



ABRIR CAPÍTULO 3

4. RESULTADOS

4.1. ESTUDIO GENERAL DE LA SUPERVIVENCIA

El estudio de supervivencia se realizó con los resultados obtenidos de las series I - Control-, II -*Sham operation*-, III -15 minutos de IMA-, IV -30 minutos de IMA-, V -60 minutos de IMA-, VI -120 minutos de IMA- y VII -180 minutos de IMA-.

A) Matriz de datos.

Los resultados de la supervivencia durante los 63 días de observación, contados desde el momento de la reperfusión, se recogen en la tabla 2. Se observa que los mayores índices de mortalidad se manifiestan entre el momento de la reperfusión y las 60 horas posteriores. El número de animales supervivientes en las series I, II y III fue de 20, durante las 9 semanas de la experiencia. En las restantes series se comprueba un aumento progresivo de la mortalidad al aumentar el tiempo de isquemia, más pronunciado en las series VI y VII. En esta última serie tan sólo dos animales sobrevivieron a las dos primeras horas de observación, alcanzándose la mortalidad del 100% de los individuos antes de las primeras 12 horas posteriores a la reperfusión.

La mortalidad nula de la serie II es un resultado significativo, que indica que la mortalidad depende únicamente del proceso de I/R, y se elimina la posibilidad de fallecimiento por causa de la intervención quirúrgica. El umbral de mortalidad se situó entre los 15 y los 30 minutos de isquemia -tiempos de isquemia de las series III y IV respectivamente-. La mortalidad del 100% se produjo con 180 minutos de isquemia, -serie VII-.

B) Cálculo estadístico y resultados.

El estudio estadístico de los resultados de los individuos supervivientes, se realizó mediante el estimador estadístico χ^2 de Pearson, enfrentando serie a serie los valores de la supervivencia final de cada una. Se tomaron como resultados significativos los valores con una $p \leq 0,05$. En la tabla 3 se refleja el valor de la p y la significación estadística para cada una de las series comparadas. Al comparar la serie VII con las restantes existen grados de significación muy altos, siendo el valor de p mucho más bajo que el error $\alpha \leq 0,05$.

TIEMPO		NÚMERO DE ANIMALES SUPERVIVIENTES EN LAS SERIES I, II, III, IV, V, VI Y VII.						
HORAS	DÍAS	I	II	III	IV	V	VI	VII
2	0,083	20	20	20	19	17	16	2
12	0,5	20	20	20	18	14	13	0
24	1	20	20	20	18	14	13	0
36	1,5	20	20	20	18	14	12	0
48	2	20	20	20	18	14	12	0
60	2,5	20	20	20	17	14	10	0
72	3	20	20	20	17	14	10	0
	7	20	20	20	17	14	10	0
	14	20	20	20	17	14	10	0
	21	20	20	20	17	14	10	0
	28	20	20	20	17	14	10	0
	31	20	20	20	17	14	9	0
	35	20	20	20	17	14	9	0
	42	20	20	20	17	14	9	0
	49	20	20	20	17	14	9	0
	56	20	20	20	17	14	9	0
	63	20	20	20	17	14	9	0

Tabla 2.- Animales supervivientes a lo largo del tiempo de observación, para cada una de las series.

También aparecieron diferencias significativas al comparar dos a dos las series II-V, III-V, II-VI, III-VI, IV-VI y V-VI, demostrando las diferencias de mortalidad existentes según los diferentes tiempos de isquemia. El grado de significación estadística entre las series fue tanto mayor cuanto mayores eran las diferencias de los tiempos de isquemia.

ESTUDIO COMPARATIVO, TABLAS 2x2, ENTRE SERIES MEDIANTE EL TEST χ^2 DE PEARSON

SERIES	χ^2 DE PEARSON	GRADOS DE LIBERTAD	p	SIGNIFICACIÓN ESTADÍSTICA
II-III	0	1	1	NS
II-IV; III-IV	3,24	1	0,0718	NS
II-V; III-V	7,04	1	0,0079	S
II-VI; III-VI	15,16	1	0,00009	S
II-VII; III-VII	40	1	$2,5 \times 10^{-10}$	S
IV-V	1,29	1	0,2549	NS
IV-VI	7,02	1	0,0080	S
IV-VII	34	1	$5,5 \times 10^{-9}$	S
V-VI	2,20	1	0,1380	NS
V-VII	28	1	$1,2 \times 10^{-7}$	S
VI-VII	18	1	0,00002	S

Tabla 3.- Estudio estadístico de la supervivencia mediante el test de χ^2 de Pearson y su correspondiente grado de significación estadística; S significativo y NS no significativo.

La tabla 4 recoge los datos del método actuarial y del cálculo de la tasa de riesgo, para cada serie, pudiéndose comprobar como la probabilidad de muerte está directamente relacionada con el tiempo de isquemia. La tasa de riesgo define la probabilidad que tiene un animal, que se encuentra ubicado en una serie determinada, de morir, para un intervalo de tiempo cualquiera.

SERIES	INTERVALOS	SUPERVIVENCIA	FUNCIÓN DE
	Días	ACUMULADA	RIESGO
I	0-63	1	0
II	0-63	1	0
III	0-63	1	0
IV	0-1	0,9	0,1053
	1-2	0,9	0
	2-3	0,85	0,0571
	3-63	0,85	0
V	0-1	0,7	0,3529
	1-63	0,7	0
VI	0-1	0,65	0,4242
	1-2	0,6	0,08
	2-3	0,5	0,1818
	3-31	0,5	0
	31-32	0,45	0,1053
	32-63	0,45	0
VII	0-63	0	1

Tabla 4.- Tasas de supervivencia y de riesgos obtenidos mediante el método actuarial.

En las series de IV, V, VI y VII la función de riesgo está elevada en los primeros días después de la intervención y, posteriormente, disminuye en días sucesivos, salvo en el caso de la serie VII, donde la función de riesgo es 1 en el primer día, siendo 0 el valor de la supervivencia acumulada. La probabilidad de que un animal sometido a 180 minutos de IMA sobreviva, es nula. Por otro lado, cualquier animal encuadrado en las series I, II y III, tiene una probabilidad 1 de sobrevivir -probabilidad absoluta-, haciéndose nulo el valor de la función de riesgo.

Cuando se observan los intervalos de tiempo, se puede comprobar cómo la mortalidad, en cualquiera de las series, se concentra en un período de tiempo relativamente corto en relación con el tiempo de observación global del experimento -tabla 2-. El intervalo crítico en el que se concentra la mortalidad abarca, desde el momento del pinzamiento de la arteria, hasta, aproximadamente, las 60 horas posteriores a la reperusión. En esta corta fase, en relación con el tiempo total de observación, acontece el 97,5% de los fallecimientos, haciéndose nulo el riesgo de mortalidad tras sobrepasar la "barrera crítica" de las 60 horas -tabla 2-.

C) Representación gráfica.

En las figuras 6 y 7 se representan la evolución de las tasas de supervivencia, expresadas en tantos por uno, para los diferentes tiempos de observación y para cada una de las series experimentales. No se representan las frecuencias de la serie I -control- ni de la serie II, -*Sham operation*- por ser la tasa de supervivencia de 1 en ambos casos, como aparece en la tabla 1. Estos resultados se superponen con los de la serie III, 15 minutos de IMA.

El tiempo 0 corresponde al momento en que comienza la reperusión, y los restantes corresponden a tiempos de observación. La tasa de supervivencia del valor absoluto 1, para el tiempo 0, representa la supervivencia total de los individuos a consecuencia de la isquemia aguda de la arteria mesentérica. En las series VI y VII, según se indica en la figura 6, no todos los animales sobrevivieron al cuadro de isquemia, correspondiendo esta mortalidad, durante el cuadro isquémico, al 15% y al 75% respectivamente, por lo tanto la tasa de supervivencia en el momento de la reperusión -tiempo 0- aparece situada por debajo del valor 1.

La figura 6 muestra las curvas de supervivencia de cada serie, para los 63 días de observación, comprobándose como en todas ellas, la mortalidad se concentra en la primera semana, a excepción de la serie VI, en la que se produce la muerte de un individuo en el día 31, suceso estadísticamente no significativo.

En la figura 7, se presenta la supervivencia para las cinco series experimentales con oclusión arterial, durante las 72 horas posteriores al momento de la reperusión. Se exponen los resultados de mortalidad en intervalos de 12 horas, pudiéndose observar un descenso agudo de la tasa de supervivencia en las primeras 12 horas, y luego un descenso moderado en los siguientes intervalos, hasta estacionarse a partir de las 60 horas.

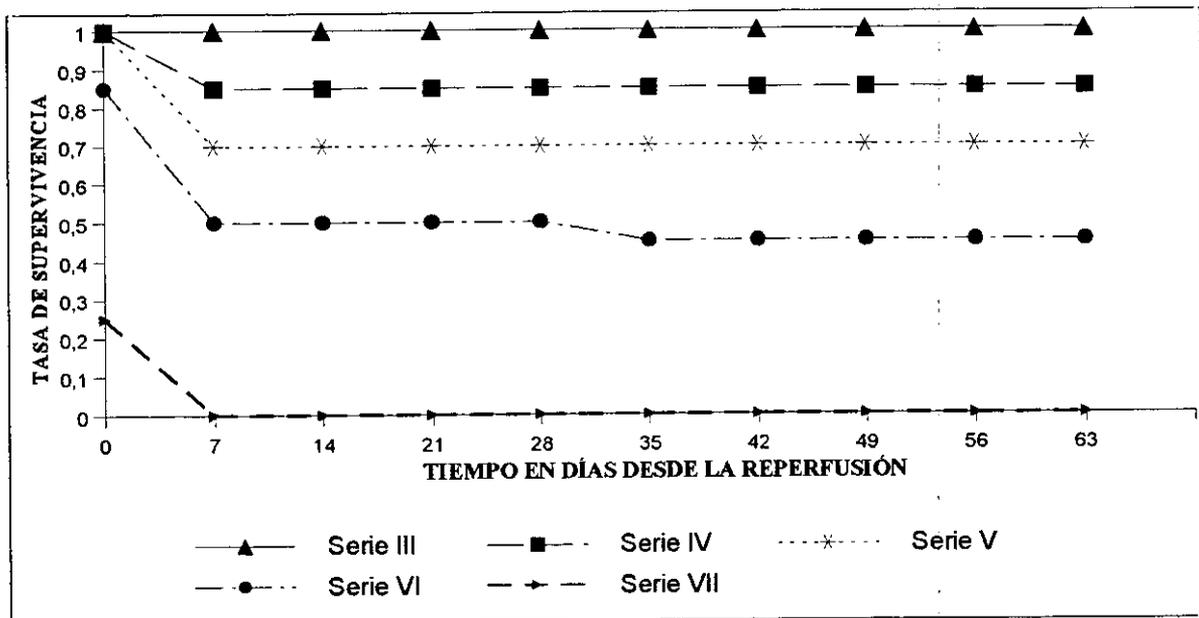


Figura 6.- Representación de la curva de supervivencia en las diferentes series experimentales tras 63 días de observación.

Se observa que el espacio de tiempo en el que se concentra la mortalidad comprende las primeras 60 horas después de la reperfusión, siendo similar en todas las series, independientemente del tiempo de isquemia. Durante este período crítico se acumula el mayor riesgo de mortalidad, pasado el cual, la supervivencia se mantiene hasta el final del período de observación de 9 semanas, con independencia del tiempo de isquemia.

Las gráficas de las figuras 6 y 7 evidencian que los mayores tiempos de isquemia afectan de manera directa a la supervivencia, apareciendo animales que no sobreviven al período isquémico y que fallecen antes de la reentrada de oxígeno. La revascularización puede suponer un "trauma" importante, tras los tiempos medios de isquemia, para la supervivencia, puesto que un gran porcentaje de animales fallece tras la reperfusión.

El 45% de la mortalidad total, con independencia del tiempo de pinzamiento arterial, se produjo antes de la reperfusión; el 42,5% en las primeras 12 horas tras la revascularización, y el 12,5% restante después de este tiempo. De este 12,5% de animales que fallecen en el intervalo que abarca desde las 12 horas posteriores a la reperfusión hasta el final del período de observación -9 semanas-, el 10 % mueren entre las 12 y las 60 horas de la reperfusión, y tan sólo el 2,5% de los individuos muere tras la "barrera crítica" de las 60 horas. Para el caso de la serie VI, el 27,3% de los animales muertos fallecen antes de cumplir la totalidad del

período isquémico; el 36,4% fallece antes de las 12 horas de la reperfusión; y otro 36,4 % fallece entre las 12 horas y las 9 semanas de observación. De este 36,4%, el 27,3% muere antes de las 60 horas y el 9,1% entre las 60 horas de la reperfusión y el final de la observación. En cambio, en la serie VII, los resultados aparecen más agrupados en torno al momento de la reperfusión. El 75% de los animales fallece antes de la retirada del clamp y sólo un 25% sobrevive a este hecho y fallece antes de las 12 horas de la reperfusión.

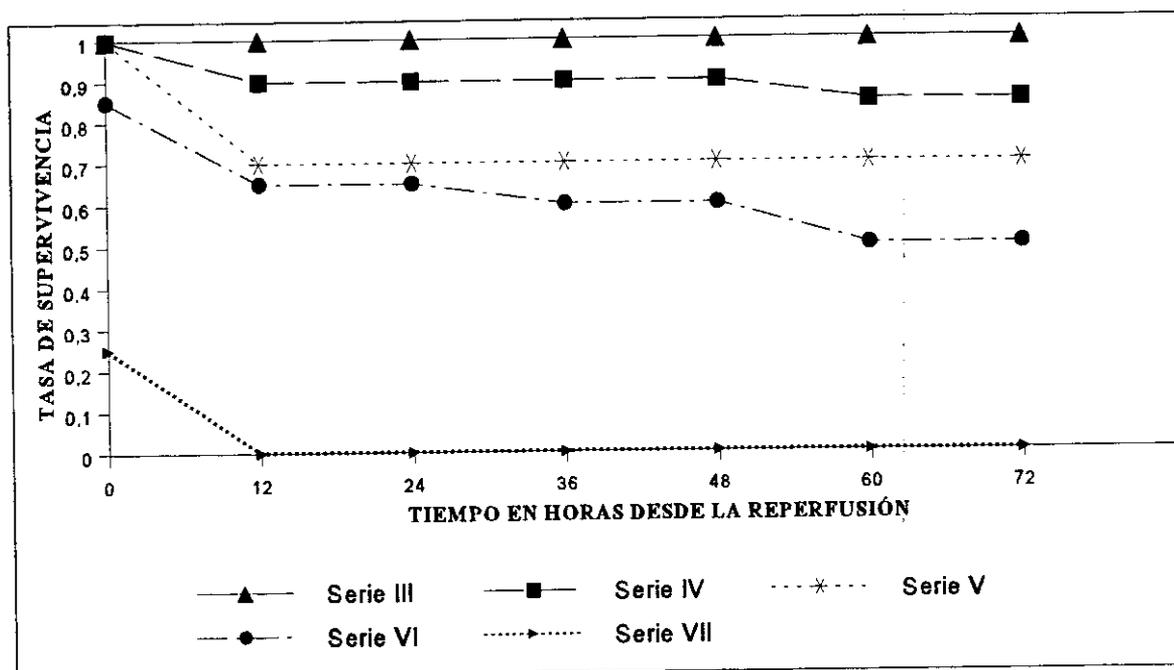


Figura 7.-Curva de supervivencia en las diferentes series experimentales durante las primeras 72 horas de observación.

4.2. SUPERVIVENCIA SEGÚN EL PESO.

Después del estudio general de la supervivencia se procedió al tratamiento estadístico comparativo entre individuos de las mismas series, dividiéndolos en dos grupos según el peso; uno estuvo formado por animales con peso comprendido entre 240 g y 270 g y el otro estuvo compuesto por los animales cuyos pesos estaban situados entre 271 g y 300 g.

Se realizó el estudio de supervivencia de ambos grupos por separado, utilizando el método actuarial para la obtención de tasas de riesgo y determinando la variable categórica mediante el test de χ^2 con el fin de obtener el grado de significación estadística.

En la tabla 5 se exponen los resultados del método actuarial, en la que se observa cómo los animales del primer grupo -animales de peso comprendido entre 240 y 270 g -presentan una función de riesgo ligeramente inferior a los animales de peso más elevado -animales de peso comprendido entre 271 y 300 g-. Se comprueba así que la frecuencia acumulada más alta al final de las 9 semanas es mayor en los animales de menor peso, aunque únicamente en las series IV y V, manteniéndose igual en las restantes.

Para comprobar el grado de significación estadística, se describen en la tabla 6 los resultados del test de χ^2 donde se observa que los valores de la p son no significativos para todas las series.

De los resultados estadísticos se deduce que no hay diferencia significativa en la tasa de mortalidad entre los individuos de menor peso y los de mayor peso dentro de cada serie experimental en el rango de pesos utilizados. Las funciones de riesgo presentan leves diferencias, debidas a la evolución normal del proceso, no pudiendo comprobarse en ningún momento la hipótesis alternativa: la diferencia de pesos entre los animales de la misma serie, influye en la tasa de mortalidad.

En la figura 8 se representan los porcentajes de mortalidad para las series intervenidas quirúrgicamente.

SERIES	PESOS	N	INTERVALOS	SUPERVIVENCIA	FUNCIÓN DE
			Semanas	ACUMULADA	RIESGO
I	≤ 270	10	0-9	1	0
	>270	10	0-9	1	0
II	≤ 270	12	0-9	1	0
	>270	7	0-9	1	0
III	≤ 270	14	0-9	1	0
	>270	6	0-9	1	0
IV	≤ 270	15	0-1	0,867	0,142
			1-9	0,867	0
	>270	5	0-1	0,8	0,222
			1-9	0,8	0
V	≤ 270	12	0-1	0,75	0,285
			1-9	0,75	0
	>270	8	0-1	0,625	0,461
			1-9	0,625	0
VI	≤ 270	12	0-1	0,5	0,667
			1-9	0,5	0
	>270	8	0-1	0,5	0,666
			1-9	0,5	0
VII	≤ 270	15	1-9	0	1
	>270	5	0-9	0	1

Tabla 5.- Resultados del método actuarial para la supervivencia entre el intervalo de animales con peso ≤ 270 g. y el intervalo de animales con peso >270 g. para cada serie.

SERIES	χ^2 DE PEARSON	GRADOS DE LIBERTAD	p	SIGNIFICACIÓN ESTADÍSTICA
I	0	1	1	NS
II	0	1	1	NS
III	0	1	1	NS
IV	0,13	1	0,7	NS
V	0,01	1	0,92	NS
VI	0,21	1	0,64	NS
VII	0	1	1	NS

Tabla 6.- Comparación estadística mediante el test de χ^2 de los animales de menor peso -intervalo entre 240 y 270 g de peso- y los animales de mayor peso -271 y 300 g-. (NS= No significativo).

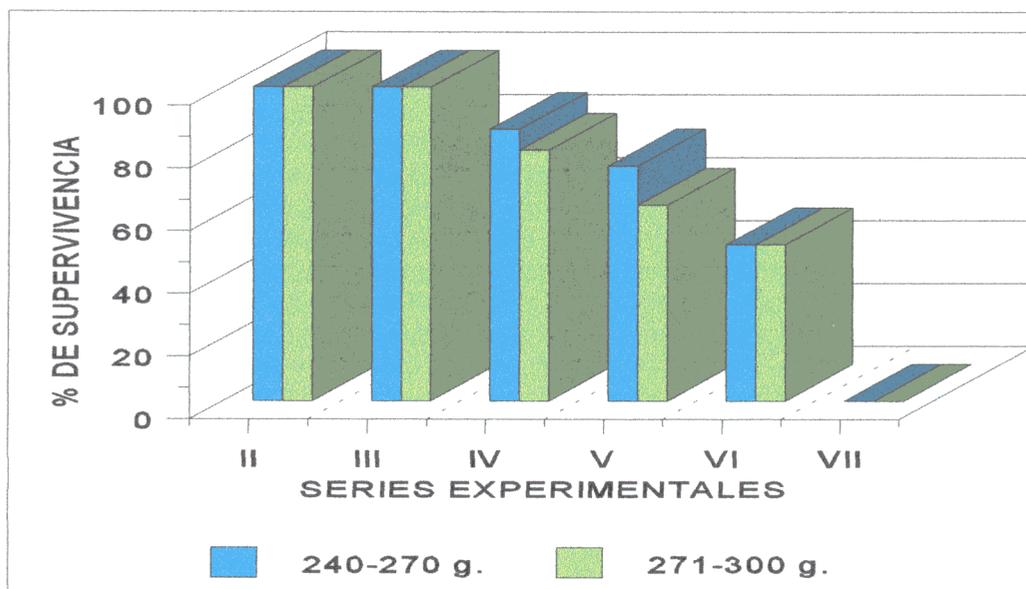


Figura 8.- Representación mediante diagrama de barras de los porcentajes de supervivencia de cada grupo de intervalo de peso, dentro de cada serie experimental.

4.3. SUPERVIVENCIA SEGÚN EL SEXO.

En animales pertenecientes a la misma serie experimental, -con peso encuadrado entre los márgenes establecidos, de iguales camadas y sometidos a idénticas formas de intervención, postpinzamiento y observación-, se hallaron diferentes grados de supervivencia según el sexo. Las pautas generales de supervivencia se mantuvieron constantes, con relación directa entre la mortalidad y la duración de la isquemia, pero en las ratas macho, la mortalidad fue considerablemente menor que en las hembras.

A) Matriz de datos.

En la tabla 7 se recogen los resultados de supervivencia para cada serie y sexo. El umbral de mortalidad para las hembras se sitúa entre las series III y IV, entre 15 y 30 minutos de isquemia; en los machos se da en la serie V, 60 minutos de isquemia. La letalidad del 50% se aprecia en las hembras pertenecientes a la serie V, sometidas a 60 minutos de IMA, mientras que, en los machos, para obtener la letalidad media, hay que superar los 120 minutos de isquemia, serie VI. En la serie VII, tras 180 minutos de isquemia intestinal, la mortalidad alcanza el 100% en ambos sexos.

B) Cálculos estadísticos y resultados.

Al igual que el estudio general de supervivencia, el estudio estadístico se realizó aplicando el test de χ^2 de Pearson, tomándose como grado de significación estadística los valores de $p \leq 0,05$. Para ello se compararon, los individuos supervivientes de cada sexo, al final del tiempo de observación -9 semanas-, pertenecientes a la misma serie experimental. Los resultados se reflejan en la tabla 8. Se observa que las diferencias de mortalidad son significativas en los animales de las series IV, V y VI, en las que se concentran las mayores probabilidades de respuesta de los organismos siendo no significativas en el resto. En las series I, II y III, sin tiempo de oclusión en las dos primeras y muy pequeño para la serie III, la letalidad es nula. En la serie VII, la letalidad es del 100% con independencia del sexo, dependiendo únicamente del máximo tiempo de isquemia, 180 minutos. En las series IV, V y VI, sometidas a tiempos de isquemia comprendidos entre el umbral de mortalidad y la letalidad 100%, se manifiesta una diferencia significativa de mortalidad entre machos y hembras.

NÚMERO DE ANIMALES SUPERVIVIENTES SEGÚN EL SEXO EN LAS SERIES EXPERIMENTALES														
TIEMPO DÍAS	SERIE I		SERIE II		SERIE III		SERIE IV		SERIE V		SERIE VI		SERIE VII	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
0,5	10	10	10	10	10	10	10	9	10	7	8	5	2	0
1	10	10	10	10	10	10	10	8	9	5	8	5	0	0
1,5	10	10	10	10	10	10	10	8	9	5	8	4	0	0
2	10	10	10	10	10	10	10	8	9	5	8	4	0	0
2,5	10	10	10	10	10	10	10	7	9	5	8	2	0	0
3	10	10	10	10	10	10	10	7	9	5	8	2	0	0
3,5	10	10	10	10	10	10	10	7	9	5	8	2	0	0
4	10	10	10	10	10	10	10	7	9	5	8	2	0	0
7	10	10	10	10	10	10	10	7	9	5	8	2	0	0
14	10	10	10	10	10	10	10	7	9	5	8	2	0	0
28	10	10	10	10	10	10	10	7	9	5	8	2	0	0
35	10	10	10	10	10	10	10	7	9	5	7	2	0	0
63	10	10	10	10	10	10	10	7	9	5	7	2	0	0

Tabla 7.- Representación del número de animales supervivientes para cada serie y género, durante los 63 días posteriores a la intervención.

SERIES	χ^2 DE PEARSON	GRADOS DE LIBERTAD	p	SIGNIFICACIÓN ESTADÍSTICA
I	0	1	1	NS
II	0	1	1	NS
III	0	1	1	NS
IV	4,058	1	0,043	S
V	3,809	1	0,05	S
VI	7,2	1	0,0073	S
VII	0	1	1	NS

Tabla 8.- Estudio estadístico de la supervivencia mediante el test de χ^2 de Pearson, para machos y hembras de cada serie experimental y su correspondiente grado de significación estadística. (NS= No Significativo, S=Significativo).

En la tabla 9 se recogen los resultados de las tasas de riesgo de cada sexo obtenidas por el método actuarial en las diferentes series experimentales.

En las series I, II y III, al no haber mortalidad en los 63 días, independientemente del sexo, coinciden la función de riesgo y la de supervivencia acumulada. En la serie IV, la supervivencia acumulada en machos se mantiene constante al no haber ninguna muerte; en cambio, en las hembras disminuye progresivamente hasta las 60 horas, para estabilizarse a partir de dicho tiempo hasta el fin de la observación. Por tanto, la probabilidad de que un animal macho muera después de 30 minutos de isquemia es nula, mientras que en el caso de las hembras, hay una probabilidad variable de que mueran, dependiendo del período de observación. La función de riesgo se detiene bruscamente al atravesar la barrera hipotética de 60 horas hasta el fin de la experiencia.

En la serie V, de 60 minutos de isquemia, la función de riesgo está mucho más elevada en las hembras, con una probabilidad superior al 50% de fallecer en las primeras 24 horas, mientras que en el caso de los machos la probabilidad de muerte para el mismo período es tan sólo del 10%. A partir de 60 horas de observación, la función de riesgo se iguala en ambos sexos, conservándose hasta el final de la experiencia.

SERIES	INTERVALOS DÍAS	SUPERVIVENCIA ACUMULADA		FUNCIÓN DE RIESGO	
		♂	♀	♂	♀
I	0-63	1	1	0	0
II	0-63	1	1	0	0
III	0-63	1	1	0	0
IV	0-0,5	1	0,9	0	0,105
	0,5-1	1	0,8	0	0,117
	1-2,5	1	0,7	0	0,133
	2,5-63	1	0,7	0	0
V	0-0,5	1	0,7	0	0,353
	0,5-1	0,9	0,5	0,105	0,333
	1-63	0,9	0,5	0	0
VI	0-0,5	0,8	0,5	0,222	0,667
	0,5-1,5	0,8	0,4	0	0,222
	1,5-2,5	0,8	0,2	0	0,667
	2,5-31	0,8	0,2	0	0
	31-32	0,7	0,2	0,105	0
	32-63	0,7	0,2	0	0
VII	0-0,5	0,2	0	0,8	1
	0,5-1	0	-	1	-
	1-63	-	-	-	-

Tabla 9.- Tasas de supervivencia y de riesgos obtenidos mediante el método actuarial, según el sexo de los animales.

En la serie VI, la función de riesgo está muy aumentada en las hembras, especialmente en las primeras 12 horas, alcanzando un 50% de mortalidad. Entre 12 y 60 horas se produce un 30% de mortalidad. A partir de este momento y hasta el fin de la experiencia, la mortalidad se

hace nula, manteniéndose, al final, una tasa de supervivencia del 20%. En cambio, en los machos, con una supervivencia acumulada del 70% al fin de la experiencia, la función de riesgo se limita a las primeras 12 horas de la reperfusión, con un 20% de mortalidad, siendo no significativa la muerte que se produce a los 31 días. En la serie VII, después de 180 minutos de isquemia, la tasa de supervivencia acumulada es 0 para las hembras, antes de las 12 primeras horas de la reperfusión; este valor se alcanza en machos en el período entre las 12 y las 24 horas posteriores a la reperfusión. Las hembras, tras las 12 primeras horas, desaparece la supervivencia acumulada y la función de riesgo puesto que no queda ningún representante. En los machos lo mismo ocurre en el tiempo comprendido intervalo comprendido entre el día 1 y los 63 días.

Se observa que la mortalidad se acumula en las primeras horas después de la isquemia, independientemente del sexo, del peso y del tiempo de isquemia.

C) Representación gráfica.

En la figura 9 se representan, en diagrama de barras, las diferentes tasas de supervivencia para cada sexo y serie. La supervivencia disminuye a medida que aumenta el tiempo de isquemia, independientemente del sexo, pero esta disminución es más constante en hembras, con un ritmo lineal, hasta alcanzar la tasa de letalidad 100; en cambio en los machos, esta recta de correlación que une los extremos de supervivencia disminuye con una pendiente muy poco pronunciada al principio, para aumentar bruscamente en el intervalo de entre 120 y 180 minutos de isquemia, series VI y VII, siguiendo una curva exponencial. La tasa de letalidad 0 para hembras se sitúa en 15 minutos de isquemia -serie III-; en tanto que, para los machos, aumenta hasta los 60 minutos de isquemia -serie V-, demostrando su mayor resistencia a la isquemia intestinal.

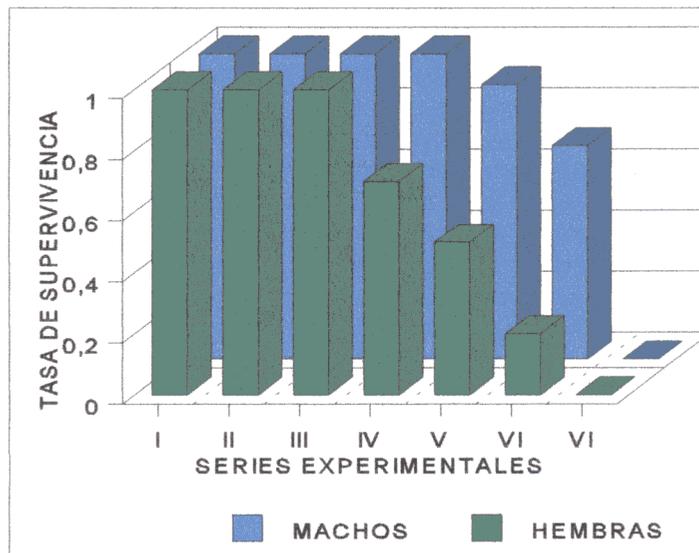


Figura 9.- Representación mediante diagrama de barras de la tasa de supervivencia para ambos sexos, en cada una de las series experimentales.

4.4. DESPERTAR DEL ESTADO ANESTÉSICO.

Finalizada la intervención quirúrgica, los animales fueron observados en jaulas individuales. El despertar del estado anestésico se controló durante las 3 horas primeras horas del postoperatorio.

Como se expone en el apartado 3.2.5.1., se consideró que el animal salía del estado anestésico, cuando iniciaba movimientos voluntarios y respondía a estímulos acústicos y nociceptivos.

Se realizó la observación en los animales de las series del estudio general de supervivencia -series II, III, IV, V, VI y VII- y se consideró un estudio separado por sexos de dichas series.

4.4.1. SEGÚN SERIES DE LA POBLACIÓN.

A) Resultados.

Los resultados se exponen en la tabla 10 en la que se recoge, en filas, la serie a la que pertenecían los animales y en columnas, el tiempo en minutos, que los animales tardaron en

abandonar el estado anestésico después de la operación, representado en forma de media aritmética (desviación estándar), el intervalo de confianza en el que se sitúa dicha media y el porcentaje de casos perdidos, que corresponde al número de animales que fallecieron después de la intervención sin haber salido del estado anestésico.

B) Inferencia estadística.

En la tabla 10 se aprecia como en la serie II, *Sham operation*, el tiempo medio que los animales tardaron en salir del estado anestésico, es considerablemente menor al del resto de las series experimentales.

Para el estudio comparativo entre las series se realizó el análisis de la varianciaa, en el que se obtiene una F de Snedecor de 0,0592, mostrando una diferencia no significativa de los resultados.

El test de Bonferroni no mostró dos grupos con diferencias significativas para una $p \leq 0,05$.

SERIES	% CASOS PERDIDOS	MEDIA (DE)	IC (95%) para la \bar{x}
II	0%	59,55 (46,88)	37,61-81,50
III	0%	102,50 (48,12)	79,98-125,02
IV	10%	68,50 (33,93)	51,63-85,37
V	25%	83,07 (59,89)	49,90-116,23
VI	20%	97,56 (52,77)	69,44-125,68
VII	90%	71,50 (19,09)	0-243,04

Tabla 10.- Tiempo medio (desviación estándar) e intervalo de confianza, medido en minutos, que tardan los animales de las diferentes series experimentales en salir del estado anestésico.

Si se observan los tiempos medios de cada una de las series y el porcentaje de casos perdidos, se comprueba cómo, el factor principal para que estas diferencias no resulten significativas, es el número de individuos que participan en cada serie, el cual se reduce de manera progresiva e irregular siendo muy considerable en el caso de la serie VII. A medida que

se reduce el número de casos válidos, la media se ajusta menos a la realidad y el intervalo de confianza se ensancha. En la serie VII, en ningún caso se cumple una distribución normal, y no se puede confirmar que un sujeto sometido a 180 minutos de isquemia, tarde en salir del estado anestésico desde el momento en el que termina la intervención y los 243 minutos siguientes, puesto que el número de casos perdidos alcanza el 90%.

C) Representación gráfica.-

En la figura 10 se representa mediante gráfico de barras, los tiempos medios que tardaron los animales de las diferentes series en abandonar el estado anestésico, así como su correspondiente desviación estándar. La serie I, al no haber sido intervenida quirúrgicamente, no figura en el gráfico. Según los resultados ofrecidos en el gráfico, no existe una pauta clara que determine una modificación del tiempo de salida de la anestesia, puesto que cada serie sigue un patrón diferente. El único hecho manifiesto es que los animales de la serie II, *Sham operation*, fueron los primeros en salir del estado anestésico con respecto a las series isquémicas II, III, IV, V, VI y VII.

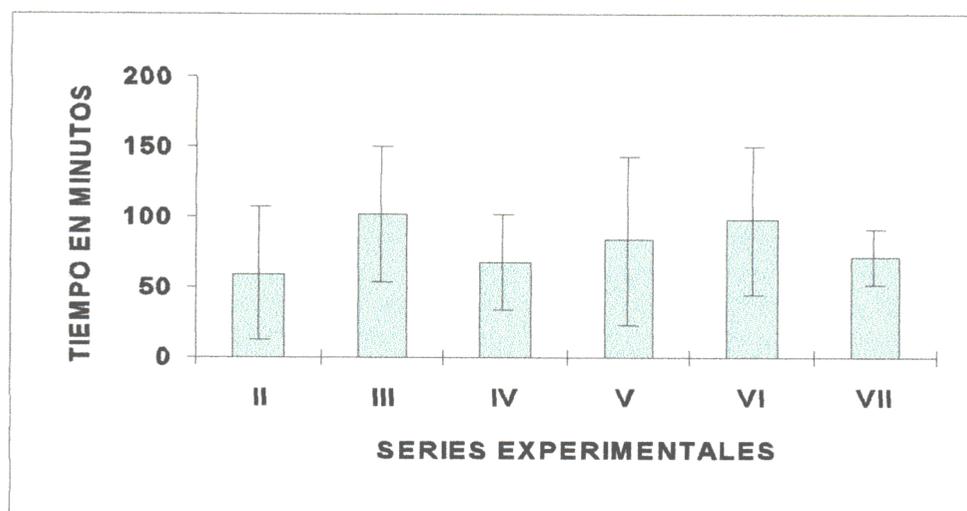


Figura 10.- Representación de los valores medios del tiempo de despertar anestésico con sus correspondientes desviaciones estándar.

4.4.2. DESPERTAR ANESTÉSICO EN FUNCIÓN DEL SEXO.

A) Resultados.

En la tabla 11 se refleja, para cada sexo, en filas, la serie de pertenencia de los animales y, en columnas, el tiempo en minutos en que estos abandonan el estado anestésico, representado en forma de media aritmética (desviación estándar), el intervalo de confianza en el que se sitúa dicha media y el porcentaje de casos perdidos correspondiente al número de animales que fallecieron tras la intervención sin haber salido del estado anestésico. Las hembras de la serie VII fallecieron en su totalidad antes de abandonar el estado anestésico por lo que sólo figuran como casos perdidos, sin otros resultados.

SERIES	% PÉRDIDAS		MEDIA (DE)		IC (95%)	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀
II	0	0	39,1(32,53)	80,0(51,50)	15,8-62,4	43,1-116,8
III	0	0	73,2(47,38)	131,8(27,1)	39,3-107,1	112,4-151,2
IV	0	20	53,9(23,55)	86,7(37,38)	37,1-70,8	55,5-118,1
V	0	50	46,0(22,74)	157,2(32,9)	29,7-62,2	116,3-198,1
VI	10	30	64,9(39,12)	139,5(35,5)	34,8-94,9	106,7-172,4
VII	80	100	71,5(19,09)	-	0-243,1	-

Tabla 11.- Tiempo medio (desviación estándar) e intervalo de confianza (IC), medido en minutos, que tardan los animales de las diferentes series experimentales en salir del estado anestésico, en función del sexo.

B) Inferencia estadística.

Puesto que los resultados entre sexos fueron muy dispares, el análisis estadístico de las series se realizó separando los machos de las hembras.

Si se compara el tiempo de salida del estado anestésico por sexos y series en conjunto, se comprueba que el tiempo menor corresponde a los individuos de la serie *Sham operation* para machos y hembras.

- Machos.

Del test de la ANOVA se obtiene una F de Snedecor de 0,2448, que supone diferencias no significativas en los resultados.

Del test de Bonferroni se induce que no existen diferencias significativas entre dos grupos para una $p \leq 0,05$.

- Hembras.

Mediante el test de la ANOVA, se obtiene una F de Snedecor de 0,011, indicando diferencias significativas en los tiempos de despertar de la anestesia para las diferentes series dentro del estudio particular de las hembras.

El test de Bonferroni concluye que aparecen diferencias significativas entre las hembras de las series II-III, II-VI, II-V y IV-V. La serie VII no interviene puesto que el 100% son casos perdidos.

C) Representación gráfica.

En la figura 11 se representa, mediante diagrama de barras, los valores medios del despertar anestésico de cada sexo correspondiente a cada serie. Se observa que el tiempo menor del despertar anestésico corresponde a los animales de la serie II en ambos géneros. Al igual que en el estudio global, representado en la figura 10, no existe una tendencia definida en la variación del tiempo de salida de la anestesia ni en los grupos de hembras ni en los grupos de machos, ya que en ambos casos es muy irregular.

D) Estudio comparativo entre machos y hembras de cada serie.

Se realizó la t de Student comparando los tiempos medios en minutos de salida del estado anestésico entre machos y hembras de cada serie. Los resultados estadísticos se recogen en la tabla 12, donde también figura el valor de p y el correspondiente grado de significación estadística.

En la tabla 12 se observa una diferencia significativa entre los tiempos de salida del estado anestésico de los machos respecto a los de las hembras y a favor de los primeros -figura 11-. En la serie VII, puesto que las hembras no llegan a salir del coma anestésico no pueden obtenerse resultados comparativos entre ambos sexos.

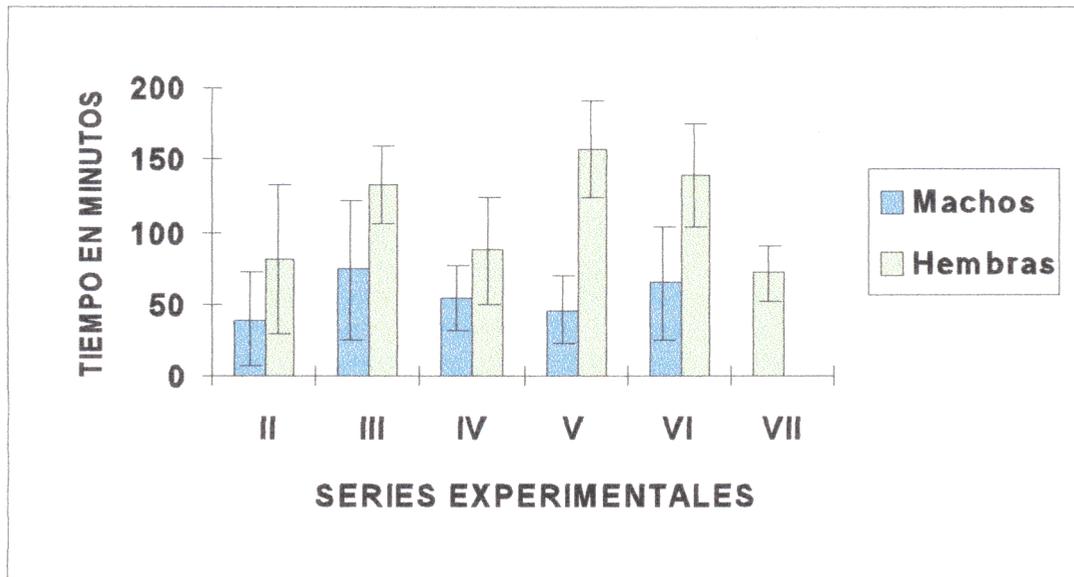


Figura 11.- Representación de los valores medios y desviación estándar de los tiempos de despertar anestésico para cada uno de los sexos de las diferentes series experimentales.

