	corto	casp 3,7	Ruptura de laminina
casp 7	corto	casp 9,8, otros	Ruptura de sustratos apoptóticos

Tabla 3.-Tipos de caspasas y su función.

5.2.1.1 Caspasas y tejido cardiaco

De las 10 caspasas caracterizadas en humanos, las caspasas 3, 8 y 9 son las que desempeñan un papel destacado en la apoptosis de los cardiomiocitos (Cook y Poole-Wilson, 1999). La caspasa 9 se expresa en niveles altos en el corazón y, o bien, actúa por sí misma como señal apoptótica (Hu y cols., 1998) o participa en la amplificación de la señal por vía mitocondrial (Kuwana y cols., 1998). La caspasa 9 se activa, entre otros, por el citocromo c liberado desde la mitocondria (Cai y Jones, 1998; Stridh y cols., 1998), siendo la caspasa 9 activa la que divide a la caspasa 3 provocando su activación (Hu y cols., 1998; Kuida y cols., 1998).

5.2.2 Familia Bcl-2

Se han identificado hasta 15 miembros de la familia Bcl-2 en humanos (Adams y Cory, 1998). Al contrario de lo que ocurre con las caspasas, este grupo no se activa por proteólisis y entre sus miembros cuenta con moléculas antiapoptóticas o de supervivencia y moléculas proapoptóticas (Borner, 2003) (Figura 9).

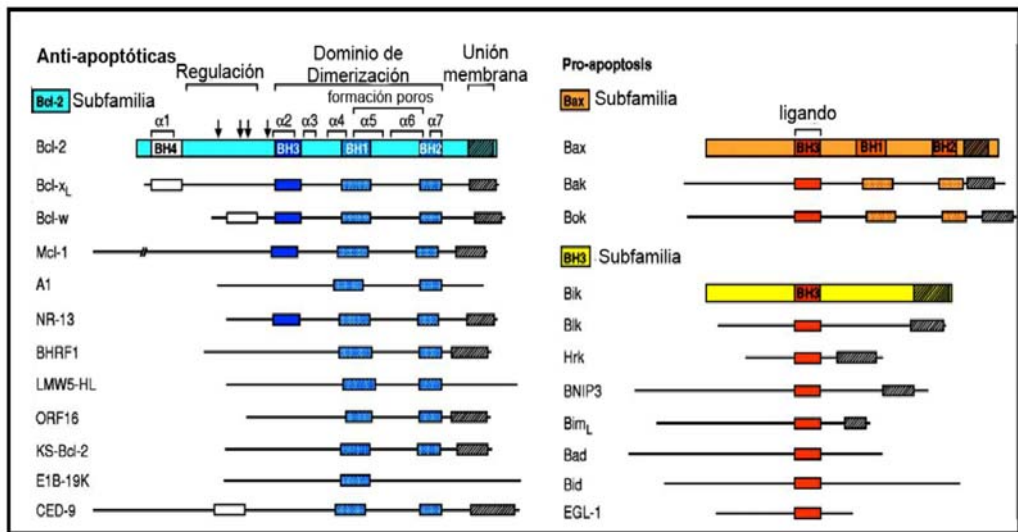


Figura 9.- Familia Bcl-2. Clasificación y estructura.

Las moléculas de esta familia presentan secuencias conservadas que se conocen como dominios de homología de Bcl-2 y que van desde BH1 hasta BH4. Además de Bcl-2 existen otros miembros de la misma familia con funciones de **supervivencia** como Bcl-X_L, Bcl-w o A1; todos ellos poseen los cuatro dominios. En cambio, dentro de las moléculas **proapoptóticas** de la familia Bcl-2 podemos distinguir dos grupos: la ‘subfamilia Bax’ formada por Bax, Bak y Bok que poseen los tres primeros dominios y la ‘subfamilia de proteínas que solo presentan el BH3’ formada por Bid, Bim, Bik, Bad, Bmf, Hrk, Noxa, Puma, Blk, BNIP3 y Spike, además del BH3 presentan un dominio de interacción que es necesario y suficiente para su función apoptótica (Cory y Adams, 2002; Mund y cols., 2003).

Si nos atenemos exclusivamente a los mamíferos, parece que la función clave de los miembros de la familia Bcl-2 sería mantener la integridad mitocondrial y controlar la liberación de las proteínas mitocondriales en el citoplasma (Cory y Adams, 2002).

Aunque existe cierta controversia en este sentido, las moléculas centrales **proapoptóticas** de la familia Bcl-2; Bax y Bak se cree que provocan o contribuyen a la permeabilización de la membrana mitocondrial externa, bien porque ellos mismos formen canales (Antonsson y cols., 2000) o porque interactúan con los componentes de los poros de dicha membrana (Tsujimoto y Shimizu, 2000).

En cambio, los miembros **antiapoptóticas** de la familia Bcl-2, controlan a los miembros proapoptóticos de la misma familia mediante la unión a los dominios BH3, (Reed, 1998). Asimismo, Bcl-2 provoca efectos antiapoptóticos mitocondriales controlando indirectamente la activación del apoptosoma (Marsden y cols., 2002). Por otra parte, se cree que las proteínas BH3 transducen señales específicas de muerte celular, como pueden ser el daño en el ADN o la falta de factores de crecimiento.

En resumen, podríamos decir que la manera en la que los miembros de la familia Bcl-2 regulan la apoptosis es la siguiente: las señales específicas de apoptosis provocan la activación de determinadas proteínas BH3, las cuales interaccionan con moléculas antiapoptóticas, fundamentalmente en la membrana externa mitocondrial (aunque también pueden hacerlo a nivel nuclear o del retículo) provocando la liberación de factores proapoptóticos tipo Bax. Estos factores sufren un cambio conformacional (posiblemente ayudados por otras proteínas tipo BH3) y se insertan en la membrana externa mitocondrial dónde provocan su permeabilización y la liberación de factores apoptogénicos (Borner, 2003).

5.2.2.1 Familia Bcl-2 y tejido cardiaco.

Las evidencias que apoyan la existencia/presencia de las vías de señalización dependientes de Bcl-2 en los cardiomiocitos son escasas, si bien se ha propuesto que

Bcl-2 inhibe la muerte de los miocitos ventriculares (Kirshenbaum y de Moissac, 1997). Asimismo, la expresión incrementada de Bcl-2 respecto a Bax supone un posible mecanismo compensatorio en el fallo cardiaco congestivo (Olivetti y cols., 1997). Sin embargo, la relevancia fisiológica de la expresión de estas proteínas en el corazón humano adulto está aún por dilucidar.

5.3 Vías apoptóticas

La apoptosis es un proceso muy regulado y preciso que requiere la interacción de múltiples factores. Puede provocarse por estímulos que provienen tanto del interior como del exterior de la célula: unión a receptores de superficie, daño del ADN provocado por defectos en los mecanismos de reparación, tratamiento con drogas citotóxicas, radiación, pérdida de señales de supervivencia, señales contradictorias para el ciclo celular o señales de muerte celular. En general, la apoptosis se puede iniciar de dos formas: la apoptosis mediada por receptores de muerte y la apoptosis independiente de los mismos, en el primer caso los receptores se activan mediante la unión a factores de inducción extracelulares; en el segundo caso intervienen señales intracelulares que, normalmente, implican a la mitocondria. El hecho de que un estímulo apoptótico culmine en la destrucción celular depende del tipo celular, de su estadio de desarrollo y de su susceptibilidad a los estímulos apoptóticos (Cook y Poole-Wilson, 1999).

5.3.1 Vía extrínseca

Está mediada por la activación de los llamados receptores de muerte, que son receptores de la superficie celular que transmiten señales apoptóticas tras la unión con ligandos específicos. Los receptores de muerte pertenecen a la familia del gen del receptor del Factor de Necrosis Tumoral (TNFR) e incluyen a TNFR-1, Fas/CD95 y a receptores TRAIL (ligando inductor de apoptosis) como DR-4 y DR-5 (Ashkenazi, 2002). La parte citoplásmica del receptor contiene una secuencia altamente conservada denominada Dominio de Muerte (DD). Cuando un receptor se activa recluta hacia su

DD activado moléculas como FADD (proteína con dominio de muerte asociada a Fas) o TRADD (proteína con domino de muerte asociada al receptor del TNF) constituyendo un receptor de membrana formado por la unión de varias moléculas denominado Complejo Inducido por Señales (DISC) (Sartorius y cols., 2001). Una vez que se produce la unión a DISC, varias moléculas de procaspasa-8 que se encuentran próximas provocan la activación y la liberación de más moléculas de la misma mediante un mecanismo de proteólisis (Denault y Salvesen, 2002). Finalmente, la caspasa 8 activa estimula a otras caspasas efectoras que fragmentan sustratos específicos provocando la muerte celular. Las células que son capaces de activar este mecanismo se denominan células de **tipo I**.

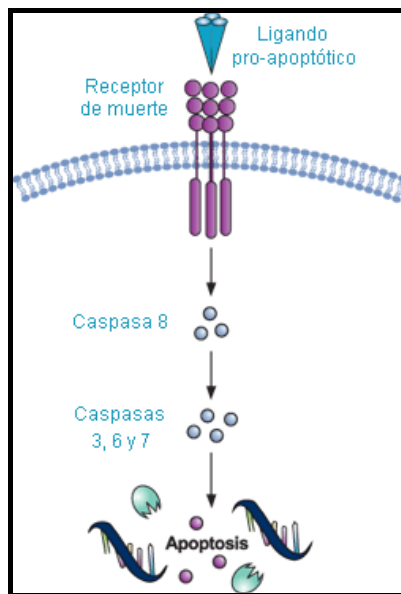


Figura 10.- Vía extrínseca de la apoptosis. *Modificada de Nat Rev Cancer.*

Sin embargo, existen otro tipo de células, las células de **tipo II**, en las que la señal que proviene del receptor activado no genera una cascada de señales lo suficientemente fuerte como para provocar la muerte celular por si misma. En este caso, la señal tiene que amplificarse a través de la vía apoptótica mitocondrial. La unión entre estas dos vías viene a través del miembro de la familia Bcl-2, Bid.

Bid es fragmentado por la caspasa 8 y esta nueva molécula (tBid) se trasloca a la mitocondria donde actúa junto con otros miembros de la familia proapoptótica Bcl-2, concretamente con Bax y Bak, para inducir la liberación de citocromo c y otros factores proapoptóticos mitocondriales hacia el citosol (Luo y cols., 1998). El citocromo C se une al Apaf-1 quien fragmenta el apoptosoma, provocando la activación de la procaspasa 9 (Acehan y cols., 2002). A continuación la caspasa 9 inicia una cascada apoptótica que implica caspasas efectoras provocando, como consecuencia, la muerte celular (Slee y cols., 1999) (Figura 10).

5.3.2 Vía intrínseca

En la **vía intrínseca** el estímulo apoptótico activa la liberación de citocromo c mitocondrial, esto provoca la formación del denominado Apoptosoma: complejo proteico citosólico de muerte celular (Salvesen y Renatus, 2002) que activa a su vez a la procaspasa-9 mediante su dimerización (Denault y Salvesen, 2002). De forma que, además de tener un papel relevante en la vía extrínseca de la apoptosis, la **mitocondria** también desempeña un papel esencial en la integración y propagación de aquellas señales que se originan dentro de la célula (vía intrínseca) como el daño del ADN, el estrés oxidativo o el daño inducido por quimioterapia (Kaufmann y Earnshaw, 2000; Wang, 2001).

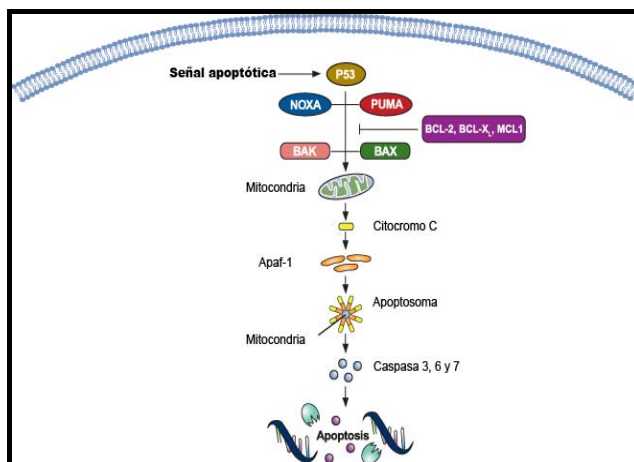


Figura 11. - Vía intrínseca de la apoptosis. *Modificada de Nat Rev Cancer.*

Finalmente y para ambas vías, una vez que las caspasas iniciadoras han sido estimuladas, activan proteolíticamente a las caspasas efectoras (3, 6 y 7); éstas rompen un grupo específico de sustratos, incluyendo a las procaspasas, lo que trae como consecuencia la amplificación de la señal de muerte y, en ciertos casos la ejecución de la muerte celular con todos los cambios morfológicos de los que se ha hablado anteriormente (Earnshaw y cols., 1999). (Figura 11).

5.4 Apoptosis en tejido cardiaco

Los estímulos implicados en la apoptosis de los cardiomiocitos se han identificado en estudios *in vitro*. Puede ser inducida por el TNF- α (Krown y cols., 1996), el estrés oxidativo (Aikawa y cols., 1997), el péptido natriurético atrial (Wu y cols., 1997), la hipoxia (Tanaka y cols., 1994), la staurosporina (inhibidor de las proteína quinasas) (Yue y cols., 1998) y, finalmente, por estiramiento de la célula o tejido (Cheng y cols., 1995).

6. MUERTE ENCEFÁLICA Y APOPTOSIS

Existen numerosas evidencias, tanto morfológicas como bioquímicas, de la existencia de apoptosis en los miocitos cardiacos en diversos estadios de enfermedades del corazón humano adulto. Concretamente, ha sido identificado en tejido muscular cardiaco de pacientes con fallo cardiaco congestivo (Olivetti y cols., 1997; Narula y cols., 1996); infarto agudo de miocardio (Olivetti y cols., 1996; Saraste y cols., 1997); displasia ventricular derecha arritmogénica (Mallat y cols., 1996) y miocarditis (Toyozaiki y cols., 1998). En cambio, la ausencia de apoptosis en este tipo celular se ha relacionado con defectos congénitos del sistema de conducción y en anomalías cardiacas asociadas con el síndrome de Noonan (Cecconi y cols., 1998).

Asimismo, se ha descrito que la muerte encefálica provoca apoptosis en animales como la rata (Van der Hoeven y cols., 2003; Kusaka y cols., 2005) y el conejo (Kirsch y cols., 1999); así como en diferentes tejidos humanos, como el riñón (Carstens y cols., 2005; Hes y cols., 2002; Nijboer y cols., 2004) o el corazón (Yeh y cols., 1999). En este último tejido, la apoptosis provoca una pérdida de masa contráctil, lo que se relaciona con fallo cardiaco (Khoynezhad y cols., 2007). La activación de la parte final de la vía apoptótica se ha sugerido como elemento importante (Kirsch y cols., 1999; Birks y cols., 2000) en la disfunción miocárdica que aparece en los corazones trasplantados de donantes de muerte encefálica (Laguens y cols., 1996; Szabolcs y cols., 1998).

7. EXPRESIÓN GÉNICA

En los estudios de expresión génica pueden surgir problemas que no permitan la comparación directa entre muestras. La **normalización** es un componente esencial de un ensayo de qPCR fiable, ya que con una normalización adecuada se controlan las posibles variaciones debidas a las eficiencias de la extracción, la transcripción inversa y la amplificación; permitiéndose la comparación entre muestras que presentan concentraciones de ARNm variables. Hasta el momento del inicio de la presente Tesis Doctoral no existían estudios previos referentes al procedimiento de normalización en tejido cardíaco humano.

7.1 PCR a tiempo real

La PCR en tiempo real (Real Time PCR) es una variante de la PCR convencional, que fue descrita por Higuchi y cols. en el año 1993. La PCR a tiempo real es una técnica que permite cuantificar mRNA en muestras biológicas, incluso cuando la muestra es escasa, ya que es un procedimiento lo suficientemente sensitivo para medir de una manera fidedigna la expresión in vivo (Demissie y cols., 2004; Fletcher y cols., 2004). Esta técnica se basa en la detección y cuantificación simultánea de la fluorescencia emitida por los productos de PCR acumulados durante varios ciclos de amplificación; lo cual permite conocer y registrar en todo momento la cinética de la reacción de amplificación. La **PCR a tiempo real** requiere de un marcador fluorescente que se una al producto formado e indique su presencia. La señal, por tanto, será proporcional a la cantidad de producto, de ahí que se considere una herramienta fundamental para el análisis cuantitativo de los ácidos nucleicos (Bustin y Nolan, 2004). Durante los ciclos iniciales la señal es débil y no se puede distinguir del ruido de fondo, según el producto se va formando se origina una señal que aumenta exponencialmente y, finalmente, los niveles se saturan. La saturación se debe al consumo de alguno de los elementos esenciales para la PCR (cebadores, marcador o dNTPs) (Kubista y cols., 2001). Como marcadores se utilizan las sondas de secuencia específica o los marcadores no específicos; dentro de este último grupo los agentes

intercalantes de cianina como ‘Sybr Green’ y ‘BEBO’ son los más populares (Bengtsson y cols., 2003; Zipper y cols., 2004). Cuando están libres en solución no presentan fluorescencia, comienzan a serlo ligeramente cuando se unen al ADN (Nygren y cols., 1998). La desventaja de los mismos es que la señal aparece siempre que tenemos una doble hebra de ADN, incluyendo los dímeros de cebadores.

7.1.1. Cuantificación del producto

Si nos referimos a cantidad de ADN, la PCR de punto final o convencional no nos dice nada acerca de la cantidad inicial de moléculas diana que estaban presentes en las muestras, solo se distingue una muestra positiva (presencia) de otra negativa (ausencia). En la PCR a tiempo real, la reacción de amplificación se detecta ciclo a ciclo, midiendo el incremento de fluorescencia, que es proporcional al aumento de ADN que se va formando en cada ciclo. Esta información se refleja en las curvas de cinética de la reacción para cada una de las muestras. Durante las primeras fases de la PCR puede estimarse la concentración inicial de ADN o ARN diana, ya que el aumento de fluorescencia es proporcional a la concentración inicial de ácido nucleico diana presente en la muestra. Por otra parte, las curvas se separan en la fase de crecimiento, esto reflejaría la diferencia en las cantidades iniciales de la molécula diana. Esta diferencia puede cuantificarse comparando el número de ciclos de amplificación requeridos por las curvas para alcanzar un nivel umbral de fluorescencia determinado. El número de ciclos requerido para alcanzar el umbral es lo que se denomina Ct (threshold cycle) o ciclo umbral. El umbral debe ser significativamente diferente del fondo en los primeros ciclos y estar en la zona de crecimiento exponencial en las curvas de cinética de la PCR (Figura 12).

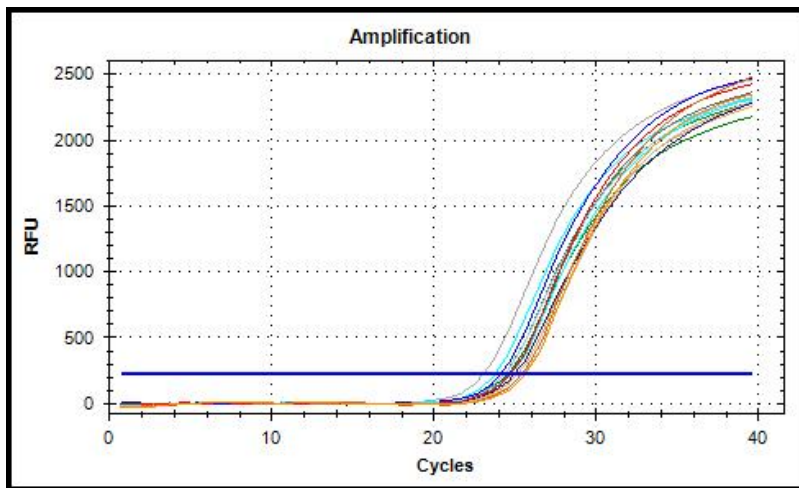


Figura 12.-Curvas de amplificación. Pérez S. y cols. (datos sin publicar).

El Ct puede variar en función del instrumento y de los parámetros del mismo, es por ello que ha de evitarse comparar valores de Ct individuales entre experimentos, siendo necesario incluir una referencia por PCR para relacionarlo respecto a las otras curvas.

Se asume que el Ct es inversamente proporcional a la concentración inicial de ADN diana presente en la muestra, siendo considerado como la unidad de medida de la PCR cuantitativa.

7.1.2. Identidad del producto

a) Curvas de disociación

Es una práctica recomendada controlar la formación de los dímeros de cebadores realizando una **curva de disociación** tras completarse la PCR. Esta curva consiste en medir la fluorescencia en función de la temperatura, para ello la reacción de PCR se somete a un aumento gradual de la misma. Teniendo en cuenta que la fluorescencia se relaciona de forma inversa con la T^a (Nygren y cols., 1998) se obtiene la curva. Sin embargo, cuando la T^a alcanza el valor en el que el ADN de

doble hélice se separa, el marcador deja de estar unido y la fluorescencia desciende abruptamente (Ririe y cols., 1997); como los dímeros de primer son más cortos que el producto diana, ellos se fusionan a una T^a menor y su presencia se reconoce fácilmente. Mediante esta aplicación se puede determinar la T^a de 'melting', que se abrevia T_m y que se corresponde con la T^a a la que el 50% del ADN está desnaturalizado y se determina como el máximo de la primera derivada negativa de la curva de 'melting'. Cada fragmento amplificado tiene una T_m característica que depende de la longitud y de la composición en nucleótidos. Esto permite distinguir la fluorescencia debida a la amplificación de un producto de PCR ($T_m \geq 80^\circ\text{C}$) de la que aparece a partir de los dímeros de oligonucleótidos (T_m entre 70°C y 80°C).

b) Electroforesis

La autenticidad del producto de PCR se puede verificar determinando el tamaño del producto amplificado mediante electroforesis en gel de agarosa y comparándolo con patrones de tamaño. En esta técnica, las biomoléculas se separan según su carga eléctrica, peso molecular y estructura, bajo la acción de un campo eléctrico. Dado que la carga eléctrica de un ácido nucleico es negativa, y proporcional a su longitud en nucleótidos, la electroforesis separa los fragmentos amplificados en la PCR según la longitud de cada fragmento expresada en pares de bases.

7.1.3. Validación de un protocolo de PCR a tiempo real

Para validar los protocolos de PCR a tiempo real con el objetivo de realizar cuantificaciones, se debe elaborar una recta de regresión a partir de concentraciones conocidas y crecientes de ADN diana, estimando a partir de la recta tres parámetros principales: eficiencia, coeficiente de correlación y rango dinámico.

a) Eficiencia (E)

La eficiencia se define como la capacidad del protocolo de PCR diseñado de duplicar la cantidad de ADN complementario (ADNc) molde disponible en cada ciclo y se expresa como porcentaje. En la práctica, se puede estimar a partir de la denominada **curva standard** que se basa en diluciones seriadas realizadas a partir de un producto de PCR o un plásmido purificados que contenga la secuencia diana (Rutledge y Côté, 2003). Los valores de Ct de las diluciones de estándares son leídos y representados versus el logaritmo de la concentración de la muestra, del número de copias de la muestra o del factor de dilución. Los datos se ajustan a la ecuación:

$$C_t = k \cdot \log(N_0) + C_t$$

La eficiencia de la PCR se calcula de la pendiente como

$$E = 10^{-1/k} - 1$$

El intercepto de la curva se corresponde al Ct de un estándar diluido conteniendo una única molécula diana.

Se acepta que el protocolo de PCR cuantitativa es válido cuando la $E \geq 80\%$ dentro del rango dinámico del ensayo, ya que un 100% significa que en cada ciclo se copia todo el ADNc del ciclo anterior.

b) Coeficiente de correlación (r)

El coeficiente de correlación es el ajuste de los datos a la recta de regresión construida, que determina si el protocolo es reproducible.

Se acepta que el protocolo de PCR es adecuado si $r \geq 0,95$ dentro del rango dinámico del ensayo.

c) Rango dinámico del ensayo

El rango dinámico del ensayo se define como el rango de concentraciones entre las que funciona correctamente el protocolo, nos indica la concentración más alta y más baja en la que el protocolo de PCR se comporta realmente de forma cuantitativa y las muestras se pueden medir.

7.2 Expresión relativa

La expresión relativa de dos genes en una misma muestra viene dada por la fórmula (Ståhlberg y cols., 2005):

$$\frac{N_A}{N_B} = K_{RS} \frac{\eta_B (1 + E_B)^{CT_B - 1}}{\eta_A (1 + E_A)^{CT_A - 1}}$$

N_A y N_B representan el número de moléculas de ARNm del gen A y del gen B que están presentes en la muestra. K_{RS} es la sensibilidad relativa de los reactivos de detección de los dos ensayos (Ståhlberg y cols., 2003) y η_A y η_B representan el rendimiento de la síntesis de ADNc del gen A y del gen B, respectivamente, definido como las fracciones de moléculas de ARNm que se transcriben a ADNc en la reacción de RT (Ståhlberg y cols., 2004). El exponente $Ct-1$ alude a la producción de ADN de doble hebra en el primer ciclo de PCR, a partir del molde de ADNc de una sola hebra generado en la transcripción reversa. Se asume que η es independiente tanto del ARN total como de la concentración de ARNm diana.

El amplio número de parámetros hace bastante complicado determinar la relación entre la expresión de dos genes en una única muestra. Por ello, en la mayoría de casos, la relación se compara en dos o más muestras, denominándose cuantificación comparativa (Pfaffl y cols., 2002). Típicamente uno de los genes es el gen a estudiar,

cuya expresión esperamos que se vea afectada por las condiciones del experimento y el otro es el gen de referencia cuya expresión ha de ser constante. Asumiendo los mismos rendimientos de la RT en las muestras, K_{RS} y η se anulan y la ratio de expresión de las dos muestras está dada por:

$$\frac{Muestra\ 1}{Muestra\ 2} = \frac{\left[\frac{N_A}{N_B} \right]_{Muestra\ 1}}{\left[\frac{N_A}{N_B} \right]_{Muestra\ 2}} = \frac{\left[\frac{(1 + E_B)^{CT_B - 1}}{(1 + E_A)^{CT_A - 1}} \right]_{Muestra\ 1}}{\left[\frac{(1 + E_B)^{CT_B - 1}}{(1 + E_A)^{CT_A - 1}} \right]_{Muestra\ 2}}$$

Yendo más lejos y asumiendo que las eficiencias de la PCR en las dos muestras son las mismas, la fórmula se simplifica de la siguiente manera:

$$\frac{Muestra\ 1}{Muestra\ 2} = \frac{(1 + E_B)^{CT_{B1} - CT_{B2}}}{(1 + E_A)^{CT_{A1} - CT_{A2}}}$$

Finalmente, asumiendo una eficiencia del 100%, tenemos:

$$\frac{Muestra\ 1}{Muestra\ 2} = \frac{2^{CT_{B1} - CT_{B2}}}{2^{CT_{A1} - CT_{A2}}} = 2^{(CT_{B1} - CT_{B2}) - (CT_{A1} - CT_{A2})} = 2^{\Delta\Delta CT}$$

Este es el conocido método del $\Delta\Delta CT$.

7.3 Métodos de normalización

La estrategia más simple es partir de una **misma cantidad** de muestra o de tejido, sin embargo, es difícil asegurar que diferentes muestras contengan el mismo material celular; un ejemplo sencillo es el caso de la sangre, ya que un mismo volumen de muestra puede contener poblaciones celulares que difieren en número.

La segunda opción sería **cuantificar el ARN Total** antes de su uso mediante la utilización de ‘ribogreen’ (sondas moleculares) o aparatos destinados a tal efecto (Agilent); asimismo, sería necesario controlar la calidad del ARN. Sin embargo, esto no nos asegura que se introduzca algún error en los pasos sucesivos (Transcripción reversa o PCR). Otro punto a tener en cuenta es el hecho de que el ARNr supone el 80% del total, mientras que el ARNm supone el 2-5%, por tanto, se asume que la relación entre ambos no cambia entre grupos, siendo esta afirmación bastante dudosa (Spanakis, 1993; Hansen y cols., 2001).

Otra estrategia es utilizar el **ADN genómico** (Talaat y cols., 2002) pero las células que están replicándose presentan más juegos cromosómicos que las que no lo hacen, de forma que se induce a error.

Una alternativa como control interno es utilizar una **molécula** que se incorpora **artificialmente** en la muestra (Bustin y cols., 2004). Esta molécula ‘artificial’ de ARN puede clonarse o ser transfectada de otras especies in vitro o generada sintéticamente. Al incorporarse en el momento de la extracción a concentración definida, va a estar sujeta a prácticamente todos los errores de manipulación y no sufre las variaciones biológicas que afectan a los genes de referencia. Sin embargo, no compensa las diferencias en la calidad del ARN entre muestras (Gilsbach y cols., 2006). Asimismo, estos estándares han de ser sintetizados (Cronin y cols., 2004) y la comercialización no está del todo generalizada, de forma que todavía es una estrategia en desarrollo. Por otra parte, presentan otra limitación porque al estar presentes en el reactivo que se utiliza para la extracción, no formarían parte propiamente del grupo celular o del tejido que estamos estudiando.

Por último, el método más común para normalizar los datos de ARNm es el uso de **genes de referencia**. No obstante, y aunque el uso de estos genes está comúnmente aceptado como la estrategia de normalización más apropiada (Huggett y cols., 2005), su utilidad tiene que ser validada de forma experimental para tejidos o tipos celulares

particulares y diseños experimentales específicos. Existen evidencias que sugieren que todos los genes se encuentran regulados bajo determinadas condiciones, de forma que, probablemente no existe un gen de referencia universal con una expresión constante en todos los tejidos (Bustin, 2000; Gibbs y cols., 2003). La elección de los genes de referencia adecuados para una correcta normalización y el número óptimo de los mismos debe ser determinada experimentalmente (Vandesompele y cols., 2002).

7.3.1 Métodos de selección de genes de referencia

Para seleccionar candidatos a genes de referencia, lo mejor es evaluar el comportamiento de genes implicados en funciones celulares diferentes (disminuyendo el riesgo de regulación simultánea), en un número de muestras representativas del estudio. Actualmente, existen paneles de genes de referencia comerciales y programas informáticos que permiten determinar qué gen/genos son los más adecuados para cada experimento. La idoneidad de estos genes se evalúa comparando los niveles de expresión de cada uno contra todos los demás. Estos métodos asumen, de manera general, que los genes con una expresión altamente correlacionada son los más apropiados como referencia.

La normalización implica calcular las relaciones entre la concentración de ARNm de los genes de interés respecto a los genes de referencia. El ARNm de los genes de referencia debe expresarse de forma estable y su concentración debe estar fuertemente correlacionada con las cantidades totales de ARNm presentes en las muestras. Un método comúnmente utilizado es la medida de la estabilidad génica. Esta medida se basa en el principio de que la relación entre la expresión de dos genes de referencia ideales es idéntico en todas las muestras, a pesar de las condiciones experimentales o del tipo celular. Es decir, que la variación en la relación entre los niveles de expresión de dos genes refleja el hecho de que uno de ellos (o los dos) no está expresado de forma constante, lo que corresponde con una disminución en la estabilidad de la expresión.

