

23.245

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA ANIMAL (II).

TESIS DOCTORAL.

AÑO 1999.



* 5 3 0 9 8 5 0 7 4 5 *
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

X-53-375297-2

**ESTUDIO DE LA CURVA DE SUPERVIVENCIA DURANTE UN
PROCESO DE ISQUEMIA MESENTÉRICA AGUDA.
ALTERACIONES MORFOLÓGICO-FUNCIONALES Y EFECTO DEL
TRATAMIENTO CON SUPERÓXIDO DISMUTASA: ESTUDIO
EXPERIMENTAL EN *Rattus norvegicus*.**

AUTOR: JERÓNIMO CARNÉS SÁNCHEZ.
DIRECTOR: PATROCINIO MORATINOS PALOMERO.
TUTORA: ROSA M^a ARAHUETES PORTERO.



BIBLIOTECA


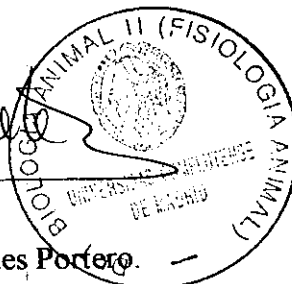
ROSA MARÍA ARAHUETES PORTERO, PROFESORA TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA ANIMAL (II) DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

CERTIFICA:

Que el presente trabajo del licenciado D. Jerónimo Carnés Sánchez, presentado para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas y titulado “Estudio de la curva de supervivencia ante un proceso de isquemia mesentérica aguda. Alteraciones morfológico-funcionales y efecto del tratamiento con superóxido dismutasa. Estudio experimental en *Rattus norvegicus*” ha sido realizado bajo mi tutoría. Así mismo considero que reúne las condiciones necesarias para ser defendido ante el Tribunal correspondiente.

Y para que conste a tal efecto, lo firmo en Madrid a cuatro de Febrero de mil novecientos noventa y nueve.

LA TUTORA DE LA TESIS.

Fdo. Dra Rosa María Arahuetes Portero.

A mis padres, por su inagotable empeño,
ánimo y apoyo y a Mari Mar por su
insufrible paciencia y comprensión.

“Para el biólogo, el ideal supremo consiste en resolver el enigma del propio yo, contribuyendo a esclarecer al mismo tiempo el formidable misterio que nos rodea. La naturaleza nos es hostil porque no la conocemos: sus crueldades representan la venganza contra nuestra indiferencia. Escuchar sus latidos íntimos con el fervor de apasionada curiosidad, equivale a descifrar sus secretos”.

Historia de mi labor científica. Santiago Ramón y Cajal.

AGRADECIMIENTOS.

A lo largo de todo este tiempo han sido muchas las personas que de manera desinteresada han colaborado en el presente trabajo. A todas ellas quiero expresar mi más sincero agradecimiento:

A mi padre, Jerónimo Carnés, Licenciado en Medicina, quien desde siempre ha luchado a mi lado para recorrer la trayectoria de estudiante. A él le debo la constancia, el ánimo y el primer impulso para dar los pasos más importantes de mi vida. A Emilia Sánchez, mi madre, quien ha resultado ser clave para la recopilación de la bibliografía. Su comprensión y ánimo han sido una constante a lo largo de todo este tiempo. A M^a del Mar Calvo, mi novia, por su enorme paciencia, entrega y ánimo en los momentos duros y por haber antepuesto este trabajo a cualquier mira personal. A mis hermanos José Ignacio y Sara por haber comprendido desde el principio lo importante que era para mí este proyecto.

A D. Patrocinio Moratinos Palomero, Doctor en Medicina, jefe del Servicio de Anatomía Patológica y director de la Tesis, excepcional persona, amigo y consejero en todo momento. No cabe la posibilidad de hablar del presente trabajo sin citarle a él en primer lugar. Sus conocimientos, experiencia y aportación son la base de esta tesis.

A Dña. Rosa María Arahuetes, Doctora en Biología, profesora titular del Departamento de Biología Animal (II), y tutora de la Tesis, por sus buenos consejos e instrucciones, quien amable y desinteresadamente se prestó a ayudarme en todo momento.

A D. Carlos Gutiérrez Ortega, Doctor en Biología y responsable del Laboratorio del Servicio de Medicina y Cirugía Experimental, gran amigo y colaborador, con quien emprendí este proyecto y a quien debo la mayoría de mis conocimientos "*in situ*" dentro del campo experimental. Su ayuda, tanto de la parte experimental, como del análisis de resultados, ha resultado ser imprescindible.

Al Departamento de Biología Animal (II) de la Facultad de Biológicas de la UCM por haberse brindado desinteresadamente a enseñarnos algunas técnicas incluidas en este trabajo.

A todo el personal del hospital Gómez Ulla que de alguna manera se vio implicado en el proyecto. A todo el personal del Servicio de Medicina y Cirugía Experimental en cuyas instalaciones se llevaron a cabo la totalidad de experimentos. Mi más merecido reconocimiento

a todos ellos, quienes, cada uno desde su posición, contribuyeron a hacer posible este trabajo. A D. Angel Aguilera Martín, Licenciado en Veterinaria, por haberme facilitado amablemente todos las necesidades que se requirieron y por haber contrastado en común los resultados obtenidos. Al personal del Laboratorio de Análisis Clínicos y al del Servicio de Anatomía Patológica por la colaboración en las determinaciones bioquímicas y en el tratamiento de las muestras histológicas respectivamente. Al Gabinete fotográfico, por su continua disposición a las necesidades que de él se requirieron.

A D. Carlos Gutiérrez Salgado, Licenciado en Medicina y Licenciado en Educación Física, por haber dedicado parte de su tiempo a la revisión del estilo literario.

Al personal bibliotecario de los Hospitales Gómez Ulla y 12 de Octubre quienes en todo momento se prestaron desinteresadamente a hacer posible la recopilación de material bibliográfico y a mantener correo con otras bibliotecas nacionales.

A los diferentes grupos de trabajo de los Laboratorios C.B.F. LETI S.A. y especialmente a Dña Inmaculada Bel, Licenciada en Farmacia, quienes en todo momento se han interesado por el trabajo y han facilitado en lo posible la finalización del mismo.

A todas las personas que de uno u otro modo siguieron la elaboración del trabajo y que de distinta manera se interesaron por la evolución del mismo. A todos aquellos que se acordaron cuando encontraban alguna publicación relacionada con el tema y que sin darse cuenta contribuyeron a la elaboración de la Tesis.

A todos, muchas gracias, este trabajo también lleva vuestro esfuerzo.

RESUMEN

Título: ESTUDIO DE LA CURVA DE SUPERVIVENCIA DURANTE UN PROCESO DE ISQUEMIA MESENTÉRICA AGUDA. ALTERACIONES MORFOLÓGICO-FUNCIONALES Y EFECTO DEL TRATAMIENTO CON SUPERÓXIDO DISMUTASA. ESTUDIO EXPERIMENTAL EN *Rattus norvegicus*.

Introducción y antecedentes.- Los procesos patológicos causados por una disminución del flujo sanguíneo, constituyen en nuestros días la primera causa de muerte en el mundo Occidental. Desde hace algunos años se ha relacionado a los procesos de isquemia-reperusión con la presencia de radicales libres en el medio, los cuales contribuyen a agravar las lesiones producidas por la falta de aporte sanguíneo. El efecto lesivo de estas moléculas, junto con la propia patología del proceso isquémico, la afectación de reacciones sistémicas y un serio riesgo de sepsis generalizada por la proliferación de bacterias procedentes del intestino anóxico, parecen ser los desencadenantes de un cuadro patológico severo que sigue presentando altas tasas de mortalidad. En la actualidad, el empleo de sustancias antioxidantes para atenuar los efectos producidos por cuadros isquémicos, han dado resultados positivos, contribuyendo a mejorar los cuadros patológicos que se derivan de una obstrucción vascular y la posterior reentrada de sangre en el tejido.

Material y método.- Se utilizaron 240 ratas de la especie *Rattus norvegicus*, variedad Wistar. A los animales se les practicó laparotomía media abdominal y tras visualizar la arteria mesentérica craneal se procedió a la colocación de microclamp atraumático. El tiempo de oclusión vascular dependió de cada una de las series. Los animales fueron distribuidos en 14 series experimentales, todos ellos con pesos comprendidos entre 240 y 300 g, y mantenidos en condiciones estándar de laboratorio, a 22° C y fotoperíodo 12 horas. Todos ellos dispusieron de alimentación y bebida a voluntad, con una dieta controlada, especialmente en antioxidantes. Las series I a VII estuvieron formadas por 10 machos y 10 hembras y constituyeron el grupo con el que se realizó la curva de supervivencia, el estudio de parámetros fisiológicos y el estudio de las alteraciones macroscópicas y microscópicas, siendo la serie I control, sin intervención; la serie II, serie *Sham operation*; serie III, sometida a 15 minutos de isquemia mesentérica aguda (IMA); serie IV, sometida a 30 minutos de IMA, serie V, sometida a 60 minutos de IMA; serie VI, sometida a 120 minutos de IMA; y serie VII, sometida a 180 minutos de IMA. A todos los

animales supervivientes de cada serie se les mantuvo en observación durante las 9 semanas posteriores, tras las cuales, fueron sacrificadas. Las series VIII, IX, X y XI constituyeron el grupo de estudio del efecto de la superóxido dismutasa (SOD), procedente de eritrocito de bovino, la cual se inyectó vía venosa y diluida en solución salina, a flujo constante, 10 minutos antes de la retirada del clamp y 10 minutos después de la reperfusión. La serie VIII -10 machos- fue sometida a 120 minutos de IMA y tratada con sustancia placebo a base de suero fisiológico; la serie X -10 machos- fue sometida a 120 minutos de IMA y tratada con SOD; la serie IX -10 hembras- fue sometida a 60 minutos de IMA y tratada con suero fisiológico; y la serie XI -10 hembras- fue sometida a 60 minutos de IMA y tratada con SOD. Las series XII, XIII y XIV, constituyeron el grupo para la cuantificación de malon-dialdehído (MDA) libre mediante el test del ácido tiobarbitúrico (TBA). La serie XII, estuvo formada por 10 machos, de los que se tomaron muestras del yeyuno para cuantificar el valor basal de MDA; la serie XIII -10 machos- a los que se sometió a 90 minutos de IMA y 30 de reperfusión, se les administró SOD antes y después de la retirada del clamp y se les tomaron muestras del yeyuno; y la serie XIV, sometida a 90 minutos de IMA y 30 de reperfusión, tras el cual se tomaron muestras del yeyuno. A las series I, II y XIV se les realizó el estudio de parámetros séricos.

Para el estudio estadístico se utilizó, el empleo de tasas y porcentajes para variables categóricas; el método actuarial, la función de riesgo y el χ^2 para el estudio de la supervivencia; el test de ANOVA o Kruskal-Wallis para valoración de variables independientes con varias categorías, dependiendo del test de normalidad de Shapiro-Wilks y el de verificación de varianzas del test de Levene; la t de Student o la U de Mann-Whitney para valoración de variables independientes con una categoría, dependiendo del test de normalidad de Shapiro-Wilks y el de verificación de varianzas del test de Levene; para índices descriptivos se empleó la media y la desviación estándar para medidas basadas en momentos y la mediana y el intervalo intercuartílico para medidas basadas en ordenaciones; las representaciones gráficas se realizaron mediante diagrama de barras apiladas, frecuencias acumuladas y boxplot. Se tomaron como valores significativos aquellos cuyo valor de p fue igual o superior a 0,05.

Resultados y conclusiones.- Del estudio general de supervivencia se encontró que en las series I, II y III no hubo mortalidad, apareciendo los primeros casos de muerte tras 30 minutos de isquemia -serie IV-. La mortalidad del 100% de los animales se produjo tras 180 minutos de isquemia. En todas las series, los máximos picos de mortalidad se produjeron entre las 0 y las

48 horas posteriores a la reperfusión. En el estudio de la curva de supervivencia entre machos y hembras se obtuvo una diferencia significativa para la serie IV -30 minutos de isquemia- y para la serie VI -120 minutos de isquemia-, estando muy próximo al grado de significación en la serie V -60 minutos de isquemia-. La tasa de letalidad 50 se situó en hembras en torno a los 60 minutos, mientras que para los machos estuvo por encima de los 120 minutos. El tratamiento con SOD en series separadas en función del sexo dio como resultado un aumento de la supervivencia en ambos casos, aunque en ninguno de ellos resultó significativo. Los estudios macroscópico y microscópico de los órganos desvelaron una relación directa entre tiempo de isquemia y gravedad de las lesiones. El estudio microscópico desveló que las lesiones no se redujeron únicamente al área afectada por la isquemia, sino que hubo afectación de otros órganos, especialmente pulmón. El estudio de los parámetros fisiológicos como salida del estado anestésico, recuperación de la alimentación, de la bebida y de la defecación demostró un mayor retraso de la recuperación de esta actividad a medida que el tiempo de oclusión fue mayor. El estudio bioquímico del suero manifestó elevación significativa de CPK, ALT, AST, LDH, creatinina y potasio, disminución significativa de urea y conservación de los niveles de GGT y sodio. La cuantificación de los niveles de MDA dio como resultado un aumento significativo tras procesos de isquemia-reperfusión, y unos valores inapreciables del mismo en animales control y en animales tratados con SOD.

INDICE.

1. INTRODUCCIÓN.....	1.
1.1. Isquemia. Concepto.....	1.
1.2. Antecedentes históricos.....	2.
1.3. Anatomía de la circulación intestinal.....	3.
1.3.1. Anatomía de la circulación arterial intestinal en la rata.....	3.
1.3.1.1. Troncos principales.....	3.
1.3.1.2. Irrigación secundaria.....	4.
1.3.2. Anatomía de la circulación venosa intestinal en rata.....	7.
1.4. Anatomía macroscópica del intestino de rata.....	7.
1.5. Anatomía microscópica del intestino de rata.....	8.
1.5.1. Intestino delgado.....	8.
1.5.2. Intestino grueso.....	9.
1.5.3. Inervación del tubo intestinal.....	9.
1.6. Fisiopatología de la isquemia intestinal.....	10.
1.7. Alteraciones microscópicas durante la isquemia intestinal.....	11.
1.8. Isquemia intestinal aguda por oclusión de los vasos principales en el hombre.....	13.
1.8.1. Incidencias y tasas de mortalidad.....	13.
1.8.2. Isquemia intestinal aguda por oclusión de la arteria mesentérica craneal en el hombre.....	14.
1.8.2.1. Trombosis arterial.....	14.
1.8.2.2. Embolia arterial.....	15.
1.8.2.3. Diagnóstico.....	15.
1.8.2.4. Tratamiento.....	16.
1.9. Mecanismos de lesión celular como consecuencia de la hipoxia anoxia.....	16.
1.9.1. Mecanismos generales.....	17.
1.10. Activación de la fosfolipasa A ₂ . Cascada del ácido araquidónico.....	18.
1.11. Peroxidación lipídica.....	20.
1.11.1. Medida de la peroxidación lipídica.....	20.

1.12. Mecanismos de lesión celular como consecuencia de la reperfusión y reoxigenación del tejido.....	21.
1.12.1. Implicación de los radicales libres de oxígeno.....	22.
1.12.2. Papel de la xantino oxidasa en la reperfusión.....	22.
1.12.3. Aumento de la permeabilidad de la mucosa.....	22.
1.12.4. Mecanismos de lesión tisular provocada por leucocitos.....	23.
1.13. Modelos experimentales sobre tratamientos antioxidantes.....	25.
1.14. Fallo multiorgánico.....	27.
1.15. Superóxido dismutasa.....	28.
2. INTERROGANTES, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DE INVESTIGACIÓN.....	31.
2.1. Interrogantes.....	31.
2.2. Hipótesis.....	32.
2.3. Objetivos.....	33.
2.4. Cronograma del diseño experimental.....	33.
3. MATERIAL Y MÉTODO.....	35.
3.1. Material.....	35.
3.1.1. Animalde experimentación.....	35.
3.1.2. Aplicación de la anestesia.....	35.
3.1.3. Inducción anestésica.....	35.
3.1.4. Preparación del campo quirúrgico.....	36.
3.1.5. Preparación quirúrgica.....	36.
3.1.6. Acto quirúrgico.....	36.
3.1.6.1. Material fungible.....	36.
3.1.6.2. Laparotomía.....	36.
3.1.6.3. Microcirugía.....	37.
3.1.6.4. Material quirúrgico habitual.....	37.
3.1.7. Necropsia.....	37.
3.1.7.1. Fármacos.....	37.
3.1.7.2. Instrumental.....	37.
3.1.8. Peso del animal.....	38.

3.1.9. Extracción de sangre.....	38.
3.1.10. Determinaciones de parámetros sanguíneos.....	38.
3.1.11. Estudio histológico.....	39.
3.1.12. Administración de la SOD.....	39.
3.1.12.1. Material.....	39.
3.1.12.2. Instrumental.....	39.
3.1.13. Soporte informático.....	39.
3.2. Metodología.....	40.
3.2.1. Anestesia.....	40.
3.2.1.1. Medidas generales.....	40.
3.2.1.2. Medidas preanestésicas.....	40.
3.2.1.3. Inducción a la anestesia.....	40.
3.2.1.4. Ventilación.....	41.
3.2.1.5. Mantenimiento de la anestesia.....	41.
3.2.2. Metodología de preparación quirúrgica.....	41.
3.2.2.1. Rasurado.....	41.
3.2.2.2. Fijación a la bandeja de disección.....	41.
3.2.3. Acto quirúrgico.....	42.
3.2.3.1. Asepsia.....	42.
3.2.3.2. Técnica.....	42.
3.2.4. Observación clínico-patológica tras la retirada del clamp.....	45.
3.2.4.1. Presencia de gas intestinal.....	45.
3.2.4.2. Perforación intestinal.....	46.
3.2.4.3. Placas de Peyer.....	46.
3.2.4.4. Hemorragia intestinal.....	46.
3.2.4.5. Desvitalización intestinal.....	46.
3.2.4.6. Repermeabilización vascular.....	46.
3.2.4.7. Alteraciones orgánico fisiológicas.....	46.
3.2.5. Observación clínica.....	47.
3.2.5.1. Despertar después de la anestesia.....	47.
3.2.5.2. Ingesta de agua.....	47.

3.2.5.3. Ingesta de alimento.....	47.
3.2.5.4. Heces.....	48.
3.2.5.5. Evolución del peso corporal.....	48.
3.2.5.6. Supervivencia.....	48.
3.2.6. Metodología del sacrificio.....	48.
3.2.7. Necropsia.....	48.
3.2.7.1. Observación de la cavidad abdominal.....	48.
3.2.7.1.1. Cavidad peritoneal.....	48.
3.2.7.1.2. Aspecto del paquete intestinal.....	48.
3.2.7.1.3. Hígado y riñones.....	49.
3.2.7.1.4. Arteria mesentérica craneal.....	49.
3.2.7.2. Cavidad torácica.....	49.
3.2.8. Aplicación de la SOD.....	50.
3.2.9. Tratamiento histológico de las piezas.....	52.
3.2.9.1. Técnica de tinción con hematoxilina eosina.....	52.
3.2.9.2. Técnica de tinción Giemsa.....	53.
3.2.9.3. Técnica de tinción con P.A.S. -para-aldehídos de Shiff-.....	54.
3.2.9.4. Técnica de tinción tricrómica de Masson.....	55.
3.2.9.5. Técnica de tinción Gallego para fibras elásticas.....	57.
3.2.9.6. Método del Oil-red O.....	58.
3.2.10. Recogida de muestras y determinación de MDA libre en tejidos.....	58.
3.2.10.1. Test del TBA.....	59.
3.2.11. Extracción de sangre.....	61.
3.2.11.1. Exanguinación intracardiaca.....	61.
3.2.11.2. Determinaciones bioquímicas séricas.....	62.
3.2.11.3. Determinaciones de sustratos metabólicos.....	62.
3.2.11.4. Determinaciones de iones.....	62.
3.2.12. Metodología estadística.....	62.
3.2.12.1. Estudio de supervivencia.....	63.
3.2.12.2. Estudio de ensayos clínicos.....	64.
3.2.12.3. Índices descriptivos para valoración de variables.....	64.

