

Universidad Complutense de Madrid
Departamento de Cirugía

ISQUEMIA-REPERFUSION EXPERIMENTAL DE INTESTINO DELGADO:
PEROXIDACION LIPIDICA, ALTERACIONES ESTRUCTURALES Y
EFECTOS DEL ALOPURINOL

José Ignacio Rodríguez García
Noviembre de 1994



C/. Julián Clavería, s/n.
Teléfono (98) 510 35 80
33006-OVIEDO

*Universidad de Oviedo
Facultad de Medicina
Cátedra de Cirugía
Prof. Dr. E. Martínez*

D. José Ignacio Rodríguez García

ENRIQUE MARTÍNEZ RODRÍGUEZ, CATEDRÁTICO DE CIRUGÍA
DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE OVIEDO,

CERTIFICA:

Que el trabajo que presenta D. José Ignacio Rodríguez
García titulado;

"Isquemia-reperfusión experimental de intestino delgado:
Peroxidación lipídica, cambios estructurales y efectos
del Alopurinol".

ha sido realizado bajo la dirección y supervisión del
abajo firmante y a su juicio reúne los requisitos neces-
arios para ser leído y defendido como Tesis Doctoral.

Oviedo, 17 de Octubre de 1994

Fdo.: Prof.Dr. E. Martínez

A Belén,
a mis padres.

AGRADECIMIENTOS

Al Profesor Dr. E. Martínez Rodríguez por su apoyo y estímulo constantes.

Al Profesor Dr. J.L. Balibrea Cantero por su tutoria en el programa de doctorado.

Al los Drs. J.E. Granero Trancón, F. Parra Fernández, P. Gonzalvo Rodríguez y a todos los componentes del grupo de trabajo en la linea de investigación "Isquemia-Reperfusión" de la Cátedra de Cirugía de la Universidad de Oviedo, por su colaboración.

A los técnicos del Servicio de Microscopía Electrónica por sus consejos prácticos.

A la Srta. Charo Martínez por su ayuda desinteresada y permanente.

INDICE

Página

1. JUSTIFICACION	1
2. ESTADO ACTUAL DEL TEMA	4
3. HIPOTESIS Y OBJETIVOS	60
4. MATERIAL Y METODOS	63
5. RESULTADOS	88
6. DISCUSION	131
7. CONCLUSIONES	141
8. BIBLIOGRAFIA	144

1. JUSTIFICACION

La isquemia intestinal, generalmente como tromboembolismo mesentérico, define por sí misma un cuadro clinico-patológico preciso que afecta a un número creciente de enfermos; para los cuales es, con frecuencia, causa de muerte.

Oservaciones recientes, clínicas y experimentales, han evidenciado que, además de en la situación anterior, el daño sobre el tubo gastrointestinal por isquemia puede aparecer en la evolución de múltiples procesos, sobre todo del ámbito quirúrgico, donde hay un defecto de perfusión sanguínea producido por la interrupción del flujo debido a causas locales o sistémicas.

Las especies moleculares denominadas radicales libres de oxígeno, generados en la reperfusión que necesariamente ha de seguir a la isquemia si se pretende mantener la vitalidad celular, al actuar en el intestino, producen un daño de especial significación. Se ven implicados en la patogenia de entidades tan importantes como el fallo multiorgánico, presente en muchos pacientes en el postoperatorio inmediato durante su ingreso en unidades de cuidados intensivos.

Con la intención de participar en los nuevos avances de la fisiopatología de la isquemia-reperfusión intestinal, entre los que se incluyen los efectos de los radicales libres de oxígeno, se diseña un modelo experimental que remeda

circunstancias quirúrgicas concretas de isquemia intestinal. Sobre éste se estudia la peroxidación lipídica, como parte importante de los trastornos bioquímicos que se producen, los cambios estructurales inducidos y el posible papel protector que tiene en estas situaciones un antioxidante. Se valoran los cambios en el nivel de malondialdehído y las alteraciones histológicas y ultraestructurales de la mucosa intestinal sometida a isquemia normotérmica y los efectos que tienen la reperfusión y la administración de alopurinol.

Con este trabajo se pretende profundizar en el conocimiento de los fenómenos metabólicos que acontecen en circunstancias reales del quehacer quirúrgico y buscar fórmulas que nos permitan mejorar la atención de algunos de nuestros enfermos ante los que generalmente nos sentimos muy impotentes.

2. ESTADO ACTUAL DEL TEMA

2.1. Introducción

La palabra isquemia deriva de las griegas "ishein", carencia, y "haima", sangre. Se define entonces como isquemia intestinal a aquella situación en la que el intestino se ve privado del suficiente aporte sanguíneo y por tanto de oxígeno y los nutrientes necesarios para conservar su metabolismo e integridad celular. Este concepto se ha de completar, como recomiendan Johnson y Weil, considerando la falta de eliminación de CO₂ y por tanto su exceso en el tejido intestinal con isquemia¹.

Las enfermedades circulatorias, fundamentalmente isquémicas, en Asturias, en el año 1990, han sido responsables del 38.5% de la mortalidad, porcentaje que asciende al 43.7% en la franja de edad comprendida entre los 75 y 84 años y al 55.6% en aquellos mayores de 85 años².

A nivel digestivo la isquemia intestinal es el trastorno circulatorio más importante, responsable de forma directa de un número cada vez mayor de ingresos hospitalarios y de una gran mortalidad, del 57 al 85% de los casos, incluyendo series con técnicas que permiten diagnósticos precoces y las más optimistas medidas terapéuticas^{3,4,5}. Es, además, un factor íntimamente implicado en el compromiso evolutivo de entidades tan frecuentes como el fallo

cardiaco, shock, peritonitis o enfermedad vascular aterosclerótica o inflamatoria. Relacionada, según algunos autores, con el síndrome de fallo multiorgánico presente en muchos enfermos postquirúrgicos graves y asociado al 85% de las muertes en las unidades de cuidados intensivos^{6,7,8}.

2.2. Etiopatogenia de la isquemia intestinal aguda.

Se puede producir isquemia intestinal aguda, en síntesis, de dos formas diferentes:

- 1) Localmente interrumpiendo el flujo a nivel arterial o venoso mesentérico (isquemia mesentérica obstructiva).

- 2) A distancia por una disminución del aporte sanguíneo sin causa local concurrente (isquemia mesentérica no obstructiva)

Se actúa sobre la arteria mesentérica de forma directa cuando se producen embolias o trombosis y en aquellas situaciones, la mayor parte en actos quirúrgicos, donde hay laceraciones parciales o reimplantes arteriales, o bien trasplantes parciales o totales de la víscera.

El embolismo arterial es causa más frecuente de isquemia intestinal aguda que la trombosis⁹, en ambas, en situación aguda, generalmente se produce isquemia total, de extensión muy variable y permitiendo, por la especial distribución de las ramas arteriales, la posibilidad de uso de colaterales que, en ocasiones, pueden suplir, al menos en parte, la carencia original.

Las manipulaciones quirúrgicas que van desde suturas simples o by-pass hasta los reimplantes de la arteria mesentérica superior en situaciones de traumatismos o en el curso de intervenciones por aneurismas aórticos, sobre prótesis aortobifemorales, de alguna forma reproducen el esquema anterior, con el posible uso de colaterales^{10,11,12}.

Los autotrasplantes segmentarios de yeyuno sustituyendo faringe o esófago y los trasplantes intestinales que, aunque aún no de forma generalizada, ya se están realizando en la actualidad, obligan a la interrupción total del flujo y de la continuidad de la luz intestinal aislando el segmento intestinal de forma que pierde toda capacidad de uso de colaterales. Se produce así una interrupción brusca del flujo y una revascularización también rápida sin el concurso de colaterales^{13,14,15}.

Se produce isquemia de forma indirecta, por el éxtasis y el edema de la pared intestinal, o de forma directa, según los casos, en situaciones de estrangulación herniaria, obstrucción por adherencias, vólvulo e invaginaciones intestinales; donde no se puede recurrir al uso de colaterales para la reperusión y se asocian fenómenos en relación con la creación de una asa intestinal ciega¹⁶. También es secundaria la isquemia intestinal que sigue a la trombosis venosa mesentérica primaria o la que aparece en casos de hipertensión portal, infecciones intrabdominales, carcinomatosis o estados de hipercoagulabilidad como los que aparecen en situaciones de deficiencia de proteína S o C, de antitrombina III, policitemia vera, trombocitosis postesplenectomía o uso de contraceptivos orales^{17,18,19,20}.

Se consideran causas de isquemia mesentérica no oclusiva el shock, los estados de bajo flujo, la terapia vasodilatadora, las fístulas arteriovenosas, el feocromocitoma, la hemodiálisis y los bypass cardiopulmonares^{18,21,22,23,24}. Se produce una isquemia en la que disminuye además el potencial compensador de las colaterales manteniendo sin embargo indemne la continuidad del tubo intestinal.

Las peculiaridades anatómicas del árbol vascular intestinal y las diferentes posibilidades en lo que respecta a la forma de disminuir el flujo sanguíneo hacen imposible el desarrollo de un diseño experimental que responda de forma

general a todos los perfiles posibles.

2.2.1. CIRCULACION MESENTERICA

Al daño efectuado por el déficit de oxígeno y nutrientes propio de la isquemia intestinal contribuyen diversos factores. A nivel general destaca la perfusión sistémica; de hecho en condiciones normales el 25% del gasto cardiaco se dirige al tracto digestivo, demostrándose por técnicas de lavado de gases que el flujo se sitúa entre 500 y 600 ml./minuto²⁵. La carencia de oxígeno a nivel tisular, más que el déficit de cualquier otra sustancia, es quien define la viabilidad tisular en situaciones de bajo flujo²⁶. Con la isquemia intestinal disminuye el flujo sanguíneo y afecta esta circunstancia al transporte de oxígeno (DO_2) y secundariamente al metabolismo aerobio en función de la capacidad de compensación de parámetros como la hemoglobina, la saturación de O_2 y todos aquellos que regulen el sistema circulatorio esplácnico. Otro factor a tener en cuenta para definir la correcta oxigenación de los tejidos es el consumo de oxígeno (VO_2), relativamente independiente del DO_2 ^{26,27}. El DO_2 normal es de aproximadamente 1000-1200 ml/minuto y el VO_2 de 250 ml/minuto. Sólo se reduce el consumo de oxígeno por isquemia cuando se consigue reducir al menos un 40% el transporte de oxígeno, esto en el perro se consigue cuando el flujo ileal desciende por debajo de 30 ml/min²⁸, y se entra en la fase en la que el consumo depende directamente del transporte y éste únicamente del flujo si se mantienen invariables la saturación y la hemoglobina.

De forma local tienen especial influencia sobre la circulación mesentérica la extensión del flujo colateral y la reacción de los vasos mesentéricos a los estímulos vegetativos, sustancias vasoactivas circulantes, factores humorales locales y productos normales y anormales del metabolismo celular generados antes y después de la reperfusión del intestino isquémico²⁹.

2.2.1.1. Flujo colateral

El intestino delgado mesentérico, irrigado por la arteria mesentérica superior, recibe circulación colateral tanto de comunicaciones con las ramas del tronco celiaco como con ramas de la arteria mesentérica inferior^{30,31} (Figuras 1 y 2). Es rara la situación en que manteniendo la permeabilidad de alguna de los anteriores vasos principales se produce isquemia mesentérica sintomática²⁹, de hecho se ha comprobado experimentalmente que la isquemia mesentérica superior determina un incremento del flujo de la arteria hepática y de la oxigenación en el sistema venoso portal^{32,33}.

Las colaterales extraparietales existen tanto a nivel de arcos primarios, secundarios o terciarios como a nivel de las arterias marginales de Drummond o el arco de Rioloano³⁰ (Figura 3). A nivel de la pared intestinal existe un plexo vascular muscular externo y de éste parten, en dirección a la mucosa y atravesando la muscular, vasos que forman posteriormente el rico plexo submucoso. De este último sale una arteriola central que pierde su capa muscular y se arboriza constituyendo la red capilar subepitelial vellositaria.

En los plexos de la muscularis, submucosa y mucosa se forman tres circuitos en paralelo que a su vez están controlados por una serie de componentes dispuestos en serie: las arteriolas de resistencia, los esfínteres precapilares, los capilares, los esfínteres postcapilares y los venulas o vasos de capacitancia (Figura 4)³⁴.

Las arteriolas son el primero y mayor determinante del flujo sanguíneo al lecho esplácnico, definido por la diferencia entre la presión hidrostática arterial y venosa y la resistencia vascular que a este nivel se ofrece (ley de Ohm). Los esfínteres precapilares y postcapilares, distales a las anteriores, contribuyen poco a la resistencia vascular y su papel se centra fundamentalmente en el interambio transcápilar de fluidos y solutos. Las vénulas y resto de vasos de capacitancia intervienen poco en la regulación del flujo y su función se centra en definir el volumen de sangre secuestrada en el sistema circulatorio esplácnico, que puede representar hasta el 30% del volumen sanguíneo circulante^{34,35}.

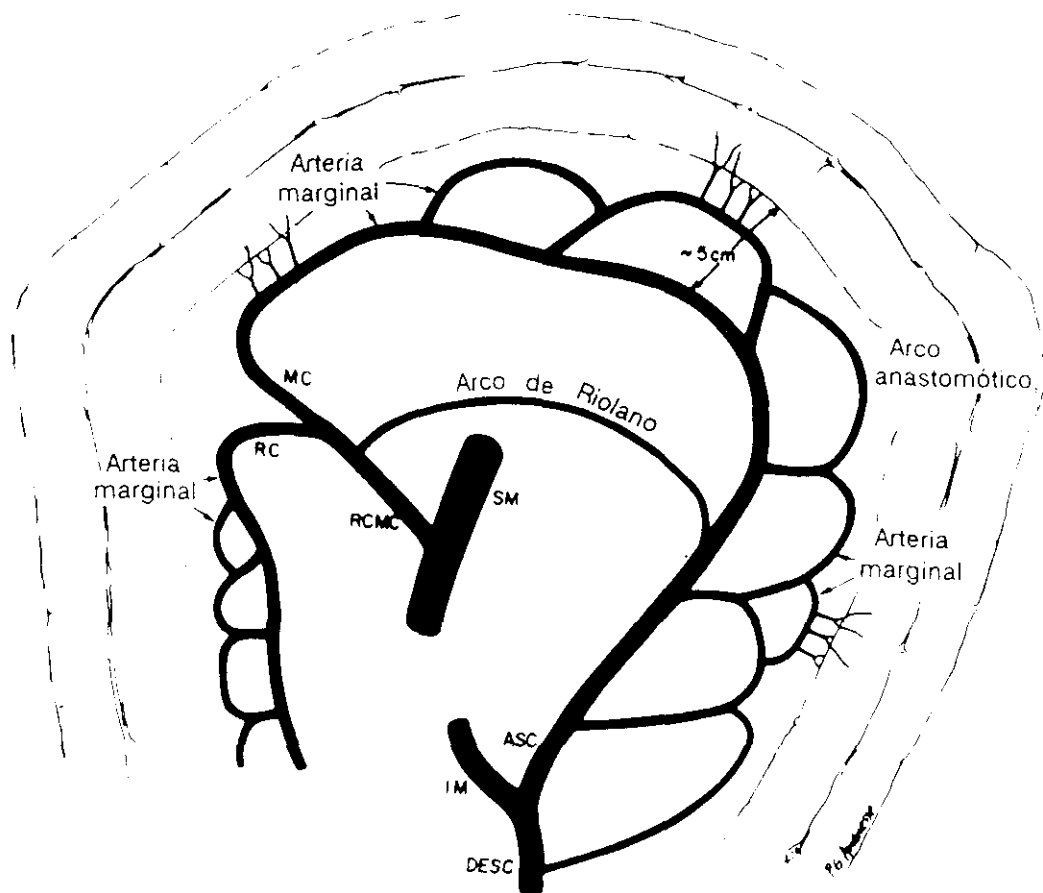
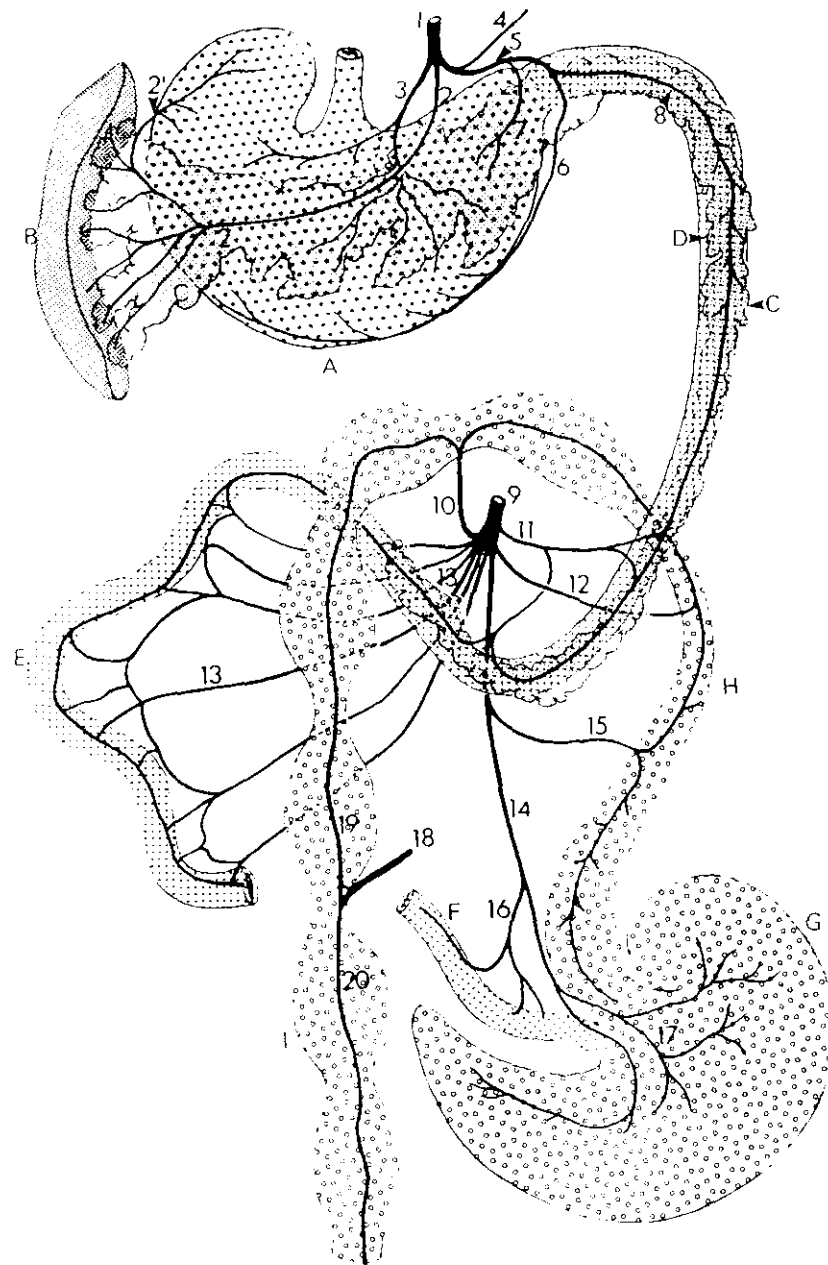


Figura 1. Red de colaterales de la arteria mesentérica superior e inferior en el humano. Modificada de Klomblith PL y cols.³⁰. MC=cólica media, RC=cólica derecha, RCMC=cólica derecha y media común, SM=mesentérica superior. IM=mesentérica inferior



Arteries of the gastrointestinal tract, dorsal aspect. A, stomach; B, spleen; C, pancreas; D, duodenum; E, jejunum (interrupted); F, ileum; G, cecum; H, colon; I, rectum. 1, a. celiac; 2, a. lienalis; 2', rr. gastrici, breves; 3, a. gastrica sin.; 4, a. hepatica; 5, a. gastroduodenalis; 6, a. gastroepiploica dextra; 7, a. gastrica dextra; 8, a. pancreaticoduodenalis cran.; 9, a. mesenterica cran.; 10, a. colica media; 11, a. pancreaticoduodenalis caud.; 12, a. colica dextra; 13, aa. jejunales; 14, a. ileocecolica; 15, r. colicus; 16, r. ilei; 17, r. caecalis; 18, a. mesenterica caud.; 19, a. colica sin.; 20, a. rectalis. (Drawing by B. Ruppel.)

Figura 2. Circulación arterial del sistema gastrointestinal de la rata. Tomado de Hebel R. y Stromberg MW.³¹

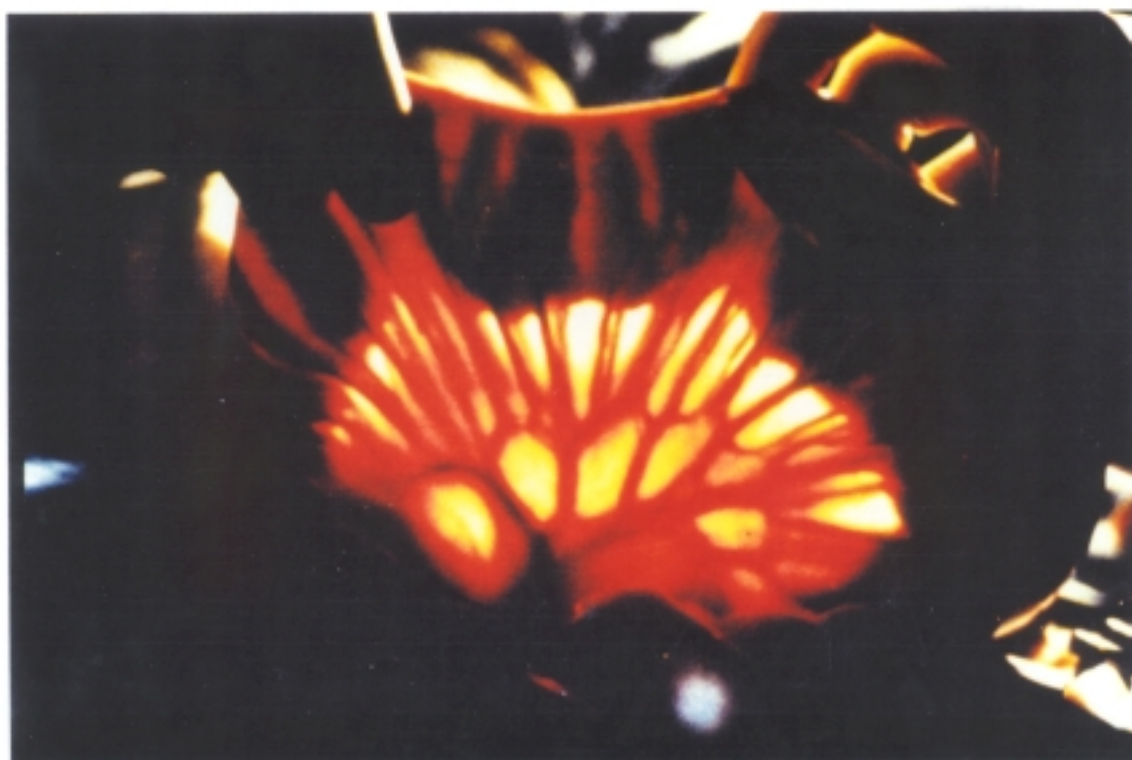


Figura 3. Fotografía con transiluminación del mesenterio.

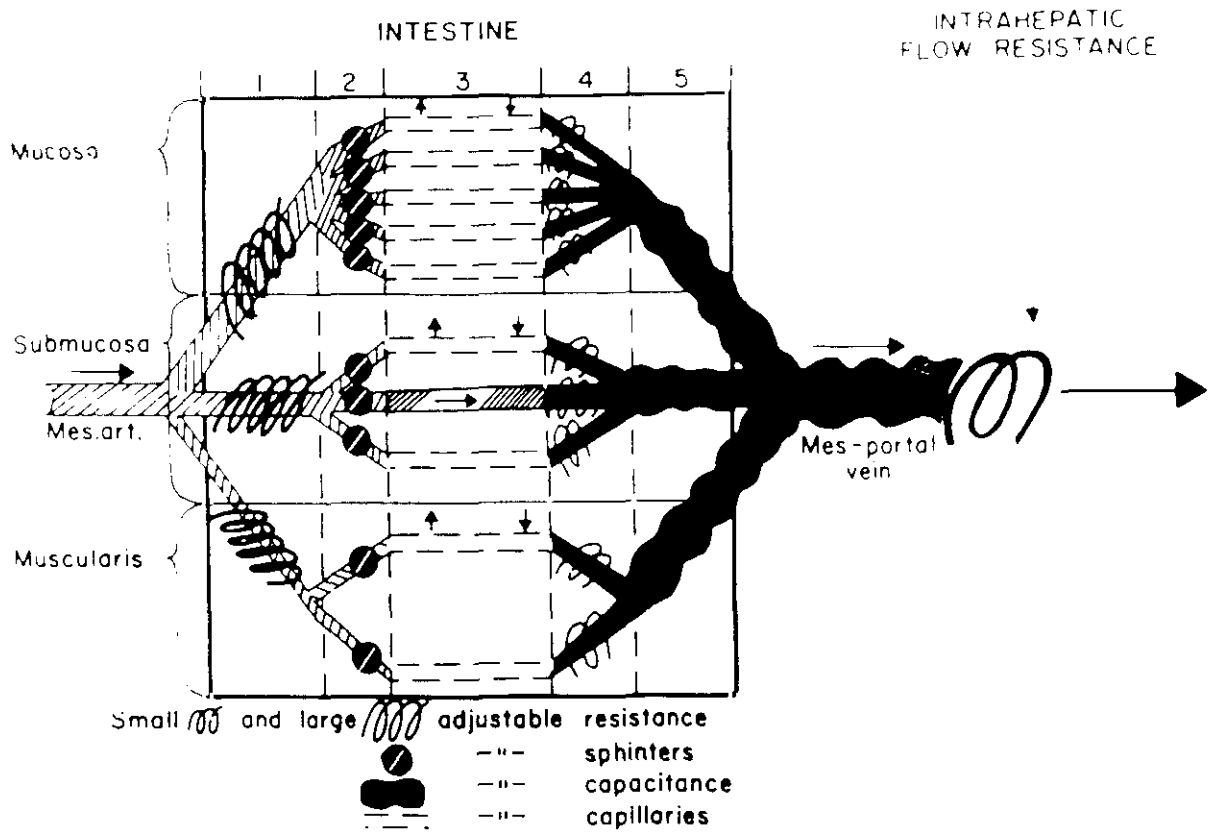


Figura 4. Anatomía microvascular de la circulación esplácnica. Tomada de Reilly PM. y col.³⁴

2.2.1.2. Factores autónomos

Dependientes del sistema nervioso simpático, y en menor medida por catecolaminas circulantes. La disminución del flujo sanguíneo se asocia a vasoconstricción desproporcionada de los lechos venosos poscapilares, acción que mediada por los receptores alfa-adrenérgicos trastorna el funcionamiento de los vasos de capacitancia³⁵. Al cabo de pocos minutos y por el escape autorregulatorio en el que intervienen receptores beta-adrenérgicos se incrementa el flujo sanguíneo hasta niveles casi normales, aunque de forma transitoria ya que si se prolonga se produce vasoconstricción activa mediada por otros factores que persisten incluso después de corregir la causa primaria del descenso del flujo²⁹.

2.2.1.3. Factores humorales

Son la angiotensina II y la vasopresina los principales péptidos vasoactivos, otros como el péptido intestinal vasoactivo (VIP), el glucagón o la prolactina tienen una capacidad de acción mucho menos determinante¹⁸. La vasopresina se produce como consecuencia de la hipotensión general y actúa produciendo vasoconstricción de forma preferente sobre la circulación mesentérica³⁶. Por su parte la angiotensina II también produce vasoconstricción esplácnica y de hecho se podría justificar la isquemia mesentérica en estados de bajo flujo por el mayor número y la gran afinidad de los receptores de angiotensina II en el músculo liso vascular de los vasos mesentéricos³⁷. Además cuando se bloquea el eje renina-angiotensina, con nefrectomía o con un inhibidor selectivo de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), la disminución de flujo y resistencias por vasoespasmo de la arteria mesentérica superior, así como el grado de lesión tisular, disminuyen notablemente³⁸.

2.2.1.4. Factores locales

Intervienen precozmente las endotelinas (tipo 1, 2 y 3), liberadas por las células endoteliales, cuyo aumento, junto al descenso de los niveles del factor relajante del endotelio, desencadena un intenso vasoespasmo^{39,40}.

La hiperpotasemia, la hiperosmolaridad sanguínea, la disminución de la tensión local de oxígeno, la adenosina, la concentración elevada de dióxido de carbono que produce acidosis local, así como algunos metabolitos del ácido araquidónico como la prostaglandina E2 y la prostaciclina, potentes vasodilatadores, actúan en situaciones de isquemia intestinal sobre los vasos de resistencia produciendo hiperemia local en una fase más tardía^{18,29,41}.