Para cada uno de los genes de referencia se determina la variación respecto al resto; se calcula como la desviación estándar de las relaciones de expresión transformados logarítmicamente y se define la medida de la estabilidad del gen control interno como M , que es el promedio de las variaciones de un gen en concreto respecto de todos los demás genes de referencia. Los genes con el valor de M menor tienen la expresión más estable. Asumiendo que los genes de referencia no están co-regulados, la exclusión en pasos sucesivos del gen que presenta el mayor valor M da lugar, finalmente, a una combinación de dos genes que están constitutivamente expresados y que tienen la expresión más estable en nuestro conjunto de muestras. Además, es necesario calcular un factor de normalización basado en los niveles de expresión de los mejores genes de referencia. Para hacer una aproximación certera, lo más exacta posible se recomienda usar la media geométrica. Con la finalidad de realizar esta serie de cálculos se desarrollan varios programas basados en el programa informático 'Excel' que permiten la evaluación de múltiples genes de referencia. Así una aplicación denominada '**geNorm**' (Vandesompele y cols., 2002) calcula el valor M para los genes control de un grupo de muestras, a continuación el programa permite la eliminación del gen de referencia peor situado (el que tiene el mayor valor M) y recalcula los nuevos valores M para los genes restantes, y así sucesivamente hasta determinar el par.

Asimismo, el programa '**Bestkeeper**' selecciona el gen menos variable utilizando también la media geométrica, pero utiliza los datos sin tratar (Pfaffl y cols., 2004) en lugar de trabajar con el número de copias.

Un tercer programa el '**Normfinder**' (Andersen y cols., 2004) no solo mide la variación sino que establece un ranking de los potenciales genes de referencia en función de cómo difieren entre los grupos estudiados, es decir, calculando hasta qué punto se ven afectados por las condiciones experimentales.

Vandesompele y cols. (2002) defienden el uso de múltiples genes de referencia en lugar de contar con un único transcrito de ARN. Es lo más recomendable si queremos hacer una normalización fina. Sin embargo, la resolución de cada ensayo en particular depende de la variabilidad de los genes de referencia escogidos. El número de genes finalmente escogido para hacer la media geométrica es una solución de compromiso entre el número de genes determinado por el programa y la disponibilidad de materiales y de muestra.

Objetivos

En la actualidad, la práctica totalidad de órganos utilizados para trasplante proceden de donantes en ME. Sin embargo, muchos de los corazones extraídos son rechazados para este fin como consecuencia de una función cardiaca alterada. Si bien, los estudios realizados en animales ponen de manifiesto el desencadenamiento, durante la ME, de una serie de procesos bioquímicos y fisiológicos, como es el caso de la “Tormenta Simpática”, que podrían provocar lesiones en el tejido cardiaco; esta circunstancia no ha sido, hasta el momento, extensamente estudiada en el hombre. Por tanto, y ante la escasez de información en la literatura acerca de las alteraciones causadas por la muerte encefálica en humanos, en la presente memoria se lleva a cabo una aproximación a la respuesta simpática y las alteraciones histológicas en el músculo cardiaco durante este proceso.

Por otra parte, el proceso apoptótico ha sido estudiado en diversas patologías cardiacas, poniendo de manifiesto la participación de varias moléculas apoptóticas en situaciones patológicas. Sin embargo, en la literatura científica no hay referencias acerca del posible papel de la apoptosis sobre el daño cardiaco que aparece como consecuencia de la muerte encefálica. Ante esta situación nos planteamos estudiar en esta Tesis el proceso apoptótico durante la muerte encefálica, abordándolo desde un punto de vista molecular e histológico.

Asimismo, para abordar un estudio de expresión génica es esencial la normalización adecuada de los resultados de PCR. La técnica comúnmente aceptada se basa en el uso de genes de referencia como controles internos, si bien, existe cierta tendencia a normalizar los resultados de forma sistemática con genes usados con esta finalidad tradicionalmente, sin comprobar de forma previa la idoneidad de los mismos para un tejido específico. De hecho, hasta la publicación del primer artículo que se incluye en la presente memoria no existía ningún estudio en tejido cardiaco humano, en el que se hubieran identificado los genes de referencia más adecuados para estudios de expresión génica.

Concretamente, los objetivos de nuestro trabajo son:

- Estudiar la expresión de genes implicados en el proceso de apoptosis en tejido cardiaco de pacientes en muerte encefálica.
- Determinar el gen o genes de referencia adecuados en nuestras condiciones experimentales para tejido cardiaco humano
- Estudiar la respuesta simpática a la muerte encefálica, a través de los niveles de catecolaminas circulantes.
- Valorar el daño tisular en el corazón tras la muerte encefálica.

*Material y
Métodos*

El trabajo que da lugar a esta memoria de Tesis comprende tres experimentos:

EXPERIMENTO 1

Determinación de los genes de referencia más adecuados para llevar a cabo una normalización correcta en experimentos de PCR a tiempo real en tejido cardiaco humano (Pérez y cols., 2007).

EXPERIMENTO 2

Estudio del papel de la apoptosis en el proceso de muerte encefálica mediante la cuantificación relativa de los niveles de expresión de seis genes relacionados con el proceso apoptótico (BAX, BCL-2, CASPASA 3, CITOCROMO C y FAS) en tejido cardiaco mediante PCR a tiempo real. (Pérez y cols., 2008).

EXPERIMENTO 3

Estudio de los niveles de catecolaminas en donantes como consecuencia de la muerte encefálica y análisis de las lesiones histológicas del tejido cardiaco tras dicho proceso. (Pérez y cols., 2009)

A continuación se describe la metodología de trabajo utilizada, especificando en cada caso a qué experimento corresponde.

1. SUJETOS DE ESTUDIO

Para la realización del presente trabajo se utilizaron 50 donantes en ME (28 hombres-22 mujeres) con una edad media de 61 años y un rango de edad que oscilaba entre los 30 y los 80 años. La ME fue desencadenada por diferentes causas (Tabla 4).

Edad	61 ±15 años (rango 30-80)
Sexo	22 M : 28 H
Causa de la Muerte	28 ACV hemorrágicos 3 ACV isquémicos 16 TCE 3 daño cerebral anóxico
Tiempo medio de estancia en la U.C.I.	93 horas (rango 7-624)
Dosis de noradrenalina	0.1 mcg/kg/min-0.2 mcg/kg/min
Dosis de dopamina	10 mcg/min-15 mcg/min
PaO₂	160±40 mmHg
PaCO₂	39.5±2.5 mmHg
pH	7.41±0.03

Tabla 4.- Características del grupo de donantes.

El tiempo medio de estancia en la UCI antes de la donación fue de 93 horas (rango 7-624 horas). Ninguno de los donantes presentaba patología cardíaca previa. Los sujetos utilizados para el estudio se incluyeron en el mismo debido a que sus corazones no fueron utilizados para el trasplante a causa de la edad o al peso del donante o a la incompatibilidad con el grupo sanguíneo del receptor. Los donantes pertenecientes a un rango de edad que oscilaba entre los 30 y los 40 años y cuyas muestras se utilizaron a pesar de no cumplir alguna de las premisas antes reseñadas, presentaban incompatibilidad con los receptores de la lista de espera española y no se aceptaron como donantes competitivos en los países europeos.

El grupo control estaba formado por 12 pacientes del Servicio de Cardiología del Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA) que se habían sometido a una sustitución de la válvula mitral debido a una lesión mitral doble. Este grupo estaba formado por 6 hombres y 6 mujeres con una edad media de 65 años y un rango de edad entre 49 y 83 años.

2. OBTENCIÓN DE MUESTRAS

2.1 Muestras de tejido cardiaco

Las muestras de tejido cardiaco utilizadas se obtuvieron del ventrículo izquierdo de los donantes mediante una adaptación del método estereológico de Cavalieri. Para que la selección de los fragmentos fuese aleatoria se realizaron secciones transversales a partir del límite auriculoventricular en cortes completos de 1 cm, la media de secciones fue de 7 cm. Se tomaron dos de ellas de manera alternativa 1° y 3°, 2° y 4°, y por último 3° y 5°, con un arco de selección aleatoria para 360°. Se recogieron secciones transversales de todo el espesor del miocardio en la zona aleatoriamente marcada en un bloque de 1,5 cm. de ancho y 3 mm. de espesor. (Figura 13).

Todos los fragmentos musculares (tanto los procedentes de los donantes como de los controles) fueron recogidos en fresco (líquido cardioplégico).

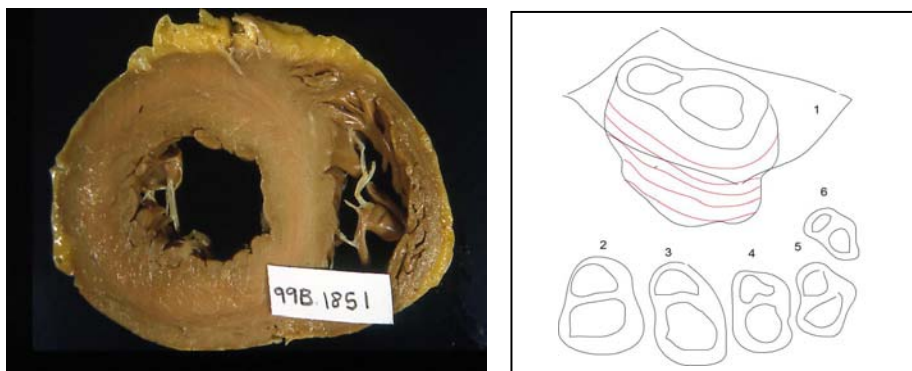


Figura 13.-Esquema representando la obtención de muestras. *Cedido por la Dra. Aurora Astudillo. Hospital Universitario Central de Asturias.*

Las muestras del grupo control se incluyeron en O.C.TTM (Tissue Tek, Sakura, Netherlands) y se conservaron a -80° hasta su procesamiento.

Las muestras obtenidas de donantes se dividieron en dos partes: una fue inmediatamente incluida en O.C.TTM y conservada a -80°C; y la otra se fijó en un tampón con formol al 10% a pH 7 (Panreac Química, Spain) y se incluyó en parafina (TP 1050 Tissue Processor; Leica) como sigue:

1.- Lavado con Agua desmineralizada

2.- Deshidratación de la muestra

- Alcohol 70° durante 2 horas
- Alcohol 80° durante 2 horas
- Alcohol 96° durante 2 horas
- 3X Alcohol absoluto durante 1 hora
- 2X Xilol durante 1 hora

3.- Inclusión

- 4X Parafina (Histosec, Merck, Darmstadt, Alemania)
durante 1 hora, la última parafina durante 2 horas

Los alcoholes y el xilol utilizados de Panreac Química España.

Las muestras incluidas en O.C.TTM se dividieron en dos partes, en una de ellas se llevó a cabo la extracción de ARN, a partir del cual se realizan los estudios de Biología Molecular y la otra se utiliza para hacer un estudio de Histoquímica.

El tejido incluido en parafina será utilizado para Inmunohistoquímica.

2.2 Muestras sanguíneas

De cada paciente se obtuvieron muestras de sangre arterial en los puntos indicados en la Figura 14. Las muestras sanguíneas se obtuvieron por punción arterial. En el momento de la toma de muestras se registraron las presiones arteriales utilizando el dispositivo GEM Premier 3000 (Instrumentation Laboratory Co., Lexington, MA). Todas las muestras se recogieron en tubos con EDTA-K₃, se centrifugaron a 2-8°C (Heraeus Multifuge 3 S-R, Heraeus, Hanau, Germany) a 3000 rpm. durante 13 min. para separar el plasma que se conserva congelado a -20°C hasta el posterior análisis de catecolaminas (adrenalina, noradrenalina y dopamina) mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y para el estudio de Troponina T.

	1 hora	1 hora	1 hora	1 hora	1 hora	1 hora
0	Pre-ME	ME	Post-ME1	Post-ME2	Post-ME3	Post-ME4
	n = 11	n = 17	n = 34	n = 29	n = 23	n = 20

Figura 14.-Obtención de muestras sanguíneas.

Asimismo, para descartar Infarto Agudo de Miocardio (IAM), se determinaron los niveles de Troponina T en todos los donantes en el momento de la ME por electroquimioluminiscencia (Cobas 6000 Módulo e 601, Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania), utilizando el Reactivo “Troponin T” (Troponina T, Cardiac T de Roche Diagnostic, Suiza) según instrucciones del fabricante. Este ensayo se realizó en el servicio de Biquímica de Urgencias del HUCA.

3. BIOLOGÍA MOLECULAR

3.1 Extracción de ARN

El ARN total se aisló, tanto en el Experimento 1 como en el Experimento 2, utilizando el kit Nucleo Spin RNA II Isolation Kit (Macherey-Nagel Gmb H & Co. KG) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Durante el procedimiento de extracción se utilizó material autoclavado y guantes estériles para evitar posibles contaminaciones.

- Las muestras de tejido cardíaco se homogeneizaron con la ayuda de un mortero.
- A continuación, las células sufrieron un proceso de lisis al incubarse con una solución formada por 350µl del tampón de lisis RA1 que incluye tiocianato de guanidina y 3,5µl de β-mercaptoetanol. Este tampón de lisis inactiva las ARNasas y crea unas condiciones adecuadas que favorecen la adsorción del ARN a la membrana de las columnas incluidas en el kit.
- Filtración del lisado mediante centrifugación a 11000 g durante 1 minuto.
- Añadir 350µl de etanol al 70% y centrifugar a 8000g durante 30 segundos.
- Añadir 350µl del tampón MDB (Membrane desalting buffer) y centrifugar a 11000g durante 1 minuto.
- Digestión del ADN: Añadir 95µl de la solución de ADNasa formada por 10µl de ADNasaI y 90µl del tampón de ADNasa. Dicha solución se aplica directamente sobre la membrana.
- Incubación a T^a ambiente durante 15 minutos.
- Primer lavado: añadir 200µl del tampón RA2 y centrifugar a 8000g durante 30 segundos. Este tampón inactiva a la ADNasa.
- Segundo lavado: añadir 600µl del tampón RA3 y centrifugar a 8000g durante 30 segundos.

- Tercer lavado: añadir 250µl del tampón RA3 y centrifugar a 11000g durante 2 minutos. Los tampones de lavado eliminan las sales, metabolitos y los componentes celulares.
- La columna se coloca en un tubo de 1,5 ml.
- Dilución del ARN. Finalmente, se añaden 60 µl de Agua libre de ARNasas y se centrifuga a 11000g durante 1 minuto.
- El ARN se alícuota y se mantiene a -80° hasta su posterior utilización.

La calidad del ARN obtenido se determinó mediante la medida de la absorbancia usando el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 UV-Vis (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE). Todas las muestras utilizadas mostraron una razón de absorbancia 260/280 nm entre 1.8 y 2.2. Una razón de aproximadamente 2 se acepta, en general, como ARN de buena calidad.

3.2 Síntesis de ADN complementario (ADNc). Transcripción inversa

Antes de que se pueda realizar una medida de la expresión génica mediante PCR a tiempo real, el ARNm de la muestra debe ser copiado a ADN complementario (ADNc) por **transcripción inversa** (RT).

Tanto en el experimento 1 como en el experimento 2 cada muestra de ARN fue transcrita a ADN complementario (ADNc) utilizando como cebadores Oligo-pdT y random primers del First-Strand complementary DNA (cDNA) synthesis kit para RT-PCR (AMV; Roche Diagnostic, Suiza) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

- Mezclar para cada muestra:
 - 2 µl del Tampón de reacción 10X
 - 4 µl de MgCl₂ 25mM
 - 2 µl de dNTPs

- 1 µl de cebador OligodT
- 1 µl de cebador random
- 1 µl de Inhibidor de ARNasas
- 2 µl de ARN
- 0,8 µl de la retrotranscriptasa AMV
- 6,2 µl de H₂O estéril

20 µl TOTALES

- Incubación de la mezcla a 25°C durante 10 minutos para que los cebadores se unan al ARN.
- Incubación durante 60 minutos a 42°C, en la que se lleva a cabo la transcripción inversa en presencia de la retrotranscriptasa AMV, obteniéndose el ADNc.
- Desnaturalización del enzima a 99°C durante 5 minutos.
- Las muestras de ADNc se enfrían a 4°C en el termociclador y se almacenan a -20°C hasta uso.

3.3 Calidad del ADNc.

Para confirmar la total ausencia de ARN residual, se realizó una PCR convencional para la β -actina (Nº Acceso GenBank: E00829) (cebador β -actina sentido 5'-ACTACCTCATGAAGATCCTC-3'; cebador β -actina antisentido 5'-CGGATGTCCACGTCACACTTC-3'). Los reactivos utilizados procedían del Biotools DNA polymerase kit (Biotools, Madrid, España) que incluían además de la ADN polimerasa (Taq polimerasa) tampón de reacción, ClMg_2 y dNTPs.

El volumen final de la mezcla de PCR para cada muestra fue:

<u>Reactivo</u>	<u>Volumen</u>
○ Tampón 10X -----	2 μl .
○ ClMg_2 25mM -----	1,6 μl .
○ dNTPs 2mM -----	2 μl .
○ Cebadores 5 μM -----	2 μl c/u.
○ Taq polimerasa -----	0,4 μl .
○ H_2O estéril -----	8 μl .
○ cDNA -----	2 μl .

TOTAL 20 μl .

El protocolo de PCR se realizó en el termociclador iCycler (Bio-Rad Hercules, CA, Estados Unidos), las muestras se someten a:

- Desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos.
- Posteriormente, 35 ciclos de Amplificación:
 - Desnaturalización a 94°C durante 30 segundos,
 - Hibridación de los cebadores a 55°C durante 30 segundos,
 - Extensión del cebador a 72°C durante otros 30 segundos,
- Extensión final de 10 minutos. El tamaño del amplicón se confirmó mediante electroforesis en gel de agarosa.

Los geles utilizados para los experimentos 1 y 2 incluidos en la presente memoria, tanto para la confirmación de la calidad del ADNc sintetizado, como para la comprobación del tamaño del producto de PCR a tiempo real obtenido; fueron geles de agarosa (Agarosa D-1 Low EEO, Conda, España) al 2% en tampón TBE (Tris/Boric Acid/EDTA) 1X a pH 8,4 (Bio-Rad, Hercules, CA, Estados Unidos) teñido con bromuro de etidio (BrEt) de Bio-Rad a una concentración final de 5µg BrEt/ml gel.

3.4 Protocolos de PCR a tiempo real

Para el estudio de la expresión génica y para detectar la abundancia de ARNm en las muestras estudiadas, se utilizó Sybr Green como fluorocromo. Concretamente, el reactivo (mastermix) empleado fue la Sybr Green PCR Supermix 2X de Bio-Rad (Hercules, CA, Estados Unidos). El agua estéril de B. Braun Medical (Melsungen Alemania). El material fungible, tiras de tubos de 0,2 ml y tapas planas (Axygen Scientific Inc, CA, Estados Unidos). Todas las muestras se estudiaron por triplicado.

En todas las PCR realizadas se cargó un control negativo, en él, todos los componentes de la mezcla de PCR estaban presentes a excepción del ADNc, este control tiene la finalidad de comprobar la ausencia de contaminación debida a ácidos nucleicos en alguno de los reactivos utilizados en la reacción de amplificación.

La identidad del producto se confirmó en geles de agarosa al 2% con BrEt, en los que se comprobó que el tamaño del producto amplificado coincidía con lo esperado según el diseño de los cebadores.

3.4.1 Detección de la expresión génica en el Experimento 1

Para la identificación del control endógeno más adecuado para el estudio de la expresión génica en corazones procedentes de donantes en muerte encefálica se utilizaron cebadores de los diez genes incluidos en el Human Endogenous Control Gene Panel (TATAA Biocenter, Goteborg, Suecia). Tabla 5.

Gen	Nombre Completo	Función
GADPH	Gliceraldehido-3-fosfato-deshidrogenasa	Enzima glicolítico
PPIA	Peptidilprolil isomerasa A (Ciclofilina A)	Proteína relacionada con inmunosupresión
ACTB	β -Actina	Proteína estructural del citoesqueleto
YWHAZ	Proteína de activación Tirosina 3/triptófano-5-monooxigenasa	Proteína de señal de transducción
RRN18S	ARNr 18S	ARN ribosomal
B2M	β -2-microglobulina	Cadena β del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHC I)
UBC	Ubiquitina C	Proteína de degradación
TBP	Proteína de unión a la caja TATAA	Factor de transcripción de la ARN polimerasa II
RPLP	60S Proteína ácida ribosomal PO	Miembro de las proteínas ribosomales
HPRT	Hipoxantina fosforribosil transferasa	Síntesis de purinas

Tabla 5.- Nombre y función de los genes de referencia estudiados.

Volumen final de PCR: Para los genes endógenos la mezcla utilizada en la reacción estaba formada por 2 μ l de ADNc en un volumen final de 25 μ l según indicaban las instrucciones del fabricante.

- H₂O estéril-----9,5 μ l.
- Mezcla de Cebadores ----- 1 μ l.

- Sybr Green (2X) ----- 12,5 µl.
- ADNc-----2 µl.

Protocolo de amplificación: El protocolo de PCR a tiempo real consistió en:

- Etapa inicial a 95°C durante 3 minutos.
- 40 ciclos de Amplificación:
 - 30 segundos a 95°C para desnaturalizar el cDNA,
 - 20 segundos a 60°C para hibridar,
 - 20 segundos a 72°C para elongar,

Los datos de fluorescencia se recogieron a 72°C.

Protocolo de melting: El análisis de la curva de melting para confirmar la especificidad del producto celular fue llevada a cabo inmediatamente después de la amplificación:

- Desnaturalización durante 1 minuto a 95°C
- Hibridación 1 minuto a 65°C
- Incrementos de 0.5°C (10 segundos cada uno) durante 60 ciclos comenzando a 65°C y monitorizando la fluorescencia emitida por la muestra.

Termociclador: Se utilizó el i-Cycler iQ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA, Estados Unidos).

3.4.2 Detección de la expresión génica en el Experimento 2

Los cebadores fueron diseñados por el programa Beacon Designer Software de Premier Biosoft International (CA) a partir de las secuencias totales que figuran en la base de nucleótidos del NCBI (National Center for Biotechnology Information). Los cebadores fueron sintetizados por Eurogentec (Liege, Bélgica) a una concentración de 40 nmol.

Todos los datos referentes a los genes amplificados: números de acceso al GenBank, tamaño de producto amplificado, T^a de hibridación y de melting, así como la secuencia de los oligonucleótidos utilizados aparecen recogidos en la Tabla 6.

Gen	Número GenBank	Tamaño	T ^a melting	T ^a hibridación	Secuencia
BAX	NM138761	171 pb	86 °	60 °	Sentido 5'
					GATGCGTCCACCAAGAAGC
BCL2	NM004049	165 pb	85,5 °	57 °	Antisentido 5'
					CCAGTTGAAGTTGCCGTCAG
CASPASA 3	NM032991	159 pb	82,5 °	57 °	Sentido 5'
					CTGGACTGTGGCATTGAGAC
CYT C	NM018947	190 pb	84,5 °	60 °	Antisentido 5'
					ACCAAGCGACTGGATGAACC
FAS	NM000043	244 pb	84,5 °	57 °	Sentido 5'
					TGGGTGATGTTGAGAAAGG
HIF1α	NM001530	229 pb	83 °	58 °	Antisentido 5'
					CGCTGTGTAAGAGTATCC
					Sentido 5'
					GAAGACACAGAAGCAAGAACC
					Antisentido 5'
					GTGGTAGTGGTGCATTAGC

Tabla 6.- Nombre y función de los genes apoptóticos estudiados.

Volumen final de PCR: La mezcla para llevar a cabo la reacción de PCR estaba compuesta por:

- 2 µl de cDNA.
- 0,4µl de cada cebador (sentido y antisentido). Concentración final 0,1 µM.
- 10µl de Sybr Green (2X).
- Agua estéril hasta un volumen final de 20 µl.

Protocolo de amplificación: El protocolo de PCR a tiempo real incluía:

- Etapa inicial a 95°C durante 3 minutos.
- 40 ciclos de Amplificación:
 - 30 segundos a 95°C para desnaturalizar el cDNA.
 - 40 segundos a diferentes T^as dependiendo del gen (Tabla 6) para hibridar.
 - 40 segundos a 72°C para elongar.

Los datos de fluorescencia se recogieron a 72°C.

Protocolo de melting: El análisis de la curva de melting para confirmar la especificidad del producto celular fue llevada a cabo inmediatamente después de la amplificación:

- Desnaturalización durante 1 minuto a 95°C.
- Hibridación 1 minuto a 65°C.
- Incrementos de 0.5°C (10 segundos cada uno) durante 60 ciclos comenzando a 65°C y monitorizando la fluorescencia emitida por la muestra.

Termociclador: para llevar a cabo las reacciones de PCR a tiempo real se utilizó el i-Cycler iQ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA, Estados Unidos).

3.4.3 Eficiencias, Coeficientes de correlación y T^as de melting

Las eficiencias de las reacciones de PCR de los Experimentos 1 y 2 se calcularon a partir de una curva estándar elaborada con una mezcla de las muestras de tejido cardíaco, diluidas en serie (diluciones decimales seriadas) con al menos seis puntos; oscilando entre 91,7° y 96,8°. El coeficiente de correlación observado se situó entre 0,993 y 0,999. En todos los experimentos, las T^as de

melting alcanzadas (ver Figura 15) fueron mayores de 80°C, quedando, por tanto, descartada la formación de dímeros.

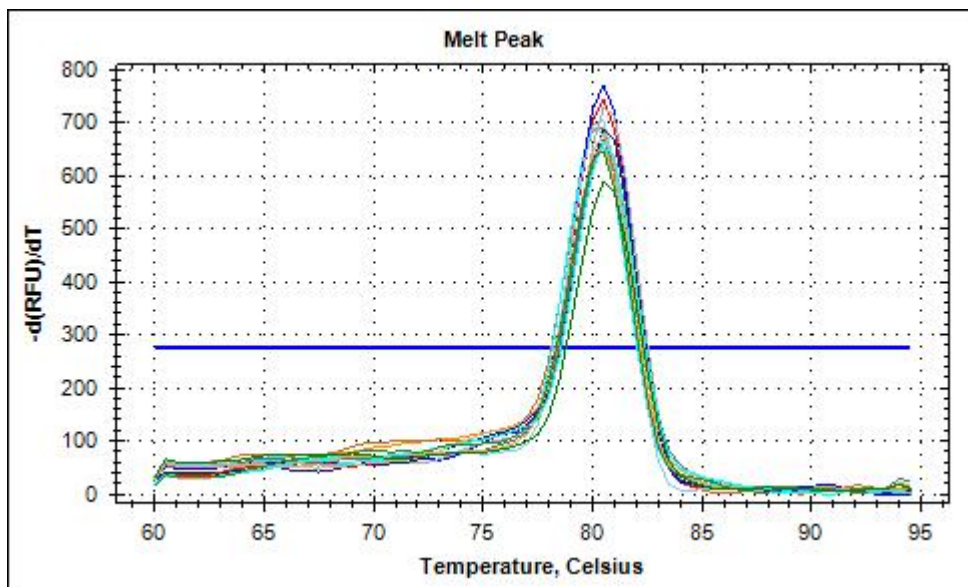


Figura 15- Curva de melting. Pérez S. y cols. (datos sin publicar).

3.4.4 Normalización

En el Experimento 2 se usó la Peptidilprolil isomerasa A/ Ciclofilina A (Human Endogenous Control Gene Panel, TATAA Biocenter, Goteborg, Suecia) como control endógeno, de acuerdo con lo descrito en el Experimento 1 y con las instrucciones del fabricante recogidas en el apartado 3.4.1 de la presente memoria.

4. HISTOLOGÍA

Los fragmentos incluidos en parafina se cortaron en secciones de 5 µm de espesor (Microtomo RM2145, Leica, Wetzlar, Alemania) y se montaron en portaobjetos SuperFrost® (Menzel-Glaser, Alemania) procesándose a continuación para la realización de una tinción estructural de rutina de hematoxilina-eosina (ST5010 Autostainer XL, Leica, Wetzlar, Alemania). Todas las muestras se sometieron de forma sucesiva a los siguientes procesos:

Horno a 59 ° C durante 15 segundos

Hidratación

- 2X Xilol durante 7 segundos.
- 2X Alcohol absoluto durante 2 minutos.
- Alcohol 70° durante 2 minutos.
- Lavado 1: Agua durante 2 minutos.
- Hematoxilina durante 2 minutos 15 segundos. Hematoxylin Harris Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania.
- Lavado 2: Agua durante 20 minutos.
- Lavado 3: Agua 5 segundos.
- Lavado 4: Agua 1 minuto.
- Eosina durante 2 minutos 30 segundos. 1% Aqueous Eosin Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania.
- Lavado 5: Agua 40 segundos.

Deshidratación

- Alcohol 96° 30 segundos.
- Alcohol absoluto 2 minutos.
- Alcohol absoluto 3 minutos.
- Xilol 10 minutos.
- Los alcoholes y el xilol de Panreac Química, España.

Las preparaciones se evaluaron además de forma independiente por dos patólogos con experiencia en la interpretación de biopsias miocárdicas y que desconocían la historia clínica del donante.

Teniendo en cuenta las características definitorias de cada uno de los tipos de lesión asociada a la muerte encefálica, y a la hora de cuantificar el grado de afectación del tejido se consideró:

4.1 Lesiones asociadas a la muerte encefálica

Los cambios histológicos asociados a la muerte encefálica incluyen:

4.1.1 Bandas de contracción

Es un cambio morfológico producido por el efecto de respuesta en contracción rápida e irreversible, que puede observarse mejor en secciones longitudinales de las fibras musculares, como gruesas bandas eosinófilas homogéneas alternantes con bandas gruesas y pálidas en las que se visualiza fibrillaridad sarcomérica.

Aunque han sido objeto de debate, ya que pueden aparecer como consecuencia de la utilización de medios fijadores fríos y las bandas localizadas en los márgenes de las muestras se clasifican como artefactos de la preparación histológica; las bandas de contracción se consideran el primer cambio morfológico de respuesta a la isquemia miocárdica. Se cuantificaron como Presencia/Ausencia.

4.1.2 Necrosis de los cardiomiocitos y lesiones cardiacas necróticas

Se considera como marcador morfológico de muerte celular la presencia de contracción nuclear (picnosis), hipereosinofilia citoplásmica y pérdida de la estriación sarcomérica. Estos cambios son muy precoces en el proceso de muerte

celular y corresponden a las primeras 24 horas. Pasado este tiempo se activa la respuesta inflamatoria. Se cuantificaron como Presencia/Ausencia y % de Área afectada.

4.1.3 Infiltrados inflamatorios

Inicialmente se produce una extravasación de polimorfonucleares, evolucionando a infiltrado de células redondas, que son monocitos emigrados después de 48 horas de muerte celular. Puede existir también una respuesta linfocitaria crónica en estadios más avanzados, especialmente cuando la necrosis es zonal, con grupos de cardiomiocitos afectados. Se cuantificaron como Presencia/Ausencia.