3.2.12.4. Representaciones gráficas.....	65.
3.2.12.5. Técnicas estadísticas para comparación de variables.....	65.
3.3. Características de los animales.....	66.
3.3.1. Especie y número de animales utilizados.....	66.
3.3.2. Procedencia.....	67.
3.3.3. Peso y edad.....	67.
3.3.4. Condiciones de vida.....	67.
3.3.4.1. Hábitat.....	67.
3.3.4.2. Alimentación.....	67.
3.3.4.3. Cuidados.....	68.
3.4. Series de animales utilizados e identificación.....	68.
3.4.1. Series.....	68.
3.4.2. Identificación de los individuos y series.....	70.
4. RESULTADOS.....	71.
4.1. Estudio general de supervivencia.....	71.
4.2. Supervivencia según el peso.....	77.
4.3. Supervivencia según el sexo.....	81.
4.4. Despertar del estado anestésico.....	86.
4.4.1. Según series de la población.....	86.
4.4.2. Despertar anestésico en función del sexo.....	89.
4.5. Condiciones fisiológicas postquirúrgicas.....	92.
4.5.1. Ingesta de agua.....	92.
4.5.2. Ingesta de alimento.....	92.
4.5.3. Deposiciones.....	93.
4.6. Evolución del peso corporal.....	94.
4.7. Resultados del estudio patológico macroscópico.....	97.
4.7.1. Observaciones intraoperatorias en el momento de retirar el clamp.....	98.
4.7.1.1. Presencia de gas intestinal.....	98.
4.7.1.2. Perforación intestinal.....	98.
4.7.1.3. Visión de las placas de Peyer.....	98.
4.7.1.4. Hemorragia en luz intestinal.....	99.

4.7.1.5. Desvitalización intestinal.....	101.
4.7.1.6. Repermeabilización vascular.....	101.
4.7.1.7. Alteraciones orgánico fisiológicas.....	102.
4.7.2. Observaciones en la necropsia.....	102.
4.7.2.1. Presencia de adherencias.....	103.
4.7.2.2. Alteraciones estructurales en órganos.....	103.
4.7.2.3. Presencia de ascitis y derrame pleural.....	104.
4.7.2.4. Perforación intestinal.....	105.
4.7.2.5. Presencia de gas intestinal.....	105.
4.7.2.6. Hemorragia en luz intestinal.....	106.
4.7.2.7. Desvitalización intestinal.....	106.
4.8. Estudio del peso de los órganos.....	107.
4.8.1. Estudio del peso de los riñones.....	107.
4.8.2. Peso de hígado y pulmones.....	108.
4.9. Resultados del estudio microscópico en las series de la curva de supervivencia.....	109.
4.9.1. Serie III, 15 minutos de IMA.....	109.
4.9.2. Serie IV, 30 minutos de IMA.....	112.
4.9.3. Serie V, 60 minutos de IMA.....	113.
4.9.4. Serie VI, 120 minutos de IMA.....	118.
4.9.5. Serie VII, 180 minutos de IMA.....	122.
4.9.6. Resultado comparativo de las series de la curva de supervivencia.....	127.
4.10. Valores del análisis del laboratorio.....	129.
4.10.1. Serie control.....	129.
4.10.1.1. Constantes enzimáticas.....	130.
4.10.1.2. Sustratos metabólicos.....	130.
4.10.1.3. Constantes iónicas.....	130.
4.10.2 Serie <i>Sham operation</i>	131.
4.10.2.1. Constantes enzimáticas.....	131.
4.10.2.2. Sustratos metabólicos.....	131.
4.10.2.3. Constantes iónicas.....	132.

4.10.3. Serie experimental.....	132.
4.10.3.1. Constantes enzimáticas.....	133.
4.10.3.2. Sustratos metabólicos.....	133.
4.10.3.3. Constantes iónicas.....	134.
4.10.4. Estudio estadístico comparativo.....	134.
4.10.4.1. Estudio estadístico comparativo entre las series I y II.....	134.
4.10.4.2. Estudio estadístico comparativo entre las series I y XIV.....	135.
4.11. Estudio comparativo de supervivencia entre individuos tratados con sustancia placebo o con SOD.....	142.
4.11.1. Machos.....	143.
4.11.2. Hembras.....	145.
4.12. Resultados del estudio microscópico en las series VIII, IX y XI.....	147.
4.12.1. Serie VIII.....	148.
4.12.2. Serie IX.....	148.
4.12.3. Serie XI.....	149.
4.12.4. Resultados comparativos en el grupo de tratamiento.....	150.
4.13. Concentración de MDA en intestino. Test del TBA.....	151.
5. DISCUSIÓN.....	154.
5.1. Curva de supervivencia.....	154.
5.1.1. Tasas de supervivencia. Relación con el tiempo de isquemia.....	154.
5.1.2. Causas de la mortalidad.....	157.
5.1.3. Lesiones en el organismo.....	160.
5.2. Mortalidad en función del sexo y el peso.....	160.
5.2.1. Implicación del sexo.....	160.
5.2.2. Implicación del peso.....	162.
5.3. Alteraciones fisiológicas.....	163.
5.3.1. Estado anestésico.....	163.
5.3.2. Estado postoperatorio.....	165.
5.3.3. Recuperación de la actividad fisiológica normal.....	166.
5.3.4. Evolución del peso.....	168.
5.4. Alteraciones de las constantes bioquímicas.....	169.

5.4.1. Sustratos enzimáticos.....	169.
5.4.2. Sustratos metabólicos.....	172.
5.4.3. Constantes iónicas.....	173.
5.5. Manifestación de lesiones multiorgánicas.....	174.
5.5.1. Pulmonares.....	174.
5.5.2. Hepáticas.....	177.
5.5.3. Pancreáticas.....	178.
5.5.4. Renales.....	178.
5.5.5. Ganglios linfáticos.....	179.
5.5.6. Arteria mesentérica craneal.....	180.
5.5.7. Alteraciones intestinales.....	180.
5.5.7.1. Lesiones clínico-patológicas macroscópicas.....	181.
5.5.7.2. Lesiones microscópicas.....	184.
5.6. Peroxidación lipídica.....	188.
5.7. Protección de la peroxidación lipídica mediante el uso de SOD.....	190.
5.7. Supervivencia y tratamiento con SOD.....	193.
6. CONCLUSIONES.....	196.
7. BIBLIOGRAFÍA.....	198.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ISQUEMIA. CONCEPTO.

La palabra isquemia deriva de las griegas *ishein*, que significa carencia, y *aima*, sangre. El término isquemia define la situación de un tejido del organismo privado del aporte sanguíneo, y por tanto de nutrientes, entre ellos el oxígeno, imprescindible para que los tejidos conserven su metabolismo y las células mantengan su integridad.

Los procesos patológicos por disminución del flujo sanguíneo en los tejidos, en cualquier localización, constituyen en la actualidad una de las primeras causas de muerte en el mundo Occidental¹. El grado de la lesión isquémica, en cualquier órgano, está directamente relacionado con la duración del proceso, la vascularización del área anatómica y del tejido afectado². De este modo, por ejemplo, el cerebro es un órgano muy sensible a la falta de oxígeno y en tan sólo unos minutos puede sufrir lesiones irreversibles. En cambio, el tejido muscular resiste a la anoxia hasta 6 horas. El margen de supervivencia del resto de los órganos se encuentra comprendido entre ambos límites³.

Cuando cualquier parte del organismo queda sin el aporte sanguíneo necesario, se dispara una secuencia de reacciones produciendo una disfunción celular y necrosis del tejido, dando lugar a una lesión típica, el infarto.

Se ha avanzado en el conocimiento de la lesión isquémica en el ámbito histológico y en la actualidad se siguen estudiando diversos aspectos en el ámbito bioquímico celular. Durante el período anóxico se produce gran cantidad de reacciones adversas relacionadas que contribuyen a desestabilizar el entorno y a agravar las lesiones. Esta destrucción, por falta de oxígeno, no se reduce al tejido propiamente dañado sino que se extiende a otras regiones del organismo, pudiendo desencadenar un efecto de shock cuyo resultado final es la muerte.

Hoy día se sabe que la reoxigenación del área afectada, único método viable para mantener la vida del individuo, tiene, paradójicamente, perniciosas consecuencias sobre la región hipoventilada, agravando las lesiones y desencadenando nuevos procesos de destrucción.

Hasta el momento, la mayor parte de los trabajos de investigación en este campo se han dirigido hacia la búsqueda de sustancias o métodos que reduzcan las lesiones, haciendo posible

el restablecimiento de la homeostasis tras el cuadro isquémico.

1.2. ANTECEDENTES HISTÓRICOS.

- En 1843, FRIEDICH TIEDEMANN describió por primera vez la oclusión aguda de la arteria mesentérica superior que produjo la muerte a un paciente por isquemia intestinal⁴.

- En 1868, CHIENNE expuso por primera vez las lesiones anatomopatológicas intestinales en un paciente fallecido por oclusión vascular del intestino⁵.

- En 1875, VIRCHOW y LITTEN realizaron estudios experimentales en perros, provocándoles isquemia mesentérica aguda (IMA) para poder observar las modificaciones producidas en el intestino tras la interrupción brusca del flujo de la arteria mesentérica craneal. Observaron ligando dicha arteria, que todos morían entre 15 y 20 horas después de la oclusión⁵.

- En 1895, ELLIOT realizó la primera resección intestinal de una IMA en un enfermo afectado del síndrome isquémico⁵.

- En 1901, SCHNITZLER fue el primero en asociar ciertos procesos patológicos arteriales con dolor abdominal⁵.

- En 1933, CONNOR comparó el resultado de la isquemia intestinal con la angina coronaria⁵.

- En 1936, DUNPHY revisó 12 casos de infarto intestinal y encontró que 7 de ellos aparecían con síntomas previos de dolor abdominal⁵.

- En 1951, KLASS practicó con éxito la primera embolectomía mesentérica quirúrgica en un caso de embolia mesentérica superior⁵.

- En 1958, SHAW y MAYNARD realizaron la primera tromboendarterectomía en arterioesclerosis oclusiva en la arteria mesentérica⁵.

- En el mismo año, DERRICK y LOGAN realizaron el primer *bypass* entre las arterias mesentérica y celiaca⁵.

- En 1958 MIKKELSON, describió con detalle las manifestaciones clínicas de la isquemia intestinal y el dolor postprandial como característico de la angina intestinal⁵.

- En 1971, MARSTON estimó que cada año se producían en EE.UU. 1800 muertes debidas a isquemia intestinal, la mayoría debidas a una embolia mesentérica, seguida de trombosis⁵.

- En 1980, McCORD, PARKS y GRANGER mostraron por primera vez que la reintroducción de oxígeno en un órgano hipóxico producía lesiones adicionales, en parte mediadas por la producción de radicales libres de oxígeno⁶ (RLO).

- En 1983, ROMSON fue el primero en proponer el papel que juegan los neutrófilos en la producción de radicales libres (RL) durante los procesos de isquemia-reperusión en estudios llevados a cabo sobre el miocardio. Observaron que la depleción de neutrófilos reducía las lesiones durante el infarto.

1.3. ANATOMÍA DE LA CIRCULACIÓN INTESTINAL.

Del volumen sanguíneo total que irriga de manera continua el organismo de la rata, el intestino recibe aproximadamente el 19%, llegando a la mucosa hasta el 65% del total. Durante los procesos digestivos, el flujo sanguíneo aumenta hasta un 30% del gasto total, distribuyéndose por las distintas capas que forman la pared intestinal, para mantener constante el flujo de sangre a la mucosa⁷.

1.3.1. ANATOMÍA DE LA CIRCULACIÓN ARTERIAL INTESTINAL EN LA RATA.

1.3.1.1. Troncos principales:

El intestino de la rata está irrigado por 3 arterias principales que se originan de la vertiente ventral de la aorta abdominal. Estas son el tronco celiaco, la arteria mesentérica craneal (AMC) y la arteria mesentérica caudal -figura 1-.

- El tronco celiaco.- Nace en la cara ventral de la aorta y se ramifica en cuatro arterias que distribuyen la sangre por el hígado, el bazo, el estómago y el duodeno a través de ramas procedentes de las arterias gástrica, gastroduodenal, esplénica y hepática. Al nivel del duodeno se forman arcos anastomóticos pancreático-duodenales entre la rama gastroduodenal, la rama de hepática, y la arteria mesentérica craneal, constituyéndose así una vía de conexión entre estas

arterias.

- La arteria mesentérica craneal (AMC).- Nace también en la cara ventral de la aorta abdominal⁸, a una distancia de entre tres y cinco mm por debajo del tronco celiaco. Desde su origen, la arteria describe una trayectoria descendente y hacia atrás, presentando un nacimiento oblicuo con respecto al eje central de la arteria aorta. Tras recorrer libre unos pocos mm, origina un número variable de arterias intestinales. La AMC irriga el yeyuno, íleon, el ciego, el apéndice y dos tercios proximales del colon⁹.

- La mesentérica inferior se origina en la parte anterior de la aorta abdominal, continuando posteriormente por el mesenterio a la fosa iliaca izquierda, cruza la arteria iliaca izquierda y origina la arteria cólica y la rectal. Es la responsable de irrigar la parte distal del colon y la parte proximal del recto.

1.3.1.2. Irrigación secundaria:

La AMC en su camino hacia posiciones dorsales, comienza a ramificarse en numerosas arterias secundarias, que son las responsables de llevar la sangre a las paredes del intestino.

A partir del lado izquierdo de la AMC se originan un número variable de arterias yeyunales cuyo aporte sanguíneo va dirigido a la porción yeyunal. Un segundo grupo se ramifica en las arterias ileales que se dispersan por todo el íleon. Cada una de estas ramas del tronco principal sigue una dirección recta y hacia delante, y transcurridos unos pocos centímetros van a dividirse nuevamente dando lugar a la formación de las arcadas primarias. De estas arcadas principales vuelven a surgir unas arterias intestinales de menor calibre, recorren libres unos pocos milímetros y vuelven a confluir unas con otras, formando las arcadas secundarias. Este patrón se repite varias veces, formándose cada vez arterias de menor calibre. A partir de la última arcada surgen los vasos rectos -*vasa recti*-, responsables de que la sangre alcance las paredes intestinales⁷.

La primera rama yeyunal, se anastomosa con la arteria duodenal inferior, ramificación procedente del tronco celiaco. De este modo se establece una estrecha comunicación entre el tronco celiaco y la AMC.

De la porción derecha de la AMC van a surgir otras arterias secundarias que se van a dirigir hacia porciones más bajas del intestino.

La arteria cólica derecha al nacer se bifurca en la rama ascendente que se une a la rama derecha de la arteria cólica, mientras que la rama descendente se une a la arteria ileocólica.

La arteria ileocólica es la última rama que se origina a partir de la AMC. Tras recorrer pocos centímetros se divide en la arteria cólica ascendente y en la rama ileal descendente. El final de la arteria cólica constituye el principio de la arteria marginal -arteria de Drummond- y se anastomosa con la rama descendente de la arteria cólica derecha. La arteria ileal se divide en las arterias cecal anterior y posterior y en las arterias apendiculares⁷.

A lo largo del borde interno del marco cólico se dispone el arco arterial paracólico -arteria marginal- como resultado de la división dicotómica de las ramas procedentes de la región derecha de la AMC y las de la mesentérica caudal -cólica izquierda y tronco de las sigmoideas-. Esta arcada anastomosa las dos grandes vías de irrigación del intestino. La parte de la arteria marginal que une la cólica media con la cólica izquierda en el espesor del mesocolon transversal se denomina arco de Riolo. La porción que sigue el descendente y el sigmoide es la arteria marginal de Drummond y la unión entre las sigmoideas y la hemorroidal superior forma la anastomosis de Sudeck⁷.

Tanto de la arteria marginal, en el caso del colon, o de las arcadas anastomóticas que forman en el mesenterio las ramas yeyuno-ileales, en el delgado, parten las arterias rectas, o *vasa recti*, que penetran en el intestino como vasos terminales. Además, existen intercomunicaciones en la microcirculación intestinal, con la formación de plexos vasculares que se localizan en la subserosa, en la muscular y, sobre todo, en la submucosa. A partir de estos plexos, las arteriolas pierden su capa muscular, originándose finas arborizaciones capilares, que forman anastomosis arteriovenosas, y originan redes de capilares que rodean a las criptas de Lieberkuhn. Otras van destinadas a las vellosidades, de modo que cada una de estas recibe una o varias ramas arteriales. Estos vasos penetran en la vellosidad a través de la base y se ramifican intensamente por debajo del epitelio de revestimiento superficial, siendo más abundantes en el intestino delgado, lo que determina su mayor resistencia a la isquemia que el colon¹⁰.

A lo largo de todo el aparato vascular intestinal, existe una estrecha comunicación entre los 3 troncos principales que aportan sangre al tubo digestivo, pero a pesar de todos estos sistemas que permiten que mantener la irrigación ante un proceso oclusivo, existen áreas de mayor vulnerabilidad. Estas zonas son aquellas cuya irrigación depende de las colaterales de las

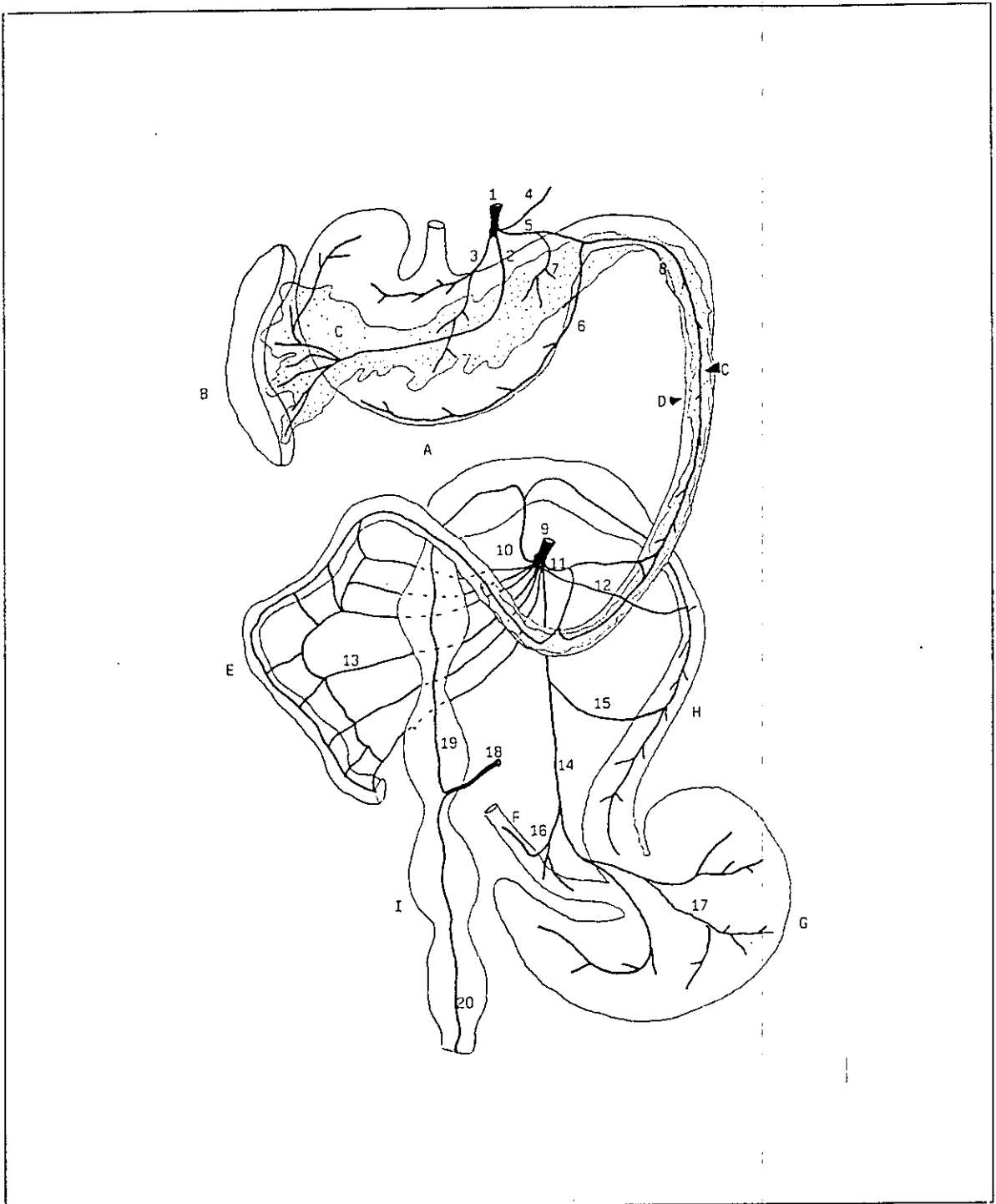


Figura 1.- Principales arterias del tracto gastrointestinal: A, estómago; B, bazo; C, páncreas; D, duodeno; E, yeyuno; F, íleon; G, ciego; H, colon; Y, recto. 1, a. celiaca; 2, a. esplénica; 3, a. gástrica; 4, a. hepática; 5, a. gastroduodenal; 6, a. gastroepiploica derecha; 7, a. gástrica derecha; 8, a. pancreático-duodenal; 9, a. mesentérica craneal; 10, a. cólica media; 11, a. pancreático duodenal caudal; 12, a. cólica derecha; 13, aa. yeyunales; 14, a. ileocecólica; 15, a. cólica; 16, a. ileal; 17, a. cecal; 18, a. mesentérica caudal; 19, a. cólica izquierda; 20, a. rectal. (De Hebel, R. Anatomy of laboratory rat. Baltimore 1976.)

arterias adyacentes, como el ángulo esplénico del colon, donde las ramas de la AMC se anastomosan con la mesentérica caudal, y la región intermedia del recto, que corresponde al lugar donde la mesentérica caudal se une con la hipogástrica. En segundo lugar se encuentran las áreas donde la irrigación es terminal, que son las correspondientes a las arterias rectas. En cuadros de una insuficiencia momentánea en el aporte de sangre por parte de una de las grandes arterias, los otros dos troncos principales juegan un papel clave en el mantenimiento del riego sanguíneo, pero en episodios más prolongados, esta colaboración se hace insuficiente y aparecen toda una serie de trastornos patológicos⁸.