2.3. Fisiopatología de la isquemia-reperfusión del intestino delgado.

En las últimas décadas, desde el descubrimiento de la enzima superóxido dismutasa (SOD) en 1968⁴², se han introducido nuevos conocimientos en la fisiopatología de los trastornos circulatorios. La utilización de este enzima, detoxificador del radical superóxido, permitió estudiar la relación entre la formación de radicales libres de oxígeno (RLO) y los fenómenos de isquemia-reperfusión intestinal⁴³. El daño producido en la perfusión surge en el momento en que se restablece el flujo sanguíneo en el área intestinal con isquemia. Se caracteriza por la aparición de un intenso vasoespasmo y la presencia de lesiones en la mucosa intestinal mediados por la acción de los RLO de forma directa o a través de la activación de los neutrófilos.

2.3.1 ISQUEMIA Y ALTERACIONES DEL EQUILIBRIO DEL Ca^{2+} : EFECTOS PRERREPERFUSIONALES

Cualquier órgano sometido a isquemia presenta inicialmente alteraciones a nivel molecular y sólo tiempo después lesiones visibles en la célula parenquimatosa y resto de componentes del tejido. La tolerancia de cada tejido

u órgano a la isquemia es muy variable y los signos clinico-patológicos de necrosis aparecen en diferentes momentos y después de déficits perfusionales de muy diferente orden. Sin embargo, algo común a toda isquemia, independiente del tejido u órgano al que afecte, por tanto válido para el intestino, es la deplección de fosfatos de alta energía: adenosintrifosfato (ATP)⁴⁴. Este deja de ser sintetizado en el ciclo de Krebs y es degradado a hipoxantina, pasando por adenosinmonofosfato (AMP), adenosina e inosina⁴⁴. Este ATP eliminado puede ser regenerado, en el caso de la mucosa intestinal, si el tiempo de isquemia no sobrepasa los 30 minutos ⁴⁵.

Una de las consecuencias de la caída energética, de gran trascendencia metabólica, es la elevación del Ca^{2+} citosólico a expensas tanto del existente en el ambiente extracelular como del intracelular. Esto es debido a la inactivación de la ATPasa de la membrana citoplasmática que no puede mantener el gradiente normal de Ca^{2+} , con una concentración del orden de 10.000 mayor en el exterior, y a la liberación del existente en el retículo endoplásmico y las mitocondrias, debido a la pérdida del sistema electrogénico ("motor de protones") situado en la cara interna de la membrana mitocondrial y relacionado con la fosforilación oxidativa^{46,47}. Esta distribución del Ca^{2+} afecta a un complejo sistema enzimático con diferentes mediadores y receptores que regulan el funcionamiento de enzimas citosólicas calcio-dependientes ⁴⁷.

Destacan de los efectos de la elevación citosólica del Ca^{2+} los siguientes:

1. Activación de proteasas citosólicas Ca^{2+} -dependientes

2. Activación de la Fosfolipasa A2.

1. Esta activación es responsable de la alteración citoesquelética, reflejada en cambios morfológicos celulares ("abollonamiento"), consecuencia, en parte, del efecto directo que sobre alguno de sus constituyentes (caldesmon, gelsolina, villina, vinculina, etc.) tiene la elevación del calcio intracelular ⁴⁶.

Debido a una proteólisis limitada e irreversible, mediada por la acción de la calpaina, proteasa calcio-dependiente, se produce la conversión de xantin

deshidrogenasa (XD) en xantín oxidasa (XO). Este cambio de forma de una misma enzima (de D a O), que podría ocurrir también por oxidación de puentes sulfidrilo⁴⁸, es muy importante para entender los cambios que ocurren en la reperfusión. Mientras que la XD utiliza como sustrato NAD para convertirlo en NADH la XO usa O₂ que al reaccionar con la hipoxantina, producto de la degradación de ATP en la isquemia, da lugar a la formación de radical superóxido y peróxido de hidrógeno⁴⁹(Figura 5).

El paso de la forma D (deshidrogenasa) a la O (oxidasa), que se hace de forma completa en 10 segundos en la isquemia total del intestino delgado⁵⁰, es clave en la hipótesis de Granger y queda demostrado midiendo los niveles de XO y XD, como hizo Friedl⁵¹, en el plasma eferente después de isquemia.

Otra enzima citosólica calcio-dependiente que requiere además para su acción la presencia de calmodulina y fosfato de nicotinamin adenin dinucleótido (NADP) es la sintetasa del óxido nítrico o factor relajante derivado del endotelio (FRDE), presente en las células endoteliales y neutrófilos y que regula la síntesis de óxido nítrico a partir del aminoácido L-arginina⁵². El descenso del nivel del óxido nítrico con la isquemia, y por tanto del mediador de su acción el monofosfato cíclico de guanosina (cGMP), debido a los cambios de concentración de calcio, justifica la pérdida de la acción vasodilatadora y por tanto parte de la vasoconstricción característica del momento. Circunstancia que se prolonga durante la reperfusión por acción de los radicales libres de oxígeno^{53,54}.

2. La activación de la Fosfolipasa A2 debido al desajuste cálcico conduce a la liberación de productos del ácido araquidónico al ser metabolizados los fosfolípidos de membrana. Estos metabolitos tienen acción directa sobre la microcirculación y van a participar de forma destacada en el daño mediado por el neutrófilo en la reperfusión^{18,29,55}.

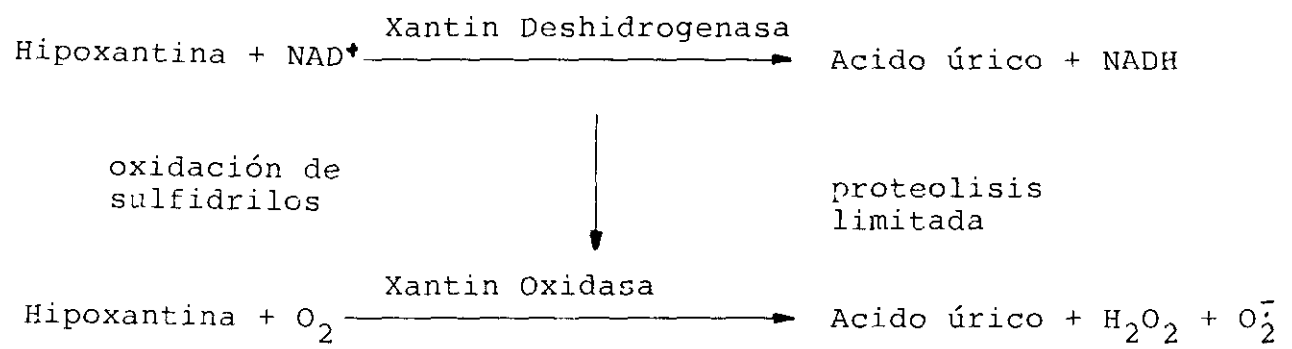


Figura 5. Transformación de la xantin deshidrogenasa en xantin oxidasa.

2.3.2. HIPERCAPNIA CELULAR

La degradación de ATP y producción de ácido láctico que acompaña a la hipoxia conduce al incremento de la concentración de hidrogeniones (H^+). El bicarbonato (HCO_3^-) es utilizado como tampón y se genera dióxido de carbono (CO_2) en grandes cantidades.



La hipercapnia aparece precozmente con la isquemia, no presenta correlación con las alteraciones histológicas halladas y revierte rápido con la reperfusión¹⁸.

Cuando disminuye el flujo sanguíneo la pCO_2 se eleva de forma proporcional al grado de restricción aunque la producción de CO_2 sea normal debido al inadecuado flujo venoso¹⁸. El gradiente de pCO_2 venoarterial se ha visto aumentado rápida y proporcionalmente en circunstancias de bajo flujo en diferentes órganos entre los que se incluye el intestino delgado⁵⁶.

La determinación del incremento de la pCO_2 celular y el posterior cálculo del pH intramucoso por medio de la ecuación de Henderson-Hasselbach se utiliza en la actualidad como indicador de isquemia⁵⁷, sin que su significado y trascendencia fisiopatológica hayan sido aún descubiertas.

2.3.3. DEFINICION DE RLO

Un radical libre es cualquier molécula o átomo que contiene uno o más electrones no apareados en su órbita más periférica. Esta situación los hace extraordinariamente activos y tienden a ceder el electrón, a aceptar otro o a unirse a un no radical para estabilizar su electrón de valencia. Así se forman nuevos radicales libres según la reacción genérica: $RH + OH^\cdot \longrightarrow R^\cdot + H_2O$, punto de partida de nuevas reacciones en cadena⁵⁸.

2.3.4. FORMACION DE RLO

En condiciones normales las células metabolizan, por sistemas intracelulares como el complejo citocromo-oxidasa mitocondrial, el 97% del oxígeno molecular. Se produce una reducción tetravalente y se forman dos moléculas de agua. El 3% restante no utiliza esta vía metabólica sino que se reduce de forma univalente y generan productos tóxicos como el radical superóxido ($O_2\cdot$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($OH\cdot$)⁵⁹, este último es el más nocivo por ser altamente reactivo y carecer de sistema enzimático de depuración⁶⁰. El radical superóxido, sin embargo, es metabolizado de forma espontánea al reaccionar con protones o iones metálicos, o, mucho más rápidamente, por catálisis enzimática de la metaloenzima SOD, de la que existen dos formas; una con Cu y Zn en el citosol y otra con Mn en la mitocondria; según la reacción:



El peróxido de hidrógeno formado ha de ser a su vez metabolizado, por la glutatión peroxidasa o bien por la catalasa. La primera es una selenoenzima localizada en el citosol y en la mitocondria y cataliza la reacción:



La catalasa, sin embargo, se encuentra en los peroxisomas donde además residen varias flavin oxidasas que también generan radical superóxido. Interviene en la reacción:



Presentan un papel defensivo adicional la fosfolípido hidropéroxido glutatión peroxidasa, que es similar a la glutatión peroxidasa pero que actúa específicamente sobre los hidropéroxidos lipídicos, y la DT diaforasa que inhibe

la transferencia univalente de algunas quinonas.

Cuando, en las circunstancias que fuere, fracasen o se vean desbordadas las anteriores enzimas y se acumulan excesivas cantidades de O_2 y H_2O_2 existe la posibilidad de que se produzca radical hidroxilo a través de la reacción de Haber-Weiss:



O bien por la reacción de Fenton y Jackson:



El radical hidroxilo no se puede eliminar ni formar con ningún sistema enzimático y resulta de la suma de las reacciones que generan radical superóxido y peróxido de hidrógeno.

Esta producción y eliminación fisiológica de algunos radicales libres puede desequilibrarse en trastornos circulatorios como la isquemia-reperfusión donde el exceso de formación supera la capacidad de limpieza ("scavenging") de la célula^{61,62}.

En procesos de isquemia-reperfusión del intestino delgado se han podido demostrar de forma directa las variaciones en los niveles de radicales libres utilizando quimioluminiscencia y resonancia de spin electrón^{63,64,65}. Se consiguió calcular la luz que emitía el luminol oxidado y cuantificar la cantidad de radical libre secundario estable al reaccionar la hidroxilamina (OXANOH) con radicales libres de oxígeno, muy inestables y difíciles de cuantificar. Así se observó que los radicales libres de oxígeno son producidos en el intestino durante la perfusión después de un periodo de reducción del flujo y que, en el gato, después de periodos de isquemia de sesenta minutos, había una significativa correlación entre el daño histológico y la formación de radicales libres^{64,66}.

La génesis de estos radicales en la reperfusión se explica por una deplección de adenosintrifosfato (ATP), degradado hasta Hipoxantina y la acción del enzima Xantin-oxidasa que en presencia de oxígeno cataliza la reacción que conduce al radical peróxido⁴⁹(Figura 6).

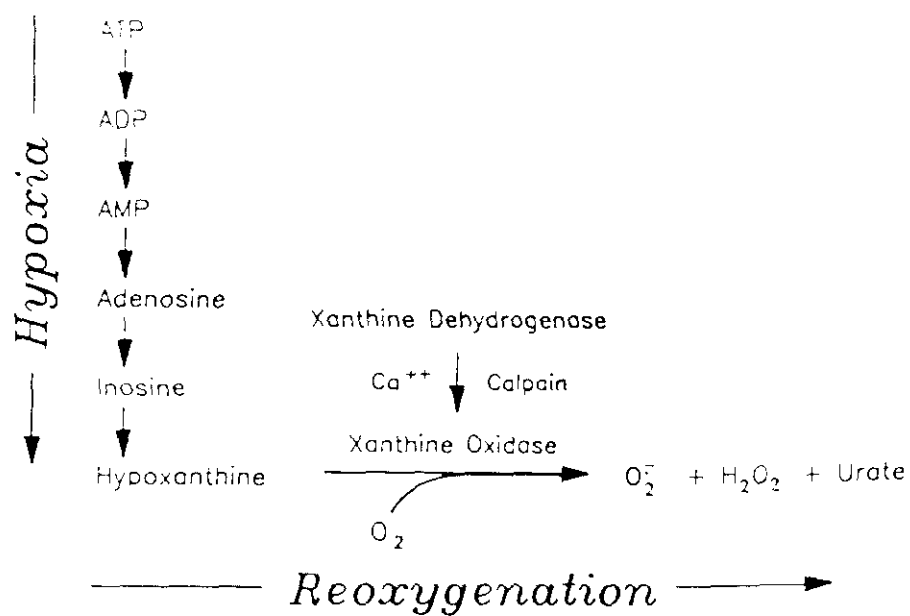


Figura 6. Mecanismo propuesto para la formación de radicales libres de oxígeno en la isquemia-reperfusión.

Modificado de Granger DN y cols.⁴³.

2.3.5. EFECTOS DE LOS RADICALES LIBRES A NIVEL MOLECULAR

Los RLO actúan fundamentalmente como oxidantes e interactúan con especies moleculares tanto intra como extracelulares.

Sobre las proteínas pueden reaccionar con aminoácidos que contienen el grupo tiol y desnaturalizarlas, producir entrecruzamientos catalíticos "cross linking", polimerizarlas, degradarlas o inhibir su acción enzimática^{67,68}.

A nivel de los ácidos nucleicos se han demostrado alteraciones en la transcripción, traslocación y replicación del DNA, aumentando el riesgo de mutaciones y muerte celular, por rotura y alteraciones de las bases púricas y pirimidínicas por hidroxilación, particularmente a través del H₂O₂ por la reacción de Fenton, y producción de entrecruzamientos catalíticos en los que también participa el malondialdehído, al interactuar con los grupos amino del ADN⁶⁹.

En el caso de los carbohidratos los RLO inactivan la vía de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), hacen descender el nicotin adenin dinucleótido (NAD) y producen una discreta acidosis y un aumento de la concentración de calcio intracelular. Además al actuar sobre los grupos glucosamina (CH-NH), por mediación del aldehído malónico, se producen alteraciones en los receptores de superficie de la membrana plasmática⁶⁸.

El efecto que tienen los RLO sobre los lípidos se denomina de forma genérica peroxidación lipídica y hasta hace varias décadas sólo se la relacionaba con la química de los aceites y las grasas y su interés se centraba en el campo de la tecnología de los alimentos. Fue Tappel en 1962 quien primero sugirió la posibilidad de que la peroxidación lipídica es un proceso clave para el conocimiento de la forma en que se produce, en determinadas circunstancias, el daño celular sobre las membranas plasmáticas. Inicialmente se observó que estaba en relación con la deficiencia en el aporte de vitamina E u otros antioxidantes de la dieta⁷⁰.

2.3.6. PEROXIDACION LIPIDICA

En la actualidad los fenómenos de isquemia-reperfusión tisular son una de las circunstancias que más está potenciando el desarrollo y estudio de la peroxidación lipídica tisular que, de forma arbitraria, se puede dividir en tres fases: Iniciación, propagación y terminación.

Iniciación: Comienza con la acción de un radical libre sobre las cadenas alquilo de un ácido graso poliinsaturado (AGPI) que puede estar formando parte de la doble capa fosfolipídica de la membrana plasmática. El ataque afecta al hidrógeno unido a un átomo de carbono de un grupo metileno situado entre dos dobles enlaces, con una relativa baja energía de disociación (75 Kcal/mol), que lo hacen particularmente sensible a la agresión.

Se constituye así un radical lipídico por la acción de RLO como el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno o el radical hidroxilo. El primero es insuficientemente reactivo para extraer H^+ de los lípidos y ha de reducirse (HO_2), constituyendo una forma más reactiva. Por otro lado del radical hidroxilo, con gran capacidad de reacción, se desconoce como es capaz de migrar desde su sitio de origen hasta la membrana celular para ejercer su acción⁷⁰.

El radical lipídico con el átomo de carbono activado reacciona fácilmente con el oxígeno y forma un radical peroxilipídico. Este, más tarde, puede extraer un hidrógeno de un carbono vecino y formar un endoperóxido lipídico.

Propagación: Se entra en esta fase cuando un radical endoperóxido reacciona con otro AGPI para formar hidroperóxido y un nuevo radical lipídico o cuando el endoperóxido lipídico se metaboliza para formar malondialdehído, el más común de los productos de la peroxidación lipídica susceptibles de cuantificación debido a su relativa estabilidad.

La descomposición de los hidroperóxidos, catalizada por hierro u otro metal de transición, origina radicales alkoxi y peroxiradicales, amplificando la propagación y dando una segunda generación de radicales libres que pueden iniciar nuevos hidroperóxidos lipídicos.

Por otro lado el MDA reacciona con grupos epsilon-amino de proteínas formando bases conjugadas de Schiff (Figura 7). También se forman un gran número de aldehídos: alcanos, alquenos, 4-hidroxi-alquenos, alca-dienos, etc. así como pequeñas cadenas hidrocarbonadas como etano y pentano⁷⁰.

Terminación: Se considera que acaba la formación de radicales lipídicos cuando se combinan dos radicales libres dando un producto estable. Esto ocurre al reaccionar con otro lípido, proteínas, carbohidratos o ácidos nucleicos en el entrecruzamiento catalítico ("cross linking").

Las consecuencias de la peroxidación lipídica de las membranas celulares se detecta en la pérdida de regiones hidrofóbicas en los fosfolípidos y los consiguientes incrementos en la permeabilidad que se expresan en el hinchamiento de mitocondrias y vacuolización del retículo endoplasmático que aparecen en los estudios ultraestructurales^{70,71,72}.

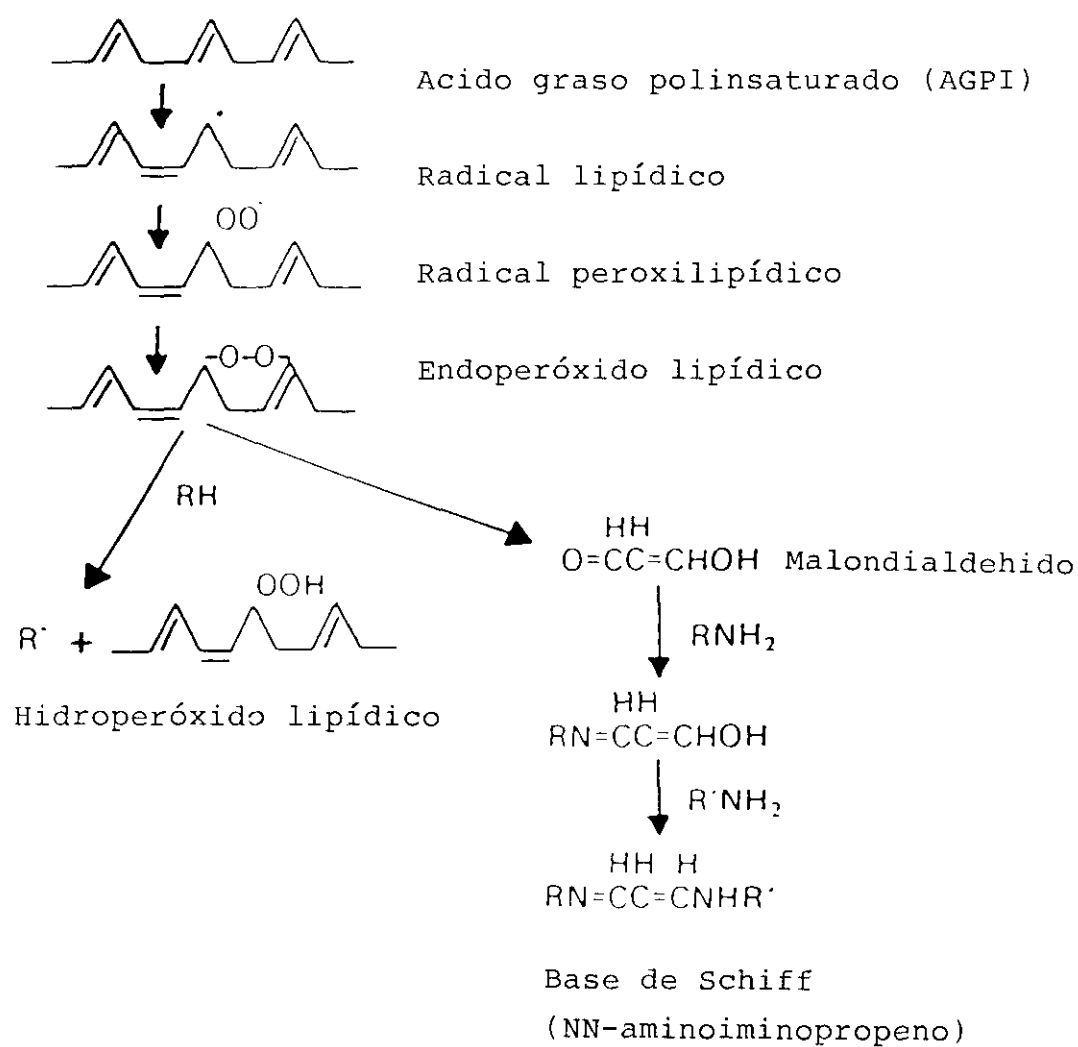


Figura 7. Secuencia de fenómenos de la peroxidación lipídica.

2.3.7. PAPEL DEL NEUTROFILO

El neutrófilo en el compartimento vascular sin flujo se sitúa marginalmente y se adhiere de forma muy laxa al endotelio. Se dice que está secuestrado, en procesos inflamatorios, cuando se fortalece esa adherencia al intervenir receptores glicoproteicos de la membrana celular y se traslada al intersticio⁵⁶.

Antes de poder ejercer su acción lesiva tisular ha de ser conducido al sitio de acción (quimiotactismo), adherirse al endotelio y pasar finalmente, por diapedesis, al espacio subendotelial e intersticio tisular.

Aunque se considera que los radicales libres participan en la quimiotaxis de neutrófilos activados en el tejido reperfundido aún no se conoce bien el mecanismo por el que lo llevan a cabo de forma directa⁷³. Ha sido en cambio bien estudiada la forma en que lo hacen de forma indirecta a través de los derivados del ácido araquidónico y fragmentos del sistema complemento. La liberación de radicales libres de oxígeno produce un aumento del calcio libre intracelular y la activación de la fosfolipasa A2 con la consiguiente generación de ácido araquidónico y derivados, de tal forma que inhibidores de la formación de radicales libres evitan la liberación de metabolitos del ácido araquidónico en la reperfusión⁷⁴.

Dentro de los productos del ácido araquidónico con destacada capacidad quimiotáctica destacan el tromboxano A2 y el leucotrieno B4 y del sistema complemento el fragmento C5a, de especial trascendencia a nivel intestinal^{75,76,77}. Además de los anteriores también tiene capacidad quimiotáctica otro derivado de la acción de los radicales libres sobre las membranas: el factor activador de plaquetas (FAP)⁷⁸.

Un paso adicional, necesario para producir el daño tisular mediado por los PMN, es la adhesión de éstos a las células endoteliales, que se puede realizar de tres formas:

La primera es la adherencia espontánea de los neutrófilos marginales, mayor cuanto más lento es el flujo.

Otra forma es la adherencia estimulada del neutrófilo, producida por el efecto quimiotáctico del LB4, TxA2, FAP, fracción C5a del complemento, los

formilpéptidos (FMLP), los inmunocomplejos y por la acción de las moléculas expuestas en el endotelio lesionado. Para que tenga lugar este tipo de adherencia se precisan receptores específicos glicoproteicos de membrana: CD11/CD18⁷⁹. Así, anticuerpos monoclonales contra estos receptores, como el IB4, bloquean la adhesión y protegen del daño reperfusional^{79,80}.

La adherencia endotelial estimulada es de intensidad similar a la anterior pero se manifiesta más tarde. Está mediada por la acción de trombina, endotoxinas, interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa) que inducen la expresión de glicoproteínas en la superficie de las células del endotelio: molécula de adherencia intercelular-1 (ICAM-1) y molécula de adherencia leucocitaria y endotelial-1 (ELAM-1 o selectina-E)⁵⁴. Además de las selectinas, que median el primer contacto entre neutrófilos y las células endoteliales, intervienen otras moléculas de adherencia celular, las integrinas, que interactúan con componentes del citoesqueleto coordinando estímulos extracelulares con acciones como la diapedesis y la fagocitosis. Esta adherencia se ve contrarrestada por la producción de prostaciclina y de un inhibidor soluble por parte de las células endoteliales que de esta forma autorregulan y limitan el proceso⁵⁵.

La última fase previa a la activación es el secuestro de los neutrófilos, que en el intestino es clave en el desarrollo del daño mediado por la isquemia-reperfusión⁵⁵. Para que ocurra los PMN han de pasar, por diapedesis, desde la superficie endotelial al espacio subendotelial. Este fenómeno se ve favorecido por la acción del LB4 y por la creación de un gradiente de concentración producido por formilpéptidos (FMLP, FNLP) y C5a^{55,81}.

Otros factores que también aumentan el trasiego transendotelial, incluso en ausencia del gradiente de concentración, en endotelios humanos cultivados, son la IL-1 y el TNF-alfa⁵⁵.

2.3.7.1. Activación de los polimorfonucleares y daño tisular

El daño tisular producido por la activación de los neutrófilos se puede realizar por dos vías (Figura 8):

A) Generación de radicales libres de oxígeno ("respiratory burst").

B) Liberación de enzimas lisosómicas (degranulación).

A) La primera comienza con la interacción de agentes estimulantes del neutrófilo: Fe, fragmentos de partículas opsonizadas o inmunocomplejos, C5a, N-formilpéptidos, leucotrieno B₄, ácidos grasos, endotoxinas y FAP con receptores de membrana del neutrófilo; modificación de proteínas-G (guanin nucleótido) y activación del fosfolípido C con formación de inositol trifosfato y acúmulo de calcio intracelular. Se activa la fosfolipasa D y se hidroliza el fosfatidilinositol formando fosfatidato y diacilglicerol. Este actúa sobre la proteinquinasa C y se fosforilizan proteínas que conducen a la génesis de NADPH oxidasa de membrana que reduce el oxígeno (O₂) a superóxido (O₂⁻):



El O₂⁻ es rápidamente dismutado a peróxido (H₂O₂):



En presencia de la mieloperoxidasa (MPO) (enzima de los gránulos azurófilos) el peróxido reacciona con el cloruro (Cl⁻) para formar ácido hipocloroso (HOCl) y cloraminas, pudiendo formar también radical Hidroxilo⁶⁸. El ácido hipocloroso en solución salina produce hipoclorito que es un potente oxidante de citocromos, adenin nucleótidos y proteínas hierro-azufradas así como un sustrato para la génesis de RLO, siendo este efecto rápido e irreversible.

B) La degranulación de potentes enzimas digestivas lisosómicas en el espacio intercelular compromete la integridad de la membrana basal. Es la elastasa la más significativa y la que ha demostrado más influencia en la migración de los leucocitos en el intersticio al actuar sobre el colágeno, la fibronectina y la laminina. Otras enzimas que también participan son la colagenasa y la

gelatinasa⁸²(Figura 9).

Hay que tener en cuenta, sin embargo, que la intervención del neutrófilo a nivel local es cuestionada de manera que se considera que es el mediador de las acciones de los radicales libres producidos por la isquemia-reperfusión intestinal en otros órganos como el pulmón o el hígado pero que sobre el intestino únicamente los radicales libres de oxígeno son los responsables directos de las lesiones producidas⁸³.