4.2 APOPTOSIS

4.2.1 Tunel

Los porcentajes de apoptosis se analizaron mediante el estudio de la morfología nuclear de las células positivas a la técnica TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling*).

Las endonucleasas apoptóticas que provocan la fragmentación nuclear generan fragmentos de ADN de diferentes tamaños en los que aparecen grupos 3'-OH libres en los extremos. Estos grupos pueden identificarse gracias a la unión de nucleótidos marcados que es catalizada por la deoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) que se une a los extremos 3'-OH de los fragmentos de ADN generados en respuesta a las señales apoptóticas y cataliza la adición de nucleótidos marcados con biotina. Los nucleótidos biotinilados se detectan usando una estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano (HRP). La diaminobenzidina (DAB) reacciona con la muestra marcada para generar un sustrato coloreado insoluble en el lugar de la fragmentación de ADN, lo que permite que sean detectados mediante microscopía óptica.

- Las muestras de ventrículo izquierdo previamente incluidas en parafina y cortadas en secciones de 5 μm de espesor se **desparafinaron** con xilol y **rehidrataron** en alcoholes de concentración decreciente hasta llegar a etanol al 70%.
- Posteriormente se llevó a cabo la **permeabilización** de las mismas con proteinasa K (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) incubando durante 20 minutos a T^a ambiente.
- Se **inactivaron las peroxidasas endógenas** mediante el tratamiento de las muestras con H₂O₂ al 3% durante 5 minutos.
- A continuación los especímenes se **incubaron** con la solución **TdT Labelling Reaction** (TdT-FragEL™ DNA Fragmentation Detection Kit (TUNEL; Calbiochem, Merck Biosciences, Alemania) por un periodo de 90 minutos a 37°C.
- La reacción se detuvo mediante la adición de una **solución de parada** (EDTA 0,5 M a pH 8).
- La **detección** se llevó a cabo con diaminobenzidina (DAB).

Como control positivo se utilizaron muestras histológicas de ganglio linfático suministradas por el Biobanco del HUCA. El test se consideró positivo cuando más del 20% de las células en cada portaobjetos mostraron un núcleo con coloración marrón.

4.2.2 Inmunohistoquímica

Se realizó Inmunohistoquímica utilizando un anticuerpo contra la proteína antiapoptótica Bcl-2.

Las muestras se cortan con el microtomo a un espesor de 5 μm y se secan toda la noche en la estufa Heraeus Function Line (Heraeus instruments, Hanau,

Germany) a 58°C-59,5°C. Se montan en portaobjetos SuperFrost® (Menzel-Glaser, Alemania).

Desparafinado e hidratación

- Xilol, 10 minutos.
- Xilol, 10 minutos.
- Alcohol absoluto, 5 minutos.
- Alcohol absoluto, 5 minutos.
- Alcohol 96°, 5 minutos.
- Agua destilada, 5 minutos.
- Los alcoholes y el xilol de Panreac Química, España.

Desenmascaramiento antigénico con tampón citrato

Se realiza desenmascaramiento con tampón citrato 0,01 M a pH 6,5.

- Ácido cítrico monohidrato _____ 4,20 gr.
(100244, Merck, Darmstadt, Alemania)
- Agua bidestilada _____ 1970 ml.

Ajustar hasta el pH indicado con hidróxido sódico 2 M (28735, Fisher Scientific, Estados Unidos).

Incubaciones

- 3 lavados con PBS (BR0014, OXOID, Reino Unido) + Tween-20 (655204, Merck, Darmstadt, Alemania) al 0,05%.
- A continuación se trataron las muestras con una solución de bloqueo de la peroxidasa endógena (S2023, Dako, Glostrup, Dinamarca) 3 veces durante 2 minutos y 30 segundos cada una de ellas.

- 3 lavados con PBS (BR0014, OXOID, Reino Unido) + Tween-20 (655204, Merck, Darmstadt, Alemania) al 0,05%.
- Incubación con el anticuerpo primario Anti-Bcl-2 (Anticuerpo Bcl-2; M0887 Dako, Glostrup, Dinamarca) se incubó a una dilución 1:40 durante 30 minutos.
- 3 lavados con PBS (BR0014, OXOID, Reino Unido) + Tween-20 (655204, Merck, Darmstadt, Alemania) al 0,05%.
- Para el revelado se utiliza el Envision HRP ratón (K4001, Dako, Glostrup, Dinamarca) durante 30 minutos.
- 3 lavados con PBS (BR0014, OXOID, Reino Unido) + Tween-20 (655204, Merck, Darmstadt, Alemania) al 0,05%.
- Finalmente, se trata con DAB (K3468, Dako, Glostrup, Dinamarca) durante 10 minutos.
- 3 lavados con PBS (BR0014, OXOID, Reino Unido) + Tween-20 (655204, Merck, Darmstadt, Alemania) al 0,05%.
- Tinción con Hematoxilina (S3301, Dako, Glostrup, Dinamarca) durante 2 minutos.
- Lavado con H₂O.
- Secar.

La señal se detecta en los cardiomiocitos a nivel citoplásmico como color marrón.

Los recuentos celulares se realizaron en tres campos seleccionados de cada una de las preparaciones en las áreas más intensamente marcadas (hot spot) y se evaluaron 100 células en cada campo. Los resultados fueron expresados como porcentajes (n° células positivas/300 x 100).

4.2.3 Histoquímica

Para llevar a cabo la histoquímica para el citocromo C, cuya liberación al citosol es indicadora de la activación del proceso apoptótico, las muestras de tejido congelado incluidas en O.C.TTM se cortaron en el criostato (CM1900, Leica, Wetzlar, Alemania) a un grosor de 7 μ m.

Después de cortar los bloques, las secciones se lavaron con tampón fosfato (BDTM Phosphate Buffered Saline [pH 7.2], Difco , Estados Unidos) a pH 7.2 e incubadas con una solución a pH 7,4 formada por 1 ml de catalasa (C-9322, SIGMA, St Louis, Estados Unidos) a una concentración de 20 mg/ml, 10 mg citocromo C (C-7752, SIGMA, St Louis, Estados Unidos), 9 ml de tampón fosfato y 10 mg de DAB (D5637, SIGMA) durante 2 horas a 37°C.

A continuación las secciones se lavan en tampón fosfato dos veces durante 2 minutos cada una de ellas. Se deshidratan utilizando baños en alcohol como sigue:

- Alcohol 70°, 5 minutos.
- Alcohol 96, 5 minutos.
- Alcohol 96°, 5 minutos.
- Alcohol absoluto, 5 minutos.
- Alcohol absoluto, 5 minutos.
- Xilol, 10 minutos.
- Xilol, 10 minutos.

Montar las preparaciones con Entellán (Merck, Darmstadt, Alemania). Los alcoholes y el xilol utilizado de Panreac Química, España.

Para el recuento celular se visualizó la sección completa de cada muestra y se clasificaron las preparaciones como citocromo c positivas cuando, al menos, una

célula por campo de gran aumento (X40) perdía la coloración o mostraba una coloración débil o difusa comparado con las células vecinas, quienes mostraban una tinción citoplásmica granular.

5. HPLC (Cromatografía líquida de alta resolución)

Previamente a su inyección en el equipo de HPLC, se purificó 1 ml. de muestra mediante un proceso que incluye fijación a polvos de alúmina, sucesivos lavados con agua y elución. Para esta extracción preanalítica se utiliza el kit comercial p-Catecholamines (195-6078, Bio-Rad Laboratories, Watford, Reino Unido).

Se inyectaron 50 μ l de la muestra purificada en el cromatógrafo líquido HPLC 1100 series de Agilent Technologies (Santa Clara, CA, Estados Unidos). La separación se llevó a cabo en una columna analítica de fase reversa (Reversed Phase Micro Guard™ Cartridges, Bio-Rad Laboratories, Watford, Reino Unido) con un flujo isocrático de 0,55 ml/min y una Tª de 35°C. En el interior de la columna se produce la separación de adrenalina, noradrenalina, dopamina y un estándar interno.

Los compuestos se detectaron mediante un sensor electroquímico capaz de producir un potencial oxidativo +0,55V vs Ag/AgCl como electrodo de referencia, a una sensibilidad de 2nA/V y una Tª de 35°C.

La duración de la adquisición de datos por muestra es de 14 minutos. La cuantificación se basa en la comparación de la relación que existe entre altura del pico de analito/altura estándar interno en cada muestra problema frente al correspondiente ratio obtenido en el calibrador.

6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La expresión relativa de los genes estudiados se analizó estadísticamente mediante el procedimiento (Proc) MIXED incluido en el programa informático SAS/STAT v8.2 (SAS Institute, Inc., Cary, NC). Los valores de Ct (número de ciclos necesarios para generar una señal de fluorescencia por encima de un umbral predefinido) y de incremento de Ct (ΔCt , diferencia entre el Ct del gen diana y el Ct del gen de referencia) para cada gen y repetición se analizaron como variables dependientes. El método estándar relativo se utilizó para cuantificar los niveles de expresión génica.

Se ajustó un modelo que incluía como efecto fijo el tipo de muestra (dos niveles: control y donante) y la muestra como efecto aleatorio. La inclusión de la muestra como una variable aleatoria permitió tener en cuenta que las observaciones obtenidas para cada muestra en cada repetición de los análisis no eran estadísticamente independientes. Se calcularon las medias mínimas cuadráticas y sus correspondientes errores estándar para cada nivel del efecto “tipo de muestra”. Con propósitos descriptivos, y utilizando el Proc GLM de SAS/STAT, se calculó la prueba t de Student sobre las medias brutas de Ct de las muestras problema y control, asumiendo que el efecto del tipo de muestra incluía dos grupos independientes de observaciones con distribución normal. Finalmente, se calcularon los coeficientes de correlación de Pearson entre los niveles de expresión mediante el Proc CORR de SAS/STAT.

Para la determinación del gen de referencia más adecuado para el tejido cardíaco se utilizó el programa “geNorm” para Microsoft Excel desarrollado por Vandesompele y cols. (2002). Este programa utiliza un algoritmo para calcular M, una medida de la estabilidad de la expresión génica, definida como la variación entre pares de observaciones para un gen dado comparado con el resto de genes estudiados. En consecuencia, un gen con gran variación en sus niveles de expresión presentará un valor de M relativamente grande. El programa establece un orden respecto a la estabilidad de la expresión génica mediante la aplicación de técnicas de exclusión

“paso a paso”. La determinación del número de genes de referencia que debían utilizarse se realizó calculando los factores de normalización (NF_n) basados en la media geométrica de los niveles de expresión de los *n* mejores genes de referencia. Siguiendo la metodología propuesta por von Smolinski y cols. (2005), los NF_n fueron calculados mediante la inclusión secuencial de un gen menos estable. El programa muestra la variación V_n/V_{n+1} entre cada dos factores de normalización secuenciales: NF_n y NF_{n+1}. Una gran variación significa que el gen añadido tiene un efecto significativo y debería incluirse en el cálculo del factor de normalización.

Para comparar nuestros resultados con los que generaría un programa análogo, se utilizó el programa “Normfinder”. Esta herramienta utiliza una base logarítmica para identificar genes de referencia óptimos entre un grupo de candidatos. El programa ordena los genes dependiendo de los valores de estabilidad de expresión en las muestras de un diseño dado.

Resultados

EXPERIMENTO 1:

BMC MOLECULAR BIOLOGY 8: 114 (2007)

**IDENTIFYING THE MOST SUITABLE ENDOGENOUS CONTROL FOR
DETERMINING GENE EXPRESSION IN HEARTS FROM ORGAN
DONORS.**

SILVIA PÉREZ, LUIS J. ROYO, AURORA ASTUDILLO, DOLORES ESCUDERO,
FRANCISCO ÁLVAREZ, AIDA RODRÍGUEZ, ENRIQUE GÓMEZ, JESÚS
OTERO.

RESUMEN

La PCR cuantitativa es una herramienta muy útil a la hora de estudiar la expresión génica, sin embargo, la elección de unos genes de referencia adecuados para normalizar los resultados es fundamental si queremos asegurar la máxima especificidad y sensibilidad. En el presente artículo, hemos identificado el grupo ideal de genes para ser usado como referencia endógena a la hora de cuantificar la expresión génica en tejido cardíaco humano. Para ello, hemos obtenido fragmentos de ventrículo izquierdo procedentes de donantes en muerte encefálica; y, a partir del ARN extraído, estudiamos diez genes de referencia comúnmente utilizados para normalizar protocolos de PCR a tiempo real (GADPH, PPIA, ACTB, YWHAZ, RRN18S, B2M, UBC, TBP, RPLP y HPRT).

RESULTADOS MÁS DESTACABLES

De acuerdo con el programa geNorm los genes de referencia PPIA, RPLP y GADPH muestran los niveles de transcripción más estables en las muestras de tejido cardíaco utilizadas. En cambio, la expresión de TBP resultó estar altamente regulada. (S. Pérez y cols., 2007). Tabla 1.

Asimismo, el programa geNorm establece que la normalización se llevaría a cabo de la manera más adecuada utilizando todos y cada uno de los tres genes ya mencionados. (S. Pérez y cols., 2007). Figura 3.

Utilizando como herramienta el programa Normfinder, obtenemos que el grupo de genes formado por PPIA, RPLP y GADPH presenta los mejores resultados de estabilidad. Normfinder muestra el GADPH como el gen individual más estable, siendo el TBP el menos estable. (S. Pérez y cols., 2007). Figura 2.

Identifying the most suitable endogenous control for determining gene expression in hearts from organ donors

Silvia Pérez*¹, Luis J Royo², Aurora Astudillo³, Dolores Escudero^{1,4}, Francisco Álvarez⁵, Aida Rodríguez², Enrique Gómez² and Jesús Otero¹

Address: ¹Unidad de Coordinación de Trasplantes y Terapia Celular, Hospital Universitario Central de Asturias, C/Celestino Villamil s/n, 33006 Oviedo, Spain, ²Área de Genética y Reproducción Animal, SERIDA-Somió, C/Camino de los Claveles 604, 33203 Gijón, Spain, ³Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Spain, ⁴Servicio de Medicina Intensiva, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Spain and ⁵Servicio de Bioquímica Clínica, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Spain

Email: Silvia Pérez* - silvia.perez@sespa.princast.es; Luis J Royo - ljroyo@serida.org; Aurora Astudillo - astudillo@hca.es; Dolores Escudero - lolaescudero@telefonica.net; Francisco Álvarez - falvarez@arrakis.es; Aida Rodríguez - airodriguez@serida.org; Enrique Gómez - egomez@serida.org; Jesús Otero - jesus.otero@sespa.princast.es

* Corresponding author

Published: 20 December 2007

Received: 8 May 2007

BMC Molecular Biology 2007, 8:114 doi:10.1186/1471-2199-8-114

Accepted: 20 December 2007

This article is available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2199/8/114>

© 2007 Pérez et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Background: Quantitative real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) is a useful tool for assessing gene expression in different tissues, but the choice of adequate controls is critical to normalise the results, thereby avoiding differences and maximizing sensitivity and accuracy. So far, many genes have been used as a single reference gene, without having previously verified their value as controls. This practice can lead to incorrect conclusions and recent evidence indicates a need to use the geometric mean of data from several control genes. Here, we identified an appropriate set of genes to be used as an endogenous reference for quantifying gene expression in human heart tissue.

Results: Our findings indicate that out of ten commonly used reference genes (*GADPH*, *PPIA*, *ACTB*, *YWHAZ*, *RRN18S*, *B2M*, *UBC*, *TBP*, *RPLP* and *HPRT*), *PPIA*, *RPLP* and *GADPH* show the most stable gene transcription levels in left ventricle specimens obtained from organ donors, as assessed using geNorm and Normfinder software. The expression of *TBP* was found to be highly regulated.

Conclusion: We propose the use of *PPIA*, *RPLP* and *GADPH* as reference genes for the accurate normalisation of qRT-PCR performed on heart tissue. *TBP* should not be used as a control in this type of tissue.

Background

Gene expression analysis is a useful technique for determining and comparing gene expression levels in healthy and diseased tissues. One of the most commonly used tools in the area of gene expression quantification is quantitative real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR). When small amounts of nucleic acids are available, qRT-

PCR is especially suitable and provides simultaneous measurement of gene expression in many different samples. If we compare this technique with others such as in situ hybridisation, qRT-PCR offers several advantages: it is not time-consuming, only a small amount of tissue is required, it can be used in high throughput systems and no post-reaction manipulation is needed. However, the

use of qRT-PCR requires compensation for differences between samples, arising from the varying quality and quantity of the starting material, especially when starting with solid tissue, due to the method of RNA extraction and cDNA synthesis [1]. Normalisation should include endogenous control genes (reference genes), and some of the most frequently used reference genes are housekeeping genes. The ideal endogenous control should be expressed at a constant level in the different tissues of an organism at all stages of development and should be unaffected by experimental treatments. It should also be constitutively expressed in the same tissue under different circumstances. There is, however, no universal control gene that is expressed at a constant level under all conditions and in all tissues. Hence, experimental treatments [2] and hormonal stimulation [3], as well as the different methods used to process tissue specimens [4] can induce changes in the expression of typical housekeeping genes.

Consequently, the success of the technique used depends on the adequate choice of the appropriate reference genes. Despite many qRT-PCR studies having reported the use of a single endogenous control [5], a normalisation strategy based on a single housekeeping gene can lead to erroneous results [6,7]. Vandesompele *et al.* [6] propose the use of a panel of putative reference genes on a representative number of samples, to identify the most stable of these and then establish the optimal number of genes required for the reliable normalisation of RT-PCR data. In the present study, we tested ten commonly used reference genes (*GADPH*, *PPIA*, *ACTB*, *YWHAZ*, *RRN18S*, *B2M*, *UBC*, *TBP*, *RPLP* and *HPRT*) of different functional classes (significantly reducing the chance that the genes will be co-regulated) in heart tissue obtained from organ donors. Using geNorm software [6], we were able to assess gene expression stability under our experimental conditions and determine how many reference genes were needed for accurate normalisation. Then, by comparing these results with those generated by a similar programme, Normfinder [8,9], we identified a set of reference genes that offers reliable results for qRT-PCR data normalisation for use in gene expression studies involving heart tissue from brain-dead multiorgan donors.

Results

Thirty five samples of left ventricular tissue were obtained from 35 multiorgan donors. RNA was successfully isolated and cDNA synthesised from all these specimens. All the samples analysed showed a single β -actin band in the 2% agarose gel stained with ethidium bromide at the expected size (data not shown), confirming the total absence of residual DNA.

In each sample, qRT-PCR using Sybr Green was performed for ten frequently-used reference genes (*GADPH*, *PPIA*,

ACTB, *YWHAZ*, *RRN18S*, *B2M*, *UBC*, *TBP*, *RPLP* and *HPRT*). The accuracy of the qRT-PCR was assessed by melt curve analysis and gel electrophoresis. Gene-specific amplification was verified, by both a single peak in the melt curve and a single band in the agarose gel, for the 10 genes analysed in the 35 cDNA samples. Correlation coefficients (R^2) ranged from 0.995 to 0.999 and PCR efficiencies from 89.7% to 104%. Using the Proc VARCOMP in the SAS/STAT™ software [10], the reproducibility of the assay was assessed using as control material samples obtained by pooling the whole set of samples analysed in the present study. The high average correlation coefficient observed of 0.998 indicated good intra-sample reproducibility. Observed Ct values for each gene were similar across different samples indicating low variability (21.66 ± 1.39 for *GADPH*, 24.69 ± 1.22 for *PPIA*, 22.32 ± 2.03 for *ACTB*, 26.39 ± 1.36 for *YWHAZ*, 11.71 ± 1.10 for *RRN18S*, 23.87 ± 1.37 for *B2M*, 22.71 ± 1.88 for *UBC*, 30.98 ± 3.45 for *TBP*, 22.27 ± 1.42 for *RPLP* and 28.08 ± 0.94 for *HPRT*) (Figure 1).

The GeNorm software also provided a rank order of the ten candidate reference genes according to their M values (Figure 2). *PPIA*, *RPLP* and *GADPH* were the three most stable genes. M values increased moderately for all genes, while *TBP* abruptly attained the highest M value. The pairwise variation (V) upon normalisation with the two most stable genes and introduction of the third one was 0.236. This value decreased gradually until the addition of the fifth gene, when the trend became more or less stable but increased considerably upon the incorporation of the tenth gene (Figure 3).

Table 1 provides the results of the Normfinder analysis performed on our data. The reference genes tested were ordered according to their stability values. Thus, the most stable single gene was *GADPH* with a stability value of 0.345 and the least stable was *TBP* with a value of 2.287.

Discussion

Human heart tissue specimens are very difficult to acquire. However, we managed to obtain 35 samples from the left ventricles of 35 organ donors of different age, weights and sex, whose hearts could not be used for transplant purposes for various reasons (see Methods). Thus, we can assume that the number and type of samples used was sufficiently high and diverse to ensure their representativity and randomness. Reports of the use of qRT-PCR in human heart tissue are scarce because of the technical difficulties involved in obtaining such samples. However, given that qRT-PCR is especially suitable for determining gene expression in small pieces of tissue, we tried to establish guidelines for accurate data normalisation intended for human heart studies based on qRT-PCR.

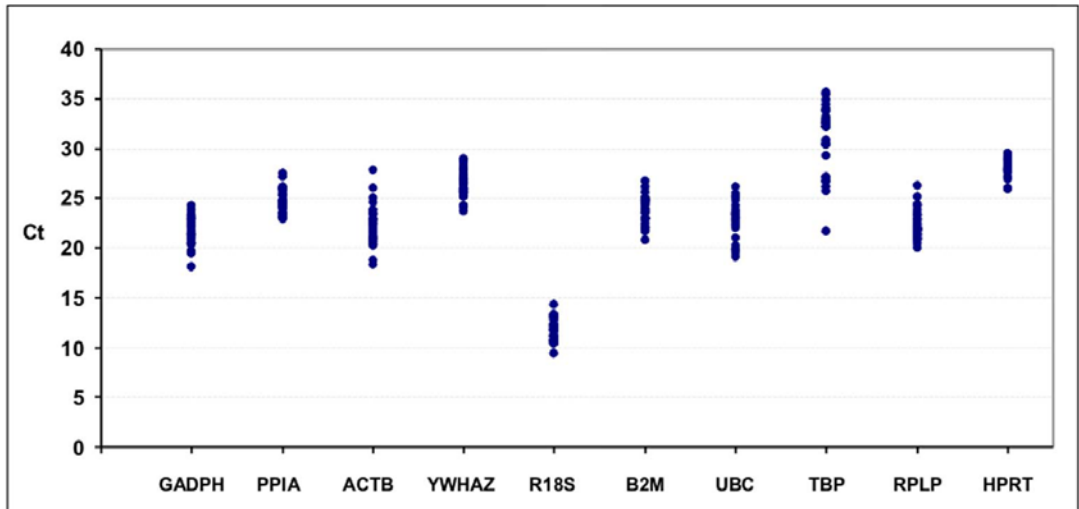


Figure 1
Expression levels of candidate housekeeping genes. Scatter plots showing the expression levels of the different reference genes in the tested heart samples (n = 35). Values are given as cycle threshold numbers (Ct values).

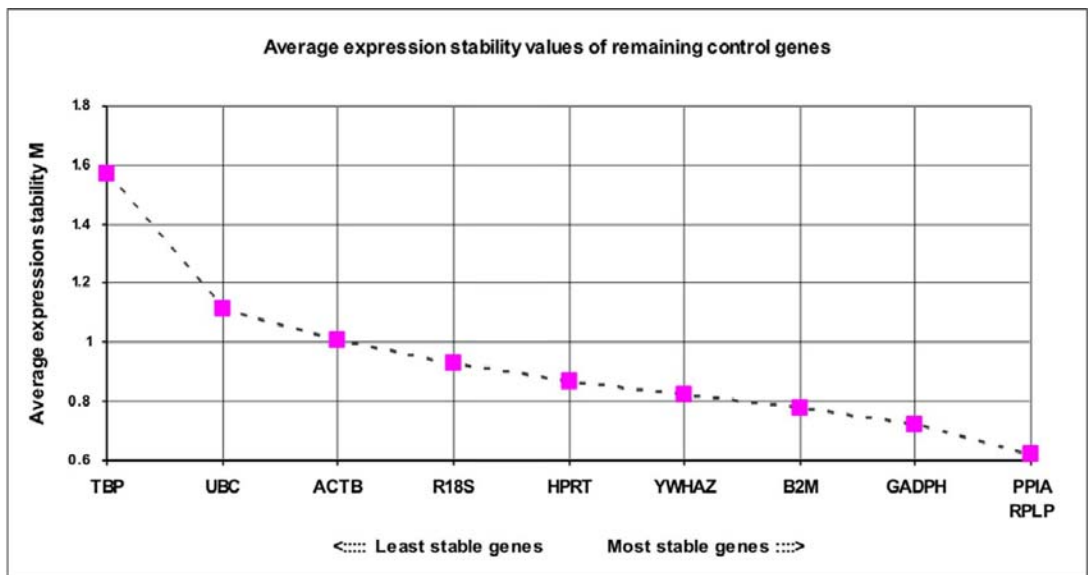


Figure 2
Average expression stability values (M) of the candidate reference genes. Average expression stability measure (M) of control genes during stepwise exclusion of least stable reference genes. M is represented from the least stable (left) to the most stable (right), analysed by the geNorm programme.

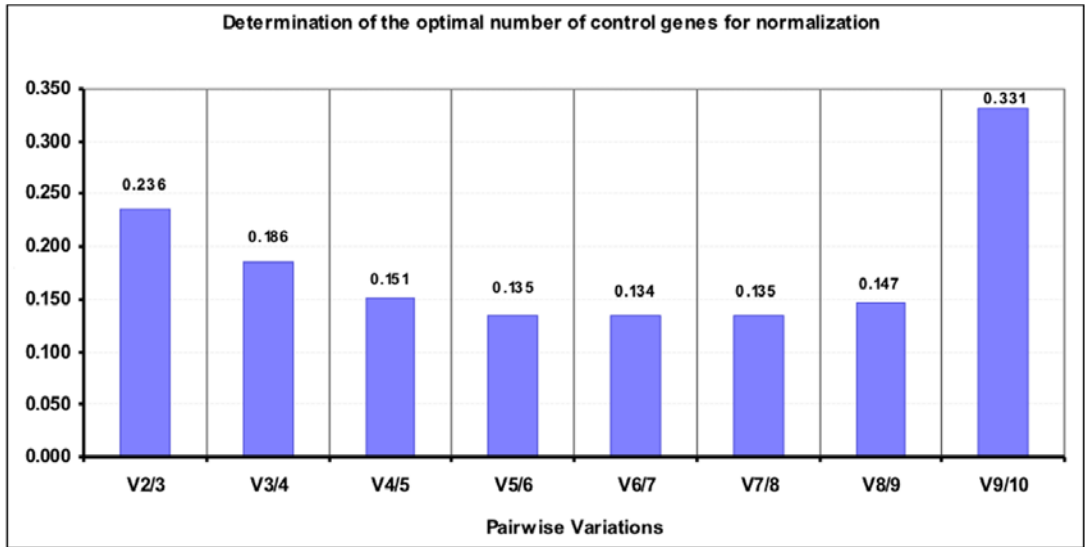


Figure 3
Pairwise variation analysis between normalisation factors to determine the optimal number of control genes for normalisation. Optimal number of control genes for normalisation calculated on the basis of pairwise variation (V) analysis. The highest V9/10 value is due to the inclusion of a relative unstable gene and is in accordance with the average expression stability (M).

Our technical procedure proved to be a valid method of quantifying gene expression, rendering high correlation coefficients (R^2) and robust PCR efficiencies.

Through geNorm analysis, *PPIA*, *RPLP* and *GADPH* appeared as the most stable genes and *TBP* the least stable (Figure 2). It has been reported that in over 90% of cases, gene expression data are normalised using *GADPH*, *ACTB*, *18S rRNA* or *28S rRNA* as single control genes [5]. However, several studies have shown that these reference genes

Table 1: Tested reference genes for normalisation of qRT-PCR listed according to their expression stability calculated by the Normfinder software.

Raking Order	Gene Name	Stability Value
1	GADPH	0.345
2	PPIA	0.405
3	RPLP	0.426
4	B2M	0.446
5	YWHAZ	0.498
6	HPRT	0.588
7	RRN18S	0.593
8	ACTB	0.737
9	UBC	0.831
10	TBP	2.287

undergo variation according to the experimental conditions, treatment and cell cycle stage [11,12].

In human adipocytes and preadipocytes, *ACTB* and *18S rRNA* gene expression levels change under hormonal stimulation [3]. Moreover, it has been reported that *ACTB* is unsuitable as a control for gene expression analysis in interstitial cells derived from sheep heart valves [13]. The *18S rRNA* gene has been considered an ideal internal control in qRT-PCR analysis. However, ribosomal RNA accounts for up to 80–90% of total cellular RNA, and several studies have shown that rRNA varies less under conditions that affect the expression of mRNAs [14] but that possible imbalances in rRNA and mRNA fractions between different samples makes genes encoding ribosomal RNAs unsuitable as references [6]. As far as we are aware, no previous study has tried to identify adequate housekeeping genes for use in human heart tissue. Morgan *et al.* [15] examined the expression of genes related to the renin-angiotensin system in human atrial tissue using *GADPH* as an endogenous control. Other authors [16] have used RNA extracted from human endomyocardial biopsies and isolated cardiomyocytes for real-time RT-PCR using *GADPH*, *HPRT* and the oncogene *ABL* as housekeeping genes. These endogenous controls showed very low variation in individual gene expression levels

across cardiac pathologies, suggesting their suitable use as reference genes for quantitative PCR studies in cardiac tissue. In these previous studies, the specific testing of several candidate reference genes to determine the most suitable reference for use in cardiac tissue was not reported [15,16]. In contrast, Radonic et al. [17] determined transcription levels of several housekeeping genes in different human tissues, including heart, and identified TBP as the gene with the lowest range of RNA transcription across tissues. This finding is in agreement with the present results.

We found *PPIA*, *RPLP* plus *GADPH* to be a reliable set of genes for normalising data (Figure 3) according to the geNorm programme. As reported by Vandesompele et al. [6], geNorm proposes a pairwise variation of 0.15 as the cut-off under which the inclusion of an additional control gene is not required. Using our set of candidate genes, this would mean that adding a fifth gene to the four most stable genes identified would really provide the best results. Notwithstanding, this cut-off of 0.15 should not be considered in a strict sense, but rather as a reference to determine the optimal number of housekeeping genes. Sometimes the observed trend can be equally informative, and using the three best reference genes is, in most cases, a valid strategy for much more accurate and reliable normalisation compared to the use of a single housekeeping gene.

Using NormFinder software [8] as another tool to validate the expression stability of the ten candidate reference genes; *GADPH*, *PPIA* and *RPLP* also achieved the best stability values. While geNorm detected the two genes whose expression ratios showed least variation from those of the other genes tested, NormFinder was able to identify the single gene with the most stable expression. Hence, the most stable candidate gene was found to be *GADPH*, and the least stable TBP. Using this programme, we obtained the same results as with GeNorm except for the rank position ascribed to *GADPH* as the most stable single gene. However, the least stable genes and most stable ones identified by GeNorm and Normfinder were generally well-matched.