1.3.2. ANATOMÍA DE LA CIRCULACIÓN VENOSA INTESTINAL EN RATA.

La vena mesentérica craneal vierte su contenido a la vena porta, al igual que las esplénicas y la mesentérica inferior, siendo la encargada de la circulación del retorno venoso¹¹.

La circulación colateral mesentérica en la rata es análoga a la del hombre. Las arcadas vasculares que conectan las arterias yeyunales con las ileales y la arteria ileocólica a la rama ascendente de la arteria cólica, forman un conducto que se extiende a lo largo de todo el borde mesentérico que en la rata presenta un diámetro inferior a los 0,5 mm¹².

1.4. ANATOMÍA MACROSCÓPICA DEL INTESTINO DE RATA.

El intestino delgado de la rata es seis veces más largo que el intestino grueso, el cual mide unos 15 cm. El diámetro del intestino delgado es aproximadamente de 0,4 cm, aumentando este grosor hasta casi el doble en el intestino grueso. Ambas porciones se pliegan ocupando la cavidad abdominal¹³.

El intestino se inicia con el duodeno a la salida del estómago y está fija a la cavidad abdominal, y en estrecha relación con el páncreas. El intestino delgado desemboca en una gran bolsa elástica, el ciego, dividido en dos porciones, una apical donde se acumula gran cantidad de tejido linfoide y una parte distal poco diferenciada. Del ciego parte el colon hasta desembocar en el recto.

Recorriendo todo el mesenterio aparecen numerosas arterias yeyunales e ileales que se van reduciendo progresivamente de calibre hasta penetrar en la pared intestinal.

1.5. ANATOMÍA MICROSCÓPICA DEL INTESTINO DE LA RATA.

1.5.1. INTESTINO DELGADO.

En la rata está constituido por cuatro capas concéntricas que de fuera hacia dentro son: serosa, muscular, submucosa y mucosa.

- **Mucosa.** La mucosa presenta un incalculable número de vellosidades, esto es, prolongaciones digitiformes de la misma. La superficie está recubierta por un epitelio cilíndrico simple, con predominio de enterocitos o células absorbentes, con borde en cepillo. La zona de membrana plasmática sobre la que se apoyan las células está estrechamente unida a la membrana basal continua.

El revestimiento epitelial del intestino está renovándose de manera continua y es el que más rápido prolifera de todos los tejidos del cuerpo¹⁴. En la rata, un ciclo celular completo dura entre 10 y 17 horas, y el epitelio es sustituido en su totalidad cada dos o tres días.

La lámina propia de la mucosa intestinal está formada por un tejido areolar laxo y forma el eje de las vellosidades intestinales. Contiene muchas células libres incluidas en un estroma de fibras. La lámina propia y la submucosa contienen los nódulos linfáticos, de diámetro variable y distribuidos a lo largo de todo el intestino. Los nódulos reunidos se conocen con el nombre de placas de Peyer.

La muscular de la mucosa *-muscularis mucosae-* está formada por finas redes de fibras elásticas y por dos capas, una circular y otra longitudinal, de músculo liso.

- **Submucosa.** Está formado por tejido conjuntivo moderadamente denso y muy rico en fibras elásticas.

- **Muscular.** Constituye una túnica muscular del intestino delgado formada por una capa externa longitudinal y otra interna circular, ambas formadas de músculo liso. Entre ambas capas se sitúa el plexo nervioso mioentérico o de Auerbach. Esta capa es responsable del peristaltismo intestinal.

- **Serosa.-** Está constituida por una lámina continua de células mesoteliales planas, separada de la muscular adyacente por una fina capa de tejido conjuntivo laxo.

1.5.2. INTESTINO GRUESO.

Básicamente la organización estructural es la misma que la del intestino delgado con ligeras variaciones.

En la mucosa no existen las vellosidades como tales y los pliegues que se observan son debidos en parte a las contracciones de la capa muscular. El epitelio se renueva continuamente, aunque de manera mucho más lenta, y la vida media de la población celular es de aproximadamente seis días. El resto de la mucosa, submucosa y serosa son similares a las del intestino delgado.

En cuanto a la muscular, las fibras no se distribuyen igual que en el intestino delgado, sino que están agrupadas en tres bandas longitudinales que reciben el nombre de tenias del colon.

1.5.3. INERVACIÓN DEL TUBO INTESTINAL.

El tubo intestinal de la rata está inervado por el sistema nervioso autónomo, que consta de 3 ramas, el simpático, el parasimpático y el entérico. Tanto el simpático como el parasimpático constituyen la inervación extrínseca.

El sistema entérico, constituye la inervación intrínseca y está formado por ganglios y haces comunicantes de fibras nerviosas que se distribuyen como extensos plexos a lo largo de todo el tubo digestivo. Contiene de 10^7 a 10^8 neuronas, y es en gran parte autónomo, pudiendo llevar a cabo sus funciones sin necesidad de impulsos procedentes del sistema nervioso central.

Existen tres tipos de plexos distribuidos por el intestino:

- Elementos neurales más superficiales forman el plexo subseroso, que carece de ganglios y está formado por una ancha red de fibras nerviosas que conectan los nervios extrínsecos con los intrínsecos.

- Plexo mioentérico o de Auerbach, situado entre las capas longitudinal y circular de la muscular, está constituido por ganglios que contienen de tres a cincuenta cuerpos neuronales y por haces amielínicos que unen entre sí los ganglios y forman una red continua.

- Plexo submucoso o de Meissner, formado por una red de ganglios y de haces

interconectados dentro del tejido conjuntivo de la submucosa.

Todos estos sistemas de redes nerviosas están interconectados unos con otros, lo que hace que ninguno de estos sistemas funcione independientemente, sino como un conjunto organizado.

1.6. FISIOPATOLOGÍA DE LA ISQUEMIA INTESTINAL.

La isquemia aguda del intestino medio es el fallo de la circulación mesentérica que compromete la vitalidad del intestino en el territorio de la arteria mesentérica superior en una extensión variable, desde el ángulo duodeno-yeyunal hasta la mitad del colon transversal. Consecuentemente, constituye uno de los cuadros más graves del síndrome de abdomen agudo. También se le conoce como infarto mesentérico e íleo vascular mesentérico¹⁵.

Las consecuencias clínicas y patológicas de la perfusión insuficiente del intestino dependen de la causa y localización de la oclusión, del tiempo que tarda en establecerse la isquemia, de su duración y de la situación hemodinámica del individuo¹⁶.

Cuando la oclusión se produce en un vaso importante y es gradual, la disminución del riego intestinal se compensa por la apertura de las colaterales existentes entre los troncos principales y, si no existen otros factores adicionales, como hipotensión o shock, las consecuencias pueden ser mínimas. Si la obstrucción se debe a un émbolo, la oclusión vascular se produce de manera repentina, con lo que no hay tiempo suficiente para que la circulación colateral mantenga la perfusión produciéndose entonces una necrosis intestinal.

El tiempo de isquemia y el grado de reducción del flujo son de gran importancia; cuando el flujo sanguíneo es menor del 20%, no se mantiene la difusión normal de oxígeno y se producen alteraciones celulares a los 5 ó 10 minutos. Los factores generales, como la hipoxia, la hipotensión y la caída del gasto cardíaco, son, en la mayoría de los casos, los determinantes del daño isquémico e, incluso, ser los principales responsables.

Además de las alteraciones funcionales y estructurales, los desórdenes circulatorios del intestino, aunque sean en cortos espacios de tiempo, desarrollan los siguientes procesos:

- Pérdida de plasma a través de la pared y de la luz intestinal con edema e íleo parálisis concomitante. El aumento significativo de la permeabilidad vascular está asociado a un incremento de la morbimortalidad¹⁷.

• Liberación de gran cantidad de sustancias vasoactivas, como histamina que incrementa la contractibilidad del músculo liso y forma parte de la respuesta inflamatoria, aunque no media en cambios de permeabilidad vascular¹⁸. La liberación del factor activador de las plaquetas y de metabolitos derivados de la cascada del ácido araquidónico como los leucotrienos, estimulan y promueven la activación y la adherencia de neutrófilos al endotelio vascular¹⁹, aumentando la permeabilidad y obturando la luz de capilares y vasos de pequeño calibre.

• Proliferación de la flora intestinal bacteriana debido a la anoxia y a la permeabilidad alterada de la pared del intestinal, favoreciendo la translocación de gérmenes y toxinas, lo que puede desencadenar un cuadro de sepsis generalizada y shock²⁰. El efecto conjunto de estos estados de shock provoca la lesión de órganos vitales, como el miocardio o los pulmones, y la instauración de un shock irreversible.

La restauración del flujo sanguíneo no siempre implica una mejoría. Con la llegada de la sangre oxigenada a la mucosa lesionada se ocasiona la formación de RLO, que activan a los leucocitos, los cuales se adhieren al endotelio y liberan proteasas, que lesionan el endotelio microvascular, agravando aún más las lesiones que se iniciaron durante la fase isquémica²¹, inducen la peroxidación de las membranas, con el efecto que tiene el aumento de malón dialdehído (MDA) libre y hacen extensivo el efecto destructor a otras regiones del organismo. Este proceso fisiopatológico se conoce con el nombre de *síndrome de revascularización* o de *isquemia-reperusión (I/R)*²².

1.7. ALTERACIONES MICROSCÓPICAS DURANTE LA ISQUEMIA INTESTINAL.

El descenso del flujo sanguíneo intestinal por debajo de valores críticos, puede producir un infarto, sin embargo, la pérdida del flujo en un vaso puede no ocasionar ningún efecto debido a la circulación colateral existente a lo largo de todo el tubo intestinal.

La mucosa intestinal es especialmente vulnerable a episodios anóxicos, y es la primera estructura en verse afectada por la ausencia de irrigación. Tras pocos minutos el epitelio se destruye, e inmediatamente se afecta la submucosa, en la que se produce una necrosis hemorrágica.

• Infarto mural parcial y de la mucosa. Las lesiones que se producen pueden ser multifocales o continuas. Las regiones afectadas adquieren una tonalidad roja oscura debido a la hemorragia luminal. Aparece ulceración superficial. En la forma isquémica más leve, el epitelio aparece necrótico y erosionado. Cuando la necrosis de la mucosa es completa, hay pérdida total del epitelio, dejándose al descubierto la lámina propia. Si la necrosis es grave, hay hemorragia intensa y necrosis de diferentes capas tisulares²³.

Como consecuencia aparece una infección bacteriana con formación de productos bacterianos enterotóxicos que provocan una inflamación pseudomembranosa, especialmente en colon.

• Infarto transmural. Tiene aspecto hemorrágico por el reflujo de sangre que se produce en el área lesionada. En estados iniciales aparece un aspecto congestivo y oscuro, la pared se hace edematosa, engrosada y hemorrágica. En la luz aparece moco sanguinolento. Histológicamente aparece edema evidente, hemorragia intersticial y necrosis erosiva de la mucosa. Las características histológicas de la muscular dejan de distinguirse. A las pocas horas, las bacterias intestinales producen una gangrena completa y en ocasiones perforación intestinal.

Los primeros cambios microscópicos se inician entre 5 y 10 minutos de la oclusión vascular con destrucción de las estructuras vellositarias. A nivel ultraestructural, acontece una destrucción del glicocalix de las microvellosidades de los enterocitos y lesión de los lisosomas y mitocondrias. Al cabo de una hora, las células lesionadas se desprenden de la membrana basal en el vértice vellositario y posteriormente en sentido proximal hacia la base, dejando denudados los ejes conectivovasculares, con fenómenos de plasmorragia intensa; se forman trombos plaquetarios en los capilares de la mucosa y la submucosa. Alrededor de las cuatro horas, la lesión isquémica afecta a los fondos glandulares y a partir de las 68 horas se desarrolla un infarto transmural con edema intenso, infiltración hemorrágica, proliferación bacteriana e infiltrado de polinucleares, que conduce a la necrosis. Las capas muscular y serosa son más resistentes y pueden permanecer intactas a pesar de que la mucosa y la submucosa estén necrosadas. Cuando la isquemia es muy grave, todas las capas intestinales se lesionan, con la perforación y la peritonitis consiguientes²⁴.

En 1997, Shah, Shurey y Green describieron apoptosis celular tras cuadros de isquemia y reperfusión en diversos órganos. Para demostrar si las células intestinales entraban en muerte

celular programada tras un cuadro de I/R mesentérica, extrajeron células vivas de intestinos isquémicos y las trasplantaron en intestinos de animales sanos. Comprobaron que las células trasplantadas entraban en apoptosis, llegando a la conclusión de que las células procedentes de tejido intestinal isquémico también entraban en apoptosis²⁵.

Analogías entre el síndrome experimental y el cuadro clínico.

La distribución y las lesiones histológicas observadas experimentalmente en perros, gatos y ratas, han demostrado una gran similitud con las lesiones clínicas, tanto en la erosión de la pared intestinal como en el shock que produce la anoxia mesentérica, siendo totalmente comparables con las lesiones descritas en pacientes fallecidos por shock hipovolémico²⁶. En humanos existe una clara gradación de las lesiones en función de la duración del estado anóxico, al igual que en animales experimentales, aunque los tiempos no coincidan entre las especies. Así, se han encontrado grados de lesión semejantes entre humanos fallecidos tras 24 horas de ausencia de flujo mesentérico y perros con tan sólo unas pocas horas de isquemia²⁷.

1.8. ISQUEMIA INTESTINAL AGUDA POR OCLUSIÓN DE LOS VASOS PRINCIPALES EN EL HOMBRE.

1.8.1. INCIDENCIA Y TASAS DE MORTALIDAD.

La incidencia exacta de la isquemia mesentérica es difícil de precisar debido a las bajas tasas de nuevos casos. La población de riesgo afecta a personas con enfermedades cardiovasculares y diabetes y se sabe que con el envejecimiento aumenta considerablemente su frecuencia, oscilando la media de la enfermedad en torno a los 60 años. No existen diferencias, en cuanto a la incidencia se refiere, entre sexos o razas²⁸.

En cuanto a la frecuencia con que se manifiesta, es un proceso patológico no frecuente y supuso en 1997 el 0,1% del total de ingresos en hospitales de urgencia de USA.

Hasta hace pocos años las tasas de mortalidad global rondaban entre el 70-90% de los casos, permaneciendo estable desde los años 30. En la actualidad, y gracias a los métodos nuevos de diagnóstico y terapia, este porcentaje se ha reducido hasta el 45% si el diagnóstico se hace a tiempo y las lesiones no son irreversibles. El problema continúa siendo la identificación

tardía cuando ya no es posible realizar cirugía de revascularización intestinal eficaz²⁹.

En Julio de 1998, el Instituto Nacional de Estadística (INE), hizo públicos el número de defunciones según causa, correspondientes al año 1995, reflejándose que fallecieron en España 1972 individuos a los que se les diagnosticó una insuficiencia vascular intestinal y de los que 890 fueron hombres y 1082 fueron mujeres³⁰. En la tabla 1 se reflejan las causas de muerte y el número de personas fallecidas.

CAUSA	MUJERES	HOMBRES	TOTAL
AGUDA	580	457	1037
CRÓNICA	203	179	382
OTRAS	299	254	553

Tabla 1.- Causa y número de individuos fallecidos en España durante el año 1995 a los que se les diagnosticó insuficiencia vascular intestinal. Resultados obtenidos del Instituto Nacional de Estadística y publicados en Julio de 1998.

El síndrome de isquemia intestinal aguda puede ser debido a 4 causas: interrupción brusca del flujo arterial por oclusión aguda de la mesentérica craneal; disminución del flujo arterial hacia el intestino -infarto intestinal agudo no oclusivo, forma anoclusiva de isquemia mesentérica aguda o isquemia por bajo flujo mesentérico-; la interrupción del retorno venoso producido por trombosis aguda de la vena mesentérica, y la colitis isquémica³¹.

1.8.2. ISQUEMIA INTESTINAL AGUDA POR OCLUSIÓN DE LA ARTERIA MESENTÉRICA CRANEAL EN EL HOMBRE.

La oclusión aguda de la AMC por embolia o trombosis provoca, en pocas horas, la aparición de una gangrena intestinal.

1.8.2.1. Trombosis arterial.

La trombosis arterial es una de las lesiones más letales, siendo responsable del 96% de los fallecimientos, en pacientes con este cuadro³². Causa el 40 % de los casos de isquemia intestinal aguda.

A medida que el flujo mesentérico va disminuyendo, el tronco celíaco se dilata para aportar mas sangre, pero en un momento determinado el flujo mesentérico se interrumpe de forma súbita y por completo, la circulación colateral es insuficiente y la funcionalidad intestinal se hace inviable.

1.8.2.2. Embolia arterial.

Es la causa desencadenante en el 25-30% de los casos y afecta a pacientes más jóvenes. La AMC tiene predisposición a alojar el émbolo debido a su origen oblicuo, casi paralelo a la aorta, su grueso calibre y su elevado flujo, lo que facilita el alojamiento del émbolo. Por lo general, el émbolo se impacta en el estrechamiento de la bifurcación con la cólica media y, con menor frecuencia, en el segmento distal. En consecuencia, origina un bloqueo arterial agudo, con espasmo y trombosis secundaria, que evoluciona a infarto intestinal¹⁵.

Cappell, Mikhail y Gujral³³ realizaron un seguimiento de ocho enfermos con infarto intestinal y comprobaron que el 100% presentó dolor abdominal agudo, el 12,5% náuseas, el 12,5% vómitos, el 12,5% melenas y el 37,5% pirexia.

1.8.2.3. Diagnóstico.

Hace más de 100 años que se conocen las lesiones isquémicas a nivel intestinal; sin embargo su conocimiento no ha sido muy amplio hasta la actualidad, con la aparición de técnicas más eficaces de imagen y diagnóstico³⁴. Aún así, uno de los rasgos característicos de la isquemia mesentérica es la escasez de manifestaciones clínicas, y el reconocimiento de dicho proceso patológico sigue siendo tardío, y está condicionada por el tratamiento quirúrgico³⁵. La radiología no ofrece ningún resultado específico que conduzca al diagnóstico, y tan solo la angiografía mesentérica permite alcanzar un reconocimiento precoz de la isquemia³⁶. Balthazar, Liebeskind y Macari, publicaron en 1997 un estudio sobre detección de isquemia intestinal en 100 pacientes empleando tomografía computerizada, y encontraron en el método una especificidad del 93% y una sensibilidad del 83%³⁷, porcentajes que dan una validez diagnóstica muy aceptable -para que una prueba diagnóstica sea aceptable, tanto la sensibilidad como la especificidad deben estar por encima del 80%-³⁸.

En cuanto al diagnóstico basado en pruebas de laboratorio, no existe un patrón fijo o específico de alteraciones bioquímicas o hematológicas, y tan sólo aparece una elevación significativa de leucocitos³⁹. En relación con las pruebas bioquímicas, se observa aumento

significativo de transaminasas, CPK y LDH, así como un desequilibrio de líquidos y de electrolitos ácido-base⁴⁰.