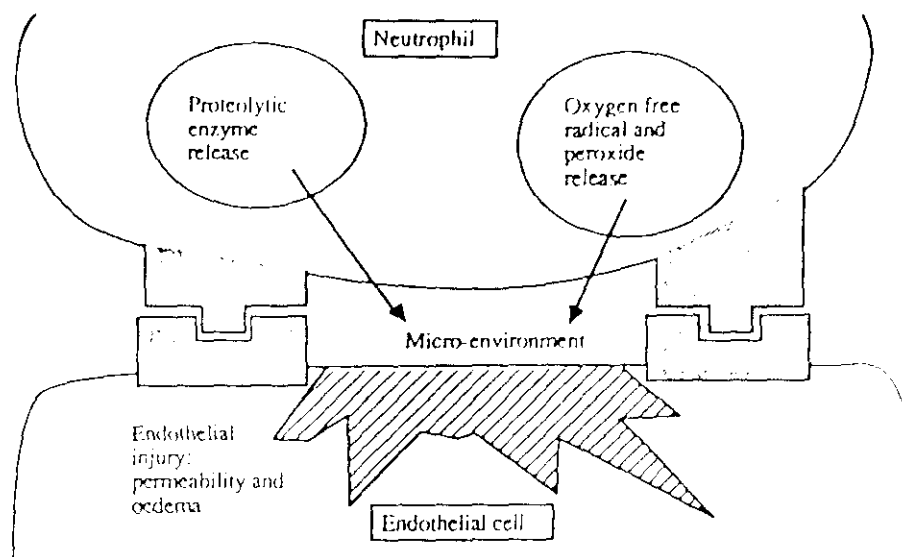


Figura 8. Unión de neutrófilo al endotelio y patogenia del daño endotelial.
Tomado de Welbourn CRB y cols.⁷³

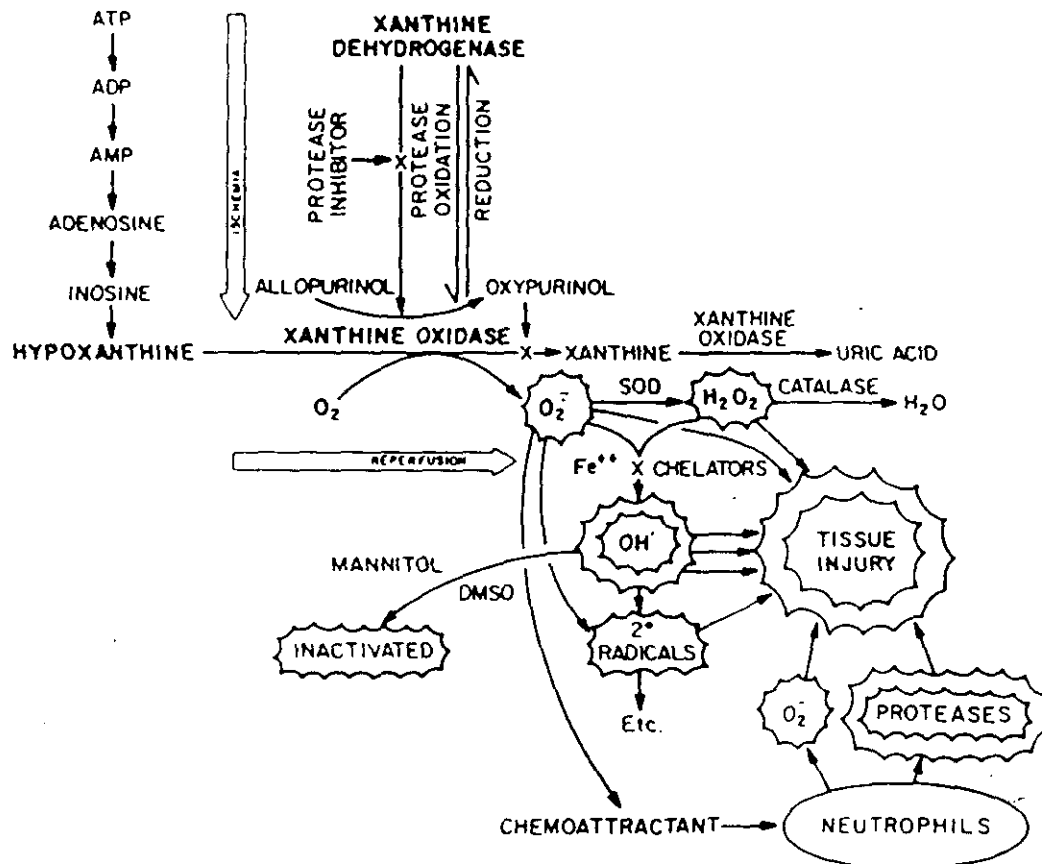


Figura 9. Representación integrada del mecanismo patogénico del daño producido tras isquemia reperfusion. Modificado de Granger DN y cols.⁴³.

2.4. Cambios histológicos

Los hallazgos anatomopatológicos de los trastornos del flujo a nivel intestinal, en la clínica, se dividen en dos categorías bien definidas: necrosis de la mucosa e infarto transmural⁸⁴. A nivel experimental, utilizando tiempos de isquemia que permitan reperfusiones posteriores, para la valoración del daño intestinal mucoso, se recurre generalmente a la clasificación de Chiu⁸⁵. Se considera como primer grado de alteración la presencia de espacios subepiteliales en la punta de la vellosidad, consecuencia del aumento de la permeabilidad capilar⁴⁹, y como último la desintegración total de la lámina propia. A esta escala de daño tisular representada por cinco grados de trastorno mucoso de la vellosidad se le pueden sumar, como propone Park y cols.⁸⁶, 3 grados más (6,7 y 8) en los que se incluye el infarto a nivel de la cripta, transmucoso y transmural respectivamente.

Otra visión diferente de las alteraciones mucosas considera de forma independiente el número de vellosidades afectadas por un lado y el número de criptas por otro⁸⁷.

También es posible cuantificar con el microscopio óptico (en micras) la longitud del villi, la profundidad de la cripta y el espesor total de la mucosa^{87,88}.

Con intención de aumentar la sensibilidad de la valoración histológica algunos autores han simplificado la escala de Chiu y medido la lesión histológica en distintos cuadrantes de una misma sección intestinal⁸⁹.

Haglund y cols.⁹⁰ han conseguido representar de forma esquemática, basándose en estudios de autores como los citados anteriormente, los diferentes grados de alteración mucosa en función del grado de isquemia-reperusión al que es sometido el intestino delgado (Figura 10).

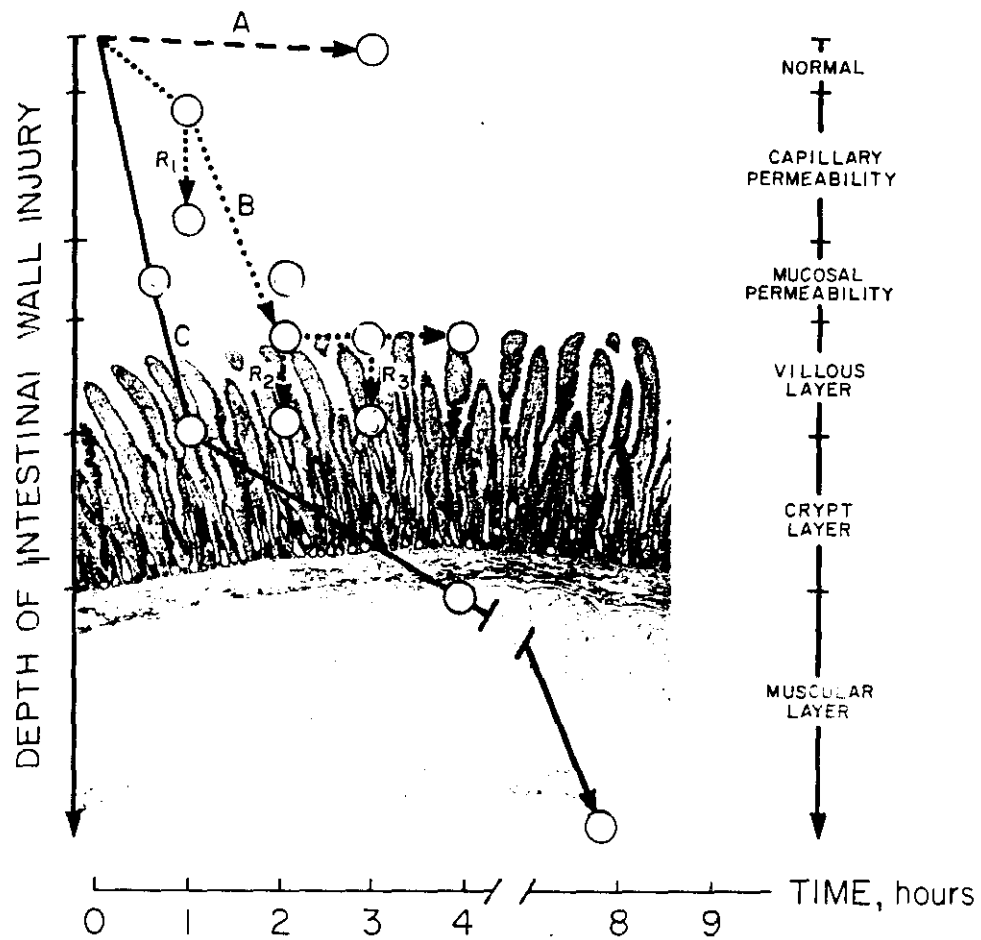


Figura 10. Ilustración del daño tisular según se incrementa el grado y tiempo de isquemia (de A a C) y con la reperusión ($R_{1,2,3}$). Tomado de Haglund⁹⁰.

2.5. Alteraciones ultraestructurales

De acuerdo con los cambios observados por Aho y Brown se puede hablar de toda una serie de alteraciones que van apareciendo de forma sucesiva con el mayor grado de isquemia-reperfusión^{71,72}.

En un intestino normal se pueden ver: Enterocitos con "ribete estriado" constituido por microvellosidades conteniendo microfilamentos en su interior y variando de tamaño según su localización en la vellosidad, más altas en las células apicales; unidos por sistemas de conjunción: zona ocludens, zonula adherens y desmosomas (D) constituyendo estrechos espacios intercelulares. En el citosol se hallan mitocondrias (M) con crestas y gránulos densos en la matriz, retículo endoplasmático liso (REL) y rugoso (RER) con los ribosomas adheridos, el aparato de Golgi (AG) bien formado con algún dictiosoma, lisosomas (L), sobre todo en el polo apical de la célula, y ribosomas libres. Además está el núcleo con la doble capa fosfolipídica de la membrana nuclear íntegra y la cromatina de distribución homogénea junto al nucleolo⁹¹.

En un primer grado de alteración se ve que las mitocondrias aparecen hinchadas y la matriz es menos densa en algunas células de la parte apical de los villi. La membrana nuclear presenta zonas irregulares y la cromatina

comienza a agruparse. Se pueden observar algunos linfocitos entre los enterocitos.

Con mayor tiempo de isquemia todas las mitocondrias están edematosas y han desaparecido los gránulos densos. Hay dilataciones de cisternas del RE, con R desligados. Aumenta el espacio infranuclear, se reduce el número de microvellosidades a diferentes niveles y se agrupa más la cromatina.

Posteriormente el borde en cepillo se vuelve irregular, con desaparición parcial de microvellosidades. Los D aparecen ensanchados, algunos distorsionados, en las células de la zona apical de la vellosidad. Hay alguna rotura en la membrana y el RE se distiende formando amplias vacuolas. Las mitocondrias aparecen muy hinchadas y los cambios mencionados se empiezan a observar ocasionalmente en las células de las criptas.

Después de una hora se empieza a hacer evidente la vacuolización extracelular entre los microvilli y aparecen los desmosomas ensanchados en todas las vellosidades. Estos últimos cambios se acentúan más tarde, hay una gran vacuolización intracelular, amplios espacios intercelulares en los complejos de unión, incluso en la zona de las criptas, y en los nucleos la cromatina está muy agrupada.

Todas estas alteraciones pueden ser ordenadas y establecer, como se hace con la lesión histológica una escala de grados de lesión ultraestructural⁹².

2.6. Posibilidades terapéuticas

Aunque el tratamiento más efectivo para prevenir el daño producido en la isquemia mesentérica sea evitar el vasoespasmo³⁴, una terapéutica alternativa es la utilización de agentes que atenuen los efectos de la formación de radicales libres de oxígeno. Así las drogas antioxidantes pueden actuar en la reperfusión intestinal por medio de los siguientes mecanismos de acción:

- 1.- Interfiriendo en los procesos de formación de radicales libres.
- 2.- Bloqueando su acción.
- 3.- Suprimiendo la amplificación secundaria al impedir la implicación del neutrófilo e interceptar el ataque de radicales libres secundarios u otros componentes biológicos derivados.

1.- Se bloquea la formación de radicales libres de oxígeno con el alopurinol y el oxipurinol, su metabolito activo. Ambos son análogos estructurales de la

hipoxantina e inhiben, de forma competitiva y no competitiva respectivamente, la xantinaoxidasa (XO) aumentando así la concentración de hipoxantina y disminuyendo los niveles de ácido úrico en los homogeneizados de la pared intestinal^{93,94,95,96}. El ácido fólico y el pterinaldehído actúan de la misma forma que el anterior evitando la formación de superóxido⁹⁷.

Otras dos formas de inhibir la génesis de radicales libres de oxígeno es impedir el paso de XO a XD, como hace el inhibidor de la "Soybean trypsin" o inactivar el apoenzima de XO que se consigue con una dieta rica en tungsteno o deficitaria de molibdeno^{97,98}.

2.- La acción de los RLO puede ser modulada por mecanismos enzimáticos o no enzimáticos. La SOD, barredora del radical superóxido, administrada parenteralmente o instilada a nivel local, en su forma bovina o humana recombinante, ve limitados sus efectos por la corta vida media de su molécula (seis minutos aproximadamente). Se han utilizado inmunoglobulina humana IgA1, polietilenglicol o liposomas con la intención de prolongarla, llegando en algunos casos a conseguir una vida media de 40 horas^{94,97}. La catalasa, que elimina H₂O₂ y evita la formación del radical hidroxilo a través de las reacciones de Haber-weiss y Fenton, también puede ser de utilidad y para aumentar su vida media, también corta, se puede recurrir a las mismas fórmulas que se utilizaron anteriormente^{94,97}.

Los "Scavengers" no enzimáticos reaccionan directamente con los RLO para formar productos menos reactivos y entre ellos destacan: CuDIPS, cobre(II) (ácido 3,5-diisopropilsalicílico), CuMeTIM, CuTIM, CuDIM, Desferal-Mn (DF-Mn), con una actividad similar a la SOD. El manitol, la albúmina, el dimetilsulfóxido, la dimetiltiourea o los "lazaroides" (21-aminoesteroides) como el U74006F también son "scavengers" de RLO y/o hidroperóxidos lipídicos^{94,97,99}. Otros compuestos que bloquean la acción de los RLO al interferir en la formación de radicales hidroxilo mediada por las reacciones de Haber-Weiss y Fenton son los quelantes de los metales de transición: la deferroxamina, que secuestra hierro, y el etilendiaminotetracético (EDTA), inefectivo sin embargo al no evitar la oxidación del hierro^{94,97}.

En este apartado se podrían incluir aquellas sustancias que potencian la actividad antioxidante endógena: Oltipraz, Ebselen, glutatión y N-acetilcisteína⁹⁷.

3.- Se contrarresta o previene la amplificación del daño producido por los RLO al participar el neutrófilo suprimiendo la actividad de la NADPH oxidasa o inhibiendo la adhesión del neutrófilo al endotelio. La adenosina, los bloqueantes de los canales de calcio, los anestésicos locales y los antiinflamatorios no esteroideos (AINES) interfieren en la función de la NADPH por diferentes mecanismos. En cambio inhiben la quimiotaxis y adhesión del neutrófilo al endotelio el ácido nordihidroguaiarético (NDGA), el L663,536, los anticuerpos monoclonales contra el complejo CD11/CD18 (IB4), la GMP-140 y los antagonistas del FAP (BN 5201 y WEB 2086)^{79,97,100}.

Como antioxidantes "per se" se consideran aquellos que interrumpen la peroxidación. Incluyen la vitamina E, el propanolol, bloqueantes de los canales de calcio y el captopril⁵⁴.

2.6.1. ALOPURINOL

El alopurinol (4 hidroxipirazolopirimidina), sintetizado en principio con la intención de que funcionase como agente antineoplásico y posteriormente utilizado ampliamente en el tratamiento de la hiperuricemia, debe su utilidad a la capacidad de inhibir de forma competitiva la xantina oxidasa; que en situaciones de isquemia-reperfusión impide la formación de radicales libres de oxígeno¹⁰¹. Esta forma de acción se debe a la analogía que presenta con el sustrato de la XO: la hipoxantina (Figura 11). Hay, no obstante, estudios que consideran la posibilidad de que pueda tener un efecto "scavenger" directo¹⁰².

En su forma sólida es un polvo blanco que precisa un medio alcalino (pH:9-10) para su solubilidad en alcohol o agua, siendo insoluble en cloroformo¹⁰³.

Se metaboliza parcialmente formando oxipurinol, su metabolito activo. Tiene una vida media de aproximadamente una hora, muy inferior a la del oxipurinol, veinticuatro veces mayor. Se elimina vía renal, por lo que se ha de considerar su ajuste ya sea en cuanto a la dosis o en cuanto al intervalo de tiempo de

administración en aquellas situaciones con insuficiencia¹⁰¹.

Entre sus posibles reacciones adversas destaca un síndrome de hipersensibilidad que puede ser grave, alteraciones en test de función hepática y trastornos hematológicos diversos. Como interacciones con otros fármacos puede aumentar la vida media de la 6-mercaptopurina y de la azatioprina al inhibir su oxidación¹⁰¹.

Se puede administrar por vía oral, intraperitoneal o de forma parenteral. Se ha comprobado su utilidad en isquemia-reperfusión intestinal después de haber sido administrado tanto en bolo intravenoso como cuando se hacía de forma fraccionada, dando una parte "per os" horas antes de establecer la isquemia. Así se observó que aumentaba la concentración de hipoxantina y disminuía la de ácido úrico en la homogeneizado de pared intestinal⁹⁵.

Se ha demostrado que ofrece efectos beneficiosos en otras entidades, como la pancreatitis aguda, en la que también participan los RLO¹⁰⁴ y se ha incluido en algunas soluciones de preservación de la Universidad de Wisconsin como es el líquido de Belzer¹⁰⁵.

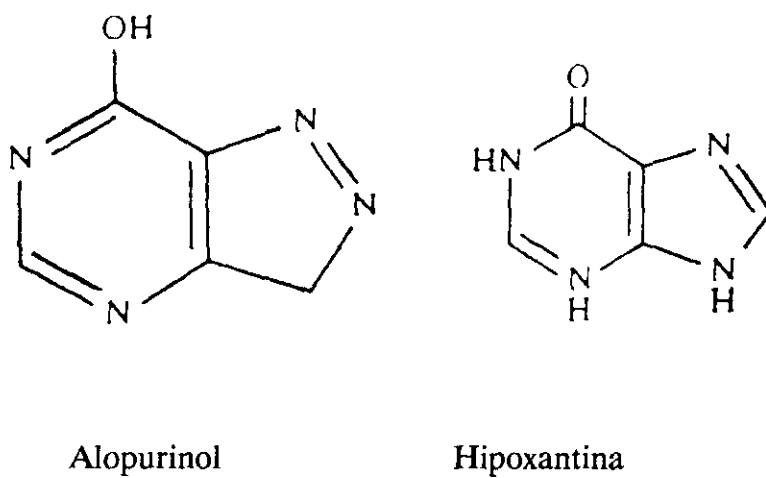


Figura 11. Demostración de la analogía entre la estructura química del alopurinol y de la hipoxantina

2.7. Estudio de la isquemia-reperfusión intestinal

Se puede enfocar desde un punto de vista clínico, analizando variables recogidas de forma retrospectiva o prospectiva en un protocolo de estudio que incluya desde nuevas facetas diagnósticas a posibles utilidades terapéuticas farmacológicas o quirúrgicas, con la intención de mejorar el pronóstico de pacientes cuyo problema fundamental es la isquemia intestinal o bien ésta forma parte del curso evolutivo de alguna otra entidad. De hecho es en torno a esta cuestión donde se está avanzando ultimamente con estudios indirectos de oxigenación mucosa intestinal utilizados como guía terapéutica de enfermos con estado crítico.^{7,57,106}

Son muy escasos, sin embargo, los estudios clínicos de isquemia intestinal donde se valoran derivados de la peroxidación lipídica¹⁰⁷, generalmente éstos se realizan en estudios de base experimental. No ocurre así en otros órganos como el corazón donde si se evalúan niveles de MDA-TBA en un entorno clínico después de trombolisis¹⁰⁸.

2.7.1. MODELOS EXPERIMENTALES

Como animales de experimentación para el estudio de la fisiopatología de la isquemia-reperfusión intestinal se han utilizado perros, cerdos, conejos, gatos, etc. Sin embargo los más empleados dada la facilidad de su manejo, costo y posibilidad de conseguir una muestra homogénea es la rata. Presenta como aspecto adverso su tamaño que condiciona en muchos casos la aplicación de técnicas operatorias que en algunos experimentos permiten un control más riguroso de factores como la presión arterial, diuresis y flujo mesentérico.

Se puede tomar como modelo de isquemia intestinal un segmento o la totalidad del intestino delgado. Ambos presentan particularidades topográficas, anatómicas y fisiológicas que justifican la pluralidad de protocolos existentes con un mismo objetivo: instaurar un déficit reversible de flujo sanguíneo.

La circulación mesentérica mantiene el consumo de oxígeno siempre que su flujo no descienda por debajo de un determinado umbral, de 30 ml/min x 100g. en el perro y algo por debajo en el gato^{28,44}. A su vez el consumo de O₂ ha de disminuir en un 50% con respecto al normal para que se manifiesten en la mucosa intestinal alteraciones fisiológicas cuantificables¹⁰⁹. Con lo anterior se demuestra que el intestino delgado puede recurrir a mecanismos compensatorios que accionados permiten paliar una limitación al flujo puesta por un experimentador. Así se deben esperar diferencias en los datos presentados por diferentes autores amparándose en un diferente diseño y modelo experimental con distintas posibilidades de compensación.

Con la intención de disminuir el flujo mesentérico se puede recurrir a multitud de sistemas: Inocular bacterias o endotoxina bacteriana¹¹⁰, producir un shock cardiogénico con un taponamiento pericárdico³⁸ o hemorrágico con exanguinación¹¹¹, colocar un sistema de limitación del flujo venoso⁸⁶, pasar un hilo en forma de asa de la que después se tracciona desde el exterior o bien seccionar el pedículo vascular que posteriormente se anastomosará¹¹². El más utilizado, sin embargo, es la colocación de un clamp microvascular sobre un tronco o rama arterial, que puede disponer de un sistema de regulación ajustable en algunos casos^{87,113,114,115}.

Independiente de la acción sobre los vasos sanguíneos principales y optativamente de sus colaterales, que se pueden ligar y así eliminar su potencial influencia compensadora, se puede actuar sobre el tubo digestivo aislándolo de múltiples formas. Se pueden ligar ambos extremos del segmento de intestino utilizado¹¹⁶, o bien practicar enterotomías manteniendo o eliminando el resto de intestino circundante (duodeno e intestino grueso)^{90,100,117}. En modelos donde se utilizan grandes animales es posible colocar sistemas de control de flujo electromagnéticos o Doppler, también utilizado en ratas, que son más precisos que la palpación y el cambio de coloración de la pared intestinal, métodos habituales para la identificación de flujo reperfusional^{89,100,116}.

En relación con la toma de muestras éstas pueden hacerse del torrente venoso, arterial o incluso de un homogeneizado de la pared intestinal o de la mucosa^{66,82,118,119,120}.

Considerando todas las posibles alternativas mencionadas se ha de elegir aquel modelo que se ajuste a la circunstancia clínica que se quiera remedar si es esto lo que se pretende o bien intentar limitar con un diseño y protocolo de trabajo adecuados sesgos que puedan interferir en los resultados del experimento, dado el gran número de factores que intervienen.

2.7.2. PARAMETROS DE VALORACION

Cuando un tejido es sometido a isquemia se produce una secuencia de reacciones químicas que conducen a alteraciones metabólicas y disfunciones celulares que sin reperfusión subsiguiente acaban finalmente en la necrosis tisular. No parece haber diferencias cualitativas entre los hallazgos histológicos vistos en el intestino isquémico y aquel sometido a isquemia con reperfusión ya que se utiliza generalmente la misma escala para medir ambas situaciones¹¹⁷. Hay, sin embargo, marcadores bioquímicos que se asocian de forma exclusiva con la reperfusión debido a la acción de los RLO producidos al reinstaurar el flujo y disponer de oxígeno en un ambiente isquémico.

De esta forma se pueden valorar parámetros que en algunos casos son específicos de lesión reperfusional y en otros indican alteraciones en la mucosa

intestinal que pueden ser tanto consecuencia de la isquemia como de la posterior revascularización. Presentamos los más difundidos:

1. Identificación de radicales libres de forma directa con resonancia de spín electrón y quimioluminiscencia^{63,64,65,66}.
2. Concentración de XO, XD, hipoxantina, ácido úrico, nucleótidos de alta energía (ATP) y glutatión^{44,61,93,117,120,121}.
3. Derivados de la peroxidación lipídica: dienos conjugados, Malondialdehído, etano o pentano^{99,107,116,118,119,122}.
4. Sustancias implicadas en la acción del neutrófilo: Leucotrieno B₄, Tromboxano A₂, Factor de activación plaquetaria, mieloperoxidasa o elastasa^{44,75,76,77,78,82,93,99,100,118}.
5. Alteraciones histológicas^{38,41,44,66,85,86,87,89,90,98,99,110,114,118,123,124}.
6. Alteraciones ultraestructurales^{71,72,92}.
7. Pruebas de funcionalismo como las alteraciones en la permeabilidad o los trastornos en la absorción y secreción de enzimas digestivos^{49,115,119,121,124,125,126}.

2.7.3. METODOS DE ESTUDIO DE LA PEROXIDACION LIPIDICA

La cuantificación directa o indirecta de derivados de la peroxidación lipídica en sistemas biológicos puede hacerse sobre modelos experimentales *in vitro* o *in vivo*¹²⁷.

Los estudios *in vitro* han usado generalmente células enteras o suspensiones u homogeneizados de organelas intracelulares: nucleos, mitocondrias, microsomas, lisosomas, membranas plasmáticas o liposomas. Para producir la peroxidación lipídica se utilizaron radiaciones ionizantes, ultravioletas o del

espectro visible en presencia de un fotosintetizador; agentes reductores como ascorbato, cisteína, CCl_4 o NADPH que favorece el paso de Fe^{3+} a Fe^{2+} mediado por la NADPH-citocromo P-450 reductasa o algún tipo de lipoxigenasa¹²⁷.

La peroxidación lipídica está implicada en todos los procesos fisiopatológicos donde hay liberación de radicales libres de oxígeno y sustratos como los ácidos grasos de membrana: isquemia-reperfusión, carcinogénesis, pancreatitis aguda, intoxicaciones, etc. y se pueden diseñar entonces modelos que la induzcan con técnicas invasivas o no invasivas¹²⁸.

Se puede cuantificar la peroxidación lipídica en sistemas biológicos estimando los ácidos grasos de la membrana, los dienos conjugados, derivados fluorescentes, la quimioluminiscencia, el malondialdehído y derivados gaseosos hidrocarbonados como el etano o pentano, utilizando técnicas muy diversas^{127,129,130,131}.

2.7.3.1. Determinación de malondialdehído

El malondialdehído o aldehído malónico es el compuesto que más se ha utilizado como indicador de la peroxidación lipídica en la isquemia-reperfusión intestinal^{107,116,118,119}. En su forma libre se puede medir por absorbancia UV, polarografía o cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)¹³².

El método más difundido para su determinación en materiales biológicos es la espectrofotometría una vez que reacciona con el ácido tiobarbitúrico (TBA). Una molécula de MDA reacciona con dos de TBA eliminándose dos moléculas de agua y formando un pigmento cristalino rosado con una absorbancia máxima a 532-535nm. Se considera que el TBA además de con MDA reacciona, aunque en escasa medida, con otras moléculas denominadas de forma genérica "MDA-like". En conjunto son consideradas todas como sustancias reactivas con el TBA (TBARS), expresión preferida por muchos autores en vez de hablar de MDA ya que lleva implícita la posible incorporación de las sustancias "like".

Circunstancias clave para poder comparar diferentes determinaciones con este método son el pH de la muestra, el tipo de ácido empleado, el tiempo de

reacción y el posible uso de catalizadores metálicos¹³².

Es menos específico que la HPLC ya que puede haber productos en la muestra que se toma con significativa absorbancia que lo pueden interferir, aunque, excepto para muestras pigmentadas, sus valores son bastante próximos a los obtenidos con el primero¹³². Otro método, diferente al espectrofotométrico que puede identificar el complejo MDA-TBA es la fluorometría, con una emisión máxima a los 532-535 nm. Basado en la capacidad de reaccionar el MDA con un grupo amino de los fosfolípidos y dar un compuesto fluorescente¹²². No utilizado por la presencia de compuestos naturales y derivados diferentes del MDA con alta capacidad fluorescente¹³².

En la actualidad se está empezando a comercializar el "Test Kit" LPO-586 (BIOXYTECH^R, Francia) que mejora la sensibilidad y especificidad de métodos colorimétricos descritos anteriormente.