As a limitation to our study, we should mention that although we established the purity of our RNA samples, due to the amount of RNA available, we could not run electrophoretic tests to check RNA integrity.

Finally, the set of reference genes determined here as the best endogenous controls to be used in qRT-PCR studies in heart tissue has applications in developing cardiovascular diagnostic tests and therapeutic strategies that will substantially improve human health [18].

Conclusion

It is commonly accepted that gene expression studies should be normalised using more than one reference gene. Based on our results, we propose the use of the mean result rendered by *PPIA*, *RPLP* and *GADPH* as housekeeping genes to normalise gene expression values obtained by qRT-PCR in heart tissue.

Methods

Sample collection

Tissue samples were obtained from the left ventricle of 35 organ donors (19 male, 16 female; mean age 59 years, range 40 – 80 years). The organ donors had died in a multidisciplinary ICU of a tertiary university hospital. In 85% of the organ donors, brain death was attributed to a non-traumatic cause and no donor had previous heart pathology. Consent for organ donation for transplant and clinical investigation was obtained from the relatives of each donor.

The hearts had been rejected for transplant because of donor age or weight, or recipient blood group incompatibility. The cardiac tissues were freshly harvested, stored immediately in O.C.T™ Compound (Tissue Tek, Sakura, Netherlands) and then frozen at -80°C.

RNA extraction and cDNA synthesis

Isolation of total RNA was performed using the Nucleo Spin RNA II Isolation Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG) according to the manufacturer's instructions.

The quality of the RNA was assessed through absorbance measurements made using a NanoDrop ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA). All the samples used in the PCR procedures showed a 260/280 nm absorbance ratio between 1.8 and 2.2. A ratio of ≈ 2 is generally accepted as pure for RNA.

Each RNA sample was reverse transcribed using the Oligo-pdT and Random primers provided in the first-strand complementary DNA (cDNA) synthesis kit for RT-PCR (AMV; Roche Diagnostic, Switzerland) following the manufacturer's instructions. The tubes were incubated at 25°C for 10 minutes to allow annealing. Reverse transcription was conducted at 42°C for 60 minutes, followed by 5 minutes incubation at 99°C to denature the enzyme. The cDNA samples were then cooled at 4°C and stored at -20°C until use.

To confirm the total absence of residual DNA, we performed a conventional PCR with *β -actin* [GenBank:E00829] primers designed using Beacon Designer software (Premier Biosoft International, California) spanning intron-exon boundaries (*β -actin* up 5'-GACTACCT-

CATGAAGATCCTC-3'; β -actin down 5'-CGGATGTCCACGTCACACITC-3'). The PCR protocol consisted of an initial denaturation step at 94°C for 5 minutes, followed by 35 amplification cycles. Each cycle involved a denaturation step of 30 seconds at 94°C, followed by 30 seconds of primer annealing at 55°C and 30 seconds of primer extension at 72°C followed by a final extension of 10 minutes. Amplicon size was confirmed by electrophoresis using an ethidium bromide-stained 2% agarose gel in 1XTBE buffer.

Gene expression

We analysed the expression of the genes *GADPH*, *PPIA*, *ACTB*, *YWHAZ*, *RRN18S*, *B2M*, *UBC*, *TBP*, *RPLP* and *HPRT* included in the Human Endogenous Control Gene Panel supplied by TATAA Biocenter (Goteborg, Sweden) (see Table 2). For this panel, the genes are carefully selected to be of different functional classes, thus significantly reducing the likelihood that they might be co-regulated. The genes selected here were also evaluated by Vandesompele *et al.* [6].

Quantitative PCR was performed using an i-Cycler iQ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). SYBR Green PCR Supermix (2X) (Bio-Rad), which detects amplification using Sybr Green as a double-stranded DNA-specific fluorescent dye, was used as a mastermix. Assays were performed in duplicate and a blank included in every assay. The reaction mixture for amplification consisted of 2 μ l of cDNA in a final reaction volume of 25 μ l, as indicated in the instructions for the Human Endogenous Control Gene Panel. The RT-PCR protocol included an initial step of 95°C (3 minutes), followed by 40 cycles of 30 seconds at 95°C for DNA denaturation, 20 seconds for primer annealing at 60°C and 20 seconds at 72°C for primer extension. Fluorescence data were acquired at 72°C. Melting-curve analysis to confirm product specificity was performed immediately after amplification, following 1 minute denaturation at 95°C, 1 minute annealing at 65°C and 60 cycles of 0.5°C increments (10 seconds each) beginning at 65°C while monitoring fluorescence. Product identity was confirmed by

electrophoresis using an ethidium bromide-stained 2% agarose gel in 1XTBE buffer.

PCR efficiencies were calculated from a relative standard curve derived from a pool of heart tissue specimens from the same organ donors and serially diluted (a ten-fold dilution series with at least six measuring points).

Reference gene expression stability

To determine the most stable housekeeping genes of the set of tested genes in our heart cDNA sample panel, we used firstable, the geNorm software package for Microsoft Excel® developed by Vandesompele *et al.* [6]. The programme geNorm uses an algorithm to calculate M, a gene expression stability measure, defined as the mean pairwise variation for a given gene compared to the remaining tested control genes. Thus, the higher the M value of a gene, the greater the variation in its expression levels. The programme establishes a rank order of gene stability via stepwise exclusion. To determine how many reference genes should be used, normalisation factors (NF_n) based on the geometric mean of the expression levels of the n best reference genes were calculated by stepwise inclusion of an extra, less stable reference gene as described elsewhere [4]. The programme shows the pairwise variation V_n/V_{n+1} between two sequential normalisation factors, NF_n and NF_{n+1}. A large variation means that the added gene has a significant effect and should probably be included for calculation of the normalisation factor.

To compare our results with those generated by a similar programme, we used Normfinder [9], another algorithm-based tool for identifying optimal reference genes among a set of candidates. The programme ranks the genes depending on their expression stability value in given samples derived from an experimental design.

Authors' contributions

The first author of the manuscript SP performed the experimental procedures. IJR, AR and EG provided support for the qRT-PCR and discussion. AA and FA harvested the heart tissue. DE was the main person responsible for obtaining tissue samples from organ donors. The project

Table 2: Abbreviations and functions of the genes mentioned in the text

GADPH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Glycolytic enzyme
PPIA	Peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)	Immunity protein
ACTB	Actin beta	Cytoskeletal structural protein
YWHAZ	Tyrosine 3/tryptophan 5-monoxygenase activation protein, zeta polypeptide	Protein signal transduction
RRN18S	18S rRNA	Ribosomal RNA
B2M	Beta-2-microglobulin	Beta-chain of major histocompatibility complex class I molecules
UBC	Ubiquitin C	Protein degradation
TBP	TATAA box binding protein	General RNA polymerase II transcription factor
RPLP	60S Acidic ribosomal protein P0	Member of the ribosome proteins
HPRT	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase	Purine synthesis

was designed by JO. All the authors have read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This research was supported by grant IB05-135 from the Ficyt. We also thank to the Spanish Ministry of Science and Education (project NO AGL-2005-04479).

References

- Ginzinger DG: **Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream.** *Exp Hematol* 2002, **30(6)**:503-512.
- Schmittgen TD, Zakrajsek BA: **Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR.** *J Biochem Biophys Methods* 2000, **46(1-2)**:69-81.
- Gorzelnik K, Janke J, Engeli S, Sharma AM: **Validation of endogenous controls for gene expression studies in human adipocytes and preadipocytes.** *Horm Metab Res* 2001, **33(10)**:625-627.
- von Smolinski D, Leverkoehne I, von Samson-Himmelstjerna G, Gruber AD: **Impact of formalin-fixation and paraffin-embedding on the ratio between mRNA copy numbers of differently expressed genes.** *Histochem Cell Biol* 2005, **124(2)**:177-188.
- Suzuki T, Higgins PJ, Crawford DR: **Control selection for RNA quantitation.** *Biotechniques* 2000, **29**:332-337.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F: **Accurate normalization of Real-Time quantitative RT-PCR by geometric averaging of multiple internal control genes.** *Genome Biol* 2002, **3(7)**:34.
- Tricarico C, Pinzani P, Bianchi S, Paglierani M, Distanto V, Pazzagli M, Bustin SA, Orlando C: **Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction: normalization to rRNA or single housekeeping genes is inappropriate for human tissue biopsies.** *Anal Biochem* 2002, **309**:293-300.
- Andersen CL, Jensen JL, Orntoft TF: **Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets.** *Cancer Res* 2004, **64(15)**:5245-5250.
- NormFinder Software** [<http://www.mdl.dk/publication/snornfinder.htm>]
- SAS/STAT™, 1999. User's Guide. Release 8.2. SAS Institute Inc, 703 Cary NC. 704.**
- Theillin O, Zorzi W, Lakaye B, De BB, Coumans B, Hennen G, Grisar T, Igout A, Heinen E: **Housekeeping genes as internal standards: use and limits.** *J Biotechnol* 1999, **75**:291-295.
- Glare EM, Divjak M, Bailey MJ, Walters EH: **Beta-Actin and GADPH housekeeping gene expression in asthmatic airways is variable and not suitable for normalising mRNA levels.** *Thorax* 2002, **57**:765-770.
- Yperman J, De Visscher G, Holvoet P, Flameng W: **Beta-actin cannot be used as a control for gene expression in ovine interstitial cells derived from heart valves.** *J Heart Valve Dis* 2004, **13(5)**:848-853.
- Bustin SA, Nolan T: **Pitfalls of quantitative real-time reverse transcription Polymerase Chain Reaction.** *J Biomol Tech* 2004, **15**:155-166.
- Morgan K, Wharton J, Webb JC, Keogh BE, Smith PL, Taylor KM, Oakley CM, Polak JM, Cleland JG: **Co-expression of renin-angiotensin system component genes in human atrial tissue.** *J Hypertens Suppl* 1994, **12(4)**:S11-19.
- Moniotte S, Vaerman J-L, Kockx MM, Larrouy D, Langin D, Noirhomme P, Balligand J-L: **Real-Time RT-PCR for the detection of beta-adrenoceptor messenger RNAs in small human endomyocardial biopsies.** *J Mol Cell Cardiol* 2001, **33**:2121-2133.
- Radonic A, Thulke S, Mackay IM, Landt O, Siegert W, Nitsche A: **Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR.** *Biochem Biophys Res Commun* 2004, **313**:856-862.
- Seo D, Ginsburg GS, Goldschmidt-Clermont PJ: **Gene expression analysis of cardiovascular diseases: novel insights into biology and clinical applications.** *J Am Coll Cardiol* 2006, **48(2)**:227-235.

Publish with **BioMed Central** and every scientist can read your work free of charge

"BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime."

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:
http://www.biomedcentral.com/info/publishing_adv.asp



EXPERIMENTO 2:

TRANSPLANTATION 86(7): 977-982 (2008)

A MOLECULAR APPROACH TO APOPTOSIS IN THE HUMAN HEART DURING BRAIN DEATH.

SILVIA PÉREZ LÓPEZ, NATALIA VÁZQUEZ MORENO, DOLORES ESCUDERO AUGUSTO, AURORA ASTUDILLO GONZÁLEZ, FRANCISCO ÁLVAREZ MENÉNDEZ, FÉLIX GOYACHE GOÑI, JESÚS OTERO HERNÁNDEZ.

RESUMEN

La muerte encefálica provoca cambios histológicos, moleculares y endocrinos en los tejidos y órganos destinados al trasplante. En el presente artículo, se estudia la posible relación entre la muerte encefálica y el fenómeno apoptótico en tejido cardíaco humano desde un punto de vista molecular, evaluando niveles de expresión de genes relacionados con este tipo de muerte celular. Para ello y tras procesar muestras de ventrículo izquierdo obtenido a partir de donantes en muerte encefálica, se utiliza el ARN extraído para estudiar los siguientes genes: BAX, BCL2, CASPASA 3, CITOCROMO C y FAS.

RESULTADOS MÁS DESTACABLES

Tras utilizar el método de la cuantificación relativa y normalizar nuestros resultados con PPIA se encontró que existen diferencias significativas ($p < 0,0001$) entre el grupo de donantes y el de los pacientes control, en la expresión relativa de tres genes relacionados con el proceso apoptótico: FAS, CASPASA 3 y BAX. (S. Pérez y cols., 2008). Figura 1.

Dichos genes presentaban, respectivamente, incrementos de 12,14; 7,85 y 4,89 veces respecto a los niveles basales del control endógeno. Mientras que el resto de genes estudiados también presentaban incrementos, aunque no significativos, en los

Resultados

niveles de expresión, indicando la activación de la apoptosis durante la muerte encefálica (S. Pérez y cols., 2008). Figura 1.

Los coeficientes de correlación entre los niveles de expresión de los seis genes fueron significativos para todos ellos con $p < 0,0001$. (S. Pérez y cols., 2008). Tabla 4.

A Molecular Approach to Apoptosis in the Human Heart During Brain Death

Silvia Pérez López,^{1,6} Natalia Vázquez Moreno,¹ Dolores Escudero Augusto,^{1,2} Aurora Astudillo González,³ Francisco Álvarez Menéndez,⁴ Félix Goyache Goñi,⁵ and Jesús Otero Hernández^{1,2}

Background. Brain death induces changes in tissues and organs destined for transplant at the cell, molecular, and endocrine level including cell death through apoptosis. This study was designed to examine apoptotic damage in cardiac tissue obtained from brain dead donors.

Methods. Fifty tissue specimens from the left ventricles of individual donors were processed to evaluate changes in the expression levels of five genes involved in apoptosis (*BAX*, *BCL2*, *CASPASE 3*, *CYTOCHROME C*, and *FAS*) using the real time-polymerase chain reaction technique. Expression levels were quantified by the relative standard method and results normalized to the levels recorded for the endogenous control peptidylprolyl isomerase A. The *HIF1 α* gene was also determined to check for the possibility of hypoxic damage. Control ventricular tissue specimens were obtained from patients undergoing mitral valve replacement.

Results. Using a mixed linear model it was determined that the sample type (donor vs. control patient) significantly affected ($P < 0.0001$) expression levels of the genes examined reflected by their C_t values. Three of the genes (*BAX*, *CASPASE 3*, and *FAS*) showed significantly higher (Student's *t* test, $P < 0.05$) expression levels (4.89-, 7.85-, and 12.14-fold endogenous control values, respectively) in donors compared with control patients (2.31-, 2.64-, and 3.57-fold endogenous control values, respectively) indicating the activation of apoptosis during brain death.

Conclusion. Our findings suggest the possibility of using antiapoptosis agents to prevent cardiac injury and improve posttransplant behavior.

Keywords: Brain death, Apoptosis genes, Heart transplant, RT-PCR, Organ donor.

(*Transplantation* 2008;86: 977–982)

Brain dead (BD) patients are the main source of organs for transplant. However, in approximately 10%–30% of BD donors, severe myocardial ventricular dysfunction prevents the use of hearts for transplant (1), 19% of which are rejected because of contractility failure (2). The reason for this situation is related to the hemodynamic and neuroendocrine alterations that appear during cerebral herniation (3). Since initial studies performed in experimental models (4, 5), it has been reported that brain death leads to changes that compromise cardiac function. Recently, BD has also been reported to induce apoptosis in animals including the rat (6, 7) and rabbit (8) and in several human tissues such as kidney (9–11) and heart (12). Cardiac apoptosis reduces the contractile mass

available, which has been linked to heart failure (13). Apoptosis is a cell function necessary for the removal of unwanted cells during normal development or aging. The mechanism is controlled through two major pathways, an extrinsic and intrinsic pathway (14), regulated by aspartate-specific cysteine proteases designated caspases (15). Activation of the extrinsic pathway makes surface cell death receptors such as Fas bind to their specific ligands (e.g., FasL). The intrinsic pathway is activated by various intracellular stimuli such as anoxia or DNA damage, all of which affect mitochondria, where they promote mitochondrial membrane permeabilization and release of caspase activating factors like cytochrome *c* into the cytosol (16, 17). Members of the Bcl-2 family (proapoptotic Bax and antiapoptotic Bcl-2) control activation of the intrinsic path-

This research was supported by grant IB05-135 from the FICYT.

Silvia Pérez López performed the RT-PCR experiments and wrote the manuscript. Natalia Vázquez Moreno provided technical assistance. Dolores Escudero Augusto was the main person responsible for obtaining tissue samples from organ donors. Aurora Astudillo González and Francisco Álvarez Menéndez harvested the heart tissue. Félix Goyache Goñi provided statistical analysis assistance and Jesús Otero Hernández designed the project.

The authors have no conflict of interest to declare.

¹ Unidad de Coordinación de Trasplantes y Terapia Celular, Hospital Universitario Central de Asturias, C/Celestino Villamil s/n, Oviedo, Spain.

² Servicio de Medicina Intensiva, Hospital Universitario Central de Asturias, C/Celestino Villamil s/n, Oviedo, Spain.

³ Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Universitario Central de Asturias, C/Celestino Villamil s/n, Oviedo, Spain.

⁴ Servicio de Bioquímica Clínica, Hospital Universitario Central de Asturias, C/Celestino Villamil s/n, Oviedo, Spain.

⁵ Área de Genética y Reproducción Animal, SERIDA-Somío, C/Camino de los Claveles, Gijón, Spain.

⁶ Address correspondence to: Silvia Pérez López, Laboratorio de Trasplante y Terapia Celular, Hospital Universitario Central de Asturias, Edificio Polivalente A, 1^o planta, C/Celestino Villamil s/n, 33006 Oviedo, Spain.

E-mail: silvia.perez@sespa.princast.es

Received 2 April 2008. Revision requested 30 April 2008.

Accepted 12 June 2008.

Copyright © 2008 by Lippincott Williams & Wilkins

ISSN 0041-1337/08/8607-977

DOI: 10.1097/TP.0b013e318186d6d6

way and play an important role in cardiomyocyte apoptosis in rats (18). Briefly, for each stimulus, the balance between death and survival seems to be determined by the ratio of apoptosis-stimulating to apoptosis-suppressing Bcl-2 family members (19, 20). Activation of both apoptotic pathways (extrinsic and intrinsic) culminates in the activation of effector caspases (caspase-3, -6, and -7). Effector caspases have many substrates, whose cleavage mediates chromatin condensation and DNA fragmentation as well as the cell morphology changes characteristic of apoptosis (21). Activation of the terminal stage of the apoptotic pathway has also been suggested to play an important role (8, 22) in the myocardial dysfunction that appears in grafted hearts from brain-dead donors (23, 24). Given that the process of apoptosis can be pharmacologically manipulated, the noninvasive identification of apoptosis is critical (25). Because apoptosis is a controlled process with different targets for therapeutic intervention (26), antiapoptotic treatments could serve to prevent cardiac injury and avoid posttransplant complications. However, little is known about the molecular mechanisms that give rise to cardiac apoptotic alterations induced by BD in humans (9, 22). The aim of this study performed on cardiac tissue from brain-dead donors was to examine through real-time-polymerase chain reaction (RT-PCR) the expression of several genes involved in the apoptotic cascade (*BAX*, *BCL2*, *CASPASE 3*, *CYTOCHROME C*, and *FAS*) to determine whether it is activated during BD. To exclude the possibility that our results could be attributable to hypoxia, *HIF1 α* gene expression was also determined.

MATERIALS AND METHODS

Sample Collection

Tissue samples were obtained from the left ventricles of 50 heart beating donors (28 men, 22 women; mean age, 61 years; range, 30–80 years). Control samples were heart tissue specimens obtained from the left ventricles of 12 patients (6 men, 6 women; mean age, 65 years; range, 49–83 years) undergoing mitral valve replacement for double mitral lesion. In these patients, left ventricular end-diastolic pressures were moderately elevated over normal levels $\approx 8 \pm 2.2$ mm Hg. Samples were obtained over a year, from April 2006 to May 2007. The heart-beating donors had died in a multidisciplinary intensive care unit of a tertiary university hospital. Brain death was attributed to several causes (28 deaths to subarachnoid or intracerebral hemorrhage, 3 to cerebrovascular anoxia, 16 to traumatic brain injury, and 3 to anoxic brain injury). Mean intensive care unit stay before donation was 93 hr (range, 7–624 hr). No donor had previous heart pathology. Consent for organ donation for transplant and clinical research was obtained from the relatives of each donor and control patient.

The donor hearts had been rejected for transplant because of donor age or weight, or recipient blood group incompatibility. The hearts from the 30- to 40-year-old donors that were incompatible with recipients on the Spanish waiting list, had not been accepted as competitive donors elsewhere in Europe. Left ventricular specimens were obtained by the Cavalieri principle of sectioning. After delivering cardioplegia, all cardiac tissues (from donors and controls) were freshly

harvested, immediately embedded in O.C.T Compound (Tissue Tek, Sakura, Netherlands) and then stored at -80°C .

RNA Extraction and cDNA Synthesis

Total RNA was isolated using the Nucleo Spin RNA II Isolation Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG) according to the manufacturer's instructions.

The quality of the RNA was assessed through absorbance measurements made using a NanoDrop ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE). All the samples used in the PCR procedures showed a 260/280 nm absorbance ratio between 1.8 and 2.2. A ratio of approximately 2 is generally accepted as pure for RNA.

Each RNA sample was reverse transcribed using the oligo-pdT and random primers provided in the first-strand complementary DNA (cDNA) synthesis kit for RT-PCR (AMV; Roche Diagnostic, Switzerland) following the manufacturer's instructions. The cDNA samples were then cooled at 4°C and stored at -20°C until use. To confirm the total absence of residual RNA, we performed a conventional PCR on β -actin (GenBank: E00829) (β -actin forward primer 5'-ACTACCTCATGAAGATCCTC-3'; β -actin reverse primer 5'-CGGATGTCCACGTCACACTTC-3'). The PCR protocol consisted of an initial denaturation step at 94°C for 5 min, followed by 35 amplification cycles. Each cycle involved a denaturation step of 30 sec at 94°C , followed by 30 sec of primer annealing at 55°C and 30 sec of primer extension at 72°C , followed by a final extension of 10 min. Amplicon size was confirmed by electrophoresis using an ethidium bromide-stained 2% agarose gel in $1 \times$ TBE buffer.

Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction

The primers for the genes examined were designed using Beacon Designer software (Premier Biosoft International, CA). Table 1 provides the primer sequences and annealing temperatures used.

Quantitative PCR was performed using an i-Cycler iQ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA). SYBR Green PCR Supermix ($2 \times$) (Bio-Rad), which detects amplification using Sybr Green as a double-stranded DNA-specific fluorescent dye, was used as a mastermix. Assays were performed in duplicate and a blank included in every assay. The reaction mixture for amplification comprised $2 \mu\text{L}$ of cDNA, $0.4 \mu\text{L}$ of each primer (forward and reverse primers; final concentration $0.1 \mu\text{M}$), $10 \mu\text{L}$ of Sybr Green mix, and sterile water in a final volume of $20 \mu\text{L}$. The RT-PCR protocol included an initial step of 95°C (3 min), followed by 40 cycles of 30 sec at 95°C for DNA denaturation, 40 sec for primer annealing at different temperatures depending on the gene (Table 1), and 40 sec at 72°C for primer extension. Fluorescence data were acquired at 72°C . Melting-curve analysis to confirm product specificity was performed immediately after amplification following 1 min of denaturation at 95°C , 1 min annealing at 65°C , and 60 cycles of 0.5°C increments (10 sec each) beginning at 65°C while monitoring fluorescence. Product identity was confirmed by electrophoresis using an ethidium bromide-stained 2% agarose gel in $1 \times$ TBE buffer.

Polymerase chain reaction efficiencies were calculated from a relative standard curve derived from a pool of heart tissue specimens from the same organ donors that was serially

TABLE 1. Genbank accession numbers, annealing temperatures, and primer sequences for the human genes tested by RT-PCR

Gene	Genbank acc. no.	Annealing temperature (°C)	Sequence
<i>BAX</i>	NM138761	60	Forward: 5' GAT-GCG-TCC-ACC-AAG-AAG-C Reverse: 5' CCA-GTT-GAA-GTT-GCC-GTC-AG
<i>BCL2</i>	NM004049	57	Forward: 5' GAT-GCG-TCC-ACC-AAG-AAG-C Reverse: 5' CCA-GTT-GAA-GTT-GCC-GTC-AG
<i>CASPASE 3</i>	NM032991	57	Forward: 5' CTG-GAC-TGT-GGC-ATT-GAG-AC Reverse: 5' ACA-AAG-CGA-CTG-GAT-GAA-CC
<i>CYT C</i>	NM018947	60	Forward: 5' TGG-GTG-ATG-TTG-AGA-AAG-G Reverse: 5' CGG-CTG-TGT-AAG-AGT-ATC-C
<i>FAS</i>	NM000043	57	Forward: 5' CGT-CTG-TTG-CTA-GAT-TAT-CG Reverse: 5' TTG-TCT-GTG-TAC-TCC-TTC-C
<i>HIF1α</i>	NM001530	58	Forward: 5' GAA-GAC-ACA-GAA-GCA-AAG-AAC-C Reverse: 5' GTG-GTA-GTG-GTG-GCA-TTA-GC

Table provides the accession numbers for the six genes examined: the antiapoptotic and apoptotic genes *BAX*, *BCL2*, *CASPASE 3*, *CYTOCHROME C*, and *FAS* and the gene *HIF1 α* as an indicator of hypoxic damage. All primer sequences were designed using Beacon Designer software. *CYT C*, Cytochrome C; RT-PCR, real-time polymerase chain reaction.

diluted (a 10-fold dilution series with at least six measuring points). Peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A) was used as the endogenous control (Human Endogenous Control Gene Panel, TATAA Biocenter, Goteborg, Sweden) according to the manufacturer's instructions.

Statistical Analysis

Data were statistically analyzed using the Proc MIXED procedure of the SAS/STAT v8.2 software package (SAS Institute, Inc., Cary, NC). C_t values (number of cycles needed to generate a fluorescent signal above a predefined threshold) and ΔC_t values (difference between the C_t of the target gene and that of the housekeeping gene) for each gene and repetition were used as dependent variables. The relative standard method was used to quantify gene expression levels.

The model fitted included the type of sample (two levels: control vs. donor) as the fixed effect, and the sample as a random effect to account for the nonindependency of repetitions. Least-square means and their corresponding standard errors were computed for each sample level. For descriptive purposes, a Student's t test was also carried out on raw C_t means computed for control and donor samples using Proc GLM of SAS/STAT, assuming that the sample type effect included two independent groups of normally distributed observations. Correlation coefficients between levels of expression were computed using the Proc CORR implemented in SAS/STAT.

RESULTS

Product identity was confirmed by electrophoresis on ethidium bromide-stained 2% agarose gels in $1 \times$ TBE buffer, which resulted in a single product of the desired length. In addition an i-Cycler iQ melting curve analysis was performed, which rendered single product specific melting temperatures. No primer-dimers were generated during the 40 real-time PCR cycles conducted (see Table 2).

Polymerase chain reaction efficiencies were 91.7% for *BAX*, 101.5% for *BCL2*, 94.3% for *CASPASE 3*, 101.1%

TABLE 2. Amplicon size and melting temperatures of the six genes analyzed by RT-PCR

Genes	Amplicon size (bp)	Melting temperature (°C)
<i>BAX</i>	165	86
<i>BCL2</i>	165	86.5
<i>CASPASE3</i>	159	83
<i>CYT C</i>	153	84.5
<i>FAS</i>	244	85
<i>HIF1α</i>	230	82.5

Product identity was confirmed by electrophoresis, which resulted in a single product of the desired length. Melting curve analysis was also performed, rendering in each case a single product-specific melting temperature.

CYT C, Cytochrome C; RT-PCR, real-time polymerase chain reaction; bp, base pair.

for *CYTOCHROME C*, 94.7% for *FAS*, and 103.2% for *HIF1 α* . Linearity was high, with correlation coefficients (R^2) above 0.989.

To confirm the accuracy and reproducibility of real-time PCR, intra-assay precision was determined in two replicates within a single i-Cycler iQ run. Interassay variation was determined in two experimental runs performed on different days. The reproducibility of the data ranged from 95% for *FAS* to 98.8% for *CASPASE 3* and *CYTOCHROME C*.

Gene Expression

The mixed linear model indicated a significant influence of the type of sample (donor vs. control) on C_t values at P less than 0.0001. The Student's t test computed on raw means also revealed that differences between the type of sample were significant at the level P less than 0.05 for all the genes examined. Least-square C_t means and their corresponding standard errors for each gene according to the sample type (control or donor) are given in Table 3.

To quantify gene expression, the relative standard method (relative fold changes) was used and expression levels

TABLE 3. C_t (threshold cycle) values for the two study groups (brain-dead donors vs. control patients) represented as Lsmean and SEM

Gene	Sample	Lsmean	SEM
BAX	Control	35.1367	0.5584
	Donor	31.6283	0.2681
BCL2	Control	34.6723	0.5972
	Donor	31.5346	0.2745
CASPASE 3	Control	33.445	0.6682
	Donor	29.4894	0.3073
CYT C	Control	25.8755	0.5179
	Donor	23.1565	0.2382
FAS	Control	34.3758	0.9349
	Donor	30.1238	0.3946
HIF1 α	Control	33.6809	0.5918
	Donor	31.0102	0.2776

Significant differences between the donor (n=50) and control (n=12) specimens ($P < 0.05$) were recorded for all the genes examined (Student's *t* test).

CYT C, Cytochrome C; SEM, standard error of mean; Lsmean, least-square C_t means.

determined for the donor and control groups normalized to the level for peptidylprolyl isomerase A (PPIA). A marked increase was noted in the relative expression of three of the genes in the donor compared with control heart tissue specimens. These increases are plotted in Figure 1. In the heart-beating donor group, the genes FAS, CASPASE 3, and BAX were up-regulated 12.14-, 7.85-, and 4.89-fold, respectively, with respect to the basal levels recorded for the endogenous control (PPIA). For the same three genes increases in control group specimens were 3.57-, 2.64-, and 2.31-fold, respectively, over basal levels. Differences in expression level in-

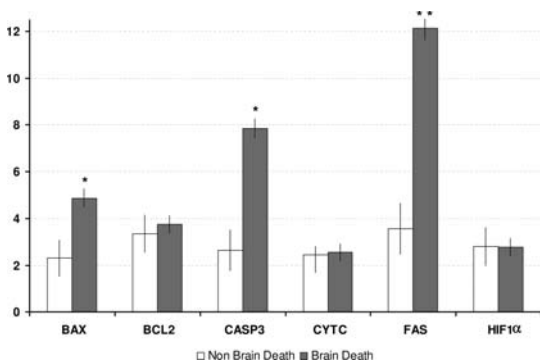


FIGURE 1. Relative quantification of the studied genes. mRNA levels for apoptosis-related genes recorded in the heart tissue of brain-dead (BD) donors (n=50) and control patients (n=12) relative to levels for the endogenous control gene peptidylprolyl isomerase A. Values are expressed as mean \pm SEM. * indicates a significant difference compared with controls at P less than 0.05. ** indicates a significant difference between the two groups at P less than 0.01. CYT C, cytochrome C; Casp3, Caspase 3.

creases were significant between the donor and control groups.