Gutiérrez *et al.*⁴¹ indicaron la posible utilidad clínica de la detección de MDA valorado mediante el test del ácido tiobarbitúrico -test del TBA-. En 1998 Aydin *et al.*⁴² estudiaron los niveles de MDA libres en suero tras someter a 10 perros a ligadura de la AMC observando que las concentraciones de MDA circulantes en suero después de un cuadro de isquemia mesentérica aumentaban significativamente con respecto a animales controles, concluyendo que el MDA libre en suero de animales podía constituir un marcador del diagnóstico de la isquemia mesentérica.

1.8.2.4. Tratamiento

El shock que desencadena un infarto intestinal supone la pérdida de líquidos corporales y una invasión bacteriana, por lo que el tratamiento de choque debe ir encaminado a combatir ambos -tras la aclaración del diagnóstico- restableciendo el flujo mediante embolectomía, trombolectomía y resección del tejido dañado⁴³.

La pérdida de líquidos y solutos provoca hemoconcentración, aumento de la viscosidad sanguínea y reducción del volumen de sangre circulante. Es necesario reponer los líquidos y mantener constante el hematocrito. La invasión bacteriana y la toxemia deben tratarse mediante antibióticos que combatan gérmenes anaeróbicos⁴⁴.

1.9. MECANISMOS DE LESIÓN CELULAR COMO CONSECUENCIA DE LA HIPOXIA O ANOXIA.

Hipoxia es la disminución del riego sanguíneo en un tejido. Cuando se interrumpe el flujo de manera total y brusca se habla de anoxia o shock isquémico.

Consecuencia de la disminución del riego sanguíneo es la anoxia tisular. La célula sufre alteraciones bioquímicas y estructurales produciéndose una activación del sistema neuroendocrino⁴⁵, que de no normalizarse en breve plazo, conducen a la muerte de la célula por falta de oxígeno, desencadenando toda una serie de alteraciones en su microentorno que influyen sobre la homeostasis.

1.9.1. MECANISMOS GENERALES.

En la célula existen cuatro sistemas celulares especialmente vulnerables, que son: la membrana celular, la respiración aerobia, la síntesis de proteínas y la estructura genética.

Cuando se produce la disminución del flujo sanguíneo a un tejido, el resultado inmediato es el descenso de la oxigenación y la alteración de la respiración aerobia de la célula por fallo de la fosforilación oxidativa llevada a cabo por la mitocondria. La primera alteración ocurre a nivel de la membrana, donde se produce un cambio brusco de la permeabilidad, los mecanismos de transporte se alteran y disminuye la diferencia de potencial intermembranal. El ATP celular disminuye y aumenta la concentración de AMP, con lo que se estimula la actividad de la fructoquinasa y la fosforilasa, aumentando la glucólisis anaerobia. El glucógeno comienza a degradarse rápidamente, y también empieza a generar ATP la creatinquinasa a partir del fosfato de creatinina. La glucólisis anaerobia genera ácido láctico y fosfatos inorgánicos liberándose iones hidrógeno, lo que produce un rápido descenso del pH, provocando aglutinación de la cromatina celular.

Por fallo de la bomba Na^+/K^+ , el Na^+ comienza a penetrar en la célula y el K^+ sale al espacio extracelular, alterándose el equilibrio osmótico. La respuesta inmediata es la activación de la ATPasa, aumentando el consumo de ATP y estimulando a la mitocondria a producir mayor cantidad de energía. Al faltar los elementos necesarios para ello, se produce un desequilibrio inmediato en el microambiente celular lo que desencadena una pérdida de actividad de la ATPasa, disminuyendo la actividad de la adenilato ciclasa⁴⁶.

La ganancia neta de soluto se acompaña de pérdida del equilibrio osmótico, edema celular y una dilatación del retículo endoplásmico. Además se pierde la capacidad de eliminar catabolitos intracelulares, contribuyendo a la entrada de agua.

La mitocondria también ve alterado su microambiente, de modo que se rompe el equilibrio osmótico, además se alteran los niveles de Mg^{2+} y los de Ca^{2+} . La pérdida del equilibrio en la regulación del Ca^{2+} celular activa la fosfolipasa A_2 .

En este momento la actividad metabólica celular se detiene y especialmente la mitocondrial. El DNA comienza a sufrir alteraciones severas, cada vez más cantidad de ATP es consumido y menos sintetizado, las mitocondrias se vacuolizan, hay una pérdida masiva de proteínas, enzimas, coenzimas y ácidos nucleicos y aparecen roturas de las membranas

lisosomales dejando escapar al medio DNAasas, proteasas y glucosidasas. Comienza la degradación lipídica de los ácidos grasos de las membranas por acción de la fosfolipasa A₂, disparándose la reacción en cadena de la peroxidación lipídica, originándose radicales libres (RL) que agravan aún más las lesiones. Además se liberan sustancias inflamatorias y quimioatrayentes que actúan como agentes tóxicos, entre los que se encuentran los metabolitos del ácido araquidónico, lisofosfolípidos o el factor activador de las plaquetas⁴⁷ -figura 2-.

Si el proceso continúa se producen mecanismos de lesión irreversibles que hacen que la reparación celular sea inviable. Pasadas estas barreras críticas, ni siquiera la reoxigenación del tejido puede impedir la necrosis.

1.10. ACTIVACIÓN DE LA FOSFOLIPASA A₂. CASCADA DEL ÁCIDO ARAQUIDÓNICO.

Uno de los mecanismos de respuesta más típicos de los tejidos a la anoxia es la inflamación del tejido en cuestión, cuyo efecto más inmediato es una vasodilatación y un incremento de la perfusión sanguínea al tejido alterado. La injuria tisular y la deplección de ATP activa las fosfolipasas de la membrana y especialmente la fosfolipasa A₂ iniciándose la liberación de la cascada metabólica del ácido araquidónico, dando lugar a la síntesis de prostaglandinas y leucotrienos. El ácido araquidónico libre va a ser degradado por la ciclooxigenasa, dando lugar a endoperóxidos del tipo prostaglandinas, que conducen a la formación de tromboxanos y prostaciclina⁴⁸, proceso en el cual se forman RLO los cuales inician la peroxidación lipídica de las membranas⁴⁹.

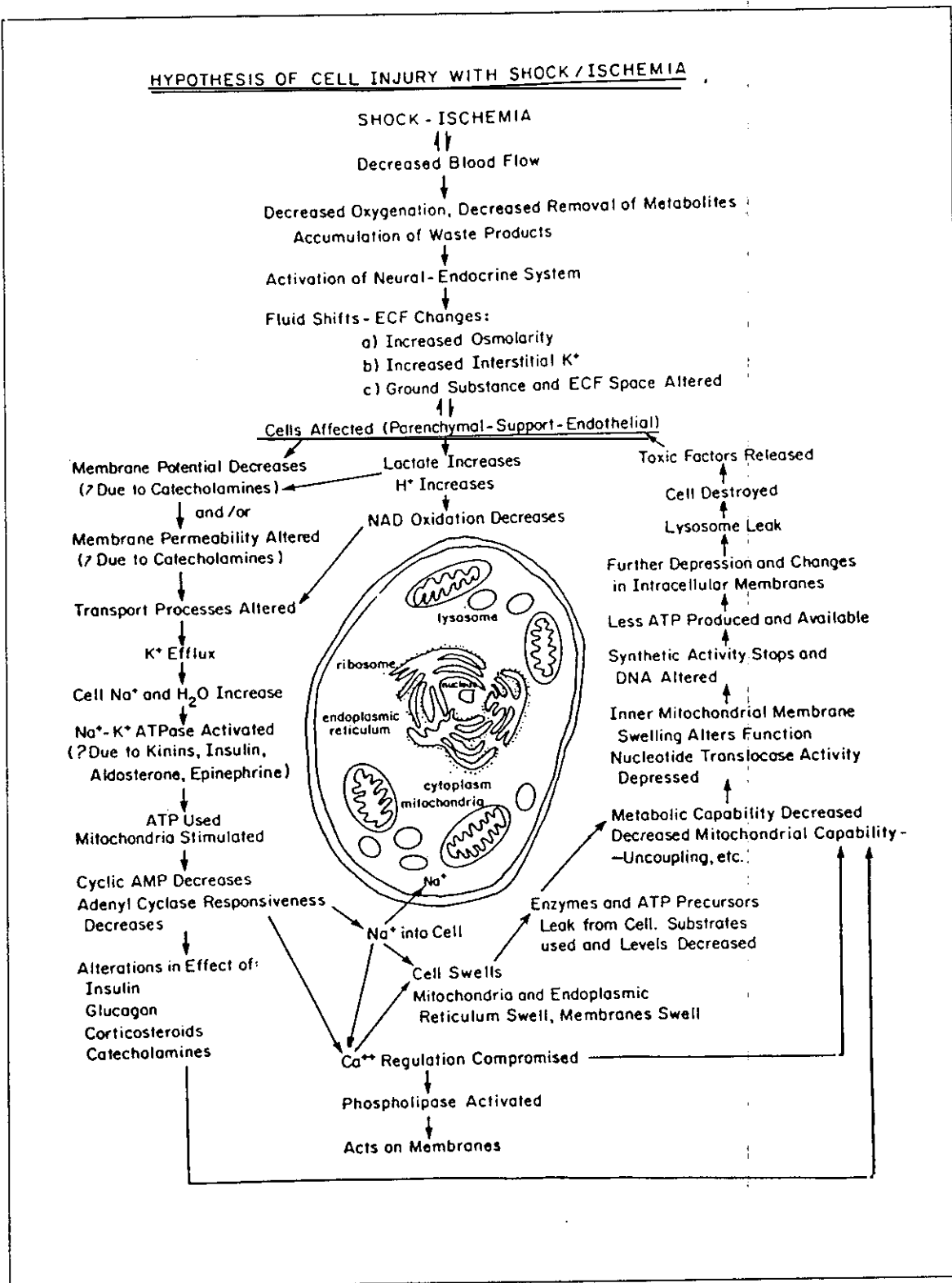


Figura 2.- Esquema sobre los mecanismos de lesión celular ocurridos durante el shock isquémico. (Chaudry. Alterations in cell function with ischemia and shock and their correction. Arch Surg 1981).

1.11. PEROXIDACIÓN LIPÍDICA.

Durante la peroxidación lipídica, los ácidos grasos poliinsaturados que constituyen la estructura de la membrana celular, son oxidados a productos lipídicos intermedios, que reaccionan a su vez con otros ácidos grasos poliinsaturados. Probablemente, la lesión de la membrana, tanto celular como la de los orgánulos celulares, constituye uno de los daños más lesivos y a menudo de carácter irreversible, que se producen como consecuencia de la isquemia⁵⁰.

El proceso de peroxidación se inicia cuando un ácido graso -componente estructural de las membranas biológicas- es atacado por una especie lo suficientemente reactiva como para arrancar un electrón a un grupo metileno del ácido poliinsaturado, como puede ser el radical hidroxilo -en este caso el radical superóxido no es lo suficientemente reactivo para iniciar la cascada-. Cuando esto ocurre, aparece un grupo con un radical carbono con desprendimiento de agua. El siguiente paso es la estabilización del radical carbono, el cual reacciona con otro grupo similar, formándose así dienos conjugados.

Cuando en el medio existe oxígeno suficiente, los grupos de radical carbono reaccionan con el oxígeno formándose radicales peroxilo. Durante la isquemia, los niveles de oxígeno son muy bajos, por lo que se establecen reacciones con otros lípidos, e incluso reaccionan con otros componentes de las membranas como proteínas u otras moléculas orgánicas. Esta fase de reacción con otras moléculas es lo que se llama propagación de la cascada, prolongando el efecto destructor en el tiempo y en el espacio, y en consecuencia, agravando fatalmente las lesiones producidas por la anoxia. El producto último de esta cascada es el MDA, una molécula presente en todos los tejidos en concentraciones muy bajas pero que aumenta su presencia en tejidos isquémicos⁵¹. La principal causa de su formación es debida a la peroxidación lipídica, durante la destrucción de los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas. Su molécula es:



1.11.1. MEDIDA DE LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA.

Existen gran variedad de pruebas y métodos para la determinación de la peroxidación lipídica de las membranas celulares. Entre las más destacadas están la cuantificación de

peróxidos, el consumo de oxígeno, la formación de dienos conjugados, la cuantificación de gases hidrocarbonados, la pérdida de ácidos grasos, la medida de la fluorescencia, el test del ácido tiobarbitúrico, etcétera⁴⁹.

La valoración del MDA ha sido el método más utilizado en los últimos 30 años como marcador de la peroxidación lipídica de las membranas⁵². El test del ácido tiobarbitúrico, o test del TBA se basa en la reacción *in vitro* que se produce cuando se combinan el TBA y el MDA libre en los tejidos, con el desprendimiento de dos moléculas de agua. En la reacción se genera un ambiente ácido y se producen temperaturas elevadas, que dar origen a la formación de compuestos indeseables. Estos pueden unirse al TBA en lugar del MDA, con puntos de similar absorción, confundiendo los resultados e indicando un estado mayor de peroxidación al que realmente existe⁵³ efecto que se elimina realizando todo el trabajo en cristalizadores con agua a temperatura entre 0 y 5°C.

El proceso se inicia con una muestra de tejido a analizar conservado en frío, a la que se añade butil hidroxitolueno y ácido ortofosfórico con el fin de disminuir el pH del medio, dejando en un baño de agua a 90°. A continuación se pasa a agua fría para detener la reacción y se extrae el TBA combinado con el MDA con n-butanol, centrifugando la muestra. Se recoge la fase orgánica y se valora por espectrofotometría a 535 nm. Los resultados se extrapolan en una curva patrón de concentraciones conocidas⁵³.

1.12. MECANISMOS DE LESIÓN CELULAR COMO CONSECUENCIA DE LA REPERFUSIÓN Y REOXIGENACIÓN DEL TEJIDO.

Los procesos de I/R ocasionan dos mecanismos diferentes en relación con la fisiopatología del proceso: el primero producido por la ausencia de flujo sanguíneo, durante el cual se producen las alteraciones tisulares y citológicas descritas anteriormente; y el segundo es debida al efecto que causa la reintroducción de sangre en el tejido anóxico⁵⁴. El restablecimiento del flujo sanguíneo a los tejidos isquémicos es imprescindible para la regeneración celular y para la limpieza tisular de metabolitos tóxicos, recuperando de nuevo la homeostasis perdida durante la anoxia. Sin embargo, la reperfusión agrava las lesiones provocadas por la isquemia. Este fenómeno ha sido conocido por ello como la "paradoja del reflujo"⁵⁵.

1.12.1. IMPLICACIÓN DE LOS RADICALES LIBRES DE OXÍGENO.

Durante la reperfusión del tejido se forman metabolitos reactivos del oxígeno. Los RLO reaccionan con las biomoléculas de los tejidos, entre las que destacan ácidos nucleicos, lípidos de membrana, enzimas, receptores de membrana etcétera. Este proceso se inicia a los 2 ó 3 minutos de haberse restablecido el flujo sanguíneo a los tejidos infartados⁵⁶. Los RLO que se forman comienzan a degradar las membranas e iniciando el proceso de peroxidación lipídica.

1.12.2. PAPEL DE LA XANTINO OXIDASA EN LA REPERFUSIÓN.

La xantino oxidasa (XO), enzima implicada en el catabolismo de los ácidos nucleicos, está ampliamente distribuida por todos los tejidos de los mamíferos y abunda especialmente en el intestino delgado. Tiene la capacidad de generar radicales libres (RL) durante la oxidación de la hipoxantina o de la xantina.

En tejidos sanos y sin alteraciones, la XO se encuentra en concentraciones muy bajas y estas reacciones son llevadas a cabo por la xantina deshidrogenasa (XD). Durante episodios isquémicos, la XD se convierte en XO, almacenándose en altas concentraciones, sin que apenas exista XD. En menos de un minuto de isquemia toda la XD se transforma en XO⁵⁷. Otros autores piensan que la transformación de XD en XO ocurre en todos los tejidos isquémicos pero la acumulación depende de la duración del estado anóxico, de modo que para ello proponen diferentes curvas para demostrar la relación tiempo de isquemia conversión⁵⁸.

En comparación con otros tejidos, la mucosa intestinal tiene una capacidad muy elevada de oxidar la hipoxantina hacia xantina vía XO -aproximadamente 100 mU/g neto de peso-⁵⁷ y su actividad se encuentra a lo largo de toda la mucosa, incrementando su actividad desde el vértice de las vellosidades hasta la base⁵⁹. Estudios de inmunolocalización ponen de manifiesto que la XO de la mucosa intestinal se encuentra en células endoteliales a nivel de las vellosidades⁶⁰, sin embargo, otros ensayos realizados mediante histoquímica desvelan su localización a nivel de las células epiteliales⁶¹.

1.12.3. AUMENTO DE LA PERMEABILIDAD DE LA MUCOSA.

La hipoxia asociada a la disminución del flujo vascular a la mucosa, y la presencia de

agentes oxidantes en la región reperfundida provoca un incremento de la permeabilidad microvascular⁶² que se hace máxima a los 30 minutos de la reperfusión⁶³, mediante la acción de factores locales y por alteraciones en el microambiente de la célula. Entre estos factores tisulares pueden encontrarse los eicosanoides liberados como consecuencia de la destrucción de las membranas, los productos procedentes de lisis celulares por isquemia, la liberación de neurotransmisores locales, la degranulación de mastocitos y la modulación de la respuesta inmune producida en el área dañada, mediada por citoquinas⁶⁴, así como gran cantidad de sustancias quimioatrayentes y de factores neutrofilicos⁶⁵.

1.12.4. MECANISMOS DE LESIÓN TISULAR PROVOCADA POR LEUCOCITOS.

Durante la reperfusión, los neutrófilos contribuyen a la lesión de los tejidos, y, además, activan la presencia de nuevos neutrófilos en la zona, agravando las lesiones.

El efecto de los neutrófilos sobre la región reperfundida se basa en tres puntos:

- Adhesión del neutrófilo al endotelio de capilares y vénulas^{66,67}, produciendo la rotura lesional en la zona, con el consecuente aumento de RL.

- Acumulación de neutrófilos en el área afectada, induciendo a la formación de grumos y taponos leucocitarios⁶⁸. Esto, unido al aumento de deformabilidad de eritrocitos, la baja presión vascular existente, la activación de los sistemas de coagulación por hemorragias internas y la activación de los propios neutrófilos, ocasiona una oclusión microcirculatoria que provoca un síndrome de no reflujo.

- Agregación leucocitaria a distancia, formando microémbolos.

El acúmulo de estas células a su vez, dispara la síntesis de sustancias quimioatrayentes, agregando más células al área, con oclusión microcirculatoria, desestabilización de las células endoteliales, generación de nuevos RL dificultando el retorno adecuado de sangre oxigenada.

Los neutrófilos activan proteasas, colagenasas etcétera y promueven un daño directo sobre el endotelio. Estas lesiones celulares cierran nuevamente el ciclo disparando la degradación del ácido araquidónico⁶⁹.

También se activa el sistema de complemento y la liberación de citoquinas que estimulan la síntesis de moléculas de adhesión, activando a los leucocitos.

En resumen, los procesos que ocurren durante los procesos de I/R intestinal se pueden resumir en:

A) Fase isquémica

- Disminución del rendimiento energético celular por disminución del aporte de oxígeno. La célula entra en anaerobiosis, reduciéndose considerablemente el número de ATP generados.

- Disfunciones en la actividad celular por desequilibrio de la bomba Na^+/K^+ , con alteraciones en la permeabilidad membranal.

- Lisis celular con la consecuente liberación de enzimas degradativas al intersticio.

- Aumento de la presión osmótica y edema celular, que se traduce en alteración de la permeabilidad, con edema tisular generalizado⁷⁰.

- Activación de la ruta catabólica del ácido araquidónico, por activación de la fosfolipasa A_2 .

- Conversión de la xantina deshidrogenasa en xantino oxidasa⁵⁸.

- Aumento de la proliferación anaerobia bacteriana.

- Acúmulo de neutrófilos en la zona ante el aumento de sustancias de desecho⁷¹.

B) Fase de repermeabilización

- Generación de RL con el reinicio de la cadena respiratoria mitocondrial

- Generación de tromboxanos y leucotrienos, con síntesis de RL, procedentes de la cascada del ácido araquidónico.

- Génesis de RL por la conversión de hipoxantina en xantina⁷².

- Liberación de RL por los polimorfonucleares activados.

- Peroxidación lipídica de las membranas por acción de los RL.