2.7.4. MODELOS DE ENSAYO TERAPEUTICO CON ALOPURINOL

Como ya se ha mencionado previamente el alopurinol, al inhibir la XO, previene las consecuencias de la liberación de RLO en situaciones de isquemia-reperusión. Su efecto ha quedado patente en múltiples trabajos experimentales de isquemia-reperusión intestinal^{44,61,89,93,95,119,123}. Se han definido diferentes ensayos terapéuticos en los que varían el modelo experimental de isquemia-reperusión sobre el que se trabaja, la vía de administración empleada para proporcionar el medicamento, la dosis utilizada y el momento de la inoculación o ingesta.

Con respecto al primer punto ya se ha comentado en el apartado de modelos experimentales las diferentes opciones posibles.

Como vía de administración se puede utilizar la parenteral^{44,61,89,119}, la intraperitoneal¹²³ o la oral⁹³. Pudiendo en algunos casos recurrir a más de una en cronogramas distintos y con la intención de conseguir mayores concentraciones en la mucosa intestinal y por tanto más efecto antioxidante^{61,95}.

Las dosis generalmente son de 50,100 o 200 mg/Kg, siendo suministrada la misma cantidad independientemente de la vía de administración utilizada. La

forma en que fue suministrada lo que condiciona es el cronograma. Así en la vía parenteral (iv) se administró de forma muy variable, desde 60 minutos antes de establecer la isquemia hasta 20 minutos antes de la reperfusión^{44,89}, en la vía intraperitoneal 30 minutos antes del clampaje y oralmente de 24 a 48 horas antes del comienzo de la isquemia^{93,95,123}.

En cualquier caso el objetivo es conseguir unos niveles adecuados en la mucosa intestinal en el momento en que permanece abierta la "ventana terapéutica", es decir, en el periodo de tiempo en que tienen lugar la mayor parte de las alteraciones bioquímicas desencadenadas por la reperfusión¹³³.

3. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

Se sistematiza la hipótesis planteada de la siguiente forma:

1. La reperfusión en la mucosa intestinal isquémica condiciona cambios bioquímicos y metabólicos con repercusiones en la función y estructura celular.
2. Se forman radicales libres de oxígeno al actuar la xantina oxidasa, generada durante la isquemia, sobre la hipoxantina en presencia del oxígeno proporcionado en la reperfusión.
3. Estos radicales producen una peroxidación de lípidos de diferentes estructuras celulares con las siguientes consecuencias:
 - A) Alteración de los niveles tisulares de malondialdehído.
 - B) Aparición de trastornos morfológicos identificables en el enterocito y en el epitelio mucoso intestinal.
4. El alopurinol, inhibidor de la xantina oxidasa, podría disminuir la formación de radicales y así evitar que aumentasen los niveles de malondialdehído y se produjesen lesiones en la mucosa intestinal.

Con la intención de determinar el alcance de los daños mencionados y la utilidad del alopurinol se diseña esta tesis experimental cuyos objetivos son:

1. Analizar las variaciones en los niveles de malondialdehído en la mucosa intestinal sometida a diferentes tiempos de isquemia-reperusión.
2. Estudiar los cambios histológicos que se producen.
3. Evaluar la diferencia de grado lesional desde el punto de vista ultraestructural.
4. Conocer el efecto terapéutico del alopurinol valorando los cambios en la concentración de malondialdehído tisular y las modificaciones del grado de lesión mucosa a nivel óptico y del enterocito a nivel ultraestructural.

4. MATERIAL Y METODOS

4.1. Material

4.1.1. MATERIAL BIBLIOGRAFICO

Previamente a la realización del experimento y antes de definir el diseño y modelo definitivos se realizó una revisión exhaustiva de la bibliografía de los últimos diez años, recogiendo también referencias anteriores de reconocida significación. Se consultaron artículos de revistas científicas españolas y extranjeras, libros de texto y tesis doctorales relacionadas con la fisiopatología y clínica de los procesos de isquemia-reperfusión y la implicación en su patogenia de los radicales libres de oxígeno. Para la búsqueda bibliográfica se acudió a los sistemas de documentación periódicos (Index Medicus, Cumulated Index Medicus, Current Contents e Índice Médico español) de la biblioteca del Hospital Central de Asturias, del Centro de Documentación y de la Facultad de Medicina de la Universidad de Oviedo (Servicio Index Medicus-CD ROM). Para la selección de artículos se utilizaron las siguientes palabras clave: Intestino delgado, ratas, circulación mesentérica, obstrucción vascular mesentérica, mucosa intestinal, isquemia, daño reperfusional, radicales libres de oxígeno, peroxidación de lípidos, malondialdehído, sustancias reactivas con el ácido

tiobarbitúrico, espectrofotometría, histología, microscopio electrónico, antioxidantes y alopurinol.

La bibliografía más útil para nuestro estudio se presenta por orden de aparición en el texto siguiendo las indicaciones del "International Comitee of Medical Journal Editors"¹³⁴.

Se exponen algunos esquemas y tablas sin traducción respetando así su originalidad.

4.1.2. ANIMALES DE EXPERIMENTACION

Se utilizaron 48 ratas macho de la cepa Wistar del animalario de la Universidad de Oviedo con una media de peso de 334g. (DS: 56g). Se usaron sólo machos porque son más dóciles, alcanzan mayor peso más rápidamente y además se evitan posibles sesgos atribuibles al sexo. Antes y mientras duró el experimento permanecieron en las mismas condiciones de estabulización; igual temperatura y humedad, regimen luz-oscuridad e identicas posibilidades de alimentación. Todo el manejo de los animales de experimentación se hizo siguiendo las normas éticas vigentes y bajo la aprobación de la Comisión de investigación del Departamento de Cirugía y Especialidades Medico-Quirúrgicas de la Universidad de Oviedo y la Comisión de control del animalario.

4.1.3. LABORATORIOS E INSTRUMENTAL

Los experimentos se realizaron en el laboratorio del Departamento de Cirugía y especialidades Medico-Quirúrgicas de la Facultad de Medicina de Oviedo, las determinaciones espectrofotométricas en el laboratorio del Departamento interfacultativo de Bioquímica y la última fase del procesado de microscopía electrónica en el Servicio Central de Microscopía electrónica de la misma facultad.

Además del instrumental convencional de laboratorio (tubos de ensayo, pipetas, matraces, balanzas, etc.) y del necesario para la inoculación de drogas se precisó material quirúrgico específico tal como pinzas de disección de Adson,

tijeras, escalpelo y clamp arterial para producir isquemia.

Se utilizó para la preparación de la solución de mucosa el aparato Ultraturax^R, una centrífuga Centromix^R S-549 y para la determinación de MDA el espectrofotómetro Shimadzu^R UV-160.

Para realizar los cortes histológicos se usó el microtomo Reicherter Jung^R modelo 1165 "Rotomat" a 1µm de espesor y para la observación de éstas teñidas el microscopio Leitz^R modelo "Dialux 20 EB" conectado a un sistema de fotografía automática wild^R PS 45.

Los cortes de las preparaciones para el estudio ultraestructural, de 500 Å de grosor, se hicieron, previa piramización, con el ultramicrotomo LKB_R 5. Para su visualización se utilizó el microscopio electrónico de transmisión Zeiss^R EM 109.

4.1.4. PRODUCTOS EMPLEADOS

Para la anestesia:

- Atropina (Atropina Sulfato Braun. B. Braun Medical S.A. 1mg./ml.)
- Ketamina (Ketolar^R. PARKE-DAVIS S.A. 50mg./ml.)
- Diazepam (Valium^R. Roche. 5mg./ml.)

Como antioxidante:

Alopurinol (Zyloric^R. Gayoso-Wellcome S.A. 1mg/ml.) disuelto en NaOH 1M, pH:9-10.

El resto de sustancias para la determinación de Malondialdehído y el procesado para la visualización de las preparaciones al microscopio óptico y electrónico serán descritas más adelante, junto a la técnica correspondiente.

4.2. Métodos

4.2.1. MODELO EXPERIMENTAL

Se diseña con la intención de que remede las circunstancias que con más frecuencia aparecen en los procesos de isquemia reperusión de intestino delgado: tromboembolismo y cirugía mesentérica y aortobifemoral. Así se elige un modelo simple y fácilmente reproducible en el que la isquemia intestinal se produce por la interrupción brusca de la circulación arterial al colocar un clamp en el origen de la arteria mesentérica superior. Al contrario de lo realizado por otros autores que aislaron el segmento de intestino a estudio ligando las colaterales y seccionando el tubo intestinal, en nuestro caso no se actuó ni sobre las primeras ni sobre la pared intestinal manteniendo así indemne su potencial compensador y el tránsito digestivo. Con el fin de no recoger en la muestra zonas del intestino que fácilmente se vieran irrigadas por colaterales del tronco celiaco o de la mesentérica inferior se despreciaron los 5 cm. proximales y distales del intestino mesentérico. Se colocó un clamp microvascular que garantizó la posterior revascularización, asegurándose de que eso ocurre al percibir, por palpación, el latido de la arteria mesentérica distalmente a la zona

de la oclusión previa.

Este modelo se aplica en un diseño experimental en que la elección de los miembros de los diferentes grupos y del control se hace de forma aleatoria garantizando la igualdad inicial de los diferentes grupos y obviando así la realización de pretest.

4.2.2. REALIZACION DEL EXPERIMENTO

Hasta su inicio el animal tuvo acceso libre a los alimentos con el fin de imitar en lo posible la situación fisiológica basal.

Como técnica anestésica se utilizó una inyección intramuscular de una mezcla de ketamina 5cc (25mg), atropina 1cc (1mg) y diazepam 4cc (20mg) a razón de 0.5ml/100 g de peso.

Bajo condiciones de asepsia se disecciona el paquete vascular femoral y 10 minutos antes de la manipulación de la arteria mesentérica se introduce con una aguja 25G 5/8, durante un minuto, 1 cc de suero salino o solución con alopurinol, según el grupo del protocolo, en la vena femoral común.

Se rasura el abdomen del animal y se realiza una laparotomía media identificando y disecando la arteria mesentérica superior en su salida de la aorta. Se coloca a este nivel, después de asegurarnos de que no quedan colaterales próximas, un clamp microvascular; comprobando su eficacia al notar la ausencia de latido distal (Figuras 12, 13 y 14). Se cierra la laparotomía con sutura metálica para permitir una rápida reapertura, la retirada del clamp y la comprobación de la reperfusión apreciando el latido por palpación, según el grupo de estudio.

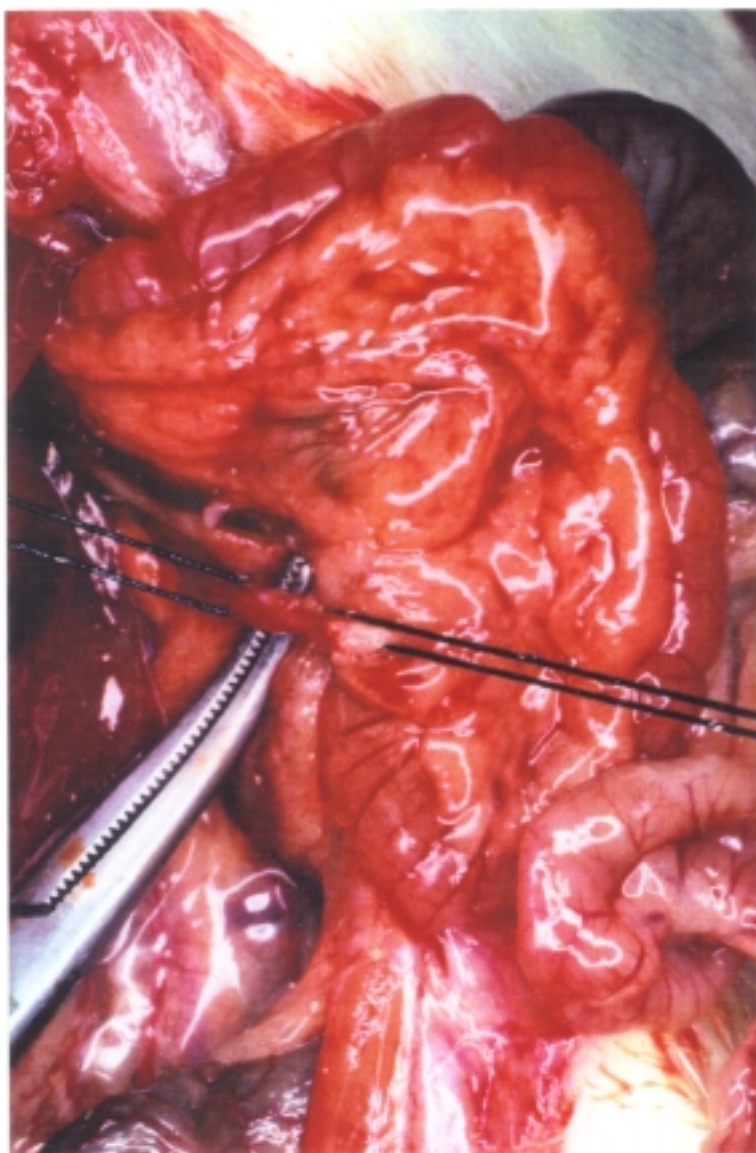


Figura 12. Disección de la arteria mesentérica superior

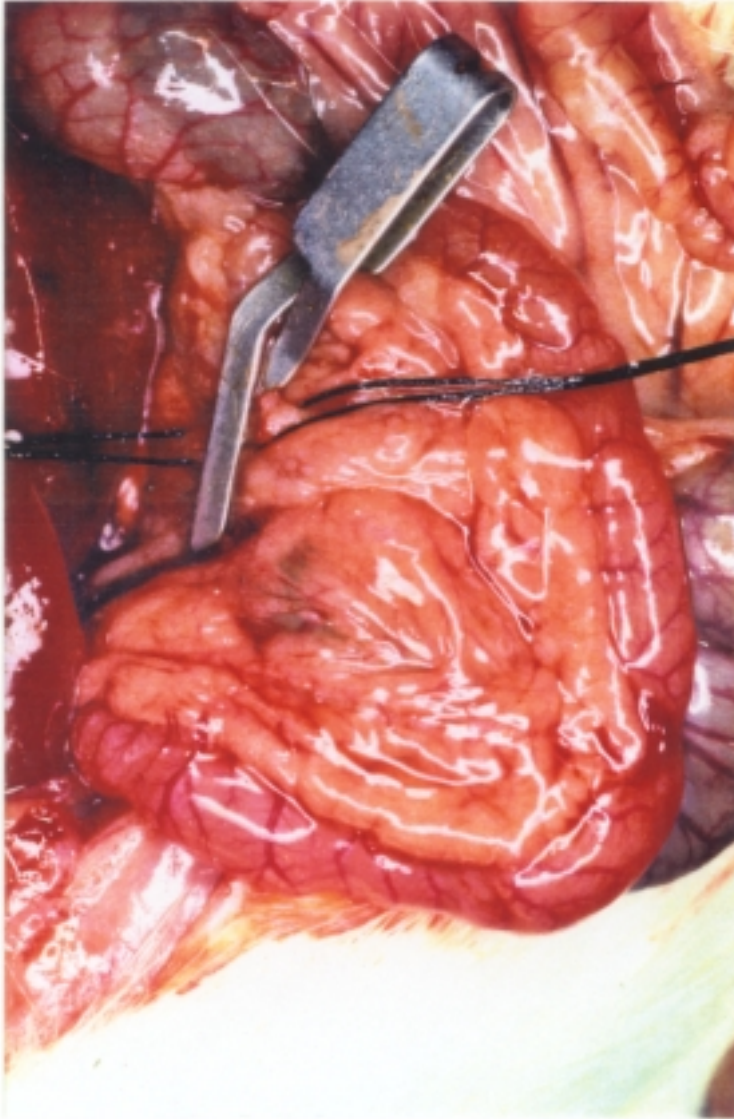


Figura 13. Colocación del clamp.

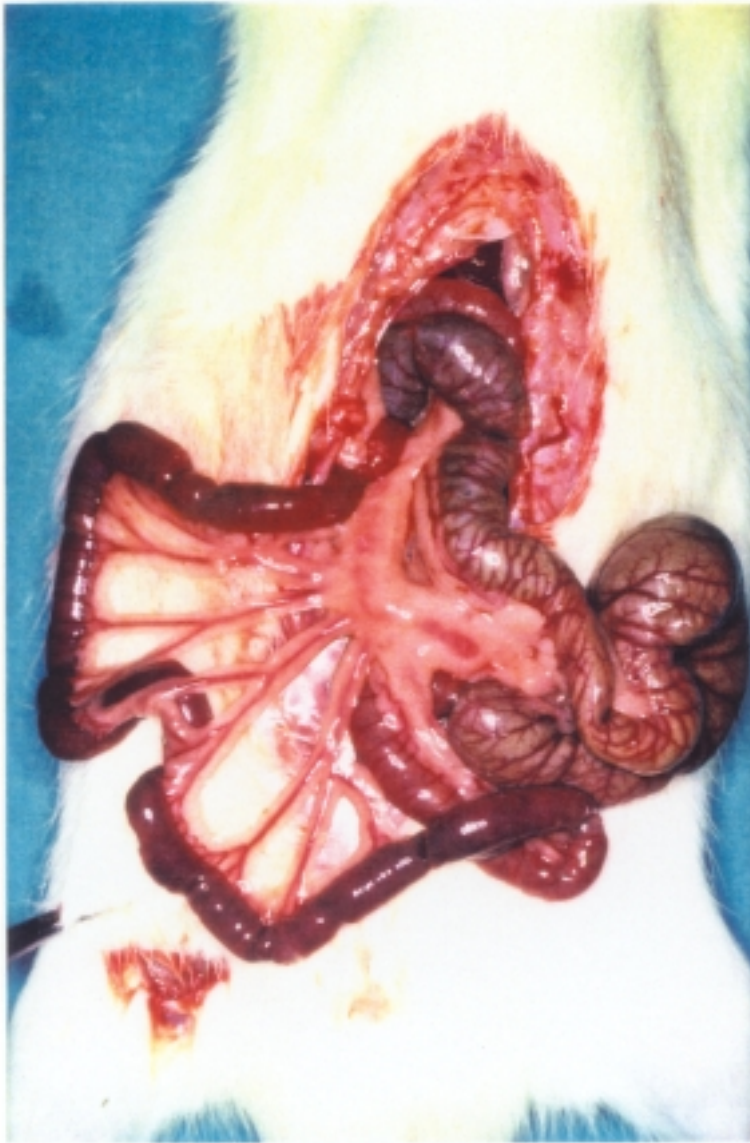


Figura 14. Aspecto del intestino delgado después de 30 minutos de isquemia.

4.2.3. RECOGIDA DE MUESTRAS

Se extirpa todo el intestino delgado mesentérico a excepción de cinco centímetros proximales de yeyuno y de los cinco últimos de ileon distal. Del segmento resultante se recogen:

- 12 cm para la determinación del malondialdehído. Esta parte se abre longitudinalmente con tijera y una vez expuesta la cara luminal y lavada con suero salino se raspa con un escalpelo para extraer 150 mg. de mucosa intestinal (Figura 15).
- 2 cm para el estudio histológico.
- 1 cm destinado al análisis ultraestructural se divide en bloques de 3mm de grosor máximo.

Cada muestra, una vez procesada, fue marcada sin que se pudiese identificar a que grupo pertenecía antes del momento de la determinación.

Una vez finalizada la toma de muestras se sacrifica el animal, bajo anestesia, con exanguinación.



Figura 15. Obtención de mucosa por raspado con escalpelo.

4.2.4. PROTOCOLO DE TRABAJO

Se realizó la distribución de los animales al azar en 8 grupos de 6 ejemplares cada uno conforme al siguiente protocolo:

Grupo control (C). Una vez anestesiado el animal e inyectado 1ml de suero salino via femoral común en un minuto se espera hasta que transcurren 10 y se practica una laparotomía media. Se toman muestras, los valores obtenidos se consideran como normales y sirven de control para la comparación con el resto de grupos. "Sham operation".

Grupo de isquemia de 30 minutos (I30). Se mantiene una isquemia de la arteria mesentérica superior durante 30 minutos y después de obtener las muestras es sacrificado el animal.

Grupo de isquemia de 60 minutos (I60). Sólo se diferencia del anterior en que el tiempo de isquemia es de 60 minutos.

Grupo de isquemia de 30 minutos y reperfusión de 20 segundos (I30+R20s). Se siguen los pasos del grupo I30 pero antes de la toma de muestras se deja reperfundir el intestino durante 20 segundos.

Grupo de isquemia de 60 minutos y reperfusión de 20 segundos (I60+R20s). Igual que en el grupo de I60 pero con el tiempo adicional de reperfusión del grupo anterior.

Grupo de isquemia de 30 minutos y reperfusión de 10 minutos (I30+R10m). Como en el grupo I30 pero en este caso con una reperfusión de 10 minutos.

Grupo de isquemia de 60 minutos y reperfusión de 10 minutos (I60+R10m). A la isquemia del grupo I60 le siguen 10 minutos de reperfusión.

Grupo de isquemia de 30 minutos y Alopurinol (I30+ Alo). Exactamente igual que en el grupo de I30 pero administrando, durante un minuto, diez minutos antes de comenzar con la isquemia, 50 mg/Kg de Alopurinol en una solución de 1ml de suero salino, de forma IV en la femoral comun.

4.2.5. PARAMETROS DE ESTUDIO

Se valoraron:

1.- Concentración de malondialdehido. Expresado como pMol/mg de mucosa húmeda.

2.- Alteraciones histológicas. Para ello se tomó como referencia la escala de Chiu⁸⁵.

Grado

- 0 Vellosidad intestinal normal.
- 1 Espacio subepitelial en las vellosidades (espacio de Gruenhagen).
- 2 Despegamiento epitelial de las vellosidades.
- 3 Despegamiento epitelial masivo y hemorragia ocasional en la lámina propia.
- 4 Vellosidades denudadas y hemorragia en la lámina propia.
- 5 Desintegración total de la lámina propia.

3.- Cambios ultraestructurales.

Se cuantificaron dando un valor, entre 0 y 5, a cada una de las estructuras celulares consideradas más abajo (1-4). Posteriormente se suman éstos y se obtiene un valor final para cada ejemplar de experimentación. Fueron utilizados como criterios guía los presentados por Aho⁷¹ y Brown⁷².

Se utilizaron los siguientes parámetros ultraestructurales:

- (1) Hinchazón de la mitocondria, alteraciones en las crestas mitocondriales y desaparición de los gránulos densos.
- (2) Irregularidad de la membrana nuclear y agrupación de la cromatina.
- (3) Trastornos en el número y regularidad de las microvellosidades y distorsión y ensanchamiento de los desmosomas.
- (4) Dilataciones de cisternas del retículo endoplásmico, separación de los ribosomas y vacuolizaciones intra y extracelulares.

4.2.6. METODOS DE DETERMINACION

4.2.6.1.- Concentración de malondialdehido.

Para su cuantificación hemos recurrido al método que se basa en la capacidad de reacción de una molécula de malondialdehido con dos de ácido tiobarbitúrico (TBA) eliminando dos moléculas de agua y produciendo un pigmento rosado con un máximo de absorción a 535nm en el espectrofotómetro.

Como primer paso para calcular la cantidad de malondialdehido existente en una muestra de tejido a partir de la absorbancia que presenta en el espectrofotómetro se ha de disponer de una ecuación matemática o recta de regresión que relacione la absorbancia con la concentración.

Técnica de preparación del standard de MDA y recta de regresión.

Para ello se preparan una serie de concentraciones crecientes de 1,1,3,3-Tetrahidroxipropano (SIGMA, N° T-9889) que en el espectrofotómetro nos permiten obtener determinadas medidas de absorbancia y una ecuación lineal que nos relaciona ambas.

Procedimiento:

- Poner 120 microl de 1,1,3,3- Tetrahidroxipropano en 50 ml de CIH 0.1 M.
- Incubar a 50° C durante una hora.
- Conservar a 4° C protegido de la luz
- Se obtiene una solución de 720 microg/ml de MDA. A partir de ésta diluir o concentrar con agua destilada hasta conseguir las siguientes concentraciones:

$$S_1 = 2880 \text{ ng/ml}$$

$$S_2 = 1440 \text{ ng/ml}$$

$$S_3 = 720 \text{ ng/ml}$$

$$S_4 = 360 \text{ ng/ml}$$

$$S_5 = 180 \text{ ng/ml}$$

$$S_6 = 90 \text{ ng/ml}$$

El aspecto del pigmento obtenido a las diferentes concentraciones mencionadas se muestra en la figura 16 y en la 17 el espectro de absorción, con un pico a los 535nm.

La recta de regresión resultante se presenta en la figura 18.

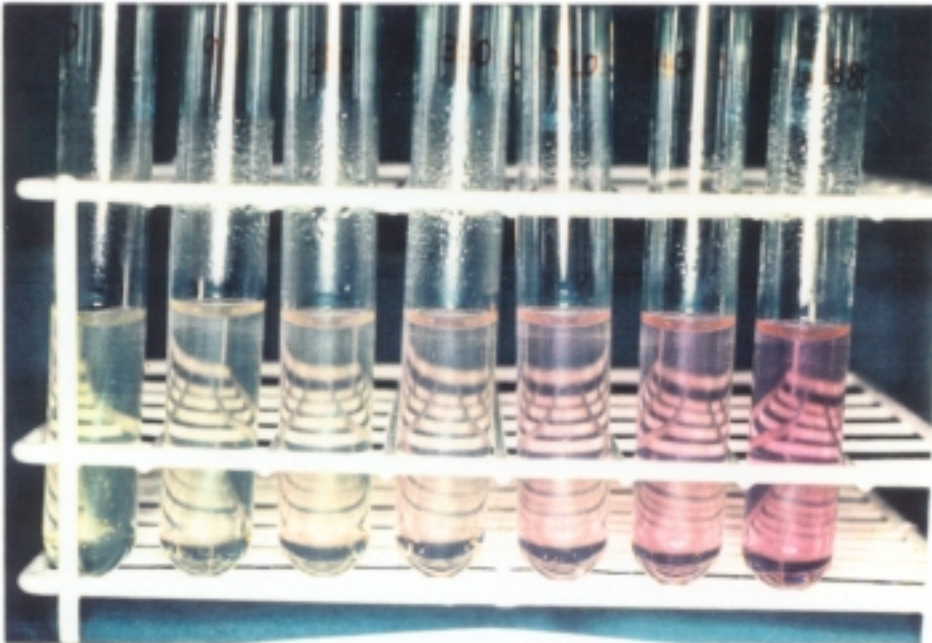


Figura 16. Tubos de ensayo con el pigmento para definir la curva standard.

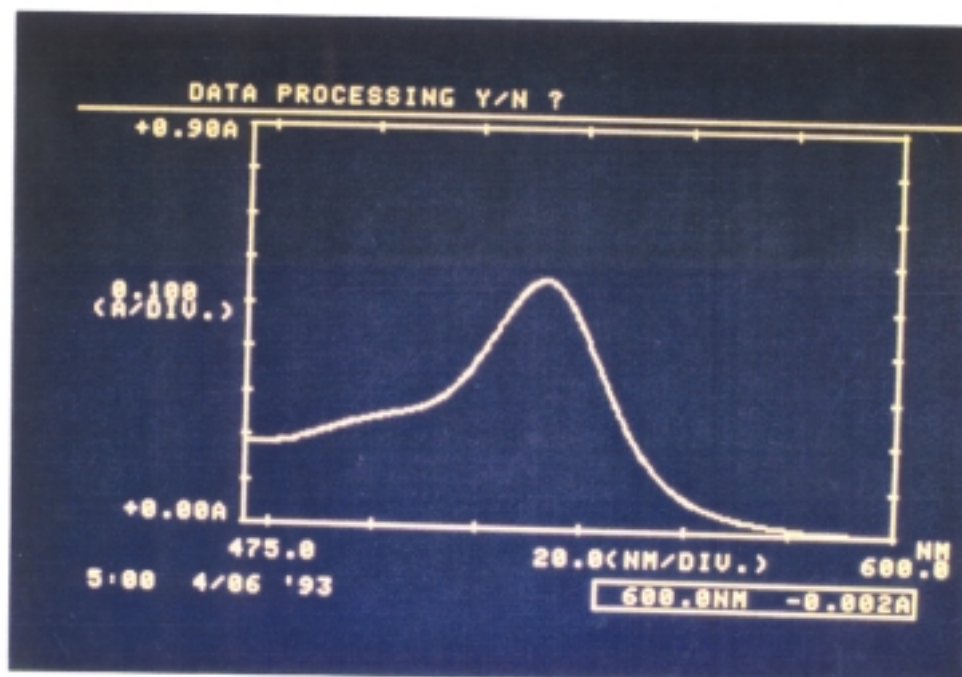


Figura 17. Curva de absorbancia del pigmento en el espectrofotómetro.