Series	Test de Levene	t -Student	p	Grado de significación
II	0,133	2,12	0,048	S
III	0,115	3,39	0,003	S
IV	0,152	2,28	0,037	S
V	0,425	7,72	0,000	S
VI	0,396	3,94	0,001	S
VII	-	-	-	-

Tabla 12.- Resultados del estudio estadístico, de la comparación intraserie de machos y hembras, de los tiempos de salida del estado anestésico (S=Significativo).

4.5. CONDICIONES FISIOLÓGICAS POSTQUIRÚRGICAS.

Después de la operación, los animales fueron introducidos en jaulas individuales, donde permanecieron aislados durante 72 horas. Durante este tiempo se realizó un seguimiento de las condiciones fisiológicas vitales: ingestión de líquido, alimento y deposiciones, según se describe en los apartados 3.2.5.2., 3.2.5.3. y 3.2.5.4. respectivamente.

4.5.1. INGESTA DE AGUA.

En la tabla 13 se refleja en porcentajes respecto al total de animales de la serie, los que ingieren agua en los períodos de tiempo señalados.

El 96,07% de los animales supervivientes había bebido agua antes de las 48 horas posteriores a la reperusión; ninguno de los animales que fallecieron entre el momento de la reperusión y las 48 horas posteriores ingirió agua.

TIEMPO HORAS	SERIES EXPERIMENTALES					
	II	III	IV	V	VI	VII
0-24	100%	75%	65%	50%	30%	0%
24-48	100%	100%	85%	70%	45%	0%
48-72	100%	100%	85%	70%	50%	0%

Tabla 13.- Porcentajes de animales que ingieren líquido en las 72 horas posteriores a la reperusión.

4.5.2. INGESTA DE ALIMENTO.

En la tabla 14 se expone en porcentajes respecto al total de animales de la serie, los que ingirieron alimento en cada espacio de tiempo. El porcentaje de animales que toman alimento en el último período de observación se corresponde con el total de animales supervivientes en cada serie.

Se observa que a medida que aumenta el tiempo de isquemia, los animales inician más tardíamente la ingestión de alimento, posiblemente debido a la gravedad de las lesiones isquémicas, explicación que se deduce comparando los tiempos de cualquiera de las series con

la serie II -*Sham operation*-.

TIEMPO HORAS	SERIES EXPERIMENTALES					
	II	III	IV	V	VI	VII
0-24	75%	35%	30%	10%	5%	0%
24-48	100%	90%	75%	70%	20%	0%
48-72	100%	100%	85%	70%	50%	0%

Tabla 14.- Porcentajes de animales que ingieren alimento en las 72 horas posteriores a la reperusión.

4.5.3. DEPOSICIONES.

En la tabla 15 se presentan los porcentajes de animales con respecto al total de la serie que realizaron defecaciones en cada uno de los intervalos que se indica en la tabla. Tanto los animales de la serie II, *Sham operation* como los de la serie III, 15 minutos de IMA, realizaron las deposiciones a ritmo normal, con presencia de heces en el 100% de los casos antes de las 24 horas de la primera observación. En las series isquémicas IV, V, VI y VII, los porcentajes no alcanzaron a la totalidad de los individuos supervivientes hasta el segundo intervalo -24-48 horas-.

En cuanto a las características de las heces, el 100% de los animales en los casos de las series II y III fueron normales. En la serie IV, el 65% de los animales realizaron deposiciones, siendo un 85% de aspecto hemorrágico y el 20% restante de aspecto normal. El porcentaje de sangre en heces, aumentó progresivamente a medida que los tiempos de isquemia fueron superiores. En la serie V, el 55% del total de animales que realizaron deposiciones, un 70% presentó aspecto sanguinolento mientras que el 30% restante presentó aspecto normal. En la serie VI un 50% de animales realizaron defecaciones presentando todas ellas aspecto sanguinolento. En el caso de la serie VII no se obtuvieron resultados puesto que ninguno de los animales fue capaz de defecar.

TIEMPO HORAS	SERIES EXPERIMENTALES					
	II	III	IV	V	VI	VII
0-24	100%	100%	80%	60%	40%	0%
24-48	100%	100%	85%	70%	50%	0%
48-72	100%	100%	85%	70%	50%	0%

Tabla 15.- Porcentajes de animales que realizaron deposiciones en las 72 horas posteriores a la reperusión.

4.6. EVOLUCIÓN DEL PESO CORPORAL.

Todos los animales fueron pesados en el momento de la intervención quirúrgica y semanalmente después de la operación. Los animales muertos por el propio proceso isquémico fueron pesados antes de la necropsia. En este apartado, todos los animales constituyen un único grupo que se empleó para seguir la evolución semanal de los pesos corporales tras la IMA.

A) Resultados.

En la tabla 16 se recoge la evolución semanal de los pesos durante las 9 semanas. Se determinó como valoración estadística, la media aritmética y la desviación estándar de cada uno de ellos en gramos, expresándose de la forma \bar{x} (DE). También se calculó el intervalo de confianza del 95% para el valor de la media, lo que indica que cualquier individuo que pudiera ser incluido en el experimento en iguales condiciones de intervención, tiene un 95% de probabilidad de que su peso esté contenido entre ambos extremos.

Los pesos de la semana 0 corresponden al momento de la intervención, antes de la anestesia, el resto de pesos, corresponde a las semanas siguientes a la intervención. Aquellos animales que no completaron el período de observación en semanas fueron incluidos en los resultados de la última semana completada de vida.

B) Inferencia estadística:

Se observa un aumento constante y gradual del peso a lo largo del tiempo. El peso medio de los animales al inicio de la operación fue de 266,14 g (DE=19,20), y el de la última pesada, realizada en los animales supervivientes de cada una de las series, tras 9 semanas de observación

fue de 311,60 g (DE=38,62), poniendo de manifiesto un aumento ponderal de la población en el tiempo de observación. Esta tendencia sólo se interrumpió tras la primera semana de observación, en la se comprueba una ligera tendencia al descenso, con un peso medio de los animales de 262,13 g (DE=22,27). Este ligero descenso durante la primera semana con respecto al peso medio inicial, muy probablemente debido al manejo quirúrgico, es revertido inmediatamente en la segunda semana, en la que se observa un rápido incremento del peso medio, que sobrepasa los pesos iniciales.

Mediante diagrama de barras, se representa en la figura 12, el peso medio por semana y la desviación estándar. Se observa un ascenso continuado, a excepción de la primera semana. Igualmente se comprueba como los valores de las desviaciones estándar aumentan a medida que transcurren las semanas indicando una mayor variabilidad entre los individuos, afectados también posiblemente por el dimorfismo sexual existente entre machos y hembras.

C) Valoración estadística.

Puesto que en cada grupo de tiempo en que se realizó la medición ponderal presentó un número de animales superior a 30, indicado en la tabla 16, no fue necesario aplicar el test de Shapiro-Wills considerándola como distribución normal.

Según el test de Levéne para el estudio de la homogeneidad de la variancia, se obtiene un valor de $p=0$, donde $p<0,05$, por lo tanto un valor muy significativo, es decir, existe una variación significativa de los pesos, en cada una de las mediciones señaladas.

Al ser el valor de la p significativo, según metodología, no se puede aplicar la ANOVA por lo tanto, se aplica el índice de Kruskal-Wallis, obteniéndose una $p=0$, que indica que el peso ha variado significativamente a lo largo del tiempo.

SEMANAS	N	MEDIA (DE)	IC (95%) para la \bar{x}
0	210	266,14 (19,20)	262,93-269,35
1	101	262,13 (22,27)	257,73-266,52
2	101	271,49 (22,72)	269,99-276,01
3	101	278,36 (25,57)	273,32-283,41
4	101	285,49 (27,38)	280,08-290,90
5	100	291,03 (32,74)	284,57-297,50
6	100	296,73 (35,95)	289,63-303,82
7	100	302,70 (34,27)	295,90-309,50
8	100	307,00 (38,03)	299,45-314,54
9	100	311,60(38,62)	303,94-319,26

Tabla 16.- Media, desviación estándar (DE), expresadas en gramos, e intervalo de confianza (IC) de la evolución de los pesos durante 9 semanas. N es el número de animales de los que se obtiene la medida de los pesos.

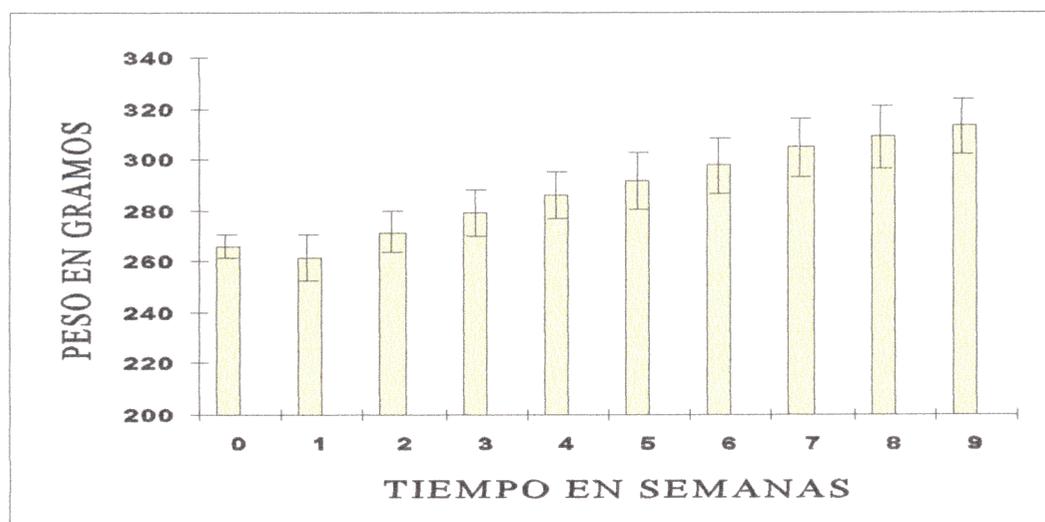


Figura 12.- Representación mediante diagrama de barras, de los pesos medios del conjunto de las series tras 9 semanas de observación.

En la tabla 17 se exponen, los resultados del test de Bonferroni con el error admitido del 5%, poniéndose de manifiesto las semanas en que se presentan las diferencias significativas del peso, representadas en la tabla mediante asteriscos. Es importante señalar, que entre el peso inicial y el de la primera semana, a pesar de la disminución ponderal, no aparecen diferencias significativas. Las primeras diferencias significativas se observan en los pesos iniciales, y en los de la tercera semana. Esto puede indicar que la pérdida de peso durante la primera semana tras la intervención quirúrgica, pueda ser secundario a la manipulación operatoria, pero que posiblemente, no dependa del cuadro isquémico.

		TIEMPOS EN SEMANAS									
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0											
1											
2											
3	*										
4	*	*	*								
5	*	*	*								
6	*	*	*	*							
7	*	*	*	*	*						
8	*	*	*	*	*	*					
9	*	*	*	*	*	*	*	*			

Tabla 17.- Cada uno de los asteriscos indica las diferencias significativas y entre que semanas ocurren estas.

4.7. RESULTADOS DEL ESTUDIO PATOLÓGICO MACROSCÓPICO.

En los animales de las series I, II, III, IV, V, VI y VII, se realizó un estudio de patología macroscópica en el momento de la muerte -por fallecimiento natural como consecuencia de la I/R, o tras ser sacrificados después de 9 semanas-. Además, salvo a los individuos de la serie I, se les hizo otro estudio clínico patológico después de la reperusión.

4.7.1. OBSERVACIONES INTRAOPERATORIAS EN EL MOMENTO DE RETIRAR EL CLAMP.

El estudio intraoperatorio se realizó siguiendo el método descrito en el apartado 3.2.4.

4.7.1.1. Presencia de gas intestinal. Se valoró como tal la presencia de acumulaciones anormales de gas en el intestino, preferentemente en el ciego, atribuibles a un desarrollo masivo de bacterias anaerobias de la flora intestinal, como consecuencia de un período de anoxia tisular según se describe en el punto 3.2.4.1.

La tabla 18 recoge el número de animales de cada serie que presentaron determinado grado de la variable dependiente categórica “presencia de gas intestinal”, encontrándose una relación directa entre la cantidad de gases intestinales y el tiempo de IMA.

GAS INTESTINAL	SERIES EXPERIMENTALES						
	I	II	III	IV	V	VI	VII
0	20	20	20	18	6	3	1
1	0	0	0	2	9	5	2
2	0	0	0	0	5	12	17
TOTAL	20	20	20	20	20	20	20

Tabla 18.- Nº de animales con los diferentes grados de la variable categórica “presencia de gas intestinal”. 0: ausencia; 1: presencia moderada; 2: presencia abundante -más de 4,5 cm de diametro-.

4.7.1.2. Perforación intestinal. Se definió según lo descrito en el apartado 3.2.4.2. del método. No se observó en ninguna de las series.

4.7.1.3. Visión de las placas de Peyer. En los casos de isquemia aguda se manifestaron como estructuras blanco-violáceas, abultadas y resaltadas. Se definió como variable dependiente categórica según queda apuntado en el punto 3.2.4.3. -figura 14-.

La tabla 19 recoge el número de animales de cada serie y el grado de la variable dependiente categórica “presencia de placas de Peyer”. Se observa como al aumentar el tiempo de IMA de 15 minutos, serie III, a 30 minutos, serie IV, se produce un incremento notable, en

cambio el proceso se revierte al aumentar más los tiempos de isquemia, series VII y VII.

PLACAS DE PEYER	SERIES EXPERIMENTALES						
	I	II	III	IV	V	VI	VII
0	20	20	16	9	18	20	20
1	0	0	4	11	2	0	0
TOTAL	20	20	20	20	20	20	20

Tabla 19.- N° de animales con los diferentes grados de la variable categórica "manifestación de las placas de Peyer". 0: presencia normal; 1: presencia resaltada.

4.7.1.4. Hemorragia en luz intestinal. La extravasación sanguínea hacia la luz intestinal, consecuencia de la isquemia intestinal, se manifestó por una tonalidad rojo-negrucza en la luz intestinal con presencia de zonas hemorrágicas en la mucosa. Se definió como variable categórica independiente, según consta en el apartado 3.2.4.4. -figura 13-.

En la tabla 20 se expone el número de animales por serie y el grado de la variable dependiente categórica "presencia de hemorragia en luz intestinal". Se observa una relación directa entre el tiempo de isquemia y la hemorragia intestinal.

GRADO DE HEMORRAGIAS	SERIES EXPERIMENTALES						
	I	II	III	IV	V	VI	VII
0	20	20	20	7	2	3	0
1	0	0	0	9	12	7	0
2	0	0	0	4	6	10	20
TOTAL	20	20	20	20	20	20	20

Tabla 20.- N° de animales con los diferentes grados de la variable categórica "presencia de hemorragia en luz intestinal". 0: ausencia; 1: presencia focal; 2: presencia de hemorragias en sábana.

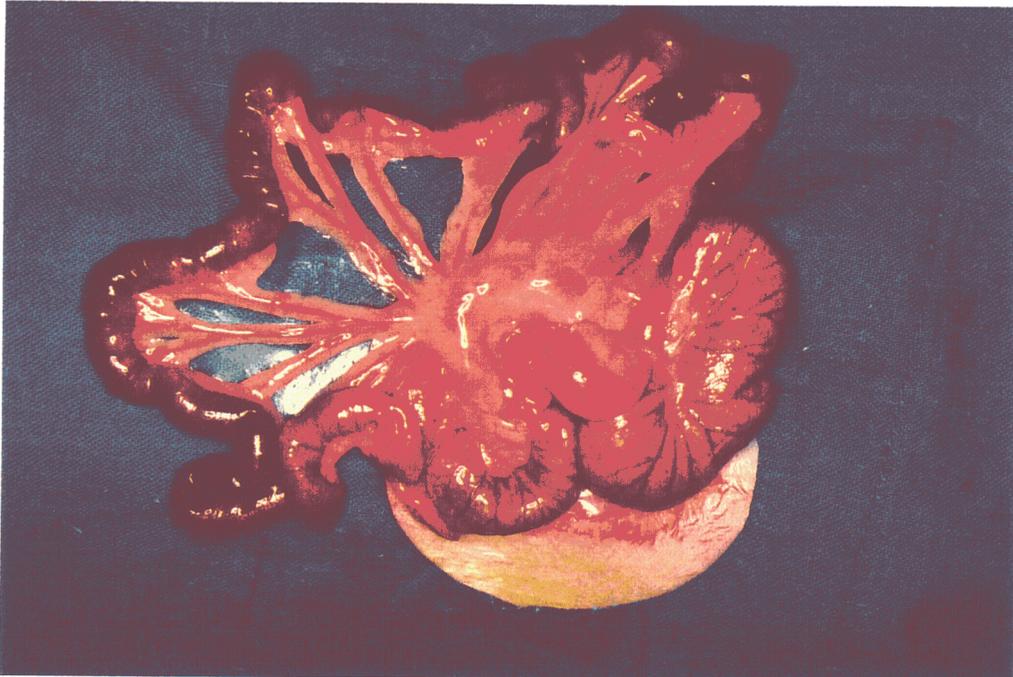


Figura 13.- Vista general del intestino delgado tras 120 minutos de isquemia. Obsérvese la congestión del tejido y la flacidez de las estructuras.

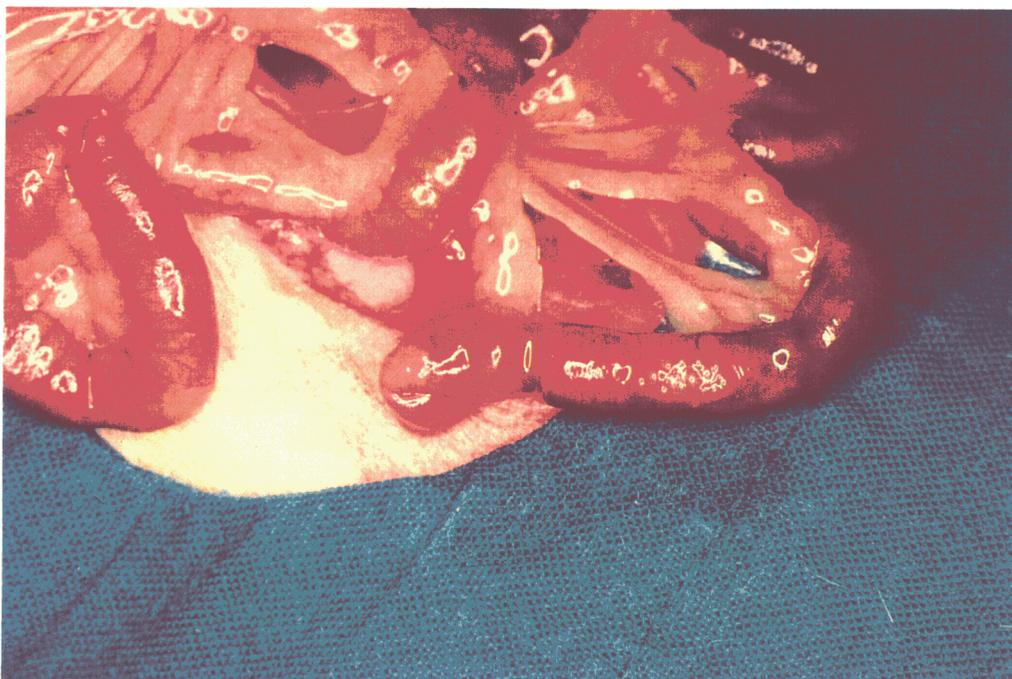


Figura 14.- Detalle de una porción del yeyuno donde se visualizan las placas de Peyer tras 120 minutos de isquemia mesntérica.

4.7.1.5. Desvitalización intestinal. Se definió como variable dependiente categórica la “presencia de desvitalización intestinal”, descrita en el apartado 3.2.4.5.

La tabla 21 muestra el número de animales por serie y el valor de la variable que presentaron. Se observa una relación directa entre el tiempo de isquemia intestinal, el grado de desvitalización intestinal y el número de animales incluidos en cada grado de la variable.

GRADO DE DESVITALIZACIÓN	SERIES EXPERIMENTALES						
	I	II	III	IV	V	VI	VII
0	20	20	0	0	0	0	0
1	0	0	18	13	8	5	0
2	0	0	2	7	11	13	0
3	0	0	0	0	1	2	20
TOTAL	20	20	20	20	20	20	20

Tabla 21.- N° de animales con los diferentes grados de la variable categórica “desvitalización intestinal”. 0: ausencia; 1: ligera congestión con palidez; 2: desvitalización y edema; 3: desvitalización intensa y colapso de las arterias intestinales.

4.7.1.6. Repermeabilización vascular. Se graduó la variable categórica “visión de la repermeabilización” en la forma descrita en el apartado 3.2.4.6.

En la tabla 22 se enumeran los animales de cada serie, el grado de repermeabilización que presentaron y el número de sujetos perdidos, SP. No se representan los individuos de las series I, serie Control y II, *Sham operation*, puesto que no se realizó el pinzamiento de la arteria.

La reperusión y la recuperación del latido arterial fueron menos manifiestas en los animales expuestos a tiempos de isquemia mayores, series VI y VII.

GRADO DE REPERFUSIÓN	SERIES EXPERIMENTALES				
	III	IV	V	VI	VII
0	20	20	19	14	1
1	0	0	1	3	4
SP	0	0	0	3	15
TOTAL	20	20	20	20	20

Tabla 22.- N° de animales y grados de la variable categórica "visualización de la reperfusión". 0: reperfusión correcta; 1: reperfusión poco manifiesta; SP: individuos que fallecieron antes de la reperfusión.

4.7.1.7. Alteraciones orgánico fisiológicas. La variable categórica se valoró siguiendo lo expuesto en el apartado 3.2.4.7. del método.

La tabla 23 recoge el número de animales de cada serie y el grado de alteraciones orgánico-fisiológicas de la variable independiente categórica.

Destaca un aumento considerable de las alteraciones orgánico-fisiológicas en relación con el aumento del tiempo de isquemia.

GRADO DE ALTERACIONES ORGÁNICO-FISIOLÓGICAS	SERIES EXPERIMENTALES						
	I	II	III	IV	V	VI	VII
0	20	20	20	19	17	14	16
1	0	0	0	1	3	6	4
TOTAL	20	20	20	20	20	20	20

Tabla 23.- N° de animales y grados de la variable categórica "Alteraciones orgánico-fisiológicas". 0: ausencia; 1: presencia de alteraciones.

4.7.2. OBSERVACIONES EN LA NECROPSIA.

Para las observaciones durante la necropsia se siguió la metodología señalada en el

apartado 3.2.7. Las alteraciones patológicas macroscópicas que se describen a continuación corresponden a los animales que fallecieron como consecuencia del episodio de I/R al que fueron sometidos, puesto que los animales supervivientes, a los que se sacrificó 9 semanas después de la operación, habían revertido las lesiones y no presentaron ninguna alteración macroscópica visible. Por igual motivo se excluyen los animales pertenecientes a las series I y II.

A continuación se presentan los resultados de las siguientes alteraciones:

4.7.2.1. Presencia de adherencias. La observación de la presencia de adherencias en torno a la AMC se realizó como consecuencia de la manipulación a que se la sometió durante la intervención.

El 100% de los animales sacrificados, independientemente de la serie a la que perteneciesen -a excepción de las series I y II que, al no contener animales sacrificados no se incluyen en el punto 4.10.2.-, presentaron adherencias alrededor de la arteria, dificultando, según los casos, su localización. Los animales muertos por causa natural no presentaron este tipo de estructuras postquirúrgicas debido al escaso intervalo de tiempo entre la operación y la muerte de los animales.

4.7.2.2. Alteraciones estructurales en órganos. En la necropsia de los animales fallecidos espontáneamente se recogieron las lesiones en hígado, riñones y pulmones.

A) Resultados.

La tabla 24 recoge los porcentajes de animales de las series IV, V, VI y VII que presentaron el grado de lesión de la variable categórica "alteración estructural en órganos". Al reflejarse en las tablas únicamente los resultados de las necropsias de los individuos fallecidos como consecuencia de la IMA, se han omitido las tres primeras series puesto que no hubo ningún caso de muerte espontánea. Como variable dependiente figuran los casos de lesiones hepáticas, lesiones renales y lesiones pulmonares, definiéndose cada una como variable categórica, según la cual, grado 0 significa ausencia de lesiones y grado 1 presencia de congestión del órgano y/o de regiones necróticas.

B) Inferencia estadística.

Comparando los resultados entre las series se comprueba que a medida que el tiempo de isquemia es mayor, el número de individuos con lesiones en otros órganos aumenta

considerablemente, hasta alcanzar porcentajes muy elevados. También se observa como el pulmón es el órgano más afectado, en cuanto que las lesiones se manifiestan antes -con menor tiempo de isquemia- y en mayor número que el resto de los órganos.

LESIONES	GRADO	SERIES EXPERIMENTALES			
		IV	V	VI	VII
HEPÁTICAS	0	100%	50%	66,7%	60%
	1	0%	50%	33,3%	40%
RENALES	0	100%	100%	88,9%	70%
	1	0%	0%	11,1%	30%
PULMONARES	0	33,3%	33,3%	21,2%	15%
	1	66,7%	66,7%	78,8%	85%

Tabla 24.- Porcentaje de animales fallecidos como consecuencia del cuadro isquémico con lesiones hepáticas, pulmonares y renales, en cada una de las series.

En cuanto a los animales sacrificados, el 100% presentó un aspecto normal en cada uno de los órganos mencionados.

4.7.2.3. Presencia de ascitis y derrame pleural. La presencia de líquido tanto en la cavidad abdominal como en la cavidad torácica se valoró como: grado 0 la ausencia de ascitis o derrame pleural; y grado 1 la presencia de ascitis o derrame pleural.

A) Resultados.

La tabla 25 muestra los porcentajes de animales de cada serie que presentaron o no alguna de estas manifestaciones.

B) Inferencia estadística.

La presencia de ascitis se manifestó en forma de pequeños volúmenes que oscilaron entre 0,5 y 1 ml. Sólo se hizo evidente en las series VI y VII. La presencia de derrame pleural, igualmente poco abundante, únicamente se presentó en la serie VII.

LESIONES	GRADO	SERIES EXPERIMENTALES			
		IV	V	VI	VII
ASCITIS	0	100%	100%	89,9%	90%
	1	0%	0%	11,1%	10%
DERRAME PLEURAL	0	100%	100%	100%	90%
	1	0%	0%	0%	10%

Tabla 25.- Porcentaje de animales de cada serie experimental que presentaban ascitis o derrame pleural en el momento de la necropsia.

El 100% de los animales sacrificados a las 9 semanas, independientemente de la serie, estuvo libre de ascitis y de derrame pleural.

4.7.2.4. Perforación intestinal. En ningún caso, igual en los animales sacrificados, como en los animales muertos por causa natural, apareció perforación intestinal.

4.7.2.5. Presencia de gas intestinal. La presencia de gas intestinal en la necropsia se valoró según se expresa en el punto 3.2.4.1.

A) Resultados.

En la tabla 26 se recogen los resultados de las observaciones.

GAS INTESTINAL	SERIES EXPERIMENTALES			
	IV	V	VI	VII
0	33,3%	0%	9,1%	5%
1	66,7%	40%	27,3%	10%
2	0%	60%	63,6%	85%

Tabla 26.- Porcentaje de animales fallecidos entre el período de isquemia y las 60 horas posteriores a la reperfusión y que presentaron gas intestinal en el momento de la necropsia en cada serie. Grado 0 ausencia; grado 1 presencia moderada de gas y grado 2 presencia abundante de gas intestinal - diámetro superior a 4,5 cm-.

B) Inferencia estadística:

Como se observa en la tabla 26, la presencia de gas en intestino en los animales fallecidos espontáneamente fue un hallazgo frecuente. En la misma tabla se comprueba cómo la frecuencia de la aparición de gas era mayor a medida que el tiempo de isquemia de las series aumentaba.

Los animales sacrificados después de las 9 semanas de supervivencia, y pertenecientes a las mismas series de los animales anteriores, que no fallecieron por causa directa del proceso isquémico, tan sólo el 5,1% presentó gases intestinales de grado 1 y un 1,38% de grado 2, no achacables al proceso isquémico, puesto que sobrevivieron todo el tiempo de observación.

4.7.2.6. Hemorragia en luz intestinal.- Fue valorada según se describe en el apartado 3.2.4.4.

A) Resultados.

La tabla 27 recoge los porcentajes de animales muertos espontáneamente y el grado de hemorragia intestinal que presentaron.

B) Inferencia estadística.

Se aprecia cómo el número de afectados y la intensidad de la hemorragia aumenta con el tiempo de isquemia, hasta el 100% en los animales de la serie VII.

HEMORRAGIA INTESTINAL	SERIES EXPERIMENTALES			
	IV	V	VI	VII
0	0%	20%	0%	0%
1	33,3%	20%	27,3%	0%
2	66,7%	60%	72,7%	100%

Tabla 27.- Porcentaje de animales que presentaron hemorragia intestinal en el momento de la necropsia en cada serie. 0: ausencia; 1: presencia focal; 2: presencia de hemorragias en sábana.

Ninguno de los animales en los que se realizó la necropsia al ser sacrificados a las 9 semanas, presentó hemorragia intestinal.

4.7.2.7. Desvitalización intestinal. Para el estudio de este punto se siguió la metodología del apartado 3.2.4.5.

A) Resultados:

La tabla 28 refleja los porcentajes y grados de desvitalización intestinal en animales muertos de forma espontánea como consecuencia de la isquemia.

B) Inferencia estadística:

Se comprueba que la gravedad de las lesiones está directamente relacionada con el tiempo de isquemia. La mayor severidad de las lesiones aparece en la serie VII en la que el 100% de los animales manifiesta signos de desvitalización muy intensos con necrosis intestinal generalizada.

Ninguno de los animales en los que se practicó la necropsia tras ser sacrificados a las 9 semanas presentaron lesión ni desvitalización intestinal.

GRADO DE DESVITALIZACIÓN	SERIES EXPERIMENTALES			
	IV	V	VI	VII
0	0%	0%	9,1%	0%
1	0%	0%	9,1%	0%
2	100%	80%	63,7%	0%
3	0%	20%	18,1%	100%

Tabla 28.- Porcentaje de animales y grado de desvitalización intestinal en el momento de la necropsia en cada serie. 0: ausencia; 1: aspecto necrótico moderado; 2: edema agudo generalizado; 3: descomposición generalizada y shock intestinal.

4.8. ESTUDIO DEL PESO DE LOS ÓRGANOS.

Se pesó cada riñón por separado, los pulmones como un único valor y el hígado.

4.8.1. ESTUDIO DEL PESO DE LOS RIÑONES.

A) Resultados.

La tabla 29 recoge el peso medio relativo respecto del total corporal y la desviación estándar de los riñones para cada serie. Se detallan los intervalos de confianza (IC), con un error $\alpha \leq 0,05$ -95% de confianza-.

B) Inferencia estadística.

El test de Levene, para la homogeneidad de la variancia da resultados no significativos, $-p=0,072$ en riñón derecho y $p=0,23$ en riñón izquierdo-, por lo tanto, el estudio de comparación de las series se realiza mediante el test de ANOVA, obteniéndose los valores de $p=0,06$ en riñón derecho y $p=0,11$ en riñón izquierdo, por lo que, en ambos casos, el resultado es no significativo.

El test de Bonferroni determina que no existen diferencias significativas en el peso entre ninguna de las series experimentales para ninguno de los dos riñones.

SERIES	ÓRGANOS			
	RIÑÓN DCH.	IC (95%)	RIÑÓN IZQ	IC (95%)
I	0,32 (0,04)	0,31-0,34	0,33 (0,03)	0,31-0,35
II	0,35 (0,03)	0,34-0,37	0,34 (0,03)	0,33-0,36
III	0,38 (0,05)	0,36-0,41	0,36 (0,04)	0,34-0,38
IV	0,37 (0,08)	0,33-0,42	0,34 (0,03)	0,33-0,36
V	0,37 (0,06)	0,35-0,40	0,35 (0,03)	0,33-0,36
VI	0,36 (0,07)	0,33-0,40	0,35 (0,04)	0,33-0,37
VII	0,38 (0,05)	0,36-0,41	0,36 (0,03)	0,34-0,37

Tabla 29.- Pesos medios relativos y desviación estándar, e intervalo de confianza de los riñones de cada serie experimental.

4.8.2. PESO DE HÍGADO Y PULMONES.

A) Resultados.

La tabla 30 recoge el peso medio y la desviación estándar de los pulmones y del hígado, para cada serie, expresados en forma de pesos relativos con respecto al total corporal, y los intervalos de confianza con un error $\alpha \leq 0,05$.

B) Inferencia estadística.

Del test de Levene, para la homogeneidad de la variancia se obtuvieron resultados

significativos $-p=0,0008$ en hígado y $p=0,0408$ en pulmones-, por lo tanto, el estudio de comparación de las series se realizó mediante el test de Kruskal-Wallis, obteniéndose los valores de $p=0,132$ en hígado y $p=0,112$ en pulmones. Por lo tanto para el hígado y los pulmones se obtiene que no existen diferencias significativas en el peso de los órganos entre los individuos de diferentes series.

El test de Bonferroni concluye que no existen diferencias significativas entre ninguna de las series experimentales ni para el peso del hígado ni para el de los pulmones.

SERIES	ÓRGANOS			
	HÍGADO	IC (95%)	PULMONES	IC (95%)
I	3,59 (0,36)	3,42-3,76	0,48 (0,09)	0,43-0,52
II	3,84 (0,31)	3,69-3,98	0,47 (0,07)	0,44-0,50
III	3,83 (0,38)	3,64-4,01	0,51 (0,05)	0,48-0,54
IV	3,61 (0,64)	3,30-3,92	0,50 (0,08)	0,46-0,54
V	3,68 (0,73)	3,34-4,03	0,51 (0,06)	0,49-0,54
VI	3,59 (0,68)	3,26-3,92	0,51 (0,06)	0,48-0,54
VII	3,69 (0,36)	3,51-3,86	0,52 (0,05)	0,49-0,55

Tabla 30.- Pesos medios relativos y desviación estándar, e intervalo de confianza de hígado y pulmones, de cada serie experimental.

4.9. RESULTADOS DEL ESTUDIO MICROSCÓPICO EN LAS SERIES DE LA CURVA DE SUPERVIVENCIA.

El estudio microscópico de las piezas anatómicas de los animales de las series I y II dio como resultado la ausencia de lesiones, puesto que en ambos casos no se realizó pinzamiento de la AMC, de ahí que la descripción de la anatomía patológica, únicamente se refiera a las series isquémicas, -III, IV, V, VI y VII-.

4.9.1. SERIE III, 15 minutos de IMA.

No murió ningún animal por causa de I/R.

- Hígado. Morfología hepática sin lesiones valorables, ni microscópicas ni macroscópicas, en todos los animales de la serie.

De los veinte animales estudiados, catorce de ellos -70%- no presentaron ninguna manifestación distinta a las del grupo control, tres animales -15%- mostraron congestión sinusoidal leve -que aparece frecuentemente en individuos control-; uno tan sólo -5%- presentó una leve hiperplasia de las células de Kupffer, de escaso valor patológico y dos -10%- presentaron leve infiltrado linfocitario portal.

- Riñones. Sin alteraciones de importancia, ni macroscópicas ni microscópicas, en los 20 animales de la serie -100% de casos-.

Del total de animales, dieciocho -90%- presentaron morfología totalmente normal y dos -10%- manifestaron congestión vascular glomerular de discreta intensidad.

- Pulmones. Sin alteraciones importantes tanto macroscópicas como microscópicas, salvo en un animal -5%- que presentó alteraciones pulmonares con infección intercurrente. Microscópicamente mostró alveolitis descamativa multifocal e intersticial de tipo lipoideo, con presencia abundante de focos hemorrágicos, hemosiderosis y focos de neumonía intersticial lipoidea endogénica. La tinción con Oil-Red dio resultado positivo. La neumonía pudo ser intercurrente o debida a una debilidad adquirida consecuente a la I/R.

Únicamente tres animales -16%- mostraron un aspecto pulmonar mantenido, diez -53%- mostraron atelectasias dispersas, que en ocasiones pueden aparecer en ratas control, tres -16%- presentaron enfisema pulmonar leve que también pueden aparecer en ratas normales, seis -31%- congestión vascular leve, tres -16%- hiperplasia folicular linfocitaria peribronquial, en uno caso -5%- se halló presencia de hemosiderófagos en focos aislados y en cuatro -21%- apareció infiltrado inflamatorio leve linfocitario.

Ninguna de estas modificaciones puede ser considerada como patología valorable, debido a que puede aparecer en animales sanos que no han sido sometidos a experimentación.

- Páncreas. Sin alteraciones valorables en ninguno de los individuos -100%-.

- AMC. En el 100% de los animales apareció permeabilidad y calibre normales y ausencia de lesiones vasculares. Se observaron únicamente adherencias grasas entorno a la arteria en el 100% de los individuos, como consecuencia de la manipulación efectuada durante

la intervención.

- Ganglios linfáticos mesentéricos. Mostraron reactividad inespecífica, con presencia de hiperplasia folicular linfoide y abundancia de mastocitos, característica que aparece también en los animales controles. El 100% de los animales de la serie presentó ganglios linfáticos sin patología valorable.

- Yeyuno. La totalidad de los individuos presentó un yeyuno viable.

El aspecto macroscópico fue normal en diecinueve casos -95% del total-, siendo moderadamente delgada la pared en un animal -5%-. Microscópicamente, 17 animales -85%- no presentaron ninguna modificación y de los tres restantes, dos -10%- presentaron regiones discretamente atróficas, con congestión vascular leve y uno -5%- manifestó cambios degenerativos aislados de desvitalización. Con respecto al total de animales, siete -35%- manifestaron infiltrado linfocitario leve en la lámina propia, compatible con la normalidad y que no se consideró alteración valorable.

- Íleon. Todos los animales presentaron viabilidad del íleon, sin alteraciones valorables.

Macroscópicamente no aparecieron alteraciones. En el estudio microscópico, dieciocho animales -90%- no manifestaron ninguna modificación y sólo dos -10% restante- presentaron edema vellositario leve poco valorable. En un animal -5%- se describió congestión vascular leve. Cinco animales -25% del total- mostraron infiltrado linfocitario leve en la lámina propia, compatible con la normalidad.

- Colon. Completamente viable en la totalidad de los animales de la serie.

Sólo un animal -5%- presentó congestión vascular leve en los bordes antimesentéricos de los pliegues de la mucosa, con infiltrado linfocitario discretamente aumentado a nivel de la lámina propia.

En resumen, en ninguno de los animales que integraron la serie III se observaron lesiones patológicas de importancia tras 9 semanas de observación, resultados que concuerdan con la supervivencia de los animales de la serie.



4.9.2. SERIE IV, 30 minutos de IMA.

El número total de animales muertos, tras el cuadro experimental de I/R, fue de 3 -15%-, habiendo sobrevivido el resto durante las 9 semanas de observación.

- Hígado. Ausencia de lesiones en los veinte casos -100%-, tanto en animales fallecidos como en supervivientes.
- Riñones.
 - Supervivientes.- No se observaron lesiones.
 - Fallecidos.- Uno -5%- de los tres animales presentó macroscópicamente hidronefrosis, diagnóstico que se confirmó microscópicamente. No se le atribuyó una relación clara con el proceso isquémico. Uno de los animales presentó riñones de shock, posiblemente causado por el shock isquémico y el tercero no presentó alteración valorable.
- Pulmones.
 - Supervivientes.- Ausencia de lesiones en la totalidad de los individuos, con la presencia habitual de focos aislados de atelectasia y enfisema.
 - Fallecidos.- Uno presentó focos leves de neumonía, otro manifestó fuerte congestión pulmonar, debida posiblemente al shock isquémico y el otro no presentó alteración valorable.
- Páncreas. Ausencia de lesiones en el 100% de los animales.
- AMC. Permeabilidad completa en todos los animales, independientemente de la supervivencia y sin lesiones valorables. Presencia de adherencias grasas en todos los animales supervivientes -diecisiete- y ausencia de ellas en los animales muertos -tres-.
- Ganglios linfáticos mesentéricos. Ganglios viables y reactivos inespecíficos en el 100% de los animales.
- Yeyuno.
 - Supervivientes. Ausencia de lesiones en el 100% de los individuos.
 - Fallecidos.- En los tres casos, se apreció macroscópicamente congestión

intestinal severa. Uno presentó necrosis de coagulación y lítica, con ausencia de células vivaces en la pared intestinal. En los otros dos animales se produjeron alteraciones epiteliales severas, con congestión vascular aguda y pérdida de epitelio glandular a nivel de la lámina propia y de las vellosidades.