The remaining genes showed less pronounced increases in expression levels. In descending order, these increments were 3.76-fold for the BCL2 gene, 2.78-fold for HIF1 α , and 2.56-fold for CYTOCHROME C compared with basal levels. Increases for the control group were 3.36-, 2.80-, and 2.45-fold, respectively. This time, differences between the control and donor groups were not significant.

Correlation coefficients among expression levels of the six genes in all the samples examined are provided in Table 4. All the computed correlation coefficients were significant at a $P < 0.0001$ and ranged from moderate (0.395 for HIF1 α -FAS) to high (0.852 for BAX-CYTC).

DISCUSSION

Current estimates of the proportion of hearts rejected for transplant because of ventricular dysfunction range from 10% (27) to 30% (1). Of these, 19% have contractility problems (1) and are therefore not suitable for transplant purposes. Several authors have recently observed an active apoptotic process during BD (9, 10). The time taken from the initiation of the apoptotic process to phagocytosis of the dying cell is unknown, but estimates range from hours to days (28), a time interval that basically coincides with the death of brain-dead donors. Cardiac myocyte apoptosis occurs in several human heart diseases such as congestive heart failure (29, 30) or arrhythmogenic ventricular dysplasia (31) or myocarditis (32). If the apoptotic process is really activated during BD, this could lead to a substantial loss of contractile mass possibly accounting for the percentage of donor hearts with compromised contractility. In this study, we used a molecular approach to assess how the BD phenomenon affects human cardiac tissue in the damage sustained through apoptosis by detecting differences in the levels of expression of six different genes (BAX, BCL2, CASPASE 3, CYTOCHROME C, FAS, and HIF1 α) using the PPIA gene to normalize the data (33) in a relative RT-PCR quantification procedure.

To establish whether apoptosis is indeed in an active mechanism in heart tissue during brain death, we examined several genes involved in the intrinsic and extrinsic apoptotic pathway. CASPASE 3 represents the final common pathway of the apoptotic cascade (34) and has been identified in neonatal (35) and adult rat cardiomyocytes (36). In our cardiac

TABLE 4. Intergene correlation analysis of q-PCR expression levels

	BAX	CYTC	HIF1 α	BCL2	FAS
CYTC	0.85273				
HIF1 α	0.74487	0.75717			
BCL2	0.66986	0.6507	0.68568		
FAS	0.49237	0.41556	0.39509	0.60124	
Casp3	0.65702	0.56326	0.6016	0.73148	0.58561

All the computed correlation coefficients (R^2) for the six genes were significant at P less than 0.0001. All pair-wise correlation coefficients were calculated on qPCR expression levels remaining after normalization with values obtained for the endogenous control PPIA (cyclophilin A).

CYT C, Cytochrome C; Casp3, Caspase 3; PPIA, peptidylprolyl isomerase A.

specimens from brain-dead donors, *CASPASE 3* expression levels were 7.85-fold higher than basal levels and, remarkably, this increase differed significantly ($P < 0.05$) from that recorded for the control cardiac specimens. We also examined expression levels of the *FAS* gene. *FAS* is a cell death receptor that belongs to the TNFR gene superfamily (37) with a role in activation of the extrinsic pathway. Our results indicate elevated expression levels of this gene by as much as 12.14-fold basal levels in heart tissue from heart beating donors, this increase being significantly greater than that detected in controls ($P < 0.01$). Further apoptotic molecules determined here were *BCL2* and *BAX* (members of the apoptosis-stimulating and suppressing Bcl-2 family). These molecules underwent 3.76- and 4.89-fold increases, respectively, over basal levels such that the ratio of *BAX* (proapoptotic)-to-*BCL2* (antiapoptotic) expression was clearly in favor of the apoptotic molecule. These two molecules have been described to indicate the balance between cell death and survival (38). Finally, to complete our molecular approach to apoptosis we analyzed expression of the *CYTOCHROME C* gene. The release of this molecule and other mitochondrial proapoptotic factors into the cytosol (39) is induced by proapoptotic family members such as *BAX* as part of the intrinsic pathway. We observed no significant difference in the expression of this gene between the two groups of cardiac specimens. Because hypoxia can stimulate components of cell death receptor and mitochondrial pathways (40) and cardiac myocyte apoptosis has been induced by hypoxia in rats (41), we also examined the gene (*HIF1 α*) to rule out the possibility that our results could be caused by hypoxia. Hypoxia-inducible factor 1 (*HIF1 α*) is a heterodimeric transcription factor consisting of an oxygen-regulated α subunit and a constitutively expressed β subunit. *HIF1 α* protein has been detected in distinct cell types in vivo and its expression is increased in response to hypoxia (42). We observed low-*HIF1 α* expression levels in control and donor specimens such that we can preclude any major hypoxic damage to the heart tissue immediately after harvesting and, surprisingly, neither did there seem to be a marked difference in the hypoxia suffered by the two sources of heart tissue. Our results are in agreement with a report (43) that hypoxia seems not to be one of the starting points for the inflammatory cascade in brain-dead donor kidneys. In a molecular study performed on the liver of heart beating rats (6), apoptotic genes such as *FAS*, *BAX*, or *CASPASE 3* increased their expression levels versus controls as a consequence of BD. Our data indicate a marked increase in the expression of three of the genes examined (*BAX*, *CASPASE 3*, and *FAS*) compared with controls. If we consider that each of these genes play a different role in the apoptotic process (*BAX* participates in the intrinsic pathway, *FAS* in the extrinsic pathway, and *CASPASE 3* is an effector caspase), we could say that our results suggest that although both apoptotic pathways were active, the intrinsic pathway was activated to a much lesser extent than the extrinsic. Given that one of the main stimuli that activates the intrinsic pathway is anoxia, the lack of substantial increases in the expression levels of the gene related to hypoxia (*HIF1 α*) and those involved in the intrinsic pathway (*BAX* or *CYTOCHROME C*) are consistent with our findings. In conclusion, our results suggest that the apoptotic process is initiated during brain death in cardiac tissue from heart beating donors. If these results are con-

firmed, they suggest the possible use of antiapoptotic treatments to prevent organ damage before transplantation.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr. Valle Castro for his help in obtaining the control tissue specimens and Benjamin Otero and Pilar Alonso for help with the donor tissue specimens.

REFERENCES

1. Chamorro C, Romera MA, Silva JA, et al. Can heart donation exclusion factors be overcome? *Rev Esp Cardiol* 2006; 59: 232.
2. Gallardo A, Anguita M, Franco M, et al. The echocardiographic findings in patients with brain death, the implications for their selection as heart transplant donors. *Rev Esp Cardiol* 1994; 47: 604.
3. Owen VJ, Burton PBJ, Michel MC, et al. Myocardial dysfunction in donor hearts. A possible etiology. *Circulation* 1999; 99: 2565.
4. Cooper DK, Novitzky D, Wicomb WN. The pathophysiological effects of brain death on potential donor organs, with particular reference to the heart. *Ann R Coll Surg Engl* 1989; 71: 261.
5. Novitzky D, Horak A, Cooper DK, et al. Electrocardiographic and histopathologic changes developing during experimental brain death in the baboon. *Transplant Proc* 1989; 21(1 Pt 3): 2567.
6. Van Der Hoeven JA, Moshage H, Schuurts T, et al. Brain death induces apoptosis in donor liver of the rat. *Transplantation* 2003; 76: 1150.
7. Kusaka M, Fukami N, Sasaki H, et al. IP-10, apoptotic genes, and calcineurin subtype messenger RNA kinetics occurring in rat renal isografts from brain-dead donors. *Transplant Proc* 2005; 37: 361.
8. Kirsch M, Bertrand S, Lecerc L, et al. Brain death-induced myocardial dysfunction: A role for apoptosis? *Transplant Proc* 1999; 31: 1713.
9. Carstens J, Markussen N, Madsen M. The granule exocytosis and Fas/FasLigand pathways at the time of transplantation and during borderline and acute rejection of human renal allografts. *Transplant Proc* 2005; 37: 3294.
10. Hes O, Treska V, Hasman D, et al. Determination of apoptotic cells in kidneys from non-heart-beating donors and heart-beating donors using the TUNEL assay: A limited immunohistochemical method? *Transplant Proc* 2002; 34: 1095.
11. Nijboer WN, Schuurts TA, van der Hoeven JA, et al. Effect of brain death on gene expression and tissue activation in human donor kidneys. *Transplantation* 2004; 78: 978.
12. Yeh T Jr, Wechsler AS, Graham LJ, et al. Acute brain death alters left ventricular myocardial gene expression. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1999; 117: 365.
13. Khoynzhad A, Jalali Z, Tortolani AJ. A synopsis of research in cardiac apoptosis and its application to congestive heart failure [review]. *Tex Heart Inst J* 2007; 34: 352.
14. Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, et al. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1999; 15: 269.
15. Patel T, Gores GJ, Kaufmann SH. The role of proteases during apoptosis [review]. *FASEB J* 1996; 10: 587.
16. Saikumar P, Venkatachalam MA. Role of apoptosis in hypoxicischemic damage in the kidney. *Semin Nephrol* 2003; 23: 511.
17. Kroemer G, Reed JC. Mitochondrial control of cell death. *Nat Med* 2000; 6: 513.
18. Kunisada K, Tone E, Negoro S, et al. Bcl-xl reduces doxorubicin-induced myocardial damage but fails to control cardiac gene down-regulation. *Cardiovasc Res* 2002; 53: 936.
19. Saikumar P, Dong X, Mikhailov V, et al. Apoptosis: Definition, mechanisms, and relevance to disease. *Am J Med* 1999; 107: 489.
20. Antonsson B. Bax and other pro-apoptotic Bcl-2 family "killer-proteins" and their victim the mitochondrion. *Cell Tissue Res* 2001; 306: 347.
21. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: Enemies within. *Science* 1998; 281: 1312.
22. Birks EJ, Yacoub MH, Burton PS, et al. Activation of apoptotic and inflammatory pathways in dysfunctional donor hearts. *Transplantation* 2000; 70: 1498.
23. Laguens RP, Meckert PM, Martino JS, et al. Identification of programmed cell death (apoptosis) in situ by means of specific labeling of nuclear DNA fragments in heart biopsy samples during acute rejection episodes. *J Heart Lung Transplant* 1996; 15: 911.

24. Szabolcs MJ, Ravalli S, Minanov O, et al. Apoptosis and increased expression of inducible nitric oxide synthase in human allograft rejection. *Transplantation* 1998; 65: 804.
25. Puig M, Ballester M, Matias-Guiu X, et al. Burden of myocardial damage in cardiac allograft rejection: Scintigraphic evidence of myocardial injury and histologic evidence of myocyte necrosis and apoptosis. *J Nucl Cardiol* 2000; 7: 132.
26. Reeve JL, Duffy AM, O'Brien T, et al. Don't lose heart—Therapeutic value of apoptosis prevention in the treatment of cardiovascular disease. *J Cell Mol Med* 2005; 9: 609.
27. Gilbert EM, Krueger SK, Murray JL, et al. Echocardiographic evaluation of potential cardiac transplant donors. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1988; 95: 1003.
28. Cook SA, Poole-Wilson PA. Cardiac myocyte apoptosis [review]. *Eur Heart J* 1999; 20: 1619.
29. Olivetti G, Abbi R, Quaini F, et al. Apoptosis in the failing human heart. *N Engl J Med* 1997; 336: 1131.
30. Narula J, Haider N, Virmani R, et al. Apoptosis in myocytes in end-stage heart failure. *N Engl J Med* 1996; 335: 1182.
31. Mallat Z, Tedgui A, Fontaliran F, et al. Evidence of apoptosis in arrhythmogenic right ventricular dysplasia. *N Engl J Med* 1996; 335: 1190.
32. Toyozaki T, Hiroe M, Tanaka M, et al. Levels of soluble Fas ligand in myocarditis. *Am J Cardiol* 1998; 82: 246.
33. Pérez S, Royo LJ, Astudillo A, et al. Identifying the most suitable endogenous control for determining gene expression in hearts from organ donors. *BMC Mol Biol* 2007; 8: 114.
34. Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. Mammalian caspases: Structure, activation, substrates, and functions during apoptosis [review]. *Annu Rev Biochem* 1999; 68: 383.
35. Yue TL, Wang C, Romanic AM, et al. Staurosporine-induced apoptosis in cardiomyocytes: A potential role of caspase-3. *J Mol Cell Cardiol* 1998; 30: 495.
36. Black SC, Huang JQ, Rezaiefar P, et al. Co-localization of the cysteine protease caspase-3 with apoptotic myocytes after in vivo myocardial ischemia and reperfusion in the rat. *J Mol Cell Cardiol* 1998; 30: 733.
37. Ashkenazi A. Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily [review]. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 420.
38. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: Arbiters of cell survival [review]. *Science* 1998; 281: 1322.
39. Luo X, Budihardjo I, Zou H, et al. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 1998; 94: 481.
40. Reeve JL, Szegezdi E, Logue SE, et al. Distinct mechanisms of cardiomyocyte apoptosis induced by doxorubicin and hypoxia converge on mitochondria and are inhibited by Bcl-xL. *J Cell Mol Med* 2007; 11: 509.
41. Tanaka M, Ito H, Adachi S, et al. Hypoxia induces apoptosis with enhanced expression of Fas antigen messenger RNA in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Circ Res* 1994; 75: 426.
42. Stroka DM, Burkhardt T, Desbaillets I, et al. HIF-1 is expressed in normoxic tissue and displays an organ-specific regulation under systemic hypoxia. *FASEB J* 2001; 15: 2445.
43. Schuurts TA, Morariu AM, Ottens PJ, et al. Time-dependent changes in donor brain death related processes. *Am J Transplant* 2006; 6: 2903.

Customer Service Contact Information

All correspondence concerning business matters, including subscription information, orders, or changes of address, should be directed to:

Lippincott Wilkins & Williams
 16522 Hunters Green Parkway
 Hagerstown, MD 21740-2116
 Tel: 800-638-3030 (North America); +44 (0) 20-7981-0525 (Europe);
 1-301-223-2300 (RoW)
 Fax: 1-301-223-2400
 Email: customerservice@Wolterskluwer.com

EXPERIMENTO 3:

**JOURNAL OF HEART AND LUNG TRANSPLANTATION 28(8): 815-820
(2009)**

BRAIN DEATH EFFECTS ON CATECHOLAMINE LEVELS AND SUBSEQUENT CARDIAC DAMAGE ASSESSED IN ORGAN DONORS.

SILVIA PÉREZ LÓPEZ, JESÚS OTERO HERNÁNDEZ, NATALIA VÁZQUEZ
MORENO, DOLORES ESCUDERO AUGUSTO, FRANCISCO ÁLVAREZ
MENÉNDEZ, AURORA ASTUDILLO GONZÁLEZ.

RESUMEN

La muerte encefálica causa alteraciones hemodinámicas y neuroendocrinas que incluyen una liberación masiva de catecolaminas al torrente circulatorio, provocando lesiones histológicas en el músculo cardíaco que se traducen en bandas de contracción, infiltrados inflamatorios y necrosis de los cardiomiocitos. Ante la escasez de estudios en humanos, en el presente artículo se estudian los niveles de catecolaminas liberadas en donantes como consecuencia de la muerte encefálica, así como las lesiones histológicas que aparecen en el tejido cardíaco, completando esta aproximación con el estudio de la apoptosis. Para ello, los niveles de las citadas hormonas fueron determinadas en muestras de sangre arterial y se llevaron a cabo técnicas de inmunohistoquímica e histoquímica con la finalidad de identificar las lesiones descritas.

RESULTADOS MÁS DESTACABLES

El pico de catecolaminas descrito en la bibliografía existente en modelos experimentales con muerte encefálica, se observa también en nuestro grupo de donantes para la adrenalina (2,36 veces por encima de los valores normales). En el caso de la noradrenalina el pico aparece una hora después de la muerte encefálica, sin embargo, los niveles aumentan hasta 8,56 veces por encima del rango normal.

Finalmente, la dopamina también experimenta un incremento de 54,76 veces por encima de los valores estándar. (S. Pérez y cols., 2009). Figura 1.

En cuanto a las lesiones histológicas, las bandas de contracción aparecen en un 54% de los donantes, los infiltrados inflamatorios aparecen en un 18% de los casos y la necrosis de los cardiomiocitos en un 62% en diferente grado, no excediendo en ningún caso el 3% del total de área muestreada. (S. Pérez y cols., 2009). Figura 2.

Asimismo, un 62% de donantes presenta células apoptóticas. (S. Pérez y cols., 2009). Figura 3.

Para concluir, un 84% de los donantes muestran algún signo de daño o muerte celular, siendo en un 40% de los mismos, tanto de tipo necrótico como apoptótico. Sin embargo, el área afectada nunca excedió el 5% del área total examinada (S. Pérez y cols., 2009). Figura 3.

Brain Death Effects on Catecholamine Levels and Subsequent Cardiac Damage Assessed in Organ Donors

Silvia Pérez López, PhD,^a Jesús Otero Hernández, MD,^{a,b} Natalia Vázquez Moreno, PhD,^a Dolores Escudero Augusto, MD,^{a,b} Francisco Álvarez Menéndez, PhD,^c and Aurora Astudillo González, PhD^d

- Background:** Brain death (BD) causes hemodynamic and neuroendocrine alterations including a catecholamine surge, which in turn causes histologic lesions in cardiac muscle such as contraction bands, focal mononuclear cell infiltrates and cardiomyocyte necrosis. These changes are likely to compromise heart function and could therefore also affect the graft response after heart transplantation. This study was designed to examine the catecholamine surge, the catecholamine release pattern and the histologic lesions traditionally described as characteristic of BD in hearts procured from BD donors.
- Methods:** After BD diagnosis, specimens were taken from the left ventricle ($n = 50$) for histologic examination. Arterial blood samples were collected from 40 of the donors at different time-points (1 hour before BD; on BD diagnosis; and 1, 2, 3 and 4 hours after BD) to determine catecholamine levels by high-performance liquid chromatography (HPLC).
- Results:** The three hormones examined showed above-normal levels (epinephrine 2.36-fold, norepinephrine 8.56-fold, dopamine 54.76-fold). Release patterns included epinephrine and dopamine peaks at the time of BD and a norepinephrine peak 1 hour later. Fifty percent of the BD donors showed contraction bands and 62% displayed cardiomyocyte necrosis, which was associated with focal mononuclear cell infiltrates in 18% of cases. In 40% of donors, colocalized apoptotic and necrotic damage was observed.
- Conclusions:** Differing extents of BD-associated cardiac lesions were observed in the donors, and >50% also showed apoptotic damage. The expected catecholamine peak at the time of BD was only detected for epinephrine and dopamine. Hormone increases were below those described in the literature, except for dopamine. *J Heart Lung Transplant* 2009;28:815–20. Copyright © 2009 by the International Society for Heart and Lung Transplantation.

Brain-dead patients are the main source of organs for transplantation. However, 20% of hearts from human brain-dead donors are discarded after procurement due to poor cardiac function.¹ Since the initial studies in experimental models,^{2,3} it has been reported that brain death (BD) leads to changes that compromise cardiac function and this affects the graft response after transplantation.^{4,5}

The changes produced during BD are related to the hemodynamic and neuroendocrine alterations that occur

during cerebral herniation.⁶ In animal models, BD first causes an intense activation of the sympathetic nervous system known as the autonomic storm, or cardiovascular hyperdynamic state,⁷ which increases catecholamine levels to about 7 or 8 times normal concentrations. Thereafter, levels normalize and finally fall below standard levels.⁸ This catecholamine release pattern is similar to that seen in a clinical situation.⁹ There is good evidence that sympathetic stimulation and the consequent increase in circulating catecholamines are pivotal in the adverse effects of BD produced in heart allografts.^{10,11}

BD has also been related to histologic changes in heart tissue, namely the appearance of contraction bands, cardiomyocyte necrosis and focal mononuclear cell infiltrates.² These lesions have been correlated with the subsequent graft response and could serve as predictors of acute cardiac rejection.¹² Recently, BD has also been reported to induce apoptosis in animals, including the rat^{13,14} and rabbit,¹⁵ and in several human tissues, such as kidney^{16,17} and heart.¹⁸ Cardiac apoptosis reduces the contractile mass available, and this has been linked to heart failure.¹⁹

Apoptosis is a cell function necessary for the removal of unwanted cells during normal development or aging.

From the ^aUnidad de Coordinación de Trasplantes y Terapia Celular, ^bServicio de Medicina Intensiva, ^cServicio de Bioquímica Clínica and ^dServicio de Anatomía Patológica, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Spain.

Submitted November 15, 2008; revised March 6, 2009; accepted April 10, 2009.

Reprint requests: Silvia Pérez López, MD, Laboratorio de Trasplante y Terapia Celular, Hospital Universitario Central de Asturias, Edificio Polivalente A, 1 Planta, C/Celestino Villamil s/n, 33006 Oviedo, Spain. Telephone: + 34-985108000 (ext. 39451). Fax: +34-985108778. E-mail: silvia.perez@sespa.princast.es

Copyright © 2009 by the International Society for Heart and Lung Transplantation. 1053-2498/09/\$-see front matter. doi:10.1016/j.healun.2009.04.021

The mechanism is controlled through two major pathways, an extrinsic and intrinsic pathway.²⁰ The intrinsic pathway is activated by various intracellular stimuli, such as anoxia or DNA damage, all of which affect mitochondria, where they promote mitochondrial membrane permeabilization and release of caspase-activating factors, such as cytochrome c, into the cytosol.^{21,22} Members of the Bcl-2 family (pro-apoptotic Bax and anti-apoptotic Bcl-2) control activation of the intrinsic pathway and play an important role in cardiomyocyte apoptosis.²³

Despite numerous animal studies, few research efforts have focused on the human tissue response to BD⁹ or have addressed whether the classical histologic lesions observed in BD described in animals are also present in humans. Our study was designed to determine whether the catecholamine increase, its characteristic release pattern and the cardiac histologic lesions observed in experimental models of BD could also be identified in heart tissue from BD donors. We also examined the presence/absence of apoptotic or necrotic lesions in this tissue.

METHODS

Hearts were obtained from 50 BD donors (28 males, 22 females; mean age 61 years, range 30 to 80 years) over a 1-year period (April 2006 to May 2007). The donors had died in the multidisciplinary ICU of a tertiary university hospital. BD was attributed to various causes (Table 1) and the mean ICU stay before donation was 93 hours (range 7 to 624 hours). No donor had a previous heart pathology. Consent for organ donation for transplant or clinical research was obtained from the relatives of each donor.

The hearts had been rejected for transplant because of donor age, weight or recipient blood group incompatibility. The time between BD diagnosis and organ procurement did not exceed 10 to 12 hours. The diagnosis of BD was made according to the recommendations and protocols included in Spanish legislation.²⁴ When there was severe structural injury, a Glasgow Coma Score (GCS) score of 3, as well as lack of brainstem reflexes and findings in the atropine and apnea tests (no spontaneous ventilation and final PaCO₂ ≤60 mm Hg or 7.98 kPa) in patients not under sedation or who showed significant metabolic alterations or hypothermia. Electroencephalography (EEG) and transcranial Doppler (TCD) ultrasonography were performed on all patients. If a patient had severe craniofacial bone destruction or had received barbiturates, cerebral hexamethylpropylene amine oxime-single-photon emission computed tomography (HMPAO-SPECT) radionuclide angiography was also performed. To maintain donors' systolic pressure at ≥100 mm Hg in the ICU, norepinephrine or dopamine was adminis-

Table 1. Donor Characteristics

Characteristic	
Age	61 ± 15 years (range 30–80)
Gender	22 F, 28 M
Cause of death	28 CVA (hemorrhagic), 3 CVA (ischemic), 16 TBI, 3 ABI
Mean ICU stay before donation	93 hours (range 7–624)
Percentage of hypertensive patients	20%
Norepinephrine dose received	0.1–0.2 µg/kg/min
Dopamine dose received	10–15 µg/min
PaO ₂	160 ± 40 mm Hg
PaCO ₂	39.5 ± 2.5 mm Hg
pH	7.41 ± 0.03

F, female; M, male; ICU, intensive care unit; CVA, cerebrovascular accident; TBI, traumatic brain injury; ABI, anoxic brain injury.

tered. The amount of drug used was about 0.1 µg/kg/min, with the maximum dose for norepinephrine being 0.2 µg/kg/min. Dopamine was only used in 8 donors and the highest dose did not exceed 10 to 15 µg/min.

Specimens

Hearts were freshly harvested and 3 to 5 specimens of left ventricular tissue randomly obtained from each donor by the Cavalieri principle of sectioning. Each specimen was divided into two parts: one piece was immediately embedded in OCT compound (Tissue Tek, Sakura, The Netherlands) and then stored frozen at –80°C, and the other was fixed in 10% buffered formalin at pH 7 (Panreac Química, Spain) and embedded in paraffin (TP 1050 Tissue Processor; Leica).

Histologic Procedures

Paraffin sections. Paraffin-embedded tissue fragments were cut into 5-µm-thick sections and hematoxylin-eosin stained (ST5010 Autostainer XL; Leica). Histologic changes, including contraction bands, inflammatory infiltrates and necrotic cardiomyocyte and necrotic cardiac lesions, were evaluated by two independent pathologists with experience in interpreting myocardial biopsies and who were blinded to the donors' medical history. Apoptotic cells were identified using a Fragel DNA fragmentation colorimetric-TdT detection kit (TUNEL; Calbiochem, Merck Biosciences, Germany). The test was considered positive when >20% of cells on each slide showed a brown-stained nucleus. As another indicator of apoptosis, Bcl-2 was immunohistochemically stained (Bcl-2 antibody; M0887 Dako 1:40) with antigen retrieval by pH 6.4 citrate buffer, and detected using the Envision Dual Link Kit (K5007 Dako) in the cytoplasm of cardiomyocytes as a brown color. Cell counts were performed in three microscopy fields selected from each slide (hot spot) and 100 cells

examined in each field. Results are expressed as percentages (number positive cells/300 × 100).

Frozen sections. Frozen tissue samples were cut into 7- μ m-thick sections for cytochrome c histochemistry. After cutting the blocks, the sections were rinsed with phosphate buffer (pH 7.2) and incubated in a solution composed of 1 ml catalase, 10 mg cytochrome c, 9 ml phosphate buffer and 10 mg diaminobenzidine (DAB; pH 7.4) for 2 hours at 37°C. We visualized the whole section of each sample and scored the slides as cytochrome c positive when at least one cell per field was unstained or showed weak, diffuse staining compared with cells with normal mitochondrial function, which show granular cytoplasm staining.

Blood Sampling and Hormone Assays

Arterial blood samples from 40 of the BD donors were obtained at three time-points at least (1 hour before BD, on BD diagnosis and 1 hour after BD). Plasma samples were subjected to high-performance liquid chromatography (HPLC) using an 1100 Series instrument from Agilent Technologies (Hewlett Packard) to determine catecholamine levels (epinephrine, norepinephrine and dopamine). Separation was performed on a reverse-phase column (Reversed Phase Micro Guard Cartridges; Bio-Rad Laboratories, Watford, UK). Arterial pressures were also recorded in the donors at the same time-points using a GEM Premier 3000 device (Instrumentation Laboratory Co., Lexington, MA). To rule out acute myocardial infarction, troponin T was determined in all donors at the time of BD by electrochemiluminescence (ECLIA; ElecSys E170; Roche Diagnostics, Mannheim, Germany).

RESULTS

Hormone Levels

Hormone levels are expressed as mean \pm SEM using data for all the donors in whom blood samples could be obtained ($n = 40$). Values are expressed in picograms per milliliter (pg/ml) considering as normal a level of 10 to 80 pg/ml for epinephrine, 95 to 446 pg/ml for norepinephrine and 0 to 150 pg/ml for dopamine. The catecholamine levels recorded in some of the heart tissue specimens were higher than these standard levels. Percentages are provided in Table 2.

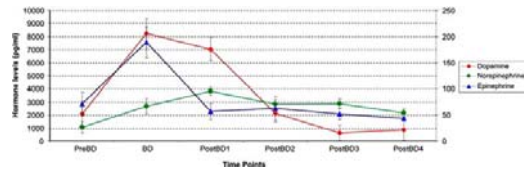


Figure 1. Catecholamine levels recorded at different time-points around the moment of brain death. Dopamine and norepinephrine are represented on the left axis and epinephrine levels on the right. All hormones are expressed in picograms per milliliter (pg/ml). A marked rise appeared at the time of BD for dopamine and epinephrine compared with baseline, after which circulating catecholamine levels steadily fell. Asterisk (*) indicates the points at which catecholamine levels exceed normal values.

Figure 1 shows the mean catecholamine levels recorded for the donors at the 6 time-points: 1 hour before BD (PreBD); at BD diagnosis (BD); and from 1 to 4 hours after BD (time-points PostBD1, PostBD2, PostBD3 and PostBD4).

The expected increase (peak) in catecholamine levels produced at the time of BD and the ensuing drop to levels below normal may be clearly observed in the case of epinephrine. The concentration of this hormone at the BD time-point was 2.36 times the normal value. Norepinephrine showed an increase of 8.56 times the norm at time-point PostBD1. Dopamine showed a peak coinciding with BD and, thereafter, levels steadily fell until PostBD4. This time, the peak was 54.76 times the standard level.

Levels of Other Hormones

Troponin T levels were within the normal range of 0 to 0.04 ng/ml for all donors.

Histologic Lesions Attributable to Catecholamine Surge Produced During BD

Contraction bands (Figure 2), mainly localized in sub-epicardic and sub-endocardic zones, were observed in 54% of the donors. Bands observed at the margins of samples were considered artifacts.

Cardiomyocyte necrosis (Figure 2) was observed by microscopy as isolated or groups of cardiomyocytes showing cytoplasmic hyper eosinophilia, nuclear picnosis and loss of striations, and occasionally an inflammatory infiltrate was also present. These changes were

Table 2. Percentages of Brain-dead (BD) Donors Showing Catecholamine Levels Above Normal

	Normal levels (pg/ml)	PreBD	BD	PostBD1	PostBD2	PostBD3	PostBD4
Epinephrine	10–82	54.55%	64.71%	47.06%	37.93%	34.78%	35.00%
Norepinephrine	95–446	72.73%	94.12%	100.00%	96.55%	95.65%	95.00%
Dopamine	0–150	36.36%	31.25%	36.36%	31.03%	39.13%	40.00%

PreBD, 1 hour before brain death; BD, time of brain-death diagnosis; PostBD1, PostBD2, PostBD3 and PostBD4, 1, 2, 3 and 4 hours after brain death.

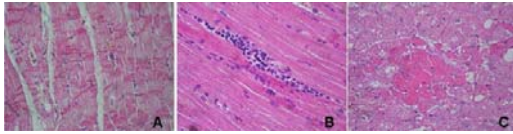


Figure 2. Histologic lesions traditionally described as characteristic of brain death. (A) Contraction bands. (B) Focal cellular infiltrates. (C) Cardiomyocyte necrosis (paraffin sections; hematoxylin–eosin staining; original magnification $\times 40$).

interpreted as a sign of acute necrosis secondary to acute hypoxia (AH). In 19 donors (38%), morphologic evidence of AH was not observed, and in 31 (62%) signs of focal AH appeared at different measure, although affected areas never exceeded 3% of total area sampled.