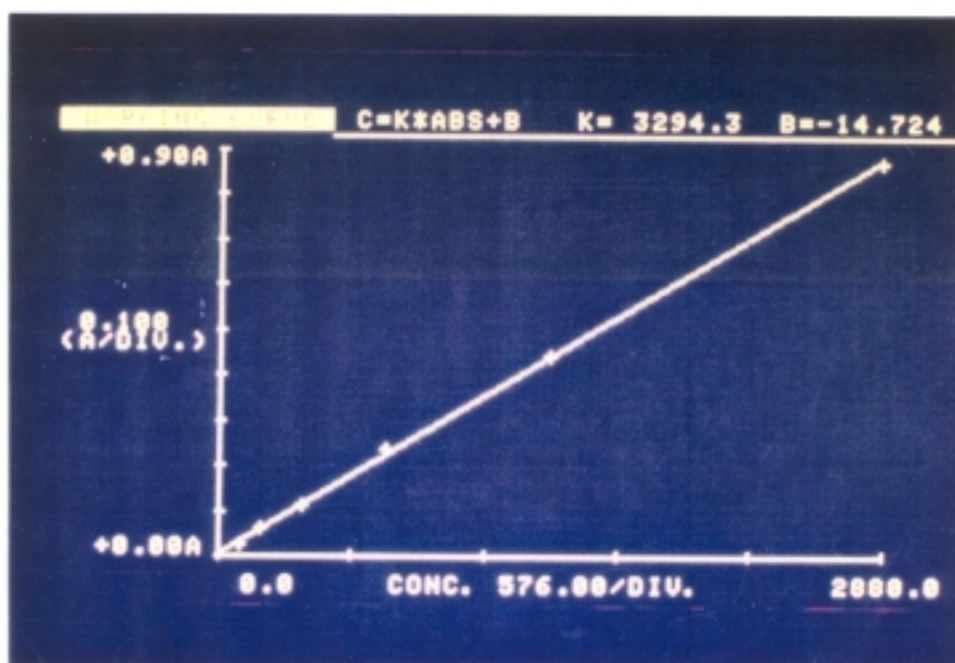


Figura 18. Recta de regresión resultante, que responde a la ecuación:
 $C = 3294.3 \times Abs - 14.724$.

Determinación del MDA¹³⁵:

- Se homogenizan bajo frío 150 mg. de mucosa intestinal en un tubo de ensayo con 1 ml de Tris-KCl con un pH de 7.4.

- La mezcla se incuba a 37° C durante 15 minutos.

- Se añaden:
 - 3 ml de ácido tiobarbitúrico al 0.75%
 - 2 ml de ácido tricloroacético al 30%
 - 0.2 ml de HCl

- Los tubos se colocan en agua a ebullición durante 15 minutos.

- Se centrifugan a 3000 r.p.m. durante 10 minutos.

- El sobrenadante se lee a 335 nm en el espectrofotómetro y se expresa la concentración obtenida en ng. por 150 mg. de tejido húmedo.

4.2.6.2.- Técnica histológica.

La muestra intestinal tomada de cada ejemplar fue fijada en formol tamponado a pH neutro al 10%. Antes de ser incluida en parafina se deshidrató de forma automática con alcoholes al 70, 90 y 100% y se aclaró con dos pases sucesivos por xilol.

Tras el corte con el microtomo a 1um de espesor se realizó la tinción con hematoxilina-eosina, PAS (Acido periódico de Schiff) y Masson según la técnica convencional y se dejó preparada para la visualización.

4.2.6.3.- Ultraestructura.

Un bloque de aproximadamente 3 mm es procesado de la siguiente forma:

- Sumergido en glutaraldehido al 5% durante 30 minutos.
- Partir la muestra, siempre incluida en la solución anterior, en bloques de 1mm y continuar la fijación 3 horas más.
- Extraer el glutaraldehido y lavar los bloques con tres baños de 10 minutos de tampón fosfato 0.1 M.
- Mantener en la solución de tampón fosfato hasta el momento de la postfijación con tetróxido de osmio (SIGMA^R) al 2% durante 90 minutos.
- Deshidratar haciendo pasar el bloque por soluciones acuosas de acetona a concentraciones crecientes:
 - . Acetona 30% 3 baños de 5 minutos
 - . Acetona 50% 3 baños de 5 minutos
 - . Acetona 70% +
Acetato de uranilo 0.5% en nevera 30 minutos
 - . Acetona 90% 3 baños de 5 minutos
 - . Acetona 100% 3 baños de 5 minutos
 - . Acetona 100% anhidra 3 baños de 10 minutos
- Preparar el medio de inclusión (SPURR-Standard^R) añadiendo los siguientes componentes en la cantidad indicada y agitando, evitando crear burbujas:
 - .ERL 4206-vinyl cyclohexane dioxide (VCD), 10.0g
 - .DER 736-diglycidyl ether of polypropylene glycol,6.0g
 - .NSA-nonenyl succinic anhydride, 26.0g
 - .DMAE-dimethylaminoethanol, 0.4g
- Mantener los bloques una hora, a temperatura ambiente, con los viales destapados, en cada una de las siguientes soluciones de acetona/medio de inclusión: 1/1, 1/3 y 0/1.

- Incubar las muestras en el medio de inclusión del molde durante 48 horas en la estufa a 60° C.
- Extraer del molde y tallarlo en el ultramicrotomo para que una vez en la rejilla sea teñido y pueda ser observado en el microscopio electrónico.

4.2.7. PRESENTACION Y TRATAMIENTO ESTADISTICO DE LOS RESULTADOS

Para la presentación escrita se ha utilizado como software el procesador de textos "Word Perfect 5.1"(Word Perfect Corporation, Utah, USA), incluyendo histogramas ejecutados con los programas "Harvard Graphics 2.3 y 3.1" (Macrobit Corporation. Florida, USA) y como hardware un PC portatil (Toshiba 1850) y una impresora laser (Hewlett Packard. Laserjet IIIp).

El análisis estadístico se ha realizado aplicando la "t" de Student para comparación de medias, utilizando el programa "SIGMA" que introduce de forma automática la corrección de Welch cuando la distribución no es normal, reduciendo el número de grados de libertad.

Todas las variables estudiadas son de caracter cuantitativo y las muestras independientes.

El programa presenta la diferencia de medias (Dif.), el error standard de la diferencia de medias (Err. est) , el valor de la "t" de Student experimental para el contraste (t), los grados de libertad (corregidos si fuese necesario) (gl), el valor de probabilidad que corresponde al valor de dicha "t" (Prob.) y el nivel de significación del contraste.

Si las varianzas no fueran homogeneas, el programa lo expresa y da el valor de la F de Fisher utilizado en el contraste (F) y los grados de libertad para el numerador y el denominador del cociente de varianzas (gl V), así como el correspondiente nivel de probabilidad (Prob. V).

Se consideran estadísticamente significativos los valores que presentaron una p menor de 0.05.

5. RESULTADOS

5.1. Descripción de los resultados

Se ofrecen a continuación, en las tablas 1-8, los resultados obtenidos. La concentración de MDA se presenta como pMol/mg para lo cual se ha tenido que convertir partiendo de ng/150 mg que es la forma en que es obtenida en la ecuación que utiliza los valores espectrofotométricos. Los valores mínimo y máximo teóricos de la escala de Chiu (valoración histológica) y del estudio ultraestructural son 0-5 y 0-20 respectivamente.

Se muestran en las tablas los valores de cada parámetro de forma individual, la media y la desviación standard (DS).

Algunos ejemplos de alteraciones histológicas y ultraestructurales presentados en las figuras 19-36.

GRUPO: *Control*

Rata Nº	1	2	3	4	5	6
Conc. MDA	40.5	41.4	42.2	25.6	32	32.6
Histología	0	0	0	0	0	0
Ultraestr.	0	0	0	0	0	0

PARAMETRO	Media	DS	Unidades
Conc. MDA	35.7	6.5	pMol/mg
Histología	0	0	grado Chiu
Ultraestr.	0	0	Unidades

GRUPO: I30 (Isquemia de 30 minutos)

Rata Nº	1	2	3	4	5	6
Conc. MDA	89	91.1	93.2	96.5	79.3	71.4
Histología	3	1	1	2	2	2
Ultraestr.	10	11	8	9	8	8

PARAMETRO	Media	DS	Unidades
Conc. MDA	86.7	6.5	pMol/mg
Histología	1.8	0.7	grado Chiu
Ultraestr.	9	1.7	Unidades

GRUPO: 160 (Isquemia de 60 minutos)

Rata Nº	1	2	3	4	5	6
Conc. MDA	82	116.2	93.2	81.4	116.8	77.4
Histología	3	4	3	3	3	2
Ultraestr.	11	14	12	12	11	12

PARAMETRO	Media	DS	Unidades
Conc. MDA	94.5	17.8	pMol/mg
Histología	3	0.6	grado Chiu
Ultraestr.	12	1.1	Unidades

GRUPO: *I30R20s* (Isquemia de 30 minutos y reperusión de 20 segundos)

Rata Nº	1	2	3	4	5	6
Conc. MDA	95.6	79	83.5	86.5	71.1	82
Histología	2	2	1	2	1	1
Ultraestr.	9	8	10	9	7	9

PARAMETRO	Media	DS	Unidades
Conc. MDA	82.9	8.1	pMol/mg
Histología	1.5	0.5	grado Chiu
Ultraestr.	7	1	Unidades

GRUPO: *I60R20s* (Isquemia de 60 minutos y reperfusión de 20 segundos)

Rata N ^o	1	2	3	4	5	6
Conc. MDA	94.1	95	92.9	101.7	97.1	87.7
Histología	3	2	3	2	2	3
Ultraestr.	7	9	10	9	11	7

PARAMETRO	Media	DS	Unidades
Conc. MDA	94.8	4.6	pMol/mg
Histología	2.5	0.5	grado Chiu
Ultraestr.	8.8	1.6	Unidades

GRUPO: *I30R10m* (Isquemia de 30 minutos y reperfusion de 10 minutos)

Rata Nº	1	2	3	4	5	6
Conc. MDA	44.1	62.6	76.8	73.5	64.4	80.4
Histología	0	0	0	2	1	2
Ultraestr.	4	6	5	7	5	5

PARAMETRO	Media	DS	Unidades
Conc. MDA	67	13.2	pMol/mg
Histología	0.8	0.9	grado Chiu
Ultraestr.	5.3	1	Unidades

GRUPO: *I60R10m* (Isquemia de 60 minutos y reperfusión de 10 minutos)

Rata Nº	1	2	3	4	5	6
Conc. MDA	92	76.2	73.2	85.3	77.7	78.3
Histología	2	3	3	3	3	3
Ultraestr.	6	6	5	7	8	7

PARAMETRO	Media	DS	Unidades
Conc. MDA	80.5	6.9	pMol/mg
Histología	2.8	0.4	grado Chiu
Ultraestr.	6.5	1	Unidades

GRUPO: *I30ALO* (Isquemia de 30 minutos y Alopurinol)

Rata Nº	1	2	3	4	5	6
Conc. MDA	62.3	33.8	49.9	55.9	57.4	50.8
Histología	0	1	1	1	1	1
Ultraestr.	5	3	2	4	2	1

PARAMETRO	Media	DS	Unidades
Conc. MDA	51.7	9.8	pMol/mg
Histología	0.8	0.4	grado Chiu
Ultraestr.	2.8	1.5	Unidades

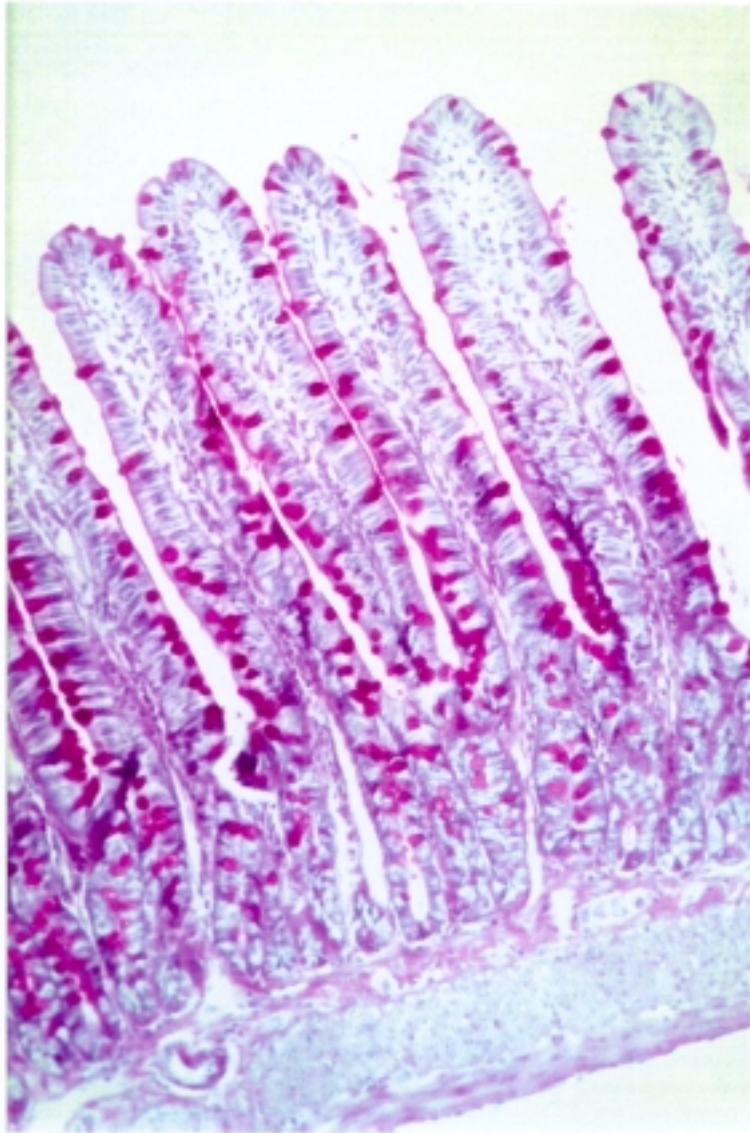


Figura 19. Vellosidad intestinal sin alteraciones. Células caliciformes hasta en el ápice de la vellosidad. PAS X400.

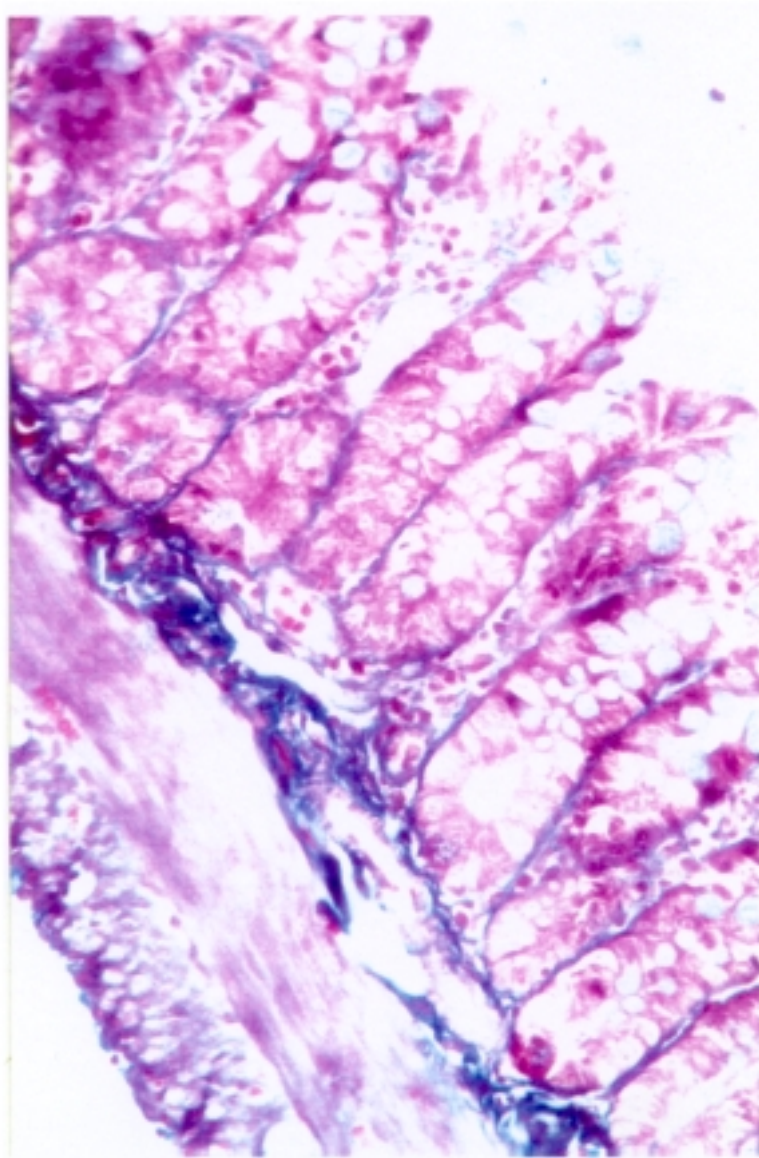


Figura 20. Vellosidad intestinal normal. Masson X650.

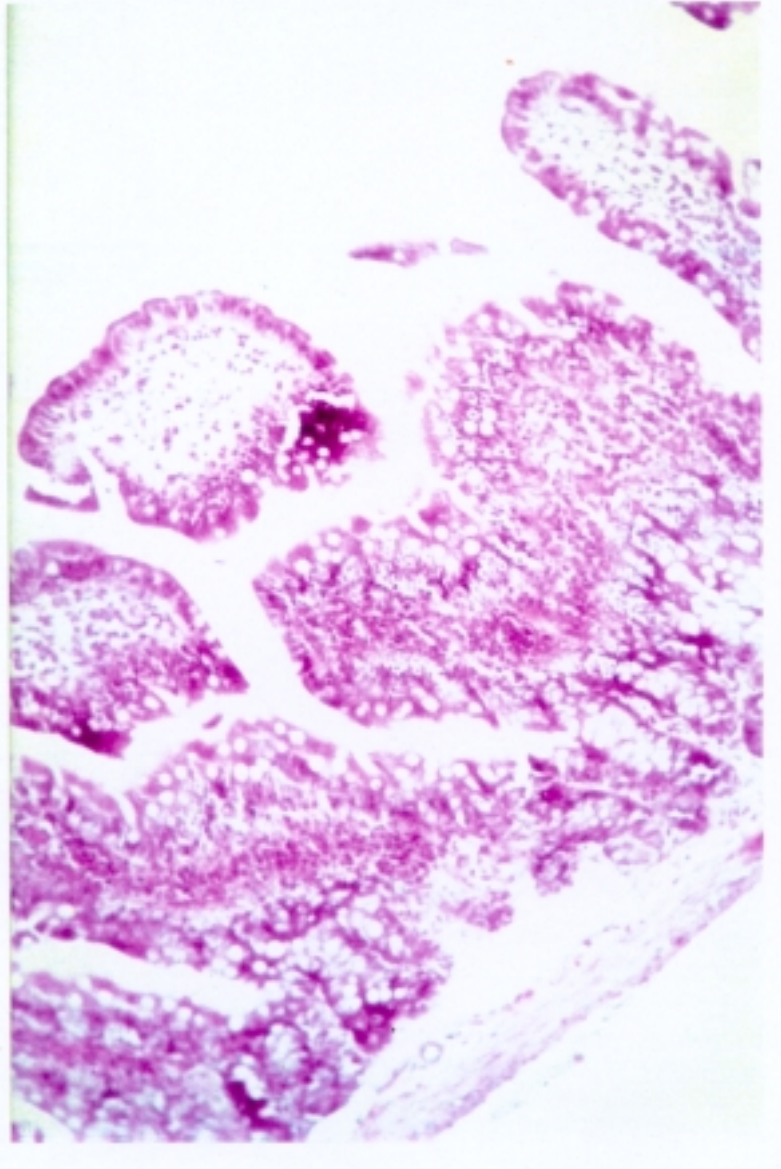


Figura 21. Villis edematosos conservando el epitelio. Hematoxilina-eosina (H-E) X200. (Grupo I30Alo).

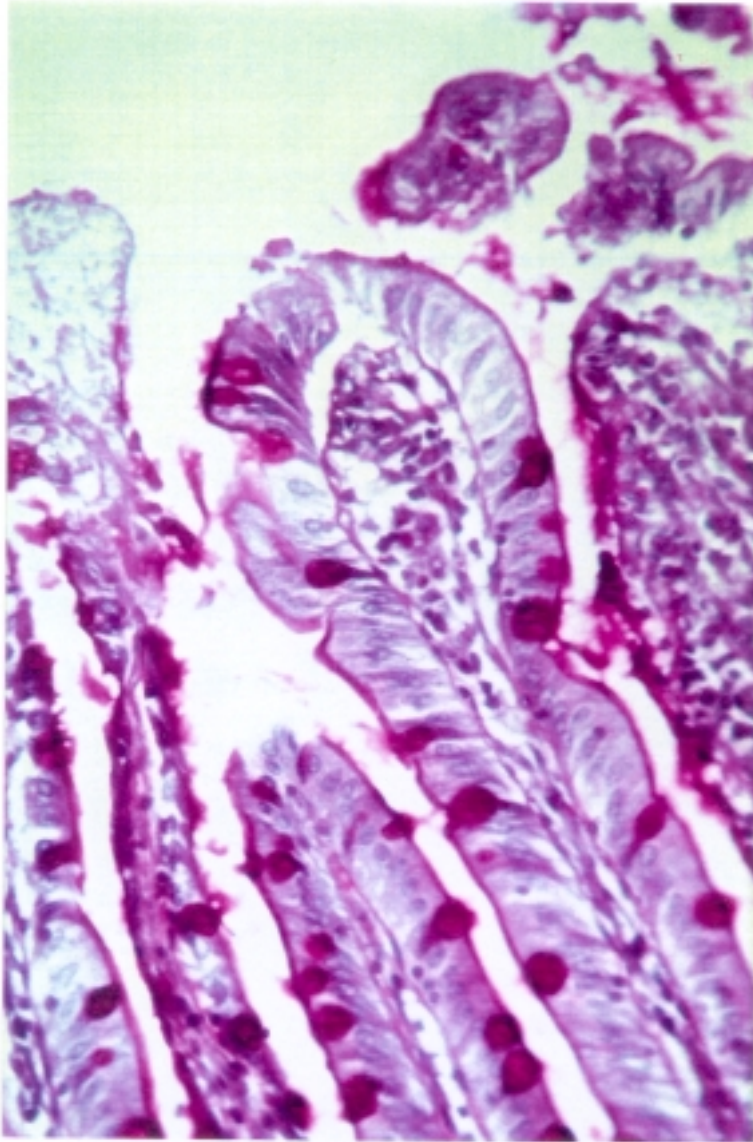


Figura 22. Espacio subepitelial en las vellosidades. PAS X1000. (Grupo I30R10m).

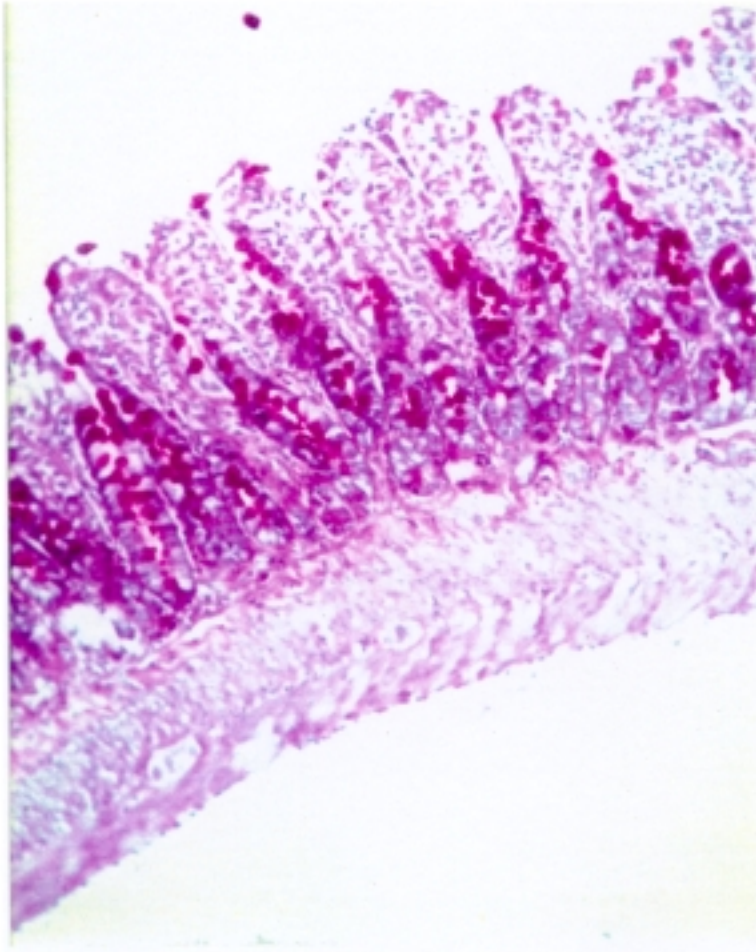


Figura 23. Despegamiento epitelial de la vellosidad. Desaparición de las células caliciformes del vértice del villi. PAS X200. (Grupo I30).

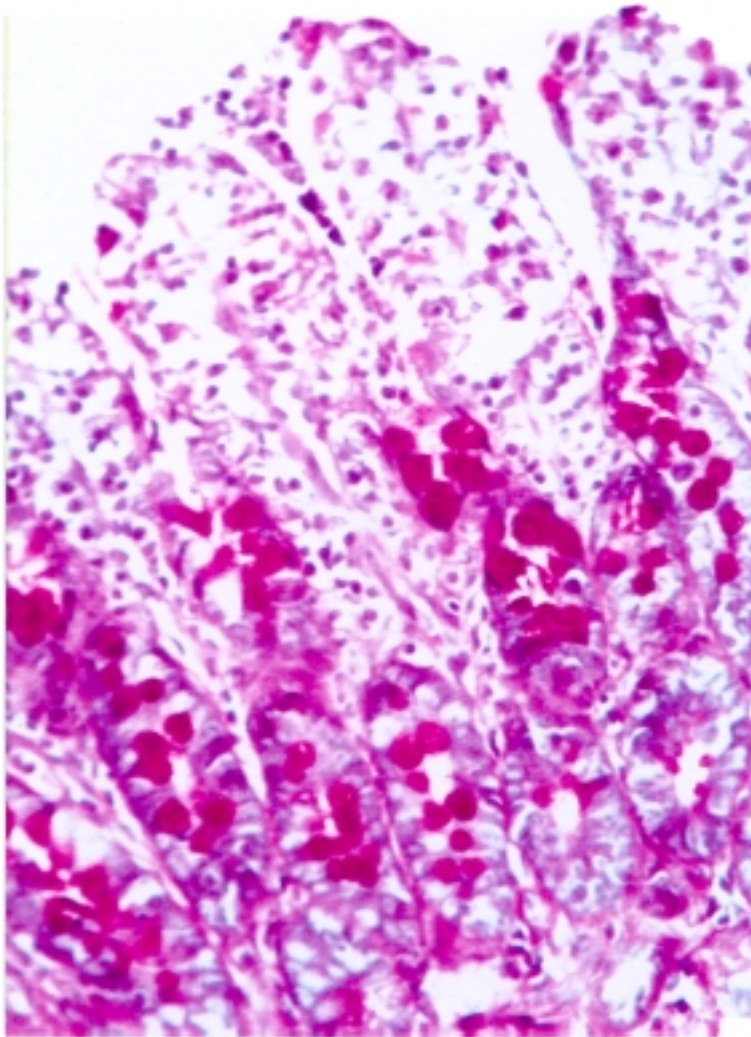


Figura 24. Detalle de la anterior. PAS X650.