- Alteración de la microcirculación por acúmulo de neutrófilos⁷³ y la adhesión de éstos a las células endoteliales⁶⁷.

- Afectación de otros órganos por la acción de RL.

•Aumento de la inflamación tisular por acción de los polimorfonucleares⁷⁴ e incremento de la permeabilidad vascular⁷⁵.

1.13. MODELOS EXPERIMENTALES SOBRE TRATAMIENTOS ANTIOXIDANTES.

La rata se ha utilizado frecuentemente en procedimientos para evaluar la isquemia mesentérica, y para comprobar el efecto de reversión o disminución de las lesiones con el empleo de fármacos. Los intentos de constatar la participación de los RL en la patogenia de los procesos de I/R, han permitido elaborar diferentes métodos para cuantificar las lesiones y para buscar tratamientos efectivos que disminuyan la mortalidad de estas afecciones⁷⁶. En el presente trabajo se han seleccionado aquellos referidos a la I/R del tracto intestinal.

Los primeros estudios dirigidos a aumentar la supervivencia se realizaron con tratamientos a base de glúcidos a fin de suministrar un aporte energético adicional, ya que durante la isquemia se producía un descenso brusco de los niveles de ATP⁷⁷, causada, en parte, por la acidosis metabólica, y además porque este decremento del pH provocaba una disminución en la actividad de la fosfofructoquinasa⁷⁸. La fructosa 1,6 difosfato es un intermediario de la glucólisis que genera gran cantidad de energía, y que presenta un efectivo papel terapéutico durante la isquemia y después de la reperfusión de órganos hipóxicos⁷⁹.

Sawchuck *et al.*⁸⁰ en 1986, realizaron un trabajo para comparar el efecto de la fructosa 1-6 difosfato y de la glucosa cuando se inyectaban en ratas sometidas a isquemia de la AMC durante 90 minutos. Tras 48 horas de reperfusión encontraron que tanto la glucosa como la fructosa 1-6 difosfato lograban incrementar de manera similar la tasa de supervivencia, con respecto a animales control, tratados con solución salina. Boornstein, Lawrence y Cronenwett⁸¹ en 1988 apuntaron como tratamiento farmacológico contra la isquemia intestinal el empleo de glucagón. Para ello utilizaron ratas macho de variedad Sprague-Dawley, y tras exponerlas a isquemia mesentérica durante 85 minutos, encontraron diferencias significativas de supervivencia tras 48 horas de reperfusión, frente a un grupo control tratado con sustancia placebo a base de solución salina.

Sun, Farias y Markov⁸² en 1990, utilizaron dos grupos experimentales de ratas macho

sometidas a 30 minutos de isquemia: uno tratado con glucosa y el otro con fructosa 1-6 difosfato, entre los 3 y los 5 minutos anteriores y posteriores al momento de la reperfusión, encontrando diferencias significativas de supervivencia, con respecto a animales control tratados con solución salina.

Wang *et al.*⁸³ estudiaron los efectos de la adenosina y la adenina en el metabolismo del intestino en I/R. Sometieron las ratas a 60 minutos de isquemia y 20 minutos de reperfusión. Prepararon cuatro grupos, uno control, y tres de tratamiento con: 200 µg de adenosina; 500 µg de adenosina; y 500 µg de adenina, respectivamente. Determinaron a nivel yeyunal la concentración del ATP y el grado de peroxidación lipídica por HPLC (High Performance liquid chromatography). Concluyeron que la adenosina promovía rápidamente la recuperación de los niveles de ATP tras la reperfusión, mientras que la adenina era mucho más lenta y que el tratamiento con adenosina no disminuía la peroxidación lipídica.

Dada a la implicación del sistema de la XO durante la isquemia y la generación de RL en el momento de la reperfusión, otros autores emplearon análogos de la hipoxantina. Morris, Haglund y Bulkley⁸⁴ en 1987, encontraron una disminución considerable de las lesiones en el epitelio intestinal de ratas sometidas a isquemia intestinal y tratadas con alopurinol -análogo estructural de la hipoxantina-, respecto de animales control. Moya, Fernández y Martínez⁸⁵ en 1991 administraron diferentes concentraciones de alopurinol intraperitoneal a 50 ratas macho antes y después de un cuadro isquémico, encontrando lesiones más leves en la mucosa intestinal respecto a los animales control. Resultados similares encontraron Krasna y Lee en ratones sometidos a isquemia intestinal⁸⁶. Rodríguez trató a dos series de ratas sometidas a 30 y a 60 minutos de isquemia intestinal respectivamente, con alopurinol y valoró los niveles de MDA concluyendo que el alopurinol reducía el daño producido por la privación de oxígeno disminuyendo los niveles de MDA respecto al grupo control⁸⁷.

Otras sustancias utilizadas han sido el α -tocoferol o el ácido fólico, que se unen a las membranas celulares, evitando o disminuyendo su peroxidación lipídica, lo que contribuye a disminuir de las lesiones histológicas⁸⁸ y a aumentar la supervivencia⁸⁹.

Puesto que los cuadros isquémicos cursan en muchas ocasiones con un importante componente inflamatorio, activado inicialmente por la fosfolipasa A₂, se han utilizado sustancias inhibitoras, a fin de detener la destrucción masiva de las membranas celulares. Otamiri, Lidhall

y Tagesson⁹⁰ en 1988, emplearon la quinacrina, un potente inhibidor de la fosfolipasa A₂ encontrando un descenso poco relevante de las lesiones intestinales. Otros autores han continuado esta línea bloqueando productos intermedios generados tras la liberación del ácido araquidónico como la prostaglandina E₂ o los leucotrienos. Fernández, Martínez y Vega⁹¹ utilizaron indometacina -un antagonista de la prostaglandinas- en ratas hembra, señalando una disminución moderada de las lesiones histológicas, en cambio, Ben-Dahan *et al.*⁹² no encontraron diferencias significativas de supervivencia en ratas con IMA tratadas con indometacina respecto a controles.

En los últimos años se están empleando como antioxidantes, mezclas de sustancias para reducir al máximo las lesiones producidas por la reperfusión. Massberg *et al.*⁹³ compararon las lesiones producidas durante la reperfusión en dos grupos de ratas expuestas a I/R intestinal, tratando a un grupo con una solución de *Ringer lactato* y a otra con *Carolina rinse* -que contiene adenosina, alopurinol, glutatión, deferoxamina, lactato sódico, cloruro potásico, cloruro sódico y cloruro cálcico-, indicando que el segundo grupo presentó menos lesiones en la mucosa intestinal y que se prevenía el acúmulo de leucocitos.

Otros autores han empleado como tratamiento sustancias antioxidantes enzimáticas como la superóxido dismutasa (SOD). Granero⁹⁴, para comparar el efecto que producía el tratamiento con SOD, empleó cuatro grupos de ratas; dos fueron sometidos a 30 y 60 minutos de IMA respectivamente, mientras que los otros dos fueron expuestos a los mismos tiempos de isquemia intestinal, pero además fueron tratadas con SOD -15 UI/g-. Encontró una disminución en las lesiones estructurales del enterocito y una disminución de los niveles de MDA en los animales tratados. Fernández⁹⁵ obtuvo resultados parecidos cuando provocó isquemia hepática experimental, valorando niveles de MDA y lesión celular.

1.14. FALLO MULTIORGÁNICO.

Horton y White pusieron de manifiesto una complicación multiorgánica tras un período de I/R intestinal. Como consecuencia este cuadro patológico se liberarían mediadores inflamatorios procedentes de la destrucción de membranas celulares, incluyendo derivados del metabolismo del ácido araquidónico y presencia de RLO, que contribuirían al desorden isquémico, con peroxidación de membranas y destrucción masiva de éstas; endotoxinas liberadas

por el desarrollo de las bacterias anaerobias del intestino; ácido láctico por un descenso brusco de los metabolitos aerobios, con una bajada del pH y liberación de agentes quimioatrayentes que provocarían un aumento de la permeabilidad vascular, con presencia de edema intersticial generalizada. Estos componentes liberados al torrente sanguíneo, ya alterado como consecuencia de un fallo hemodinámico general, provocaría una disfunción cardíaca general, caracterizada por pérdida de contractibilidad con posibilidades de fallo ventricular⁹⁶. Las citoquinas están muy implicadas en las disfunciones de la microcirculación vascular tras episodios de I/R. Xiao, Carden y Alexander encontraron en ratas un incremento importante de estas últimas tras 90 minutos de isquemia intestinal⁹⁷. El resultado final sería un fallo multiorgánico generalizado que conduciría a un shock isquémico y la muerte del animal.

Otros autores exponen la respuesta de otros órganos remotos, dañados como consecuencia de un fallo isquémico en el intestino. LaNoue *et al.*⁹⁸ señalan que la I/R intestinal induce edema pulmonar como consecuencia de la liberación de tromboxano, Lee *et al.*⁹⁹ mencionan alteraciones hepáticas como consecuencia de la presencia de gas en la vena porta procedente de intestinos isquémicos y Shutz *et al.*¹⁰⁰ menciona complicaciones cardíacas como consecuencia de cuadros de isquemia mesentérica aguda.

1.15. SUPERÓXIDO DISMUTASA.

En 1968 McCord y Fridovich encontraron que una enzima presente en los hematíes era capaz de catalizar al ión superóxido, y por esta capacidad se la denominó superóxido dismutasa (SOD)¹⁰¹.

La SOD es una metaloproteína en cuya estructura se encuentra un grupo metálico unido a cuatro residuos de histidina. Actualmente se engloba a la SOD en tres familias dependiendo del grupo metálico que lleven en su estructura: hierro-SOD (Fe-SOD), manganeso-SOD (Mn-SOD) y la cobre/zinc-SOD (Cu/Zn SOD).

La dismutación es muy rápida, con reacciones de $2 \cdot 10^9$ moles por segundo. Con un punto isoeléctrico de entre 4,6 y 6,8, la enzima presenta una carga neta negativa, lo que debería ser una barrera electrostática para la entrada de aniones superóxido, en cambio acelera enormemente la reacción de catálisis. Estudios cristalográficos demuestran que la estructura de la Cu/Zn SOD presenta en la superficie un túnel de entrada cargado positivamente con la

existencia de 8 residuos aminoacídicos de tipo lisina, los cuales crean un campo magnético que atrae y guía los aniones superóxido. Lo más probable es que estas características impidan una colisión con la enzima orientando los aniones directamente al centro activo¹⁰².

La superficie de la enzima presenta un diámetro aproximado de 24Å. El diámetro disminuye progresivamente hasta llegar al centro activo, donde se reduce tan sólo a 4Å. El túnel de entrada forma un verdadero acelerador de partículas para los aniones superóxido que son guiados hasta impactar con el átomo metálico¹⁰³.

El mecanismo catalítico de la enzima consiste en la reducción y reoxidación de aniones superóxido, generados durante el metabolismo celular y mantenidos en muy bajas concentraciones por la SOD¹⁰⁴. Estos aniones son reducidos y se forma una molécula mucho menos reactiva, que es el peróxido de hidrógeno, el cual es rápidamente destruido por la catalasa.

- *Cobre/zinc-superóxido dismutasa.*

Todas las Cu/Zn SOD aisladas de organismos eucariotas tienen un peso molecular aproximado de 32 Kd y están formadas por dos subunidades proteicas, cada una de las cuales presenta un centro activo que contiene un ión de cobre y otro de zinc. Cada subunidad está compuesta principalmente por ocho cadenas antiparalelas de 151 aminoácidos cada una, dispuestas en estructura β , formando un cilindro y con tres *loops* exteriores. El ión cobre del centro activo se une a la molécula a través de cuatro residuos de histidina -44, 46, 61 y 118-, mientras que el átomo de zinc interacciona con el de cobre a través de la histidina 61, y se une a la molécula a través del carboxi terminal de la histidinas 69 y 78 y del grupo aspartato 81^{105,106}. La reacción catalizada por la SOD procedente de eritrocitos de bovino tiene un margen muy amplio de acción entre pH de 5,3 y 9,5.

Durante la reacción de dismutación el cobre realiza una reacción reversible de oxidación y reducción, eliminando de este modo los radicales superóxido y transformándolos en O₂ y H₂O

El zinc no participa en la reacción del ciclo catalítico, y parece que su presencia es imprescindible para estabilizar la estructura de la molécula¹⁰⁵.

La Cu/Zn SOD está presente en la mayoría de los tejidos y abunda en el interior de las células. A nivel extracelular se la conoce como EC-SOD¹⁰⁷ y es una glicoproteína tetramérica hidrofóbica, con peso molecular de 135 Kd, y aunque su función no está clara, parece que actúa

como agente antioxidante en los espacios extracelulares.

Los valores medios de la enzima en los tejidos varían sensiblemente según el sexo. En el duodeno se ha comprobado que los niveles de Cu/Zn SOD, para hombres es de 471 UI/mg de proteína, mientras que en mujeres este valor se reduce a 311 UI/mg de proteína. Tampoco existe una relación entre los niveles de SOD extracelular e intracelular. Los niveles de EC-SOD en hombres son de 14 UI/mg de proteína y en mujeres alcanza valores de 18 UI/mg de proteína¹⁰⁸. Es importante también añadir que la concentración de esta enzima en los tejidos no se mantiene constante en el tiempo y varían considerablemente en función de las necesidades. En estudios de hiperoxia en pulmones de ratas neonatas, se observa como la síntesis de Cu/Zn SOD se dispara tras 72 horas de exponer a los animales a una atmósfera hiperóxica, mientras que en adultos el incremento ocurre a las 24 horas¹⁰⁹.

- Manganeseo-superóxido dismutasa.

Tiene un peso molecular aproximado de entre 32 y 40 Kd. Cataliza la misma reacción que la Cu/Zn SOD aunque disminuye su actividad a pH elevados por encima de 7.

Su concentración en duodeno varía sensiblemente entre sexos, siendo en hombres 16,6 UI/mg de proteína y en mujeres 11,1 UI/mg de proteína.

- Hierro-superóxido dismutasa.

Contiene generalmente dos subunidades proteicas, presentando entonces uno o dos cationes por molécula. El hierro dentro de la enzima se presenta en estado férrico, y al oxidarse en presencia del anión superóxido pasa a anión ferroso. Al igual que la Mn SOD, presenta una considerable disminución de la actividad cuando se la expone a pH elevados.

2. INTERROGANTES, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DE INVESTIGACIÓN

2.1. INTERROGANTES

- Mediante el pinzamiento de la AMC ¿se produce isquemia intestinal aguda?
- En caso afirmativo ¿afectarían las lesiones derivadas de ello directamente a la supervivencia de los animales?
- Igualmente, ¿estaría relacionado directamente el tiempo de oclusión vascular con el número de muertes?, o lo que es igual, ¿es proporcional el tiempo de isquemia al porcentaje de muertes?
- El riesgo de muerte tras la isquemia experimental, ¿se concentra en un espacio corto de tiempo tras la repermeabilización o, por el contrario, es similar a lo largo de todo el tiempo de observación?
- ¿Influye el tiempo de isquemia en la salida del estado anestésico?
- ¿El grado de mortalidad afecta por igual a hembras y a machos sometidos al mismo modelo experimental de isquemia mesentérica aguda, o, por el contrario, el sexo determina alguna variación de la supervivencia?
- El peso de los animales en el momento de la intervención ¿constituye un factor capaz de modificar la tasa de supervivencia?
- Puesto que la presencia de radicales libres en el medio produce la peroxidación lipídica de las membranas, ¿aumentaría el grado de peroxidación de las membranas durante la isquemia-reperusión, con el consiguiente aumento de MDA libre?
- Puesto que el papel de una sustancia enzimática antioxidante como la SOD es neutralizar los radicales libres. ¿el tratamiento del animal con esta enzima disminuiría los niveles de MDA libre?, ¿es capaz el tratamiento con SOD de aumentar la supervivencia ante la isquemia?
- Como consecuencia de la I/R, ¿se alteran ciertos parámetros bioquímicos detectables?

- ¿Existen diferencias anatomopatológicas microscópicas o macroscópicas entre individuos control y los de las series isquémicas experimentales?. De existir estas diferencias, ¿se agravan al aumentar los tiempos de anoxia?
- ¿Cómo afecta un período de isquemia a la recuperación de las funciones fisiológicas del animal?

2.2. HIPÓTESIS.

• Hipótesis conceptual de trabajo: La IMA es una entidad patológica que cursa con un importante índice de mortalidad, en relación directa con la duración de la anoxia, de modo que, a mayor duración de la isquemia, son mayores las tasas de mortalidad en los animales, y por consiguiente, más graves las lesiones microscópicas y macroscópicas.

Puesto que los procesos de I/R se asocian a la presencia de RL, induciendo a la peroxidación lipídica de las membranas y a fallos multiorgánicos generalizados, la SOD atenuará el efecto lesivo de los RL y reducirá la tasa de mortalidad en individuos sometidos a isquemia intestinal.

- Hipótesis estadísticas:

- Hipótesis nula. La duración del tiempo de la isquemia intestinal no presenta ninguna relación con las tasas de supervivencia de los individuos sometidos a isquemia mesentérica experimental, ni la aparición de lesiones tanto microscópicas como macroscópicas. La presencia o no de RL en el medio no afecta a la estructura de las membranas celulares, y por tanto, el tratamiento con SOD no modifica, ni el grado de peroxidación lipídica ni la supervivencia de los animales.

- Hipótesis alternativa. Cuanto mayor es la duración de un cuadro isquémico, más severas son las lesiones que se determinan y tanto mayor es la mortalidad de los animales.

Como consecuencia de la presencia desproporcionada de RL en el medio, tras la reperfusión, se induce una rápida peroxidación de las membranas, incrementándose de manera considerable la presencia de MDA libre y la tasa de

mortalidad, efectos que pueden ser revertidos mediante un tratamiento adicional de SOD.

2.3. OBJETIVOS.

Los principales objetivos del presente estudio experimental son los siguientes:

- Obtener las curvas de supervivencia y la función de riesgo, de animales sometidos a diferentes tiempos de IMA, con el fin de calcular la DL0, la DL50 y la DL 100.
- Determinar en qué medida, la isquemia puede afectar en diferente grado a machos y a hembras.
- Definir el tipo y el grado de las lesiones estructurales, microscópicas y macroscópicas que se producen después de un cuadro de I/R, y valorar el grado de las lesiones con respecto a los tiempos de anoxia intestinal.
- Delimitar la “barrera crítica” de recuperación de los animales, según la cual se podrá conocer el intervalo de mayor morbimortalidad postisquémica.
- Demostrar las posibles alteraciones de los parámetros bioquímicos producidas tras la I/R.
- Cuantificar el grado de peroxidación lipídica de las membranas tras la I/R, determinando las concentraciones de MDA libre en intestino, antes y después de un cuadro de isquemia mesentérica, con y sin tratamiento a base de SOD administrada por vía intravenosa.
- Mejorar la tasa de supervivencia y disminuir el grado de las lesiones postisquémicas, empleando un método terapéutico a partir de SOD.
- Comprobar la evolución de diferentes parámetros fisiológicos tras la oclusión experimental de la AMC durante las 9 semanas posteriores a la intervención.

2.4. CRONOGRAMA DEL DISEÑO EXPERIMENTAL.

Este trabajo experimental consta de las siguientes etapas expuestas por orden cronológico:

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.

•Obtención de las curvas de supervivencia de cada una de las series experimentales, con el fin de conocer cómo se distribuye la mortalidad durante el tiempo de experimentación.

•Tras conocer los ritmos y las tasas de mortalidad, se estudian los diferentes grados de las lesiones que aparecen como consecuencia de los diferentes tiempos de isquemia. Determinación de los parámetros bioquímicos y de las características fisiológicas -ingesta de alimento y líquido, valoración de las heces, despertar anestésico, evolución del peso etcétera-, empleando la serie control y la serie *Sham operation*.

•Definidos los tiempos de isquemia y su letalidad, se administra SOD a dos series para estimar la tasa de mortalidad con tratamiento antioxidante.

•El último paso consistió en determinar si existe un aumento de MDA libre en el tejido isquémico como metabolito final de la acción de los RL durante la peroxidación lipídica, y el efecto del tratamiento con SOD en la concentración de MDA libre.

3. MATERIAL Y MÉTODO.

3.1. MATERIAL.

Se describe el animal de experimentación, el material y fármacos empleados en cada fase o acto de la experimentación.

3.1.1. ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN.