- Íleon.

- Supervivientes. Ausencia de lesiones en el 100% de los individuos.
- Fallecidos. Uno presentó atrofia intestinal macroscópica que se confirmó al estudio microscópico con necrosis masiva transparietal con aisladas células vivaces residuales linfoides y del epitelio glandular en la lámina propia. Los dos restantes -10%- presentaron congestión aguda y alteraciones epiteliales severas.

- Colon.

- Supervivientes. Ausencia de lesiones en el 100% de los animales.
- Fallecidos. Alteraciones epiteliales leves en el epitelio de revestimiento superficial.

En conclusión, aunque la mortalidad de la serie fue baja -15% de los animales-, en los animales fallecidos se observó destrucción considerable de pared de la región intestinal afectada, lo que se traduce en fallo generalizado y muerte atribuible al cuadro isquémico.

4.9.3. SERIE V, 60 minutos de IMA.

El número de animales muertos en la serie fue de seis -30%-, y los sacrificados tras 9 semanas fueron catorce -70%-.

- Hígado.

- Supervivientes. Ausencia de lesiones en el 100% de los individuos.
- Fallecidos. Cuatro animales -67%- no presentaron ningún tipo de alteración hepática, mientras que en los dos restantes -33%- se observó congestión hepática severa, posiblemente asociada a I/R.

- Riñones.
 - Supervivientes. Ausencia de lesiones en la totalidad de los animales.
 - Fallecidos. Ausencia de lesiones en cinco casos -84%- y presencia de congestión leve en uno -16%-.
- Pulmones.
 - Supervivientes. Nueve -65%- presentaron histología pulmonar sin alteraciones valorables, el resto mostró alteraciones microscópicas leves: cuatro -28,6%- congestión vascular leve, dos -14,3%- neumonía subpleural, posiblemente asociada a debilidad tras la I/R, y uno -7,14%- atelectasias.
 - Fallecidos. Sólo uno -16,6%- no presentó alteraciones valorables, los cinco restantes -84%- mostraron congestión pulmonar, siendo leve en dos e intensa en los tres restantes, y en tres de ellos se presentaron hemorragias focales moderadas, causadas posiblemente por la I/R.
- Páncreas. El 100% de los individuos sin alteraciones valorables.
- AMC. Permeabilidad completa en todos los animales, independientemente de la supervivencia y ausencia de lesiones parietales. Presencia de adherencias grasas en todos los supervivientes -dieciseis- y ausencia de las mismas en los animales fallecidos -seis-.
- Ganglios linfáticos mesentéricos. Sin alteraciones patológicas valorables en ningún caso. En todos los casos se presentaron cambios reactivos inespecíficos.
- Yeyuno.
 - Supervivientes. El 79% -once animales- presentaron yeyuno normal sin alteraciones valorables ni macroscópicas ni microscópicas. Los tres restantes -22%- presentaron lesiones leves: dos mostraron infiltrado linfocitario leve y el tercero edema intestinal leve en la lámina propia, con signos de no recuperación total y presencia de desepitelización, pérdida neuronal de los plexos nerviosos e infiltrado linfocitario severo en la lámina propia.
 - Fallecidos. Tan sólo uno -17% del total de muertos- presentó alteraciones yeyunales leves. El 84% restante -cinco animales-, presentaron lesiones severas:

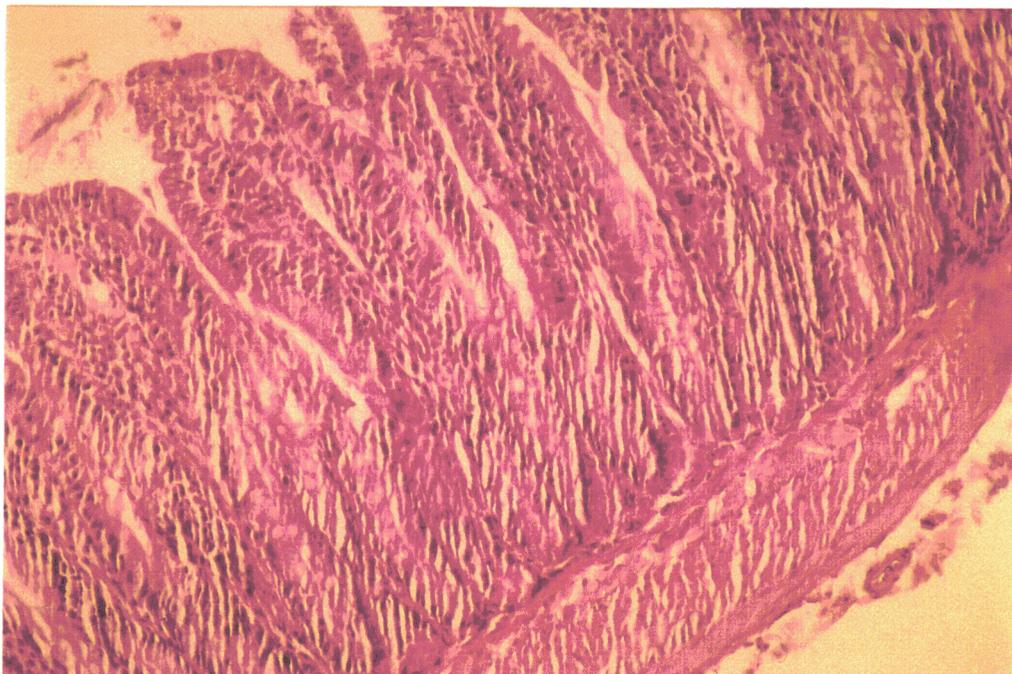


Figura 15.- Microfotografía H. E. X250. 60 minutos de IMA. Pared del intestino delgado en corte transversal, que muestra congestión vascular, más pronunciada a nivel vellositario.

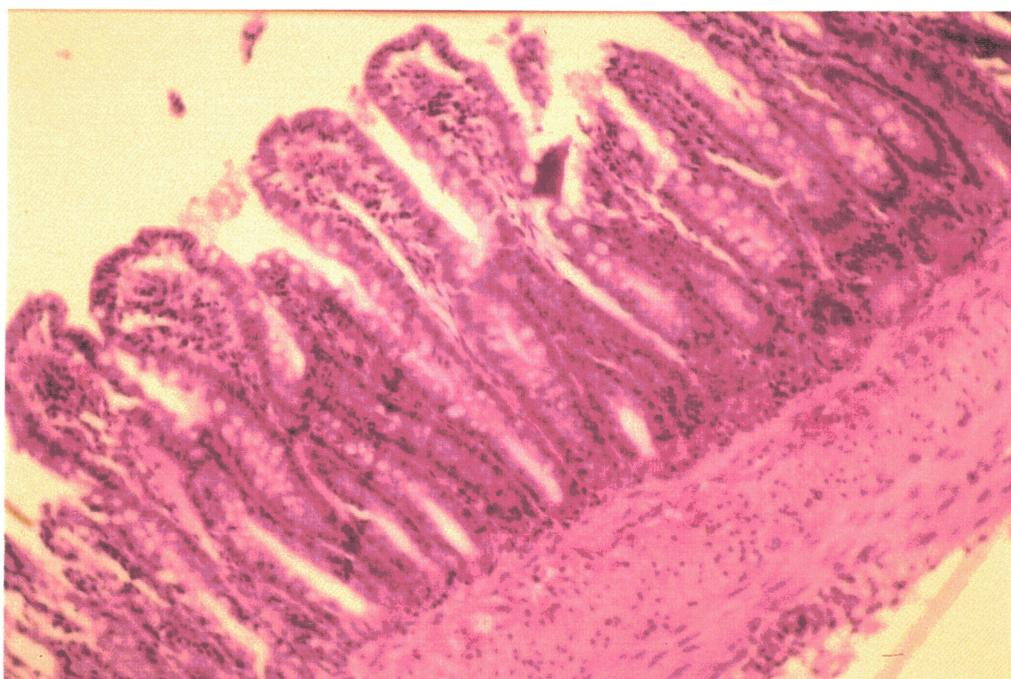


Figura 16.- Microfotografía H.E. x250. 60 minutos de IMA. Intestino delgado donde los vértices de las vellosidades muestran separación del epitelio de revestimiento de su membrana basal.

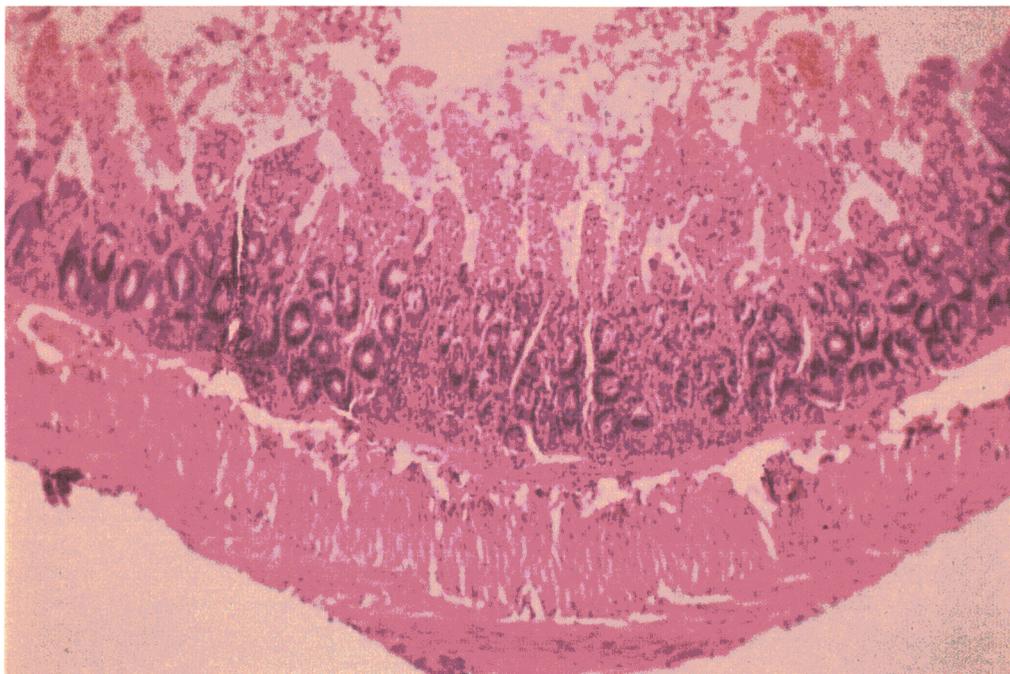


Figura 17.- Microfotografía H. E. x200. 120 minutos de IMA. Intestino delgado con vellosidades denudadas del epitelio y ampliamente hemorrágicas

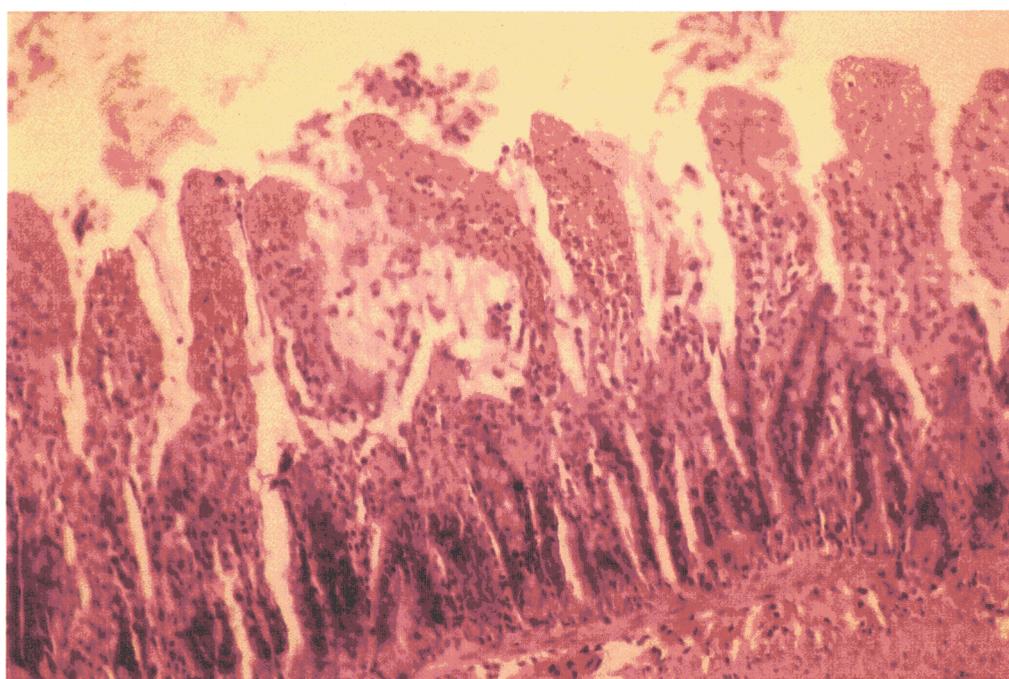


Figura 18.- Microfotografía H.E. x250. 120 minutos de IMA. Imagen similar a la anterior que muestra con mayor detalle el aspecto hemorrágico de las vellosidades.

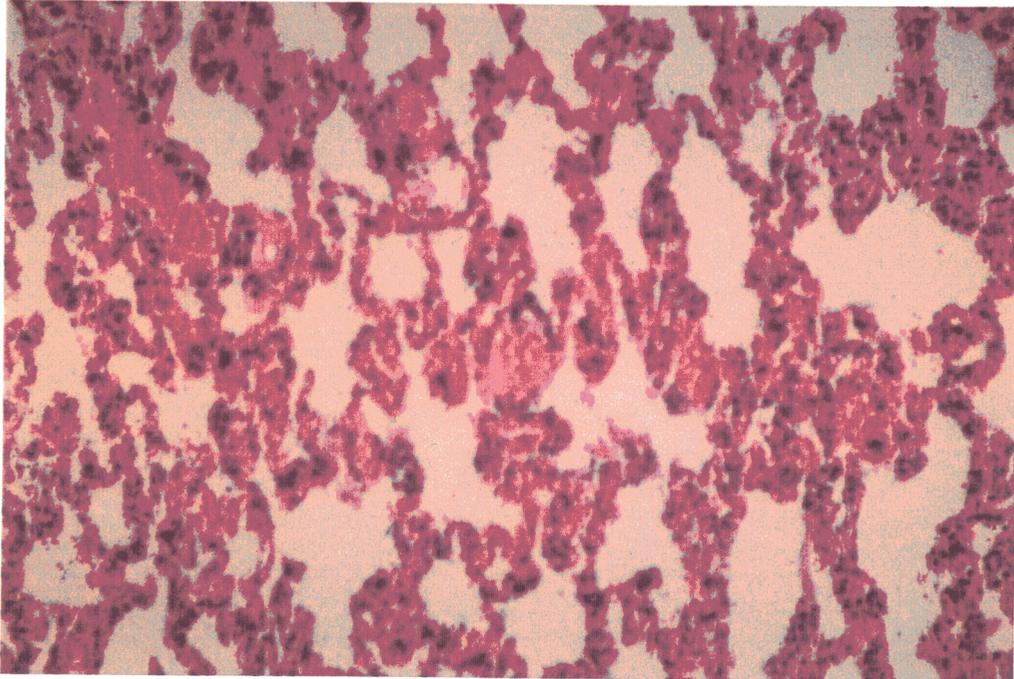


Figura 19.- Microfotografía H. E. x200. 60 minutos de IMA. Parénquima pulmonar mostrando congestión vascular en tabiques interalveolares.

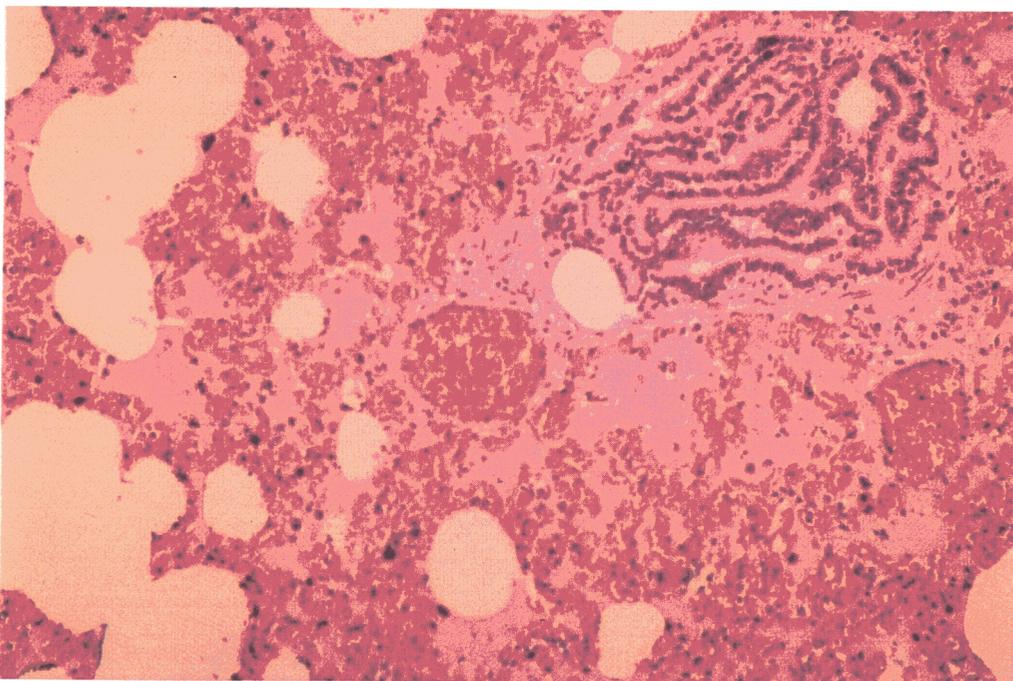


Figura 20.- Microfotografía H.E. x200. 120 minutos de IMA. Parénquima pulmonar con hemorragia y edema agudo de pulmón, que ocupa los alveolos, quedando algunos pasillos libres. Arriba a la derecha se aprecia epitelio bronquiolar.

tres necrosis subtotal con destrucción vellositaria y los otros dos necrosis transparietal masiva, con intensa desvitalización transparietal, con sólo algunas células necrobióticas y presencia aislada de células musculares vivaces.

- Íleon.

- Supervivientes. Los hallazgos fueron similares a los del yeyuno. El 79% -once casos- presentaron macroscópica y microscópicamente morfología mantenida. Dos presentaron infiltrado linfocitario leve en la lámina propia y uno presentó edema leve de la lámina propia y recuperación incompleta. Pérdida parcial de neuronas de los ganglios vegetativos.

- Fallecidos. Macroscópicamente, tres animales -50%- presentaron intestino desvitalizado, deslustrado y de color grisáceo. Microscópicamente, el 33% -dos animales- mostró edema severo y desprendimiento vellositario; el 50% -tres animales- necrosis subtotal con degeneración necrótica y mayor afectación de la región antimesentérica y el 17% -uno animal- necrosis transparietal aguda. Tres animales -50%- presentaron, también, afectación necrótica de ganglios nerviosos vegetativos parasimpáticos, del plexo nervioso mioentérico.

- Colon.

- Supervivientes. Sin alteraciones valorables en los 16 casos.

- Fallecidos. Del total de animales, cinco -el 84% de los fallecidos- no presentaron alteraciones valorables. Uno mostró afectación leve de la mucosa con descamación parcial de la misma.

En los animales fallecidos se apreció una destrucción considerable de la pared de la región intestinal, que se tradujo en choque generalizado y muerte, atribuible en todos los casos al cuadro isquémico. También se comprobó correlación entre animales muertos y lesiones a distancia en órganos periféricos, especialmente en pulmón.

4.9.4. SERIE VI, 120 minutos de IMA.

El número de fallecidos de la serie VI fue de diez animales -50%- y el otro 50% sobrevivió a las 9 semanas.

- Hígado.

- Supervivientes. El 90% -nueve animales-, no presentó alteraciones. Un único animal -10%-, presentó congestión vascular leve.

- Fallecidos. Ocho animales -80%- no presentaron alteraciones valorables. Uno -10%- mostró congestión centrolobulillar y otro -10%- congestión vascular discreta.

- Riñones. Salvo uno de los animales supervivientes, que presentó congestión vascular leve, el resto no presentaron alteraciones valorables.

- Pulmones.

- Supervivientes. El 40% -cuatro animales- no presentó alteraciones morfológicas. Tres de ellos -30%- presentaron atelectasias comunes, dos -20%- hemosiderosis, como probable vestigio de lesiones anteriores -hemorragias-, acontecidas durante el cuadro experimental, y otros dos -20%- mostraron engrosamiento de los tabiques alveolares.

- Fallecidos. El 10% -un animal- mostró pulmones sin alteraciones valorables. Los nueve animales restantes -90%- presentaron congestión vascular aguda de distinta intensidad. Además, el 40% -cuatro animales- presentó infiltrado polimorfonuclear moderado y uno -10%- presentó edema agudo de pulmón.

- Páncreas. Sin alteraciones valorables en ningún caso.

- AMC. Ausencia de roturas o lesiones en el tronco arterial y permeabilidad completa en el 100% de los animales. Presencia de adherencia grasas en todos los animales sacrificados, y ausencia de estas en los animales fallecidos.

- Ganglios linfáticos mesentéricos. Reactividad inespecífica de los ganglios en el 100% de los individuos y ausencia de alteraciones patológicas valorables.

- Yeyuno.

- Supervivientes. Todos los animales presentaron yeyuno viable. Cuatro animales -40%- sin alteraciones valorables, otros cuatro -40%- mostraron signos de recuperación incompleta y presencia de epitelio regenerado, menor tinción de

núcleos y citoplasma y neuronas con núcleos picnóticos que no han recuperado su aspecto normal. El 20% restante -dos animales- mostró infiltrado linfohistiocitario leve, en la lámina propia

- Fallecidos.- Ninguno presentó intestino viable, sino con numerosas alteraciones macroscópicas y microscópicas. Lesiones microscópicas: Necrosis transparietal aguda, pérdida generalizada de estructuras vellositarias, pérdida de mucosa y submucosa. Pérdida de núcleos de la capa muscular, con presencia de citoplasmas homogeneizados, plexo nervioso mioentérico gravemente afectado, con neuronas desvitalizadas, con núcleos hiper cromáticos y picnóticos retraídos y ausencia de nucléolos. Se trata de necrosis avasculares severas, producidas por necrosis de coagulación seguida por necrosis lítica.

El aspecto macroscópico de todos ellos fue congestivo e intensamente hemorrágico.

• Íleon.

- Supervivientes. El 40% -cuatro animales- presentó íleon sin alteraciones valorables. Otros cuatro -40%- mostraron aumento del infiltrado linfohistiocitario a nivel de la lámina propia y congestión leve en otros cuatro -40%-.

- Fallecidos. Todos presentaron lesión masiva tisular con necrosis transparietal, destrucción general de vellosidades, desprendimiento del epitelio de superficie de la membrana basal, infiltrado linfohistiocitario leve, necrosis hemorrágica y afectación severa de la capa muscular y de ganglios nerviosos mioentéricos. Macroscópicamente presentaron congestión y hemorragia.

• Colon

- Supervivientes. El 90% -9 animales- presentó colon normal sin alteraciones valorables. Uno animal -10%- mostró leve pérdida celular en capas musculares y en ganglios vegetativos mioentéricos con presencia de células ganglionares con degeneración nuclear.

- Fallecidos. El 90% -nueve animales- presentó un colon viable sin alteraciones valorables y uno -10%- mostró necrosis de mediana intensidad.

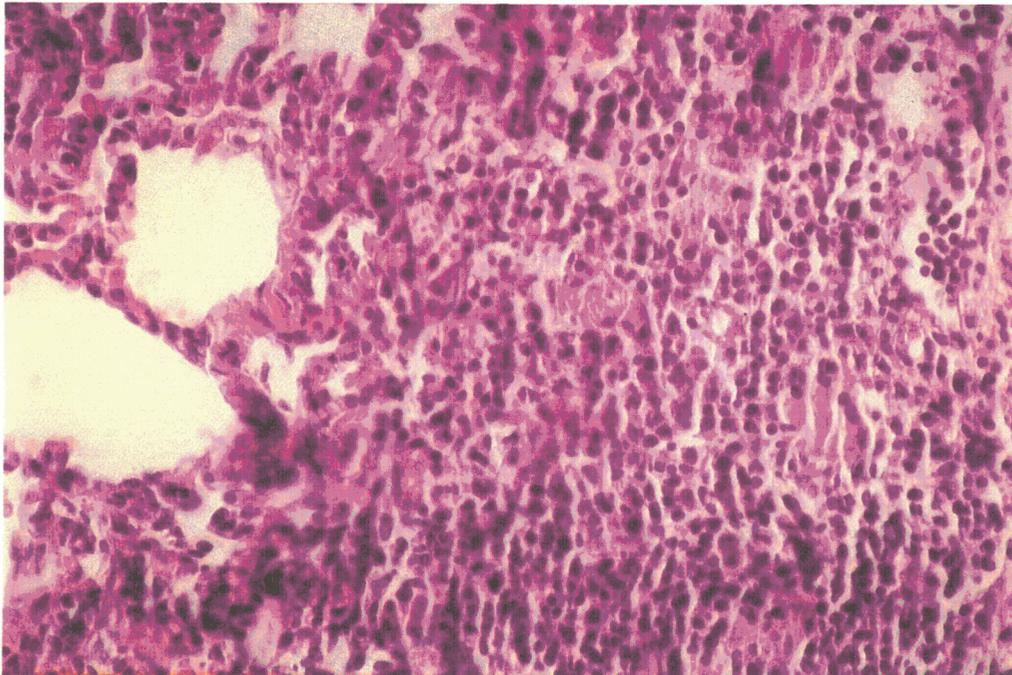


Figura 21.- Microfotografía H. E. x400. 90 minutos de IMA y sacrificada a las 9 semanas. Parénquima pulmonar mostrando foco de infiltración neumónica que ocupa la totalidad de la imagen, salvo una pequeña zona del borde derecho.

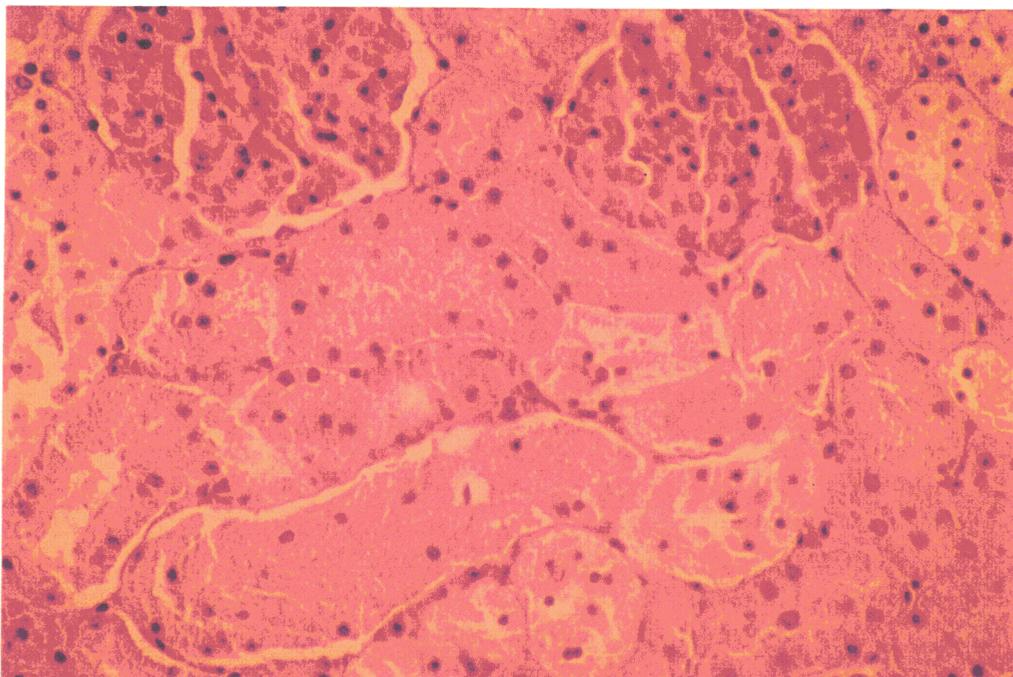


Figura 22.- Microfotografía H.E. x400. Rata fallecida tras 90 minutos de IMA. Riñón donde se observan glomerulos congestivos y túbulos con pérdida parcial de núcleos en las células de revestimiento.

En general, los animales fallecidos mostraron lesiones intestinales muy severas sobre todo en yeyuno e íleon que les condujeron a la muerte, con afectación moderada de otros órganos, especialmente pulmón.

4.9.5. SERIE VII, 180 minutos de IMA.

La tasa de mortalidad fue del 100% en las 60 primeras horas.

- Hígado. El 60% de los animales -doce-, presentó un hígado viable sin alteraciones valorables. El 35% -siete animales-, presentó congestión hepática moderada y el 5% restante mostró congestión severa.

- Riñones. El 40% -ocho animales- presentó riñones sin alteraciones valorables. El 35% mostró riñones de shock y el 35% restante congestión vascular moderada, lo que hace que el 60% de animales -doce ratas-, presentasen lesión renal.

- Pulmones. Todos los animales de la serie mostraron lesión pulmonar. El 80% -dieciseis animales- presentó congestión vascular aguda y el 20% lesiones agudas. De ellos, dos animales presentaron edema agudo de pulmón y otros dos peribronquitis y endobronquitis con sangre e infiltrado neutrofilico moderado.

- Páncreas. Sin alteraciones valorables.

- Ganglios linfáticos mesentéricos reactivos sin otras alteraciones.

- AMC. Permeable, y ausencia de adherencias.

- Yeyuno. En todos los animales hubo necrosis hemorrágica masiva transparietal, destrucción completa de vellosidades, afección muy grave de todas las capas y de ganglios nerviosos intramurales e infarto intestinal agudo irreversible. El aspecto macroscópico fue desvitalizado, con adelgazamiento severo de la pared y hemorragia.

- Íleon. Lesiones similares a las del yeyuno, mostrando necrosis masiva irreversible en todos los animales.

- Colon. El 95% -diecinueve animales-, presentaron lesiones intensas: doce animales -24%- necrosis transparietal generalizada y siete -71%- congestión vascular intensa con afectación necrótica importante de la mucosa. Tan sólo un individuo no mostró lesiones de

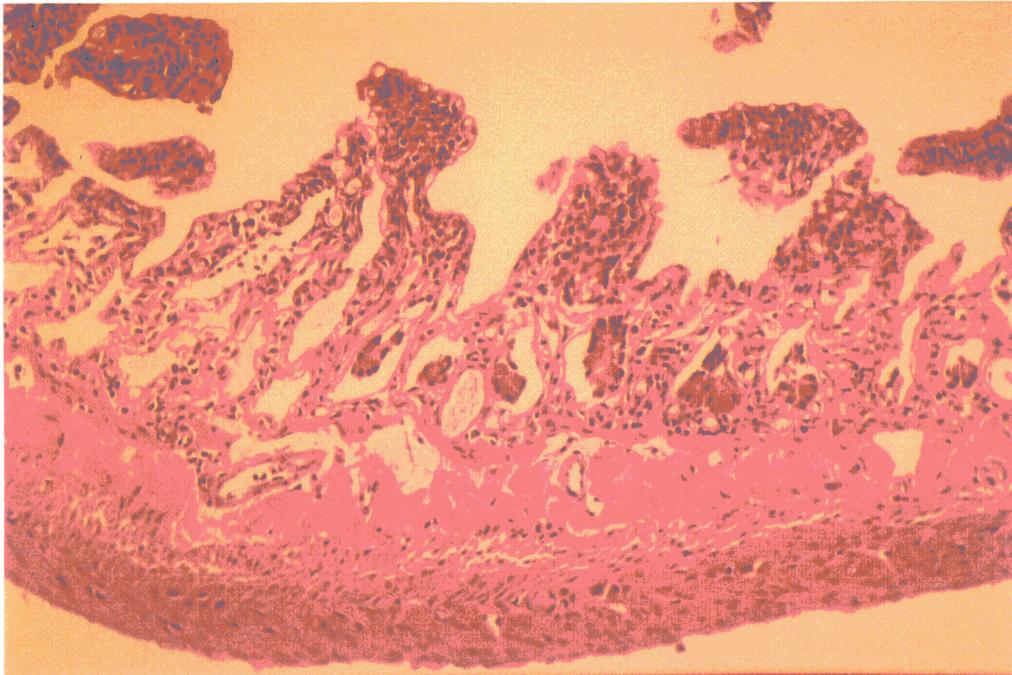


Figura 23.- Microfotografía H. E. x100. 180 minutos de IMA. Intestino delgado mostrando pérdida del epitelio de revestimiento superficial vellositario y glandular. Algunas glándulas presentan restos de epitelio desvitalizado.

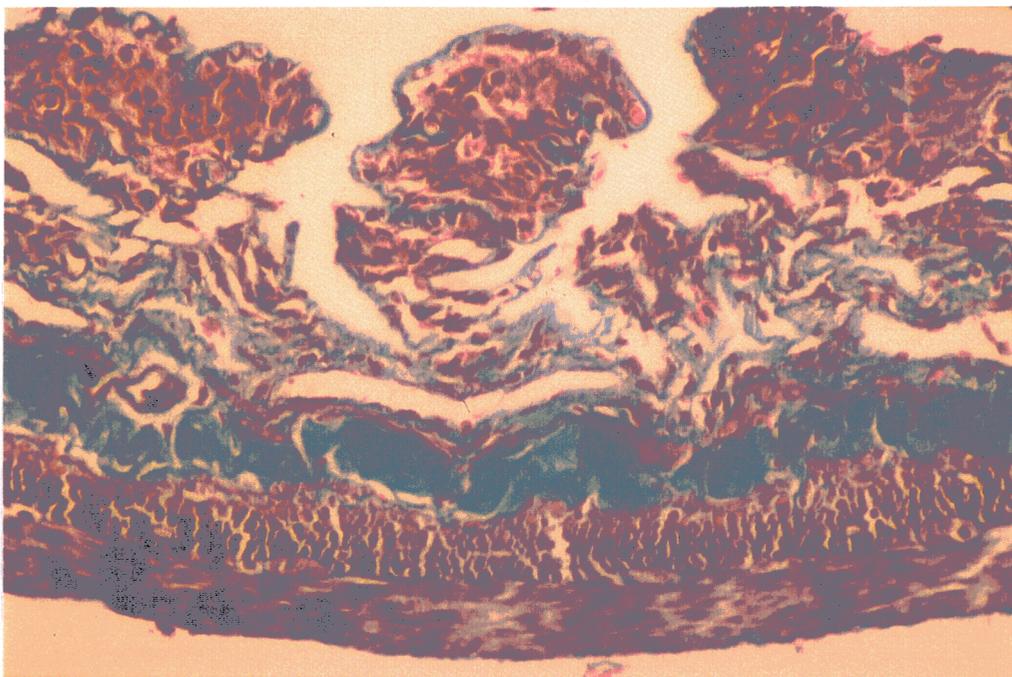


Figura 24.- Microfotografía Massón x400. 180 minutos de isquemia. Intestino delgado con pérdida total del epitelio. Los restos vellositarios se muestran contraídos y desvitalizados. La submucosa aparece en verde y las musculares en rojo.

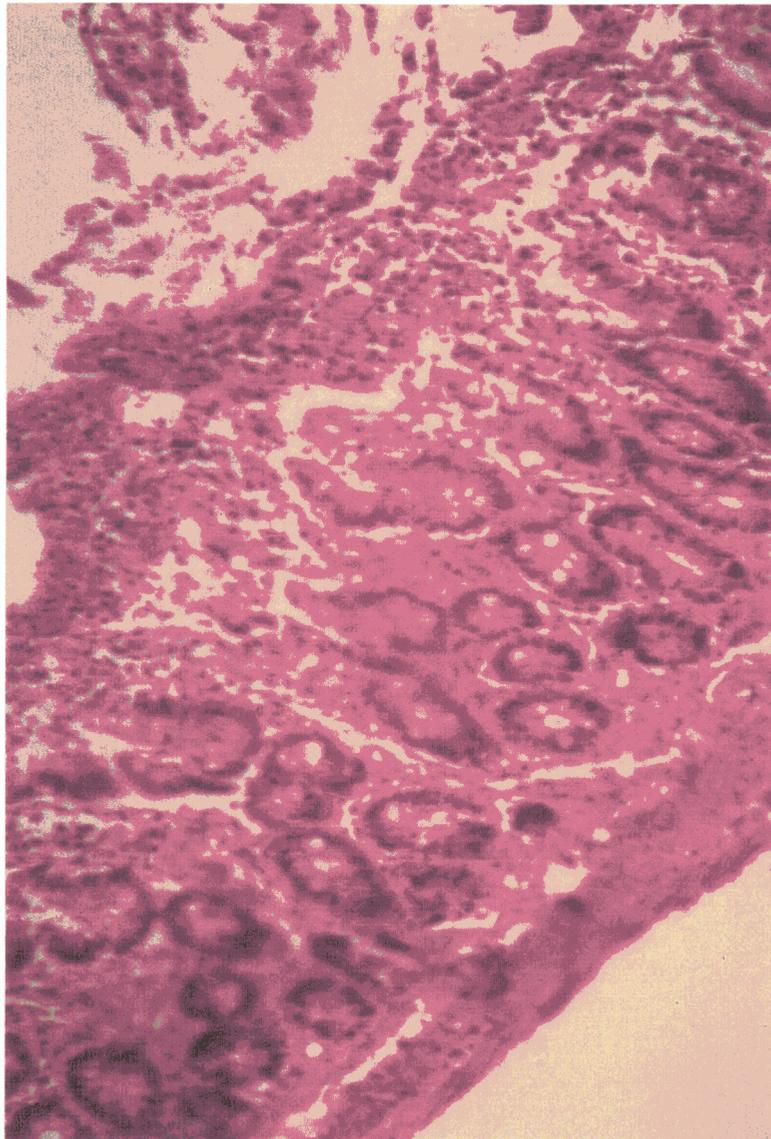


Figura 25.- Microfotografía H.E. x250. 180 minutos de IMA. Intestino delgado en el que han desaparecido las vellosidades y la superficie se muestra recubierta por una especie de membrana constituida por sangre, fibrina y elementos inflamatorios con núcleos vivaces.

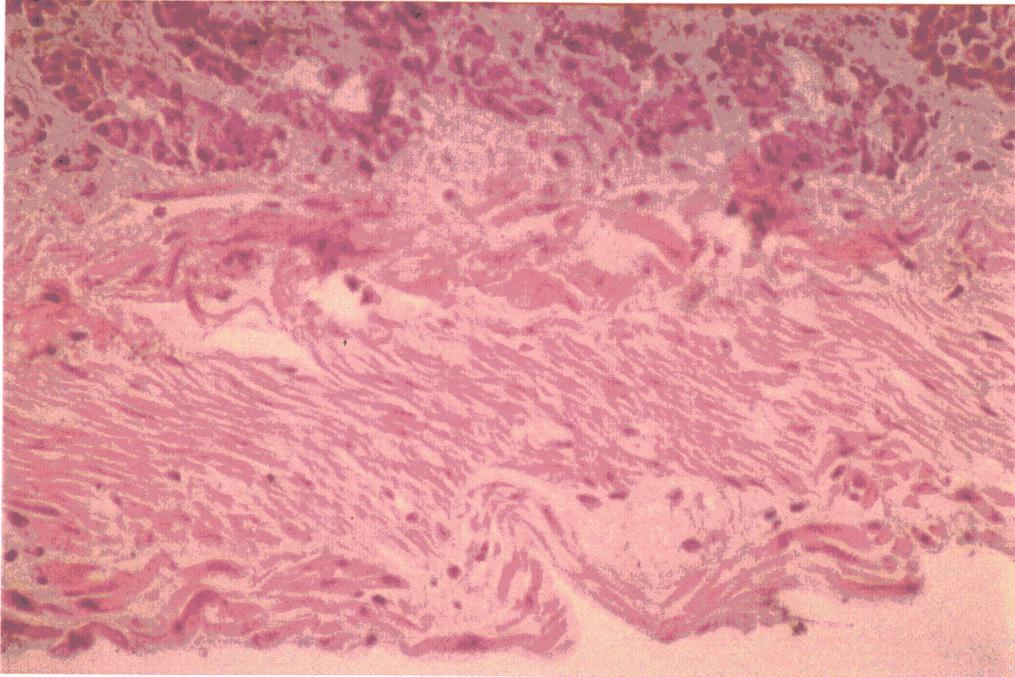


Figura 26.- Microfotografía H. E. x400. 180 minutos de IMA. Afectación por necrosis de coagulación de las capas musculares, con homogeneización citoplasmática y pérdida de núcleos. Ganglio nervioso vegetativo con vacuolización y picnosis nuclear neuronal.