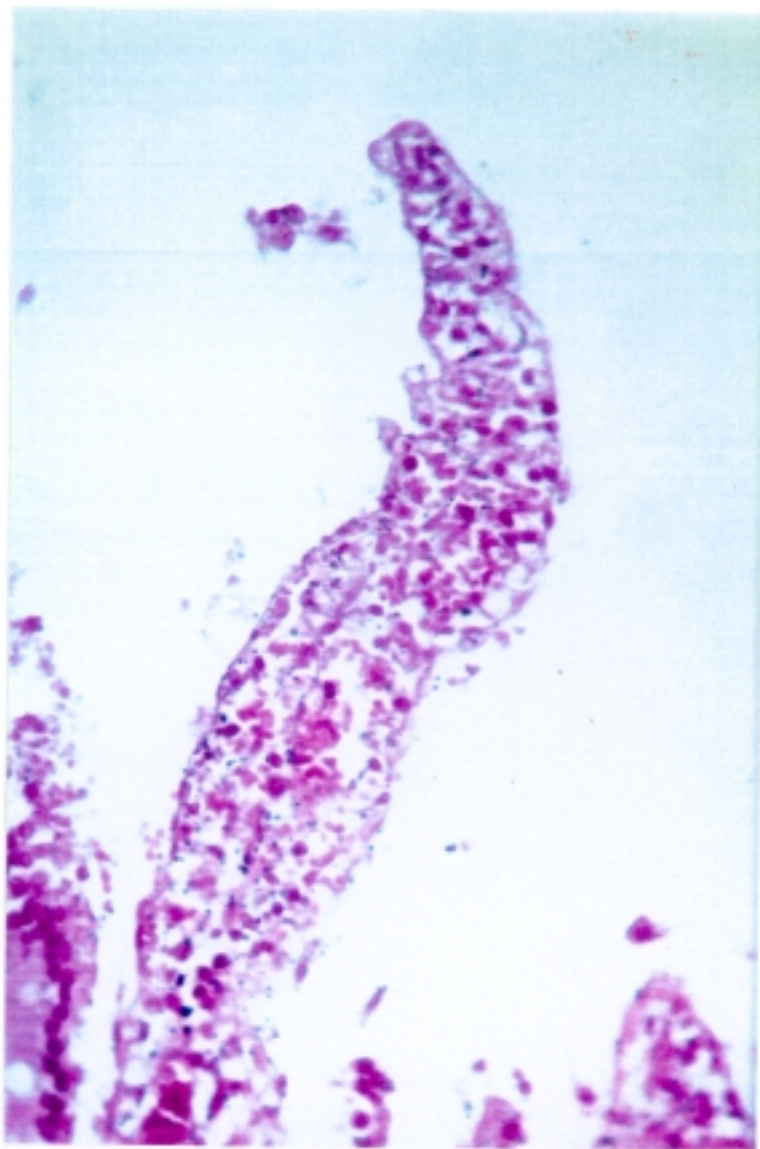


Figura 25. Despegamiento epitelial masivo. H-E X200. (Grupo I60R10m).

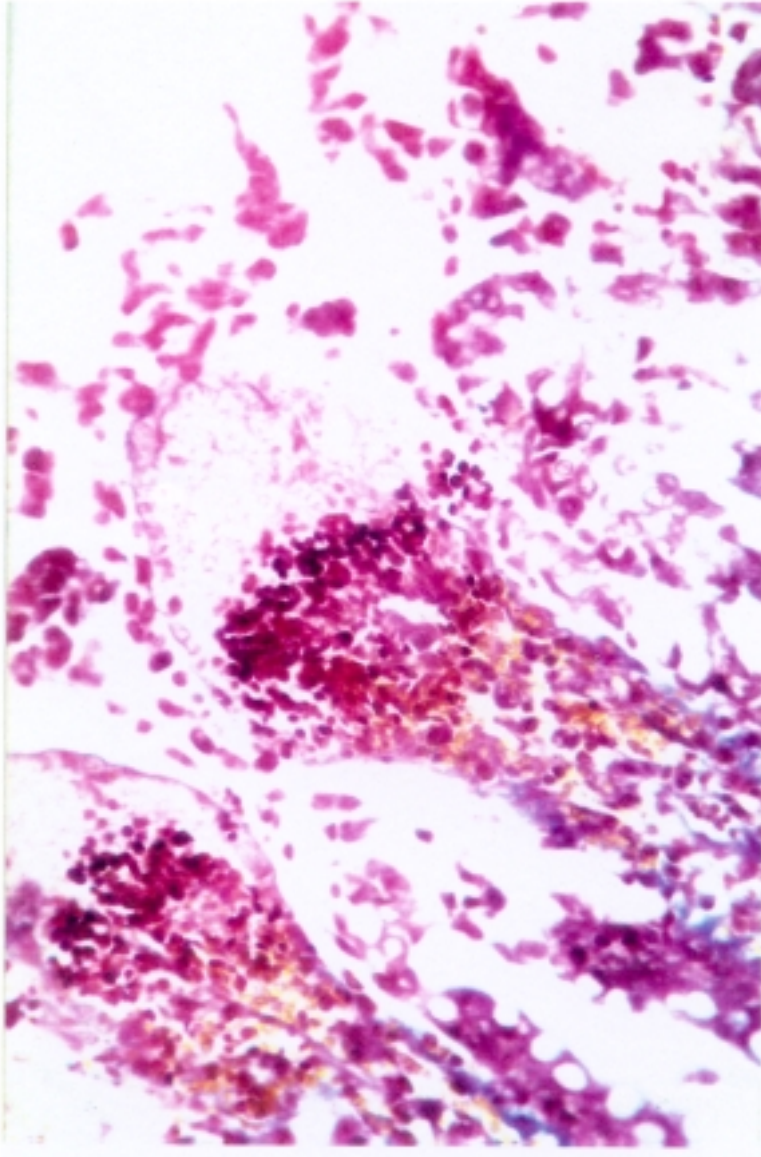


Figura 26. Destrucción del epitelio y hemorragia en la lámina propia. Masson X400. (Grupo I60).

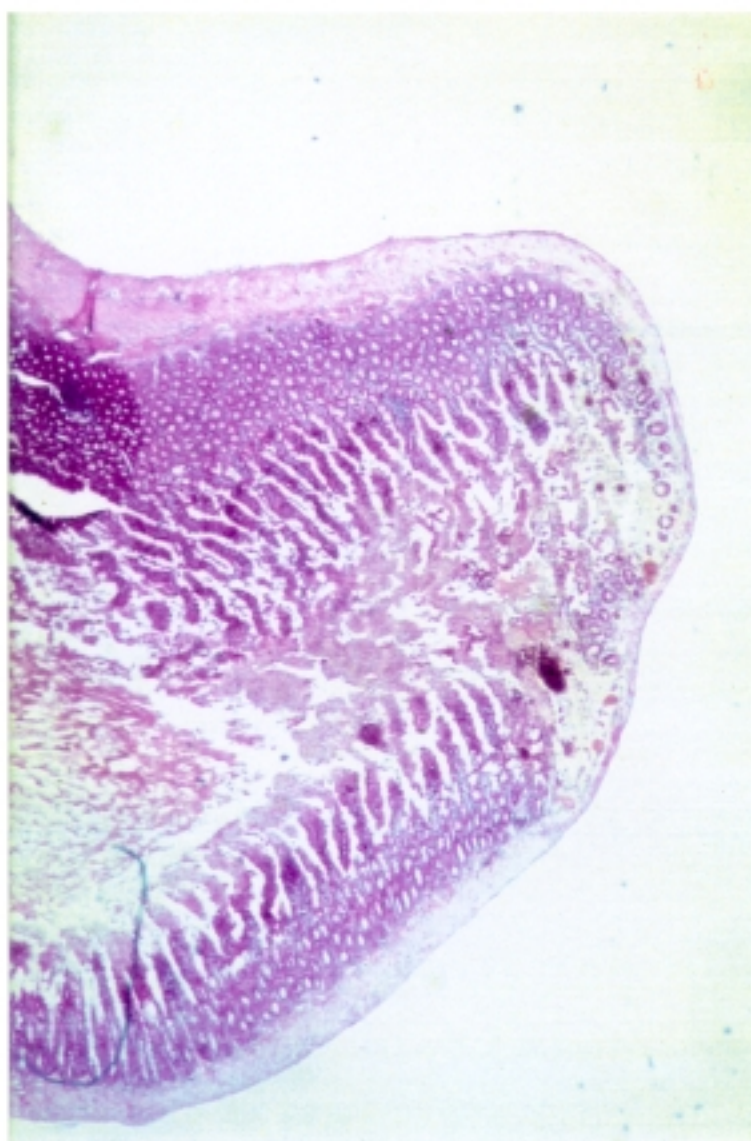


Figura 27. Destacada afectación focal y segmentaria. En la zona antimesentérica y predominando el despegamiento epitelial en el vértice de los villis. H-E X10. (Grupo I30)

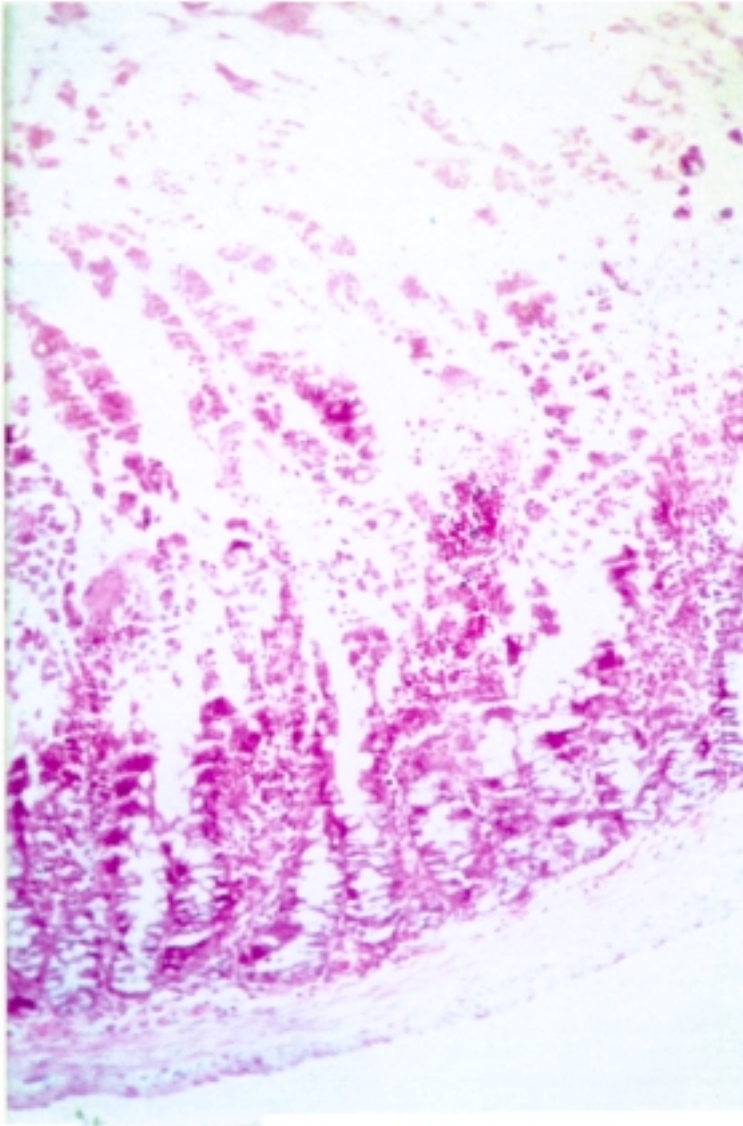


Figura 28. Denudación de la vellosidad con hemorragia en la lámina propia. H-E X400. (Grupo I60).

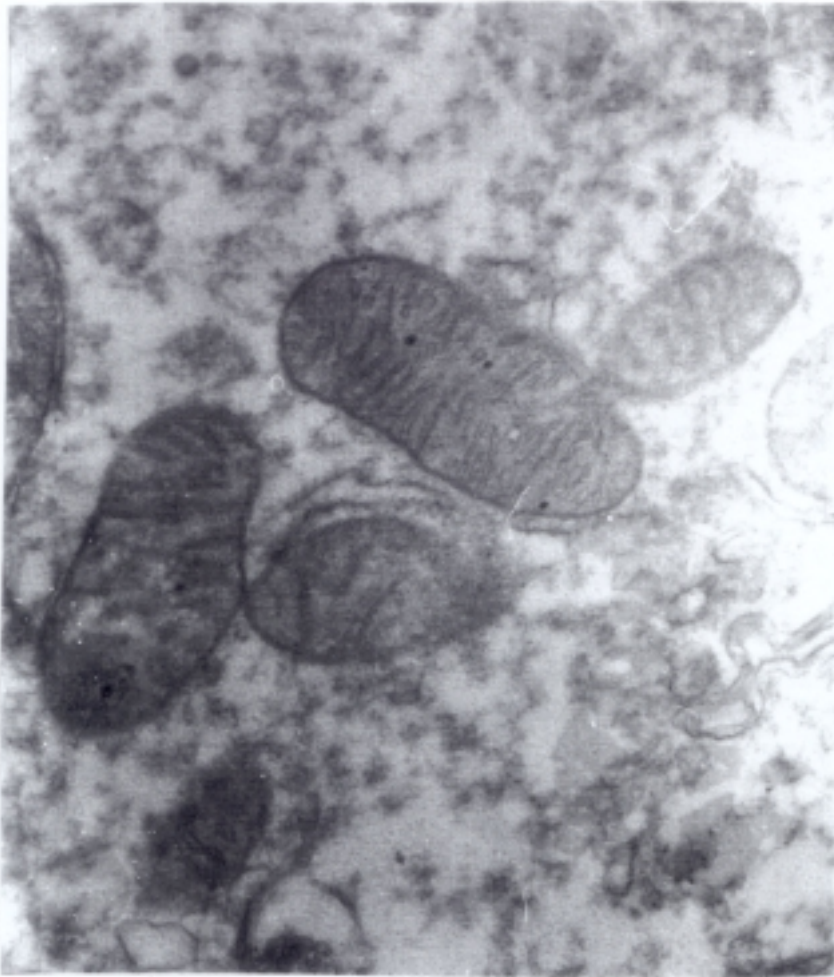


Figura 29. Mitocondrias con escasa afectación. Gránulos densos. ME X 20.000

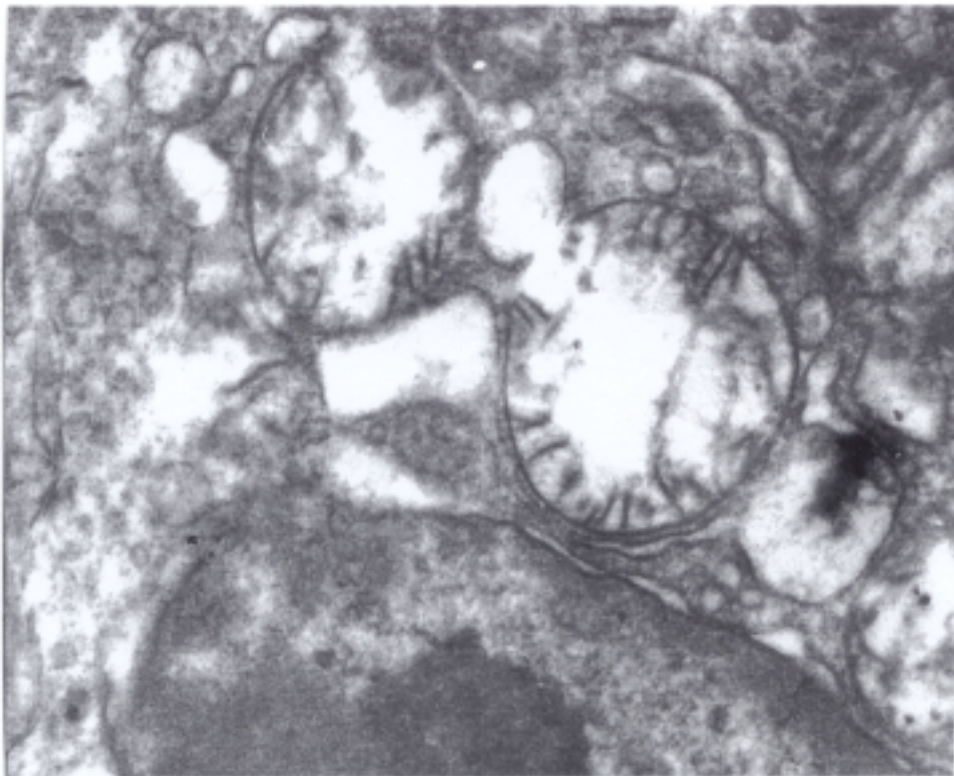


Figura 30. Tendencia a la esfericidad, "Blebs", pérdida de crestas y de gránulos densos. Disminución de la densidad de la matriz. ME X 20.000

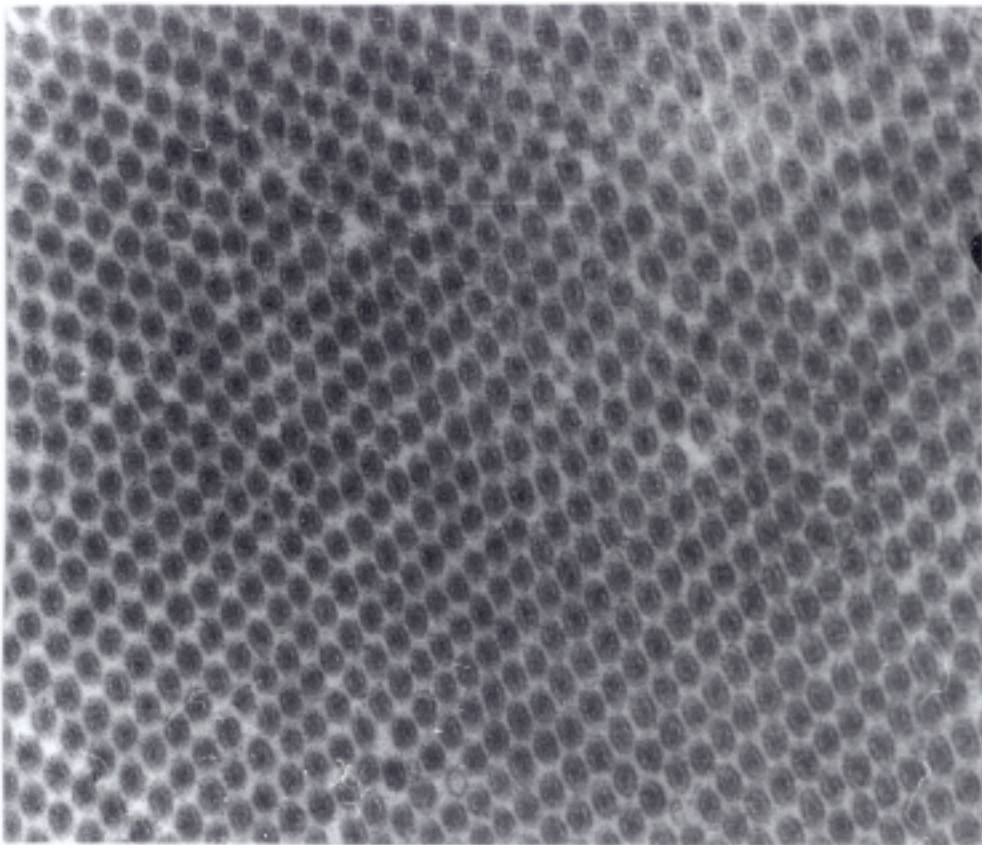


Figura 31. Campo de microvillis normales cortados transversalmente. ME X 20.000

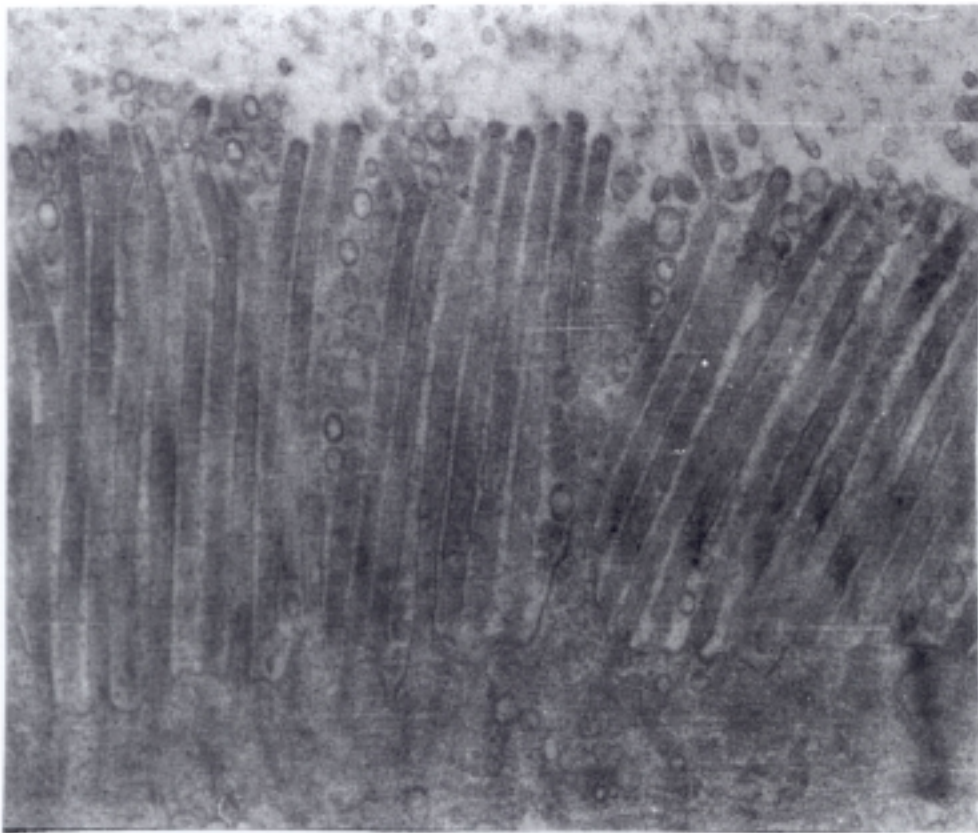


Figura 32. Desestructuración parcial de los microvillis y ocasional vacuolización extracelular. ME X 30.000

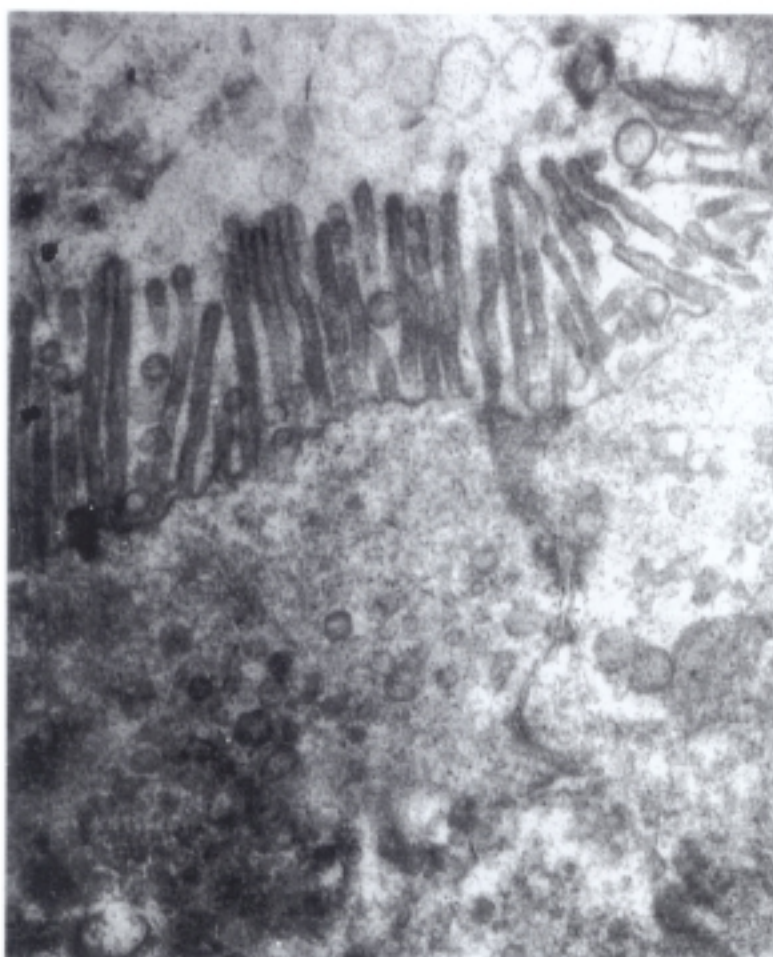


Figura 33. Pérdida de villis. Vacuolización extra e intracelular. ME X 20.000

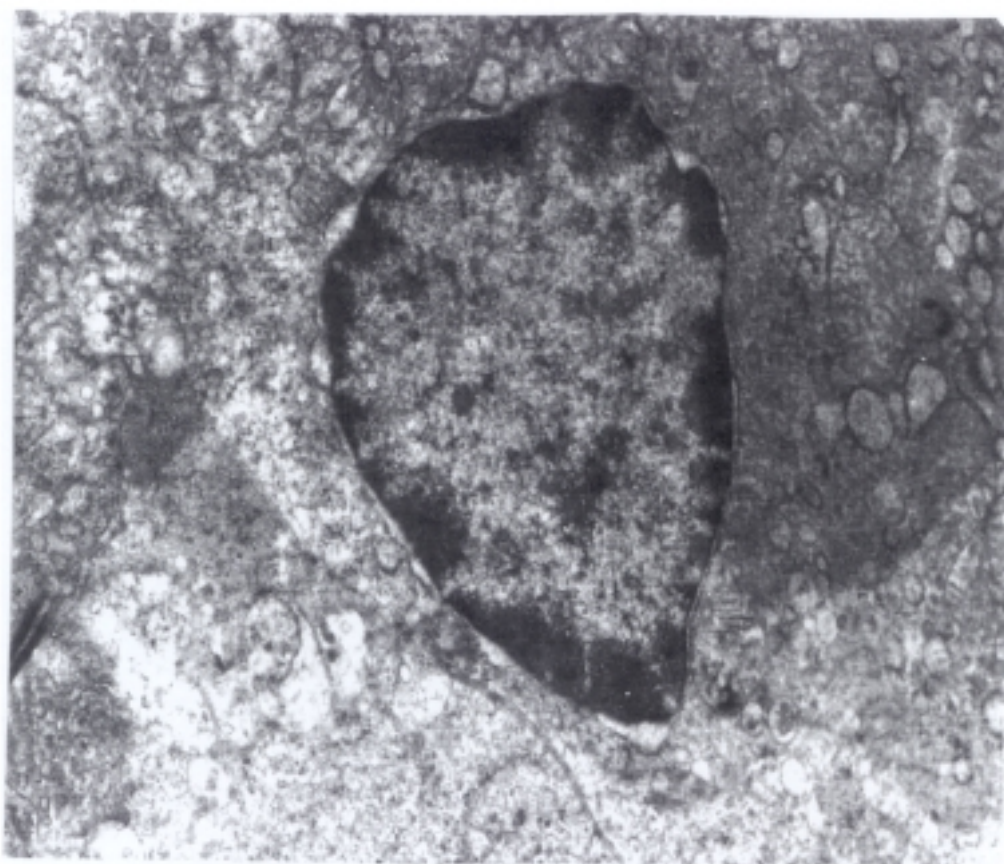


Figura 34. Agrupación de la cromatina en la periferia del nucleo. ME X 12.000

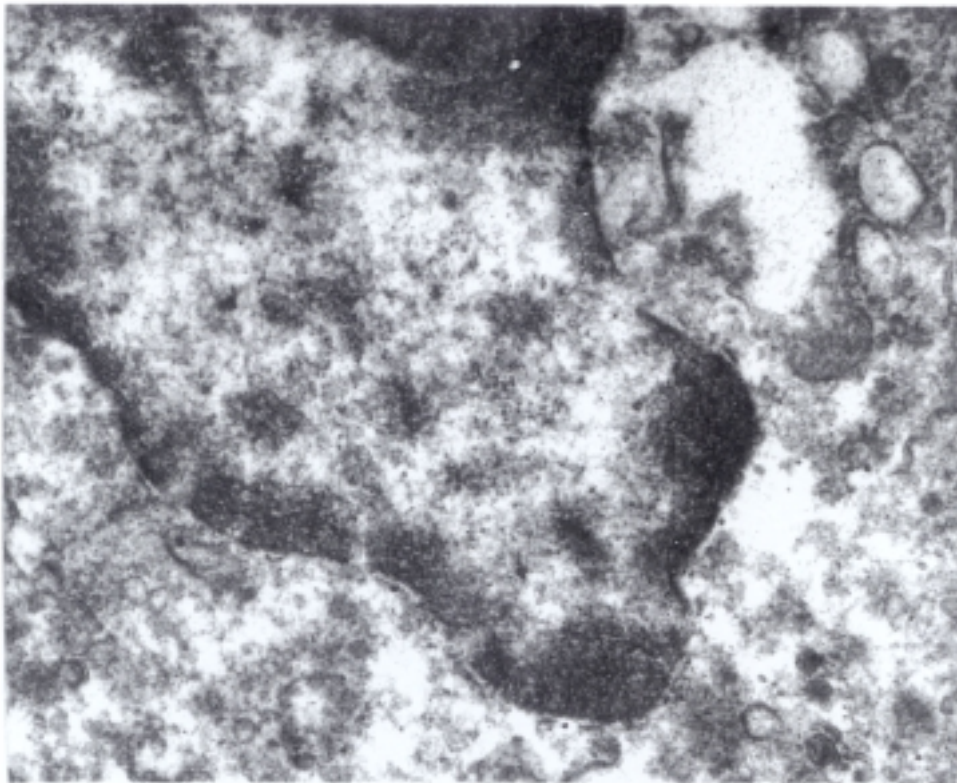


Figura 35. Irregularidad y pérdida de zonas de la membrana nuclear. ME X
20.000

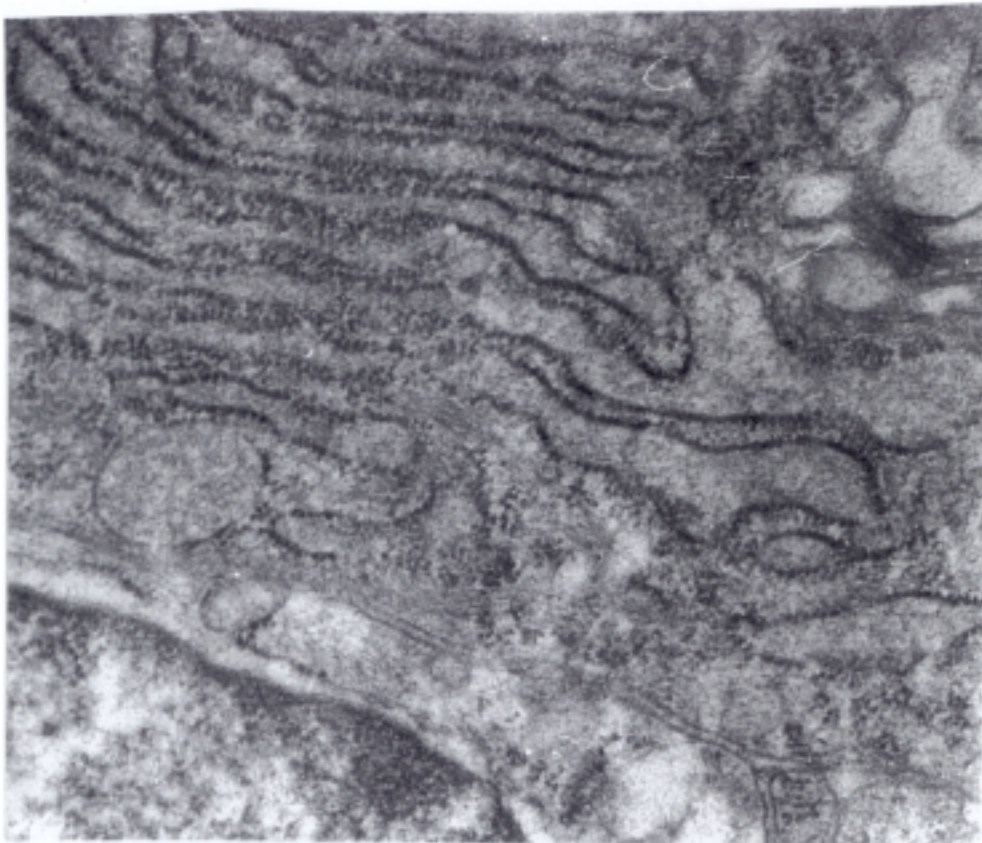


Figura 36. Retículo endoplásmico rugoso con zonas de despegamiento de ribosomas y vacuolizaciones. ME X 30.000