Se utilizaron ratas de laboratorio, pertenecientes a la especie *Rattus norvegicus*, variedad "Wistar". Se escogieron animales de entre 9 y 12 semanas de edad con peso comprendido entre 240 g y 300 g. siendo la media de 266,14 g. (DE=19,25). La elección de estos animales se debió a la menor presencia de tejido adiposo, a la buena salud que presentan los ejemplares jóvenes y ser la rata un animal relativamente asequible, de fácil manejo, resistente a infecciones, y que requiere pocos cuidados.

3.1.2. APLICACIÓN DE LA ANESTESIA.

Se utilizan para inyectar:

- jeringas de 1 y 2 cc para la administración de fármacos, modelo Plastipak® de un solo uso,
- agujas de 21 G de grosor y de 0.8 por 25 mm de longitud.

3.1.3. INDUCCIÓN ANESTÉSICA.

Se utilizó la mezcla de tres fármacos:

- diazepam, 5 mg/ml,
- atropina, 1 mg/ml,
- ketamina, 50 mg/ml.

La proporción de volumen de la mezcla fue: 10% de sulfato de atropina, 50% de ketamina y 40% de diazepam.

3.1.4. PREPARACIÓN DEL CAMPO QUIRÚRGICO.

- máquina de afeitar modelo Wahl 8900®,
- sustancia antiséptica, povidona iodada.

3.1.5. PREPARACIÓN QUIRÚRGICA.

Elementos que forman el soporte de base para la intervención:

- tabla de disección de corcho para sujetar al animal, de 40 cm de ancho por 60 cm de largo,
- lámina de papel de filtro que se sitúa cubriendo la superficie de la tabla de disección, de 52,5 cm de largo por 42,5 de ancho,
- tiras de esparadrado de tela modelo Leukoplast de 5 cm de ancho para fijar al animal por las extremidades,
- alfileres entomológicos para fijar el esparadrado al corcho.

3.1.6. ACTO QUIRÚRGICO.

3.1.6.1. Material fungible:

- mascarilla,
- guantes estériles de látex del 7 ½,
- gasas estériles de 5 cm por 5 cm,
- compresas,
- paños.

3.1.6.2. Laparotomía:

- pinzas de disección, Adson® de 12 cm,
- pinzas para tejidos, de dos por tres dientes de 18 cm de Ferris-Smith,
- tijeras de extremo curvo, Adson modelo BC-423® de 130 mm,
- tijeras de extremo recto, Adson modelo BC-321® de 115 mm,

- pinzas hemostáticas, Halsted-Mosquito® de 12 cm,
- porta agujas, de Mayo-Heger® de 15 cm.

3.1.6.3. Microcirugía:

- pinzas de extremo romo, modelo Adson OC-22® de 100 mm,
- pinzas de extremo con punta, modelo Adson BD-333® de 115 mm,
- tijeras modelo, Adson FD-22 ® de 85 mm.

3.1.6.4. Material quirúrgico habitual:

- bisturí de mango metálico, número 4 para hoja del número 20 ref. BB520 Aesculap AG®,
- recipiente metálico para solución salina, de 100 ml,
- cinta *vessel-loop* para visualizar y fijar la arteria mesentérica,
- microclamp atraumático, modelo Heifetz 659105 ® para la oclusión de la arteria mesentérica,
- lámpara para campo quirúrgico, Martín. Chromophare C-2000®,
- lupa de 0,7 a 4 aumentos modelo Olympus Tokyo 285079®,
- sutura sintética reabsorbible, Dexon de 3/0 para suturar la musculatura abdominal,
- sutura no reabsorbible de seda de 3/0 para suturar la piel,
- solución salina, para lavar la herida y limpiar la sangre.

3.1.7. NECROPSIA.

3.1.7.1. Fármacos:

- pentobarbital, 20 g/100 ml,

3.1.7.2. Instrumental:

- Para-formaldehído al 10%,

- tubos de ensayo, para la recogida de muestras,
- jeringa de 1 cc, para la administración de la medicación, modelo Plastipak ® de un sólo uso,
- aguja de 21 G, de medidas 0.8 por 25 mm,
- tabla de disección, de 40 por 60 cm con base de corcho,
- lámina de papel de filtro, de 42,5 por 52,5 cm,
- tijeras rectas, modelo Adson BC-321® de 115 mm,
- tijeras curvas, para el corte de tejidos blandos, modelo Adson BC-423 ® de 130 mm,
- cuenco metálico, de 100 ml para el lavado con solución salina de las piezas de necropsia,
- pinzas, modelo Ferris-Smith ® de dos por tres dientes de 18 cm,
- balanza de precisión electrónica para órganos, modelo FY-300®.

3.1.8. PESO DEL ANIMAL.

Balanza automática electrónica modelo Mini-sc Mobba®.

3.1.9. EXTRACCIÓN DE SANGRE.

Se practica utilizando:

- jeringa, Plastipak® de un solo uso de 10 cc,
- aguja estéril intramuscular, de un solo uso de 21 G y de medidas 0,8 por 25 mm,
- tubo de ensayo para bioquímica, con silicona inerte en el fondo.

3.1.10. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS SANGUÍNEOS.

Autoanalizador de bioquímica clínica Technicon DAX 2000®, junto con los correspondientes reactivos, para la determinación de urea, creatinina, aspártico transaminasa, alanin transaminasa, gamma glutamil transpeptidasa, láctico

deshidrogenasa, creatin fosfo kinasa, sodio y potasio.

3.1.11. ESTUDIO HISTOLÓGICO.

Se realiza mediante:

- inductor automático de parafina, Milles Scientific. Tissue-Tek Vip®,
- microtomo, Reichert-Jung. Modelo 2035 Boicut Leica instruments GmbH®,
- microscopio óptico, Nikon Optifot HFX-IIA®,
- cámara fotográfica,
- material de tinción.

3.1.12. ADMINISTRACIÓN DE LA SOD.

3.1.12.1. Material.

Se inyecta:

- Cu/Zn SOD liofilizada procedente de eritrocitos de bovino, en viales de 3000 UI., de SIGMA CHEMICAL CO®.
- solución salina para irrigación, con 0.9 g. de cloruro sódico por cada 100 ml de agua destilada y apirógena. Con un pH de 5,5 y osmolaridad de 308 mosm/l.

3.1.12.2. Instrumental.

Se utiliza el señalado a continuación:

- microinyector Meditronika modelo A-99®,
- butterfly-23 de 0,4 mm de diámetro externo, modelo Venisystem®,
- jeringas de 2 ml de un solo uso..

3.1.13. SOPORTE INFORMÁTICO.

- Hardware informático. PC 486-DX2, marca Redkom-Computer®, de 8 Mb de memoria RAM y 2,5 Gb de memoria ROM.

- Software informático. Se usaron los programas:
 - hoja de cálculo Excel versión 5.0 para Windows,
 - procesador de textos WordPerfect versión 6.1 para Windows,
 - procesador de textos Word versión 6.0 para Windows,
 - paquete estadístico SPSS versión 6.1.3 para Windows.

3.2. METODOLOGÍA .

3.2.1. ANESTESIA.

3.2.1.1. Medidas generales.

Durante la experiencia los animales dispusieron de comida y bebida *ad libitum* incluso en las horas previas a la intervención. Antes de ésta se realizó un control previo sobre el estado de salud y de peso, comprobando que éste se encontraba entre 240 y 300 g.

En las 24 horas previas a la intervención se realizó un estudio visual para detectar posibles lesiones externas, alteraciones de comportamiento o cualquier aspecto anómalo. De no encontrarse nada irregular el animal era encuadrado en un grupo y en una serie a la espera de la intervención.

3.2.1.2. Medidas preanestésicas.

Una vez incluido el animal en el grupo experimental correspondiente por cumplir los parámetros requeridos, y minutos antes de la operación, se le ponderó exactamente para calcular el volumen de anestesia a inyectar y, en el caso de los animales con tratamiento adicional de SOD, calcular la concentración de enzima a inocular.

3.2.1.3. Inducción a la anestesia.

Se sujeta al animal por la cola que se extrae entre los barrotes de la cubierta superior de la jaula; a continuación se tira suavemente del animal hasta que el rabo queda en su totalidad en el exterior, y la parte final del cuerpo apoyada en los barrotes. Inmovilizado el animal de esta manera, con el muslo apoyado en los barrotes, se procede a la inyección intramuscular del

preparado anestésico.

La preparación del complejo anestésico se realizó, mezclando en un tubo de ensayo de 10 ml, los fármacos siguientes: clorhidrato de ketamina -50 mg/ml-, diazepam -5 mg/ml- y sulfato de atropina -1 mg/ml-, en una proporción de 50%-40%-10% respectivamente. A continuación se agita el preparado, y del volumen total se extrae con una jeringuilla, la cantidad en ml, en función del peso del animal. Se le inocula 0.003 ml por cada gramo de peso.

Realizada la inyección del complejo anestésico, se libera al animal y se espera el tiempo necesario hasta que entre en estado de dormición. Esto se comprueba colocándole en posición supina y observando que ha perdido la capacidad de volverse y de moverse, y que se encuentra en relajación e hipotonía muscular.

3.2.1.4. Ventilación.

No es necesario aplicar ventilación artificial al animal, ya que es capaz de respirar por sí mismo, y son suficientes los gases normales de la atmósfera. Sí es importante tener la precaución de dejar libres las vías respiratorias y evitar que cualquier objeto le cubra la cabeza y, especialmente las fosas nasales.

3.2.1.5. Mantenimiento de la anestesia.

El volumen de anestesia inyectado en la primera dosis fue suficiente en los animales de las series II, III, IV, V, VIII, IX, X, XI y XII. En las series VI y VII, a los 100 minutos de la dosis inicial, se inyectaron 0.0008 ml por cada gramo de peso corporal del complejo anestésico, lo que mantuvo al animal dormido hasta el final de la operación.

3.2.2. MÉTODO DE LA PREPARACIÓN QUIRÚRGICA.

3.2.2.1. Rasurado.

Comprobado el estado anestésico se rasuró toda la superficie abdominal, desde el cartilago xifoides hasta los órganos genitales externos, en sentido longitudinal, y transversalmente, desde la extremidad inferior izquierda a la derecha.

3.2.2.2. Fijación a la bandeja de disección.

Con tiras de esparadrapo de tela se rodean las porciones terminales de las 4

extremidades, dejando un pequeño saliente en las tiras. Se coloca al animal en decúbito supino sobre una lámina de papel de filtro, situada sobre la bandeja de disección de corcho. Puesto el animal en el centro de la bandeja se fija clavando alfileres entomológicos en las tiras de esparadrapo que sobresalen, quedando la superficie abdominal expuesta hacia arriba y con las 4 extremidades extendidas en forma de X.

3.2.3. ACTO QUIRÚRGICO.

3.2.3.1. Asepsia.

El material utilizado en la intervención fue previamente esterilizado, o se utilizó material desechable esterilizado como agujas, jeringas, gasas, hojas de bisturí, etcétera.

Una vez rasurada la zona abdominal, se procedió a su limpieza mediante frotación con una gasa estéril impregnada en povidona iodada.

El operador realizó un lavado quirúrgico previo de manos con jabón antiséptico. Se trabajó con guantes de látex estériles, así como con mascarilla y bata quirúrgica estéril.

3.2.3.2. Técnica.

Situado el animal en decúbito supino, y fijado a la tabla de disección, se procede a la desinfección de la zona abdominal, limpiándola en todas las direcciones, con una gasa estéril impregnada en povidona iodada. Se cubre al animal con un paño quirúrgico abierto que delimite el campo operatorio expuesto al exterior.

A continuación se practica una laparotomía media, en dirección longitudinal desde el cartílago xifoides hacia la región pubiana con un corte aproximado de unos 5 cm. La incisión en piel se realiza con bisturí de mango metálico y hoja desechable.

Realizado el corte longitudinal de la piel se procede a la limpieza de la sangre con una gasa estéril impregnada en solución salina a 35°C.

El siguiente paso es seccionar los músculos rectos abdominales por la línea media, usando el bisturí para realizar un corte de medio cm de longitud, aproximadamente; tamaño suficiente para introducir unas pinzas rectas de extremo romo en la cavidad abdominal, con precaución para no tocar el paquete intestinal. A continuación se levanta con las pinzas la musculatura abdominal, y con las tijeras rectas se procede al corte por la línea alba hasta la altura

del cartílago xifoides. De este modo se accede a la cavidad intestinal, con espacio suficiente para la manipulación de la AMC. Después de realizado el corte se limpia la zona con gasa estéril empapada en suero.

Seguidamente se colocan los separadores, hechos con un clip doblado a modo de gancho y sujetos por detrás con una goma elástica, fijada con un alfiler entomológico clavado en la mesa de disección. Se coloca un separador a cada lado de la musculatura abierta y entre el clip y la musculatura se interpone una gasa estéril húmeda para evitar lesiones de la pared. Tanto el clip como la goma elástica fueron esterilizados dentro de una bolsa cerrada, con pastillas de paraformaldehído sólido.

Una vez separada la musculatura aparece el paquete intestinal que se extrae manualmente desplazándolo hacia el lado derecho del operador, y se envuelve en una gasa estéril empapada en suero a 35°C, para evitar erosiones intestinales y reducir al mínimo la evaporación de líquido.

Con el paquete intestinal en el exterior, se observan el riñón y la vena renal izquierdas. El paso siguiente es desplazar el estómago hacia la derecha, observando la AMC y su latido. En el extremo craneal toma su origen la arteria aorta abdominal, y en la porción caudal se introduce en la raíz mesentérica, donde inicia su ramificación.

Visualizada la AMC se procede a la utilización del material de microcirugía -tijeras y pinzas con extremo romo-, ayudado con lupa de cuatro aumentos. Con las pinzas de disección se levanta la arteria hacia arriba y con las tijeras de punta roma se abre un pequeño orificio en los tejidos periadventiciales a cada lado de la misma y se cruza por detrás con una cuidadosa manipulación para evitar su lesión.

Disecada la AMC, se pasa una cinta *vessel-loop* por detrás de la misma para su control -figura 3-.

A continuación, tras observar el tamaño y el latido de la arteria, se procede a la colocación del microclamp. Para ello, ayudándose de la cinta *vessel-loop*, se eleva el tronco arterial hacia arriba y se introducen las pinzas de microcirugía por detrás de la arteria de modo que asomen por el lado opuesto. Luego se elevan ligeramente las pinzas, provocando el levantamiento de la arteria. Entonces se abren las pinzas, colocando en el hueco que queda entre sus dos ramas el microclamp vascular atraumático. En este momento se toma la hora para medir el tiempo de isquemia y se comprueba que el latido arterial en el extremo caudal del microclamp

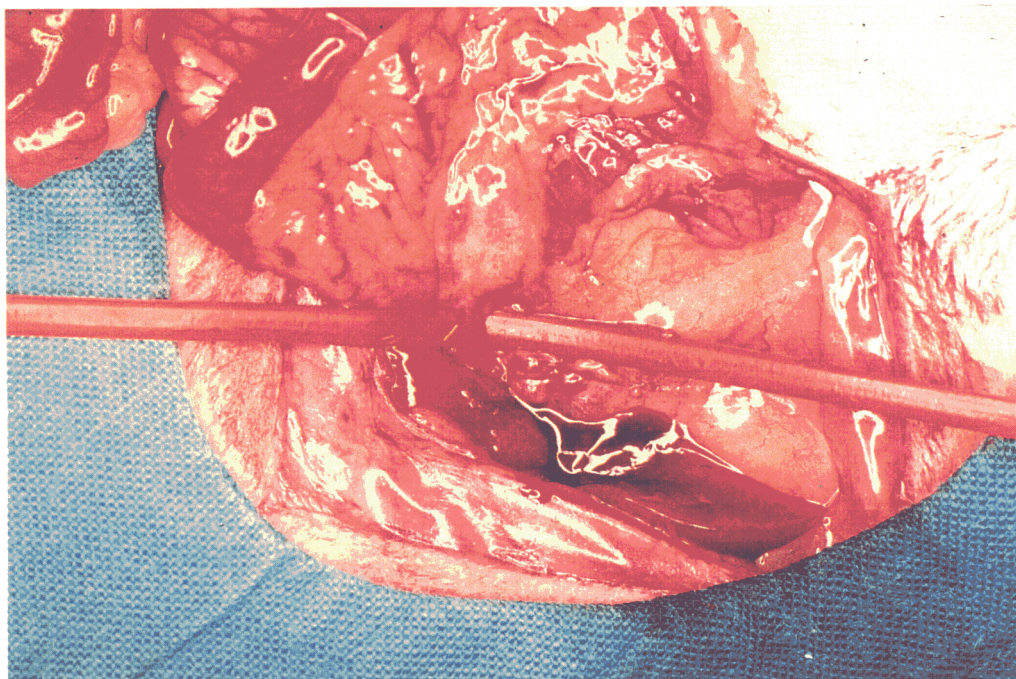


Figura 3.- Abdomen abierto de rata control, mostrando la arteria mesentérica craneal fijada mediante cinta *vessel-loop*.

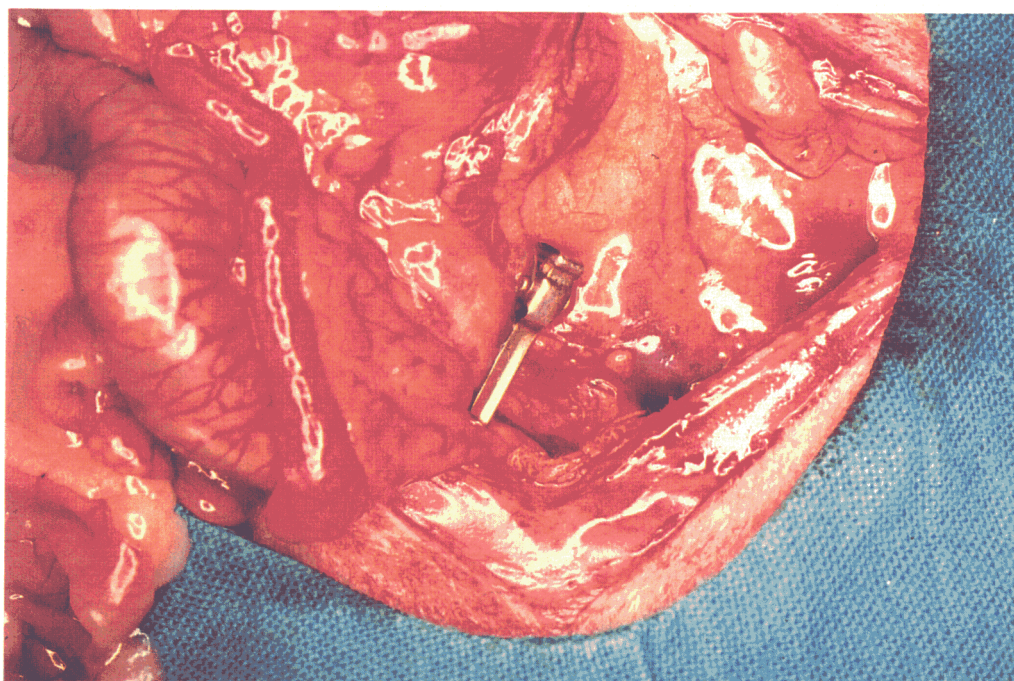


Figura 4.- Arteria mesentérica craneal ocluída mediante microclamp atraumático. Se observa la ausencia de riego en la parte distal de la oclusión.

se ha interrumpido -figura 4-. Se retiran los separadores y se procede a la colocación del paquete intestinal en la cavidad abdominal. De este modo se mantiene al animal mientras que dura la isquemia. La incisión se cubre con una gasa impregnada en suero para disminuir la pérdida de líquidos del organismo.

Transcurrido el tiempo de isquemia se retira el microclamp, previa colocación de los separadores y extracción del intestino, comprobando el restablecimiento de la circulación y el pulso arterial y la integridad del vaso.

Finalizada la intervención se procede al cierre de la musculatura con sutura sintética reabsorbible Dexon de 3/0 mediante puntos continuos, con aguja circular. En la piel se emplea sutura no reabsorbible -seda negra de 3/0-, con aguja triangular recta, por medio de puntos sueltos.

Tras suturar la incisión, se limpia la herida con solución salina a 35°, eliminando cualquier resto de sangre y aplicando povidona iodada en toda la superficie. El animal se coloca en una jaula de macrolón individual con base de sepiolita, disponiendo de comida y bebida *ad libitum*. En estas condiciones se hace un seguimiento del animal, observando la salida del estado anestésico. Tras 72 horas de observación en jaula individual los animales son trasladados a jaulas comunitarias de cinco animales.