Focal mononuclear cell infiltrates (Figure 2), scored as presence/absence, were not detected in 41 donors (82%). Six of the organ donors did have cell mononuclear cell infiltrates (12%), although these were never accompanied by necrosis, and only in 3 of the donors was the inflammatory infiltrate directly associated with AH (6%). For these donors, approximate times from BD diagnosis to organ procurement were 7, 10 and 11 hours, respectively.

Apoptosis

Thirty-one of the donors (62%) scored positive for apoptotic cells (slides showing $>20\%$ stained cells), 2 donors showed both the absence of cytochrome c and Bcl-2 staining, 5 donors only showed a loss of cytochrome c, and 13 donors only showed Bcl-2 expression (Figure 3).

Final Stages of Tissue Damage

Table 3 shows the necrosis and apoptosis appearing in the final stages of the catecholamine surge produced in response to BD. In 8 BD donors (16%), no lesions were observed, whereas the remaining donors (84%) showed some signs of cell damage or death; in 20 donors (40%), there were signs of both necrotic and apoptotic dam-

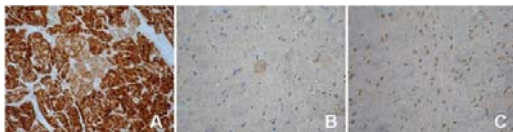


Figure 3. Images indicating apoptotic damage (original magnification $\times 40$). (A) Histochemistry for cytochrome c. Slides that scored positive show weakly and diffusely stained (DAB) cells (frozen sections). (B) Immunohistochemistry for Bcl-2 (an anti-apoptotic molecule). Slides were scored positive if the cytoplasm of the cardiomyocytes was stained a brown color (DAB) (paraffin sections). (C) TUNEL technique. Positive apoptotic cells were identified by a brown stain (DAB) in the nucleus (paraffin sections).

Table 3. Percentages of Donors Showing Apoptotic and Necrotic Lesions

	Necrosis (-)	Necrosis (+)
TUNEL (-)	8 (16%)	11 (22%)
TUNEL (+)	11 (22%)	20 (40%)

age. Affected areas never exceeded 5% of the total area examined.

DISCUSSION

Since the pioneering work of Novitzky et al in their study of the Chacma baboon,² BD has been associated with the metabolic and hemodynamic derangement that occurs because of quickly deteriorating cardiovascular function. Many investigators have suggested that these cardiac alterations could be the result of the abrupt increase in catecholamine levels observed during BD.²⁵ This catecholamine storm, known as the Cushing reaction,²⁶ produces negative effects on myocardial function²⁷ and also gives rise to histologic lesions.²⁸ In the present study, we examined the behavior of catecholamines during BD in terms of hormone amounts and their release pattern, and assessed the presence of alterations produced at the histologic level. BD has also been described to induce apoptosis in human tissues such as the heart.¹⁸ Apoptosis in heart tissue reduces the contractile mass available, and this has been linked to heart failure.¹⁹ Although few studies have examined the BD process and related hormonal changes in humans, Powner et al⁹ observed increases of 5- to 30-fold, 2- to 6-fold and 2.5- to 18-fold in epinephrine, norepinephrine and dopamine, respectively, over standard levels. These observations are consistent with the findings reported in animal models.^{29,30} The release kinetics of the hormones established includes a peak at the moment of BD, with levels normalizing thereafter followed by a fall to below-normal levels.³¹ A second peak was observed 45 minutes after BD in one study³² and even several hours after death in another study.^{25,33} This later catecholamine surge could be attributed to the adrenal response to BD, as suggested by investigators such as Chen et al.³¹

In our series of BD donors, catecholamine levels above normal were detected in most cases. Our results clearly reflect the expected release profile for epinephrine, yet levels detected at the time of BD peaked at only 2.36-fold. For norepinephrine, the peak produced 1 hour after BD was 8.56 times the standard value and dopamine showed a single peak coinciding with BD that decreased thereafter until 4 hours after BD, which was, remarkably, 54.76 times the standard level. These peaks were probably the result of the sympathetic storm (Cushing reflex) produced in BD. No second catecholamine peak was observed.

The release profiles of epinephrine and dopamine generally correspond to the expected pattern, especially that of epinephrine. The norepinephrine surge, however, was produced 1 hour later. The following limitations to our study must be considered. The initial reaction (catecholamine storm) took place during the minutes in which BD occurred. This short time period means there will be small differences in the sampling times among donors. Also, the use of vasopressors in patients at the time of BD (mainly norepinephrine) is likely have influenced blood hormone levels. Our norepinephrine results must therefore be interpreted with caution. Finally, the obvious limitation that our study lacked a control group indicates that our data are merely descriptive and cannot be used for statistical comparisons.

Our histologic results indicate that the structural myocardial damage produced in response to BD was characterized by myocytolysis, contraction band necrosis and occasional interstitial cell infiltration.³⁴ The incidence of this type of damage in humans has been reported to be 89%³⁵ for band necrosis in a study performed in patients with no pre-existing heart disease. The incidence rates for the lesions described herein were contraction bands in 54% of the BD donors, isolated cardiomyocyte necrosis in 62% and cardiomyocyte necrosis associated with focal cell infiltrates in 12%. Cardiomyocyte necrosis is also observed in acute myocardial infarction, and thus we determined troponin T levels in our donors to rule out this possibility. Only one donor showing a troponin T concentration above normal was withdrawn from the study.

In our study specimens, myocytolysis associated with AH affected only a small proportion of the total surface area of the sections (<3%), and was very sparsely distributed. The discrete amount of this type of damage indicates minimal immediate functional consequences for the transplanted organ. Thus, it should be considered that the necrotic sub-endocardic changes described frequently in control biopsies obtained during the first month of transplant are probably not attributable to the organ procurement process. It should also be taken into account, however, that minimal necrotic changes could be the cause of subsequent heart rejection, given the presence of cardiac interstitial dendritic cells capable of antigen processing and presentation.

When using the TUNEL technique to detect apoptotic cells, the percentage of donors showing only apoptotic lesions was 22%. This same percentage was observed for hearts showing only myocytolysis. In 40% of the donors, both apoptosis and necrosis were detected. Thus, the proportion of donors with damaged heart tissue in general was 84%, although the affected area was never >5%. Focal cellularity of lymphocytes and monocytes was predominant over polymorphonuclear

leukocytes. This explains why the inflammatory infiltrate was not always directly related to acute myocytolysis, because, during the death process, we would only expect polymorphonuclear leukocytes to improve microscopic cardiac necrosis, with other inflammatory cells probably being pre-existent and related to myocarditis. Periods of ischemia cause different types of damage, such as apoptosis and necrosis,³⁶ and the time and intensity of ischemia is a determining factor for the presence of one or both types of damage. During the BD process, the entire cardiac muscle is not subjected to the same insult because of changes in blood distribution, especially in sub-endocardic ventricular zones. This could explain the different distribution of the damage observed in our cardiac tissue specimens, in which apoptotic damage was the prevalent form of damage and was associated or not with microscopic necrotic changes.

In conclusion, during BD in humans, catecholamine levels are elevated several-fold. The increases observed herein were lower than expected based prior observations in animal models, with the exception of dopamine, for which the levels were 55 times the norm. Catecholamine release patterns seemed to be consistent with previous descriptions, with the exception of norepinephrine. This finding is most likely attributable to the fact our donors had been treated with a small dose of this drug to maintain haemodynamic stability at the time of BD. Histologic lesions appeared in different proportions in the cardiac tissue, but the damaged area was never extensive and is thus unlikely to have had any major detrimental effect on post-transplant heart function.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

Supported by Grant IB05-135 from the FICYT.

REFERENCES

1. Cooper DKC, Wicomb WN, Barnard CN, et al. Storage of the donor heart by a portable hypothermic perfusion system: experimental development and clinical experience. *J Heart Transplant* 1983;2:104-10.
2. Novitzky D, Wicomb WN, Cooper DKC, et al. Electrocardiographic, haemodynamic and endocrine changes occurring during experimental brain death in the Chacma baboon. *J Heart Transplant* 1984;4:63.
3. Novitzky D, Wicomb WN, Cooper DKC, et al. Prevention of myocardial injury during brain death by total cardiac sympathectomy in the Chacma baboon. *Ann Thorac Surg* 1986;41:520.
4. Busson M, N'Doye P, Benoit G, et al. Donor factors influencing organ transplant prognosis. *Transplant Proc* 1995;27:1662-4.
5. Birks EJ, Yacoub MH, Burton PS, et al. Activation of apoptotic and inflammatory pathways in dysfunctional donor hearts. *Transplantation* 2000;70:1498.
6. Owen VJ, Burton PBJ, Michel MC, et al. Myocardial dysfunction in donor hearts. A possible etiology. *Circulation* 1999;99:2565.
7. Chai CL, Tu YK, Huang SJ. Can cerebral hypoperfusion after sympathetic storm be used to diagnose brain death? A retrospec-

- tive survey in traumatic brain injury patients. *J Trauma* 2008;64:688-97.
8. Chen EP, Bittner HB, Kendall SW, et al. Hormonal and hemodynamic changes in a validated animal model of brain death. *Crit Care Med* 1996;24:1352-9.
 9. Pownner DJ, Hendrich A, Nyhuis A, et al. Changes in serum catecholamine levels in patients who are brain dead. *J Heart Lung Transplant* 1992;11:1046-53.
 10. Wilhelm MJ, Pratschke J, Laskowski IA, et al. Brain death and its impact on the donor heart—lessons from animal models. *J Heart Lung Transplant* 2000;19:414-8.
 11. Emery RW, Cork RC, Levinson MM, et al. The cardiac donor: a six-year experience. *Ann Thorac Surg* 1986;41:356-62.
 12. Herskowitz A, Soule LM, Mellits ED, et al. Histologic predictors of acute cardiac rejection in human endomyocardial biopsies: a multivariate analysis. *J Am Coll Cardiol* 1987;9:802-10.
 13. Van Der Hoeven JA, Moshage H, Schuurts T, et al. Brain death induces apoptosis in donor liver of the rat. *Transplantation* 2003;76:1150.
 14. Kusaka M, Fukami N, Sasaki H, et al. IP-10, apoptotic genes, and calcineurin subtype messenger RNA kinetics occurring in rat renal isografts from brain-dead donors. *Transplant Proc* 2005;37:361.
 15. Kirsch M, Bertrand S, Lecerc L, et al. Brain death-induced myocardial dysfunction: a role for apoptosis? *Transplant Proc* 1999;31:1713.
 16. Carstens J, Markussen N, Madsen M. The granule exocytosis and Fas/FasLigand pathways at the time of transplantation and during borderline and acute rejection of human renal allografts. *Transplant Proc* 2005;37:3294.
 17. Hes O, Treska V, Hasman D, et al. Determination of apoptotic cells in kidneys from non-heart-beating donors and heart-beating donors using the TUNEL assay: a limited immunohistochemical method? *Transplant Proc* 2002;34:1095.
 18. Pérez López SP, Vázquez Moreno NV, Escudero Augusto DE, et al. A molecular approach to apoptosis in the human heart during brain death. *Transplantation* 2008;86:977-82.
 19. Khojenezhad A, Jalali Z, Tortolani AJ. A synopsis of research in cardiac apoptosis and its application to congestive heart failure. *Texas Heart Inst J* 2007;34:352.
 20. Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, et al. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1999;15:269.
 21. Saikumar P, Venkatachalam MA. Role of apoptosis in hypoxicischemic damage in the kidney. *Semin Nephrol* 2003;23:511.
 22. Kroemer G, Reed JC. Mitochondrial control of cell death. *Nat Med* 2000;6:513.
 23. Kunisada K, Tone E, Negoro S, et al. Bcl-x1 reduces doxorubicin-induced myocardial damage but fails to control cardiac gene downregulation. *Cardiovasc Res* 2002;53:936.
 24. Real Decreto 2070/1999. Regulacion de la donacion y el trasplante de organos y tejidos. *BOE* 3/2000:179-90.
 25. Bittner HB, Kendall SW, Campbell KA, et al. A valid experimental brain death organ donor model. *J Heart Lung Transplant* 1995;14:308-17.
 26. Cushing H. Concerning a definite regulatory mechanism of the vascular center which controls blood pressure during cerebral compression. *Bull Johns Hopkins Hosp* 1901;12:290-2.
 27. Herijgers P, Leunens V, Tjandra-Maga TB, et al. Changes in organ perfusion after brain death in the rat and its relation to circulating catecholamines. *Transplantation* 1996;62:330-5.
 28. Cooper DK, Novitzky D, Wicomb WN. The pathophysiological effects of brain death on potential donor organs, with particular reference to the heart. *Ann R Coll Surg Engl* 1989;71:261-6.
 29. Chiari P, Hadour G, Michel P, et al. Biphasic response after brain death induction: prominent part of catecholamines release in this phenomenon. *J Heart Lung Transplant* 2000;19:675-82.
 30. Ueno T, Zhi-Li C, Itoh T. Unique circulatory responses to exogenous catecholamines after brain death. *Transplantation* 2000;70:436-40.
 31. Chen EP, Bittner HB, Kendall SW, et al. Hormonal and hemodynamic changes in a validated animal model of brain death. *Crit Care Med* 1996;24:1352-9.
 32. Mertes PM, el Abassi K, Jaboin Y, et al. Changes in hemodynamic and metabolic parameters following induced brain death in the pig. *Transplantation* 1994;58:414-8.
 33. Christé G, Hadour G, Ovize M, et al. Brain death does not change epicardial action potentials and their response to ischemia-reperfusion in open-chest pigs. *J Heart Lung Transplant* 2006;25:847-53.
 34. Shivalkar B, Van Loon J, Wieland W, et al. Variable effects of explosive or gradual increase of intracranial pressure on myocardial structure and function. *Circulation* 1993;87:230-9.
 35. Baroldi G, Di Pasquale G, Silver MD, et al. Type and extent of myocardial injury related to brain damage and its significance in heart transplantation: a morphometric study. *J Heart Lung Transplant* 1997;16:994-1000.
 36. Chen-Scarabelli C, Scarabelli TM. Turning necrosis into apoptosis: the exacting task that can enhance survival. *Am Heart J* 2004;148:196-9.

Discusión

EXPERIMENTO 1:

BMC MOLECULAR BIOLOGY 8: 114 (2007)

**IDENTIFYING THE MOST SUITABLE ENDOGENOUS CONTROL FOR
DETERMINING GENE EXPRESSION IN HEARTS FROM ORGAN
DONORS.**

SILVIA PÉREZ, LUIS J. ROYO, AURORA ASTUDILLO, DOLORES ESCUDERO,
FRANCISCO ÁLVAREZ, AIDA RODRÍGUEZ, ENRIQUE GÓMEZ, JESÚS
OTERO.

Utilizando el programa informático "geNorm" hemos puesto de manifiesto que el uso conjunto de los genes PPIA, RPLP y GADPH como genes de referencia en tejido cardíaco humano, es la mejor opción para llevar a cabo la normalización de resultados de PCR cuantitativa. Siendo el par formado por PPIA y RPLP los más estables. Asimismo, utilizando el programa "Normfinder" corroboramos los resultados anteriores, al comprobar que los genes más estables son de nuevo el PPIA, RPLP y GADPH. Sin embargo, utilizando este último programa el orden con respecto al anterior varía ya que identifica al GADPH como el gen más estable. Es decir, que los tres genes más estables y, por tanto, más recomendables para llevar a cabo la normalización coinciden en ambos casos, con una pequeña variación en el orden de los mismos.

Tras el análisis con el programa "geNorm" el gen TBP se clasificó como el menos estable de todos, al igual que ocurrió tras tratar los datos con el programa "Normfinder".

Hasta ese momento, no existía en la literatura científica ningún experimento diseñado con la finalidad de determinar los genes de referencia adecuados para normalizar los resultados obtenidos en experimentos de PCR cuantitativa llevados a cabo en tejido cardíaco humano. Aunque el uso de genes de referencia como controles

internos es la estrategia de normalización más comúnmente aceptada (Huggett y cols., 2005), su utilización debe ser validada para cada tejido y diseño experimental en particular. Así, existe todavía una importante tendencia a normalizar sistemáticamente los resultados de PCR cuantitativa usando genes de referencia tradicionalmente utilizados con dicha finalidad, como pueden ser el ACTB (β -actina), GADPH o el ARNr 18S sin haber comprobado previamente la idoneidad de los mismos, esta circunstancia se daba hasta en un 90% de los experimentos de PCR cuantitativa en los que se utilizaban como genes de referencia únicos (Suzuki y cols., 2000).

Sin embargo, la utilización de un único gen de referencia puede conducir a la obtención de resultados erróneos. Así, Vandesompele y cols. (2002) demostraron que esta estrategia de normalización provoca errores de entre 3,0 y 6,4 veces el valor de la ratio en un 10%-25% de casos y defienden el uso de múltiples genes de referencia en lugar de contar con un único transcrito de ARN si se quiere llevar a cabo una normalización adecuada; de forma que la resolución de cada ensayo en particular, depende de la variabilidad de los genes de referencia escogidos.

Para llevar a cabo la normalización se calcula un factor de normalización, éste se obtiene a partir de la media geométrica y está basado en los niveles de expresión de los mejores genes de referencia. El número de genes que se tiene en cuenta para el cálculo de esta media es una solución de compromiso entre el número determinado por el programa informático (geNorm, Normfinder...) y la disponibilidad de materiales y de muestra.

Además, numerosas publicaciones están de acuerdo en el hecho de que la β -actina no parece ser adecuada para utilizarse como control interno de reacciones de PCR a tiempo real (Selvey y cols., 2001). En cuanto al GADPH, se ha puesto de manifiesto que en determinados tejidos, como tejido arterial (Deindl y cols., 2002) o células T (Hamalainen y cols., 2001) y en condiciones concretas, como pueden ser situaciones de hipoxia (Zhong y Simons, 1999) su uso no es recomendable.

Asimismo, en la actualidad, se acepta que el uso del ARN ribosómico para la normalización de resultados de PCR cuantitativa no es recomendable, debido al hecho de que la transcripción de este tipo de ARN está afectada por factores biológicos y por drogas. Así, Spanakis en 1993 estudió los efectos de la toxina colérica y de un promotor tumoral en la expresión del ARN ribosómico 28S demostrando que la expresión del mismo estaba sustancialmente influida por dichos estímulos. Una posible explicación sería el hecho de que el ARN ribosómico supone entre un 80-90% del ARN total de la célula y por tanto, las variaciones que experimenta en su expresión son menos acusadas que las que mostraría el ARN mensajero bajo las mismas condiciones de afectación (Bustin y Nolan, 2004). Asimismo, cuando se purifica ARN mensajero las moléculas de ARN ribosómico de 18S y de 28S no aparecen en dichas muestras purificadas; por otra parte, su gran abundancia comparado con las moléculas diana transcritas de ARN mensajero hace que el valor basal no se pueda sustraer en la qPCR con la adecuada especificidad (Vandesompele y cols., 2002).

En relación al uso del ACTB como gen de referencia en tejido cardiaco, se ha encontrado que en células derivadas de las válvulas cardiacas de oveja, su uso no es recomendable debido a la importante variación que experimenta en sus niveles de expresión (Yperman y cols., 2004). Asimismo, en un estudio en el que se examinaba el uso de diez genes de referencia comúnmente empleados en normalización, en diferentes tejidos humanos entre los que se encontraba el tejido cardiaco, se encontró que el nivel de expresión de la β -actina era relativamente bajo, lo cual resulta llamativo si tenemos en cuenta que este tejido es de origen claramente muscular (Vandesompele y cols., 2002). En este mismo estudio, en relación con el GADPH, resultó ser el gen de referencia que presentaba unos niveles de expresión más elevados en el miocardio. Los resultados obtenidos para estos dos genes parecen estar en clara consonancia con nuestros resultados, ya que en nuestro experimento la β -actina aparece posicionada en el antepenúltimo lugar, mientras que el GADPH aparece dentro del grupo de genes recomendados para la normalización.

Igualmente, varios autores han utilizado previamente el gen GADPH para su estrategia de normalización en tejido cardíaco humano, así Morgan y cols., (1994) examinaron la expresión de genes relacionados con el sistema renina-angiotensina en tejido auricular humano utilizando el GADPH como control endógeno. Igualmente Moniotte y cols., (2001) utilizaron para su estudio de qPCR, ARN extraído de biopsias humanas endomiocárdicas y de cardiomiocitos aislados y para ello utilizaron GADPH, HPRT y el oncogen ABL como genes de referencia, demostrando que dichos genes muestran muy poca variación a nivel individual en las diferentes patologías cardíacas estudiadas, sugiriendo que son muy adecuados a la hora de normalizar los experimentos de PCR cuantitativa en el tejido miocárdico.

Sin embargo, en un estudio sobre selección de genes de referencia en miocardio humano publicado en el año 2008 (Pilbrow y cols.) en el que se establecieron dos grupos de estudio, uno de ellos con individuos que presentaban fallo cardíaco y el otro formado por personas sanas, se determinó que el GADPH era el gen menos estable de los estudiados. Esto nos demuestra que un mismo gen puede ser adecuado para un tejido, en una localización concreta y para unas condiciones experimentales definidas, mientras que para el mismo tejido, en otra localización o cambiando las condiciones, puede no serlo; de ahí que sea necesario llevar a cabo una normalización adecuada, si queremos obtener unos resultados fiables.

Respecto al gen TBP, Radonic y cols., (2004) tras determinar los niveles de transcripción de diferentes genes de referencia en varios tejidos humanos, incluyendo corazón, identificaron el gen TBP como el que presentaba el menor rango de transcripción en los diferentes tejidos. De acuerdo con estos resultados Tricarico y cols., en 2002 demostraban que este gen estaba altamente regulado si comparamos tejidos tumorales con tejidos normales en biopsias de mama. En contraposición, un estudio reciente llevado a cabo para seleccionar genes de referencia en un modelo de fallo cardíaco en cerdos, nos muestra que el TBP es uno de los genes más estables a nivel del ventrículo izquierdo y de las dos aurículas (Martino y cols., 2011).

Los resultados de este primer experimento suponen, por tanto, un importante avance en el uso de la PCR cuantitativa en tejido cardiaco humano, al ser el primer estudio que pone de manifiesto la eficacia de estos tres genes (PPIA, RPLP y GADPH) utilizados de forma conjunta para normalizar los resultados. Estos tres genes cumplen las características definitorias de todo gen de referencia, han de expresarse de una manera constante y de forma constitutiva en los diferentes tejidos de un organismo, en todos los estadios del desarrollo y no han de verse afectados por los tratamientos o las condiciones experimentales. (Vandesompele y cols., 2002)

Por otro lado, los resultados de este primer artículo nos permiten tener nuestra propia batería de genes de referencia para abordar el segundo experimento, en el que se estudiaron varios genes relacionados con el proceso apoptótico en tejido cardiaco durante la muerte encefálica.

EXPERIMENTO 2:

TRANSPLANTATION 86(7): 977-982 (2008)

**A MOLECULAR APPROACH TO APOPTOSIS IN THE HUMAN HEART
DURING BRAIN DEATH.**

SILVIA PÉREZ LÓPEZ, NATALIA VÁZQUEZ MORENO, DOLORES
ESCUADERO AUGUSTO, AURORA ASTUDILLO GONZÁLEZ, FRANCISCO
ÁLVAREZ MENÉNDEZ, FÉLIX GOYACHE GOÑI, JESÚS OTERO
HERNÁNDEZ

En cuanto al segundo experimento llevado a cabo, nuestros resultados mostraron que los niveles de expresión del gen FAS se encontraban 12,14 veces por encima de los niveles basales en el tejido cardíaco procedente de donantes, siendo este incremento significativamente mayor que el detectado en el grupo control. Este resultado nos indica que la vía extrínseca de la apoptosis se encuentra activada a nivel génico durante el proceso de ME. La activación de esta vía está mediada por la estimulación de los denominados receptores de muerte que forman parte de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral a la que pertenece Fas (Ashkenazi, 2002).

Así, diversos estudios experimentales han puesto de manifiesto la existencia de un proceso apoptótico activo con la participación de Fas en diferentes patologías cardíacas, como pueden ser las cardiomiopatías isquémicas e inflamatorias (Jeremias y cols., 2000) o el fallo cardíaco (Li y cols., 2004). Tanto Fas como el ligando de Fas (Fas-L) son proteínas de la superficie celular que tienen un papel representativo como moléculas apoptóticas (Nishigaki y cols., 1997); el ligando de Fas está presente de forma abundante en los cardiomiocitos adultos y su expresión se incrementa en respuesta a un estímulo patológico (Takemura y cols., 2001). Así, los niveles circulantes del ligando de Fas están elevados en humanos en situación de fallo cardíaco, lo que refleja la activación del sistema Fas-Fas ligando (Yamaguchi y cols.,

1999) mediante la unión de Fas a su receptor. En este sentido, un estudio reciente diseñado para conocer el efecto del envejecimiento sobre la apoptosis cardiaca, llevado a cabo tanto en humanos como en animales, puso de manifiesto un aumento del marcador de apoptosis Fas en ratas viejas comparado con el grupo de ratas jóvenes, sometidas todas ellas a un periodo de isquemia de 30 minutos. Además, estos resultados están en concordancia con los obtenidos por los mismos autores en humanos dónde también observaron un aumento plasmático de Fas, así como un deterioro de la función cardiaca (Liu y cols, 2011). Por otra parte, cuando en cardiomiocitos en cultivo se estimula la apoptosis mediante la inoculación de Fas en el medio, se observa que esta apoptosis se lleva a cabo en asociación con la activación de la caspasa-3 (Takemura y cols., 2001).

Esto parece estar en consonancia con los resultados obtenidos en nuestro estudio para la Caspasa 3. En nuestras muestras de tejido cardiaco, la expresión de CASPASA 3 se encuentra 7,85 veces por encima de los valores basales y presenta diferencias significativas con respecto al grupo de muestras control. Esta molécula forma parte de la parte final común de la cascada apoptótica (Earnshaw y cols., 1999) y ha sido identificada tanto en cardiomiocitos de rata neonata (Yue y cols., 1998) como en rata adulta (Black y cols., 1998). En humanos la caspasa 3, junto con la caspasa 8 y 9 se considera la más determinante para la apoptosis miocárdica (Cook y Poole-Wilson, 1999).

La Caspasa 3 es una molécula efectora, cuya sobreexpresión se ha relacionado con la reducción de contractilidad en el ventrículo izquierdo debido a la destrucción de la estructura sarcomérica, como se ha demostrado en un modelo de fallo cardiaco en conejo (Laugwitz y cols., 2001). Esto se debe a que las caspasas activas a nivel cardiaco fragmentan sustratos entre los que se encuentran la α -actina, tropomiosina o troponinas cardiacas (Communal y cols., 2002). Lo cual estaría en consonancia con las alteraciones de contractilidad que han sido descritos en la literatura para los corazones procedentes de donantes en muerte encefálica (Szabo y cols., 2001).

En cuanto a los miembros de la familia Bcl-2, como BAX y BCL-2, se observaron incrementos en sus niveles de expresión de 4,89 y 3,76 respectivamente, sobre los valores basales. Sin embargo, en el primer caso los niveles de dicho gen presentan valores significativamente mayores a los del grupo control. Sugiriendo que la vía intrínseca también se encuentra activada en tejido cardíaco durante la ME, si bien se deduce que de una manera menos intensa que la anterior.

Clásicamente, la relación Bax/Bcl2 ha sido un parámetro utilizado como indicador del balance entre la muerte y la supervivencia celular (Adams y Cory, 1998). En nuestro caso, la relación de proporcionalidad entre los niveles de expresión de BAX (proapoptótica) y BCL2 (antiapoptótica) estaba claramente a favor de la molécula apoptótica. Asimismo, la expresión incrementada de Bcl-2 con respecto a Bax ha sido propuesta como un posible mecanismo compensatorio en el fallo cardíaco congestivo (Olivetti y cols., 1997). Las evidencias que apoyan la existencia de vías apoptóticas dependientes de Bcl-2 en miocitos cardíacos son escasas, si bien se ha visto que Bcl-2 inhibe la muerte de las células cardíacas ventriculares en rata (Kirshenbaum y de Moissac, 1997). Por otra parte, Saraste y cols., (1999) demostraron un incremento en la expresión de Bcl-2 en los cardiomiocitos en pacientes de cardiomiopatía dilatada, lo cual nos indica la activación de una respuesta antiapoptótica frente a la apoptosis que ya se había iniciado en la zona de la lesión.

Para completar la aproximación a la regulación del proceso apoptótico a través de la vía mitocondrial o intrínseca se analizó la expresión del CITOCROMO C. La liberación al citosol de esta molécula y de otros factores proapoptóticos mitocondriales (Luo y cols., 1998) es inducida por moléculas proapoptóticas, como Bax. En el caso del Citocromo C no se observaron diferencias significativas en la expresión de este gen entre los dos grupos estudiados.

El proceso apoptótico en el corazón es estimulado, entre otros, por el alargamiento de las fibras, el estrés de las paredes, citoquinas y neurohormonas, como la

noradrenalina (Communal y cols., 1999). Teniendo en cuenta los altos niveles de noradrenalina que presentan nuestros donantes, todo parece indicar que dicho proceso tendría que estar activado en nuestros corazones, como se pone de manifiesto con los resultados.

En relación con los hallazgos anteriores, van der Hoeven y cols. (2003) en un estudio molecular llevado a cabo en hígado de ratas a las que se les provocaba la ME, encontraron niveles aumentados en la expresión de los genes apoptóticos Fas, Bax y Caspasa-3 en relación con el grupo control, al igual que ocurre en nuestros resultados. Por otra parte, un reciente estudio publicado (Adrie y cols., 2010) parte de una hipótesis de trabajo similar a la nuestra, ya que se plantean la posible asociación de la ME con la respuesta apoptótica combinada con la respuesta inflamatoria y para comprobarlo estudian biopsias de músculo esquelético. Los autores encontraron que numerosos genes proapoptóticos que incluían antagonistas de Bcl-2, Bax o Bad entre otros, no mostraban diferencias entre los dos grupos estudiados (pacientes con ME y grupo control formado por personas sometidas a cirugía de cadera y voluntarios sanos), sin embargo existía otro grupo de genes entre los que se encontraba la Caspasa-9 que solo se expresaban en el grupo de donantes. La caspasa-9 contribuye a la muerte celular a través de la vía intrínseca de la apoptosis activando a la caspasa 3, lo cual estaría de acuerdo con los niveles incrementados de caspasa-3 que observamos en nuestro estudio.