5.2. Análisis comparativo de los resultados

COMPARACION DE MEDIAS (MUESTRAS INDEPENDIENTES)**Malondialdehido:**

Grupos: Control/I30

Dif.: -51 Err. est.: 4.7 t: -10.7 gl.: 10

Prob.: 8.226E-07 SIGNIFICATIVO (p < de 0.001)

Var. Homogenea F: 2 gl. V.: 5.5 Prob. V.: 0.2

Grupos: Control/I60

Dif.: -58 Err. est.: 7.7 t: -7.5 gl.: 6

Prob.: 0.0003 SIGNIFICATIVO (p < de 0.001)

Var. no Homogenea F: 7.1 gl. V.: 5.5 Prob. V.: 0.02

Grupos I30/I60

Dif.: -7.8 Err. est.: 8.2 t: -0.9 gl.: 10

Prob.: 0.4 NO SIGNIFICATIVO

Var. Homogenea F: 3.5 gl. V.: 5.5 Prob. V.: 0.1

Grupos I30/I30R20s

Dif.: 3.7 Err. est.: 5.1 t: 0.7 gl.: 10

Prob.: 0.5 NO SIGNIFICATIVO

Var. Homogenea F: 1.36 gl. V.: 5.5 Prob. V.: 0.4

Grupos I30/I30R10m

Dif.: 19.7 Err. est.: 6.6 t: 3 gl.: 10

Prob.: 0.01 SIGNIFICATIVO (p < de 0.05)

Var. Homogenea F: 1.9 gl. V.: 5.5 Prob V.: 0.2

Grupos I30R20s/I30R10m

Dif.: 16 Err. est.: 6.3 t:2.5 gl.: 10

Prob.: 0.03 SIGNIFICATIVO (p < de 0.05)

Var. Homogenea F:2.6 gl.V.: 5.5 Prob V.: 0.1

Grupos I60/I60R20s

Dif.: -0.2 Err. est.: 7.5 t: -0.03 gl: 5

Prob.: 1 NO SIGNIFICATIVO

Var. Homogenea F: 14.9 gl. V.: 5.5 Prob. V.: 0.005

Grupos I60/I60R10m

Dif.: 14 Err. est.: 7.8 t: 1.8 gl: 6

Prob.: 0.1 NO SIGNIFICATIVO

Var. no Homogenea F: 6.6 gl. V.: 5.5 Prob. V.: 0.03

Grupos I60R20s/I60R10m

Dif.: 14.3 Err. est.: 3.4 t:4.2 gl: 10

Prob.: 0.002 SIGNIFICATIVO (p < de 0.01)

Var. Homogenea F: 2.2 gl. V.: 5.5 Prob. V.: 0.2

Grupos I30/I30Alo

Dif.: 35 Err. est.: 5.6 t: 6.2 gl: 10

Prob.: 0.00009 SIGNIFICATIVO (P < de 0.001)

Var. Homogenea F: 1.1 gl. V.: 5.5 prob. V.: 0.5

Histología:

Grupos I30/I60

Dif.: -1.2 Err. est.: 0.4 t: -2.9 gl: 10

Prob.: 0.01 SIGNIFICATIVO (p < de 0.05)

Var. Homogenea F: 1.4 gl. V.: 5.5 Prob. V.: 0.3

Grupos I30/I30R20s

Dif.: 0.3 Err. est.: 0.4 t: 0.9 gl: 10

Prob.: 0.4 NO SIGNIFICATIVO

Var Homogenea F: 1.89 gl. V.: 5.5 Prob. V.: 0.2

Grupos I30/I30R10m

Dif.: 1 Err. est.: 0.5 t: 2 gl: 10

Prob.: 0.07 CASI SIGNIFICATIVO (p < de 0.1)

Var. Homogenea F: 1.7 gl. V.: 5.5 Prob. V.: 0.3

Grupos I30R20s/I30R10m

Dif.: 0.7 Err. est.: 0.4 t: 1.4 gl: 10

Prob.: 0.2 NO SIGNIFICATIVO

Var. Homogenea F: 3.2 gl. V.: 5.5 Prob. V.: 0.1

Grupos I60/I60R20s

Dif.: 0.5 Err. est.: 0.3 t: 1.5 gl: 10

Prob.: 0.2 NO SIGNIFICATIVO

Var. Homogenea F: 1.3 gl. V.: 5.5 Prob. V.: 0.4

Grupos I60/I60R10m

Dif.: 0.2 Err. est.: 0.3 t: 0.5 gl: 10

Prob.: 0.5 NO SIGNIFICATIVO

Var. Homogenea F: 2.4 gl. V.: 5.5 Prob. V.: 0.2

Grupos I60R20s/I60R10m

Dif.: 0.3 Err. est.: 0.3 t: -1.2 gl: 10

Prob.: 0.2 NO SIGNIFICATIVO

Var. Homogenea F: 1.8 gl. V.: 5.5 Prob. V.: 0.3

Grupos I30/I30Alo

Dif.: 1 Err. est.: 0.3 t: 2.9 gl: 10

Prob.: 0.02 SIGNIFICATIVO ($p < de 0.05$)

Var. Homogenea F: 3.4 gl. V.: 5.5 Prob. V.: 0.1

Ultraestructura:**Grupos I30/I60**

Dif.: -3 Err. est.: 0.7 t: -4.3 gl: 10

Prob.: 0.001 SIGNIFICATIVO ($p < de 0.01$)

Var. Homogenea F: 1.3 gl. V.: 5.5 Prob. V.: 0.4

Grupos I30/I30R20s

Dif.: 0.3 Err. est.: 0.7 t: 0.5 gl:10

Prob.: 0.6 NO SIGNIFICATIVO

Var. Homogenea F: 1.5 gl. V.: 5.5 Prob. V.: 0.3

Grupos I30/I30R10m

Dif.: 3.6 Err. est.: 0.7 t: 5.5 gl: 10

Prob.: 0.0003 SIGNIFICATIVO (p < de 0.001)

Var. Homogenea F: 1.5 gl. V.: 5.5 Prob. V.: 0.3

Grupos I30R20s/I30R10m

Dif.: 3.3 Err. est.: 0.6 t: 5.5 gl: 10

Prob.: 0.0002 SIGNIFICATIVO (p < de 0.001)

Var. Homogenea F: 1 gl. V.: 5.5 Prob. V.: 1

Grupos I60/I60R20s

Dif.: 3.2 Err. est.: 0.8 t: 4 gl:10

Prob.: 0.002 SIGNIFICATIVO (p < de 0.05)

Var. Homogenea F: 2.1 gl. V.: 5.5 Prob. V.: 0.2

Grupos I60/I60R10m

Dif.: 5.5 Err. est.: 0.6 t: 8.9 gl: 10

Prob.: 4.6E-06 SIGNIFICATIVO (p < de 0.001)

Var. Homogenea F: 1.1 gl. V.: 5.5 Prob. V.: 0.5

Grupos I60R20s/I60R10m

Dif.: 2.3 Err. est.: 0.7 t: 3 gl: 10

Prob.: 0.01 SIGNIFICATIVO (p < de 0.05)

Var. Homogenea F: 2.3 gl. V.: 5.5 Prob. V.: 0.2

Grupos I30/I30Alo

Dif.: 6.1 Err. est.: 0.8 t: 7.8 gl: 10

Prob.: 0.00001 SIGNIFICATIVO (p < de 0.001)

Var. Homogenea F: 1.3 gl. V.: 5.5 Prob. V.: 0.4

5.3. Presentación gráfica de los resultados

Se presentan gráficamente, en las figuras 38-43, los valores medios de los parámetros estudiados en los diferentes grupos, así como su desviación típica.

La significación estadística obtenida en el análisis previo se expresa de la siguiente forma:

- * : $p < \text{de } 0.05$
- * * : $p < \text{de } 0.01$
- * * * : $p < \text{de } 0.001$

Malondialdehido

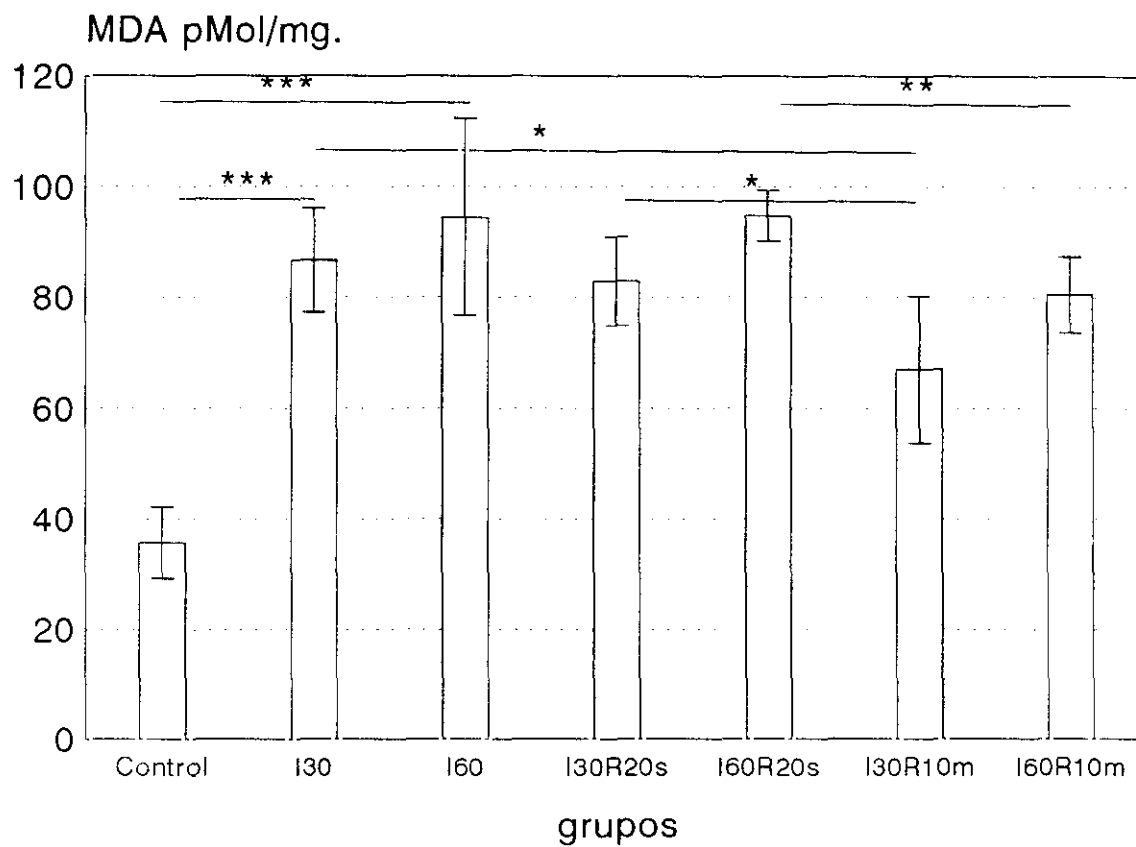


Figura 38. Representación comparativa de los valores de MDA en los grupos de isquemia-reperusión.

Malondialdehido

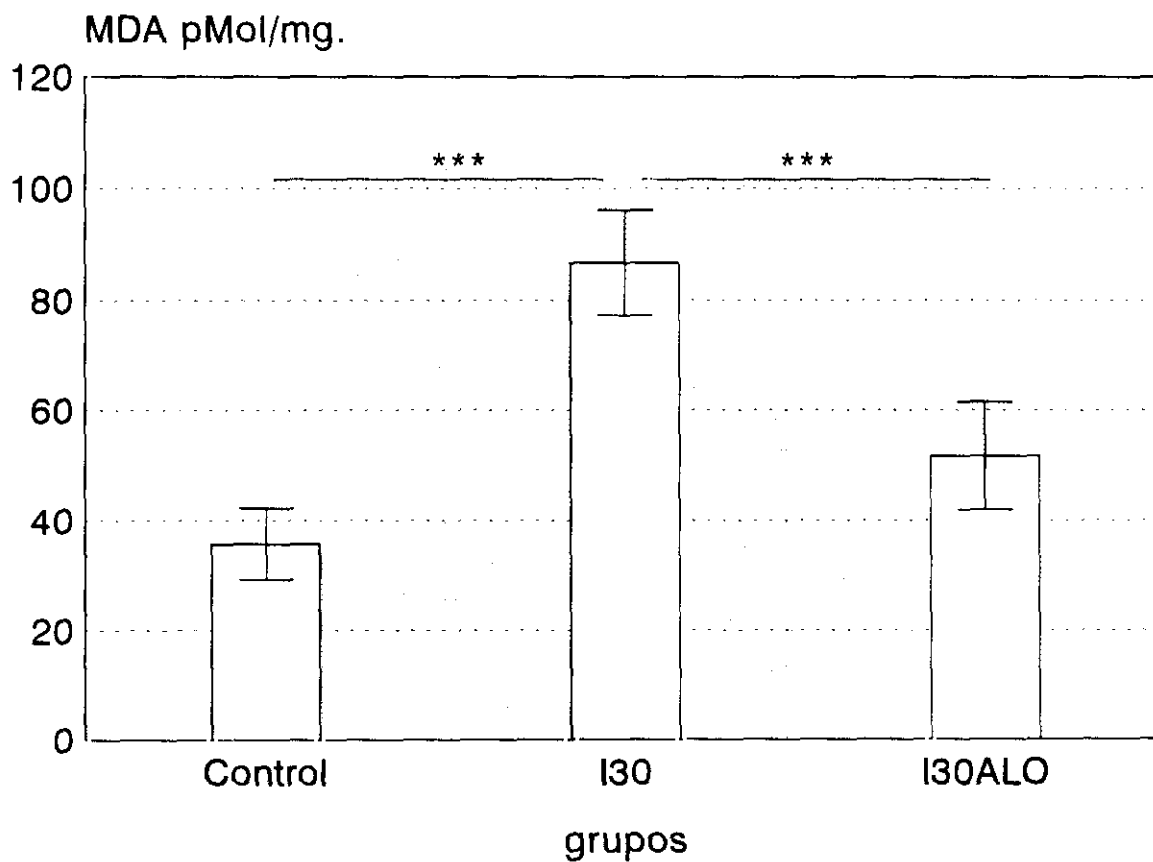


Figura 39. Valores comparativos de MDA de los grupos: control e isquemia de 30 minutos sin y con alopurinol.

Histología

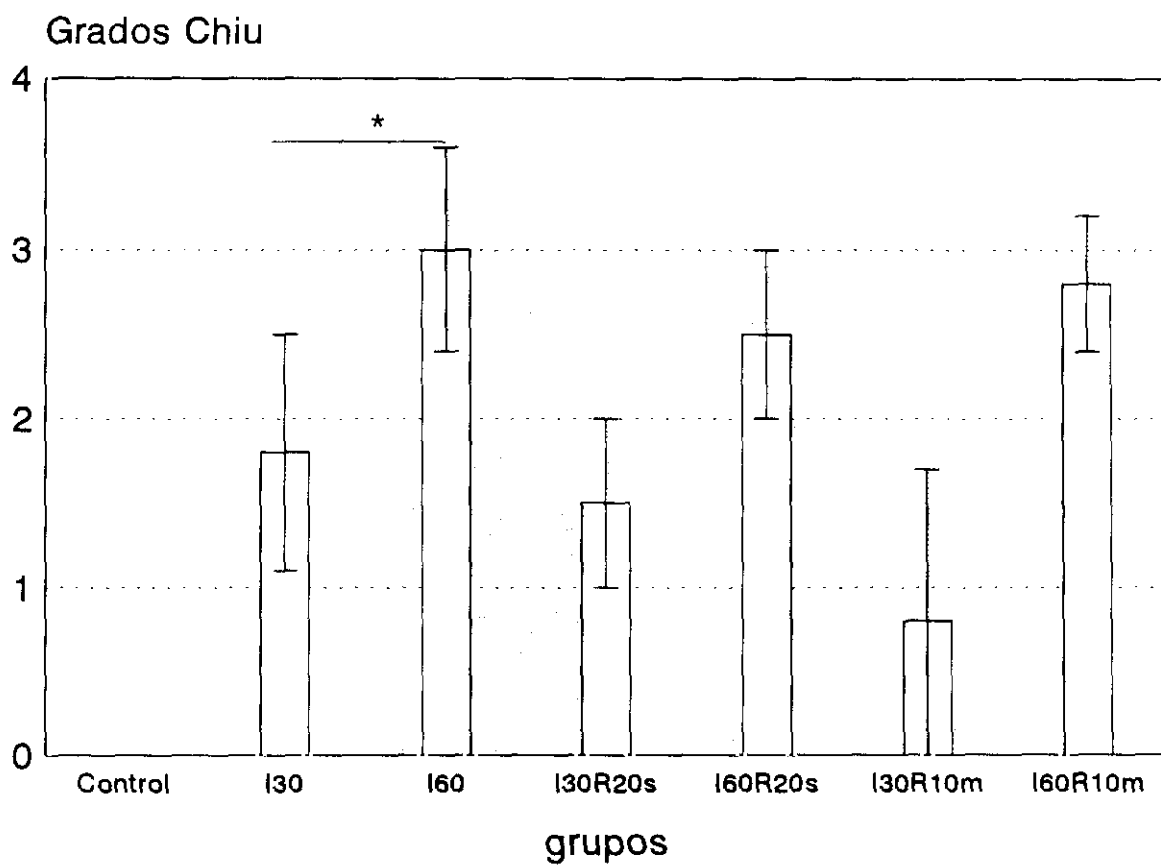


Figura 40. Comparación de las alteraciones histológicas en los grupos de isquemia-reperfusión.

Histología

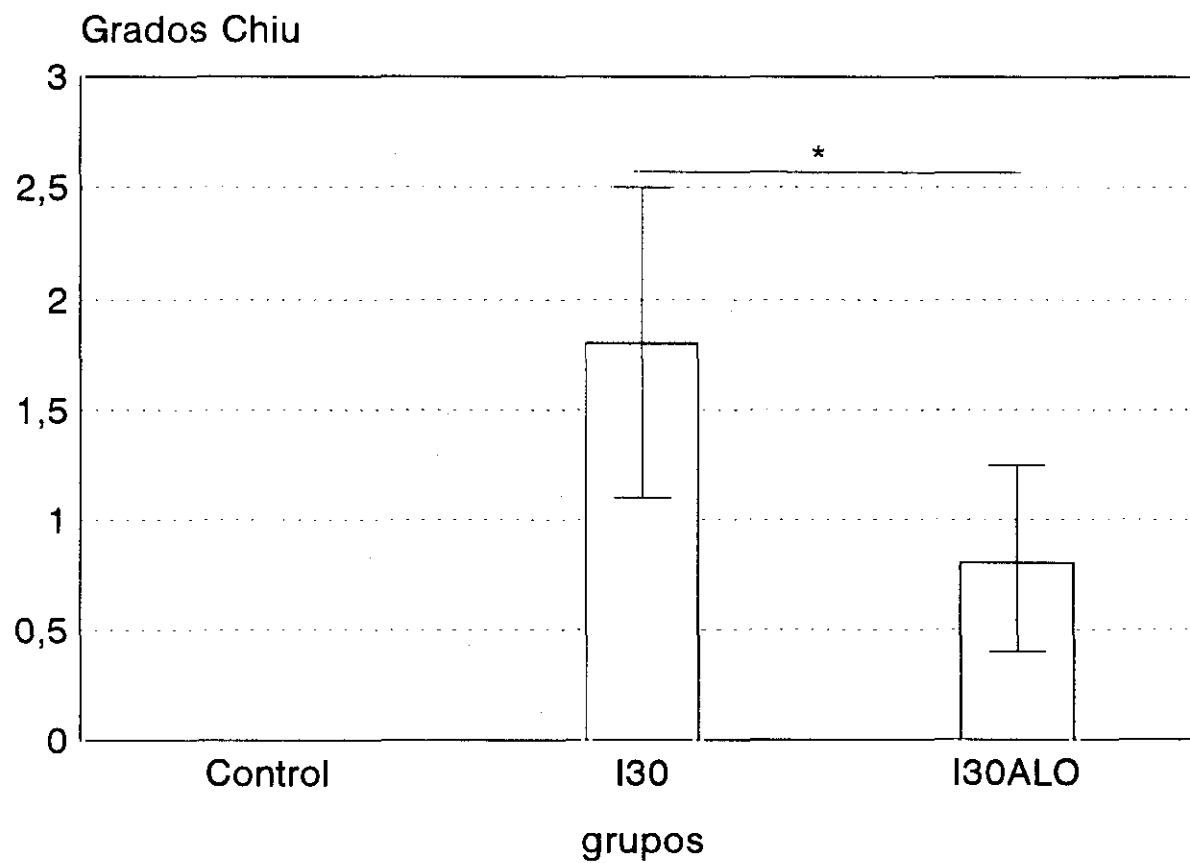


Figura 41. Cuantificación de los valores obtenidos en el estudio de las alteraciones histológicas en el grupo control y de isquemia de 30 minutos sin y con alopurinol.

Ultraestructura

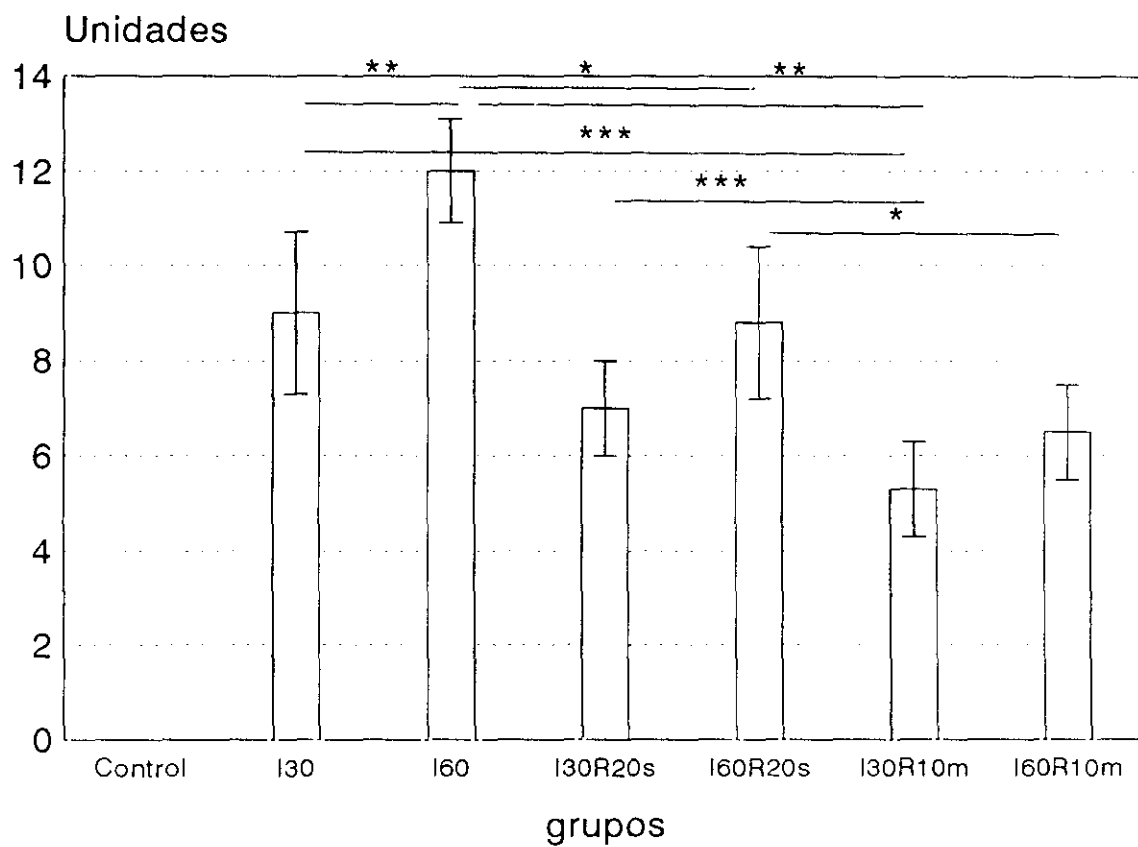


Figura 42. Alteraciones ultraestructurales en los grupos de isquemia-reperfusión. Las unidades son arbitrarias.

Ultraestructura

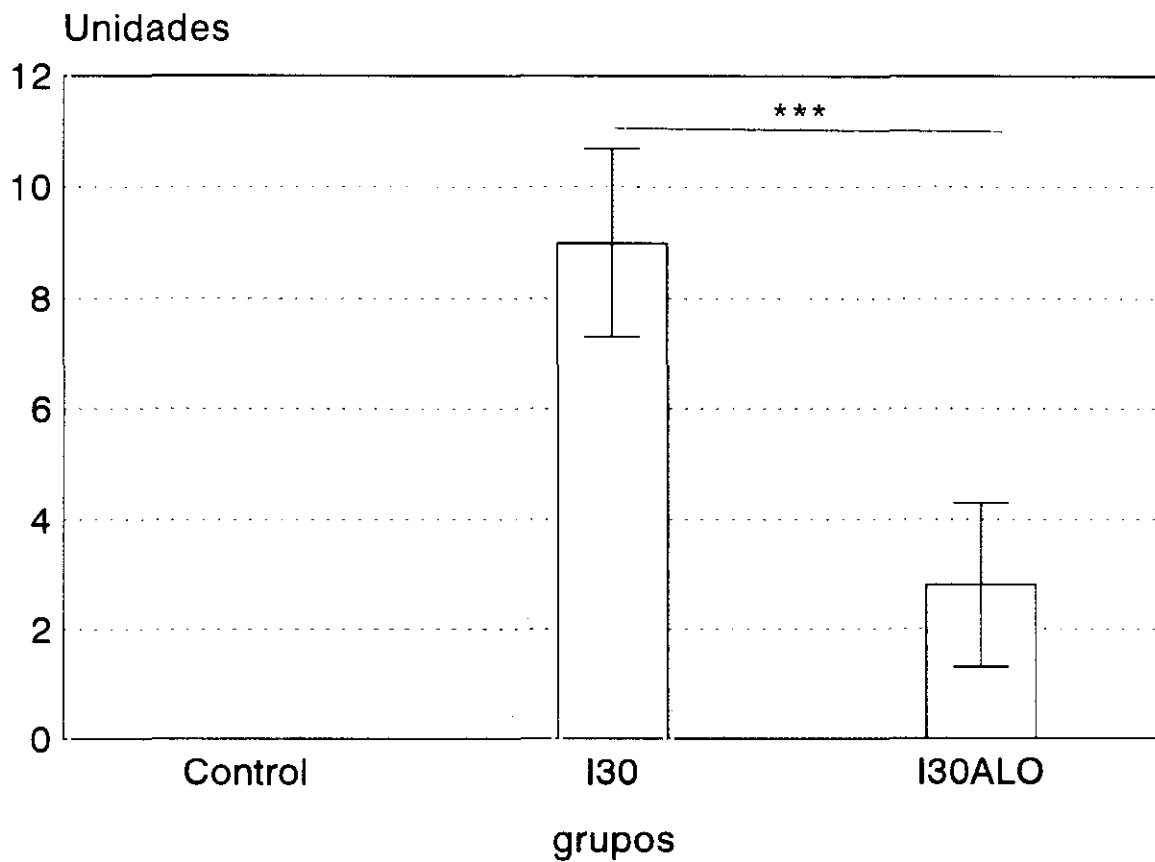


Figura 43. Valoración ultraestructural en los grupos: control e isquemia de 30 minutos sin y con alopurinol.