Transcurridos 7 días desde la operación, se retiran los puntos externos de sutura de la piel. Para ello, se introduce al animal en una jaula de barrotes que permite su manipulación, sin ningún tipo de molestia y se cortan los puntos. A continuación se limpia la herida y se le vuelve a introducir en la jaula.

3.2.4. OBSERVACIÓN CLINICO-PATOLÓGICA TRAS LA RETIRADA DEL CLAMP.

Transcurridos los minutos de isquemia estimados para cada serie se valoraron las alteraciones clínico-patológicas producidas como consecuencia de la falta de irrigación. Los puntos observados fueron:

3.2.4.1. Presencia de gas intestinal. Se valoraron las acumulaciones anormales de gas en el intestino, especialmente en el ciego. Se definió como variable dependiente categórica, definiéndose como grado 0, la ausencia de gas intestinal; grado 1, la presencia moderada de gas;

y grado 2, la presencia abundante de este, que provoca dilatación notoria del ciego y acumulación importante en el resto de las partes intestinales.

3.2.4.2. Perforación intestinal. Se valoró la existencia, en su caso, de posibles roturas o perforaciones de la pared intestinal por visualización directa del intestino.

3.2.4.3. Placas de Peyer. En la revisión global del intestino tras el cuadro isquémico se verificó la presencia o no de placas de Peyer. Se definió como variable categórica, siendo de grado 0 cuando a la vista presentó un aspecto normal; y de grado 1 su presencia resaltada.

3.2.4.4. Hemorragia intestinal. Se vió la existencia o no de sangre en el lumen intestinal directamente y en comparación con el aspecto que presentaba el intestino antes del pinzamiento arterial. Se definió como variable categórica dependiente, siendo de grado 0, la ausencia de sangre extravasada; grado 1, la presencia focal de hemorragias intestinales; y grado 2, la presencia de hemorragias en sábana, con grandes áreas sangrantes a lo largo del intestino y cantidad abundante de sangre extravasada.

3.2.4.5. Desvitalización intestinal. Después de retirar el clamp se anotó el grado de desvitalización del intestino según una escala categórica, siendo de grado 0, cuando no se observó desvitalización intestinal; grado 1, la presencia de desvitalización discreta con ligera congestión y palidez; grado 2, desvitalización moderada con edema; y grado 3, desvitalización intensa y colapso de las arterias intestinales.

3.2.4.6. Repermeabilización vascular. Tras retirar el clamp de la arteria y permitir el paso de sangre nuevamente, se estimó la permeabilidad del tronco mesentérico y la presión del flujo, comprobando por apreciación visual directa, la recuperación del latido arterial y el paso de la sangre a través de la arteria. Se definió como variable categórica, siendo de grado 0 la reperusión correcta con observación evidente de la recuperación del latido arterial; y grado 1, la reperusión poco manifiesta con colapso arterial. A los individuos muertos durante el cuadro isquémico, que no soportaron el tiempo de isquemia, se les catalogó como sujetos perdidos (SP).

3.2.4.7. Alteraciones orgánico-fisiológicas. Se definieron como alteraciones orgánico-fisiológicas los estados de hipotermia, convulsiones, apnea o disnea, alteraciones de la frecuencia cardíaca -bradicardia o taquicardia-, o las manifestaciones cianóticas en órganos distales tales como las extremidades y el hocico. Se valoró como grado 0 la ausencia de alteraciones

orgánicas y como grado 1 la presencia de alguna de las alteraciones mencionadas.

3.2.5. OBSERVACIÓN CLÍNICA.

A continuación de la intervención quirúrgica de los animales se procedió a su observación individual, por series, en jaulas y estantes debidamente identificados. Seguidamente se detalla cada uno de los parámetros de estudio manifestando el método seguido para su observación:

3.2.5.1. Despertar después de la anestesia. Finalizado el proceso operatorio se separó al animal de la mesa de disección y se le trasladó a una jaula individual, donde fue observado permanentemente. Se consideró que el animal salía del estado de anestesia cuando comenzaba a realizar movimientos voluntarios, aunque no fueran desplazamientos largos, ya que se limitaba a torsiones del cuerpo y a movimientos de las extremidades. Se observó la respuesta a estímulos acústicos mediante palmadas y estímulos algógenos por punción leve en las extremidades posteriores. Se consideró positiva la respuesta cuando el animal respondía al estímulo, en forma de huida, sobresalto o retracción de la extremidad. Las observaciones se efectuaron con intervalos de 30 minutos durante las tres primeras horas posteriores al postoperatorio.

Durante el tiempo de observación postoperatoria, hasta el momento de abandonar del estado anestésico, los animales permanecieron en jaulas individuales en la sala de operaciones. Tras el despertar anestésico fueron devueltos al estabulario a las condiciones estándar de temperatura y fotoperíodo, manteniéndose en jaulas individuales durante las 72 horas posteriores a la intervención.

3.2.5.2. Ingesta de agua. Después de salir del estado anestésico los animales fueron devueltos al estabulario según se describe en el punto 3.2.5.1. La ingestión de agua fue comprobada visualmente, mediante un bebedor graduado, a las 24 horas, a las 48 horas, y a las 72 horas.

3.2.5.3. Ingesta de alimento. Se controló visualmente si el animal comía o no y cotejando la disminución del peso de la comida, con su peso inicial y al realizar las comprobaciones a las 24, 48 y 72 horas. Igualmente se apreció porque las porciones de alimento se colocaron enteros y aparecían roídos en los distintos períodos de observación.

3.2.5.4. Heces. Se determinó la cantidad, consistencia y color de las heces a las 24, 48 y 72 horas posteriores a la intervención.

3.2.5.5. Evolución del peso corporal. Cada animal fue pesado al inicio de la intervención quirúrgica comprobando que el peso estaba comprendido entre los límites establecidos -240 y 300 g-. La evolución del peso se siguió semanalmente a partir de la operación. Los animales que sobrevivieron 9 semanas fueron sacrificados y pesados. Los que no sobrevivieron ese tiempo fueron pesados en el momento de su muerte y antes de realizárseles la necropsia.

3.2.5.6. Supervivencia. Se determinó mediante observaciones realizadas a las 2, 12, 24, 36, 48, 60 y 72 horas posteriores a la retirada del clamp, y diariamente durante las 9 semanas que duró el experimento.

3.2.6. METODOLOGÍA DEL SACRIFICIO.

Transcurridas las 9 semanas de observación, los animales que no habían fallecido, fueron sacrificados por la inyección intramuscular de pentobarbital, a razón de 0,001ml por gramo de peso corporal.

3.2.7. NECROPSIA.

Fallecido el animal por causas naturales tras la operación, o por eutanasia en los animales supervivientes, se pesó y se procedió a la recogida de muestras orgánicas. Para ello se fijó al animal a la tabla de disección y se repitieron los pasos del proceso operatorio, según se detallan en el apartado 3.2.3.2. para la apertura de la cavidad abdominal. Las muestras tomadas durante la necropsia se introdujeron en tubos de ensayo, debidamente identificados, y con formaldehído al 10% como fijador.

3.2.7.1. Observación de la cavidad abdominal.

3.2.7.1.1. Cavidad peritoneal. Se apreció la existencia o no de derrame peritoneal, de focos inflamatorios y de adherencias.

3.2.7.1.2. Aspecto del paquete intestinal. Se estimó la coloración y las lesiones en la serosa y la coloración de los pequeños vasos intestinales. Igualmente se observó la

existencia o no de dilatación intestinal por acúmulos de gas en el interior de la luz intestinal, valorándose según la clasificación del apartado 3.2.4.1.

Se recogieron las siguientes muestras para cada estudio microscópico: 2 cm de yeyuno, 2 cm de íleon y otros 2 cm de colon ascendente. Cada pieza fue abierta longitudinalmente, enrollada en espiral sobre sí misma y atravesada transversalmente con un alfiler a fin de que en los cortes de las muestras se observase mayor superficie intestinal. A continuación fueron introducidas en tubos de ensayo identificados, con aldehído fórmico al 10%.

Después se extrajo el intestino abriéndolo longitudinalmente, observando el aspecto macroscópico de la mucosa, la existencia de erosiones o úlceras, la aparición de hemorragias y la desvitalización intestinal. Estas tres últimas se valoraron de forma individual según variable categórica, siguiendo la misma escala de clasificación de los apartados 3.2.4.2., 3.2.4.4. y 3.2.4.5 respectivamente.

3.2.7.1.3. Hígado y riñones. Ambos riñones y el hígado fueron extraídos y pesados, realizándose el estudio macroscópico. A continuación fueron preparados para su estudio microscópico. En cada uno de los órganos se realizó una variable categórica, definida como de grado 0 para la ausencia de lesiones y grado 1 ante la presencia de alteraciones macroscópicas.

3.2.7.1.4. Arteria mesentérica craneal. Se observó la existencia de adherencias de tejidos periadventiciales, la presencia de trombos o émbolos y lesiones parietales, recogiendo el tronco arterial para su estudio histológico.

3.2.7.2. Cavidad torácica.

Se procedió a su apertura, mediante el corte longitudinal de la porción costal con tijeras quirúrgicas, se valoró la presencia de derrame pleural, definiéndola como variable categórica, de modo que grado 0 significó la ausencia de derrame pleural y el grado 1 la presencia del mismo. A continuación se extrajeron los pulmones y se pesaron, constatando su aspecto externo. De los mismos se tomaron biopsias para su estudio microscópico. Igualmente se introdujo la variable categórica de manifestación de lesiones pulmonares, siendo grado 0 la ausencia y grado 1 la aparición de anomalías macroscópicas.

3.2.8. APLICACIÓN DE LA SOD.

Para el estudio de supervivencia con tratamiento de SOD, se utilizaron las siguientes series experimentales:

- Serie VIII. 10 machos, sometidos a 90 minutos de isquemia mesentérica aguda y tratados con sustancia placebo a base de solución salina.
- Serie IX. 10 hembras sometidas a 60 minutos de isquemia mesentérica aguda, tratadas con placebo a base de solución salina.
- Serie X. 10 machos sometidos a 90 minutos de isquemia mesentérica aguda y tratados con SOD.
- Serie XI. 10 hembras sometidas a 60 minutos de isquemia mesentérica aguda, y tratadas con SOD.

El cuadro isquémico fue provocado siguiendo el procedimiento quirúrgico habitual descrito en el apartado 3.2.3.2.

Las series VIII y IX fueron utilizadas como control, siendo tratadas como ya se ha indicado con solución salina -0,9 g de cloruro sódico por cada 100 ml de agua- a razón de 0.002 ml por g de peso corporal.

Las series X y XI fueron tratadas con SOD la cual se presentó liofilizada, en viales de 3000 UI. La enzima fue diluida en solución salina hasta una concentración de 1000 UI por ml. Se administró en una concentración de 2 UI por gramo de peso corporal, y en flujo constante a razón de 0,1 ml por minuto.

El tratamiento de SOD y el placebo, se aplicaron por vía intravenosa a través de la vena yugular, mediante el sistema de émbolo impulsado por microinyector automático, utilizando una jeringa de 1cc con subdivisiones de centésimas de ml. Dormido el animal, se realizó un corte a nivel del cuello, y tras visualizar el tronco venoso se descubrió por disección. Mediante un sistema de *butterfly* de 23 G se conectó la aguja en la yugular del animal, introduciéndola primeramente en el músculo pectoral, y avanzando hasta su penetración en la vena, con el fin de que al retirar la aguja, la propia presión del músculo cerrase el orificio de la punción y evitar la extravasación sanguínea. El otro extremo se conectó a la jeringa de 1 ml, la cual a su vez se montó en el soporte del microinyector -figura 5-.



Figura 5.- Muestra de la aplicación de SOD endovenoso yugular mediante el empleo de microinyector y sistema *butterfly*.

Se aplicaron dos tandas de tratamiento, la primera 10 minutos antes de la retirada del clamp y la segunda 10 minutos después de la repermeabilización.

Transcurrido el tiempo de isquemia se retiró el microclamp y se cerró la cavidad abdominal. En la incisión del cuello, después retirar el sistema de *butterfly* se aplicaron puntos continuos con sutura no reabsorbible de 3/0, y a continuación se introdujo al animal en la jaula. A los animales supervivientes se les dejó un período de observación de 9 semanas, según metodología descrita en el punto 3.2.4., y con los animales muertos espontáneamente se procedió según metodología del punto 3.2.7.

3.2.9. TRATAMIENTO HISTOLÓGICO DE LAS PIEZAS.

Para el estudio de las muestras de los distintos tejidos mediante microscopía óptica se practicaron los siguientes pasos:

- tallado de las piezas,
- inclusión en parafina,
- realización de cortes histológicos con un espesor de 3 micras mediante microtomo de rotación,
- desparafinación y mantenimiento en estufa a 80° C., durante 30 minutos.

Seguidamente se utilizaron las siguientes tinciones:

3.2.9.1. Técnica de tinción con hematoxilina eosina (H.E.)

A) Reactivos:

- hematoxilina de Harris:

- hematoxilina, 5 g,
- alcohol absoluto, 50 ml,
- agua destilada, 1000 ml,
- óxido de mercurio, 2,5 g,
- alumbre potásico, 100 g.

- eosina:

- eosina, 1 g,
- agua destilada, 100 ml,

B) Batería:

- 3 pases por xilol, 3 cubetas,
- dos pases por alcohol de 100 grados, 2 cubetas,
- dos pases por alcohol de 96 grados, 2 cubetas,
- lavado en agua corriente durante 2 minutos.

C) Técnica:

- tinción con hematoxilina, de 3 a 5 minutos,
- lavado en agua corriente durante dos minutos.
- tinción con eosina, medio minuto,
- deshidratación:
 - dos pases por alcohol de 96 grados, 2 cubetas,
 - 2 pases por alcohol de 100 grados, 2 cubetas,
 - 3 pases por xilol, 3 cubetas,
- montaje con bálsamo EUKIT.

3.2.9.2. Técnica de tinción Giemsa.

A) Reactivos:

- solución Giemsa:
 - giemsa Merk®, 20 ml,
 - agua destilada, 80 ml,
- 100 ml de agua destilada con unas gotas de ácido acético glacial,
- alcohol isopropílico.

B) Técnica:

- desparafinar e introducir en agua destilada,
- colocar en la solución de Giemsa diluida durante 1 hora,
- extraer los cortes de la solución de Giemsa y se introducen en una solución de agua con ácido acético durante unos segundos,
- se extraen los cortes de la solución anterior y se pasan por alcohol de 96° hasta que se obtenga el color deseado,
- se detiene la diferenciación sumergiéndolos 3 veces en isopropanol, 2 minutos cada vez,

- se pasan 3 veces por xilol,
- se montan en EUKITT.

3.2.9.3. Técnica de tinción con P.A.S.-para-aldehidos de Schiff.

A) Reactivos:

- solución de Alcian-Blue: pH 2.5
Alcian-Blue, 0.5 g,
ácido acético al 10%, 100 ml,
- ácido periódico al 0.5%.
- sulfuro de Ruisseus o bisulfito sódico al 2%:
Metabisulfito sódico al 10%, 6 ml,
ácido clorhídrico normal, 5 ml,
ácido clorhídrico, 8,4 ml,
agua destilada, hasta 100 ml.
- reactivo de Schiff:
pararosaniline hydrochloride, 1 g,
bisulfito sódico anhidro, 1 g,
ácido clorhídrico normal, 20 ml
agua destilada 200 ml.

Para preparar el reactivo de Schiff se hierven 200 ml de agua destilada y se añade la pararosaniline y se disuelve. La solución se enfría hasta los 50° C y a continuación se añade el bisulfito sódico, agitando la preparación. Se vuelve a enfriar la solución hasta los 25° C y a continuación se añade el ácido clorhídrico y se agita la mezcla. Se deja reposar 24 horas en oscuridad en frascos ámbar y si en este tiempo el preparado no adquiere una tonalidad transparente, se le agrega carbón activo y se filtra el contenido. Si después de realizar el filtrado la preparación sigue sin estar transparente, se desecha.

B) Técnica:

- hidratar los cortes,
- introducir en ácido periódico durante 10 minutos,
- lavar durante 10 minutos,
- añadir el reactivo de Schiff, de 15 a 30 minutos,
- añadir el bisulfito sódico sin previo lavado y mantenerlo durante 10 minutos,
- lavar y contrastar con hematoxilina. Lavar, deshidratar y montar.

C) Resultados:

La tinción con para-aldehído de Schiff es el mejor colorante de mucopolisacáridos ácidos. Con esta tinción al ser observada la preparación al microscopio, los glúcidos aparecen en una tonalidad púrpura, los núcleos en azul, los citoplasmas celulares en color amarillo y las membranas basales en púrpura rojizo.

3.2.9.4. Técnica de tinción tricómica de Masson.

A) Reactivos:

- sulfato amonio-férrico al 5%, sal ácida de alumbre férrico,
- hematoxilina de Weigert, soluciones A y B,
- solución de ácido pícrico,
- ácido pícrico a saturación en alcohol de 96°, 2 partes,
alcohol de 96°,
- solución de fucsina ácida acética. Solución A,
fucsina ácida, 1 g,
ácido acético glacial, 1 ml,
agua destilada, 100 ml,
- solución de Pouceau-xilidina. Solución B,
pouceau-xilidina, 1 g,

ácido acético glacial, 1 ml

Agua destilada, 100 ml,

- se mezcla una parte de solución de fucsina -solución A-, y dos partes de xilidina -solución B-

- ácido fosfomolibdico al 1%,

- solución verde luz -Gurr's-

Verde luz, 1 g,

ácido acético glacial ,1 ml,

agua destilada, 100 ml,

Se puede reemplazar por ácido acético al 25% y azul de anilina hasta la saturación.

B) Técnica:

- hidratar los cortes,

- alumbre férrico a 60° C, durante 20 o 30 minutos,

- agua destilada, lavar muy bien,

- hematoxilina de Weigert, durante 4 minutos,

- lavar,

- diferenciar con ácido pícrico hasta que solo los núcleos estén teñidos y los hematíes hayan perdido la coloración. Esto se hace durante 10 minutos,

- lavar durante 10 minutos, hasta que no salga mas ácido pícrico,

- teñir los citoplasmas con la solución A más B de fucsina-xilidina durante 5 minutos,

- lavar en agua,

- diferenciar en fosfomolibdico que decolora la colágena y tiñe los eritrocitos y los citoplasmas; duración 5 minutos,

- sin lavar, teñir la colágena con verde luz durante 10 minutos,

- deshidratar y montar.

C) Resultados:

Las coloraciones que se obtienen son: tejido conjuntivo y moco en verde o azulado, citoplasmas rojizos o anaranjados, necrosis fibrinoide naranja y núcleos en pardo.

3.2.9.5. Técnica de Gallego para fibras elásticas:

A) Reactivos:

- solución A:

- 10 cc de agua destilada,
- 25 gotas de fucsina de Zieh,
- 2 gotas de ácido acético glacial.

- solución B:

- 10 cc de agua destilada,
- 1 gota de ácido nítrico puro,
- 2 gotas de formol puro,
- 1 gota de percloruro de hierro al 10%,
- picro-índigo de Carmín,
- ácido pícrico a saturación en agua, se le añade el índigo de carmín al 1% y se comprueba el color con papel de filtro.

B) Técnica:

- sensibilización con solución A, durante unos segundos,
- sin lavar se agrega la solución A. Se controla el color al microscopio óptico,
- lavar muy bien,
- realizar la fijación con B durante 5 minutos,
- lavar y contrastar con picro-índigo.

C) Resultados:

- se visualizan las fibras elásticas en color violeta oscuro.

3.2.9.6. Método del Oil-red O.

A) Reactivos:

- solución madre: Se prepara saturando el alcohol isopropílico con el oil-red O.
- solución de trabajo: Se filtra la solución madre y se diluye con 6 cc. de ella, 4 cc. de agua destilada, se deja reposar durante 10 minutos y se filtra sobre los cortes invertidos.

B) Técnica:

- los cortes de los tejidos se realizan en congelación y se las introduce en una solución diluida durante un tiempo de 10 a 30 minutos, con los portaobjetos invertidos o flotando en la solución,
- se lava muy bien y con cuidado de que no se rompan cuando están los cortes flotando, ya que si suben a la superficie se abren,
- se añade a la solución, hematoxilina de Carazzi durante 10 minutos,
- lavar y montar en gelatina de glicerina de Roulet-Kaiser o en Plasdon C.

C) Resultados:

- Los lípidos se visualizan en color rojo y los núcleos en azul.