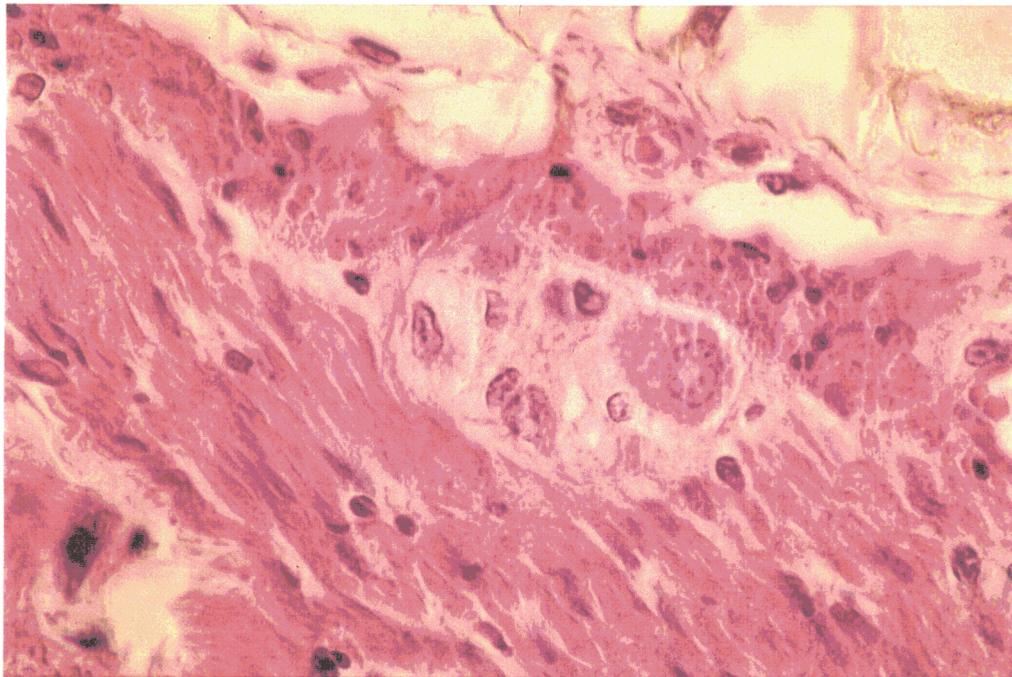


Figura 27.- Microfotografía H.E. x600. 120 minutos de IMA. Ganglio del plexo mientérico de Auerbach, mostrando pérdida de nucleolo y contracción nuclear neuronal.

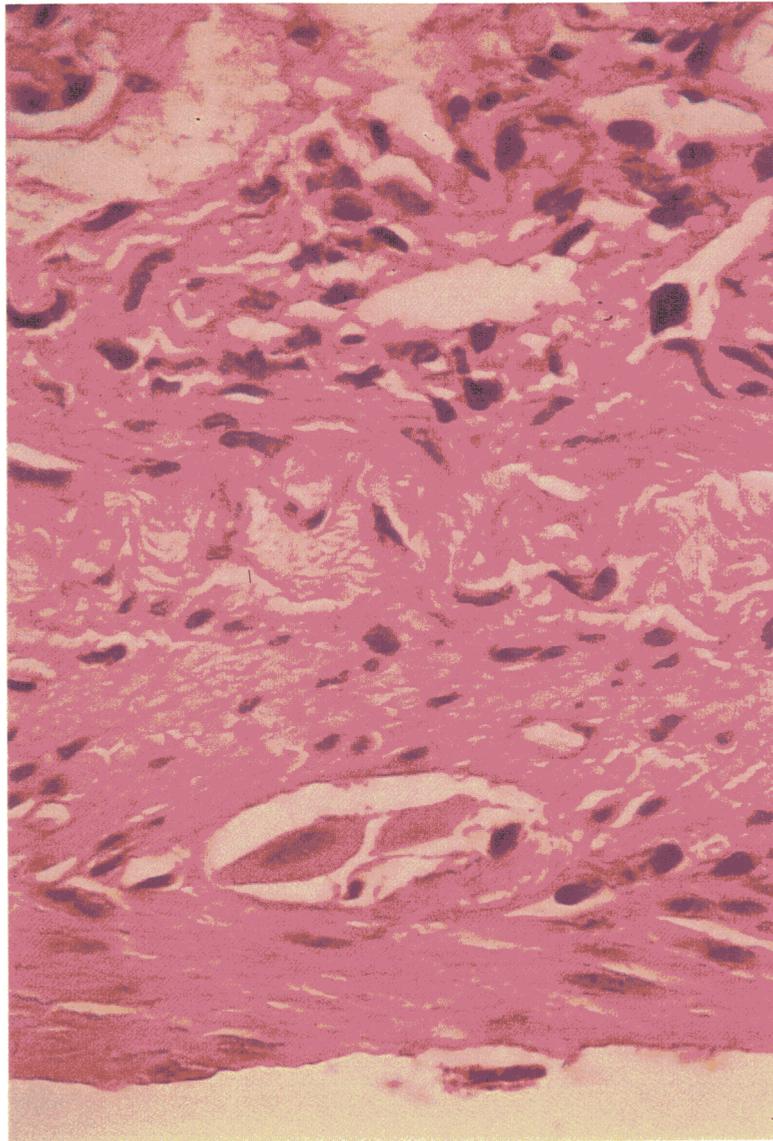


Figura 28.- Microfotografía H.E. x600. 180 minutos de IMA. Necrosis de coagulación de las neuronas de un ganglio vegetativo mientérico y desaparición de pericitos.

importancia.

El aspecto general de la serie es de infarto agudo de intestino con destrucción masiva de tejido e irrecuperable, shock mixto y afección multiorgánica.

4.9.6. RESULTADO COMPARATIVO DE LAS SERIES DE LA CURVA DE SUPERVIVENCIA.

En la tabla 31 muestra el número de animales fallecidos en cada grupo que presentaron lesiones histológicas, y, entre paréntesis, el porcentaje relativo con respecto al número total de fallecimientos de cada serie.

Independientemente del grado de las lesiones, se observa que en todas las series aparecen lesiones de importancia en el intestino delgado, área regada por la AMC, lo que evidencia la relación entre la interrupción experimental del flujo sanguíneo y la aparición de lesiones histológicas en el tejido. Los porcentajes de lesiones hísticas intestinales, aumentan a medida que se prolonga el tiempo de isquemia.

La AMC permanece normal en todas las series, sin perforaciones, obstrucciones, o lesiones en la pared, y en todos los casos permeables tras la retirada del microclamp.

En cuanto a los resultados en el resto de órganos:

- el páncreas difuso de la rata no mostró ninguna alteración,
- los ganglios linfáticos mesentéricos mostraron reactividad inespecífica en los límites de la normalidad,
- el hígado presentó una tasa de afectación semejante en todas las series, independientemente del tiempo de isquemia,
- las lesiones en pulmón aumentaron a medida que la isquemia intestinal se prolongó alcanzando en la serie VII el 100% de los casos,
- las lesiones en duodeno e íleon fueron similares dentro de la misma serie y progresivas en grado de afectación y cantidad de animales afectados, alcanzando en la serie VII el 100%,
- en colon, las lesiones apenas afectaron la integridad de la mucosa y únicamente en casos aislados de las series V y VI, a excepción de la serie VII donde se afectó en casi la

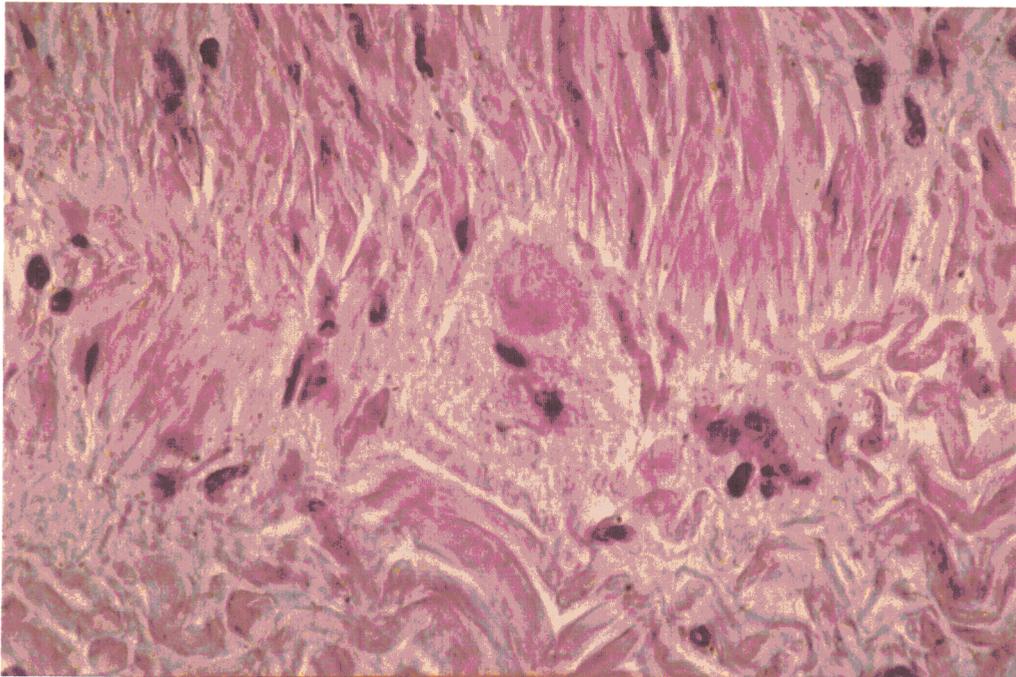


Figura 29.- Microfotografía H. E. x600. 120 minutos de IMA. Ganglio vegetativo del plexo mientérico, mostrando neuronas con cambios necróticos de cromatolisis y pérdida nucleolar. Otras muestran picnosis nuclear.

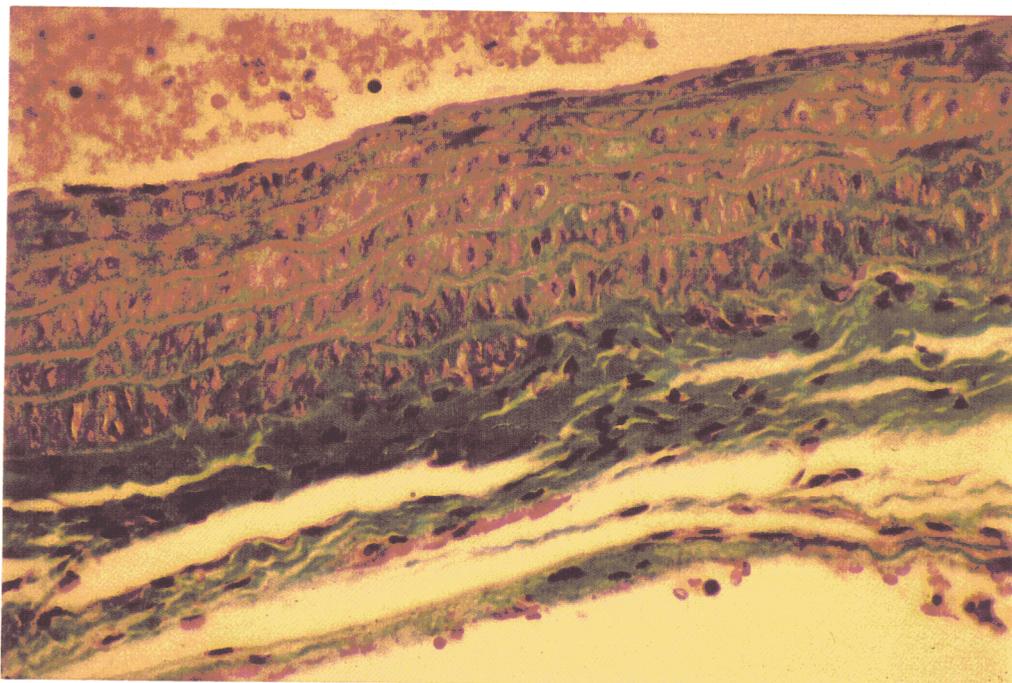


Figura 30.- Microfotografía Massón. x600. 90 minutos de IMA. AMC. En la luz se aprecian elementos sanguíneos. El revestimiento endotelial muestra núcleos alargados y planos. La túnica media, en rojo, contiene fibras conectivas y musculares.

totalidad de los individuos.

TEJIDO	SERIES EXPERIMENTALES			
	IV	V	VI	VII
Hígado	1(33,3%)	2(33,3%)	2(20%)	8(40%)
Riñones	1(33,3%)	0(0%)	0(0%)	12(60%)
Pulmones	1(33,3%)	5(83,4%)	9(90%)	20(100%)
Páncreas	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
AMC	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
Ganglios	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
Yeyuno	3(100%)	6(100%)	10(100%)	20(100%)
Íleon	3(100%)	6(100%)	10(100%)	20(100%)
Colon	0 (0%)	2(16,7%)	1(10%)	19(95%)

Tabla 31.- Número de animales, y porcentajes relativos, de los grupos de fallecidos de cada serie, en los que aparecen lesiones histológicas para cada uno de los órganos estudiados.

4.10. VALORES DEL ANÁLISIS DEL LABORATORIO.

4.10.1. SERIE CONTROL.

La serie I -serie control-, constituida por 20 animales, como se describe en el apartado 3.2.11. de la metodología, suministran la información basal de las constantes bioquímicas, determinadas en suero sanguíneo, obtenido por centrifugación a 3000 r.p.m durante 10 minutos. Los parámetros se dividieron en 3 grupos:

- constantes enzimáticas,
- sustratos metabólicos,
- constantes iónicas.

4.10.1.1. Constantes enzimáticas.

La tabla 32 recoge los resultados estadísticos: media aritmética y desviación estándar, expresado de la forma \bar{x} (DE), el valor de la mediana y el intervalo de confianza del 95%, con un error $\alpha \leq 0,05$ -95% de confianza- de cada una de las constantes enzimáticas expresadas en unidades internacionales por litro (UI/l).

Constantes enzimáticas	CPK	GGT	AST	ALT	LDH
\bar{x} (DE).	186(29)	3(1)	95(9)	59(9)	214(53)
Mediana.	185,5	3	96,5	10	107,5
IC (95%)	171,8-199,2	2,5-3,5	91,4-99,5	54,5-63,4	188,8-238,8

Tabla 32.- Constantes enzimáticas de la serie control (Serie I) para n=20.

4.10.1.2. Sustratos metabólicos:

La tabla 33 recoge, expresados en mg/dl, los valores de la media aritmética y desviación estándar, expresado en la forma \bar{x} (DE), la mediana y el intervalo de confianza (IC) del 95% con un error $\alpha \leq 0,05$ para la urea y la creatinina.

Sustratos metabólicos	Creatinina (mg/dl)	Urea (mg/dl)
\bar{x} (DE).	0,5 (0,2)	47 (4)
Mediana.	0,5	47
IC (95%)	0,43-0,58	45,41-48,89

Tabla 33.- Sustratos metabólicos de la serie control (Serie I) para n=20.

4.10.1.3. Constantes iónicas

En la tabla 34 figuran los valores de la media aritmética y desviación estándar expresada según \bar{x} (DE), la mediana y el intervalo de confianza (IC) del 95% con un error $\alpha \leq 0,05$ para los cationes sodio y potasio, en mEq/l.

Constantes iónicas	Na ⁺ (mEq/l)	K ⁺ (mEq/l)
\bar{x} (DE).	141 (5)	4 (0,5)
Mediana.	140	4,1
IC (95%)	138,6-143,6	3,80-4,31

Tabla 34.- Valores de las constantes iónicas de la serie control (Serie I) para n=20.

4.10.2. SERIE SHAM OPERATION.

La serie II, *Sham operation*, estuvo constituida según se ha descrito en el apartado 3.4.1., por 20 ratas que suministraron información de las constantes bioquímicas en el suero sanguíneo de animales intervenidos quirúrgicamente, pero no sometidos a cuadro isquémico. Los parámetros analizados se dividieron en 3 grupos según su naturaleza:

- constantes enzimáticas,
- sustratos metabólicos,
- constantes iónicas.

4.10.2.1. Constantes enzimáticas.

La tabla 35 recoge los resultados estadísticos media aritmética y desviación estándar, \bar{x} (DE), mediana e intervalo de confianza del 95% (IC) con un error $\alpha \leq 0,05$. Los valores de cada una de las constantes se expresan en unidades internacionales por litro (UI/l).

Constantes enzimáticas	CPK	GGT	AST	ALT	LDH
\bar{x} (DE).	180 (29)	3 (1)	97 (13)	56 (7)	211 (40)
Mediana.	187	3	95,5	56	206
IC (95%)	166,8-194,0	2,9-3,7	90,8-102,9	52,4-58,5	192,1-229,8

Tabla 35.- Constantes enzimáticas de la Serie II (*Sham operation*), para n=20.

4.10.2.2. Sustratos metabólicos

Se determinaron las concentraciones de los sustratos metabólicos -creatinina y urea-.

La tabla 36 recoge los resultados estadísticos de la creatinina y urea, expresados en mg/dl, en forma de media aritmética y desviación estándar, \bar{x} (DE), mediana y el intervalo de confianza del 95% (IC), con un error $\alpha \leq 0,05$.

Sustratos metabólicos	Creatinina (mg/dl)	Urea (mg/dl)
\bar{x} (DE). Global	0,5 (0,2)	44 (7)
Mediana. Global	0,5	45,5
IC (95%)	0,39-0,57	41,23-47,37

Tabla 36.- Sustratos metabólicos de la Serie II (*Sham operation*), para n=20.

4.10.2.3. Constantes iónicas

En la tabla 37 se reflejan los valores de la media aritmética y desviación estándar, \bar{x} (DE), mediana e intervalo de confianza del 95% (IC), con un error $\alpha \leq 0,05$ -95% de confianza- para los cationes sodio y potasio, expresados en mEq/l.

Constantes iónicas	Na ⁺ (mEq/l)	K ⁺ (mEq/l)
\bar{x} (DE). Global	143 (7)	4,1 (0,6)
Mediana. Global	142	4
IC (95%)	140,2-146,60	3,81-4,38

Tabla 37.- Constantes iónicas obtenidos de la Serie II (*Sham operation*), para n=20.

4.10.3. SERIE EXPERIMENTAL.

La serie XIV, formada por 10 ratas macho, y descrita en el punto 3.4.1. del método, suministró la información de las constantes bioquímicas en suero sanguíneo, en animales sometidos a 90 minutos de isquemia y 30 minutos de reperfusión según se expone en el apartado 3.2.3.2. del método. Los parámetros se dividieron en 3 grupos:

- constantes enzimáticas,
- sustratos metabólicos,
- constantes iónicas.

4.10.3.1. Constantes enzimáticas.

La tabla 38 recoge los estadísticos media aritmética y desviación estándar, mediana e intervalo de confianza del 95% (IC), con un error $\alpha \leq 0,05$ para las constantes enzimáticas expresadas en unidades internacionales por litro (UI/l).

Ctes. enzimáticas	CPK	GGT	AST	ALT	LDH
\bar{x} (DE). Global	1429(337)	3 (1)	227 (50)	119 (27)	719 (88)
Mediana. Global	1348,5	3	221	122	701,5
IC (95%)	1270,6-1586,4	2,7-3,7	203,8-250,9	106,5-131,4	677,6-760,1

Tabla 38.- Constantes enzimáticas obtenidas de la Serie XIV, para n=10.

4.10.3.2. Sustratos metabólicos

La tabla 39 refleja los resultados de la creatinina y urea, expresados en mg/dl, como media aritmética y desviación estándar, \bar{x} (DE), mediana e intervalo de confianza del 95% (IC), con un error $\alpha \leq 0,05$ -95% de confianza-.

Sustratos metabólicos	Creatinina (mg/dl)	Urea (mg/dl)
\bar{x} (DE). Global	0,8 (0,2)	32 (7)
Mediana. Global	0,8	32
IC (95%)	0,65-0,86	28,82-35,07

Tabla 39.- Sustratos metabólicos obtenidos de la Serie XIV, para n=10.

4.10.3.3. Constantes iónicas

Se determinaron los valores de los cationes sodio y potasio en mEq/l.

La tabla 40 recoge los resultados expresados como media aritmética y desviación estándar, \bar{x} (DE), mediana y el intervalo de confianza del 95% (IC), con un error $\alpha \leq 0,05$.

Constantes iónicas	Na ⁺ (mEq/l)	K ⁺ (mEq/l)
\bar{x} (DE). Global	138 (11)	4,5 (0,7)
Mediana. Global	138	0,6
IC (95%)	133,11-143,39	4,12-4,80

Tabla 40.- Constantes iónicas obtenidos de la Serie XIV, para n=10.

4.10.4. ESTUDIO ESTADÍSTICO COMPARATIVO.

El estudio estadístico comparativo se realizó entre las series I, II y XIV, utilizando para ello los valores medios de cada constante bioquímica mediante la t de Student o la U de Mann-Whitney, según el test de normalidad de Shapiro-Wilks según se describe en el punto 3.2.12.5. del método. Para ello se enfrentaron los resultados de la serie I con los de la serie II y los de la serie I con los de la serie XIV.

4.10.4.1. Estudio estadístico comparativo entre las series I y II -Series control y *Sham operation*-.

A) Resultados:

La tabla 41 recoge el estudio estadístico comparativo entre las series I y II. Primeramente y en todos los casos se realizó el test de Shapiro-Wilks, cuya significación o no, definió la prueba estadística de la U-Mann-Whitney o del test de Levene. Además se refleja el valor de p y el grado de significación estadística para un valor de $p \leq 0,05$.

Substratos	Test Shapiro-Wilks	Test- Levene	t- Student	U-Mann- Whitney	p	Grado Significación
CPK	NS	NS	0,56	-	0,589	NS
GGT	S	-	-	155,0	0,231	NS
AST	NS	NS	0,42	-	0,680	NS
ALT	NS	NS	1,35	-	0,187	NS
LDH	NS	NS	0,19	-	0,847	NS
CREA	S	-	-	160	0,288	NS
UREA	S	-	-	147	0,157	NS
Na	S	-	-	168	0,398	NS
K	NS	NS	0,25	-	0,805	NS

Tabla 41. - Estudio estadístico y grado de significación realizados para cada uno de los parámetros hematológicos entre las series I y II. (NS=No significativo).

B) Inferencia estadística:

La comparación estadística entre los resultados medios de los parámetros bioquímicos de las series I y II, no presentó diferencias significativas en ninguna de las constantes, evidenciando la ausencia de diferencias entre los animales de control y los intervenidos pero no expuestos a I/R.

4.10.4.2. Estudio estadístico comparativo entre la serie I -control- y la XIV -serie experimental-.

A) Resultados:

La tabla 42 recoge los resultados del estudio estadístico entre las series I y XIV. El test de Shapiro-Wilks según su significación, permite la prueba estadística de la U-Mann-Whitney o del test de Levene. Se representa también el valor de p y su correspondiente grado de significación estadística para un valor de $p \leq 0,05$.

Substratos	Test Shapiro-Wilks	Test-Levene	t-Student	U-Mann-Whitney	p	Grado Significación
CPK	S	-	-	0	0,000	S
GGT	S	-	-	177	0,547	NS
AST	NS	S	11,56	-	0,000	S
ALT	NS	S	9,52	-	0,000	S
LDH	S	-	-	0	0,000	S
CREA	S	-	-	75	0,001	S
UREA	NS	S	8,90	-	0,000	S
Na	NS	S	1,05	-	0,302	NS
K	NS	NS	2,08	-	0,045	S

Tabla 42.- Estudio estadístico y grado de significación realizados para cada uno de los parámetros hematológicos entre las series I y XIV. S=Significativo, NS= No significativo.

B) Inferencia estadística:

- CPK. Cuando se compararon las medias de CPK de las series I y II -control y *Sham operation*- no se alcanzaron diferencias significativas. El test de Levene para el análisis de la variancia produjo resultados muy homogéneos para ambos casos. En cambio, entre la serie I, control y la serie XIV, experimental, el valor de la U de Mann-Whitney fue muy significativo, pudiendo afirmar que tras 90 minutos de isquemia y 30 minutos de reperfusión los niveles de CPK se elevan muy significativamente.

La figura 31 representa, mediante diagrama de *boxplot*, los valores de la mediana para las tres series. Los valores de los percentiles y el intervalo intercuartílico -IQR- son más pronunciados en la serie experimental -serie XIV- que en las series I y II, en las que la distribución es muy próxima a la normal.

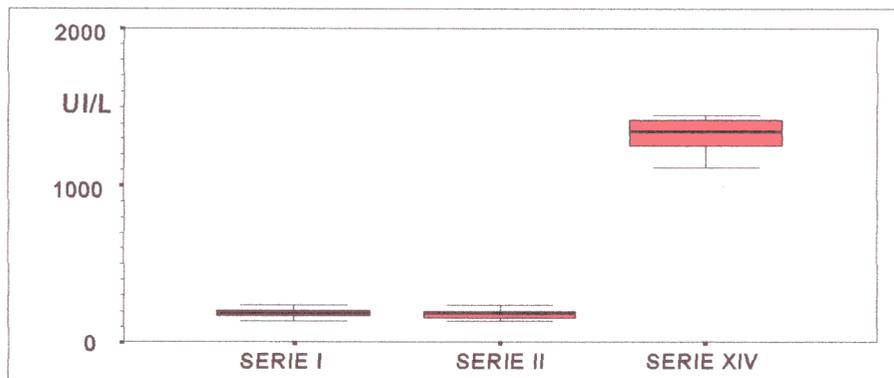


Figura 31.- Niveles de la CPK en cada una de las series, expresadas en UI/L.

• **Transaminasas.** Tanto los valores de ALT como de AST no muestran diferencias significativas entre las series I y II -control y *Sham operation*-. En cambio, entre la serie control y la serie experimental se observan diferencias significativas por aumento de los valores de ambas enzimas en la serie experimental -serie XIV- cuando se comparan mediante la t de Student, puesto que el test de Shapiro-Wilks no presentó diferencias significativas.

En las figuras 32 y 33 se representan mediante diagrama *boxplot*, los valores de la mediana -expresada en UI/l- para la AST y para la ALT y para cada una de las tres series.

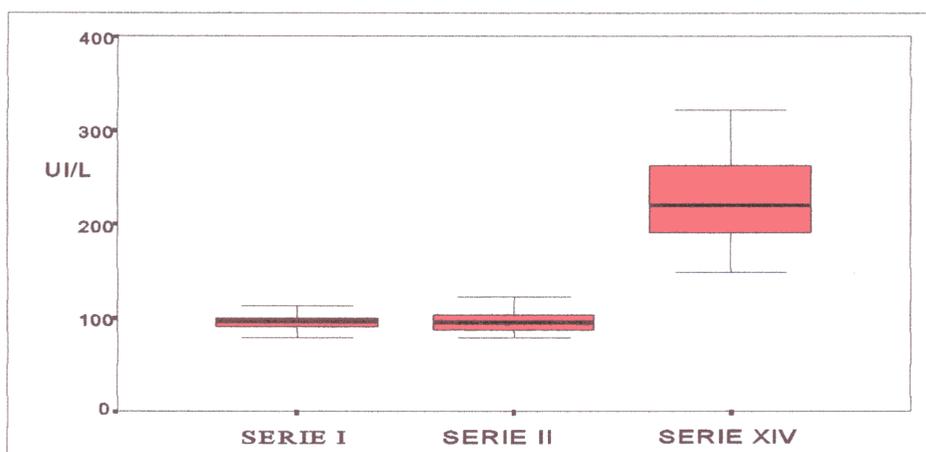


Figura 32.- Valores de la mediana de la AST para cada una de las series.

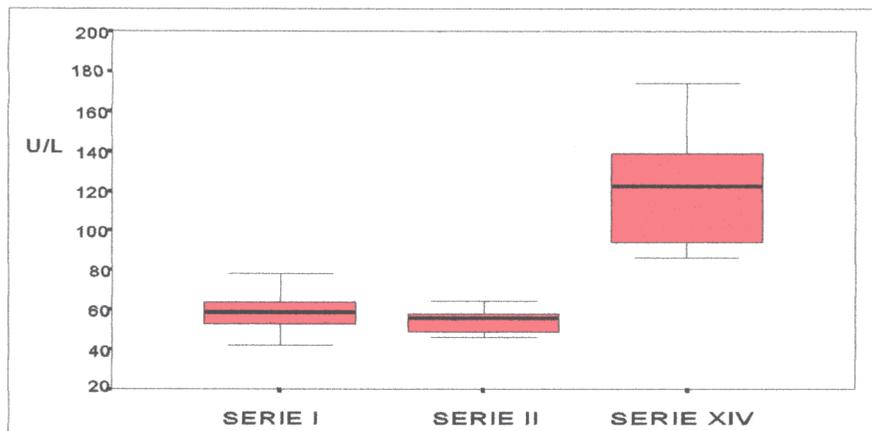


Figura 33.- Valores de la mediana de la ALT para cada una de las series.

Se observa la proximidad de los valores para las series I y II -control y *Sham operation*-, mientras que en la serie XIV -experimental- aparecen significativamente elevados. El intervalo intercuartílico es notablemente más amplio en el caso de la serie experimental, lo que indica una mayor amplitud en el rango de resultados. En cambio en las series I y II, los valores son más homogéneos y las distribuciones se aproximan mucho a la normal.

- LDH. No hubo diferencias significativas entre las series I y II. Entre las series I ,control y XIV, serie isquémica, aparecieron diferencias muy significativas, valoradas mediante la U de Mann-Whitney puesto que aparecen diferencias significativas cuando se valoran por el test de Shapiro-Wilks.

La figura 34 muestra mediante diagrama *boxplot* los valores de la mediana para la LDH para las tres series, expresados en UI/l. En la figura se observa como el intervalo intercuartílico es semejante en las tres series, indicando resultados poco dispares. La variación entre las series I y II con respecto a los resultados de la serie XIV se explican por el proceso de I/R.

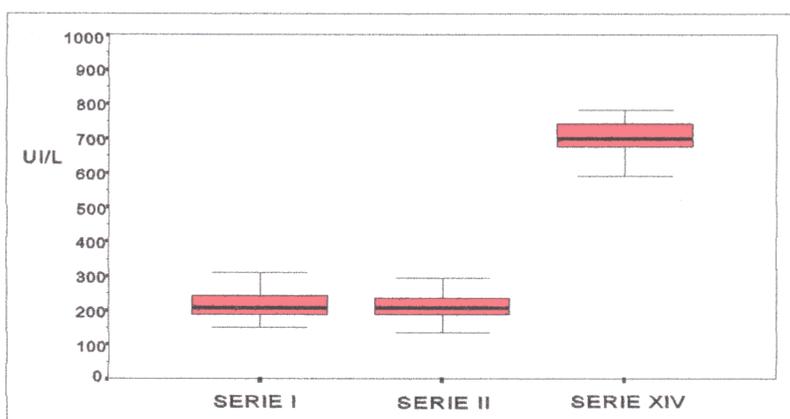


Figura 34.- Representación de los valores de la mediana de la LDH para cada una de las series.

• GGT.- La GGT fue la única enzima que no mostró diferencias significativas entre los individuos de las tres series; fue valorada mediante la U de Mann-Whitney puesto que el test de Shapiro-Wilks resultó significativo. En la figura 35 se representan mediante diagrama *boxplot* los valores de la mediana para cada serie. Se observa como para los tres casos se presenta una media muy similar, presentando las mayores diferencias en los valores inferiores .

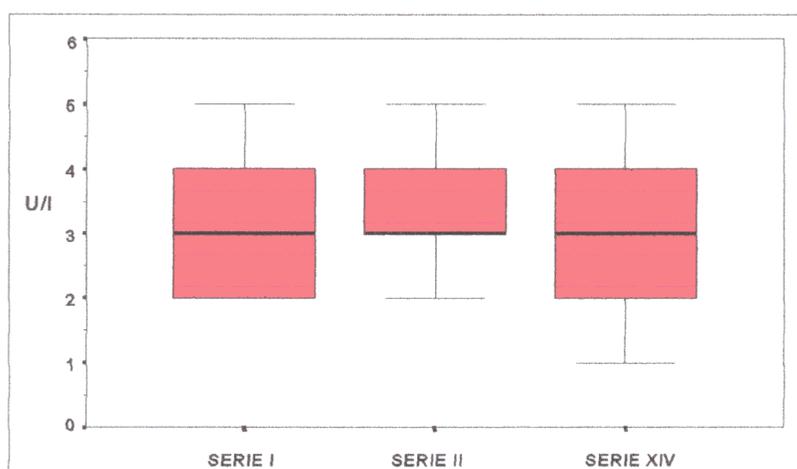


Figura 35.- Representación de los valores de la mediana de la GGT para cada una de las series experimentales.

• Sustratos metabólicos. Al valorar la urea y la creatinina no hubo diferencias significativas entre las series I y II -control y *Sham operation*-, en cambio sí las hubo entre la serie I y la serie XIV. Los resultados de la creatinina vulneraron el supuesto de normalidad exigido por el test de Shapiro-Wilks, por lo tanto la comparación estadística para la creatinina se realizó mediante la U de Mann-Whitney y mediante la t de Student en el caso de la urea.

- Creatinina. En la figura 36 se representan los resultados mediante diagrama *boxplot* de los valores de la mediana. Se observa un incremento en la concentración -expresada en mg/dl- tras el período de I/R. El intervalo intercuartílico se hace notablemente ancho, indicando una variabilidad importante en los resultados especialmente en los de la serie experimental -serie XIV-.

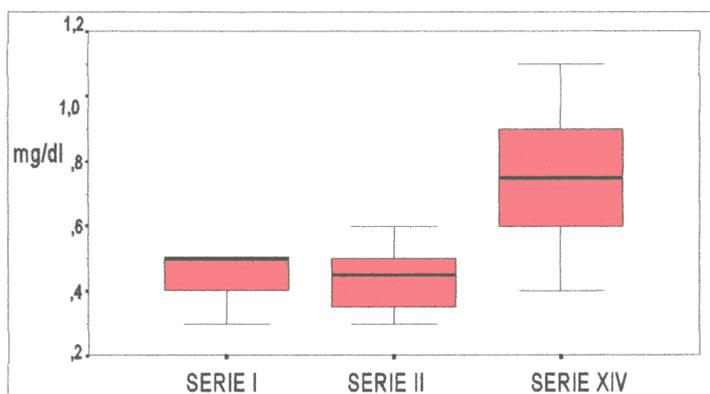


Figura 36.- Representación de los valores de la creatinina para cada una de las series.

- Urea. El diagrama de *boxplot* de la figura 37 representa los niveles de urea en mg/l. Se observa un descenso de los niveles de urea en la serie experimental -serie XIV-. Las tres series muestran un intervalo intercuartílico -IQR- amplio indicando la variabilidad de los resultados para las tres series. Esto implica una importante inespecificidad de los resultados de la urea.

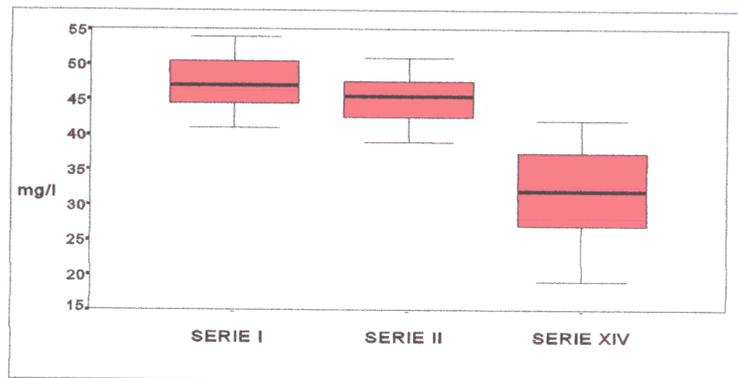


Figura 37.- Representación de los valores de la mediana de la urea para cada una de las series.

• Constantes iónicas. Los valores del sodio y del potasio, no vulneran el supuesto de normalidad de Shapiro-Wilks, por lo que las comparaciones de las medias, en ambos casos se realizaron mediante la t de Student. Para el sodio no aparecieron diferencias significativas entre la serie I -control- con la serie II -*Sham operation*-, ni entre la serie I y la XIV.

Para el potasio no hubo diferencias significativas entre la serie I y la II pero si entre los animales de la serie control y los de la serie experimental, obteniéndose un valor de p de 0,045, valorado mediante la t de Student.

En las figuras 38 y 39 se representan, mediante diagrama de *boxplot*, los valores de la mediana para el sodio y el potasio respectivamente, medidos en meq/l.

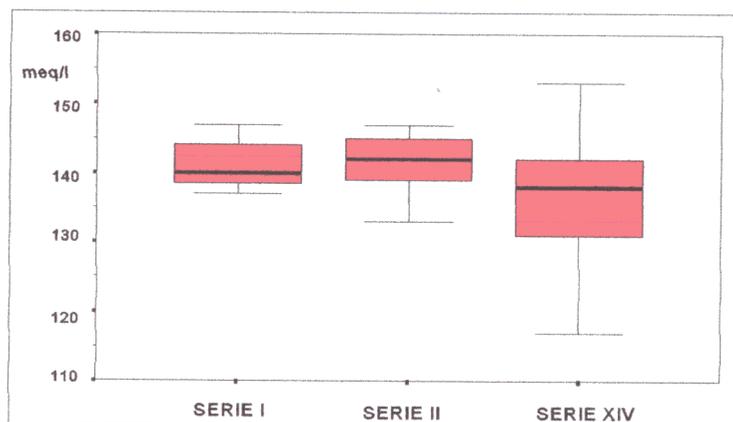


Figura 38.- Representación de los valores de la mediana del sodio para cada una de las series.

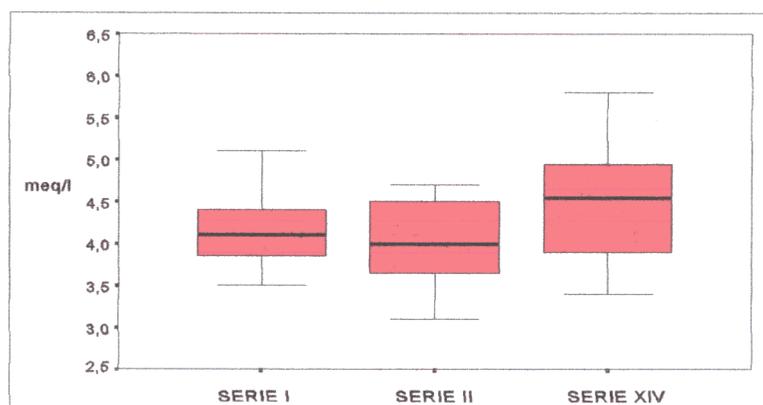


Figura 39.- Representación de los valores de la mediana del potasio para cada una de las series.

En resumen:

- Enzimas. La GGT no sufrió cambios significativos, mientras que la CPK, AST, ALT y LDH se elevaron significativamente, si bien ambos tipos de transaminasas mostraron una amplia variabilidad.

- Metabolitos. La creatinina aumentó y la urea bajó, ambas de manera significativa, aunque con gran variabilidad en los resultados.

- Iones. El sodio no sufrió cambios significativos y el potasio aumentó aunque de modo muy variable y en el límite de la significación estadística.

4.11. ESTUDIO COMPARATIVO DE SUPERVIVENCIA ENTRE INDIVIDUOS TRATADOS CON SUSTANCIA PLACEBO O CON SOD.

En el apartado 3.2.8. del método se hace referencia a las series utilizadas, así como al método de aplicación del tratamiento con SOD o con sustancia placebo.

Al ser diferentes los tiempos de isquemia a que se sometió a machos y hembras, todos los resultados se compararon en función del sexo.

4.11.1. MACHOS.

A) Resultados e inferencia estadística:

Los resultados de los animales supervivientes de las series VIII y X se exponen en la tabla 43. Se observa un aumento de la supervivencia en los individuos tratados con SOD con respecto a los tratados con placebo -solución salina-.