Por otra parte, y teniendo en cuenta que la hipoxia puede estimular tanto a componentes del receptor de muerte celular (vía extrínseca) como la vía mitocondrial (Reeve y cols., 2007) y que en ratas la apoptosis de los cardiomiocitos se induce por hipoxia (Tanaka y cols., 1994) se examinó la expresión del gen HIF1 α para descartar la posibilidad de que el daño se debiese a hipoxia. Se trata de un factor de transcripción heterodímero que presenta una subunidad α oxígeno dependiente y una subunidad β que es constitutiva. Es una proteína que ha sido detectada en diferentes tipos celulares *in vivo* y cuya expresión aumenta en respuesta a la hipoxia (Stroka y

cols., 2001). Se observaron niveles bajos de expresión de dicho gen tanto en el grupo control como en el grupo de donantes, por lo que se concluyó que se puede descartar daño hipóxico importante en el tejido cardíaco inmediatamente después de la extracción y que, no parece haber diferencias entre la hipoxia sufrida por los dos grupos experimentales. Estos resultados están en consonancia con el artículo publicado por Schuurs y cols., (2006) en el que se pone de manifiesto que la hipoxia parece no ser intensa en los donantes de ME y, por tanto, no sería uno de los puntos iniciadores de la cascada inflamatoria. Si además consideramos que uno de los principales estímulos que activa la vía intrínseca es la anoxia, la falta de incremento sustancial en los niveles de expresión de HIF1 α y de los genes relacionados con la vía intrínseca (Bax o Citocromo C) es consistente con nuestros hallazgos.

De modo que, en consonancia con nuestros resultados y teniendo en cuenta que el proceso apoptótico puede tener consecuencias en cuanto a pérdida de contractilidad y de volumen cardíaco (Khoynzhad y cols., 2007), parece lógico plantearse llevar a cabo terapias anti-apoptóticas encaminadas a minimizar los daños que a este nivel se produzcan como consecuencia de la muerte encefálica, con la finalidad de mejorar la calidad de los corazones extraídos para trasplante cardíaco.

EXPERIMENTO 3:

**JOURNAL OF HEART AND LUNG TRANSPLANTATION 28(8): 815-820
(2009)**

**BRAIN DEATH EFFECTS ON CATECHOLAMINE LEVELS AND
SUBSEQUENT CARDIAC DAMAGE ASSESSED IN ORGAN DONORS.**

SILVIA PÉREZ LÓPEZ, JESÚS OTERO HERNÁNDEZ, NATALIA VÁZQUEZ
MORENO, DOLORES ESCUDERO AUGUSTO, FRANCISCO ÁLVAREZ
MENÉNDEZ, AURORA ASTUDILLO GONZÁLEZ.

En nuestro estudio, los niveles plasmáticos de catecolaminas aparecieron aumentados en la mayoría de casos. Para la adrenalina detectamos el valor pico coincidiendo con el momento de la ME, si bien el incremento fue de tan solo 2,36 veces por encima de los valores estándar. El valor pico de la noradrenalina apareció una hora después de la ME y fue de 8,56 veces los valores normales. Finalmente, la dopamina mostró su valor pico en el momento de la ME que decreció progresivamente en las 4 horas posteriores y arrojó unos valores de 54,76 veces por encima de los valores estándar. Nuestros resultados respecto a los niveles plasmáticos de adrenalina y dopamina confirman los obtenidos previamente en animales por otros autores, especialmente para la adrenalina. Hasta el momento, lo descrito en la literatura refería una activación del SNA conocida como “Tormenta Simpática” que provoca un incremento de los niveles de catecolaminas hasta 7 u 8 veces por encima de las concentraciones normales, seguido de niveles en torno a la normalidad y de una caída hasta niveles por debajo de los valores estándar (Chen y cols., 1996).

Sin embargo, no ocurre así en el caso de la noradrenalina, ya que no se registra el valor pico hasta una hora más tarde. Esto está en consonancia con lo observado por Mertes y cols., (1994a) que en un estudio llevado a cabo en cerdo observaron niveles aumentados de adrenalina y noradrenalina 45 minutos después de haberse producido la ME describiendo un segundo pico de noradrenalina, solo que en nuestro caso no se

observó el primer pico coincidente con el momento de la ME. En cambio, otros autores observaron dichos incrementos tras varias horas (Bittner y cols., 1995; Christé y cols., 2006).

En nuestro estudio no observamos el segundo pico descrito en la literatura, coincidiendo con Powner y cols. (1992) que tampoco constataron la presencia del mismo.

En un estudio en humanos llevado a cabo por Powner y cols., (1992) se muestra que las concentraciones séricas de catecolaminas no se comportan de manera uniforme en todos los individuos, así en un paciente los niveles de catecolaminas decrecieron justo antes del diagnóstico clínico de la ME, pero en general, encuentran que los niveles de catecolaminas aumentan antes de la muerte encefálica, más concretamente entre 5 y 30 veces para la adrenalina; entre 2 y 6 veces para la noradrenalina y entre 2,5 y 18 veces para la dopamina.

Hay que tener en cuenta algunas limitaciones en nuestro estudio, el fenómeno de la “tormenta simpática” tiene lugar en un corto espacio de tiempo (minutos) con lo cual pueden existir diferencias entre los pacientes en cuanto a los tiempos de muestreo. Por otra parte, para el mantenimiento de los niveles de presión arterial y para mejorar tanto la perfusión como la función de los órganos del donante se utiliza medicación vasopresora, fundamentalmente noradrenalina, lo que puede influir en cierta forma en los resultados que hemos obtenido en cuanto a niveles hormonales. Aunque también ha de tenerse en consideración que la noradrenalina se elimina rápidamente, ya que tiene una vida media en torno a 2-2,5 minutos (Beloeil y cols., 2005). Por otra parte, en un reciente estudio (Marthol y cols., 2010) realizado en 5 pacientes con ME, encuentran que en dos de ellos que mostraron un incremento en la actividad simpática no se había utilizado tratamiento vasopresor con noradrenalina, con lo cual quedaría descartada la posible influencia de la noradrenalina administrada exógenamente en los niveles hormonales registrados. Asimismo, otra limitación es el hecho de que nuestro estudio carece de grupo control, debido a la dificultad de

obtención de muestras de tejido cardíaco sano, de forma que los resultados son meramente descriptivos, no pudiendo ser utilizados con fines estadísticos.

Tradicionalmente se consideró que la liberación masiva de catecolaminas podía dañar de forma directa el tejido cardíaco. Así en un modelo experimental, concretamente en corazones de *Chacma baboon* extraídos 12 horas tras la ME, se observó daño del tejido de conducción del músculo liso de las arterias coronarias y de los miocitos a nivel fundamentalmente subendocárdico. Este daño no aparecía cuando la liberación de catecolaminas endógenas se revertía mediante una simpatectomía cardíaca total antes de la ME, indicando el importante papel que las catecolaminas ejercen en el daño miocárdico posterior a la ME (Novitzky y cols., 1986, 1988).

En la misma línea, Shivalkar y cols., (1993) tras inducir experimentalmente la ME en perro demostraron que sus corazones mostraban miocitolisis, necrosis de las bandas de contracción, hemorragia subendocárdica y edema e infiltrado intersticial de células mononucleares. Las bandas de contracción han sido, asimismo identificadas en corazones obtenidos a partir de autopsias practicadas tras la ME en un 89% de pacientes que no presentaban patología cardíaca previa (Baroldi y cols., 1997).

En nuestro caso, al estudiar las lesiones cardíacas características de ME tuvimos que del número total de donantes incluidos en el estudio (50) se observaron bandas de contracción en un 54% de las muestras. La necrosis de los cardiomiocitos apareció de manera focal en un 62% de los casos, afectando a áreas variables, que en ningún caso excedían del 3% del área total.

Los infiltrados de células mononucleares aparecieron en 6 donantes, lo cual supone un porcentaje del 12%. Estos infiltrados nunca iban acompañados de necrosis y en 3 casos se relacionó la presencia de este tipo lesión con la hipoxia aguda. En estos tres casos los tiempos de espera hasta la extracción de órganos fueron de 7, 10 y 11 horas respectivamente.

Nuestros resultados histológicos confirman los resultados previos obtenidos por otros autores en modelos animales, poniendo de manifiesto que el daño estructural descrito como característico de la ME se corresponde con las lesiones anteriormente referidas. Es importante señalar que a pesar de lo expuesto anteriormente, existen estudios llevados a cabo en modelos animales que muestran que estos mecanismos que en el pasado se creía que explicaban el deterioro hemodinámico del organismo en ME como la estimulación del SNA, la liberación hormonal, las alteraciones a nivel histológico parecen no ser la causa de la disfunción miocárdica (Szabo y cols., 1998a).

Así, Galinanes y Hearse, (1992) demostraron que la extracción y la perfusión *ex vivo* del corazón revierte la disfunción contráctil tras la ME en un modelo de rata, si bien los niveles de catecolaminas no mostraban diferencias entre el grupo control y el grupo con ME. En otro estudio (Szabo y cols., 1998b) estudiaron el papel de los factores neurohumorales y las condiciones de carga cardiaca tras la ME utilizando corazones *ex vivo* procedentes de donantes en ME y donantes pseudo-operados; aunque tras el explante se observó *in vivo* un deterioro hemodinámico asociado a la ME, el estudio de la función de los dos grupos de corazones *ex vivo* no fue significativamente diferente.

Algunas lesiones observadas en nuestros pacientes como consecuencia de la ME, como la necrosis de los cardiomiocitos, se observan también en algunas patologías cardiacas como en el infarto agudo de miocardio (IAM). Para descartar esa posibilidad en nuestro estudio, se determinaron los niveles de Troponina T, sólo uno de los pacientes incluido presentó unos niveles de 0,225 ng/ml (se considera patológico por encima de 0,15 ng/ml) y fue eliminado del estudio por esta causa.

Por otra parte, la necrosis tisular es un daño también característico en situaciones que conllevan hipoxia aguda. En nuestras muestras, la necrosis asociada a hipoxia aguda afectaba a un pequeño porcentaje del área total de la sección de músculo cardiaco (< 3%) y estaba distribuida de forma dispersa, este tipo de distribución del daño puede explicarse basándonos en el hecho de que durante el proceso de ME el

corazón no se encuentra sometido al mismo daño debido a las diferencias regionales en cuanto a distribución sanguínea, especialmente en las zonas subendocárdicas de los ventrículos. Este porcentaje tan pequeño de lesión, indica que las consecuencias para el órgano trasplantado serán mínimas, de forma, que las lesiones necróticas de localización fundamentalmente subendocárdica que se describen con frecuencia en biopsias de control obtenidas durante el primer mes post-trasplante, probablemente no deben atribuirse al proceso de ME.

Sin embargo, en contraposición, es importante tener en cuenta que para algunos autores, los mínimos cambios necróticos descritos, pueden ser la causa de rechazo dada la presencia de células dendríticas intersticiales capaces de llevar a cabo el procesamiento y presentación de antígenos (Herskowitz y cols., 1987).

En resumen, estos resultados ponen de manifiesto la presencia en el tejido cardíaco de lesiones tisulares típicas de la ME, a la vez que aumenta la liberación plasmática de catecolaminas. Sin embargo, el área afectada no parece ser extensa, por lo que deducimos que el daño cardíaco observado en corazones procedentes de donantes en ME y por el que en ocasiones dicho órgano no puede utilizarse para el trasplante no se puede atribuir a este hecho.

Asimismo, podemos afirmar que el proceso apoptótico se encuentra activado en el tejido cardíaco tras la ME, demostrándose la estimulación de ambas vías apoptóticas (intrínseca y extrínseca). Todo ello nos hace pensar que la causa de que algunos corazones procedentes de donantes en ME no puedan ser utilizados se debe más bien al proceso apoptótico desencadenado durante la ME, por lo cual sería interesante la búsqueda de terapias antiapoptóticas para mejorar la funcionalidad de los órganos extraídos.

Conclusiones

PRIMERA

Los genes PPIA, RPLP y GADPH pueden ser utilizados de forma conjunta como genes de referencia para la normalización de los resultados obtenidos en estudios de expresión génica por PCR cuantitativa a tiempo real en tejido cardiaco humano.

SEGUNDA

Se descarta el uso del gen TBP como control endógeno para tejido cardiaco humano.

TERCERA

La vía extrínseca de regulación de la apoptosis se encuentra activada durante la muerte encefálica en tejido cardiaco humano con una expresión aumentada del gen Fas.

CUARTA

La muerte encefálica provoca en tejido cardiaco una activación de la vía intrínseca de regulación de la apoptosis, con una sobreexpresión de los genes Bax y Caspasa 3.

QUINTA

Los niveles plasmáticos de adrenalina y dopamina aumentan durante la muerte encefálica, confirmando la tormenta simpática descrita previamente en animales. Sin embargo, la magnitud de la respuesta difiere de ésta, ya que mientras en el caso de la adrenalina es menor, para el caso de la dopamina es mucho mayor.

SEXTA

La noradrenalina sigue un patrón diferente a la del resto de catecolaminas, ya que no se observa un aumento en sus valores hasta una hora tras la muerte encefálica.

SÉPTIMA

Las lesiones histológicas aparecen en un porcentaje elevado de donantes. Sin embargo, dichas lesiones ocupan un área muy pequeña, que no parece ser suficiente para alterar la función cardiaca post trasplante.

Conclusions

FIRST

The set of PPIA, RPLP and GADPH genes can be used as reference to normalize quantitative gene expression PCR results obtained in human cardiac tissue.

SECOND

The TBP gene is ruled out as a good endogenous control for human cardiac tissue.

THIRD

During brain death, the extrinsic apoptotic pathway is activated in human cardiac tissue causing an increase in Fas gene expression.

FOURTH

In cardiac tissue, brain death induces activation of the intrinsic apoptotic pathway and overexpression of Bax and Caspase 3 genes.

FIFTH

During brain death, plasma adrenaline and dopamine levels rise, confirming the catecholaminergic storm previously described in animals. However, the magnitude of this response differs in that the adrenaline surge is lower and the dopamine surge is much higher than in animals.

SIXTH

Unlike the remaining catecholamines, noradrenaline does not peak until an hour after brain death.

SEVENTH

Histological lesions may be observed in a high percentage of heart transplant donor organs. However, these lesions affect an insufficient area of tissue to have any substantial effects on post-transplant cardiac function.

Resumen

Los cambios que se producen durante la ME se relacionan con las alteraciones hemodinámicas y neuroendocrinas que ocurren durante la herniación cerebral. Esto se traduce en una intensa activación del sistema nervioso autónomo conocida como la ‘tormenta simpática’, que provoca un incremento de los niveles de catecolaminas por encima de 7 u 8 veces las concentraciones normales (Chen y cols., 1996). Esta circunstancia provoca cambios en el tejido cardíaco tanto a nivel histológico (Novitzky y cols., 1989) como génico (Yeh y cols., 1999). Asimismo, la ME ha sido recientemente relacionada con la aparición de fenómenos apoptóticos en animales como la rata (Van der Hoeven y cols., 2003; Kusaka y cols., 1995) o el conejo (Kirsch y cols., 1999) y en diversos tejidos humanos como riñón (Carstens y cols., 2005; Hes y cols., 2002) o músculo esquelético (Adrie y cols., 2010). En tejido cardíaco el fenómeno apoptótico puede implicar una reducción en la masa contráctil, lo cual se asociaría con fallo cardíaco (Khoynezhad, 2007).

Ante la escasez de información en la literatura acerca de las alteraciones causadas por la muerte encefálica en humanos y de la posible implicación del proceso apoptótico en la misma, nos hemos planteado estudiar la respuesta simpática y las alteraciones histológicas en el músculo cardíaco tras la muerte encefálica. Asimismo, se valorará la posible relación del citado proceso con el fenómeno apoptótico.

Por otra parte, al inicio del estudio nos planteamos valorar la eficacia de un grupo de genes (GADPH, PPIA, ACTB, YWHAZ, ARN 18S, B2M, UBC, TBP, RPLP y HPRT) para ser usados como genes de referencia para normalizar los datos obtenidos en estudios de expresión génica en tejido humano procedente de donantes en muerte encefálica.

Más concretamente, los objetivos de nuestro trabajo fueron:

- Determinar el gen o genes de referencia adecuados para tejido cardíaco humano, utilizando para ello los programas informáticos “geNorm” y “Normfinder”

- Relacionar desde el punto de vista de la expresión génica, la muerte encefálica con el proceso de apoptosis, valorando para ello la expresión de genes implicados en el proceso de apoptosis como son: BAX, BCL2, Caspasa 3, citocromo C y FAS
- Estudiar si durante la muerte encefálica se produce la “tormenta simpática” previamente observada en animales y, por otro lado, conocer las lesiones histológicas que se produzcan en el corazón durante la muerte encefálica.

Los principales resultados obtenidos son los siguientes:

- Los genes PPIA, RPLP y GADPH resultaron ser los mas estables, lo cual sugiere que el uso de los tres de forma conjunta es una buena opción como genes de referencia para valorar la expresión génica en tejido cardiaco humano.
- Durante la muerte encefálica se inicia un proceso apoptótico en el tejido cardiaco.
- Se observa una secreción aumentada de catecolaminas, concretamente de adrenalina y dopamina durante la muerte encefálica y de noradrenalina una hora tras la muerte.
- Si bien se observan lesiones tisulares en el corazón, éstas afectan a un área muy pequeña y por lo tanto no parecen ser las responsables del posterior fallo cardiaco tras el transplante.

Dichos resultados se recogen en los siguientes artículos que conforman la memoria de tesis doctoral:

- *Identifying the most suitable endogenous control for determining gene expression in hearts from organ donors.*

Pérez S, Royo LJ, Astudillo A, Escudero D, Alvarez F, Rodríguez A, Gómez E, Otero J.

BMC Mol Biol. 2007 Dec 20;8:114.

- *A molecular approach to apoptosis in the human heart during brain death.*
Pérez López S, Vázquez Moreno N, Escudero Augusto D, Astudillo González A, Alvarez Menéndez F, Goyache Goñi F, Otero Hernández J.
Transplantation. 2008 Oct 15;86(7):977-82.
- *Brain death effects on catecholamine levels and subsequent cardiac damage assessed in organ donors.*
Pérez López S, Otero Hernández J, Vázquez Moreno N, Escudero Augusto D, Alvarez Menéndez F, Astudillo González A.
J Heart Lung Transplant. 2009 Aug;28(8):815-20.

Bibliografía

A

- Aaslid R, Markwalder TM, Nornes H. *Noninvasive transcranial Doppler ultrasound recording of flow velocity in basal cerebral arteries.* J Neurosurg. 1982. 57(6):769-774.
- Acehan D, Jiang X, Morgan DG, Heuser JE, Wang X, Akey CW. *Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation.* Mol Cell. 2002. 9(2):423-432.
- Adams JM, Cory S. *The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival.* Science. 1998. 281(5381):1322-1326.
- Adrie C, Monchi M, Fulgencio JP, Cottias P, Haouache H, Alvarez-Gonzalez A, Guerrini P, Cavaillon JM, Adib-Conquy M. *Immune status and apoptosis activation during brain death.* Shock. 2010. 33(4):353-362.
- Aikawa R, Komuro I, Yamazaki T, Zou Y, Kudoh S, Tanaka M, Shiojima I, Hiroi Y, Yazaki Y. *Oxidative stress activates extracellular signal-regulated kinases through Src and Ras in cultured cardiac myocytes of neonatal rats.* J Clin Invest. 1997.100(7):1813-1821.
- American Clinical Neurophysiology Society. *Guideline 3: Minimum technical standards for EEG recording in suspected cerebral death.* J Clin. Neurophysiol. 2006. 23:97-104.
- Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF. *Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets.* Cancer Res. 2004. 64(15):5245-5250.
- Antonsson B, Montessuit S, Lauper S, Eskes R, Martinou JC. *Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome c release from mitochondria.* Biochem J. 2000. 345 Pt 2:271-278.
- Antonsson B. *Bax and other pro-apoptotic Bcl-2 family "killer-proteins" and their victim the mitochondrion.* Cell Tissue Res. 2001. 306: 347.
- Ashkenazi A. *Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily.* Nat Rev Cancer. 2002. 2(6):420-430.

B

- Baroldi G, Di Pasquale G, Silver MD, Pinelli G, Lusa AM, Fineschi V. *Type and extent of myocardial injury related to brain damage and its significance in heart transplantation: a morphometric study.* J Heart Lung Transplant. 1997. 16(10):994-1000.

- Beloeil H, Mazoit JX, Benhamou D, Duranteau J. *Norepinephrine kinetics and dynamics in septic shock and trauma patients*. Br J Anaesth. 2005. 95(6):782-788.
- Bengtsson M, Karlsson HJ, Westman G, Kubista M. *A new minor groove binding asymmetric cyanine reporter dye for real-time PCR*. Nucleic Acids Res. 2003. 31(8):e45.
- Birks EJ, Yacoub MH, Burton PS, Owen V, Pomerance A, O'Halloran A, Banner NR, Khaghani A, Latif N. *Activation of apoptotic and inflammatory pathways in dysfunctional donor hearts*. Transplantation. 2000. 70(10):1498-1506.
- Bittner HB, Kendall SW, Campbell KA, Montine TJ, Van Trigt P. *A valid experimental brain death organ donor model*. J Heart Lung Transplant. 1995. 14(2):308-317.
- Bittner HB, Chen EP, Biswas SS, Van Trigt P 3rd, Davis RD. *Ann Thorac. Right ventricular dysfunction after cardiac transplantation: primarily related to status of donor heart*. Surg. 1999. 68(5):1605-1611.
- Black SC, Huang JQ, Rezaiefar P. *Colocalization of the cysteine protease caspase-3 with apoptotic myocytes after in vivo myocardial ischemia and reperfusion in the rat*. J Mol Cell Cardiol. 1998. 30(4):733-742.
- Borner C. *The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions*. Mol Immunol. 2003. 39(11):615-647.
- Bradac GB, Simon RS. *Angiography in brain death*. Neuroradiology. 1974. 7(1):25-28.
- Bratton SB, MacFarlane M, Cain K, Cohen GM. *Protein complexes activate distinct caspase cascades in death receptor and stress-induced apoptosis*. Exp Cell Res. 2000. 256(1):27-33.
- Bratton SL, Davis RL. *Acute lung injury in isolated traumatic brain injury*. Neurosurgery. 1997. 40(4):707-712.
- Braun M, Ducrocq X, Huot JC, Audibert G, Anxionnat R, Picard L. *Intravenous angiography in brain death: report of 140 patients*. Neuroradiology. 1997. 39:400-405.
- Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, Wang X. *Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis*. Annu Rev Cell Dev Biol. 1999. 15:269-290.
- Busson M, N'Doye P, Benoit G. *Donor factors influencing organ transplant prognosis*. Transplant Proc. 1995. 27(2):1662-1664.
- Bustin SA, Nolan T. *Pitfalls of quantitative real-time reverse transcription Polymerase Chain Reaction*. J Biomol Tech. 2004. 15:155-166.
- Bustin SA. *Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays*. J Mol Endocrinol. 2000. 25(2):169-193.

C

- Cai J, Jones DP. *Superoxide in apoptosis. Mitochondrial generation triggered by cytochrome c loss.* J Biol Chem. 1998. 273(19):11401-11404.
- Carstens J, Markussen N, Madsen M. *The granule exocytosis and Fas/FasLigand pathways at the time of transplantation and during borderline and acute rejection of human renal allografts.* Transplant Proc. 2005. 37(8):3294-3297.
- Cecconi F, Alvarez-Bolado G, Meyer BI, Roth KA, Gruss P. *Apaf1 (CED-4 homolog) regulates programmed cell death in mammalian development.* Cell. 1998. 94(6):727-737
- Chai CL, Tu YK, Huang SJ. *Can cerebral hypoperfusion after sympathetic storm be used to diagnose brain death? A retrospective survey in traumatic brain injury patients.* J Trauma. 2008. 64(3):688-697.
- Chamorro C, Romera MA, Silva JA, Valdivia M, Ortega A. *Can heart donation exclusion factors be overcome?.* Rev. Esp. Cardiol. 2006. 59(3): 232-237.
- Chen EP, Bittner HB, Kendall SW, Van Trigt P. *Hormonal and hemodynamic changes in a validated animal model of brain death.* Crit Care Med. 1996. 24(8):1352-1359.
- Cheng W, Li B, Kajstura J, Li P, Wolin MS, Sonnenblick EH, Hintze TH, Olivetti G, Anversa P. *Stretch-induced programmed myocyte cell death.* J Clin Invest. 1995. 96(5):2247-2259
- Chen-Scarabelli C, Scarabelli TM. *Turning necrosis into apoptosis: the exacting task that can enhance survival.* Am Heart J. 2004. 148(2):196-199.
- Chiappa KH. *Use of evoked potentials for diagnosis of multiple sclerosis.* Neurol Clin. 1988. 6(4):861-880.
- Chiari P, Hadour G, Michel P, Piriou V, Rodriguez C, Budat C, Ovize M, Jegaden O, Lehot JJ, Ferrera R. *Biphasic response after brain death induction: prominent part of catecholamines release in this phenomenon.* J Heart Lung Transplant. 2000. 19(7):675-682.
- Christé G, Hadour G, Ovize M, Ferrera R. *Brain death does not change epicardial action potentials and their response to ischemia-reperfusion in open-chest pigs.* J Heart Lung Transplant. 2006. 25(7):847-853.
- Cohen GM. *Caspases: the executioners of apoptosis.* Biochem J. 1998. 326: 1-16.
- Communal C, Singh K, Sawyer DB, Colucci WS. *Opposing effects of beta(1)- and beta(2)-adrenergic receptors on cardiac myocyte apoptosis : role of a pertussis toxin-sensitive G protein.* Circulation. 1999. 100(22):2210-2212.

Communal C, Sumandea M, de Tombe P, Narula J, Solaro RJ, Hajjar RJ. *Functional consequences of caspase activation in cardiac myocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002. 99(9):6252-6256.

Cook SA, Poole-Wilson PA. *Cardiac myocyte apoptosis*. Eur Heart J. 1999. 20(22):1619-1629.

Cooper DK, Novitzky D, Wicomb WN. *The pathophysiological effects of brain death on potential donor organs, with particular reference to the heart*. Ann R Coll Surg Engl. 1989. 71(4):261-266.

Cooper DK, Wicomb WN, Barnard CN. *Storage of the donor heart by a portable hypothermic perfusion system: experimental development and clinical experience*. J Heart Transplant. 1983. 2:104-110.

Cory S, Adams JM. *The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch*. Nat Rev Cancer. 2002. 2(9):647-656.

Cronin M, Ghosh K, Sistare F, Quackenbush J, Vilker V, O'Connell C. *Universal RNA reference materials for gene expression*. Clin Chem. 2004. 50(8):1464-1471.

Cushing H. *Concerning a definite regulatory mechanism of the vascular center which controls blood pressure during cerebral compression*. Bull Johns Hopkins Hosp. 1901. 12:290-292.

D

Deindl E, Boengler K, van Royen N, Schaper W. *Differential expression of GAPDH and beta3-actin in growing collateral arteries*. Mol Cell Biochem. 2002. 236(1-2):139-146.

Demissie A, Abebe M, Aseffa A, Rook G, Fletcher H, Zumla A, Weldingh K, Brock I, Andersen P, Doherty TM; *Healthy individuals that control a latent infection with Mycobacterium tuberculosis express high levels of Th1 cytokines and the IL-4 antagonist IL-4delta2*. VACSEL Study Group. J Immunol. 2004. 172(11):6938-6943.

Denault JB, Salvesen GS. *Caspases: keys in the ignition of cell death*. Chem Rev. 2002. 102(12):4489-4500.

Dluhy RG, Lawrence JE, Williams GH. *Endocrine hypertension*. In: Larsen PR, Kronenberg HM, Melmed S, ed. *Williams Textbook of Endocrinology*. WB Saunders. 2003. 555.

Donchin E, Ritter W, McCallum WC. *Cognitive psychophysiology: the endogenous components of the ERPs en Callaway AE, Tueting P, Koslow SH editors*. Event-related potentials in man. Nueva York: Academic Press. 1978. 349-441.

Ducrocq X, Braun M, Debouverie M, Junges C, Hummer M, Vespignani H. *Brain death and transcranial Doppler: experience in 130 cases of*

brain dead patients. *J Neurol Sci.* 1998. 160(1):41-46.

Dupas B, Gayet-Delacroix M, Villers D, Antonioli D, Veccherini MF, Soullillou JP. *Diagnosis of brain death using two-phase spiral CT.* *AJNR Am J Neuroradiol.* 1998. 19(4):641-647.

E

Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. *Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis.* *Annu Rev Biochem.* 1999. 68:383-424.

Eisenhofer G, Kopin IJ, Goldstein DS. *Catecholamine metabolism: a contemporary view with implications for physiology and medicine.* *Pharmacol Rev.* 2004. 56(3):331-349.

Emery RW, Cork RC, Levinson MM, Riley JE, Copeland J, McAleer MJ, Copeland JG; *The cardiac donor: a six-year experience.* *Ann Thorac Surg.* 1986. 41(4): 356-362.

Escudero D, Otero J, Muñiz G, Gonzalo JA, Calleja C, González A, Martínez A, Parra D, Yano R, Taboada F. *The Bispectral Index Scale: its use in the detection of brain death.* *Transplant Proc.* 2005. 37(9):3661-3663.

Escudero D. *Brain death diagnosis.* *Med Intensiva.* 2009. 33(4):185-195.

F

Flatmark T, Almas B, Ziegler MG. *Catecholamine metabolism: an update on key biosynthetic enzymes and vesicular monoamine transporters.* *Ann N Y Acad Sci.* 2002. 971:69-75.

Fletcher HA, Owiafe P, Jeffries D, Hill P, Rook GA, Zumla A, Doherty TM, Brookes RH *Increased expression of mRNA encoding interleukin (IL)-4 and its splice variant IL-4delta2 in cells from contacts of Mycobacterium tuberculosis, in the absence of in vitro stimulation.* *Vacsel Study Group. Immunology.* 2004. 112(4):669-673.

Frapas E, Videcoq M, de Kerviler E, Ricolfi F, Kuoeh V, Mourey F, Tenaillon A, Dupas B. *CT angiography for brain death diagnosis.* *AJNR Am J Neuroradiol.* 2009. 30(8):1566-1570.

G

Galiñanes M, Hearse DJ. *Brain death-induced impairment of cardiac contractile performance can be reversed by explantation and may not preclude the use of hearts for transplantation.* *Circ Res.* 1992. 71(5):1213-1219.