3.2.10. RECOGIDA DE MUESTRAS Y DETERMINACIÓN DE MDA LIBRE EN TEJIDOS.

Para la determinación de los valores de MDA libre en los tejidos se emplearon:

- Serie XII.- 10 machos de control a los que únicamente se tomaron muestras de tejido intestinal.
- Serie XIII.- 10 machos a los que se sometió a 90 minutos de IMA según la técnica general del apartado 3.2.3.2. con 30 minutos de reperfusión y tratamiento con SOD. Tras 30 minutos de reperfusión se tomaron muestras del yeyuno.

• Serie XIV.- 10 machos sometidos al mismo procedimiento que la serie XIII pero tratados únicamente con solución salina.

Las tomas de muestras yeyunales se realizaron en todos los animales y se introdujeron en tubos de ensayo de cristal conservados a -20° C y debidamente identificados. Este paso se realizó para no romper la cadena del frío.

En las 30 muestras intestinales se aplicó el test del TBA para conocer la concentración de MDA libre en el tejido.

3.2.10.1. Test del TBA

- Preparación de la curva estándar.

Se prepara una solución madre de MDA a una concentración de 706 nM/ml. De esta solución se hace una dilución 1/10 en tampón fosfato pH 7, con lo que la nueva solución queda a una concentración de 70,6 nM MDA/ml. A partir de esta se realizan diluciones seriadas 1:1 según el esquema:

Tubo 1 =>0,14 ml de muestra+0,86 ml de tampón fosfato.	9,88 nM MDA/tubo
Tubo 2 =>1 ml de tubo 1+1 ml de tampón fosfato	4,94 nM MDA/tubo
Tubo 3 =>1 ml de tubo 2+1 ml de tampón fosfato	2,47 nM MDA/tubo
Tubo 4 =>1 ml de tubo 3+1 ml de tampón fosfato	1,24 nM MDA/tubo
Tubo 5 =>1 ml de tubo 4+1 ml de tampón fosfato	0,62 nM MDA/tubo
Tubo 6 =>1 ml de tubo 5+1 ml de tampón fosfato	0,31 nM MDA/tubo
Tubo 7 =>1 ml de tubo 6+1 ml de tampón fosfato	0,15 nM MDA/tubo
Tubo 8 =>1 ml de tubo 7+1 ml de tampón fosfato	0,08 nM MDA/tubo

Realizadas las diluciones se añaden a cada tubo, al igual que a las muestras de tejido -que se especifican en el punto 3.2.10-, los siguientes reactivos en el orden que se indica:

- 1 ml de ácido fosfórico 1%, con el fin de detener la producción de RL,
- 33 μ l de butil hidroxitolueno -diluido al 0,01% en alcohol etílico-, para impedir la neoformación de radicales,

- 0,6 ml de ácido tiobarbitúrico al 0,6% -diluido en agua destilada-, que reacciona con el MDA dando una solución coloreada.

El blanco se prepara de la misma manera, sustituyendo la muestra de tejido por 140 μ l de tampón fosfato,

A continuación se ponen los tubos en un baño de agua a 100°C con agitación suave, durante 45 minutos. Trascorrido el tiempo se observa una tonalidad rosada en las muestras. En este momento las muestras se introducen en un baño con agua fría.

A continuación las muestras se extraen del baño y se añade a cada tubo 1,4 ml de n-butanol para disolver la fase orgánica, se agitan, y se centrifugan a 4000 rpm durante 15 minutos a una temperatura de 5°C. Se recoge la fase orgánica de cada una de las muestras y se mide por espectrofotometría a 535 nm de longitud de onda.

- Preparación de las muestras.

Se tomaron 50 mg de tejido por ml de tampón fosfato pH 7 y se trató con homogeneizador de vidrio, realizando la operación en un baño con hielo. A continuación se depositó la muestra en un tubo de ensayo y se centrifugó durante 20 minutos a 5500 rpm a una temperatura entre 0 y 5°C. Se tomaron 140 μ l del sobrenadante y se depositaron en un tubo de ensayo.

El resto del procedimiento se realizó conjuntamente con la curva patrón, como se describe en el apartado 3.2.9.1.

- Realización de los cálculos.

Cada una de las soluciones, bien sean las de la curva patrón o las soluciones del tejido, se midieron en el espectrofotómetro a 535 nm de longitud de onda.

Efectuadas las lecturas de las disoluciones patrón, se realizó la recta de regresión para el cálculo de los parámetros de la misma y se determinó el coeficiente de regresión R, que deberá ser mayor o igual a 0,95, lo que indica que el 95% de los puntos se encuentra dentro de la correlación lineal.

El resultado de las muestras, a fin de conocer la concentración de MDA libre por gramo de tejido se define por la fórmula:

$$\text{nM MDA/g de tejido} = (\text{DO}_{535} - a)/b \times \text{ml tampón fosfato/mg de tejido} \times 1/0,14 \times 1000$$

siendo:

- b, la pendiente de la recta,
- a, la ordenada en el origen,
- DO_{535} , la absorbancia de cada una de las muestras,
- ml de tampón fosfato/mg de tejido, son los 50 mg de tejido diluidos en 1 ml de tampón fosfato para homogeneizar la muestra,
- 0,14, los ml de muestra que se cogen,
- 1000 el factor de conversión de mg a g de tejido.

Por lo tanto la fórmula desarrollada queda de la manera:

$$\text{nM MDA/g de tejido} = (\text{DO}_{535} - a)/b \times 20/0,14.$$

3.2.11. EXTRACCIÓN DE SANGRE

3.2.11.1. Exanguinación intracardiaca:

Se utilizó una aguja de 0,8 mm de diámetro y 25 mm de longitud, acoplada a una jeringa de 10 cc. Dormido el animal, se coloca en decúbito dorsal. Con los dedos índice y pulgar, a través de la masa intercostal, se localiza el corazón percibiendo sus latidos. A nivel intercostal derecho se introduce la aguja hasta el corazón, procediendo, con la jeringa acoplada, a la exanguinación total. Con esta técnica se obtienen de 8 a 10 cc de sangre, que se depositan en un tubo sin anticoagulante, pero con gel de silicona como separador mecánico. Este tubo se centrifugó a 3000 r.p.m. durante 10 minutos, previa retracción del coágulo.

Se recogieron muestras sanguíneas de tres series:

- Serie I. Serie Control. Toma de sangre tras las 9 semanas de observación, coincidiendo con su eutanasia.

- Serie II. *Sham operation*. Igual que para la serie I.

- Serie XIV. 10 animales machos sometidos a 90 minutos de isquemia y 30 de reperfusión. Transcurrido este tiempo, se realizó una toma de muestra de sangre, antes de realizar la necropsia.

3.2.11.2. Determinaciones bioquímicas séricas:

- aspártico transaminasa (AST o GOT),
- alanin transaminasa (ALT o GPT),
- gamma glutamil transpeptidasa (GGT),
- láctico deshidrogenasa (LDH),
- creatin fosfo kinasa (CPK).

3.2.11.3. Determinación de sustratos metabólicos:

- urea (UREA),
- creatinina (CREA).

3.2.11.4. Determinación de iones:

- sodio (Na^+),
- potasio (K^+).

3.2.12. METODOLOGÍA ESTADÍSTICA.

En el presente trabajo experimental se aplicó el estudio estadístico de los resultados según el modelo de investigación científico en el que estuvieran encuadrados, siguiendo el diseño de estudios científicos elaborado por Doménech¹¹⁰. A continuación se describen cada uno de los diseños estadísticos que aparecen en el presente trabajo:

- estudio de supervivencia -series de I a VII-, en el que se registran datos para un período de tiempo y, además, se incorpora el momento en el que se produce el evento -estudio longitudinal prospectivo-,

- estudio de supervivencia -series de VIII a XI- con un tratamiento predeterminado - estudio longitudinal prospectivo-,

- ensayo clínico -series de I a VII-, donde se estudian parámetros de determinaciones fisiológicas -alimentación, bebida y defecación-,

- ensayo de determinaciones séricas -bioquímicas de 9 metabolitos sanguíneos-, llevado a cabo en los animales de las series I, II y XIV.

- Ensayo clínico -series XII, XIII y XIV-, para determinar las concentraciones de MDA -estudio transversal-.

El proceso estadístico difiere según el tipo de estudio, tal como se detallan en los siguientes apartados.

3.2.12.1. Estudio de supervivencia.

A) Variables:

- independiente: Diferentes tiempos de isquemia intestinal a los que se somete a las diferentes series,

- dependiente: Diferentes tasas de mortalidad que se presentan con la modificación de los tiempos de isquemia.

B) Matriz de datos:

Los resultados de la supervivencia se exponen en tablas y comprenden los estudios estadísticos siguientes:

- estudio de la χ^2 de Pearson. Se obtienen los valores de la distribución Chi cuadrado, la p de Pearson y el grado de significación para un error unilateral de $p \leq 0,05$,

- valoración de la supervivencia -proporción acumulada de supervivencia- Se emplea método actuarial -o método de las tablas de vida-, desarrollado por Berkson y Gage en 1950 y Cutler y Ederer, en 1958. Consiste en agrupar el tiempo de participación de cada sujeto en intervalos de tiempo predeterminados -igual que el método de Kaplan-Meier- y calcular las probabilidades de supervivencia estimando las probabilidades condicionadas de supervivencia, correspondientes a cada uno de los intervalos de tiempo,

- cálculo de la función de riesgo, que describe la dinámica del proceso y representa la probabilidad condicionada por unidad de tiempo que tiene un sujeto de fallecer durante la observación.

3.2.12.2. Estudio de ensayos clínicos

A) Variables:

- independiente: Diferentes tiempos de isquemia intestinal a los que se ha sometido a las diferentes series.

- dependientes: Atendiendo a su clasificación se dividen en:

- categóricas:

presencia o ausencia de un determinado carácter cualitativo, presencia o ausencia de alteraciones macroscópicas y presencia o ausencia de alteraciones microscópicas, así como la cantidad de individuos de cada categoría de estudio -número de animales que beben, que comen o que realizan deposiciones tras la operación-

- cuantitativas.- datos métricos.

3.2.12.3. Índices descriptivos para valoración de variables

Para medir la distribución de datos se utilizaron los siguientes índices estadísticos:

A) Índices descriptivos, basados en momentos para variables cuantitativas:

- medidas basadas en momentos:

- medidas de tendencia central.- media aritmética,

- medidas de dispersión.- desviación estándar.- cuantifica la variabilidad.

Ambas se expresaron como media aritmética (desviación estándar).

B) Medidas basadas en ordenaciones:

- medida de tendencia central:

- mediana.- como valor central de un conjunto de observaciones.

- medidas de dispersión.- los percentiles 25 y 75 describen la posición de un sujeto dentro del grupo de referencia.

C) Medidas para descripción de caracteres categóricos:

- razones y tasas.

3.2.12.4. Representaciones gráficas.

A) Para variables categóricas se confeccionaron representaciones de diagrama de barras, diagrama de barras apiladas y agrupadas.

B) Para variables cuantitativas se eligió el diagrama de caja *-boxplot-*, para medidas basadas en ordenaciones *-analíticas y concentración de MDA-*, debido a la capacidad que tienen para esquematizar distribuciones asimétricas que difieren de una distribución normal; y diagrama de barras y barras agrupadas para las medidas basadas en momentos *-evolución del peso-*.

3.2.12.5. Técnicas estadísticas para comparación de variables.

Para la comparación estadística de variables, se adoptaron los métodos propuestos por Fisher en que se establece como mínimo intervalo de confianza (IC) el 95%, despreciando el 2,5% de cada una de las dos colas *-5% total-* de las distribuciones muestrales. Según esto para los test estadísticos de variables, se ha utilizado como grado de significación estadística un valor de $p \leq 0,05$

Para la comparación entre las variables independiente *-tiempo-* y las variables dependientes, atendiendo a la naturaleza de las últimas, se dispuso el siguiente procedimiento:

A) Variables cuantitativas:

- Exploración de datos y detección de anomalías. Condiciones previas:

- bondad de ajuste a una distribución normal, mediante el cumplimiento del test de normalidad de Shapiro-Wilks,
- verificación de igualdad de variancias entre los resultados de cada categoría a través del test de Levene.

- Pruebas de independencia.

- Comparación de 2 medias:

- t de Student Fischer.- cuando ambas muestras no contradicen el supuesto de normalidad, obtenido mediante el test de Shapiro-Wilks,

- U de Mann Whitney.- cuando alguna muestra vulnera el supuesto de normalidad.

- Comparación entre una variable dependiente con otra independiente con varias categorías:

- análisis de la variancia (ANOVA); cálculo de la intensidad de la relación dependiente mediante el coeficiente η^2 , cuando no se vulnera el supuesto de normalidad, ni el de homogeneidad de las variancias en los datos de las variables, obtenido a través del test de Shapiro-Wilks; y contrastes múltiples *a posteriori* mediante el procedimiento de Bonferroni,

- test de Kruskal Wallis, cuando se vulnera, en cualquier categoría, el supuesto de normalidad o el de homogeneidad de las variancias del test de Shapiro-Wilks, y contrastes múltiples *a posteriori* mediante el procedimiento de Bonferroni.

B) Variables categóricas.

Se realizó el test de χ^2 de Pearson para la comparación de las razones obtenidas.

Se tomaron como valores significativos aquellos cuyo valor fue $p \leq 0,05$.

3.3. CARACTERÍSTICAS DE LOS ANIMALES.

3.3.1. ESPECIE Y NÚMERO DE ANIMALES UTILIZADOS.

Se utilizaron 210 ratas de la especie *Rattus norvegicus*, variedad "Wistar", de los cuales 120 eran machos y eran 90 hembras.

3.3.2. PROCEDENCIA.

Los animales procedieron del animalario del Servicio de Medicina y Cirugía Experimental del Hospital Militar Central "Gómez Ulla", de Madrid.

3.3.3. PESO Y EDAD.

Los animales utilizados presentaron un peso homogéneo comprendido entre 240 y 300 g y una edad de entre 9 y 12 semanas.

3.3.4. CONDICIONES DE VIDA.

3.3.4.1. Hábitat.

Los animales permanecieron en jaulas de Macrolón de 35 cm de ancho por 60 cm de largo y 20 cm de alto, con base de sepiolita en gránulos absorbentes. El número de animales por jaula fue cinco, según la normativa vigente de la Unión Europea, sobre alojamiento y cuidados de los animales destinados a experimentación -86/609/CEE-¹¹¹.

Tras la intervención quirúrgica los animales permanecieron en jaulas individuales de macrolón durante las 72 horas siguientes cuyas dimensiones eran de 23 x 23 x 15 cm.

Las condiciones del bioterio fueron homogéneas, a temperatura constante de 22° a 24° C, y fotoperíodo de 12 horas.

3.3.4.2. Alimentación.

Los animales disponían de comida y bebida diaria *ad libitum*. La comida fue administrada en *pellets*, elaborados por piensos Moragón Ref. AC-10.

• Constituyentes analíticos y porcentaje de aditivos del pienso administrado:

- proteína bruta..... 22.40 %
- celulosa bruta..... 3.70 %

- grasas brutas.....	4.00 %
- cenizas brutas	6.20 %
- calcio	1.10 %
- fósforo	0.75 %
- sodio	0.16 %
- vitamina A U.I./Kg.....	15000
- vitamina D ₃ U.I./Kg.....	2500
- vitamina E (α -tocoferol) p.p.m. ...	100
- sulfato de cobre p.p.m.	20.

• **Ingredientes:** Cereales, extractos de proteínas vegetales, subproductos de origen vegetal, carnes y subproductos animales, aceites y grasas, sustancias minerales y butilhidroxianisol etoxiquin.

3.3.4.3. Cuidados.

Durante la experiencia se cuidó especialmente el mantenimiento en las mismas condiciones de fotoperiodo y temperatura, disponiendo de alimentación y bebida a voluntad, y de limpieza diaria de las jaulas.

3.4. SERIES DE ANIMALES UTILIZADOS E IDENTIFICACIÓN.

3.4.1. SERIES.

Se construyeron 14 series experimentales formadas por:

• **SERIE I. Serie control.**- Formada por 10 machos y 10 hembras. No fueron sometidos a intervención quirúrgica y sirvieron de control para comparar los resultados de observación entre los individuos intervenidos y los no intervenidos quirúrgicamente durante 9 semanas.

• **SERIE II. Serie Sham operation.**- Formada por 20 animales, 10 de cada sexo. Se les sometió a laparotomía media abdominal y disección de la AMC, dejando la cavidad abdominal abierta durante 180 minutos,procediendo a continuación a su cierre. Al igual que la serie I se

utilizó como control.

- SERIE III.- Serie de isquemia de la AMC durante 15 minutos. Integrada por 20 animales, 10 machos y 10 hembras. Se les sometió a intervención quirúrgica según el procedimiento general señalado en el apartado 3.2.3. y se les pinzó la AMC durante 15 minutos. Se hizo control de parámetros durante las 9 semanas de observación.
- SERIE IV.- Serie de isquemia de la AMC durante 30 minutos. Formada por 20 animales, 10 de cada sexo. Intervenidos según el método general -apartado 3.2.3.- realizándoseles el pinzamiento de la AMC durante 30 minutos. Se controlaron los parámetros durante las 9 semanas de observación.
- SERIE V.- Serie de isquemia de la AMC durante 60 minutos. Formada por 20 animales, 10 de cada sexo. Intervenidos siguiendo el método general del apartado 3.2.3. realizándoseles el pinzamiento de la AMC durante 60 minutos. Se les realizó control de los parámetros durante las 9 semanas de observación.
- SERIE VI.- Serie de isquemia de la AMC durante 120 minutos. Formada por 20 animales, 10 de cada sexo. Intervenidos de acuerdo con el método general 3.2.3. practicándoseles el pinzamiento de la AMC durante 120 minutos. Se practicó un control de los parámetros durante las 9 semanas de observación.
- SERIE VII.- Serie de isquemia de la AMC durante 180 minutos. Formada por 20 animales, 10 de cada sexo. Fueron intervenidos según el método general señalado en el apartado 3.2.3. realizándoseles el pinzamiento de la AMC durante 180 minutos. Se efectuó el control de parámetros durante las 9 semanas de observación.
- SERIE VIII.- Formada por 10 animales machos, utilizados como controles para el tratamiento con SOD. Se les sometió a 90 minutos de IMA, y se realizó un tratamiento con solución salina como solución placebo, según se describe en el apartado 3.2.8. de la metodología.
- SERIE IX.- Formada por 10 animales hembras utilizados como controles para el tratamiento con SOD. Se les sometió a 60 minutos de IMA según el apartado 3.2.3. del método, y un tratamiento a base de solución salina en relación con el punto 3.2.8. del método.
- SERIE X.- Formada por 10 animales. Se les sometió a 90 minutos de IMA por el

procedimiento general descrito en el apartado 3.2.3., y fueron tratados con SOD según se dice en el apartado 3.2.8. de la metodología.

- SERIE XI.- Formada por 10 animales hembras. Se les sometió 60 minutos de IMA por el procedimiento general descrito en el apartado 3.2.3., y fueron tratadas con SOD según se describe en el apartado 3.2.8. de la metodología.

- SERIE XII.- Formada por 10 animales machos a los que no se les sometió a IMA. Se tomaron muestras del yeyuno según se describe en el apartado 3.2.10. y sirvió como control para comparar los niveles de MDA libres en intestino.

- SERIE XIII.- Formada por 10 animales machos sometidos a isquemia intestinal durante 90 minutos según metodología del apartado 3.2.3. y 30 minutos de reperfusión. Estos animales fueron tratados con SOD, según el apartado 3.2.8. de la metodología y se tomaron muestras del yeyuno según el apartado 3.2.10.

- SERIE XIV.- Formada por 10 individuos machos a los que se les sometió a 90 minutos de isquemia según metodología del apartado 3.2.3 y 30 minutos de reperfusión. Antes de ser sacrificados se les practicó punción cardíaca para toma de muestras de sangre según apartado 3.2.11. Seguidamente se tomaron muestras del yeyuno según el apartado 3.2.8., para la determinación de MDA en intestino.

3.4.2. IDENTIFICACIÓN DE LOS INDIVIDUOS Y DE LAS SERIES.

Las diferentes series fueron separadas en jaulas y estantes debidamente identificadas con etiquetas .

Cada jaula fue ocupada por animales de la misma serie y del mismo sexo. Cada animal fue identificado mediante la colocación subcutánea de chip electrónico a la altura del cuello.

ABRIR CAPÍTULO 4