La tabla 44 muestra el estudio estadístico mediante el estimador χ^2 , comparando las dos series que participan en el estudio. El aumento de la supervivencia en animales tratados con enzima antioxidante no resultó significativo, según las condiciones del presente estudio, respecto a los animales tratados con placebo.

INTERVALO DE TIEMPO	N° DE ANIMALES SUPERVIVIENTES		
	DÍAS	SERIE VIII	SERIE X
	0-0,5	9	10
	0,5-1	7	10
	1-1,5	7	10
	1,5-2	7	10
	2-63	7	10

Tabla 43.- Animales machos supervivientes durante los 63 días de observación para cada una de las series experimentales.

SERIES	χ^2 DE PEARSON	GRADOS DE LIBERTAD	p	SIGNIFICACIÓN ESTADÍSTICA
VIII-X	3,528	1	0,0603	NS

Tabla 44.- Estudio mediante el estimador estadístico χ^2 de Pearson, y su significación estadística de la comparación de las series VIII y X.

La tabla 45 muestra el estudio de supervivencia acumulada y la función de riesgo para las dos series durante las 9 semanas de observación. Se comprueba como la serie X, tratada con

SOD, presenta una función de riesgo 0, -la probabilidad de que un individuo muera en las mismas condiciones es nula-, mientras que en el caso de la serie VIII, animales tratados con solución salina, presenta una función de riesgo de 0,35 en el primer período de tiempo que abarca desde el momento de la reperfusión hasta el primer día. Estos resultados ponen de manifiesto, una vez más que la función de riesgo se concentra en torno a las primeras horas de la revascularización.

SERIES	INTERVALOS	SUPERVIVENCIA	FUNCIÓN DE
	Días	ACUMULADA	RIESGO
VIII	0-1	0,7	0,352
	1-63	0,7	0
X	0-63	1	0

Tabla 45.- Tasas de supervivencia y de riesgo obtenidos mediante el método actuarial. Se expresa la probabilidad para cada intervalo.

C) Representación gráfica.-

En la figura 40 se representa mediante diagrama de barras apiladas, los porcentajes de supervivencia y mortalidad para las series VIII y X.

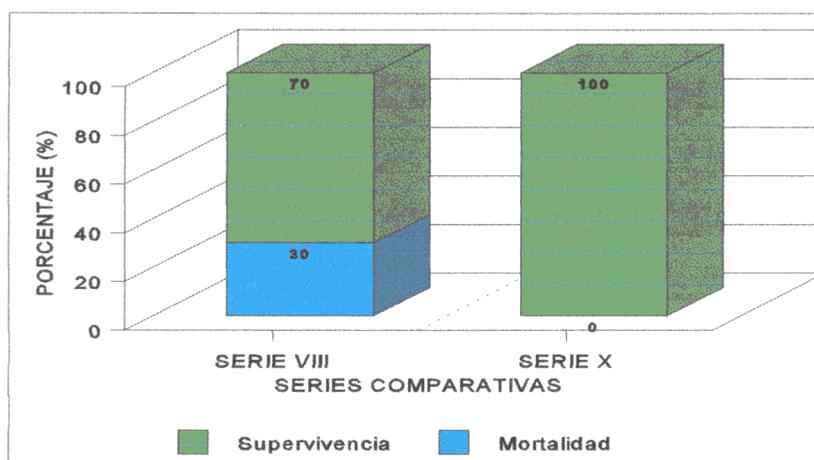


Figura 40.- Representación mediante diagrama de barras apiladas de los porcentajes de supervivencia de las series VIII y X, tras 9 semanas de observación.

En la serie X, el porcentaje de supervivencia fue del 100% al final de las 9 semanas de observación; en cambio, en el caso de la serie VIII, esta supervivencia fue del 70%, manteniéndose un 30% de mortalidad representado en la parte inferior de la barra. La suma de ambas tasas -mortalidad y supervivencia- constituyen la barra -100% de los casos-. Los animales sometidos a las mismas condiciones experimentales de tratamiento quirúrgico y tiempo de isquemia, pero con distinto tratamiento farmacológico presentaron diferentes tasas de supervivencia, a favor de los que fueron tratados con SOD, lo que implica un efecto terapéutico de dicha enzima.

4.11.2. HEMBRAS.

Para el estudio del tratamiento con SOD en hembras se siguió la metodología descrita en el apartado 3.2.8.

A) Resultados e inferencia estadística.-

La tabla 46 recoge el número de animales que sobrevivieron tras 9 semanas de observación. Al igual que en el caso de los machos, la mortalidad se agrupa en torno a las 60 primeras horas tras la reperusión. Se comprueba un ligero descenso de la mortalidad en la serie XI -animales tratados con SOD-, con respecto a los animales de la serie IX, -tratados con solución salina-.

INTERVALO DE TIEMPO	Nº DE ANIMALES SUPERVIVIENTES		
	DÍAS	SERIE IX	SERIE XI
	0-0,5	8	9
	0,5-1	6	8
	1-1,5	5	8
	1,5-2	4	8
	2-63	4	8

Tabla 46.- Animales hembras, supervivientes a lo largo de los intervalos de observación, para cada una de las dos series experimentales.

En la tabla 47 se presentan los resultados de la comparación estadística de las dos series

mediante el estimador estadístico de χ^2 de Pearson. Como en el caso de los machos -apartado 4.11.1.-, existe un aumento de la supervivencia en los animales a los que se les aplicó tratamiento con SOD, aunque no fue estadísticamente significativo.

SERIES	χ^2 DE PEARSON	GRADOS DE LIBERTAD	p	SIGNIFICACIÓN ESTADÍSTICA
IX-XI	0,952	1	0,329	NS

Tabla 47.- Estudio mediante el estimador estadístico χ^2 de Pearson, y su significación estadística de la comparación de las dos series del experimento.

La tabla 48 muestra los resultados de la supervivencia acumulada y de la función de riesgo para las dos series experimentales. Al igual que para los machos, existe una función de riesgo tras las primeras horas posteriores a la reperusión, después de las cuales, la probabilidad de morir se hace nula.

SERIES	INTERVALOS	SUPERVIVENCIA	FUNCIÓN DE
	Días	ACUMULADA	RIESGO
IX	0-1	0,6	0,500
	1-2	0,4	0,400
	2-63	0,4	0
XI	0-1	0,8	0,222
	1-63	0,8	0

Tabla 48.- Tasas de supervivencia y de riesgo obtenidos mediante el método actuarial. Se expresa la probabilidad para cada intervalo.

C) Representación gráfica.-

La figura 41 muestra mediante diagrama de barras apiladas, la supervivencia y la mortalidad de las dos series tras 9 semanas de observación, poniéndose de manifiesto un

aumento de la supervivencia para el mismo tiempo de observación en los animales tratados con enzima antioxidante. En cada barra se muestra la tasa de supervivencia y de mortalidad, expresada en tantos por ciento, mientras que el eje representa el porcentaje global de supervivencia. Cada una de las barras equivale a la totalidad de los individuos de una serie.

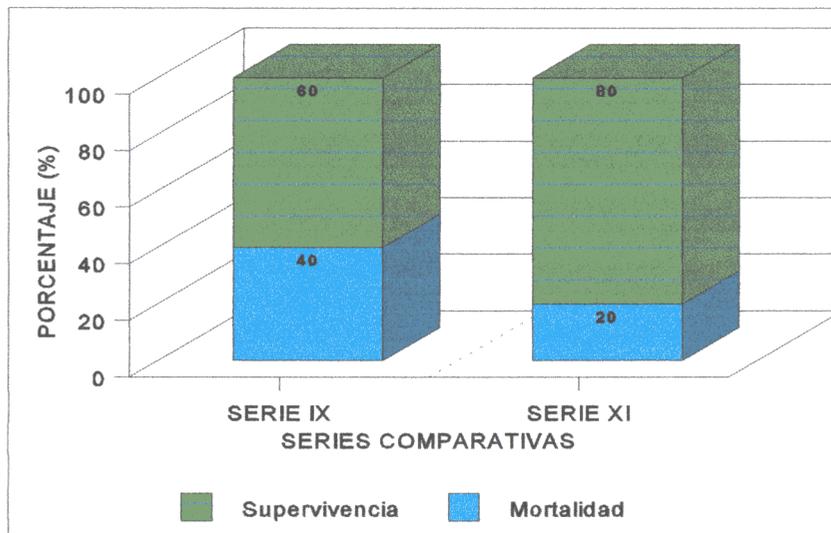


Figura 41.- Representación mediante diagrama de barras apiladas de los porcentajes de supervivencia de las series IX y XI tras 9 semanas de observación.

4.12. RESULTADOS DEL ESTUDIO MICROSCÓPICO EN LAS SERIES VIII, IX Y XI.

Únicamente se realizó el estudio microscópico de las muestras orgánicas de aquellos animales de las series VII, IX y XI que fallecieron espontáneamente a consecuencia del proceso isquémico. No se realizó a los animales que sobrevivieron a las 9 semanas de observación, por lo que no aparecen resultados referentes a la serie X, puesto que ninguno falleció a causa de la isquemia y todos fueron sacrificados.

4.12.1. SERIE VIII, 10 machos sometidos a 90 minutos de isquemia y tratamiento con solución salina.

En la serie VIII, fallecieron tres animales -30%- y siete -70%- sobrevivieron hasta el sacrificio a las 9 semanas.

- Hígado. De los tres fallecidos, tan sólo uno -34%- presentó congestión vascular.
- Riñones. Un animal presentó congestión vascular simple, y dos sin alteraciones valorables.
- Pulmones. Los tres animales fallecidos -100%- presentaron congestión vascular severa y uno además presentó hemorragia pulmonar.
- Páncreas. Sin alteraciones valorables en ningún caso.
- Ganglios linfáticos mesentéricos. Sin alteraciones valorables en ningún caso.
- AMC. Debido al corto tiempo transcurrido entre la reperfusión y la muerte, no aparecieron adherencias grasas en ningún caso. La arteria se mostró permeable en todos los casos, y sin lesiones parietales.
- Yeyuno. Las lesiones fueron similares en los tres animales con denudación y pérdida de vellosidades, necrosis transmural intensa con mayor afectación del borde antimesentérico, y afectación de capas musculares y de ganglios nerviosos mioentéricos.
- Íleon. Lesiones similares a las del yeyuno.
- Colon. Uno de los animales presentó congestión aguda y necrosis de la mucosa, mientras que dos -66,7%- mostraron lesiones moderadas con pérdida parcial del epitelio de revestimiento superficial.

4.12.2. SERIE IX, 10 hembras sometidas a 60 minutos de isquemia y 30 minutos de reperfusión, tratadas con solución salina.

En la serie IX fallecieron cuatro animales y seis sobrevivieron hasta el sacrificio a las 9 semanas

- Hígado. Sin alteraciones valorables en ningún caso.

- Riñones. Sin alteraciones valorables en ninguno de los animales
- Pulmones. Los cuatro animales -100%- fallecidos presentaron congestión vascular aguda.
- Páncreas. Sin alteraciones valorables en ningún caso.
- Ganglios linfáticos mesentéricos. Sin alteraciones valorables en ningún caso.
- AMC. Debido al corto tiempo transcurrido entre la reperusión y la muerte, no aparecieron adherencias grasas en ninguno de los cuatro casos. La arteria se mostró siempre totalmente permeable, y sin lesiones parietales.

• Yeyuno. Macroscópicamente todos presentaron congestión severa. Microscópicamente lesiones epiteliales severas con pérdida del epitelio vellositario y glándulas de la lámina propia. Las lesiones fueron muy similares a las de los animales fallecidos de la serie IV.

- Íleon. Lesiones similares a las del yeyuno.
- Colon. Alteraciones epiteliales leves en todos los casos, sin alcanzar inviabilidad manifiesta.

4.12.3. SERIE XI, 10 hembras sometidas a 60 minutos de isquemia y 30 minutos de reperusión, tratadas con SOD.

En la serie XI murieron dos animales y sobrevivieron ocho durante las 9 semanas posteriores, hasta el momento del sacrificio.

- Hígado. Sin alteraciones valorables en ninguno de los animales.
- Riñones. Sin alteraciones valorables.
- Pulmones. Congestión vascular en ambos casos.
- Páncreas. Sin alteraciones valorables en ningún caso.
- Ganglios linfáticos mesentéricos. Sin alteraciones valorables en ningún caso.
- AMC. Debido al corto tiempo transcurrido entre la reperusión y la muerte, no aparecieron adherencias grasas en ninguno de los casos. La arteria se mostró permeable en todos los casos, y sin lesiones parietales.

4. RESULTADOS

- Yeyuno. Congestión vascular con necrosis vellositaria y denudación del epitelio de revestimiento de revestimiento. Hemorragias en sábana en la mucosa en ambos casos.
- Íleon. Lesiones similares a las del yeyuno.
- Colon. Únicamente uno de los animales mostró necrosis transmural, mientras que en el otro no aparecieron alteraciones valorables.

4.12.4. RESULTADOS COMPARATIVOS EN ELGRUPO DE TRATAMIENTO.

Los resultados expuestos en la tabla 49 muestran que los porcentajes de las lesiones son parecidos en animales a los que se les administró placebo -series VIII y X- y los tratados con SOD. También se aprecia que los animales fallecidos, además de presentar lesiones a nivel intestinal, muestran alteraciones especialmente en pulmón.

Los animales de la serie X -machos tratados con SOD-, sobreviven todos al proceso isquémico, a diferencia de lo que sucedió con la serie XI -hembras tratadas con SOD-, donde se presentó un 20% de mortalidad.

SERIES EXPERIMENTALES			
TEJIDO	VIII	IX	XI
Hígado	1(34%)	0(0%)	0(0%)
Riñones	1(34%)	0(0%)	0(0%)
Pulmones	3(100%)	4(100%)	2(100%)
Páncreas	0(0%)	0(0%)	0(0%)
AMC	0(0%)	0(0%)	0(0%)
Ganglios	0(0%)	0(0%)	0(0%)
Yeyuno	3(100%)	4(100%)	2(100%)
Íleon	3(100%)	4(100%)	2(100%)
Colon	3(100%)	4(100%)	1(50%)

Tabla 49.- Número de animales, con los porcentajes relativos, de los grupos de fallecidos de cada serie, en los que aparecen lesiones histológicas para cada uno de los órganos estudiados.

4.13. CONCENTRACIÓN DE MDA EN INTESTINO. TEST DEL TBA.

A) Curva patrón

Las concentraciones de MDA se determinaron mediante el test del TBA según se ha descrito en el apartado 3.2.10.1. del método. Se determinó, en primer lugar, la curva patrón, haciendo diluciones seriadas 1:1, y partiendo de concentraciones conocidas de MDA. Cada punto representado en la figura 42 corresponde a la densidad óptica -absorbancia a 535 nm- obtenida para cada concentración de MDA. Con estos puntos se construye la recta de regresión y se define, mediante el coeficiente de regresión, el grado con el que dicha recta representa a la mencionada nube de puntos -grado de asociación lineal-. En la misma figura se muestra la ecuación de la recta y el coeficiente de determinación lineal, cuyo valor R^2 es igual a 0,987, significa que el 98,7% de la variación total de las absorbancias es explicado por la recta de regresión.

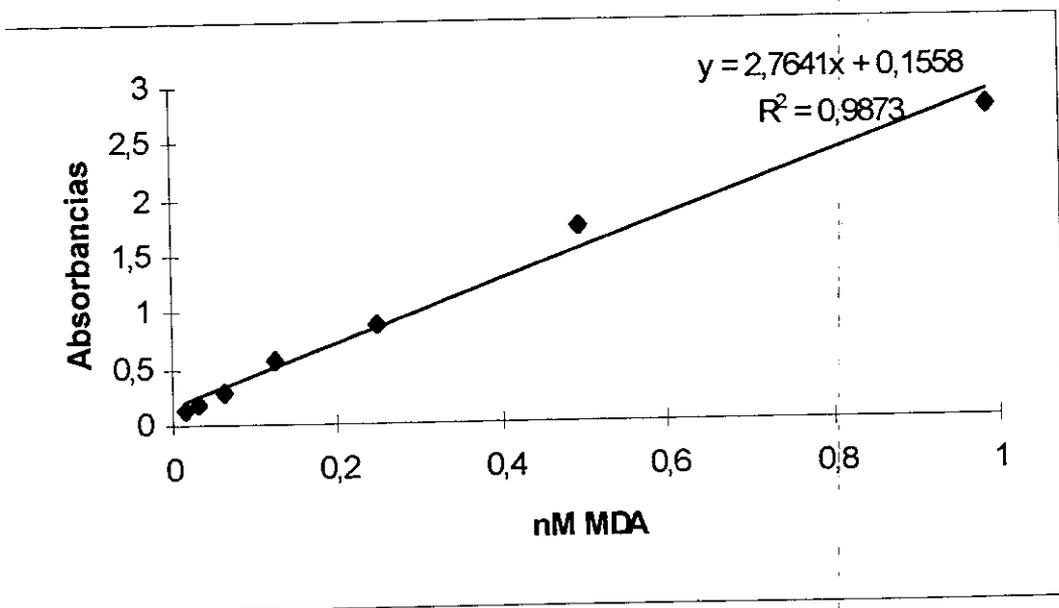


Figura 42.- Recta de regresión de la curva patrón.

B) Determinación de MDA en intestino.

Las concentraciones de MDA se valoraron mediante la técnica *in vitro* del test del TBA utilizando los animales de las series XII, XIII y XIV, correspondientes a un grupo de control -serie XII- en el que no se les realizó proceso isquémico, otro grupo sometidos a 30 minutos de reperusión con tratamiento de SOD -serie XIII- según apartado 3.2.8. de la metodología y un

tercer grupo sometido a isquemia reperfusión -serie XIV-, según se explica en el punto 3.4.1. para la cuantificación de MDA libre. Con la densidad óptica de cada muestra intestinal sometida al test del TBA, se calcularon las concentraciones de MDA con la ecuación de la recta patrón, efectuando las correcciones debidas a las diluciones.

C) Cálculos.

La relación existente entre los valores de las absorbancias y la concentración de MDA en nM viene definida por la fórmula:

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

- $\text{DO}_{535\text{ nm}}$, el valor de cada una de las absorbancias, obtenidas de la lectura del espectrofotómetro.

- a, el valor del punto de la ordenada en el origen. En la recta, $a=0,1558$.

- b, el valor de la pendiente de la recta. En la recta, $b=2,764$.

D) Estudio estadístico.

Mediante esta técnica no se pueden determinar las concentraciones de MDA cuya lectura en absorbancias sea menor o igual al coeficiente a de la ecuación de la recta de regresión - $a=0,1558$ -, de manera que las concentraciones de MDA en los animales de la serie XII -que se utilizó como control en este estudio- y en los de la serie XIII -tratada con SOD- figuran como indetectables.

Los resultados no vulneran el supuesto de normalidad -test de Shapiro-Wilks $p=0,43$ -, sin embargo se aprecia una ligera asimetría en el diagrama de *boxplot* -figura 43-, con una mediana de 4,15 nM MDA/g de tejido, cuando la media aritmética es de 4,51 nM MDA/g de tejido.

Dado el número de casos empleados, y la asimetría de la distribución de datos, es más adecuado el empleo del IQR como medida de dispersión, que corresponde al intervalo comprendido entre los 3,571 y los 5,535 nM MDA/g de tejido en el cual se encuentran el 50% de los datos, mientras que el 100% de los individuos está contenido entre 2,44 nM MDA /g. de tejido y 7,35 nM MDA/ g de tejido intestinal, no encontrándose por ningún extremo valores adyacentes.

SERIE XII		SERIE XIII		SERIE XIV	
Absorbancia	nM MDA	Absorbancia	nM MDA	Absorbancia	nM MDA
0,011	Indetectable	0,043	Indetectable	0,207	2,646
0,066	Indetectable	0,027	Indetectable	0,290	6,936
0,026	Indetectable	0,085	Indetectable	0,234	4,042
0,097	Indetectable	0,065	Indetectable	0,263	5,541
0,037	Indetectable	0,048	Indetectable	0,237	4,197
0,071	Indetectable	0,080	Indetectable	0,203	2,439
0,082	Indetectable	0,036	Indetectable	0,298	7,350
0,049	Indetectable	0,121	Indetectable	0,225	3,577
0,015	Indetectable	0,089	Indetectable	0,232	3,938
0,044	Indetectable	0,047	Indetectable	0,243	4,507

Tabla 50. Valores de las absorbancias y concentración de MDA por gramo de tejido, para cada uno de los grupos de la muestra.

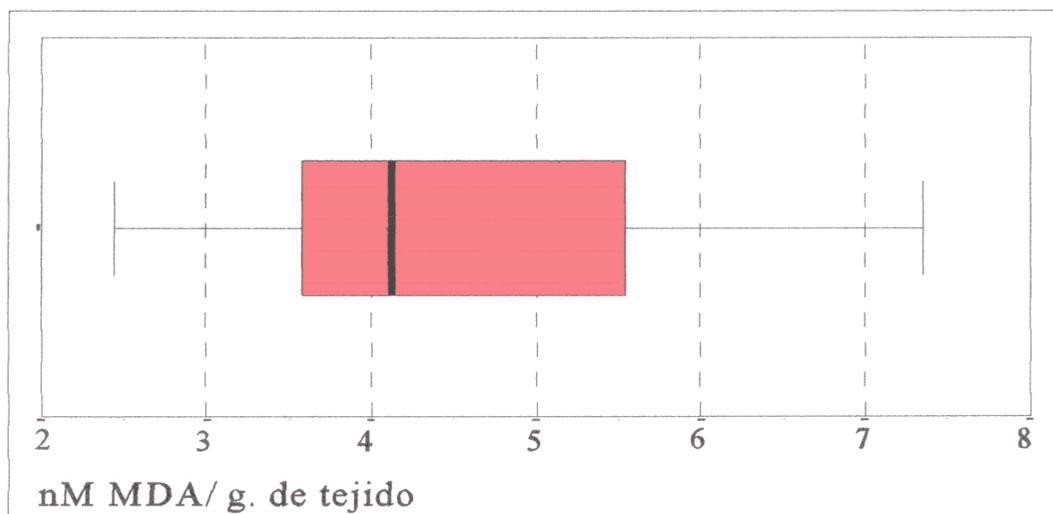


Figura 43.- Representación mediante diagrama *boxplot* del valor de la mediana para la concentración de MDA, en la serie XIV -serie experimental de I/R-.

5. DISCUSIÓN

5.1. CURVA DE SUPERVIVENCIA.

5.1.1. TASAS DE SUPERVIVENCIA. RELACIÓN CON EL TIEMPO DE ISQUEMIA.

Las consecuencias, tras un proceso de I/R de la AMC quedan evidenciadas en el estudio de supervivencia, en que se sometió a ratas de ambos sexos a diferentes tiempos de isquemia. En el punto 4.1., se observa que el índice de supervivencia de las series se va reduciendo a medida que se prolonga el tiempo de isquemia. Con tiempos de 15 minutos la supervivencia se mantuvo en el 100%; después de 60 minutos se obtuvo una mortalidad aproximada del 50%; y el 100% de mortalidad se consiguió a los 180 minutos de isquemia, comprobándose una tendencia clara de aumento de la mortalidad a medida que se prolongaba la isquemia.

El estudio estadístico de la supervivencia, mediante el método de χ^2 pone de manifiesto el papel primordial del factor pues constituye una variable muy determinante en el estudio de la evolución de la supervivencia. Se encontraron diferencias significativas de supervivencia entre la serie II y las series V, VI y VII; en cambio los resultados no fueron significativos al comparar la serie II con las series III y IV. Al estudiar los resultados de las tasas de supervivencia obtenidos en las diferentes series, se comprueba que es el tiempo el que rige los niveles de supervivencia; en efecto, cuando se prolongan los períodos de isquemia los índices de supervivencia disminuyen paulatinamente. El tiempo, a la vez que modifica la supervivencia, es responsables de las lesiones histológicas que se producen. En las series de tiempo de isquemia más prolongado se observaron tasas más altas de mortalidad, y también se pudo comprobar un aumento importante en la gravedad de las lesiones, tanto macroscópicas como microscópicas, según se refleja en los puntos 4.7 y 4.9.

En la bibliografía consultada, y en relación con la implicación del tiempo de isquemia en la mortalidad, solo se han encontrado dos trabajos en los que se hace un seguimiento de la evolución de la isquemia en diferentes tiempos. En el primero, realizado en conejos, los autores hallaron una relación directa entre el tiempo de oclusión mesentérica, la gravedad de las lesiones y el aumento de la mortalidad¹¹². Carnés *et al.*¹³ publicaron, en 1997, el perfil de la

supervivencia para cuatro períodos de tiempo diferentes de isquemia en ratas, encontrando significación estadística de la mortalidad, al compararlos con animales pertenecientes a la serie *Sham*. Martínez *et al.*³⁶ encontraron, en clínica humana que los porcentajes de fallecimientos se incrementaban progresivamente al aumentar el tiempo de isquemia, observando que los porcentajes alcanzados eran máximos tras 60 horas de isquemia y que, transcurrido este tiempo, descendían bruscamente hasta niveles inferiores al 4%.

No existe un consenso claro cuando se habla de porcentajes de muerte con respecto a un determinado tiempo de oclusión. Fernández, Martínez y Vega⁹¹ sometieron a ratas hembras control a pinzamiento temporal de la AMC durante 30 minutos, obteniendo una mortalidad del 93% a las 24 horas de la retirada del clamp, mientras que Sun, Farias y Markov⁸² obtuvieron una mortalidad del 43% a las 48 horas en ratas macho con 30 minutos de isquemia. Boyd *et al.*¹¹⁴, sometieron a hamsters a 30 minutos de isquemia mesentérica obteniendo una supervivencia del 25%. Sawchuck *et al.*⁸⁰ sometieron a ratas macho a 90 minutos de pinzamiento arterial, obteniendo unos resultados del 15% de supervivencia tras 48 horas de repermeabilización. Ben-Dahan *et al.*⁹² prolongaron el tiempo de oclusión vascular y pinzaron la arteria mesentérica a ratas durante 120 minutos encontrando una mortalidad del 34% tras 24 horas de observación; resultados parecidos fueron los de Boornstein, Dacey y Cronenwett⁸¹, quienes, utilizando ratas, obtuvieron una mortalidad del 24% a las 48 horas de la revascularización, para el mismo tiempo de isquemia.

Considerando estos trabajos se advierte que no está determinada una tasa letal media aproximada. Se observa que los autores obtienen diferentes porcentajes de supervivencia para diferentes tiempos de IMA. Puede ser significativo, en algunos casos, las grandes diferencias de mortalidad señaladas por distintos autores, que emplean los mismos animales. Así, mientras que Fernández, Martínez y Vega encuentran una tasa de supervivencia de sólo el 7%, Sun, Farias y Markov, tras el doble de tiempo de observación, encuentran un porcentaje que se aproxima el 60%, resultados similares a los obtenidos en el presente trabajo, donde se aprecia, sin distinción de sexos, que la supervivencia es del 85%. Si bien existe un desacuerdo patente entre los autores sobre la relación tiempo de isquemia-supervivencia, todos comparten la idea de que existe un incremento de la mortalidad cuanto mayor es el tiempo de anoxia intestinal.

No hay acuerdo claro en relación con el tiempo de isquemia aproximado que se ha de aplicar para experimentar el efecto de algún tratamiento y, además existen tratamientos aplicados

durante un amplio espectro de tiempo. Debido a estas discrepancias entre los porcentajes de mortalidad y la tasa media de letalidad, se decidió realizar una curva de supervivencia que se aproximase a las condiciones estándar, con animales en edad adulta, de peso homogéneo y diferenciando el sexo, con el fin de interpretar la respuesta de ambos grupos de animales. Los tiempos se escogieron en función de los resultados y de las tasas de mortalidad descritas en la literatura, extrapolarlo estadísticamente los valores extremos de letalidad 0 y letalidad 100.

Sobre las lesiones histológicas, existen numerosos trabajos que demuestran la relación directa de las lesiones con el tiempo de isquemia. Con los resultados del presente estudio, se definió la curva de mortalidad de los animales sometidos a diferentes tiempos de isquemia, en la que se pone de manifiesto, simplemente observando las tasas de supervivencia de cada serie, cómo el tiempo de ausencia de riego determina ciertos niveles de mortalidad.

En el presente trabajo experimental se definen las tasas de muerte, desde el tiempo mínimo en que un grupo de animales soporta una isquemia intestinal sin existir mortalidad, esto es, el tiempo de ausencia de riego intestinal en el que las lesiones que se producen son compatibles con la vida y pueden ser revertidas mediante los sistemas reparadores del organismo, hasta el tiempo máximo de isquemia, en el que los animales sufren lesiones irreversibles que les conducen a la muerte. Esta precisión de ambos extremos, así como las tasas medias de letalidad, pueden ser importantes para la aplicación de tratamientos y para conocer el grado de la lesión que padece el individuo.

En la bibliografía revisada no se ha encontrado ningún trabajo en el que los autores escogiesen, como método de comparación estadística, el método actuarial. En el presente trabajo se eligió, porque el número de animales por serie era suficiente para dicho método y además porque se consideró importante calcular las tasa de riesgo en cada período.

El cálculo de las probabilidades de supervivencia, demostró estadísticamente la implicación del tiempo de isquemia en las esperanzas de supervivencia, observándose un aumento progresivo de las funciones de riesgo, en cada serie, al comenzar la repermeabilización. En las series de control -series I y II-, como era de esperar, la función de riesgo de muerte se mantuvo nula, al igual que en la serie III, conservándose así hasta el final de la experiencia. En las series IV, V, VI y VII, la frecuencia fue aumentando progresivamente obteniéndose valores de 0,10, 0,3, 0,42 y 1 respectivamente, dependiendo únicamente de la variable "tiempo de

isquemia”.

Igualmente se pudo establecer una relación clara entre el tiempo y el grado de las lesiones, que será abordada más adelante.

5.1.2. CAUSAS DE LA MORTALIDAD.

De la bibliografía revisada se deduce que son varios los factores que pueden explicar las lesiones isquémicas. Desde que en 1980 se implicó a los RL como agentes causantes de las lesiones tisulares y de su responsabilidad en la mortalidad de los individuos, han sido numerosos los trabajos desarrollados para conocer el funcionamiento bioquímico y fisiológico de estas moléculas de alta inestabilidad. Hoy está bien documentado que las lesiones producidas por la isquemia se agravan durante la revascularización, precisamente por la acción destructora de los RL¹¹⁵.

Desde hace años numerosos autores apoyan la teoría de que los RL son los agentes primordiales en la producción de las lesiones isquémicas^{116, 117, 118, 119}; otros sostienen que las lesiones más graves se producen por la propia destrucción celular del tejido durante la isquemia^{120,121}; algunos basan su teoría en la acción desmesurada de las células polimorfonucleares tras la revascularización^{122, 123}; por último, un cuarto grupo, basa las altas tasas de mortalidad en la sepsis generalizada que acompaña al ambiente anaerobio^{124, 125}. Creemos que todos y cada uno de estos hechos ayudan a comprender mejor el proceso isquémico.

Los RL constituyen un pilar importante en el estudio de los procesos de I/R, y su neutralización es uno de los principales desafíos para disminuir las lesiones isquémicas. Se mantiene que juegan un papel primordial en el agravamiento de las lesiones debido a las peculiaridades que presentan y a la facilidad con que se generan. Los RL son, posiblemente, los agentes menos sujetos a control desde el momento en el que se inicia la manipulación del animal. Gil *et al.*¹²⁶ describieron la lipoperoxidación de las membranas con tres procederes anestésicos, lo que aporta una idea sobre la actuación de los RL. Si durante el desarrollo del proceso isquémico y la posterior revascularización, se produce una explosión de la producción de estas sustancias, es lógico pensar que su implicación en las lesiones sea de considerable importancia. No obstante, la principal duda surge cuando se valora su actividad y si potencialmente son

capaces de provocar la muerte a un individuo isquémico por sí solos.

Ciertamente la acción de los RL es primordial en las lesiones tisulares, no obstante, no son los únicos agentes que causan daños, por ello es difícil demostrar que la mortalidad de los individuos sea debida su acción exclusiva.

Hasta el momento se han empleado muchas sustancias a base de antioxidantes y “secuestradores” de los radicales con el fin de mejorar la supervivencia. En el presente trabajo se encontró un resultado positivo de reducción de la mortalidad con el empleo de SOD. No obstante, los resultados obtenidos por los diferentes autores han sido muy diversos y, la mayoría de ellos, están sujetos a las variables dependientes, entre las que destacan los tiempos de isquemia, el tipo de antioxidante empleado o la concentración de éstos. Es evidente que cualquiera de los trabajos, independientemente de la sustancia utilizada, se produjeron efectos terapéuticos o protectores considerables, pero al igual que en los hallazgos que aquí se ofrecen estas mejoras, en general, no resultaron siempre estadísticamente significativas.

La relación existente entre los procesos de reperfusión, la formación de RL y la repercusión de ambos factores en el sistema leucocitario, constituyen en la actualidad una importante línea de investigación. La observación directa y la prevención de la adhesión de granulocitos a las áreas reperfundidas otorga a los neutrófilos un papel importante en las lesiones tisulares postisquémicas¹²⁷, y aunque el tratamiento con antioxidantes atenúa las lesiones provocadas por la I/R, no se puede atribuir exclusivamente la gravedad del proceso a los agentes oxidantes¹²⁸.

La proliferación bacteriana masiva y la liberación de endotoxinas que se produce como consecuencia del microambiente favorable durante la falta de oxígeno, constituye un factor de importancia. Esta proliferación bacteriana puede traducirse en una infección que afecte a la totalidad del organismo. Como consecuencia, se origina vasodilatación periférica y aumento del gasto cardíaco. Todo ello conduce a un fallo multiorgánico con afectación de otros órganos. Fontes *et al.*¹²⁹ demostraron que tras un cuadro experimental de I/R se inducía un fallo en la médula ósea, provocando a corto plazo una depresión de la granulopoyesis, y por tanto un aumento de la posibilidad de sepsis generalizada. En estos casos se provocan cambios histológicos que revelan una inflamación sistémica y el intestino muestra signos evidentes de edema intersticial y de necrosis isquémica¹³⁰. En el presente trabajo, aunque no se valoró de

manera directa la presencia de bacterias como consecuencia de la isquemia, se hizo un seguimiento de los animales que presentaron gas intestinal después del período isquémico. Según se describe en el apartado 4. se encontró una relación directa entre el mayor tiempo de isquemia y la presencia abundante de gas, apareciendo en diecisiete de los veinte individuos de la serie VI -120 minutos de isquemia- y en diecinueve de los veinte animales de la serie VII -180 minutos de isquemia-.

Igualmente, según se detalla en el apartado 4.12, se contrastó que las lesiones tisulares e histológicas producidas por la falta de sangre oxigenada, pueden alcanzar un alto grado de severidad que, en muchas ocasiones, haría inviable la recuperación del intestino conduciendo a la muerte.

Los procesos patológicos de I/R, representan una afección aguda acompañada de lesiones de gran trascendencia y, en muchos casos, del fallecimiento del individuo. Restringir las causas principales de las lesiones, resulta en cierta parte contradictorio y minimiza la magnitud del proceso. Si bien es cierto que la reperfusión puede agravar las lesiones, la propia fase anóxica puede producir un desequilibrio trascendental en la homeostasis del organismo. Por otro lado, tampoco puede entenderse la lesión isquémica sin considerar la gran cantidad de cascadas anómalas que se producen con la reentrada de sangre.

Considerando la gran cantidad de factores que participan en este cuadro patológico, es importante conocer la curva de supervivencia en la que se desarrollan las frecuencias de mortalidad y las tasas de riesgo porque ambas coinciden en un punto de equilibrio. La curva de supervivencia desvela la existencia de diferencias entre lesiones reversibles e irreversibles, lo que determinan la posibilidad de un tratamiento y la posible supervivencia.

Se considera que es importante la utilización de tiempos de isquemia que produzcan letalidad del 50%, para valorar de modo adecuado los efectos de los agentes terapéuticos en el ámbito experimental, sobre la supervivencia en los procesos de I/R. Este punto es de gran importancia al comparar los resultados entre los diferentes autores, puesto que la significación de los resultados en cualquier tratamiento puede depender de la reversibilidad de las lesiones postisquémicas. En estudios experimentales, la tasa de supervivencia es, posiblemente, el mejor parámetro para valorar la eficacia de agentes terapéuticos durante la I/R.

La destrucción histológica del tejido afectado, pone de manifiesto, en los animales

fallecidos, el componente esencial de la lesión isquémica, que no es otro, que la propia privación de oxígeno a los tejidos.

5.1.3. LESIONES EN EL ORGANISMO.

Es de gran trascendencia conocer que las lesiones isquémicas no se producen únicamente en la región hipovascularizada, sino que el proceso influye en el resto de órganos, manifestándose lesiones en algunos de ellos, especialmente en pulmón, y elevándose los valores normales de enzimas y de otros parámetros bioquímicos.

5.2. MORTALIDAD EN FUNCIÓN DEL SEXO Y EL PESO.

5.2.1. IMPLICACIÓN DEL SEXO.

Dentro de los animales de la mismas serie, sometidos todos a los mismos tiempos de isquemia, la tasa de mortalidad para cada sexo presentó diferencias estadísticas significativas. La función de riesgo siempre apareció aumentada en las hembras presentando una probabilidad superior de fallecer, con respecto a los machos, para iguales tiempos de isquemia. Estos resultados se recogen en la tabla 9 en la que se observa, en relación con todos los tiempos de isquemia, que la función de riesgo es siempre mayor en las hembras, incluso para series de tiempo de isquemia relativamente corto. En la serie IV, de 30 minutos de isquemia, los machos presentan una función de riesgo de 0 tras las primeras 12 horas de la reperusión y las hembras, para el mismo tiempo presentan una función de riesgo de 0,105. Las diferencias aún se hacen más patentes en las dos series siguientes, y principalmente en la serie VI, donde los resultados para machos son de 0,2 y para las hembras de 0,7.

En la revisión de la bibliografía no se ha encontrado ningún trabajo donde se describa un estudio comparativo por sexos en animales sometidos a IMA experimental. Payan y Conard¹³¹ observaron que existían diferencias significativas de mortalidad en función del sexo y de la edad cuando ligaban la arteria carótida de gerbos; por ello introdujeron una nueva serie de animales castrados en la que obtuvo una mortalidad del 57% en machos y 23% en hembras, por lo que relacionó la muerte entre los sexos con las hormonas gonadales. Koida *et al.*¹³² encontraron

también una mayor tasa de supervivencia en machos que en hembras cuando sometían a hipoxia cerebral a dos series de ratones.

En un estudio realizado en 1997 por Bronner y Boissel en 20 pacientes a los que se diagnosticó IMA, en el hospital de Brabois, encontraron un predominio de la mortalidad en las mujeres. Estas presentaron un 80% de mortalidad, mientras que en los hombres se aproximaba al 45%, lo que inducía a pensar que el sexo femenino ofrecía menor resistencia al infarto intestinal¹³³.

Según los resultados publicados por el Instituto Nacional de Estadística, reflejados en la tabla 1 del punto 1.8. de la Introducción, en el año 1995 se produjeron en España 1972 muertes diagnosticadas como insuficiencia vascular intestinal, de las cuales un 54,9% correspondieron a mujeres mientras que un 45,1% correspondió a hombres.

Existen numerosas sustancias antioxidantes, que actuando en condiciones fisiológicas normales, pueden controlar la génesis de RL, protegiendo al organismo. Cano propugnó en 1996 que los estrógenos podrían actuar como barredores de RL¹³⁴ y Zhang en 1998¹³⁵ presentó un trabajo en ratas donde exponía el efecto beneficioso del tratamiento con estradiol en cuadros de isquemia focal cerebral.

Es muy posible que estos sistemas de protección sean completamente ineficaces en casos de producción masiva de RL, como en episodios isquémicos y de reperfusión que afectan masivamente a todo un órgano, puesto que los estrógenos se liberan en cantidades minúsculas y presentan picos temporales de la concentración.

Puede ser significativo la diferente cuantía de antioxidante, especialmente de SOD, que existen en los tejidos de cada sexo. Marklund cuantificó las isoenzimas de SOD en diferentes tejidos humanos y encontró que en el duodeno, los niveles de Cu/Zn SOD, determinados en U/mg de proteína, representaban, aproximadamente, 1/3 más en machos que en hembras, y lo mismo ocurría con la Mn SOD¹⁰⁸. Estas diferencias podrían resultar determinantes ante un aumento brusco e incontrolado de RL durante la fase de la reperfusión. Si la presencia de SOD puede limitar las lesiones estructurales e inhibir ciertos procesos de destrucción tisular, es lógico pensar que mayores niveles de concentración, puedan favorecer la supervivencia.