Gallardo A, Anguita M, Franco M, Giménez D, Torres F, Ciudad M, López-Granados A, Mesa D, Arizón JM, Concha M. *The echocardiographic findings in*

- patients with brain death, the implications for their selection as heart transplant donors. *Rev Esp Cardiol.* 1994. 47: 604-608.
- Gan TJ, Glass PS, Windsor A, Payne F, Rosow C, Sebel P, Manberg P. *Bispectral index monitoring allows faster emergence and improved recovery from propofol, alfentanil, and nitrous oxide anesthesia.* BIS Utility Study Group. *Anesthesiology.* 1997. 87(4):808-815.
- Gibbs PJ, Cameron C, Tan LC, Sadek SA, Howell WM. *House keeping genes and gene expression analysis in transplant recipients: a note of caution.* *Transpl Immunol.* 2003. 12(1):89-97.
- Gilbert EM, Krueger SK, Murray JL, Renlund DG, O'Connell JB, Gay WA, Bristow MR. *Echocardiographic evaluation of potential cardiac transplant donors.* *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1988. 95(6):1003-1007.
- Gilbert TT, Wagner MR, Halukurike V, Paz HL, Garland A. *Use of bispectral electroencephalogram monitoring to assess neurologic status in unsedated, critically ill patients.* *Crit Care Med.* 2001. 29(10):1996-2000.
- Gilsbach R, Kouta M, Bönisch H, Brüß M. *Comparison of in vitro and in vivo reference genes for internal standardization of real-time PCR data.* *Biotechniques.* 2006. 40(2):173-177.
- Glare EM, Divjak M, Bailey MJ, Walters EH. *Beta-Actin and GAPDH housekeeping gene expression in asthmatic airways is variable and not suitable for normalising mRNA levels.* *Thorax* 2002. 57:765-770.
- Gonzalez FM., De la Riva A., Vallejo JA., Robles JC, Infante de la Torre JR, Delgado F. *Medicina nuclear y diagnostico de muerte encefálica: angiogramagrafía cerebral ⁹⁹Tc-HMPAO.* Sensibilidad y especificidad diagnostica. *Medicina Intensiva.* 2000. 4:143-150.
- Gorzelnik K, Janke J, Engeli S, Sharma AM. *Validation of endogenous controls for gene expression studies in human adipocytes and preadipocytes.* *Horm Metab Res.* 2001. 33(10):625-627.

H

Halejcio-Delophont P, Siaghy EM, Devaux Y, Richoux JP, Bischoff N, Carreaux JP, Ungureanu-Longrois D, Burlet C, Villemot JP, Mertes PM. *Consequences of brain death on coronary blood flow and myocardial metabolism.* *Transplant Proc.* 1998. 30(6):2840-2841.

Hamalainen HK, Tubman JC, Vikman S, Kyrölä T, Ylikoski E, Warrington JA, Lahesmaa R. *Identification and validation of endogenous reference genes for expression profiling of T helper cell differentiation by quantitative real-time RT-PCR.* *Anal Biochem.* 2001. 299(1):63-70.

Hansen MC, Nielsen AK, Molin S, Hammer K, Kilstrup M. *Changes in rRNA levels during stress invalidates results from mRNA blotting: fluorescence in situ rRNA hybridization permits renormalization for estimation of cellular mRNA levels.* J Bacteriol. 2001. 183(16):4747-4751.

Hekmatpanah J. *Cerebellar tumors in children and their management.* Semin Neurol. 1989. 9(3):225-230.

Herijgers P, Leunens V, Tjandra-Maga TB, Mubagwa K, Flameng W. *Changes in organ perfusion after brain death in the rat and its relation to circulating catecholamines.* Transplantation. 1996. 62(3):330-335.

Herskowitz A, Soule LM, Mellits ED. *Histologic predictors of acute cardiac rejection in human endomyocardial biopsies: a multivariate analysis.* J Am Coll Cardiol. 1987. 9(4):802-810.

Hes O, Treska V, Hasman D, Boudová L, Kuntscher V. *Determination of apoptotic cells in kidneys from non-heart-beating donors and heart-beating donors using the TUNEL assay: a limited immunohistochemical metho?* Transplant Proc. 2002. 34(4):1095-1097.

Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. *Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions.* Biotechnology (NY). 1993. 11(9):1026-1030.

Hu Y, Benedict MA, Wu D, Inohara N, Núñez G. *Bcl-XL interacts with Apaf-1 and inhibits Apaf-1-dependent caspase-9 activation.* Proc Natl Acad Sci U S A. 1998. 95(8):4386-4391.

Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A. *Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations.* Genes Immun. 2005. 6(4):279-284.

J

Jeremias I, Kupatt C, Martin-Villalba A, Habazettl H, Schenkel J, Boekstegers P, Debatin KM. *Involvement of CD95/Apo1/Fas in cell death after myocardial ischemia.* Circulation. 2000. 102(8):915-920.

K

Kaufmann SH, Earnshaw WC. *Induction of apoptosis by cancer chemotherapy.* Exp Cell Res. 2000. 256(1):42-49.

Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. *Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics.* Br J Cancer .1972. 26: 239-257.

Khoynezhad A, Jalali Z, Tortolani AJ. *A synopsis of research in cardiac apoptosis and its application to congestive heart failure.* Tex Heart Inst J. 2007. 34(3):352-359.

- Kirsch M, Bertrand S, Lecerf L, Ginat M, Garnier JP, Loisanse D. *Brain death-induced myocardial dysfunction: a role for apoptosis?* Transplant Proc. 1999. 31(3):1713-1714.
- Kirshenbaum LA, de Moissac D. The bcl-2 gene product prevents programmed cell death of ventricular myocytes. *Circulation*. 1997. 96(5):1580-1585.
- Kriett JM, Kaye MP. *The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: eighth official report--1991.* J Heart Lung Transplant. 1991. 10(4):491-498.
- Kroemer G, Reed JC. *Mitochondrial control of cell death.* Nat Med. 2000. 6: 513.
- Krown KA, Page MT, Nguyen C, Zechner D, Gutierrez V, Comstock KL, Glembotski CC, Quintana PJ, Sabbadini RA. *Tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis in cardiac myocytes. Involvement of the sphingolipid signaling cascade in cardiac cell death.* J Clin Invest. 1996. 98(12):2854-2865.
- Kubista M., Stahlberg A, Bar T. Light-up probe based real-time Q-PCR. In: Raghavachari R., Tan W. (Eds). *Genomics and Proteomics Technologies, Proceedings of SPIE.* 2001. 4264, pp.53-58.
- Kuida K, Haydar TF, Kuan CY, Gu Y, Taya C, Karasuyama H, Su MS, Rakic P, Flavell RA. *Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9.* Cell. 1998. 94(3):325-337.
- Kunisada K, Tone E, Negoro S, Nakaoka Y, Oshima Y, Osugi T, Funamoto M, Izumi M, Fujio Y, Hirota H, Yamauchi-Takahara K. *Bcl-xl reduces doxorubicin-induced myocardial damage but fails to control cardiac gene downregulation.* Cardiovasc Res. 2002. 53(4):936-943.
- Kusaka M, Fukami N, Sasaki H, Higuchi T, Ishikawa K, Shiroki R, Hoshinaga K. *IP-10, apoptotic genes, and calcineurin subtype messenger RNA kinetics occurring in rat renal isografts from brain-dead donors.* Transplant Proc. 2005. 37(1):361-363.
- Kuwana T, Smith JJ, Muzio M, Dixit V, Newmeyer DD, Kornbluth S. *Apoptosis induction by caspase-8 is amplified through the mitochondrial release of cytochrome c.* J Biol Chem. 1998. 273(26):16589-16594.

L

- Laguens RP, Meckert PM, Martino JS, Perrone S, Favalaro R. *Identification of programmed cell death (apoptosis) in situ by means of specific labeling of nuclear DNA fragments in heart biopsy samples during acute rejection episodes.* J Heart Lung Transplant. 1996. 15(9): 911-918.
- Laugwitz KL, Moretti A, Weig HJ, Gillitzer A, Pinkernell K, Ott T, Pragst I, Städele C, Seyfarth M,

- Schömig A, Ungerer M. *Blocking caspase-activated apoptosis improves contractility in failing myocardium*. Hum Gene Ther. 2001. 12 (17):2051-2063.
- Leclerc X, Taschner CA, Vidal A, Strecker G, Savage J, Gauvrit JY, Pruvo JP. *The role of spiral CT for the assessment of the intracranial circulation in suspected brain-death*. J Neuroradiol. 2006. 33(2):90-95.
- Leist M, Jäättelä M. *Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms*. Nat Rev Mol Cell Biol. 2001. 2(8):589-598.
- Li Y, Takemura G, Kosai K, Takahashi T, Okada H, Miyata S, Yuge K, Nagano S, Esaki M, Khai NC, Goto K, Mikami A, Maruyama R, Minatoguchi S, Fujiwara T, Fujiwara H. *Critical roles for the Fas/Fas ligand system in postinfarction ventricular remodeling and heart failure*. Circ Res. 2004. 95(6):627-636.
- Liu M, Zhang P, Chen M, Zhang W, Yu L, Yang XC, Fan Q. *Aging might increase myocardial ischemia / reperfusion-induced apoptosis in humans and rats*. Age (Dordr). 2011.
- López SP, Moreno NV, Augusto DE, González AA, Menéndez FA, Goñi FG, Hernández JO. *A molecular approach to apoptosis in the human heart during brain death*. Transplantation. 2008. 86(7):977-982.
- Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X. *Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors*. Cell. 1998. 94(4):481-490.
- Mallat Z, Tedgui A, Fontaliran F, Frank R, Durigon M, Fontaine G. *Evidence of apoptosis in arrhythmogenic right ventricular dysplasia*. N Engl J Med. 1996. 335(16):1190-1196.
- Marsden VS, O'Connor L, O'Reilly LA, Silke J, Metcalf D, Ekert PG, Huang DC, Cecconi F, Kuida K, Tomaselli KJ, Roy S, Nicholson DW, Vaux DL, Bouillet P, Adams JM, Strasser A. *Apoptosis initiated by Bcl-2-regulated caspase activation independently of the cytochrome c/Apaf-1/caspase-9 apoptosome*. Nature. 2002. 419 (6907):634-637.
- Marthol H, Intravooth T, Bardutzky J, De Fina P, Schwab S, Hilz MJ. *Sympathetic cardiovascular hyperactivity precedes brain death*. Clin Auton Res. 2010. 20(6):363-369.
- Martino A, Cabiati M, Campan M, Prescimone T, Minocci D, Caselli C, Rossi AM, Giannessi D, Del Ry S. *Selection of reference genes for normalization of real-time PCR data in minipig heart failure model and evaluation of TNF- α mRNA expression*. J Biotechnol. 2011. 153(3-4):92-99.

M

- McBride MA, Peters TG, Hendeson JM, et al. Expanded donor study. UNOS Report to Health Resources & Services Administration. 1997. pp.17-34.
- Meier P, Finch A, Evan G. *Apoptosis in development*. Nature. 2000. 407(6805):796-801.
- Mertes PM, el Abassi K, Jaboin Y, Burtin P, Pinelli G, Carreaux JP, Burlet C, Boulange M, Villemot JP. *Changes in hemodynamic and metabolic parameters following induced brain death in the pig*. Transplantation. 1994a. 58(4):414-418.
- Mertes PM, Carreaux JP, Jaboin Y, Pinelli G, el Abassi K, Dopff C, Atkinson J, Villemot JP, Burlet C, Boulange M. *Estimation of myocardial interstitial norepinephrine release after brain death using cardiac microdialysis*. Transplantation. 1994b. 57(3):371-377.
- Moniotte S, Vaerman J-L, Kockx MM, Larrouy D, Langin D, Noirhomme P, Balligand J-L. *Real-Time RT-PCR for the detection of beta-adrenoceptor messenger RNAs in small human endomyocardial biopsies*. J Mol Cell Cardiol. 2001. 33:2121-2133.
- Morgan K, Wharton J, Webb JC, Keogh BE, Smith PL, Taylor KM, Oakley CM, Polak JM, Cleland JG. *Co-expression of renin-angiotensin system component genes in human atrial tissue*. J Hypertens Suppl. 1994. 12(4):S11-19.
- Mund T, Gewies A, Schoenfeld N, Bauer MK, Grimm S. *Spike, a novel BH3-only protein, regulates apoptosis at the endoplasmic reticulum*. FASEB J. 2003. 17(6):696-698.
-
- ## N
-
- Narula J, Haider N, Virmani R, DiSalvo TG, Kolodgie FD, Hajjar RJ, Schmidt U, Semigran MJ, Dec GW, Khaw BA. *Apoptosis in myocytes in end-stage heart failure*. N Engl J Med. 1996. 335(16):1182-1189.
- Nau R, Prange HW, Klingelhöfer J, Kukowski B, Sander D, Tchorsch R, Rittmeyer K. *Results of four technical investigations in fifty clinically brain dead patients*. Intensive Care Med. 1992. 18(2):82-88.
- Nijboer WN, Schuurs TA, van der Hoeven JA, Fekken S, Wiersema-Buist J, Leuvenink HG, Hofker S, Homan van der Heide JJ, van Son WJ, Ploeg RJ. *Effect of brain death on gene expression and tissue activation in human donor kidneys*. Transplantation. 2004. 15-78(7): 978-986.
- Nishigaki K, Minatoguchi S, Seishima M, Asano K, Noda T, Yasuda N, Sano H, Kumada H, Takemura M, Noma A, Tanaka T, Watanabe S, Fujiwara H. *Plasma Fas ligand, an inducer of apoptosis, and plasma soluble Fas, an inhibitor of apoptosis, in patients with chronic*

- congestive heart failure*. J Am Coll Cardiol. 1997. 29(6):1214-1220.
- Novitzky D, Wicomb WN, Cooper DKC, Rose AG, Fraser RC, Barnard CN. *Electrocardiographic, haemodynamic and endocrine changes occurring during experimental brain death in the Chacma baboon*. J Heart Transplant. 1984. 4:63.
- Novitzky D, Wicomb WN, Cooper DKC, Rose AG, Fraser RC, Reichart B. *Prevention of myocardial injury during brain death by total cardiac sympathectomy in the Chacma baboon*. Ann Thorac Surg. 1986. 41:520-524.
- Novitzky D, Cooper DK, Reichart B. *Hemodynamic and metabolic responses to hormonal therapy in brain-dead potential organ donors*. Transplantation. 1987. 43(6):852-854.
- Novitzky D, Rose AG, Cooper DK. *Injury of myocardial conduction tissue and coronary artery smooth muscle following brain death in the baboon*. Transplantation. 1988. 45(5):964-966.
- Novitzky D, Horak A, Cooper DK, Rose AG. *Electrocardiographic and histopathologic changes developing during experimental brain death in the baboon*. Transplant Proc. 1989. 21(1 Pt 3):2567-2569.
- Novitzky D. *Donor management: state of the art*. Transplant Proc. 1997. 29(8):3773-3775.
- Nygren J, Svanvik N, Kubista M. *The interactions between the fluorescent dye thiazole orange and DNA*. Biopolymers. 1998. 46(1):39-51.
-
- ## O
- Olivetti G, Quaini F, Sala R, Lagrasta C, Corradi D, Bonacina E, Gambert SR, Cigola E, Anversa P. *Acute myocardial infarction in humans is associated with activation of programmed myocyte cell death in the surviving portion of the heart*. J Mol Cell Cardiol. 1996. 28(9):2005-2016
- Olivetti G, Abbi R, Quaini F, Kajstura J, Cheng W, Nitahara JA, Quaini E, Di Loreto C, Beltrami CA, Krajewski S, Reed JC, Anversa P. *Apoptosis in the failing human heart*. N Engl J Med. 1997. 336(16):1131-1141
- ONT. *Memoria. Dossier donantes 2010*. Madrid España.
- Owen VJ, Burton PBJ, Michel MC, et al. *Myocardial dysfunction in donor hearts. A possible etiology*. Circulation. 1999. 99:2565-2570.
-
- ## P
- Paolin A, Manuali A, Di Paola F, Boccaletto F, Caputo P, Zanata R, Bardin GP, Simini G. *Reliability in diagnosis of brain death*. Intensive Care Med. 1995. 21(8):657-662.

- Patel T, Gores GJ, Kaufmann SH. *The role of proteases during apoptosis*. FASEB J. 1996. 10(5):587-597.
- Pennefather SH, Bullock RE, Dark JH. *The effect of fluid therapy on alveolar arterial oxygen gradient in brain-dead organ donors*. Transplantation. 1993. 56(6):1418-1422.
- Pérez S, Royo LJ, Astudillo A, Escudero D, Alvarez F, Rodríguez A, Gómez E, Otero J. *Identifying the most suitable endogenous control for determining gene expression in hearts from organ donors*. BMC Mol Biol. 2007. 20-8:114.
- Pérez López S, Otero Hernández J, Vázquez Moreno N, Escudero Augusto D, Alvarez Menéndez F, Astudillo González A. *Brain death effects on catecholamine levels and subsequent cardiac damage assessed in organ donors*. J Heart Lung Transplant. 2009. 28(8):815-820
- Petty GW, Wiebers DO, Meissner I. *Transcranial Doppler ultrasonography: clinical applications in cerebrovascular disease*. Mayo Clin Proc. 1990. 65(10):1350-1364.
- Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. *Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR*. Nucleic Acids Res. 2002. 1;30(9):e36.
- Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP. *Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations*. Biotechnol Lett. 2004. 26(6):509-515.
- Pilbrow AP, Ellmers LJ, Black MA, Moravec CS, Sweet WE, Troughton RW, Richards AM, Frampton CM, Cameron VA. *Genomic selection of reference genes for real-time PCR in human myocardium*. BMC Med Genomics. 2008. 1:64.
- Powner DJ, Hendrich A, Nyhuis A, Strate R. *Changes in serum catecholamine levels in patients who are brain dead*. J Heart Lung Transplant. 1992. 11(6):1046-1053.
- Pratschke J, Wilhelm MJ, Kusaka M, Basker M, Cooper DK, Hancock WW, Tilney NL. *Brain death and its influence on donor organ quality and outcome after transplantation*. Transplantation. 1999. 67(3):343-348.
- Puig M, Ballester M, Matías-Guiu X, Bordes R, Carrió I, Kolodgie FD, Pons C, García A, Aymat MR, Marrugat J, Brossa V, Campreciós M, Padró JM, Caralps JM, Virmani R, Prat J, Narula J. *Burden of myocardial damage in cardiac allograft rejection: scintigraphic evidence of myocardial injury and histologic evidence of myocyte necrosis and apoptosis*. J Nucl Cardiol. 2000. 7(2):132-139.

R

- Radonić A, Thulke S, Mackay IM, Landt O, Siegert W, Nitsche A. *Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004. 313(4):856-862.
- Randell TT, Höckerstedt KA. *Triiodothyronine treatment in brain-dead multiorgan donors--a controlled study*. *Transplantation*. 1992. 54(4):736-738.
- Real Decreto 2070/1999, de 30 de Diciembre, por el que se regulan las actividades de obtención y utilización clínica de órganos humanos y la coordinación territorial en materia de donación y trasplante de órganos y tejidos. BOE 3/2000 de 4 de Enero del 2000, pp.179-190.
- Reed JC. Bcl-2 family proteins. *Oncogene*. 1998. 17(25):3225-3236.
- Reeve JL, Duffy AM, O'Brien T, Samali A. *Don't lose heart--therapeutic value of apoptosis prevention in the treatment of cardiovascular disease*. *J Cell Mol Med*. 2005. 9(3):609-622.
- Reeve JL, Szegezdi E, Logue SE, Chonghaile TN, O'Brien T, Ritter T, Samali A. *Distinct mechanisms of cardiomyocyte apoptosis induced by doxorubicin and hypoxia converge on mitochondria and are inhibited by Bcl-xL*. *J Cell Mol Med*. 2007. 11(3):509-520.
- Regan D. *Human brain electrophysiology*. Nueva York: Elsevier. 1989.
- Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT. *Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction*. *Anal Biochem*. 1997. 245(2):154-160.
- Rosendale JD, Kauffman HM, McBride MA, Chabalewski FL, Zaroff JG, Garrity ER, Delmonico FL, Rosengard BR. *Hormonal resuscitation yields more transplanted hearts, with improved early function*. *Transplantation*. 2003. 75 (8) :1336-1341.
- Rutledge RG, Côté C. *Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves*. *Nucleic Acids Res*. 2003. 31(16):e93.

S

- Saikumar P, Dong Z, Mikhailov V, Denton M, Weinberg JM, Venkatachalam MA. *Apoptosis: Definition, mechanisms, and relevance to disease*. *Am J Med*. 1999. 107: 489-506.
- Saikumar P, Venkatachalam MA. *Role of apoptosis in hypoxicischemic damage in the kidney*. *Semin Nephrol*. 2003. 23:511-521.
- Salvesen GS, Renatus M. *Apoptosome: the seven-spoked death machine*. *Dev Cell*. 2002. 2(3):256-257.

- Saraste A, Pulkki K, Kallajoki M, Henriksen K, Parvinen M, Voipio-Pulkki LM. *Apoptosis in human acute myocardial infarction*. Circulation. 1997. 95(2):320-323
- Saraste A, Pulkki K, Kallajoki M, Heikkilä P, Laine P, Mattila S, Nieminen MS, Parvinen M, Voipio-Pulkki LM. *Cardiomyocyte apoptosis and progression of heart failure to transplantation*. Eur J Clin Invest. 1999. 29(5):380-386.
- Saraste A, Pulkki K. *Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis*. Cardiovasc Res. 2000. 45(3):528-537.
- Sartorius U, Schmitz I, Krammer PH. *Molecular mechanisms of death-receptor-mediated apoptosis*. Chembiochem. 2001. 2(1):20-29.
- Schmittgen TD, Zakrajsek BA. *Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR*. J Biochem Biophys Methods. 2000. 46(1-2):69-81.
- Schuurs TA, Morariu AM, Ottens PJ, 't Hart NA, Popma SH, Leuvenink HG, Ploeg RJ. *Time-dependent changes in donor brain death related processes*. Am J Transplant. 2006. 6(12): 2903-2911.
- Sebening C, Hagl C, Szabo G, Tochtermann U, Strobel G, Schnabel P, Amann K, Vahl CF, Hagl S. *Cardiocirculatory effects of acutely increased intracranial pressure and subsequent brain death*. Eur J Cardiothorac Surg. 1995. 9(7):360-372.
- Seguin C, Devaux Y, Grosjean S, Siaghy EM, Mairose P, Zannad F, de Talancé N, Ungureanu-Longrois D, Mertes PM. *Evidence of functional myocardial ischemia associated with myocardial dysfunction in brain-dead pigs*. Circulation. 2001. 104(12 Suppl 1):I197-201.
- Selvey S, Thompson EW, Matthaei K, Lea RA, Irving MG, Griffiths LR. *Beta-actin--an unsuitable internal control for RT-PCR*. Mol Cell Probes. 2001. 15(5):307-311.
- Seo D, Ginsburg GS, Goldschmidt-Clermont PJ. *Gene expression analysis of cardiovascular diseases: novel insights into biology and clinical applications*. J Am Coll Cardiol. 2006. 48(2):227-235.
- Shivalkar B, Van Loon J, Wieland W, Tjandra-Maga TB, Borgers M, Plets C, Flameng W. *Variable effects of explosive or gradual increase of intracranial pressure on myocardial structure and function*. Circulation. 1993. 87(1):230-239.
- Simmons LE, Riker RR, Prato BS, Fraser GL. *Assessing sedation during intensive care unit mechanical ventilation with the Bispectral Index and the Sedation-Agitation Scale*. Crit Care Med. 1999. 27(8):1499-1504.
- Slee EA, Harte MT, Kluck RM, Wolf BB, Casiano CA, Newmeyer DD, Wang HG, Reed JC, Nicholson DW, Alnemri ES, Green DR, Martin SJ.

- Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner.* J Cell Biol. 1999. 144(2):281-292.
- Smith M. *Physiologic changes during brain stem death--lessons for management of the organ donor.* J Heart Lung Transplant. 2004. 23(9 Suppl):S217-222.
- Spanakis E. *Problems related to the interpretation of autoradiographic data on gene expression using common constitutive transcripts as controls.* Nucleic Acids Res. 1993. 21(16):3809-3819.
- Ståhlberg A, Aman P, Ridell B, Mostad P, Kubista M. *Quantitative real-time PCR method for detection of B-lymphocyte monoclonality by comparison of kappa and lambda immunoglobulin light chain expression.* Clin Chem. 2003. 49(1):51-59.
- Ståhlberg A, Håkansson J, Xian X, Semb H, Kubista M. *Properties of the reverse transcription reaction in mRNA quantification.* Clin Chem. 2004. 50(3):509-515.
- Ståhlberg A, Zoric N, Aman P, Kubista M. *Quantitative real-time PCR for cancer detection: the lymphoma case.* Expert Rev Mol Diagn. 2005. 5(2):221-230.
- Stridh H, Kimland M, Jones DP, Orrenius S, Hampton MB. *Cytochrome c release and caspase activation in hydrogen peroxide- and tributyltin-induced apoptosis.* FEBS Lett. 1998. 429(3):351-355.
- Stroka DM, Burkhardt T, Desbaillets I, Wenger RH, Neil DA, Bauer C, Gassmann M, Candinas D. *HIF-1 is expressed in normoxic tissue and displays an organ-specific regulation under systemic hypoxia.* FASEB J. 2001. 15(13):2445-2453.
- Suzuki T, Higgins PJ, Crawford DR. *Control selection for RNA quantitation.* Biotechniques. 2000. 29:332-337.
- Szabó G, Sebening C, Hackert T, Hoffmann L, Melnitchuk S, Vahl CF, Hagl S. *The role of coronary perfusion changes in cardiac dysfunction associated with brain death.* Thorac Cardiovasc Surg. 1998a. 46(6):339-343.
- Szabó G, Sebening C, Hagl C, Tochtermann U, Vahl CF, Hagl S. *Right ventricular function after brain death: response to an increased afterload.* Eur J Cardiothorac Surg. 1998b. 13(4):449-458.
- Szabó G, Hackert T, Buhmann V, Graf A, Sebening C, Vahl CF, Hagl S. *Downregulation of myocardial contractility via intact ventriculo-arterial coupling in the brain dead organ donor.* Eur J Cardiothorac Surg. 2001. 20(1):170-176.
- Szabó G. *Physiologic changes after brain death.* J Heart Lung Transplant. 2004. 23(9 Suppl):S223-226.

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(6): 804-812.

T

Takemura G, Kato S, Aoyama T, Hayakawa Y, Kanoh M, Maruyama R, Arai M, Nishigaki K, Minatoguchi S, Fukuda K, Fujiwara T, Fujiwara H. *Characterization of ultrastructure and its relation with DNA fragmentation in Fas-induced apoptosis of cultured cardiac myocytes*. J Pathol. 2001. 193(4):546-556.

Talaat AM, Howard ST, Hale W 4th, Lyons R, Garner H, Johnston SA. *Genomic DNA standards for gene expression profiling in Mycobacterium tuberculosis*. Nucleic Acids Res. 2002. 30(20):e104.

Tanaka M, Ito H, Adachi S, Akimoto H, Nishikawa T, Kasajima T, Marumo F, Hiroe M. *Hypoxia induces apoptosis with enhanced expression of Fas antigen messenger RNA in cultured neonatal rat cardiomyocytes*. Circ Res. 1994. 75(3):426-433.

Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, De BB, Coumans B, Hennen G, Grisar T, Igout A, Heinen E. *Housekeeping genes as internal standards: use and limits*. J Biotechnol. 1999. 75:291-295.

Thornberry NA, Lazebnik Y. *Caspases: Enemies within*. Science. 1998. 281: 1312-1316.

Toyozaki T, Hiroe M, Tanaka M, Nagata S, Ohwada H, Marumo F. *Levels of soluble Fas ligand in myocarditis*. Am J Cardiol. 1998. 15;82(2):246-248.

Tricarico C, Pinzani P, Bianchi S, Paglierani M, Distante V, Pazzagli M, Bustin S.A, Orlando C. *Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction: normalization to rRNA or single housekeeping genes is inappropriate for human tissue biopsies*. Anal Biochem. 2002. 309: 293-300.

Tsujimoto Y, Shimizu S. *VDAC regulation by the Bcl-2 family of proteins*. Cell Death Differ. 2000. 7(12):1174-1181.

U

Ueno T, Zhi-Li C, Itoh T. *Unique circulatory responses to exogenous catecholamines after brain death*. Transplantation. 2000. 70(3):436-440.

V

van Der Hoeven JA, Moshage H, Schuurs T, Nijboer M, Van Schilfgaarde R, Ploeg RJ. *Brain death induces apoptosis in donor*

- liver of the rat*. Transplantation. 2003. 76(8):1150-1154.
- van der Lugt A. *Imaging tests in determination of brain death*. Neuroradiology. 2010. 52(11):945-947.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. *Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes*. Genome Biol. 2002. 18;3(7).
- Vivien B, Paqueron X, Le Cosquer P, Langeron O, Coriat P, Riou B. *Detection of brain death onset using the bispectral index in severely comatose patients*. Intensive Care Med. 2002. 28(4):419-425.
- von Smolinski D, Leverkoehne I, von Samson-Himmelstjerna G, Gruber AD. *Impact of formalin-fixation and paraffin-embedding on the ratio between mRNA copy numbers of differently expressed genes*. Histochem Cell Biol. 2005. 124(2):177-188.
- Heart Lung Transplant. 1995. 14(4):734-742.
- White M, Wiechmann RJ, Roden RL, Hagan MB, Wollmering MM, Port JD, Hammond E, Abraham WT, Wolfel EE, Lindenfeld J. *Cardiac beta-adrenergic neuroeffector systems in acute myocardial dysfunction related to brain injury. Evidence for catecholamine-mediated myocardial damage*. Circulation. 1995. 92(8):2183-2189.
- Wijdicks EF. *Determining brain death in adults*. Neurology. 1995. 45(5):1003-1011.
- Wilhelm MJ, Pratschke J, Laskowski IA, Paz DM, Tilney NL. *Brain death and its impact on the donor heart-lessons from animal models*. J Heart Lung Transplant. 2000. 19(5):414-418.
- Wu CF, Bishopric NH, Pratt RE. *Atrial natriuretic peptide induces apoptosis in neonatal rat cardiac myocytes*. J Biol Chem. 1997. 272(23):14860-14866.

W

- Wang X. *The expanding role of mitochondria in apoptosis*. Genes Dev. 2001. 15(22):2922-2933.
- Wheeldon DR, Potter CD, Oduro A, Wallwork J, Large SR. *Transforming the "unacceptable" donor: outcomes from the adoption of a standardized donor management technique*. J

Y

- Yamaguchi S, Yamaoka M, Okuyama M, Nitoube J, Fukui A, Shirakabe M, Shirakawa K, Nakamura N, Tomoike H. *Elevated circulating levels and cardiac secretion of soluble Fas ligand in patients with congestive heart failure*. Am J Cardiol. 1999. 83(10):1500-1503.

Yeh T Jr, Wechsler AS, Graham LJ, Loesser KE, Sica DA, Wolfe L, Jakoi ER. *Acute brain death alters left ventricular myocardial gene expression.* J Thorac Cardiovasc Surg. 1999. 117(2):365-374.

Yperman J, De Visscher G, Holvoet P, Flameng W: *Beta-actin cannot be used as a control for gene expression in ovine interstitial cells derived from heart valves.* J Heart Valve Dis. 2004. 13(5):848-853.

Yue TL, Wang C, Romanic AM, Kikly K, Keller P, DeWolf WE Jr, Hart TK, Thomas HC, Storer B, Gu JL, Wang X, Feuerstein GZ. *Staurosporine-induced apoptosis in cardiomyocytes: A potential role of caspase-3.* J Mol Cell Cardiol. 1998. 30(3):495-507.

Z

Zhong H, Simons JW. *Direct comparison of GAPDH, beta-actin, cyclophilin, and 28S rRNA as internal standards for quantifying RNA levels under hypoxia.* Biochem Biophys Res Commun. 1999. 259(3):523-526.

Zipper H, Brunner H, Bernhagen J, Vitzthum F. *Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications.* Nucleic Acids Res. 2004. 32(12):e103.