5.2.2. IMPLICACIÓN DEL PESO.

Algunos estudios experimentales han planteado la hipótesis de una afectación diferente de los cuadros isquémicos según el peso de los animales. Ortiz-Lacorzana *et al.*¹³⁶ encontraron diferencias en la tasa de mortalidad cuando compararon animales jóvenes de poco peso con animales adultos, aunque estas diferencias no fueron significativas estadísticamente. En el caso de las ratas, existe una relación evidente entre el peso y la edad de los animales, de manera que ratas de mayor peso, son a su vez las de mayor edad y viceversa. Según el trabajo anterior, las ratas más jóvenes presentarían una tasa de mortalidad algo superior con respecto a las de mayor edad. Por tanto existen diferencias en la curva de mortalidad según las variables consideradas.

En el punto 4.2. del apartado de resultados se exponen las diferencias encontradas cuando se realizó el estudio estadístico de supervivencia separando a los animales de cada serie según el peso corporal. Se intentó encontrar alguna relación entre el peso de los animales y la mortalidad. Si bien los resultados hallados muestran leves diferencias en la frecuencia de supervivencia y en la función de riesgo, la valoración estadística de las variables categóricas resultó no significativa para cualquiera de las series. Este hecho no contradice la hipótesis de Ortiz-Lacorzana *et al.* puesto que en el presente trabajo se utilizó una barrera de peso muy ajustada, y siempre comprendida en los parámetros fijados en la metodología del trabajo -pesos comprendidos entre 240 y 300 g y edad entre 9 y 12 semanas- con lo que apenas se manifestaban diferencias en la edad o el peso, e incluso los extremos inferior y superior de cada intervalo llegan a solaparse. Este análisis estadístico se introdujo para descartar que las diferencias de mortalidad encontradas entre animales de sexo diferente pudieran ser debidas a diferencias en los pesos; de ello se deduce directamente la implicación de la variable independiente sexo en la curva de supervivencia.

A la vista de los resultados, no se puede descartar que, siguiendo la metodología del presente trabajo, no se encontrasen diferencias significativas empleando animales de peso y edad muy diferentes. Es una vía que queda abierta para otros posibles trabajos y para esclarecer aún más las diferentes tasa de mortalidad para sujetos de distintas características físicas.

Igualmente, para reducir las posibles diferencias entre diferentes lotes de animales, para el presente trabajo se seleccionaron camadas homogéneas en peso y edad. Esta característica reducía al máximo las diferencias genéticas entre los animales, teniendo posibilidades muy

similares de sufrir el mismo efecto tras el episodio de isquemia.

Según se indicó en un trabajo publicado en 1998¹³⁷, aunque las variables dependientes como peso, edad o procedencia de los animales, fueron reducidas y controladas al máximo, empleando animales de características homogéneas, se manifestaron diferencias significativas entre ambos sexos en todos los períodos de isquemia -excepto lógicamente en aquellos en los que la mortalidad fue nula y el tiempo de isquemia no alcanzó el umbral de la mortalidad como en las series I, II y III y en la serie de letalidad 100%, serie VII-. Actualmente se diseñan nuevos experimentos para determinar las causas concretas de estas diferencias.

La hipótesis inicial de trabajo sobre esta variable queda confirmada puesto que se han dado diferencias estadísticamente significativas en la mortalidad de machos y hembras. El peso corporal no interviene directamente en la mortalidad de los animales para intervalos estrechos de pesos como los utilizados en este trabajo.

5.3. ALTERACIONES FISIOLÓGICAS.

Difícilmente pueden compararse las lesiones intestinales y multiorgánicas que se producen después de un período de isquemia mesentérica con las de otros tejidos, por su particularidad estructural y funcional. La gravedad de las lesiones producidas tras la isquemia intestinal, vienen condicionadas, en gran medida por el tiempo de anoxia tisular.

5.3.1. ESTADO ANESTÉSICO.

Después de revisar numerosos modelos experimentales basados en la oclusión temporal de la AMC, se comprobó que, prácticamente, en ninguno se menciona el estado anestésico del animal. Los autores se limitan a mencionar el fármaco inductor predominando en la gran mayoría, el uso de pentobarbital sódico, seguido del empleo de ketamina. En el presente trabajo se utilizó una mezcla de ketamina, diazepam y sulfato de atropina, según se detalla en el punto 3.1.3. con los que, dadas sus propiedades farmacológicas, analgésicas, miorelajantes y ansiolíticas, se obtuvo un estado de relajación muy favorable para los prolongados procesos de intervención quirúrgica, especialmente en las series de mayor duración del tiempo de isquemia y en las series de tratamiento.

El período postoperatorio inmediato constituye un lapso de cambios funcionales en el individuo, producido por la reversión farmacológica de los agentes anestésicos y los cambios fisiológicos dinámicos, como consecuencia del traumatismo quirúrgico¹³⁸.

En un principio, el estudio del despertar anestésico se realizó de manera conjunta para todos los individuos sin discriminación de sexos, y posteriormente se incorporó esta variable categórica, cuando se observó una evolución significativamente diferente entre los machos y las hembras.

Cuando se analizó el tiempo del despertar anestésico en animales de diferentes series, sin tener en cuenta el sexo, mediante test de ANOVA, no aparecieron diferencias significativas entre las series, hecho corroborado por el test de Bonferroni, según se detalla en el apartado 4.4.1. Es importante señalar que existe un aumento del tiempo medio del despertar entre la serie *Sham operation* y el resto de las series experimentales, ampliándose en gran medida los límites del período de confianza para cada serie. Estos resultados implican que existe un ligero aumento del tiempo de despertar anestésico tras la isquemia reperusión, pero que en ningún caso se contradice la hipótesis nula.

Tan sólo se encontró un trabajo en la revisión bibliográfica, en el que se realizó un seguimiento postoperatorio y se valoró el efecto de la anestesia y el tiempo de despertar de los animales tras oclusión de la AMC. Guijarro *et al.*¹³⁹ encontraron diferencias significativas entre algunos grupos de conejos sometidos a I/R intestinal, cuando compararon serie a serie los tiempos de salida anestésica mediante la t de Student.

Aunque el efecto anestésico desaparece en pocos minutos, tras finalizar la intervención quirúrgica, posiblemente el efecto traumático de la operación puede tener alguna implicación en la evolución del despertar anestésico, de esta manera se explicaría un leve aumento del tiempo medio de respuesta. En el efecto traumático se incluiría la producción de endotoxinas bacterianas y la proliferación bacteriana, la gravedad de las lesiones, tanto intestinales como sistémicas; la disfunción de la circulación sistémica; la disminución de los sistemas detoxificadores del organismo; así como la innumerable cantidad de procesos anómalos que desencadena el infarto intestinal y, en definitiva, la alteración de la homeostasis del organismo. Un punto a tener en cuenta según el método experimental del presente trabajo es que a los animales de las series VI y VII se les administró posteriormente una concentración adicional de

anestesia con el fin de que no despertasen durante la intervención, de manera que el aumento del tiempo de isquemia corresponde a un mayor tiempo en estado anestésico, con un mayor consumo o metabolización de factores anestésicos.

Cuando este estudio se llevó a cabo en los animales de diferente sexo pertenecientes a la misma serie, se encontraron entre ellos diferencias significativas. Salvo en la serie II donde la diferencia entre machos y hembras fue ligeramente significativa, con una p de 0,048, en el resto de las series se obtuvieron grados de significación muy pronunciados, siendo los más destacados los de las series V y VI, en las que el valor de p fue de 0 y 0,001 respectivamente. Puesto que los machos son más resistentes que las hembras a isquemia mesentérica, y puesto que esta resistencia parece otorgarles una ventaja -las lesiones menos severas y el cuadro anóxico menos traumático-, se explicaría un menor tiempo en estado anestésico para los machos tras finalizar la intervención.

5.3.2. ESTADO POSTOPERATORIO.

Todo proceso patológico requiere un tiempo de recuperación en el que el individuo presenta facultades más o menos mermadas, en función de la gravedad del mismo.

Para definir el estado de los animales tras la intervención experimental, nos basamos en las directrices de reconocimiento de dolor y enfermedad, elaboradas por Morton y Griffiths¹⁴⁰, mediante ellas se determinó el patrón de comportamiento frente a estímulos externos y la apariencia del animal.

Uno de los primeros síntomas que se manifiestan durante la isquemia mesentérica aguda es la presencia de dolor abdominal difuso, agudo y permanente³⁶ y por ello, basándonos en dicha sintomatología, se pudo catalogar el estado de los animales tras la recuperación del estado anestésico. Entre las sustancias más importantes que participan en la cadena nociceptiva que se produce tras la isquemia, cabe destacar la bradiquinina, sustancia liberada durante la isquemia y la inflamación¹⁴¹, que es capaz de estimular las vías aferentes que llegan al intestino; las prostaglandinas que se liberan durante la cascada de destrucción masiva del tejido intestinal¹⁴², y otros factores químicos locales liberados como consecuencia de la anoxia, como el lactato, la elevación parcial del CO₂ en los tejidos o la concentración de iones hidrogeno¹⁴³. Todos ellos son factores capaces de estimular las fibras nerviosas aferentes del intestino. Estas sustancias

producen en el animal un efecto de malestar general, con decaimiento del ritmo fisiológico normal y modificación del comportamiento lo que explica la presencia de animales con erizamiento del pelo y ausencia de movimientos, características que se manifestaron especialmente en animales supervivientes, tanto los que revirtieron el proceso patológico, como los que murieron en las horas posteriores a la reperusión.

5.3.3. RECUPERACIÓN DE LA ACTIVIDAD FISIOLÓGICA NORMAL.

La gravedad de las lesiones ocasionadas por la ausencia de riego en el intestino contribuye de manera fundamental a la recuperación de la actividad normal del organismo. Si ya de por sí, el hecho de la intervención quirúrgica supone una modificación importante en el biorritmo normal, la provocación experimental de una lesión aguda sería causa principal de una mayor alteración, y de una recuperación más lenta. Cuando se observaron las variables “tiempo que tardan en ingerir alimento”, “tiempo que tardan en ingerir líquido” y “tiempo transcurrido hasta la primera deposición”, se observó que a medida que el tiempo de isquemia era mayor, se reducía considerablemente el porcentaje de animales que se recuperaban en las primeras horas de la reperusión. En el apartado 4.5. de resultados, se detallan las tablas con los porcentajes de animales que comieron bebieron o realizaron deposiciones en las primeras horas después de la intervención, observándose en todas ellas que a medida que el tiempo de oclusión arterial se hizo mayor, el reestablecimiento de las características fisiológicas se enlentece. Los resultados más significativos se producen en las 24 horas del postoperatorio, con porcentajes que van disminuyendo a medida que el tiempo de isquemia se hace mayor.

Las lesiones intestinales y sistémicas, más intensas, asociadas a la isquemia -edema intersticial, destrucción vellositaria, etcétera- explicarían una recuperación más lenta en la ingesta de alimento y líquido. Una destrucción de las fibras musculares del intestino y las lesiones en la cadena nerviosa entérica explicarían el retraso en la defecación de los animales. En el apartado 4.5.3. se detallan estos resultados. Tras 24 horas de reperusión, el 100% de los animales realizaron deposiciones, en el caso de la serie IV; en el mismo tiempo de observación, este porcentaje disminuyó hasta el 80% de los animales; en la serie V se redujo hasta el 60%; en la serie VI volvió a descender hasta hacerse nula en la serie VII, donde ningún animal defecó, en este caso, muy probablemente, debido al período corto de supervivencia.

Guijarro *et al.*¹³⁹ hallaron en conejos diferencias de recuperación de la ingesta de alimento y de líquido en distintas series, con diferentes tiempos de isquemia. En el presente trabajo también se encontraron diferencias entre las series con menos tiempo de isquemia y las series de isquemia más prolongada, tanto en la ingesta de alimento como en la ingesta de líquido.

Es fácilmente comprensible que las lesiones provocadas en la mucosa intestinal pueden afectar de manera directa a la recuperación de la ingesta y de la defecación; pero resulta complicado explicar la relación directa con la supervivencia de los animales. Los animales que murieron antes de salir del estado anestésico, evidentemente no ingirieron ningún tipo de alimento ni líquido, pero los animales que lograron revertir temporalmente el efecto isquémico durante unas horas y sobrevivieron durante algún período comprendido entre el momento de la reperfusión y la barrera crítica de las 60 horas, ingirieron tanto líquido como alimento. Puede observarse en las tablas 13 y 14 de los puntos 4.5.1. y 4.5.2 del apartado de resultados, que la recuperación de la ingesta de alimentos fue más retardada que la de líquidos en todas las series. Cabe destacar el hecho de que ninguno de los animales que falleció entre las 0 horas de la reperfusión y las 48 horas, ingirió alimento sólido ni agua, siendo esto último lo más sorprendente, por lo tanto, además de las lesiones que acompañan a la I/R, una de las causas de muerte puede estar en la deshidratación del animal, asociada a la incapacidad de ingerir líquido. En cambio todos los animales supervivientes ingirieron líquido a las pocas horas de la reperfusión.

La defecación también se manifiesta estrechamente relacionada con las lesiones en el intestino y posiblemente esté directamente relacionada con la viabilidad del sistema nervioso del propio intestino. El sistema nervioso autónomo y entérico rigen los movimientos peristálticos del intestino, imprescindibles para la digestión y el desplazamiento del contenido intestinal. Ninguno de los animales que murió en el intervalo crítico realizó deposiciones de heces, por lo tanto, este hecho puede ser una manifestación indirecta de una alteración severa de la red nerviosa intestinal, hecho corroborado por el estudio microscópico de las muestras.

La presencia de hemorragia en heces, es comprensible por la destrucción masiva de las diferentes capas del intestino, junto con una extravasación hacia el lumen de la sangre que se mezcla con las heces. Valdivieso *et al.*, tras un seguimiento de 15 enfermos confirma la presencia de heces hemorrágicas en algunos de ellos³⁹. Igualmente destaca la presencia de vómitos en el 67% de los casos, hecho imposible de constatar en estudios con ratas, puesto que

debido a la disposición anatómica del esófago y el estómago de estos animales, no presentan vómito¹⁴⁴.

Los animales que superaron la barrera de las 60 horas, habían recuperado por completo la actividad fisiológica normal y evolucionaron sin alteraciones hasta el momento del sacrificio, hecho contrastado con la evolución semanal de los pesos y la general ausencia de lesiones permanentes de importancia en el estudio patológico, tanto macroscópico como microscópico realizado tras las 9 semanas de supervivencia.

5.3.4. EVOLUCIÓN DEL PESO.

La rata mantiene, en estado normal, una tasa de aumento constante de peso, y de tamaño, hasta los últimos meses de vida, apreciándose un claro dimorfismo sexual, según el cual los machos presentan una mayor medida ponderal con respecto a las hembras.

Todos los animales de las series experimentales incluidas en el estudio de supervivencia -a excepción de las series I y II- presentaron un descenso moderado de peso tras la primera semana de observación, reflejado en un descenso de la media. Esta caída moderada del peso, no significativa estadísticamente, fue revertida en la semana segunda de observación, si bien este aumento tampoco resultó significativo. En las semanas posteriores esta tendencia ascendente se mantuvo constante, resultando estadísticamente significativa respecto a las medidas realizadas en las 2 primeras semanas.

La explicación de este hecho puede encontrarse en la evolución del proceso patológico durante la primera semana. Como se ha señalado anteriormente, existe una barrera hipotética en las 60 horas posteriores a la reperfusión, según la cual, cualquier animal capaz de sobrevivir ese tiempo tiene una probabilidad absoluta de no morir y revertir el cuadro isquémico, por consiguiente, es evidente que existe una fase crítica de riesgo de muerte que resultó ser independiente del tiempo de isquemia. Durante este tiempo, y hasta alcanzar la primera semana, el animal se enfrenta al hecho de recuperar la homeostasis perdida como consecuencia del infarto intestinal, añadiendo a este aspecto una alteración en la ingesta de nutrientes, valorada en el punto anterior. Por lo tanto, es lógico que haya un debilitamiento general del organismo, con mayor consumo de energía y recuperación del proceso patológico agudo.

Transcurrido el proceso de recuperación, el animal entra en una dinámica de tendencia general, y mantiene el ritmo de crecimiento ponderal habitual, siendo total la recuperación de los animales en el estudio realizado al ser sacrificados a las 9 semanas.

5.4. ALTERACIONES DE LAS CONSTANTES BIOQUÍMICAS.

Una de las principales causas de la elevada mortalidad que produce el síndrome isquémico del intestino en el hombre se debe a la dificultad de un diagnóstico precoz¹⁴⁵. La isquemia intestinal no tiene un patrón definido de alteraciones, que la hagan identificable de inmediato, basándose en pruebas bioquímicas. Gonze *et al.*¹⁴⁶ encontraron en 1997 un aumento significativo de D-lactato en el suero de ratas sometidas a I/R mesentérica y apuntaron la idea de que el descubrimiento podía tener gran importancia como marcador del proceso patológico, actuando como agente diferenciador del infarto intestinal, lo que podría facilitar el tratamiento haciendo el proceso reversible antes de que el intestino se tornase inviable.

En el presente trabajo se cuantificaron los parámetros bioquímicos en una serie experimental de ratas macho -serie XIV- sometidas a isquemia intestinal durante 90 minutos y con toma de muestras tras 30 minutos de reperfusión, encontrando diferencias significativas con respecto a las serie control -serie I- y *Sham operation* -serie II-, en la mayoría de las sustancias analizadas, como la LDH, la CPK, la ALT y la AST, enzimas séricas en las que Sachs¹⁴⁷ encuentra valores aumentados significativamente en enfermos con isquemia intestinal. A continuación se detalla cada uno de los parámetros bioquímicos analizados.

5.4.1. SUSTRATOS ENZIMÁTICOS.

Cuando se analizaron los resultados de la serie control y los de la serie *Sham operation*, no apareció ninguna diferencia significativa en ninguno de los parámetros bioquímicos -CPK, GGT, LDH, AST, ALT, creatinina, urea, Na⁺ y K⁺-, independientemente de si se utilizó el t-test o la U de Mann-Whitney, según la realización previa del test de Shapiro-Wilks para el cálculo de bondad de ajuste a una distribución normal. Estos resultados ponen de manifiesto la recuperación total de los individuos *Sham* tras las 9 semanas de observación, apoyado por los resultados de la supervivencia, al no darse ningún caso de fallecimiento. En cambio las

diferencias cuantitativas fueron patentes entre los individuos control y los individuos de la serie isquémica -serie XIV-.

* CPK. Cuando se compararon estadísticamente los resultados de los valores de la CPK entre la serie control -serie I- y XIV, se encontraron diferencias altamente significativas. Mientras que los valores de CPK en la serie control, oscilaron entre 171 y 199 UI/l, los valores medios de la serie isquémica fueron 1429 (DE=337) UI/l, lo que pone de manifiesto una relación del proceso isquémico en la subida de dicha enzima, resultados que coincide plenamente con los encontrados por Graeber *et al.*¹⁴⁸, quienes tras someter a perros a infarto intestinal, cuantificaron los niveles de CPK total en suero y además valoraron mediante electroforesis la alteración de las isoenzimas de la CPK.

La CPK es una enzima que aparece, generalmente, muy aumentada en síndromes isquémicos de cualquier parte del organismo, así Smith *et al.*¹⁴⁹ encuentran una elevación importante tras I/R cardíaca, empleando sus valores para el cálculo del porcentaje del área infartada y Das *et al.*¹⁵⁰ encuentran también una elevación plasmática de la creatinina quinasa en cerdos, cuando estudian las alteraciones inducidas en la estructura de la membrana celular mediante I/R. La CPK es una enzima eminentemente muscular que cataliza la reacción exérgica de transferencia de un grupo fosforilo de la fosfocreatina a una molécula de ADP, liberándose al medio creatina y ATP¹⁵¹ lo que explicaría su aumento en la serie de isquemia intestinal -serie XIV- por dos causas:

- destrucción de la pared muscular como consecuencia de la incisión abdominal realizada durante la intervención,
- por la destrucción masiva de las fibras del músculo liso del intestino como consecuencia de la anoxia, relacionada directamente con el tiempo de oclusión vascular.

Si se observa la representación del diagrama de *boxplot* para los niveles de la CPK, se aprecia una distribución de los percentiles, e incluso un valor del IQR realmente estrecho en la serie control, indicando una escasa variabilidad de resultados.

* LDH. De unos niveles medios comprendidos entre 138 y 238 UI/l, para la serie control, ascendió, en la serie experimental, hasta un valor medio de 719 (DE=88), resultando las diferencias del estudio estadístico altamente significativas. Sánchez Lozano menciona una modificación sensible de los niveles de LDH cuando somete a isquemia intestinal a perros¹⁵² a

los que les realiza tomas de sangre antes de la intervención, durante el episodio isquémico y después de 60 minutos de reperfusión.

La LDH es una enzima que aparece elevada significativamente en los infartos agudos, y puesto que cataliza la conversión anaerobia del piruvato en lactato¹⁵³, es explicable su fuerte incremento a continuación de un episodio isquémico. En condiciones fisiológicas normales, el escaso ácido láctico que se produce, vía láctico deshidrogenasa, es tamponado por el bicarbonato circulante¹⁵⁴, pero durante la anoxia tisular se favorece el ambiente anaerobio, además, al encontrarse la célula privada de los nutrientes necesarios para su subsistencia, genera la energía a partir del lactato, aunque el rendimiento sea considerablemente menor.

Para la LDH aparece un IQR sensiblemente amplio en las tres series, aunque el resultado de modificación de la enzima puede considerarse específico del trastorno isquémico ya que los intervalos de individuos extremos no se solapan.

* Enzimas hepáticas. La GGT, valorada estadísticamente mediante la U de Mann-Whitney no mostró diferencias significativas entre la serie control y la experimental, con un valor de $p > 0,05$, resultados similares a los obtenidos por Suso Alea *et al.*¹⁵⁵ en perros sometidos a 3 horas de isquemia, lo que indicaría una ausencia de lesiones en el sistema biliar tras una isquemia mesentérica aguda. En cuanto al análisis de la AST y la ALT, aparecieron diferencias significativas entre los resultados de la serie experimental y los de la serie control, valorados estadísticamente mediante la t de Student. Para ambas transaminasas, se observa un IQR amplio, lo que indica una mayor disparidad de los valores, estando muy próximos a solaparse los casos extremos de ambas distribuciones. Esto se interpreta como que la elevación de las transaminasas tras la isquemia es muy variable y se manifiesta de forma inconstante e inespecífica. Otros autores encuentran también una elevación significativa de ambas enzimas tras 3 horas de isquemia intestinal en perros^{155,156}.

La elevación inespecífica de las transaminasas, enzimas eminentemente hepáticas, podría deberse a varias causas. En primer lugar, el hígado es un órgano multifuncional¹⁵⁷, por lo que el simple efecto "tóxico" del complejo anestésico podría ocasionar una desestabilización pasajera de su sistema enzimático. Además, el hígado es la viscera abdominal por la que todas las sustancias tóxicas que se generan durante la anoxia del intestino, vía vena porta, van a alcanzar la circulación general, por lo tanto es muy probable que estos metabolitos puedan afectar en

mayor o menor grado a su parénquima¹⁵⁵. En segundo lugar, las transaminasas se dispararían debido al carácter multiorgánico de las lesiones isquémicas del intestino, afectando directamente al hígado. La liberación de proteasas y otras enzimas degradativas vertidas al medio como consecuencia de las lisis celulares, hacen que el organismo ponga en marcha todos los sistemas detoxificadores, y especialmente los hepáticos, lo que provocaría alteraciones de la homeostasis hepática y, en consecuencia, en su función.

Consecuencia de los resultados del estudio de las enzimas hepáticas y conforme con las publicaciones de otros autores antes mencionadas, se considera que la elevación de dichas enzimas no constituye un diagnóstico fiable de la IMA, puesto que la elevación es altamente inespecífica y puede deberse a más de un factor, ajeno a la propia patología isquémica. Además, y según apuntan Caulin, Isal y Dahan, todos los procesos patológicos que cursan con infarto intestinal producen un aumento de las transaminasas¹⁵⁸.

5.4.2. SUSTRATOS METABÓLICOS.

Tanto en los resultados de la creatinina como los de la urea, aparecieron diferencias significativas. La creatinina, valorada estadísticamente mediante la U de Mann-Whitney, presentó un valor medio considerablemente elevado de 0,8 (DE=0,2) UI/l en la serie experimental -serie XIV-, con respecto al intervalo de confianza de la serie control (0,39-0,57) UI/l, aunque el *boxplot* presenta un IQR muy amplio, con solapamiento de los valores inferiores con los valores normales. La creatinina es un producto de desecho metabólico, producido por degradación de la creatinina muscular y su alteración en suero refleja un descenso de la función renal y un aumento en la destrucción de células musculares¹⁵⁹. Esta elevación inespecífica puede ser explicada por la necrosis de fibras musculares -tanto por causa de la incisión como por causa de la lesión isquémica-.

En el caso de la urea aparece una alteración inespecífica muy baja. Los valores de la mediana, representados en el diagrama de *boxplot* en el apartado de resultados, desvelan una sensible disminución de los valores centrales de la urea para los animales de la serie experimental -serie XIV-, aunque el IQR de la serie es marcadamente ancho, lo que indica una gran oscilación de resultados. En la misma figura, al observar los resultados tanto de la serie I como de la serie II, se observa una gran amplitud del IQR, con medidas de dispersión muy amplias. Debido a esto,

la cuantificación de los niveles de urea no muestran un patrón fijo de comportamiento tras la isquemia. Durante la isquemia la hipoxantina se almacena en el tejido isquémico, inhibiéndose el catabolismo hacia xantina, la cual, por acción de la xantino oxidasa es convertida en ácido úrico, para la posterior formación de urea. El descenso de los niveles de urea podría afectarse por la presencia de la xantina deshidrogenasa, que inhibe la síntesis de xantina, de modo que disminuiría el catabolismo hacia la síntesis de urea. Durante la reperfusión, con la reentrada de oxígeno al medio se dispararía la síntesis de xantina, con la liberación de grupos hidroxilo. Todo el tiempo de retención de hipoxantina, asociado a una deficiente constante hemodinámica, provocaría un descenso de la síntesis de urea.

5.4.3. CONSTANTES IÓNICAS.

Los niveles de sodio y de potasio muestran una ligera modificación de los niveles normales tras la I/R. Se encontró una ligera hiponatremia, aunque no significativa, y una hipercalemia ligeramente significativa, con un valor de $p=0,045$. Estos resultados, acompañados de unos IQR en ambos casos muy amplios, que se solapan con los valores, y que se corresponden con los datos obtenidos del test de Levene, da como respuesta una modificación sensible y muy inespecífica a la alteración de electrólitos, resultados que coinciden con los obtenidos por Sánchez Lozano¹⁵² en perros tras someterlos a isquemia mesentérica. Igualmente, Horton y White⁹⁶ detectan leves modificaciones, en ningún caso significativas, en los niveles tanto de sodio como de potasio, tras estudiar 3 grupos de ratas sometidas a isquemia durante 20 minutos pero con distintos tiempos de reperfusión.

En conclusión, aún encontrando diferencias significativas en la mayoría de los parámetros bioquímicos analizados, no se puede afirmar categóricamente que estas diferencias sean debidas exclusivamente al cuadro isquémico del tejido intestinal, por lo que el diagnóstico de la IMA mediante bioquímicas de laboratorio, no resulta actualmente determinante ni presenta una sensibilidad clara. Tanto la inespecificidad como la variabilidad de la población, hace que el diagnóstico analítico introduzca variables de confusión, que no pueden ser aisladas por ningún método estadístico. En esto coinciden la mayoría de los autores citados y las publicaciones consultadas, en las que ponen de manifiesto alteraciones bioquímicas, fundamentalmente de carácter enzimático, pero ninguno manifiesta una opinión rotunda sobre la validez de este

método diagnóstico, y tan sólo le confieren un resultado orientativo, que debe ser confirmado mediante diagnóstico por imagen.

Por lo tanto se puede aceptar como válido que existe una alteración severa funcional y multiorgánica después de un episodio agudo de isquemia mesentérica.

5.5. MANIFESTACIÓN DE LESIONES MULTIORGÁNICAS.

El cuadro lesional que se origina a consecuencia de la I/R mesentérica no afecta únicamente al intestino sino que alcanza a otros órganos.

5.5.1. PULMONARES.

El pulmón es un órgano especialmente vulnerable tras la I/R del intestino. Schmeling *et al.*¹⁶⁰, sometieron a ratas a tiempos de isquemia variable que oscilaron entre 15 y 120 minutos y a una posterior repermeabilización. Encontraron que tras 120 minutos de reperusión en todas ellas se producía un incremento progresivo de la permeabilidad pulmonar, así como afectación de las células endoteliales y reducción de la energía almacenada en forma de fosfatos en el tejido pulmonar.

En el estudio necrópsico no hubo derrame pleural en todos los casos, el estudio patológico macroscópico del pulmón mostró una proporción creciente de lesiones en las diferentes series, a medida que el tiempo de isquemia fue mayor. Así, un 66,7% de los animales fallecidos por la isquemia presentaron lesiones pulmonares en las series IV y V, este valor aumentó hasta el 85% de pulmones en la serie VII. Estos resultados sugieren que la isquemia mesentérica no es un proceso estrictamente localizado en el territorio arterial correspondiente sino que afecta también a órganos alejados y especialmente al pulmón. Las alteraciones más frecuentes fueron la congestión vascular y el edema de pulmón.

Al comparar los pesos de los pulmones entre los animales de la serie control, con el resto de las series, mediante el test de Kruskal-Wallis, se obtuvo un valor de p de 0,112, resultando una diferencia no significativa entre ninguna serie, hecho que se comprobó mediante la realización del test de Bonferroni. Estos resultados explicarían la ausencia de lesiones específicas del pulmón ajenas a la isquemia, puesto que el peso relativo de los pulmones se mantuvo sin

diferencias significativas en todas las series con respecto a la serie control como se muestra en la tabla 30. Mientras que el peso relativo de los pulmones de la serie I osciló entre 0,43 y 0,52, el resto de las series mostraron un intervalo de confianza muy similar.

El estudio al microscopio, del tejido pulmonar, confirmó los resultados macroscópicos. Sin hacer mención de las leves alteraciones que se dan incluso en el pulmón de animales sanos, -como presencia de enfisema o atelectasias focales- y que también son frecuentes en los animales de las series isquémicas, en proporción similar a las de individuos sanos, los individuos de las series experimentales manifestaron alteraciones importantes y en proporciones elevadas.

Entre las afecciones citadas destacan la congestión vascular aguda, con presencia relativamente abundante de edema agudo de pulmón, incluso de hemorragia aguda, presencia del infiltrado linfocitario, y alteraciones en los tabiques alveolares. Estas anomalías histológicas, además de tener un importante componente mecánico y bioquímico, quizás pueden llevar asociada la presencia de sepsis generalizada, la cual, en pocas horas, provocaría cambios histológicos a nivel sistémico, especialmente de carácter pulmonar¹³⁰.

El edema agudo se produce como resultado de una lesión vascular difusa de los vasos de la microcirculación, con deplección por el líquido edematoso y serofibrinoso de las luces alveolares, como consecuencia de una presión capilar anómala¹⁶¹. Como resultado de la isquemia aguda se produce un fallo hemodinámico general. Esta modificación vascular afecta a todos los órganos y especialmente a aquellos más vascularizados, como el pulmón, de manera que las alteraciones hemodinámicas, asociadas a las sustancias que se liberan tras la isquemia, y provocan lesiones capilares, con aumento de la presión, lo que se traduce en una pérdida general de fluidos que afecta severamente al pulmón.

A causa de la isquemia se liberan mediadores inflamatorios y quimioatrayentes de neutrófilos, del tipo de endotoxinas, citoquinas y productos derivados de la cascada del ácido araquidónico; ello provoca una retención de estos elementos celulares en los intersticios; así se explicaría el aumento considerable de infiltrado leucocitario que se observa en el tejido pulmonar. Simpson *et al.*¹⁶² afirman que un porcentaje muy importante de las manifestaciones patológicas producidas en el pulmón tras la I/R mesentérica, se deben a la presencia de polimorfonucleares (PMN), y estas lesiones se atenúan considerablemente por un tratamiento que induzca neutropenia. Encontraron en ratas que una disminución de los neutrófilos

circulantes disminuían hasta en un 80% el aumento de la permeabilidad vascular del pulmón. La presencia de los PMN, además de aumentar la permeabilidad y el edema, se adhieren al endotelio vascular provocando una alteración fisiológica de la respiración como consecuencia de la congestión vascular¹⁶³. Goldman, Welbourn y Klauner⁷¹ demostraron que los procesos de I/R inducen la atracción de PMN de tipo neutrófilo, aumentando considerablemente la permeabilidad vascular, pero estos factores que actúan como quimioatrayentes, inhibían el desplazamiento de los neutrófilos hacia el intersticio, de ahí que aumenten las alteraciones de la microcirculación vascular, puesto que se acumulan en los vasos lesionando el endotelio.

Otro hecho destacado es la manifestación de lesiones recurrentes en los animales provocadas, muy posiblemente por una debilidad tisular o por una disminución de los sistemas de defensa. En efecto, algunos animales presentaron con posterioridad a la isquemia, afecciones pulmonares específicas como neumonías focales o engrosamiento de los tabiques alveolares, no así en los individuos de la serie control ni de la serie *Sham operation*, lo que eliminaría la posibilidad de relacionarse con un efecto secundario de la intervención quirúrgica.

En la revisión de la bibliografía no se ha encontrado un estudio tan prolongado de la supervivencia tras isquemia mesentérica, ni con un estudio histológico de órganos alejados del tejido isquémico, por lo que no existen resultados de referencia de otros autores.

Una posible explicación de las lesiones pulmonares, como consecuencia de IMA, puede ser debida a una debilidad orgánica tras el cuadro de anóxia. La necesidad de remontar una septicemia y un restablecimiento de la homeostasis posterior al ensayo experimental provocaría una disminución de la capacidad inmunológica para evitar infecciones. Es importante tener en cuenta el estado crítico en el que quedan los animales tras el cuadro experimental, en el que deben revertir unas lesiones intestinales de mayor o menor intensidad según el tiempo de anoxia. A esto se añade una recuperación de las funciones vitales, como ingesta de alimento y líquido, recuperación del equilibrio hemodinámico y regulación de la flora bacteriana. Es lógico que después de este estado crítico aparezcan afectaciones patológicas más o menos severas que pueden persistir como crónicas en algunos casos.

5.5.2. HEPÁTICAS.

El estudio macroscópico del hígado durante la necropsia, mostró que los animales fallecidos a causa de la IMA, presentaban alteraciones en las series de mayor duración del tiempo de isquemia; entre ellas destacan congestión y aspecto desvitalizado.

El estudio microscópico mostró, congestión vascular, focos de necrosis y afectación de las células de Kupffer.

El tipo de alteración más común fue el de congestión vascular, provocada, posiblemente, a consecuencia del fallo hemodinámico general. Este dato confirma la lesión hemodinámica sistémica del organismo, puesto que en ningún caso de los animales supervivientes aparecieron congestiones vasculares de importancia, y tan sólo en algún caso se observó congestión vascular discreta.

El hígado es la viscera con mayor metabolismo de todo el organismo, y por la que atraviesa toda la sangre procedente del intestino a través de la circulación portal. Si el hígado recibe sustancias anormales y tóxicas que se están generando como consecuencia de la isquemia, se explica que aparezcan lesiones en él¹⁶⁴. Tanto factores inflamatorios, quimioatrayentes, citoquinas y demás sustancias tóxicas, alcanzarían el torrente sanguíneo sistémico, previo paso a través del hígado. Esto, unido a la presencia de PMN, contribuiría a las lesiones hepáticas, encontradas. Las lesiones más severas que aparecen en el hígado afectan directamente al sistema reticuloendotelial -lesiones en las células de Kupffer-, puesto que este constituye un primer filtro de defensa contra los microorganismos procedentes del intestino, vía vena porta, cuyo desarrollo masivo se ve favorecido por el ambiente anaeróbico. Estas lesiones pueden constituir una de las causas de la génesis del síndrome de fallo multiorgánico¹⁶⁵, si bien el número de animales que presentaron esta afección fue relativamente escaso. Debido a las características especiales del hígado, es explicable la presencia de lesiones aunque no es el órgano que más se ve afectado. Poggetti *et al.*¹⁶⁶ encuentran lesiones hepáticas postisquémicas, pero en ningún caso tan significativas como las del pulmón, y Alea *et al.*¹⁶⁷ apuntan que estas lesiones hepáticas afectan más severamente a su metabolismo que a su propia estructura anatómica.

Se puede concluir que, si bien aparecen lesiones moderadas del hígado, hecho por otro lado explicable, las principales anomalías se encuentran en su funcionamiento. Esto se pone de manifiesto observando los resultados de la valoración analítica de enzimas como las

transaminasas, que en la serie isquémica experimental -serie XIV- aparecen significativamente elevadas.

En las necropsias de los animales sacrificados, que sobrevivieron 9 semanas después de la operación, no se observaron lesiones, lo que confirmaría la escasa relevancia de las lesiones hepáticas, pudiendo ser completamente revertidas durante el tiempo de observación.

En numerosas afecciones hepáticas se produce una hipertrofia de este órgano. En este estudio no se encontraron diferencias significativas entre los pesos del hígado de cada una de las series. Analizados los pesos mediante el test de Kruskal-Wallis, se obtuvo un valor de p de 0,132, resultado no significativo, corroborado por el test de Bonferroni, y con el que se concluye que no existen diferencias entre los pesos hepáticos de ninguna serie.

5.5.3. PANCREÁTICAS.

Dada la peculiar disposición del páncreas de rata, como órgano difuso unido a las primeras porciones del intestino, no fue escogido como pieza para su estudio, pero pudo ser observado en las preparaciones que se realizaron de la AMC y de estructuras adyacentes.

En ningún caso, independientemente de si fallecieron por causas naturales o de si fueron sacrificados a las 9 semanas, se observaron alteraciones morfológicas, macroscópicas ni microscópicas.

En la bibliografía consultada no se han encontrado trabajos que hagan referencia a estudios pancreáticos.

5.5.4. RENALES.

Al igual que en el hígado, las alteraciones renales se presentaron en proporción creciente en relación con el mayor tiempo de isquemia. En las series III, IV y V, no hubo lesiones macroscópicas, en cambio aparecieron en las series VI y VII -120 y 180 minutos de IMA respectivamente-.

Estas bajas tasas de afectación renal se mantienen en el estudio microscópico de las piezas y tan sólo aparecen ligeramente elevadas en la serie VII, donde se manifiesta una

congestión vascular moderada.

Al igual que en el caso del hígado, los riñones no aparecen afectados morfológicamente por la isquemia intestinal; en cambio la respuesta funcional es moderada, y puesta de manifiesto por las alteraciones de urea y creatinina. Tanto en riñones como en hígado existe un aumento en la proporción de las alteraciones, especialmente en la serie VII -180 minutos de IMA-, debida más que a una consecuencia directa de la isquemia mesentérica, al síndrome multiorgánico que se genera después. Este hecho se comprueba en las lesiones renales, puesto que en ninguna serie aparecen muestras de shock renal salvo en la VII, en la que se diagnóstico hasta en un 35% de casos.

No se han encontrado, en la bibliografía revisada, ningún estudio renal tras la isquemia del intestino y tan sólo Stanton *et al.* mencionan un 6% de enfermos con complicaciones renales en un estudio llevado a cabo con 23 pacientes de isquemia mesentérica¹⁶⁸.

No se encontraron alteraciones renales en los supervivientes, y en tan sólo un animal apareció una hidronefrosis, sin relación clara con el proceso isquémico. En cuanto al peso renal no se observaron diferencias significativas entre las diferentes series, valorados mediante ANOVA y confirmado con el test de Bonferroni, obteniéndose unos valores de p no significativos para la homogeneidad de la variancia, presentando ambos riñones pesos muy homogéneos en todas las series, con independencia del tiempo de isquemia.

Puede indicarse que el riñón no es un órgano especialmente vulnerable a la isquemia intestinal.

5.5.5. GANGLIOS LINFÁTICOS.

Debido al pequeño tamaño de los ganglios linfáticos mesentéricos de la rata fueron estudiados microscópicamente, igual que en el caso del páncreas, entre los tejidos que rodeaban a la AMC.

En todos los casos se encontró un estado reactivo normal, similar en los individuos control y en los experimentales, con independencia del tiempo de IMA.

5.5.6. ARTERIA MESENTÉRICA CRANEAL.

Para verificar los resultados y la efectividad del método, era necesario que el tronco arterial no presentara lesiones, a fin de eliminar cualquier variable de confusión que podría haberse generado a causa de una manipulación incorrecta de la arteria, por ejemplo reperfusión inadecuada o formación de trombos.

El 100% de los individuos sometidos a IMA presentó una correcta reperfusión después de la retirada del microclamp que obstruía por completo el flujo de sangre a través de la arteria. Esto se comprobó por observación directa de la recuperación del latido arterial en el momento de la reperfusión.

Macroscópicamente, en los animales que revertieron el cuadro isquémico y que sobrevivieron 9 semanas, la AMC estuvo rodeada por adherencias grasas, que compactaban todo el área afectada, hecho habitual tras cualquier intervención quirúrgica. En cambio los animales que murieron por causas asociadas al proceso experimental -hasta las 60 horas posteriores a dicha operación-, no presentaron adherencias, en relación con el breve tiempo transcurrido.

Microscópicamente se comprobó la permeabilidad total del vaso, con ausencia de trombos, lesiones endoteliales, fibrosis, disminución del calibre etcétera, que hubiesen podido generar un nuevo cuadro isquémico.

Se puede deducir que la arteria fue manipulada correctamente y que las lesiones encontradas, tanto en el intestino, como en el resto de estructuras, se debieron única y exclusivamente al cuadro anóxico y al posterior efecto de la reperfusión, provocado por el pinzamiento de la misma con microclamp atraumático.

5.5.7. ALTERACIONES INTESTINALES

El intestino presenta una irrigación peculiar, con una innumerable red de arterias que se anastomosan entre sí, y que, en casos de necesidad, suplen las deficiencias leves y momentáneas que pueda tener alguna región.

Las áreas más afectadas por una falta de riego sanguíneo son las regiones más distales, quedando atenuados los procesos isquémicos cuanto más próxima está la zona al tronco arterial.

Tales son los casos del yeyuno y del colon proximal, tramos que a pesar de estar regados por la AMC en su mayoría, en casos de necesidad, la ausencia de aporte sanguíneo por parte de la AMC es suplida por el tronco celiaco y la arteria mesentérica caudal respectivamente. En el caso del duodeno o de los porciones distales del colon, regadas por la arteria celiaca y la mesentérica caudal respectivamente, una disminución en el aporte de sangre por cualquiera de estas 2 vías, puede ser suplida momentáneamente por el riego de la mesentérica craneal.

5.5.7.1. Lesiones clínico-patológicas macroscópicas

La gravedad de las lesiones intestinales que aparecieron fueron proporcionales al tiempo de isquemia, siendo máximas en las ratas de la serie VII -180 minutos de isquemia-, y mínimas en las ratas de la serie III -15 minutos de isquemia-.

La mayor parte de la bibliografía revisada hace referencia a las lesiones que se producen a nivel histológico en el intestino, tras períodos prolongados de isquemia, no valorando las alteraciones clínico-patológicas *in vivo* que de ello se derivan.

El estudio del intestino en el momento de la reperfusión, muestra el cambio de la tonalidad de la pared intestinal, con regiones rojo oscuras, distribuidas a lo largo de todo el intestino y repartidas de forma irregular. Igualmente, y a medida que el tiempo de anoxia aumentaba, se observó una extravasación sanguínea en forma de hemorragias intraluminales, apareciendo un 100% de animales con presencia de hemorragia en sábana en la serie VII -180 minutos-, y un 85% en la serie VI -120 minutos-, en la que un 50% de animales presentaron hemorragia en sábana y un 35% hemorragias focales. Esta extravasación masiva hacia el lumen fue también contrastada por Bounous²⁶ quien la describe diciendo que “la serosa presenta un aspecto rojo oscuro por la abundante acumulación de sangre en el lumen”. Bounous realizó un seguimiento en humanos, identificando numerosos parámetros en la descripción del proceso isquémico como mortalidad, síntomas, etiología, alteraciones estructurales, tanto microscópicas como macroscópicas, etcétera.

La pérdida masiva de sangre consecuente al proceso isquémico puede tener repercusiones serias a la hora de la recuperación del animal, puesto que favorece el debilitamiento del animal, y el agravamiento del proceso patológico, ya que implica un posible shock hemorrágico y menor capacidad de recuperación. La rotura masiva de los vasos afectaría inicialmente a aquellos de pequeño y mediano calibre, interconectados directamente con la

mucosa y submucosa, y que pueden ser destruidos por la acción de la isquemia propiamente dicha, acompañada de necrosis celulares, desepitelización masiva de la mucosa y destrucción mural, vertiendo el contenido hacia la luz simplemente por una diferencia de presiones. Animales con esta afección, de carácter muy agudo, tendrían muy mermadas sus posibilidades de revertir el cuadro isquémico, puesto que las lesiones serían prácticamente irreversibles. Martínez *et al.* encuentran en pacientes con cuadros prolongados de isquemia intestinal lesiones irreversibles del intestino, con hemorragia transmural y un aspecto inviable del intestino¹⁶⁹.

La afluencia masiva de sangre al intestino se mezclaría con el mucus intestinal y con el contenido de este, dando una explicación a la presencia de heces hemorrágicas en aquellos animales que realizaron deposiciones en las horas posteriores a la isquemia. Igualmente relacionaría el incremento de los porcentajes de animales con hemorragias intestinales y la mayor presencia de sangre en heces de aquellos con mayor tiempo de isquemia mesentérica.

Aspecto importante es la presencia de un intestino desvitalizado en animales con isquemia mesentérica. Pocos minutos después de la oclusión arterial, el intestino adquiere una tonalidad violácea, rojo oscuro, con congestión y aspecto deslustrado. Cuando el tiempo de isquemia se prolonga, se aprecian áreas de color rojo violáceo más intenso y aspecto desvitalizado siendo tanto más abundantes cuanto mayor es el tiempo de isquemia. Este cuadro es referido en numerosos trabajos como regiones necróticas, seriamente afectadas³¹. Esta manifestación es explicable, por la necrosis isquémica por anoxia. Al no circular la sangre, esta se acumula en las arterias, el latido desaparece y la sangre no se oxigena, tornándose de un color rojo violáceo intenso como consecuencia del acúmulo de CO₂. Este fenómeno se revierte inmediatamente tras la reentrada de sangre, observándose una recuperación del latido y un reestablecimiento de la coloración arterial normal.

Destaca la ausencia de perforación intestinal en todos los animales de las diferentes series, en coincidencia con lo señalado por Bounus²⁶ quien tras realizar un seguimiento en casos humanos con isquemia mesentérica no encontró ningún caso de perforación de la pared del intestino; en cambio, comprobó que enfermos que revirtieron el proceso isquémico y sobrevivieron a este, desarrollaron con más facilidad ulceraciones y erosiones de la pared intestinal. La explicación a la ausencia de roturas en la pared podría hallarse en que el cuadro isquémico es lo suficientemente prolongado como para causar lesiones muy severas e incluso producir la muerte, pero no es suficiente para una rotura completa de la serosa, que produzca

una perforación del tubo intestinal. Joison¹⁷⁰ afirma que en períodos prolongados de ausencia de riego, cuando las lesiones isquémicas se transforman en infarto agudo, se produce la necrosis generalizada con perforación intestinal y los primeros síntomas de peritonitis y sepsis. En algunas ocasiones la pared intestinal se torna por completo necrótica, aunque no se alcanza la perforación intestinal debido a que el animal fallece antes, debido a la gravedad de las lesiones isquémicas. En caso de supervivencia del animal se traduciría en una necrosis lítica que conduciría a la perforación y a la rotura de la pared del intestino. Este hecho es fácilmente contrastable en el caso de la mucosa puesto que la necrosis requiere menos tiempo.

En efecto puede indicarse que a nivel intestinal, la isquemia suficiente en el tiempo produce primero necrosis de coagulación, después lítica, sobre todo a nivel de la mucosa, pero las lesiones de las capas musculares y serosa se produciría con mayor lentitud, y aunque la viabilidad de la pared intestinal ya no se posible, no se verifica la perforación por fallecimiento previo del animal.

Dato característico, observado en los animales sometidos a isquemia, independientemente de la serie, es la mayor manifestación de las placas de Peyer como una protusión en la serosa, y que se observan a los pocos minutos de isquemia, proceso señalado por Ferguson¹⁷¹. Las placas aparecen como nódulos blanquecinos de pequeño tamaño y de superficie granulosa y que se distribuyen a lo largo de todo el intestino delgado, muy posiblemente debido a un adelgazamiento de la pared. Este mismo hecho fue observado por Ortíz Lacorzana *et al.*¹³⁶ estudiando la supervivencia de ratas sometidas a isquemia mesentérica. Pocos autores se hacen eco de esta mayor manifestación de los nódulos linfáticos del intestino. La presencia de hipertrofia de los nódulos linfáticos intestinales pudiera ser una de las claves del aumento del infiltrado linfohistiocitario en tejidos isquémicos y la puesta en marcha de la respuesta inmunológica como consecuencia del shock isquémico. En ningún caso aumenta el número de placas de Peyer distribuidas por el intestino, lo que ocurre es un mayor aumento del tamaño y un cambio de color, sin que se detecte éxtasis linfática secundaria, obstrucción o aumento de la absorción.

Como manifestaciones indirectas producidas durante la isquemia mesentérica, está la presencia de gas intestinal en forma de acumulaciones, a menudo repartidas por el intestino grueso y otras veces como grandes bolsas contenidas en el ciego que llegan a triplicar su volumen normal. Se manifestó progresivamente en relación directa al tiempo de oclusión

vascular, siendo su incidencia prácticamente nula en las series de poco tiempo de anoxia. En la tabla 18, donde figuran los animales con esta característica en el momento de la reperfusión, se comprueba como en las series II y III no aparece ningún animal con exceso de gas en el intestino, en cambio en la serie VII, salvo 1, los 19 restantes presentaron aire intestinal, en diferente cantidad.

Durante la isquemia el ambiente anaerobio crea un microclima favorable para el desarrollo de numerosas especies bacterianas que habitan en los tramos finales del intestino, con una explosión incontrolada del metabolismo bacteriano y la consiguiente hiperproducción gaseosa. Todo esto, unido a la disminución del peristaltismo intestinal, como consecuencia de la anoxia, favorece el acúmulo de bolsas de gas en las porciones distales del intestino¹⁶. Carbonell *et al.* demostraron un aumento significativo de colonias en la luz intestinal, cuando producían I/R experimental en ratas, comprobando también que el número de estas no se reducía tras la reperfusión¹⁷², principalmente Gram negativos y bacterias anaeróbicas¹⁷³. El aumento de colonias bacterianas, sería responsable además de una producción anormal de endotoxinas, induciendo importantes reacciones biológicas¹⁷⁴. No sólo el intestino y las estructuras próximas se ven afectadas por la presencia de endotoxinas, sino que éstas pueden entrar en el torrente sanguíneo y pasar a la circulación sistémica, extendiendo la sepsis a regiones alejadas, principalmente a hígado y pulmones. Koike *et al.*¹⁷⁵, utilizando ratas macho sometidas a 45 minutos de IMA, valoró la actividad mieloperoxidasa en pulmón, encontrando lesiones irreversibles en el mismo como consecuencia de endotoxinas liberadas durante isquemia mesentérica.

5.5.7.2. Lesiones microscópicas.

En todas las especies animales, incluida la humana, la reducción del flujo sanguíneo al intestino produce alteraciones características en la mucosa, tanto más graves cuanto mayor es el tiempo de anoxia tisular. Mientras que los animales con períodos breves de anoxia, sufrieron lesiones que afectaban a las capas internas de la pared intestinal, especialmente a la mucosa, con destrucción del epitelio y daño más o menos severo de la lámina propia, series sometidas a mayor tiempo de IMA presentaban además una afectación importante de la submucosa. Si este tiempo se prolongaba por espacio de 2 horas o más, la destrucción del tejido afectaba a todas las capas, con desaparición completa de mucosa o submucosa y afectación muy severa de las capas musculares, incluso esta afectación alcanzaba los plexos nerviosos del intestino con

destrucción neuronal. También se produjo afectación de la serosa. Además de las lesiones y alteraciones de la estructura celular, la reperfusión provoca también cambios y alteraciones en los componentes de la matriz extracelular, afectando especialmente a la laminina y a la fibronectina, desorganizando la estructura habitual del tejido¹⁷⁶.

Otro hecho evidente, apreciado en el estudio histológico, es una mayor afectación general en el borde antimesentérico, posiblemente debido a que es la parte más distal que fluye desde el eje mesentérico. Las células más próximas a la fuente sanguínea consumen los escasos o nulos nutrientes que puedan transportarse por el sistema circulatorio, y las regiones más alejadas sufren más severamente la anoxia. Haglind *et al.*¹⁷⁷ expusieron dos grupos de ratas a 61 y 85 minutos de isquemia mesentérica respectivamente y determinaron el grado de lesión histológica según una escala de 0 a 5, donde 0 era ausencia de lesiones y 5 destrucción de las vellosidades y disgregación de la lámina propia. Observaron lesiones máximas en el 33% de los animales en la serie de 60 minutos de isquemia, mientras que tras 85 minutos el porcentaje se elevó al 75%. Estos autores realizaron únicamente un estudio microscópico de las alteraciones intestinales, sin tener en cuenta el estudio de supervivencia, de ahí que el tipo de lesiones no se puedan comparar con las del presente trabajo puesto que en este caso, los animales supervivientes revierten la destrucción del epitelio intestinal, no apareciendo lesión alguna tras las 9 semanas.

A nuestro entender esta forma de estudio de las lesiones histológicas sin realizar reperfusión, que como se ha indicado anteriormente, constituye uno de los principales procesos de alteración membranal mediante los procesos de degradación lipídica, puede inducir a errores a la hora de interpretar los resultados. Además, en el trabajo de Haglin no se menciona si algún animal falleció durante el proceso isquémico sin lograr alcanzar el tiempo de isquemia estimado. De ser así y no habersele realizado la toma de muestras inmediatas, el propio proceso de necrosis *postmortem* continúa evolucionando y puede enmascarar el verdadero grado de lesión.

Las lesiones originan un shock, con hemorragias masivas y liberación anormal de productos celulares, como proteasas e hidrolasas que agravan el daño producido por la isquemia. Si las lesiones generadas como consecuencia de la anoxia celular son de gran magnitud, estas se acentúan aún más cuando se restablece la circulación y la sangre oxigenada vuelve a ocupar las arterias intestinales. Incluso Parks y Granger afirman que el cuadro hipóxico por sí solo no juega un papel tan importante en la patogénesis de la isquemia intestinal, sino que

simplemente actúa como llave para iniciar una serie de procesos lesivos que se disparan con la reintroducción de sangre¹⁷⁸. Clark y Gewertz comprobaron este hecho sometiendo a ratas a breves episodios de isquemia seguidos por unos pocos minutos de reperfusión, en los que encontraron más lesiones que si realizaba un tiempo prolongado de isquemia seguido de un único momento de revascularización. Las lesiones microscópicas que encontraban eran más agudas en procesos intermitentes que en cuadros continuos¹⁷⁹. Este hecho viene reforzado por los trabajos de Korthius, Smith y Carden quienes observaron una disminución de las lesiones microscópicas tras isquemia reperfusión, cuando la reoxigenación se efectúa con sangre hipóxica¹⁸⁰. Resultados similares encuentran Perry y Wadha ante la reintroducción gradual de oxígeno tras un episodio de isquemia¹⁸¹. El fenómeno estaría justificado pues si con la reintroducción de sangre se produce una liberación masiva de RLO, formados por diferentes vías, y estos participan incrementando las lesiones en el tejido isquémico, la manera de evitar esta cascada sería controlando la producción de los RL a fin de que estos pudiesen ir destruyéndose con los sistemas antioxidantes del organismo.

En el presente trabajo, y al ser un estudio de supervivencia a largo plazo no se observó la afectación del tejido en diferentes etapas, sino que se comprobaron las lesiones que se producían en los animales fallecidos por "causas naturales" tras el cuadro de isquemia reperfusión, llegando a la conclusión posible de un importante componente anóxico en la gravedad de las lesiones.

Considerando la trascendencia de las lesiones isquémicas y las producidas tras la reentrada de sangre, se estaría de acuerdo en admitir un agravamiento del proceso patológico durante la reperfusión del tejido isquémico, siempre y cuando este mantenga un mínimo de viabilidad tras el shock anóxico. Es muy probable que animales sometido a 3 horas de isquemia, en los cuales existe una afectación masiva de todas las capas, con manifestaciones de infarto transmural y con destrucción del tejido nervioso y hemorragia masiva, la reentrada de oxígeno poco más puede agravar las lesiones, puesto que el animal presenta un intestino totalmente inviable e irrecuperable.

El epitelio intestinal es uno de los tejidos que menos tiempo tardan en renovarse, y continuamente se están generando nuevas células¹⁸². Esto mismo ocurre tras los episodios isquémicos, en los que se produce una espectacular regeneración. Pitha encontró que tan sólo 24 horas eran suficientes para recuperar todo el epitelio perdido tras 60 minutos de isquemia¹⁸³,

cuando la isquemia se prolongaba a dos horas, la estructura normal del tejido se recuperaba tras 48 a 72 horas¹⁸⁴.

En los resultados obtenidos, al tratarse de un estudio a largo plazo -9 semanas-, no se comprobó el tiempo del reestablecimiento normal del epitelio, pero si se encontró que en el 100% de los animales que sobrevivieron durante el período de observación presentaron un epitelio totalmente recuperado, si bien aparecieron en casos aislados, algunos restos de lesión intestinal, remanente. La reepitelización de la mucosa tras la isquemia se comprobó al observar signos de regeneración del epitelio en animales fallecidos entre las 12 y las 60 horas posteriores a la reperfusión, puesto que en algunos casos, los animales presentaban signos evidentes en el intestino de que habían comenzado la reparación del epitelio. Zheng *et al.*¹⁸⁵, empleando ratas con isquemia intestinal con 2 horas de reperfusión, demostraron mediante inmunohistoquímica, que 2 días después del cuadro anóxico la mucosa había iniciado la reepitelización y se habían formado de nuevo las vellosidades aunque presentaban un estado inmaduro y muy delgadas. Tras 4 días de observación constató una regeneración completa de la mucosa intestinal y además indicó que las células del tejido dañado presentaban una tasa de proliferación significativamente mayor que la de individuos control.

La entrada en apoptosis de células supervivientes, tendría efectos terapéuticos puesto que implica un proceso de renovación, mediante reguladores genéticos y factores bioquímicos que podrían prevenir o aliviar las repercusiones de las lesiones producidas por I/R¹⁸⁶.

Un animal sometido a IMA experimental sin lesiones sistémicas agudas, y con un intestino viable, puede recuperarse de las lesiones intestinales por regeneración epitelial, recuperando la funcionalidad y la homeostasis normal que tenía antes de la intervención. Por el contrario, un animal con lesiones severas en el intestino, con afectación del sistema nervioso autónomo entérico, en el que el peristaltismo se ve afectado, y la rotura de vasos de la microcirculación hacen inviable la reentrada de sangre, es muy probable que la reepitelización de la mucosa no se lleve a cabo y que el animal fallezca. Este hecho explicaría en parte la "barrera crítica" de las 60 horas para la supervivencia, puesto que transcurrido este tiempo, los animales supervivientes habrían regenerado el epitelio intestinal, lo que hace que el animal viva, siempre y cuando las lesiones sistémicas no sean especialmente importantes. Sería el caso de los animales muertos con evidentes signos de recuperación intestinal, que fallecieron en los límites próximos a las 60 horas, posiblemente debido a patología no intestinal, pero producida como

consecuencia del síndrome isquémico intestinal. En otro grupo encontraríamos a los animales con un intestino viable, pero que no sobreviven por lesiones extraintestinales o por suma de las lesiones intestinales con las sistémicas. Aquí englobaríamos a los animales de la serie de V -60 minutos de isquemia-, algunos de la serie IV -30 minutos de isquemia-, y a otros de la serie VI -120 minutos de isquemia-. Y, en el caso, opuesto estarían aquellos animales que fallecen a las pocas horas de la reperfusión, con un intestino totalmente inviable. En este último grupo se englobaría un porcentaje importante de los animales de la serie VI -120 minutos de isquemia- y la totalidad de los animales de la serie VII -180 minutos de isquemia-.

5.6. PEROXIDACIÓN LIPÍDICA.

La mucosa intestinal, y particularmente la del intestino delgado, es especialmente sensible a las lesiones producidas por la privación de oxígeno²⁴, pero es durante la revascularización cuando se producen los mayores daños en las células del epitelio¹⁸⁷. Con la llegada de sangre a los tejidos anóxicos se produce una explosión en la formación de RL, que atacan directamente los dobles enlaces de los ácidos grasos poliinsaturados constitutivos de las membranas celulares, formándose endoperóxidos lipídicos, capaces de volver a reaccionar con nuevas moléculas de ácidos grasos de la membrana y repetir el ciclo, o bien metabolizarse para dar lugar a la formación del MDA¹⁸⁸. Este proceso denominado peroxidación lipídica de las membranas celulares, provoca serias alteraciones en la estructura y en la funcionalidad de las células afectadas¹⁸⁹.

La destrucción membranar se inicia, principalmente, con la reintroducción de oxígeno en el medio y son suficientes tan solo 10 minutos de isquemia para que todos estos procesos se disparen. Pero este tipo de reacciones no solo ocurren en procesos patológicos de I/R, sino que en la actualidad se mantiene que numerosas enfermedades cursan con cuadros de peroxidación de las membranas, afectando a la práctica totalidad de los órganos y sistemas¹⁹⁰, con consecuencia a veces fatales para los individuos.

Otamiri sometió a ratas a I/R intestinal y valoró la permeabilidad vascular y cuantificó los niveles de MDA libre en intestino, observando que la isquemia, seguida de reperfusión, incrementaba la permeabilidad vascular y el contenido de MDA libre en la mucosa, asociado a un incremento de la peroxidación lipídica¹⁹¹.

En el presente modelo experimental se sometió a ratas macho a 90 minutos de isquemia y a 30 minutos de reperusión encontrándose un aumento considerable de los niveles de MDA libre que alcanzaron un valor medio de 4,15 (DE=1,643) nmoles de MDA por gramo de tejido, valorado mediante el test del TBA. Los resultados obtenidos cumplieron el supuesto de normalidad, realizado mediante el test de Shapiro-Wilks, con una distribución homogénea de los valores, lo que se traduce en una respuesta similar de todos los animales ante el episodio de I/R.

En la serie control únicamente se tomaron muestras, a fin de establecer los valores normales, observando que la cantidad de MDA libre en yeyuno era indetectable, lo que apoyaba la hipótesis de un incremento significativo de la peroxidación lipídica y de la destrucción celular tras la I/R. Estos resultados coinciden con los obtenidos por otros autores, así Horton y Walker¹⁹² encuentran un aumento de la concentración de MDA en el plasma de tejido isquémico intestinal, determinado mediante HPLC, con respecto a un grupo *Sham* y Van Ye *et al*¹⁹³. obtuvieron un incremento significativo del MDA libre en intestino con tan sólo 10 minutos de isquemia y 60 minutos de reperusión.

El MDA liberado es un metabolito secundario de la actuación de los RL, que puede considerarse como indicador fiable del efecto de éstos sobre las membranas, de modo que su cuantificación libre en el tejido proporcione una aproximación veraz al proceso de peroxidación lipídica y a la génesis de un desequilibrio en el microambiente del tejido anóxico. Esta explosión de RL en el medio no sólo ejerce un efecto lesivo a nivel intestinal sino que es capaz de afectar a órganos más distales, induciendo la destrucción de las membranas. Horton encontró que tras I/R experimental de la AMC en ratas macho se inducía la peroxidación lipídica de las membranas de células cardíacas, agravando las lesiones multiorgánicas⁵¹.

La presencia de RL en el organismo afecta, también, de manera singular a los propios hematíes¹⁹⁴. Aunque sus membranas contienen gran cantidad de sustancias antioxidantes, también son especialmente ricas en ácidos grasos poliinsaturados y además presentan canales aniónicos, a través de los cuales pueden penetrar sustancias como el radical superóxido; éste, en presencia del catión hierro se transforma mediante la reacción de Fenton en radical hidroxilo, agente altamente tóxico. La hemoglobina estimula la peroxidación lipídica debido a la presencia de átomos de hierro en su estructura, generándose una nueva cascada de peroxidación y de liberación de otros RL¹⁹¹. Este hecho explica la posibilidad de valorar la peroxidación lipídica

directamente en plasma tras un episodio de isquemia en cualquier región del organismo⁴¹.

La capacidad de propagación del efecto de la peroxidación actúa como agente agravante de las lesiones en otras regiones del organismo, sumándose de este modo, a la gran cantidad de reacciones adversas que se originan con la anoxia intestinal.

Aunque muy probablemente, la elevada mortalidad que en la actualidad sigue acompañando a cualquier proceso isquémico agudo, y en especial al infarto intestinal, tiene su origen en una innumerable cantidad de reacciones adversas que el propio proceso provoca y que conducen a una muerte por shock sistémico, una de las causas menos tenidas en cuenta es la peroxidación de las membranas, por lo que se estima oportuno valorar los efectos degradativos de las membranas.

El MDA es la molécula que se genera en exceso mediante las reacciones de peroxidación y su presencia en el medio actúa como un agente agravante de las lesiones, puesto que provoca una disminución de la deformación de los eritrocitos e incrementa la viscosidad de la sangre, con el más que posible riesgo de generación de microémbolos a nivel capilar, que obstaculizan la correcta reentrada de sangre¹⁹⁵.

Estos resultados avalan la hipótesis alternativa del presente trabajo, puesto que existe una diferencia manifiesta en los niveles de MDA entre individuos isquémicos e individuos sanos. La isquemia mesentérica induce peroxidación lipídica, iniciada por acción directa de los RL que se generan como consecuencia del proceso.

5.7. PROTECCIÓN DE LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA MEDIANTE EL USO DE SOD.

Desde que en 1980 se demostró la implicación de los RL en los procesos de I/R, y el carácter lesivo de éstos, se han realizado numerosos estudios dirigidos a la utilización de sustancias antioxidantes con el fin de neutralizar o de disminuir sus efectos. Su empleo abarca todo un espectro de posibilidades y compuestos, incluyendo sustancias que el organismo emplea como antioxidantes: vitaminas A, C y E¹⁹⁶, sustancias enzimáticas como SOD, catalasas o glutatión peroxidasa, extractos de plantas¹⁹⁷, aditivos alimentarios como butil hidroxianisol o butil hidroxitolueno⁴⁸, alopurinol, fructosa 1-6 difosfato, o incluso sobredietas de elementos

traza como el selenio¹⁹⁸, etcétera.

En la actualidad, los antioxidantes abundan en concentraciones elevadas en numerosos alimentos, incluso en los preparados especiales para animales de laboratorio. Debido a esta peculiaridad, en el presente trabajo se seleccionó cuidadosamente la alimentación así como las concentraciones de fuentes antioxidantes que en él pudiesen aparecer, puesto que al ser un estudio a largo plazo y relacionado directamente con los RL, se pensó que la alimentación con concentraciones altas de antioxidante posiblemente podrían influir en los resultados finales, especialmente en variar las tasas de mortalidad o a la hora de la medición de las concentraciones finales del MDA. Por ello se detallan en el apartado 3.3.4.2 los constituyentes básicos con su porcentaje correspondiente de la alimentación.

Los resultados confirman el efecto terapéutico de la administración de SOD en los procesos de I/R¹⁹⁹, disminuyendo las lesiones de las membranas celulares, atenuando los procesos de liberación de fosfolípidos de las mismas²⁰⁰ y reduciendo considerablemente los niveles de MDA libre²⁰¹.

Camporro demostró en ratas que el tratamiento con SOD reducía significativamente las alteraciones histológicas y ultraestructurales del tejido muscular esquelético sometido a isquemia y posterior reperfusión²⁰². En el presente trabajo, se comprobó que en la serie sin tratamiento -serie XIV- los niveles de SOD aumentaron considerablemente, mientras que en la serie de isquemia tratada con SOD -serie XIII-, estos valores se mantuvieron constantes sin un aumento cuantificable. Van Ye *et al.* demostraron que al igual que existía un aumento considerable del MDA en el tejido isquémico, con un grado de lesión histológico considerable, cuando trataban a los animales con SOD observaban una disminución significativa de las lesiones en la mucosa¹⁹³. Deshmukh *et al.*²⁰³, en 1997, utilizaron ratones transgénicos con sobreexpresión de Cu/Zn SOD. Los expusieron a 45 minutos de isquemia mesentérica con 4 horas de reperfusión y los compararon con un grupo control de ratones no manipulados genéticamente y sometidos al mismo período de isquemia reperfusión. A continuación cuantificaron los niveles de MDA en intestino para cada uno de los dos grupos y encontraron que los animales transgénicos presentaban unos niveles de MDA significativamente inferiores a los que presentaban los animales del grupo control, demostrando así que la sobreexpresión de SOD reducía las lesiones del epitelio y atenuaba los procesos de peroxidación lipídica durante la I/R.

En este estudio se utilizaron animales macho sometidos a un tiempo de isquemia relativamente moderado, que en ningún caso provocó la destrucción total del tejido. Se ha pensado que al igual que sucede cuando se habla de supervivencia, resulta necesario considerar la gravedad de las lesiones isquémicas. Tiempos de oclusión muy prolongados, en los que el área afectada por la ausencia de circulación se encuentra irreversiblemente lesionada no podría ver atenuadas ni agravadas sus lesiones durante la reentrada de sangre y el efecto de cualquier tratamiento dirigido a la mejora de las lesiones sería prácticamente despreciable²⁰⁴. Por esta razón, y antes de realizar el tratamiento con antioxidantes y valorar la respuesta del organismo, y especialmente la del tejido intestinal, ante la agresión isquémica, se realizó un seguimiento de la evolución de la supervivencia, introduciendo como variable independiente el tiempo de pinzamiento arterial. De este modo se logró obtener una tasa de letalidad próxima al 50%, en las que las probabilidades de vivir o morir fuesen similares. De no utilizar un tiempo conocido de isquemia, se introducirían variables de confusión muy potentes que podrían determinar resultados erróneos.

Según los trabajos realizados por Ceconi *et al.*²⁰⁵, los niveles de MDA libre en el tejido son prácticamente inapreciables durante la isquemia y tras los primeros momentos de la reperfusión, y es transcurridos unos minutos cuando se dispara la peroxidación lipídica y acontecen las reacciones que liberan MDA al tejido. Por lo tanto la peroxidación de las membranas se produce prácticamente por completo en la reperfusión. Gallagher *et al.*²⁰⁶ determinaron que la vida media de la SOD es de aproximadamente 22 minutos. Además Garlick *et al.*²⁰⁷ demostraron por resonancia paramagnética que la liberación de RL se produce principalmente durante los primeros 10 minutos de la reperfusión. Slavikova *et al.* determinaron, por quimioluminiscencia, que en las primeras 4 horas posteriores a la reperfusión se producía un fuerte incremento de la liberación de especies reactivas de oxígeno, y que inmediatamente el organismo ponía en funcionamiento un sistema de protección antioxidante que evitara, en lo posible, la lipoperoxidación de las membranas y que se prolongaba por espacio de 4 días después de la reperfusión²⁰⁸.

Con estos datos diseñamos la estrategia de neutralización de los RL de manera que se infundió parenteralmente la SOD 10 minutos antes de la reperfusión y a los 10 minutos inmediatamente posteriores a ésta, a fin de que la actividad de la enzima fuese máxima en el momento de mayor concentración de radicales.

5.8. SUPERVIVENCIA Y TRATAMIENTO CON SOD.

En el presente trabajo se estudió si el tratamiento con SOD era capaz de modificar los índices de supervivencia en animales a los que se les practicó pinzamiento de la AMC y posterior reperusión, utilizando tiempos similares de isquemia a los que producen el 50% de la mortalidad.

Como se describe en el apartado 4.3, se encontró que animales tratados con SOD mejoraron la tasa de supervivencia pero en ninguno de los sexos se alcanzaron valores estadísticamente significativos. Ortiz-Lacorzana *et al.*²⁰⁹ obtuvieron un aumento de un 65% en la supervivencia de ratas hembras sometidas a isquemia mesentérica con una valoración estadística no significativo. Estos resultados se aproximan a los obtenidos en hembras en el presente estudio, en el que se encontró un aumento del porcentaje de supervivencia del 50%. Por otra parte, Dalsing *et al.*²¹⁰, encontraron que ratas macho tratadas exclusivamente con SOD aumentaban la tasa de supervivencia un 25%, porcentaje similar al obtenido en el presente trabajo para los machos -que fue del 30%- resultando igualmente no significativo estadísticamente.

Este aspecto pone de manifiesto, una vez más, que los RL juegan un papel importante en las lesiones por I/R aunque no son los únicos agentes responsables del cuadro patológico. La muerte de los individuos tras la I/R, depende de muchos factores que se potencian unos a otros, llevando al organismo a un estado de shock irreversible. Probablemente, el efecto incompleto de la SOD reside en la incapacidad de evitar las lesiones de destrucción masiva acontecidas por la falta de oxígeno y en la imposibilidad de prevenir la activación de los neutrófilos, responsables en su mayoría de las lesiones producidas durante la reperusión²¹¹. Granger *et al.* demostraron que el tratamiento con SOD no ejerce un efecto directo sobre la inhibición de adherencia leucocitaria al endotelio de los vasos²¹².

En condiciones fisiológicas normales, las células están provistas de mecanismos de neutralización frente a RL, presentando niveles adecuados de SOD²¹³, tanto en su interior como en líquidos extracelulares. Ambas formas difieren en la masa molecular relativa, y aunque el papel biológico que desempeña la SOD extracelular no está aclarado totalmente, parece ser que se asocia a las superficies de las células endoteliales, protegiéndolas frente a agentes oxidantes¹⁰⁸. Cuando se produce un aporte exógeno de la enzima, los niveles extracelulares se elevan de

forma considerable, aunque el efecto protector que realizan no parece ser muy elevado. Kyle *et al.*²¹⁴ demostraron que es necesario que la enzima sea internalizada en las células por endocitosis a fin de que el efecto protector sea máximo. Este hecho supone una aportación manifiesta a la implicación de la SOD en la supervivencia de los animales. Es probable que animales sometidos a poco tiempo de isquemia, en los que las células no han sufrido un daño grave, tengan más probabilidades de supervivencia que los animales sometidos a un tiempo muy prolongado de isquemia, puesto que las células están más dañadas y el mecanismo de endocitosis más alterado.

El estudio comparativo entre las hembras y los machos no muestra diferencias significativas de la efectividad del tratamiento con SOD; no se puede, por tanto, contradecir la hipótesis nula según la cual el tratamiento con SOD no mejora la tasa de supervivencia.

La SOD sería capaz de reducir, moderar y atenuar las lesiones en el propio órgano isquémico, siempre que este sea en cierto modo viable tras la falta de oxígeno, pero no es capaz de proteger al individuo completo de las consecuencias que se derivan de la insuficiencia de oxígeno que se produce durante el clampaje experimental de la arteria, debido a la acción limitada de las funciones que realiza. Probablemente esta es una de las causas por la que ciertos autores encuentran resultados más evidentes cuando combinan varias sustancias antioxidantes que actúan a diferentes niveles. Homans *et al.*²¹⁵ y Tanaka *et al.*²¹⁶, en los años 1992 y 1993 respectivamente, y de forma individual, estudiaron el efecto sobre tejidos isquémicos del tratamiento combinado a base de SOD y catalasa, encontrando, en ambos casos, una mejora en las lesiones histológicas.

Algunos autores, con el fin de aumentar la supervivencia y disminuir el efecto lesivo de los RL, han administrado la SOD conjugada con sustancias como el polietilenglicol²¹⁷ para aumentar la vida media de la enzima, haciendo que esta se libere gradualmente en el medio y dotando al individuo de un tratamiento con efecto retardado. En el presente trabajo se aplicó la enzima libre, no conjugada a otras sustancias puesto que se consideró que la actuación de los RL es masiva con la reintroducción de sangre oxigenada en el torrente circulatorio, y el efecto de la liberación de la SOD tras las 12 o 24 horas posteriores a la reperusión tendría pocas o nulas propiedades protectoras en el animal.

El tratamiento más eficaz con SOD sería el realizado sobre lesiones que no fueran irreversibles y aplicándolo antes de la aparición masiva de RL, preparando así una primera

barrera protectora y evitando así un pico en la concentración.

6. CONCLUSIONES

- SUPERVIVENCIA.

1ª) Existe una clara relación entre el tiempo de isquemia mesentérica y la mortalidad de los animales sometidos al proceso experimental. Esto se traduce en una evolución de la curva de supervivencia, cuyos valores disminuyen considerablemente según se prolonga la ausencia de riego intestinal.

2ª) Existe un período crítico para la supervivencia situado en torno a las 60 horas desde el momento de la reperfusión, tras pasado el cual, la tasa de mortalidad se hace nula.

3ª) El sexo de los animales resultó ser determinante en cuanto a la mortalidad puesto que, en las mismas condiciones, hay diferencias significativas en las tasas de supervivencia, según se trate de machos o hembras, para tiempos de isquemia comprendidos entre el umbral de mortalidad y la letalidad 100.

4ª) No se ha encontrado relación significativa entre la mortalidad y el peso de los animales.

5ª) La aplicación de tratamiento con SOD en torno al tiempo de isquemia correspondiente a la tasa letal media, independientemente del sexo de los animales, modificó sensiblemente la tasa supervivencia, aunque no de manera significativa.

- DETERMINACIONES ANALÍTICAS.

6ª) Se produjo una elevación estadísticamente muy significativa de: creatinina, fosfoquinasa, aspártico transaminasa, alanin transaminasa, láctico deshidrogenasa, y creatinina; un descenso significativo de urea; y una conservación de los niveles de sodio y gamma glutamil transpeptidasa.

7ª) De la valoración de los parámetros bioquímicos no se han encontrado hallazgos específicos que puedan ser decisivos para el diagnóstico precoz de la isquemia intestinal.

- CLINICO-PATOLÓGICAS.

8ª) La falta de riego se manifiesta por una serie de alteraciones clinico-patológicas severas que conducen a la necrosis intestinal y a la muerte del individuo. Las alteraciones

producidas durante la isquemia mesentérica aguda no se reducen al área afectada por la isquemia, sino que además afectan a órganos alejados, especialmente al pulmón.

9ª) Existe una relación directa entre el tiempo de isquemia y la recuperación de los procesos fisiológicos normales - ingesta de alimento, ingesta de líquido y defecación- después del proceso patológico.

10ª) El tiempo de recuperación anestésica no presentó diferencias significativas entre las distintas series isquémicas. En cambio los animales machos necesitaron menor tiempo de recuperación anestésica, estadísticamente significativo, con respecto a las hembras.

11ª) El peso corporal tras la primera semana del postoperatorio experimentó una disminución no significativa, achacable al proceso quirúrgico, para aumentar después en las siguientes semanas de observación.

• MDA.

12ª) Las concentraciones de malón dialdehído libres, valoradas mediante el test del TBA, en tejido intestinal sano y en tejido isquémico, tratado con SOD, fueron indetectables, mientras que en intestino isquémico no tratado, se obtuvieron valores considerables de MDA.

7. BIBLIOGRAFÍA.

1. Mc Cord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemia tissue injury. *N Engl J Med* 1984; 32 (3): 159-163.
2. Bradbury W, Brittenden J, McBride K, Ruckley CV. Mesenteric ischaemia: a multidisciplinary approach. *Br J Surg* 1995; 82: 1446-1459.
3. Halliwell B, Gutteridge J. *Free radicals in Biology and Medicine*. Clarendon Press. Second Edition. 1989. Free radicals, ageing and disease. Ischemia/reoxygenation injury: 438.
4. Guijarro J. Alteraciones morfológico-funcionales en la isquemia aguda de la arteria mesentérica superior. Efecto de la fructosa 1-6 difosfato: estudio experimental en conejos. 1994. Tesis Doctoral. Departamento de Cirugía de la UCM.
5. Stanton P, Hollier P, Seidel T, Rosenthal D, Clark M, Lamis P. Chronic intestinal ischemia: Diagnosis and therapy. *J Vasc Surg* 1986; 4: 338-344.
6. Halliwell B, Gutteridge J. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 1989. Oxford University Press. Superoxide dismutase. 106.
7. Sheldon W, Crawford M, Brewer R. *The laboratory rat*. Tomo I. 1981. New York: academic press. Morphophysiology: 79.
8. Rohen J, Yokoci C. *Enfermería MOSBY 2000. Atlas de Anatomía*. 1996. Edit. Mosby-Doyma. Arterias de los órganos abdominales: 285.
9. Zuidema, Sackeford. *Cirugía del Aparato Digestivo*. 1995. Ed. Medica-Panamericana. 3ª Edición. (Volumen V). La arteria mesentérica: 98-135.
10. Netter F. *Colección CIBA de ilustraciones médicas*. 1983. Edit. Salvat. Tomo III/2. Sistema digestivo. Conducto inferior. Irrigación del intestino delgado y grueso: 64-68.
11. Netter F. *Colección CIBA de ilustraciones médicas*. 1983. Edit. Salvat. Tomo III/2. Sistema digestivo. Conducto inferior. Drenaje venoso del intestino delgado y grueso: 71-73.
12. Megison S, Horton H, He Chao D, Walker P. A new model for intestinal ischemia in rat. *J Surg Research* 1990; 46: 168-173.

13. Hebel R, Stromberg MW. Anatomy of laboratory rat. Baltimore 1976: 79.
14. Kummerlen C, Seiler N, Galluser M, Gossé F, Knogden B, Hasselmann M, Raul F. Polyamines and the recovery of intestinal morphology and function after ischemic damage in rats. *Digestion* 1994; 55: 168-174.
15. Farreras P, Dozman C. Medicina Interna. 1992. Ediciones DOYMA. 12ª Edición. Gastroenterología. Enfermedades vasculares del intestino: 143-149.
16. Bradbury W, Brittenden J, McBride K, Ruckley CV. Mesenteric ischaemia: a multidisciplinary approach. *Br J Surg* 1995; 82:1446-1459.
17. Horton H. Alterations in intestinal permeability and blood flow in a new model of mesenteric ischemia. *Circulatory Shock* 1992; 36: 134-139.
18. Langer J, Sohal S, Marshall J. Histamine does not mediate mucosal permeability changes after subclinical intestinal ischaemia-reperfusion injury. *J Pediatric Surg* 1993; 28 (9): 1113-1116.
19. Kubes P, Suzuki M, Granger N. Modulation of PAF-induced leukocyte adherence and increased microvascular permeability. *Am J Physiol* 1990; 259: G859-G864.
20. Harry M, Shubin H. Diagnóstico y tratamiento del shock. 1968. Ed. Interamericana. 1ª Edición. Conceptos generales y definiciones. Trastornos del flujo sanguíneo: 11.
21. Kuroda T, Shiohara E, Homma T, Furukawa Y, Chiba S. Effects of leukocyte and platelet depletion on ischemia-reperfusion injury to dog pancreas. *Gastroenterology*. 1994; 107: 1125-1134.
22. Rodés J, Guardia J. Medicina Interna. 1997. Ediciones MASSON SA Multimedia Enfermedades vasculares del intestino. (CD-ROM).
23. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. Patología estructural y funcional. El tracto gastrointestinal 1995. Interamericana. McGraw Hill. España (Madrid). 5ª Edición. Lesión y muerte celular: 3-26.
24. Robinson, Mirkovitch, Winistörfer, Daegesser. Response of the intestinal mucosa to ischaemia. *Gut* 1981; 22: 512-527.

25. Shah K, Shurey S, Green C. Apoptosis after intestinal ischemia-reperfusion injury: a morphological study. *Transplantation* 1997; 64 (10): 1393-1397.
26. Bounus G. Acute necrosis of the intestinal mucosa. *Gastroenterology* 1982; 82 :1457-1467.
27. Hugon J, Bounus G. Intestinal lesions in low flow states: electron microscopic study. SJ Boley Ed. *Vascular disorders of the intestine*. New York: Appleton Century Crofts, 1971; 123-144.
28. Nadel M. Intestinal infarctation. 1998. (<http://155.37.5.42/eAtlas/GI/1285.htm>)
29. Fernandes C. Mesenteric ischemia. 1998. St Paul's Hospital, Vancouver. Canadá. (<http://www.emedicine.com/emerg/topic311.htm>)
30. Instituto Nacional de Estadística. Defunciones según la causa de muerte del año 1995. Resultados Nacionales. Estadísticas del movimiento Natural de la Población. INE. Madrid, Julio 1998.
31. Cuesta, M, Doblas M, García L y Bengoechea A. Isquemia mesentérica aguda. *Cir Urg* 1989; 4: 97-105.
32. Ottinger LW, Austen WG. A study of 136 patients with mesenteric infarction. *Surg Gynecol Obstet* 1967; 124: 251-261.
33. Cappell M, Mikhail N, Gujral N. Gastrointestinal hemorrhage and intestinal ischemia associated with antiocardiolipin antibodies. *Dig Diseases Sci* 1994; 39 (6): 1359-1364.
34. Escartín P, Moreno J. Enfermedades del Aparato Digestivo (IV). Colitis isquémica. *Medicine*. Febrero 1996: 216-218.
35. Kaleya R, Boley S. Acute mesenteric ischemia: An aggressive diagnostic and therapeutic approach. *Can J Surg* 1992; 35: 613-623.
36. Martínez M, Conde R, Gómez D y Puñal J. La isquemia mesentérica aguda: un grave problema en patología digestiva. *Rev Esp Enf Ap Digest* 1985; 68 (2): 121-126.
37. Balthazar E, Liebeskind M, Macari M. Intestinal ischemia in patients in whom small bowel obstruction is suspected: evaluation of accuracy, limitations, and clinical implications of CT in diagnosis. *Radiology* 1997; 205 (2): 519-522.

38. Domenech J. Fundamentos de la teoría de la probabilidad. Pruebas diagnósticas. 1998. Edit SIGNO. Métodos estadísticos en ciencias de la salud. Unidad 3: 45.
39. Valdivieso A, De La Fuente M, Oleagoitia M, Ulacia M, Hernández J. Isquemia mesentérica aguda. *Revista Clínica Española* 1983; 170 (5): 195-198.
40. Masson. Medicina Interna. Enfermedades Vasculares del intestino. 1997 Edición en CD-ROM.
41. Gutierrez C, Carnés J, Aguilera A, Moratinos P. Utilidad del test del TBA en la valoración del MDA como producto final de la peroxidación lipídica: posibles implicaciones terapéuticas. Libro de resúmenes de las Sesiones Científicas del Centenario del Hospital "Gómez Ulla". 1996. 64.
42. Aydin M, Guler O, Ugras S, Bakir B, Sekeroglu R. Blood and tissue findings in the diagnosis of mesenteric ischaemia: an experimental study. *Clin Chem Lab Med* 1998; 36(2): 93-98.
43. Betzler M. Surgical technical guidelines in intestinal ischemia. *Chirurg* 1998; 69 (1): 1-7.
44. Balibrea J. Tratado de Cirugía. Cirugía de paredes y cavidades abdominales. Afecciones mesentéricas y del epiplón. 1989 Ediciones Toray. (Tomo II):259.
45. Chaudry I, Clemens M, Baue A. Alterations in cell function with ischemia and shock and their correction. *Arch Surg* 1981; 116:1309-1317.
46. D. Robertis, De Robertis. Biología celular y molecular. 1990. Edit. El Ateneo. Membrana celular y permeabilidad: 105-110.
47. Sevanian A, Muakkassah-Kelly S, Montestrugue S. The influence of phospholipase A₂ and glutathione peroxidase on the elimination of membrane lipid peroxides. *Arch Biochem Biophys* 1983; 223:441-452.
48. Giménez R. Radicales libres y antioxidantes en clínica humana. 1993. Laboratorios Zambón. Bioquímica, producción y metabolismo de los radicales libres: 12-21.
49. Halliwell B, Gutteridge J. Free Radical in Biology and Medicine. 1989. Oxford University Press. 2ª Edición. Lipid peroxidation: a radical chain reaction: 218.

50. Omar R, Nomikos I, Piccorelli G, Savino J, Agarwal N. Prevention of postischaemic lipid peroxidation and liver cell injury by iron chelation. *Gut* 1989; 30: 510-514.
51. Horton J, White J. Lipid peroxidation contributes to cardiac deficits after ischemia and reperfusion of the small bowel. *Am J Physiol* 1993; 264 (33):H1686-H1692.
52. Janero D. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic Biol Med* 1990; 9: 515-540.
53. Jentzsch A, Bachmann H, Fürst P, Biesalski H. Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. *Free Rad Biol Med* 1996; 20: 251-256.
54. Menger MD, Lehr A, Messner K. Role of oxygen radicals in the microcirculatory manifestations of postischemic injury. *Klin Wochenschr* 1991; 69: 1050-1055.
55. Menger MD, Pelikan S, Steiner D, Messner K. Microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle: significance of "reflow paradox". *Am J Physiol* 1992; 263: H1901-H1906.
56. Morris JB, Bulkley GB, Haglund U. The direct real-time demonstration of oxygen free radical generation and reperfusion following ischemia in rat small intestine. *Gastroenterology* 1987; 92: 1542.
57. Granger N. Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol* 1988; 255: H1269-H1275.
58. Parks D, Williams T, Beckman J. Conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemic rat intestine: a reevaluation. *Am J Physiol* 1988; 254: G768-G774.
59. Granger DN, Hernández LA, Grisham, MB. Reactive oxygen metabolites: Mediators of cell injury in the digestive system. *Viewpoints Dig Dis* 1986; 18:13.
60. Jarash ED, Bruder G, Heid HW. Significance of xanthine oxidase in capillary endothelial cells. *Acta Physiol Scand Sup* 1986; 548: 39-46.
61. Hollwarth, ME, Parks, DA. Ischemia-reperfusion injury: role of oxygen derived free radicals. *Acta Physiol Scand Sup* 1986; 548: 47-64.
62. Langer JC, Sohal SS, Mumford, D. Mucosal permeability in the immature rat intestine: Effects of ischemia-reperfusion, cold stresses, hypoxia, and drugs. *J Pediatr Surg* 1993; 28 (10): 1380-1385.

63. Langer JC, Sohal SS, Riddell RH. Mild intestinal ischemia-reperfusion injury causes an early, transient increase in mucosal permeability in the rat. *J Pediatr Surg* 1991; 26: 502.
64. Langer JC, Sohal SS. Increased mucosal permeability after intestinal ischemia-reperfusion injury is mediated by local tissue factors. *J Pediatr Surg* 1992; 27 (3): 329-332.
65. Langer JC, Sohal SS, Blennerhassett P. Mucosal permeability after subclinical ischemia-reperfusion injury: An exploration of possible mechanisms. *J Pediatr Surg* 1995; 30 (4): 568-572.
66. Welbourn R, Goldman G, Kobzik L, Paterson I, Valeri C, Shepro D, Hetchman H. Neutrophil adherence receptors (CD 18) in ischemia. *J Immunology* 1990; 145: 1906-1911.
67. Patel K, Zimmerman G, Presscott S, McEver R, McIntyre T. Oxygen radicals induce human endothelial cells to express GMP-140 and bind neutrophils. *J Cell Biol* 1991; 112 (4): 749-759.
68. Afors K, Lunberg C, Lindbom L, Lundberg K, Beatty P, Harlan J. A monoclonal antibody to the membrane glycoprotein complex CD 18 inhibits polymorphonuclear leukocyte accumulation and plasma leakage in vivo. *Blood* 1987; 69 (1): 338-340.
69. Brown M, Ross A, Dasher J, Turley D, Ziegler M, O'Neill J. The role of leukocytes in mediating mucosal injury of intestinal ischemia/reperfusion. *J Pediatr Surg* 1990; 25 (2): 214-216.
70. Parks D, Granger N. Role of hydrogen peroxide in ischemic injury to the small intestine. *Gastroenterology* 1984; 86: 1207-1212.
71. Goldman G, Welbourn R, Klauner JM. Ischemia activates neutrophils but inhibits their local and remote diapedesis. *Ann Surg* 1990; 211 (2): 196-201.
72. Granger N, McCord J, Parks D, Hollwarth M. Xanthine oxidase inhibitors attenuate ischemia-induced vascular permeability changes in the cat intestine. *Gastroenterology* 1986; 90: 80-84.
73. Hernández L, Grisham M, Twohig B, Afors K, Harlan J, Granger N. Role of neutrophils in ischemia-reperfusion induced microvascular injury. *Am J Physiol* 1987; 253: H699-H703
74. Gerard C, Gerard N. The pro-inflammatory seven-transmembrane segment receptors of the leukocyte. *C Op Immun* 1994; 6: 140-145.

75. Welbourn C, Goldman G, Paterson I, Valeri C, Shepro D, Hetchman H. Pathophysiology of ischaemia reperfusion injury: central role of neutrophil. *Br J Surg* 1991; 78: 651-655.
76. García A. Cardioprotección frente a radicales libres. *Farmacoterapia* 1996; 13(4): 172-173.
77. Farias L, Willis M, Gregory G. Effects of fructose 1-6 Diphosphate, glucose and saline on cardiac resuscitation. *Anesthesiology* 1986; 65: 595-601.
78. Westhead E, Kiener P, Carrol D, Gikner J. Controll of oxygen delivery from the erythrocyte by modification of piruvate kinase. *Curr Top Cell Regull* 1984; 24: 21-34.
79. Belboul A, Krotkjewski M, Al-Khaja N, Jonnson O, Haralddson G, Roberts D. Can fructose 1-6 Diphosphate (FDP) be an additive to ECC during cardiac surgery?. In *J Angyol* 1994; 3: 134-138.
80. Sawchuck A, Canal D, Slaughter M, Bearman D, O'Connor T Grosfeld J. A comparasion between fructose 1,6-diphosphate, glucose, or normal saline infusions and species-specific blood exchange transfusions in the treatment of bowel ischemia. *Surgery* 1986; 100(4): 665-670.
81. Boornstein J, Lawrence D, Cronenwett J. Pharmacologic treatment of occlusive mesenteric ischemia in rats. *J. Surg Reser* 1988; 44: 555-560.
82. Sun J, Farias L, Markov A. Fructose 1-6 Diphosphate prevents intestinal ischemic reperfusion injury and death in rats. *Gastroenterology* 1990; 98: 117-126.
83. Wang Z, Todani T, Watanable Y, Toki A. The effects of adenosine on the energy metabolism of the reperfused intestine in rats. *Surg Today* 1998; 28 (2): 178-183.
84. Morris J, Haglund U, Bulkley G. The protection from postischemic injury by xanthine oxidase inhibition: Blockade of free radical generation or purine salvage. *Gastroenterology* 1987; 92 (5): 1542.
85. Moya J, Fernández A, Martínez E. Efectos del alopurinol sobre la isquemia mesentérica experimental en la rata. *Rev Esp Enf Digest* 1991; 79 (1): 15-20.
86. Krasna I, Lee R. Allopurinol protects the bowel from necrosis caused by indomethacin and temporary intestinal ischemia in mice. *J Pediatr Surg* 1993; 28 (9): 1175-1177.
87. Rodriguez J. Isquemia-reperusión experimental de intestino delgado: peroxidación lipídica, alteraciones estructurales y efectos del alopurinol. 1994. Tesis Doctoral. Departamento de

Cirugía de la Facultad de Medicina de la UCM.

88. Marubayashi S, Kiyohiko D, Ochi K, Kawasaki T. Role of free radicals in ischemic rat liver cell injury: Prevention of damage by α -tocopherol administration. *Surgery* 1986; 99 (2): 184-192.
89. Bilbao J, García-Alonso I, Portugal P, Barceló P, Apechea A, Méndez J. Eficacia de tratamientos antioxidantes (ácido fólico y alfatocoferol) en las lesiones intestinales inducidas por reperfusión. *Cir Esp* 1992; 51 (4): 262-265.
90. Otamiri T, Lindhall M, Tagesson C. Phospholipase A₂ inhibition prevents mucosal damage associated with small intestinal ischaemia in rats. *Gut* 1988; 29: 489-494.
91. Fernández A, Martínez E, Vega J. Efectos de la prostaglandina E₂ sobre la isquemia mesentérica experimental en la rata. *Rev Esp Enf Ap Digest* 1987, 72 (6): 659-665.
92. Ben-Dahan J, Gross D, Abu-Daluc H, Klin B, Landau E, Nyska A, Krausz M. Effect of prostaglandin and leukotriene antagonists in acute mesenteric artery occlusion. *Eur Surg Res* 1988; 20: 310-319.
93. Massberg S, Leiderer R, González A, Menger M, Messmer K. Carolina rinse attenuates postischemic microvascular injury in rat small bowel isografts. *Surgery* 1998; 123 (2): 181-190.
94. Granero J. Isquemia-reperfusión experimental de intestino delgado: peroxidación lipídica, alteraciones estructurales y efecto de la superóxido dismutasa. 1995. Tesis Doctoral. Departamento de Cirugía de la Facultad de Medicina de la UCM.
95. Fernández E. Efecto de la superóxido dismutasa en la isquemia-reperfusión hepática experimental. 1994. Tesis Doctoral. Departamento de Cirugía de la Facultad de Medicina de la UCM.
96. Horton J, White J. Cardiac contractile injury after intestinal ischemia-reperfusion. *Am J Physiol* 1991; 261: H1164-H1170.
97. Xiao F, Carden D, Alexander S. Reperfusion after 30 minutes of intestinal ischemia does not influence plasma cytokine levels in rat. 1998. (<http://gema.library.ucsf.edu:8081/Originals/SAEMabs/SA260.html>).

98. LaNoue J, Iglesias J, Rogers T, Kim L, Meng Y, Myers S, Turnage R. Alveolar macrophage response to remote organ injury. *Shock* 1998; 9(4): 261-265.
99. Lee W, Ku H, Lee L, Chen Y. Hepatic portal venous gas associated with acute mesenteric infarctation. A case report. *Kao Hsiung I Hsueh Ko Tsa Chih* 1997; 13 (8): 520-524.
100. Schutz A, Eichinger W, Breuer M, Gansera B, Kember B. Acute mesenteric ischemia after open heart surgery. *Angiology* 1998; 49 (4): 267-273.
101. Halliwell B, Gutteridge J. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 1989. Oxford University Press. Protection against oxidants in biological systems. Protection by enzymes: 106.
102. Getzoff E, Tainer J, Weiner P, Kollman P, Richardson J, Richardson D. Electrostatic recognition between superoxide and copper, zinc superoxide dismutase. *Nature* 1983; 306:287-289.
103. Rousseau P. Superoxide dismutases.- Production and therapeutic potential. *Phar Tech Eur* 1996; 8 (9): 24-28.
104. Freeman B, Rosen G, Barber M. Superoxide perturbation of the organization of vascular endothelial cell membranes. *J Biol Chem* 1986; 261 (14): 6590-6593.
105. Halliwell B, Gutteridge J. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 1989. Oxford University Press. Protection against oxidants in biological systems. Proteccion by enzymes: 87-121.
106. Tainer J, Getzoff E, Richardson J, Richardson D. Structure and mechanism of Cupper, Zinc superoxide dismutase. *Nature* 1983; 306: 284-287.
107. Marklund S. Human cooper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. *Proc Natl Acad Sci* 1982; 79: 7634-7638.
108. Marklund S. Extracellular superoxide dismutase in human tissues and human cell lines. *J Clin Invest* 1984; 74: 1398-1403.
109. Hass, M., Massaro, D. Differences in CuZn superoxide dismutase induction in lungs of neonatal and adult rats. *Am J Physiol* 1987; 253 (22): C66-C70.
110. Domenech J. El modelo de investigación científica: Diseño de estudios. 1998. Métodos estadísticos en ciencias de la salud. Unidad 7: 7-67.

111. Diario Oficial de las Comunidades Europeas 18.12.86 N°L358/1 a N°L358/28. Líneas directrices relativas al alojamiento y a los cuidados de los animales. Anexo II al artículo 5 de la Directiva del Consejo de 24 de Noviembre de 1986 respecto a la protección de los animales utilizados para la experimentación y otros fines científicos. (86/609/CEE).
112. Guijarro F, Moratinos P, Aguilera A. Perfil de la supervivencia durante diferentes tiempos de isquemia mesentérica: estudio experimental. *Cir Esp* 1995; 6: 493-496.
113. Carnés J, Moratinos P, Gutiérrez C, Aguilera A, Guijarro F. Curva de supervivencia en el síndrome de isquemia-reperfusión de la arteria mesentérica craneal: estudio experimental en ratas. *Med Mil (Esp)*1997; 53 (3): 211-216.
114. Boyd A, Sherman I, Saibil F, Mamelak M. The protective effect of γ -hydroxybutyrate in regional intestinal ischemia in the hamster. *Gastroenterology* 1990; 99: 860-862.
115. García J, Martín C, Ludeña M, Gómez A. Isquemia revascularización intestinal y producción de radicales libres del oxígeno (RLO). *Cir Esp* 1993; 54 (Suplemento 1): 68.
116. Omar R, Nomikos I, Piccorelli G, Savino J, Agarwal N. *Gut* 1989; 30: 510-514.
117. Bulkley G. Free radicals and other reactive oxygen metabolites: Clinical relevance and the therapeutic efficacy of antioxidant therapy. *Surg* 1993; 113 (5): 479-483.
118. Perry M, Wadhwa S. Gradual reintroduction of oxygen reduces reperfusion damage injury in cay stomach. *Am J Physiol* 1988; 254: G366-G372.
119. Freeman B, Rosen G Barber M. Superoxide perturbation of the organization of vascular endothelial cell membranes. *J Biol Chem* 1996; 261(14): 6590-6593.
120. Robinson, Mirkovitch, Winistörfer, Saegesser. Response of the intestinal mucosa to the ischemia. *Gut* 1981; 22: 512-527.
121. Schoenberg M, Muhl E, Sellin D, Younes M, Schildberg W, Haglund U. Posthypotensive generation of superoxide free readicals possible role in the pathogenesis of the intestinal mucosal damage. *Acta Chir Scand* 1984; 150:301-309.
122. Kanwar S, Kubes P. Mast cells contribute to ischemia-reperfusion-induced granulocyte infiltration and intestinal dysfunction. *Am J Physiol* 1994; 267: G316-G321.

123. Sisley A, Desai T, Harig J, Gewertz B. Neutrophil depletion attenuates human intestinal reperfusion injury. *J Surg Res* 1994; 57: 192-196.
124. Fontes B, Moore F, Moore E, Koike K, Kim F, Trew C, Peterson V. Gut ischemia induces bone marrow failure and increases risk of infection. *J. Surg Res* 1994; 57: 505-509.
125. Lorente A, Fernández P, Marcos M, Mon E, Guigou N, Pascual T, Delgado M. Disfunción multiorgánica y cambios histológicos en la sepsis experimental. *Med Intensiva* 1996; 20 (7): 333-339.
126. Gil J, Bello M, Rojas A, Rodriguez J, Martínez P, López J. Lipoperoxidation in three different anesthesiologic procedures. 1996. VIII Biennial Meeting International Society for Free Radical Research. Abstract Book.
127. Korthius R, Jerome S. Mechanism of neutrophil-dependent reperfusion injury. *J Vascular Surg* 1993; 18 (1): 116.
128. Korthius R, Granger D, Townsley M, Taylor A. The role of oxygen derived free radicals in ischemia-induced increases in canine skeletal muscle vascular permeability. *Circ Res* 1985; 57: 599-609.
129. Fontes B, Moore F, Moore E, Koike K, Kim F, Trew C, Peterson V. Gut ischemia induces bone marrow failure and increases risk infection. *J Surg Res* 1994; 57: 505-509.
130. Lorente J, Fernández P, Marcos M, Mon E, Guigou N, Pascual T, Delgado M. Disfunción multiorgánica y cambios histológicos en la sepsis experimental. *Medicina intensiva* 1996; 20 (7): 333-389.
131. Payan H, Conard J. Carotid ligation in gerbils. Influence of age, sex and gonads. *Stroke* 1977; 8 (2): 194-196.
132. Koida M, Nakamuta H, Yasuda K, Muguruma K, Hiramatsu Y, Okawa Y, Kato Y. Carbon monoxide induced hypoxia in mice: evaluation as an experimental model of cerebral ischemia for drug screening. *Jpn J Pharmacol* 1989; 51 (2): 273-278.
133. Bronner J, Boissel P. Acute ischemia and arterial mesenteric infarction in patients aged over 75. Apropos of a comparative series of 38 cases. *J Chir* 1997; 134 (3): 109-113.

134. Cano A. Los estrógenos podrían actuar como barredores de radicales libres. *Noticias médicas* 1996; 6: 493-496.
135. Zhang Y. Effects of genger and estradiol treatment on focal brain ischemia. *Brain Res* 1998. 784 (1-2): 321-324.
136. Ortiz-Lacorzana J, García-Alonso I, Portugal V, Méndez J. Influencia del peso corporal y del período de isquemia mesentérica aguda en la mortalidad de ratas sometidas a revascularización intestinal. *Rev Esp Enf Digest* 1990; 77 (4): 263-267.
137. Carnés J, Moratinos P, Gutiérrez C, Pérez-Iñigo F, Aguilera A, Guijarro F. Evolución de la isquemia mesentérica aguda. Relación sexo-supervivencia: estudio experimental en ratas. *Med Mil (Esp)* 1998; 54 (1): 19-22.
138. Camporeni E, Greeley W, Lumb P, Watkins W. *Tratado de Patología Quirúrgica. Volumen IDC. Sabinston 13ª ed.* Madrid Interamericana. McGraw Hill, 1988. Anestesia: 168-188.
139. Guijarro J. Moratinos P, Delgado J. Aguilera A. Recuperación postoperatoria: influencia del tiempo de isquemia mesentérica aguda y del tratamiento con fructosa 1-6 difosfato. Estudio experimental en conejos. *Med Mil (Esp)* 1997; 53 (2): 109-113.
140. Morton D, Griffiths H. Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animals and an hypothesis for assessment. *Vet Record* 1985; 116: 431-436.
141. Kimura E, Hashimoto K, Furukawa S, Hayakawa H. Changes in bradykinin level in coronary sinus blood after the experimental occlusion of a coronary artery. *Am Heart J* 1973; 85: 635-647
142. Longhurst J, Kaufman M, Ordway G, Mush T. Effects of bradikinin and capsaicin on endings of afferent fibers from abdominal visceral organs. *Am J Physiol* 1984; 247: R552-R559.
143. Longhurst J, Dittman L. Hypoxia, bradykinin, and prostaglandins stimulate ischemically sensitive visceral afferents. *Am J Physiol* 1987; 253: H556-H-567.
144. Ringler D, Dabich L. *Laboratory rat.* 1983. Tomo I. The digestive system. 78
145. Haywood B, Britton S, Gordon P. In vivo noninvasive observation of acute mesenteric ischemia in rats. *Surg Gynecol Obst* 1987; 164:409-414.

146. Gonze M, Murray M, Kessler G, Olson P, Cobb C. Serum D(-)- lactate as a marker of intestinal ischemia. 1997. Digestive disease Week. (<http://www.ssat.com/97ddw/ddw57.htm>).
147. Sachs S, Morton J Schwartz S. Acute mesenteric ischemia. Surg 1982, 10:646-653.
148. Graeber G, Cafferty P, Reardon M, Curley C, Ackerman N, Harmon J. Changes in serum total creatine phosphokinase (CPK) and its isoenzymes caused by experimental ligation of the superior mesenteric artery. Ann Surg 1981; 193(4): 499-505.
149. Smith E, Egan J, Bugelski P, Hillegass L, Hill D, Griswold D. Temporal relation between neutrophil accumulation reperfusion injury. Am J Physiol 1988; 255: H1060-H1068.
150. Das D, Engelman R, Rousou J, Breyer R, Otani H, Lemeshow S. Role of membrane phospholipids in myocardial injury induced by ischemia and reperfusion. Am J Physiol 1986; 251: H71-H79.
151. Rawn J. Bioquímica. Volumen II. Editorial Interamericana McGraw-Hill. 1ª Edición. 1989. Biología molecular de la célula. Las proteínas contráctiles y el citoesqueleto: 1086
152. Sánchez L. El síndrome de revascularización intestinal. Estudio experimental. Rev Quir Esp 1980; 7(3): 134-140.
153. Rawn J. Bioquímica. Volumen I. Editorial Interamericana McGraw-Hill. 1ª Edición. 1989. La generación y el almacenamiento de la energía metabólica: 237.
154. Lorenz, A. Lactic acidosis: a nursing challenge. Crit Care 1989; 9(4): 64-73.
155. Suso Alea F, Gómez Alonso A, Gonzalez Orus J, García J, Cuadrado Idoyaga F y Ramos Hidalgo A. Repercusión hepática de la isquemia intestinal aguda. Estudio experimental. Rev Esp. Enf. Ap. Digest, 1988; 74(3): 219-224.
156. Pérez M, Gómez A, Pérez A y Battaner E. Función hepática e isquemia intestinal. Cir Esp 1980; 34 (2): 93-102.
157. Strunin, L. El hígado y la anestesia. Ed Salvat. 1ª Edición. Barcelona 1981.
158. Caulin C, Isal J, Dahan R. Les explorations biologiques en pathologie hépato-biliaire. 1981. Encyclopedie Medico-Chirurgicale. Paris.

159. Horne M, Swearingen P. Líquidos, electrolitos y equilibrio ácido-base. 1995. Ed. Mosby/Doyma: 47.
160. Schmeling D, Caty G, Oldham T, Guice K, Hinshaw D. Evidence for neutrophil related acute lung injury after intestinal ischemia-reperfusion. *Surgery* 1989; 106:195-202.
161. Donner C, Donner K. The critical difference: pulmonary edema. *Am J Nurs* 1988; 88:59.
162. Simpson R, Alon R, Kobzik L, Valeri R, Shepro D, Hechtman H. Neutrophil and nonneutrophil injury in intestinal ischemia-reperfusion. *Annals Surg* 1993; 218 (4): 444-454.
163. Lewis M, Whatley R, Cain P, McIntyre T, Prescott S, Zimmerman G. Hydrogen peroxide stimulates the synthensis of platelet-activating factor by endothelium and induces endothelial cell-dependent neutrophil adhesion. *J Clin Invest* 1988; 82: 2045-2055.
164. Vollmar B, Menger M, Glasz J, Leiderer R, Messmer K. Impact of leukocyte-endothelial cell interaction in hepatic ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol* 1994; 267: G-786-793.
165. Carrico J, Meakins J. The gastrointestinal tract: the motor of multiple organ failure. *Arch Surg* 1986; 121:197-201.
166. Poggetti R, Moore F, Moore E, Bensard D, Anderson B Banerjee A. Liver injury is a reversible neutrophil-mediated event following gut ischemia. *Arch Surg* 1992; 127: 175-179.
167. Suso Alea F, Gómez A, Gonzalez J, García J, Cuadrado F, Ramos A. Repercusión hepática de la isquemia intestinal aguda. Estudio experimental. *Rev Esp Enf Ap Digest* 1988; 74(3): 219-224.
168. Stanton P, Hollier P, Seidel T, Rosenthal D, Clark M, Lamis P. Chronic intestinal ischemia: Diagnosis and therapy. *J Vasc Surg* 1986; 30(1): 338-344.
169. Martínez M, Conde R, Gómez D, Puñal J. La isquemia mesentérica aguda: un grave problema en patología digestiva. *Rev Esp Enf Ap Digest* 1985; 68 (2): 121-126.
170. Joison J. Infarto intestinal por oclusión de las arteria principales. *Tratado de Gastroenterología y hepatología*. Edit. Salvat 1982. Tomo I.
171. Ferguson A: Models of immunologically driven small intestinal damage. *Immunopathology of the small intestine*. Chichester, John Wiley 1987: 225-252.

172. Carbonell C, Borrás M, García E, Camps B, Carbonell C. Estudio experimental de la isquemia aguda intestinal y su revascularización. Aspectos bacteriológicos. *Cir Esp* 1978; 32 (2): 99-104.
173. Cuevas P, Fine J. Demonstration of a lethal endotoxemia in experimental occlusion of the superior mesenteric artery. *Surg Gynecol Obstet* 1971; 25:81.
174. Sugino K, Dohi K, Yamada K, Kawasaki T. Changes in the levels of endogenous antioxidants in the liver of mice with experimental endotoxemia and the protective effects of the antioxidants. *Surgery* 1989; 105: 200-206.
175. Koike K, Moore F, Moore E, Pogetti R, Tuder R, Banerjee A. Endotoxin after gut ischemia/reperfusion causes irreversible lung injury. *J Surg Research* 1992; 52: 656-662.
176. Mueller A, Platz K, Heckert C, Häusler M, Guckelberger O, Schuppan D, Lobeck H, Neuhaus P. The extracellular matrix. *Transplantation* 1998; 65 (6):770-776.
177. Haglin E, Haglund U, Lundgren O, Stenberg B. Mucosal lesion of the small intestine after intestinal vascular obstruction in the rat. *Acta Chir Scand* 1985; 151: 147-150.
178. Parks D, Granger N. Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation. *Am J Physiol* 1986; 250 (13): G749-G753.
179. Clark E, Gewertz B. Intermittent ischemia potentiates intestinal reperfusion injury. *J Vasc Surg* 1991; 14: 601-606.
180. Korthius R, Smith K, Carden D. Hypoxic reperfusion attenuates postischemic microvascular injury. *Am J Physiol* 1989; 256 (25): H315-H319.
181. Perry M, Wadha S. Gradual reintroduction of oxygen reduces reperfusion injury in cat stomach. *Am J Physiol* 1988; 254 (17): G366-G372.
182. Johnson L, McCormack S. Regulation of gastrointestinal mucosal growth. *Physiology of the gastrointestinal tract* (3ª Edición). 1994. New York Raven: 611-641.
183. Pitha J. The fine structure of regenerating epithelium in the small intestine. *Cell Pathol* 1971; 7: 314-341.
184. Robinson J, Haround M, Winistörfer B, Mirkovitch V. Recovery of function and structure of dog ileum and colon following two hours acute ischemia. *Europ J Clin Invest* 1974; 4: 443-

452.

185. Zheng S, Jin B, Caty M, Tjota A. Mucosa cell regeneration following intestinal ischemia/reperfusion injury in rats. *Chin Med J* 1997; 110 (5): 338-340.

186. Shah K, Shurey S, Green C. Characterization of apoptosis in intestinal ischaemia-reperfusion injury. A light and electron microscopic study. *Int J Exp Pathol* 1997; 78 (5): 355-363.

187. Nilsson U, Schoenberg M, Aneman A, Poch B, Magadum S, Beger H, Lundgren O. Free radicals and pathogenesis during ischemia and reperfusion of the cat small intestine. *Gastroenterology* 1994; 106:629-636.

188. Rodriguez J, Granero J, Martínez E. Reperusión intestinal: Fundamentos fisiopatológicos de sus perspectivas terapéuticas. *Rev Esp Enf Digest* 1997; 89 (1): 39-45.

189. Grace P. Ischaemia-reperfusion injury. *Br J Surg* 1994; 81: 637-647.

190. Sevanian A, Hochstein P. Mechanisms and consequences of lipid peroxidation in biological systems. *Ann Rev Nutr* 1985; 5: 365.

191. Otamiri T. Oxygen radicals, lipid peroxidation, and neutrophil infiltration after small-intestinal ischemia and reperfusion. *Surgery* 1989; 105: 593-597.

192. Horton H, Walker P. Oxygen radicals, lipid peroxidation and permeability changes after intestinal ischemia and reperfusion. *J Appl Physiol* 1993; 74 (4): 1515-1520.

193. Van Ye T, Roza A, Pieper G, Henderson J, Johnson C, Adams M. Inhibition of intestinal lipid peroxidation does not minimize morphologic damage. *J Surg Res* 1993; 55: 555-558.

194. Clemens MR, Waller H. Lipid peroxidation in erythrocytes. *Chem Phys Lipids* 1987; 45: 251.

195. Otamiri, T. Oxygen radicals, lipid peroxidation, and neutrophil infiltration after small-intestinal ischemia and reperfusion. *Surgery* 1989; 5:593-597.

196. Lubin B, Machlin L. Vitamin E: Biochemical haematological and clinical aspects. *Ann N Y Acad Sci* 1982; 393: 505.

197. Otamiri T, Tagesson C. L'extrait de Ginkgo biloba previent les deteriorations muqueuses associés á une ischémie de l'intestine grêle. *Scand J Gastroenterol* 1989; 24 (6): 660-670.
198. Bauer P, Belleville-Nabet F, Dubois F, Larcan A. Selenium, oxygen-derived free radicals, and ischemia-reperfusion injury. An Experimental study in the rat. *Biol Trace Elem Res* 1995; 47: 157-163.
199. Dalsing M, Sieber P, Grosfeld J. Ischemic bowel: The protective effect of free-radical anion scavengers. *J Pediatr Surg* 1983; 18: 364-368.
200. Chakraborti S, Gurtner G, Michael J. Oxidant-mediated activation phospholipase A₂ in pulmonary endothelium. *Am J Physiol* 1989; 257: L430-L437.
201. Holt S, Gunderson M, Joyce K. Myocardial tissue iron delocalization and evidence for lipid peroxidation after two hours of ischemia. *Ann Emerg Med* 1986; 15: 1155-1159.
202. Camporro D. Papel de la SOD en la isquemia reperusión del músculo esquelético. 1997. Tesis Doctoral. Departamento de Cirugía y especialidades médico-quirúrgicas. Facultad de Medicina. Universidad de Oviedo.
203. Deshmukh DR, Mirochnitchenko O, Ghole V, Agnese D, Shah P, Reddell M, Brolin R, Inouye M. Intestinal ischemia and reperfusion injury in transgenic mice overexpressing copper-zinc superoxide dismutase. *Am J Physiol* 1997; 273 (4): C1130-C1135.
204. Alonso J, García D, Soriano J, Botas J, Fernández F, Muñoz R, Durán J, Elizaga J, Esteban E, Theroux P. Infusión intracoronaria de superóxido dismutasa durante la liberación de radicales libres del oxígeno inducida por la reperusión. Efecto sobre el tamaño del infarto tras 60 minutos de oclusión coronaria en el modelo porcino. *Rev Esp Cardiología* 1991; 44 (7): 462-472.
205. Ceconi C, Cargnoni A, Pasini E, Condorelli E, Curello S, Ferrari R. Evaluation of phospholipid peroxidation as malondialdehyde during myocardial ischemia and reperfusion injury. *Am J Physiol* 1991; 260: H1057-H1061.
206. Gallagher KP, Buda A, Pace D, Gerren A, Shalafar M. Failure of superoxide dismutase and catalase to alter size of infarctation in conscious dogs after 3 hours of occlusion followed by reperfusion. *Circulation* 1986; 73: 1065-1073.

207. Garlick PB, Davies M, Hearse D, Slater T. Direct detection of free radicals in the reperfused rat heart using electron spin resonance spectroscopy. *Cir Res* 1987; 76: 678-686.
208. Slavikova H, Lojek A, Hamar J, Duskova M, Kubala L, Vondrazek J, Ciz M. Total antioxidant capacity of serum increased in early but not late period after intestinal ischemia in rats. *Free Radic Biol Med* 1998; 1 (25): 9-18.
209. Ortiz Lacorzana J, García-Alonso I, Apecechea A, Iturburu I. The immune system and oxygen derived free radicals in small bowell reperfusion injury in the rat. *Research in Surgery* 1990; 2 (3): 106-111.
210. Dalsing M, Grosfeld J, Shiffler M, Vane D, Hull M, Baehner R, Weber T. Superoxide dismutase : a cellular protective enzyme in bowell ischemia. *J Surg Res* 1983; 34: 589-593.
211. Korthius R, Grisham M, Granger N. Leukocyte depletion attenuates vascular injury in postischemic skeletal muscle. *Am J Physiol* 1988; 254 (23): H823-H827.
212. Granger N, Benoit J, Suzuki M, Grisham M. Leukocyte adherence to venular endothelium during ischemia-reperfusion. *Am J Physiol* 1989; 257 (20): G683-G688.
213. Marklund S. Superoxide dismutase in human tissues, cells, and extracellular fluids: Clinical implications. *Free Radicals, Aging and Degenerative Diseases* 1986; 1: 509-526.
214. Kyle M, Nakae D, Sakaida I, Miccadei S, Farber J. Endocytosis of superoxide dismutase is required in order for the enzyme to protect hepatocytes from the toxicity of Hydrogen peroxide. *J Biol Chem* 1988; 263 (8): 3784-3789.
215. Homans D, Asinger R, Pavek T, Crampton M, Lindstrom P, Peterson D, Bache R. Effect of superoxide dismutase and catalase on regional dysfunction after exercise-induced ischemia. *Am J Physiol* 1992; 263 (2): H392-H398.
216. Tanaka M, Richard V, Murry C, Jennings R, Reimer K. Superoxide dismutase plus catalase therapy delays neither cell death nor the loss of the TCC reaction in experimental myocardial infarction in dogs. *J Mol Cell Cardiol* 1993; 25 (4): 367-378.
217. Galinanes M, Ferrari R, Qiu Y, Cargnoni A, Ezrin A, Hearse D. PEG-SOD and myocardial antioxidant status during ischaemia and reperfusion: dose-response studies in the isolated blood perfused rabbit heart. *J Mol Cell Cardiol* 1992; 24 (9): 1021-1030.