6. DISCUSSION

6.1 Elección del modelo experimental

Se ha intentado conseguir, con el modelo experimental diseñado, que un segmento de intestino delgado mesentérico permanezca transitoriamente sin flujo por su arteria principal, manteniendo, sin embargo, la circulación colateral adyuvante. Para lograrlo se ha utilizado un sistema reversible de interrupción del flujo al actuar sobre el tronco principal de la arteria mesentérica superior de la rata, preservando la circulación colateral del mesenterio y sin realizar ningún tipo de aislamiento o sección a nivel del tubo digestivo. Esta forma de producir isquemia intestinal permite comparaciones con trabajos que utilizan sistemas equivalentes¹¹², pero impide que los resultados obtenidos se puedan equiparar totalmente a los presentados por otros autores como Van ye⁹⁹ o Udassin¹¹³ que ligan las ramas colaterales o bien Parks⁹⁸, Schomberg¹¹⁷ y Muller¹²⁴ que aíslan un segmento intestinal seccionando el mesenterio y el intestino.

Para determinar el tiempo de isquemia y de reperfusión, muy variable en la literatura, intentamos, con múltiples pruebas, acercarnos al tiempo mínimo en el que fuese evidente, de forma macroscópica, el daño isquémico y se consiguiese una segura reperfusión. Debido a la dificultad encontrada para fijar éste y a que los procedimientos quirúrgicos sobre la arteria en la cirugía

vascular-digestiva oscilaban entre media hora y una hora se decidió adoptar éstos como referencia. En cuanto a los tiempos de reperfusión se decidió valorar uno muy corto donde se valoraría si a la rápida formación de RLO que ocurre al permitir la masiva entrada de oxígeno con la retirada del clamp se correspondía con precoces alteraciones a nivel bioquímico y estructural, y otro más largo para ver el comportamiento a corto plazo.

Como parámetros de valoración del daño producido por efecto de la isquemia-reperfusión y del posible efecto terapéutico del alopurinol se han utilizado las variaciones en la concentración de malondialdehido en la mucosa intestinal, zona de la pared intestinal en donde se ha demostrado que son mayores los niveles de XO¹³⁶, los cambios histológicos y las alteraciones que a nivel ultraestructural presenta el enterocito.

El malondialdehido es considerado el indicador más fiel de la peroxidación lipídica al ser un metabolito obtenido como consecuencia de la acción directa que sobre los lípidos tienen los RLO. Su cuantificación se hace por el método del TBA utilizando espectrofotometría, al igual que muchos otros autores^{99,116,118,119,135}, aunque en ningún caso sobre nuestro modelo experimental.

El estudio por microscopía óptica y electrónica nos permite tener una visión de los cambios que se producen en la estructura del tejido y más concretamente en el enterocito, testimonio de la acción que sobre la generalidad de los componentes de la célula tienen todas las sustancias liberadas en la isquemia-reperfusión intestinal, entre las que se encuentra de forma destacada los RLO. La valoración histológica se realiza según criterios universalmente aceptados y la ultraestructural de forma original considerando aquellas estructuras celulares que en estudios realizados por Aho⁷¹ y Brown⁷² más claramente reflejaban el daño producido por la isquemia intestinal.

6.2. Discusión de los resultados obtenidos

6.2.1 ALTERACIONES PRODUCIDAS POR LA ISQUEMIA

La isquemia que se produce según el modelo expuesto condujo a cambios tanto en la concentración de MDA mucoso como en los parámetros observados a nivel óptico y electrónico.

En los tiempos considerados de 30 y 60 minutos, la concentración de MDA se elevó de forma significativa con respecto al control, sin que se produjeran diferencias considerables entre ellos. Aunque la elevación de los valores de MDA en la isquemia aparece en prácticamente todos los trabajos que lo miden, sólo en la muestra obtenida del plasma eferente de un intestino con obstrucción y compromiso vascular hubo cambios significativos¹⁰⁷. En el resto, siempre sin circulación colateral, el incremento fue escaso e inexplicado^{99,116,118,119}.

Además de la cuantificación de un derivado de la acción de los RLO sobre los lípidos que forman parte de las diferentes membranas celulares se han reconocido en nuestro estudio alteraciones observables con el microscopio óptico y electrónico que son consecuencia de los efectos que aquellos de forma directa o mediada por los PMN tienen sobre el tejido y los diferentes componentes de

la célula. Así, en el tejido sujeto a diferentes tinciones se han observado a nivel óptico espacios subepiteliales más o menos amplios, inicialmente en el vértice de la vellosidad, con más frecuencia en la isquemia más corta, donde sin embargo lo que predominó fue el despegamiento epitelial de las vellosidades, sobre todo a nivel apical. En la isquemia de 60 minutos el epitelio se encuentra aún más desestructurado y presenta focos más o menos aislados de extravasación de hematies en la lámina propia. Con el método que utiliza el PAS (ácido periódico de Schiff) se aprecia con gran claridad que disminuyen las células caliciformes en los tercios más distales del villi conforme aumenta el daño isquémico, perdiendo en estadios avanzados su membrana pero manteniendo uniforme su contenido, indicador de poco tiempo de evolución del proceso en que se ven involucradas. En la tinción de Masson-Goldner se aprecian escasos trastornos en la disposición y reparto de las fibras de la submucosa al ser observables cuando se tiñe el colágeno.

En el estudio ultraestructural se aprecian desestructuraciones y desaparición de alguna zona de las membranas, tanto del microvilli como de las mitocondrias, en las que sin embargo lo que destacaba era su tendencia a hacerse más esféricas, la afectación de las crestas y el cambio de densidad de la matriz. En el núcleo se aprecia la agrupación de la cromatina en la periferia y en el RER irregularidades y zonas aisladas sin ribosomas. En la isquemia de 60 minutos, a diferencia de la de 30, fue a nivel de los microvillis y del núcleo donde las alteraciones fueron más marcadas.

Se podrían justificar las alteraciones bioquímicas, histológicas y ultraestructurales en este modelo de isquemia no sólo por la ausencia de oxígeno y de otros nutrientes necesarios para la mantener la estructura y función celular, sino también por la génesis de RLO que se producen al suministrar sangre oxigenada, por vía de las colaterales mantenidas o incluso desde la luz intestinal, a un área de intestino delgado isquémico cuyos niveles de SOD en la pared intestinal están disminuidos⁶¹.

Autores como Schoemberg¹¹⁷ y Gibson¹²⁰ consideran que no sólo durante la reperfusión sino también en la isquemia, por factores aún desconocidos, se produce daño mediado por RLO sobre componentes biolipídicos. De hecho, en

estudios realizados en nuestro departamento, después de 30 minutos de isquemia hepática normotérmica y total también se halló, de forma significativa, elevación de los niveles de MDA¹³⁷.

Los datos obtenidos se podrían extrapolar, dado el modelo experimental empleado, a lo que acontece en el intestino delgado cuando se produce un embolismo arterial del tronco principal de poco tiempo de evolución, se está realizando una anastomosis o practicando una exploración con un catéter de Fogarty; situaciones que tienen en común una isquemia transitoria del intestino al interrumpir el flujo en el tronco principal y que son cada vez más frecuentes en la atención quirúrgica vascular-digestiva actual.

6.2.2 EN RELACION CON LA REPERFUSION

Se han valorado dos tiempos de reperfusión muy diferentes, uno ultracorto de 20 segundos y otro mayor, aunque se podría considerar corto, de 10 minutos. En el primero se considera que en los cambios producidos sólo participarían los RLO, muy reactivos y de vida media del orden de los milisegundos, microsegundos o nanosegundos, y en el segundo, al quedar demostrado que ya hay incremento en los niveles de mieloperoxidasa a los 5 minutos de la reperfusión¹¹⁹, que podrían participar además los PMN.

En las determinaciones de MDA realizadas a los 20 segundos de reperfusión después de 30 minutos de isquemia los valores hallados fueron ligeramente inferiores a los correspondientes a la isquemia sólo. A diferencia de lo ocurrido en la situación anterior, después de 60 minutos de isquemia los niveles de MDA si fueron superiores, aunque muy poco. En ninguno de los dos casos las diferencias fueron significativas. Cuando se consideraron reperfusiones de 10 minutos tanto después de 30 como de 60 minutos de isquemia los valores de MDA fueron inferiores; de forma significativa para una p menor de 0.05 en el primer caso.

En el estudio histológico las reperfusiones no ofrecieron diferencias significativas en relación con ninguna de las isquemias, siendo sólo casi significativa en el caso de la reperfusión de 10 minutos después de 30 minutos

de isquemia, corroborando así lo demostrado por Udassin y Cols.¹¹³: que la reversibilidad del daño inducido en la mucosa intestinal sometida a isquemia total durante 30 minutos empieza a hacerse evidente a los 10 minutos de reperfusión, siendo reducido el daño original a cerca de la mitad a los 50 minutos.

A nivel ultraestructural se hallaron diferencias significativas en la isquemia de 30 minutos con la reperfusión de 10 minutos y en la isquemia de 60 segundos con ambas reperfusiones. Las alteraciones observadas en las reperfusiones se consideraron diferentes desde el punto de vista cuantitativo ya que cualitativamente no se vieron lesiones distintas a las halladas en la isquemia.

Se podrían interpretar estos datos como que fue durante la isquemia, por la acción compensadora de las colaterales, cuando se produjo el efecto y la formación de RLO y que en el momento de la reperfusión ya se había transformado la XO en XD y el oxígeno suministrado no condujo a la génesis de RLO o que ésta fue insuficiente para detectar sus efectos suplementarios sobre los lípidos. A nivel ultraestructural las observaciones realizadas indican que su estudio es un buen indicador de los cambios producidos en las células en reperfusiones de corta duración después de isquemia de 30 y 60 minutos.

6.2.3 EFECTOS DEL ALOPURINOL

El alopurinol, al igual que su metabolito el oxipurinol, inhibe la xantina oxidasa y por tanto impide la formación del radical superóxido e indirectamente la de otros radicales libres producidos en la isquemia-reperfusión intestinal⁶¹.

Los resultados obtenidos en la medida de la concentración de MDA y las observaciones óptica y electrónica con la isquemia, en nuestro modelo experimental, nos hacían suponer que había peroxidación lipídica producida por RLO en ese momento.

Cuando se administra alopurinol al grupo de animales con isquemia de 30 minutos sin reperfusión encontramos que los niveles de MDA son inferiores al grupo sin droga, con una significación de p menor de 0.001. Estos datos se apoyan además en lo hallado en las observaciones ópticas, de forma menos

significativa, y en las realizadas con el microscopio electrónico.

A diferencia de lo demostrado por Van Ye y cols.⁹⁹: que la inhibición de la peroxidación lipídica con U74389F no se acompaña de un menor daño morfológico en la mucosa intestinal; nuestros resultados indican que la inhibición de la XO con alopurinol, probablemente al minimizar los efectos que los RLO tienen no sólo sobre los lípidos sino también sobre proteínas, hidratos de carbono y ácidos nucleicos, además de disminuir los niveles de MDA también mejoran las lesiones producidas en la mucosa intestinal y en el enterocito.

Estos datos pueden contribuir a la mejor definición de la "ventana terapéutica" que podría ser ampliada, al menos en algunas circunstancias clínicas o experimentales, al tiempo de isquemia. Así el "beneficio bioquímico" del uso del alopurinol en la isquemia-reperfusión, demostrado en múltiples estudios^{44,93,95,119}, permite plantear su ensayo terapéutico en la clínica, en situaciones quirúrgicas con interrupción transitoria del flujo mesentérico (v. gr. arteriorrafias, reimplantes arteriales, trasplantes, etc) con la intención de evitar lesiones en la mucosa intestinal y posteriores consecuencias, como puede ser el fallo multiorgánico, a nivel sistémico.

7. CONCLUSIONES

1. La isquemia intestinal producida por interrupción del flujo, a nivel de la arteria mesentérica superior, durante 30 y 60 minutos, eleva significativamente la concentración de malondialdehído mucoso y produce alteraciones tisulares y en el enterocito.
2. La reperfusión intestinal de 20 segundos disminuye los niveles de malondialdehído después de 30 minutos de isquemia y prácticamente no los modifica después de 60, no produce cambios a nivel óptico y si menores lesiones en el estudio ultraestructural después de 60 minutos de isquemia.
3. La reperfusión del intestino delgado de 10 minutos disminuye los niveles de malondialdehído tras la isquemia de 30 y de 60 minutos, siendo este descenso significativo en el primer caso. Produce una mejoría casi significativa después de 30 minutos de isquemia en el estudio histológico y de forma significativa después de ambas isquemias en el análisis de su ultraestructura.

4. El alopurinol intravenoso, a dosis de 50mg./Kg. de peso, reduce significativamente los niveles de malondialdehido en la mucosa intestinal sometida a 30 minutos de isquemia, así como el grado lesional a nivel óptico y ultraestructural.

8. BIBLIOGRAFIA

1. Johnson BA, Weil MH: Redefining ischemia due to circulatory failure as dual defects of oxygen deficits and of carbon dioxide excesses. *Crit Care Med* 1991; 19: 1432-8.
2. Consejería de Sanidad y servicios sociales. Mortalidad en Asturias 1990. Oviedo: Servicio de Publicaciones del Principado, 1992.
3. Sachs SM, Morton JH, Schwartz SI. Acute mesenteric ischemia. *Surgery* 1982; 92: 646-53.
4. Wilson C, Gupta R, Gilmour DG, Imrie CV. Acute mesenteric ischaemia. *Br J Surg* 1987; 74: 279-81.
5. Lobo Martínez E, Meroño Carvajosa E, Sacco O, Martínez Molina E. Embolectomía en la isquemia mesentérica. *Rev Esp Enf Digest* 1993; 83: 351-4.
6. Sitges-Serra A, Ibarz M. Intestino y Shock. In Net A, Mancebo J, Benito S Eds: *Shock y fallo multiorgánico*. Barcelona. Springer-Verlag Ibérica SA, 1992: 223-35.
7. Fiddian-Green RG. Associations between intramucosal acidosis in the gut and organ failure. *Crit Care Med* 1993; 21: S103-7.
8. Mythen MG, Webb AR. The role of gut mucosal hypoperfusion in the pathogenesis of post-operative organ dysfunction. *Intensive Care Med* 1994; 20: 203-9.
9. Williams LF Jr. Mesenteric ischemia. *Surg Clin North Am* 1988; 68: 331-53.
10. Lucas AE, Richardson JD, Flint LM, Polk HC Jr. Traumatic injury of the proximal superior mesenteric artery. *Ann Surg* 1981; 193: 30-4.
11. Graham Jm, Mattox KL, Beall Ac Jr, Debakey ME. Injuries to the visceral artery. *Surgery* 1978; 84: 835-9.
12. Johnson WC, Nabseth DC. Visceral infarction following aortic surgery. *Ann Surg* 1974; 180: 312-8.
13. Hirabayashi S, Miyata M, Shoji M, Shibusawa H. Reconstruction of the thoracic esophagus, with extended jejunum used as a substitute, with the aid of microvascular anastomosis. *Surgery* 1993; 113: 515-19.
14. Panis Y, Valleur P. La transplantation d'intestin grêle. Résultats expérimentaux et cliniques. *Ann Chir* 1993; 47: 645-58
15. Todo S, Tzakis A, Reyes J, Abu-Elmagd K, Fukumara H, Nour B y col. Intestinal transplantation at the University of Pittsburgh. *Transplant Proc* 1994;

26: 1409-10.

16.Kukora JS, Dent TL. Obstrucción del intestino delgado. En: Nelson RL, Nyhus LIM, editores. Cirugía del intestino delgado. Barcelona: Salvat 1990: 265-80.

17.Sack J, Aldrete JS. Primary mesenteric venous thrombosis. Surg Gynecol Obstet 1982; 154: 205-8.

18.Benjamin E, Oropello JM, Iberti TJ. Acute mesenteric ischaemia: pathophysiology, diagnosis, and treatment. Dis Mon 1993; 39: 129-212.

19.Pasch AR, Flanigan DP. Diagnóstico y tratamiento de la isquemia mesentérica. En: Nelson RL, Nyhus LIM, editores. Cirugía del intestino delgado. Barcelona: Salvat 1990: 173-85.

20.Boley SJ, Kaleya RN, Brandt LJ. Trombosis venosa mesentérica. Clin Quir Nort 1992; 1: 173-90.

21.Byrd RL, Cunningham MW, Goldman LI. Nonocclusive ischemic colitis secondary to hemorrhagic shock. Dis Colon Rectum 1987; 30: 116-8

22.Goglin WK, Elliot BM, Deppe SA. Nifedipine-induced hypotension and mesenteric ischemia. South Med J 1989; 82: 274-5

23.Reed JK, Mcgiin RF, Gorman JF, Thomford NR. Traumatic mesenteric arteriovenous fistula presenting as the superior mesenteric artery syndrome. Arch Surg 1986; 121: 1209.

24.Gennaro M, Ascer E, Matano R, Jacobowitz IJ, Cunningham Jr JN. Acute Mesenteric ischemia after cardiopulmonary by-pass. Am J Surg 1993; 166: 231-6.

25.Hulten L, Jodal M, Lindhagen J, Lundgren O. Blood flow in the small intestine of cat and man as analyzed by an inert gas washout technique. Gastroenterology 1976; 70: 45-51.

26.Grum CM. Tissue oxygenation in low flow states and during hypoxemia. Crit Care Med 1993; 21: S44-9.

27.Adams RP, Cain SM. A critical value of O₂ transport in the rat. J Appl Physiol 1982; 53: 660-4.

28.Kvietys PR, Granger DN. Relation between intestinal blood flow and oxygen uptake. Am J Physiol 1982; 242: G202-8.

29.Patel A, Kaleya RN, Sammartano RJ. Fisiopatología de la isquemia mesentérica. Clin Quir Nort 1992; 1: 29-38.

30.Klomblieth PL, Boley SJ, Whitehouse BS. Anatomía de la circulación esplácnica. Clin Quir Nort 1992; 1:1-28.

31. Hebel R, Stromberg MW, editores. *Anatomy of the laboratory rat*. Baltimore: The Williams and Wilkins Company, 1976.
32. Suso Alea FJ, Gómez Alonso A, Sánchez Fernández J, Gacia García J, Ramos Hidalgo A, Cuadrado Idoyaga F y col. Modificaciones en la perfusión del hígado por ligadura de la arteria mesentérica superior. Estudio experimental. *Cir Esp* 1988; 44: 566-71.
33. Gómez Alonso A, Suso Alea FJ, Sánchez Fernández J, García García J, Ramos Hidalgo A, Cuadrado Idoyaga F y col. Oxigenación portal y equilibrio ácidobase durante la isquemia intestinal aguda. Estudio experimental. *Cir Esp* 1988; 44: 739-44.
34. Reilly PM, Bulkley GB. Vasoactive mediators and splanchnic perfusion. *Crit Care Med* 1993; 21: S55-68.
35. Rothe CF. Reflex control of veins and vascular capacitance. *Physiol Rev* 1983; 63: 1281-342.
36. Bulkley GB, Womack WA, Downey JM, Kvietys PR, Granger DN. Collateral blood flow in segmental intestinal ischemia: Effects of vasoactive agents. *Surgery* 1986; 100: 157-65.
37. Gunther J, Gimbrone MA Jr, Alexander RW. Identification and characterization of the high affinity vascular angiotensin II receptor in rat mesenteric artery. *Circ Res* 1980; 47: 278-86.
38. Bailey RW, Bulkley GB, Hamilton SR, Morris JB, Haglund UH. Protection of the small intestine from nonocclusive mesenteric ischemic injury due to cardiogenic shock. *Am J Surg* 1987; 153: 108-116.
39. Lerman A, Burnett JC. Intact and altered endothelium in regulation of vasomotion. *Circulation* 1992; 86(Suppl III): 12-9.
40. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui y cols. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988; 332: 411-5
41. Fernandez Alonso A, Martínez Rodríguez E, Vega Alvarez JA. Efectos de la prostaglandina E2 sobre la isquemia mesentérica experimental de la rata. *Rev Esp Enf Ap Digest* 1987; 72: 659-65.
42. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte hemocoupein. *J Biol Chem* 1969; 244: 6049-53.
43. Granger DN, Rutili G, McCord JM. Superoxide radicals in feline intestinal ischemia. *Gastroenterology* 1981; 81: 22-9.

44. Nilsson UA, Schoenberg MH, Aneman A, Poch B, Magadum S, Beger HG et al. Free radicals and pathogenesis during ischemia and reperfusion of the cat small intestine. *Gastroenterology* 1994; 106: 629-636.
45. Robinson JW, Mirkovitch V, Winistofer B, Saegesser F. Response of the intestinal mucosa to ischemia. *Gut* 1981; 22: 512-27.
46. Orrenius S. Mechanisms of oxidative cell damage. In: Poli G, Albano E, Dianzani MU, editors. *Free radicals: From Basic Science to Medicine*. Basel: Birkhäuser Verlag, 1993: 47-64.
47. Ernster L. Biochemistry of reoxygenation injury. *Crit Care Med* 1988; 16: 947-53.
48. Granger DN. Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol* 1988; 255: H1269-75.
49. Fridovich I. Quantitative aspects of the production of superoxide anion radical by milk xanthine oxidase. *J Biol Chem* 1970; 245: 4053-8.
50. McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 1985; 312: 159-63.
51. Friedl HP, Smith DJ, Till GO, Thomson PD, Louis DS, Ward PA. Ischemia-reperfusion in humans. Appearance of xanthine oxidase activity. *Am J Pathol* 1990; 136: 491-5.
52. McCall TB, Broughton-Smith NK, Palmer RMJ, Whittle BR, Moncada SJ. Synthesis of nitric oxide from L-arginine by neutrophils. Release and interaction with the superoxide anion. *Biochem J* 1989; 261: 293-6.
53. Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 288: 373-6.
54. Grace PA. Ischaemia-Reperfusion injury. *Br J Surg* 1994; 81: 637-47.
55. Anderson BO, Brown JM, Harken AH. Mechanisms of neutrophil-mediated tissue injury. *J Surg Res* 1991; 51: 170-9.
56. Hamilton J, Dawson A, Webb J. Observations upon small gut "mucosal" PO₂ and PCO₂ in anesthetized dogs. *Gastroenterology* 1968; 55: 52-60.
57. Gutierrez G, Palizas F, Doglio G, Wainsztein N, Gallesio A, Pacin J, y cols. Gastric intramucosal as a therapeutic index of tissue oxygenation in critically ill patients. *Lancet* 1992; 339: 195-9.
58. McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 1985; 312: 159-63.

59. Fridovich I. The biology of oxygen radicals. *Science* 1978; 201: 875-80.
60. Allen JE, Goodman DEP, Besarab A, Rasmussen H. Studies on biochemical basis of oxygen toxicity. *Biochem Biophys Acta* 1973; 320: 334-40.
61. Garcia Garcia J, Martín Rullan C, Holgado M, Javier Suso F, Cuadrado Ydoyaga F, Gomez Alonso A. Efecto del alopurinol en la isquemia intestinal aguda experimental. *Cir Esp* 1988; 44: 897-901.
62. García García J, Martín-Rollan C, Ludeña de la Cruz J, García-Criado J, Gómez-Alonso A. The protective effect of superoxide dismutase (SOD) in intestinal ischemia. *Res in Surg* 1991; 3: 184-7.
63. Cicalese L, Caraceni P, Nalesnik MA, Lee KKW, Thiel DHV, Schraut WH. Oxygen free radical formation is related to mucosal injury during reperfusion after small bowel transplantation. *Transplant Proc* 1994; 26: 1447.
64. Morris JB, Bulkley GB, Haglund U, Cadenas E, Sies H. The direct, real-time demonstration of oxygen free radical generation at reperfusion following ischemia in the living intact, rat small intestine. *Gastroenterology* 1987; 92: 1541.
65. Nilsson UA, Lundgren O, Haglind E, Bylund-Fellenius A-C. Radical production during in vivo intestinal ischemia and reperfusion in the cat. *Am J Physiol* 1989; 257(Gastrointest Liver Physiol 20): G409-14.
66. Nilsson UA, Aberg J, Aneman A, Lundgren O. Feline intestinal and reperfusion: relation between radical formation and tissue damage. *Eur Surg Res* 1993; 25: 20-29.
67. Wolff SP, Jiang ZY, Hunt JV. Protein glycation and oxidative stress in diabetes mellitus and ageing. *Free Rad Biol and Med* 1991; 10: 339-52.
68. Rossi F, Della Bianca V, Grzeskowiak M, Zeni L. Mechanisms of oxygen free radicals production in granulocytes. In: Novelli, Ursini, editores. *Oxygen free radicals in shock*. Basel. Karger, 1986: 15-28.
69. Davies KJA. Oxidative Damage and Repair: Introduction and overview. In *Oxidative Damage and Repair. Chemical, Biological and Medical Aspects*. Pergamon Press. Oxford, 1991. XVII-XXVII.
70. Comporti M. Lipid Peroxidation. An Overview. In: G.Poli, E.Albano, MU.Dianzini, editors. *Free Radicals: From Basic Science to Medicine*. Basel: Birkhäuser Verlag, 1993: 65-79.
71. Aho AJ, Arstila AU, Ahonen J, Inberg MV, Scheinin TM. Ultrastructural alterations in ischaemic lesion of small intestinal mucosa in experimental superior mesenteric artery occlusion. Effect of oxygen breathing. *Scand J Gastroenterol* 1973; 8: 439-47.

72. Brown RA, Chiu CJ, Scott HJ, Gurd FN. Ultrastructural changes in the canine ileal mucosal cell after mesenteric arterial occlusion. A sequential study. *Arch Surg* 1970; 101: 290-7.
73. Welbourn CRB, Goldman G, Paterson IS, Valeri CR, Shepro D, Hechtman HB. Pathophysiology of ischaemia reperfusion injury: central role of neutrophil. *Br J Surg* 1991; 78: 651-5.
74. Klausner JM, Paterson IS, Kobzik L, Valeri CR, Shepro D, Hechtman HB. Oxygen free radicals mediate ischemia-induced lung injury. *Surgery* 1989; 104: 192-9.
75. Spagnuolo PJ, Ellner JJ, Hassid A, Dunn MJ. Thromboxane A2 mediates augmented polymorphonuclear leukocyte adhesiveness. *J Clin Invest* 1980; 66: 406-14.
76. Gimbrone MA, Brock AF, Schafer AI. Leukotriene B4 stimulates polymorphonuclear leukocyte adhesion to cultured vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 1984; 74: 1552-5.
77. Simpson R, Alon R, Kobzik L, Valeri R, Shepro D, Hechtman HB. Neutrophil and nonneutrophil-mediated injury in intestinal ischemia-reperfusion. *Ann Surg* 1993; 218: 444-54.
78. Kubes P, Ibbotson G, Russell J, Wallace JL, Granger DN. Role of platelet activating factor in ischemia/reperfusion-induced leukocyte adherence. *Am J Physiol* 1990; 259: G300-5.
79. Kurtel H, Tso P, Granger DN. Granulocyte accumulation in post-ischemic intestine: role of leukocyte adhesion protein CD11/CD18. *Am J Physiol* 1992; 103: 807-12.
80. Simpson PJ, Todd RF, Fantone JC, Mickelson JK, Griffin JD, Lucchesi BR. Reduction of experimental canine reperfusion injury by a monoclonal antibody (Anti-Mo1, Anti-CD11b) that inhibits leukocyte adhesion. *J Clin Invest* 1988; 81: 624-29.
81. Goldman G, Welbourn R, Klausner JM, Valeri CR, Shepro D, Hechtman HB. Oxygen free radicals are required for ischemia-induced leukotriene B4 synthesis and diapedesis. *Surgery* 1992; 111: 287-93.
82. Zimmerman BJ, Granger DN. Reperfusion-induced leukocyte infiltration: Role of elastase. *Am J Physiol* 1990; 259: H390-4.
83. Simpson R, Alon R, Kobzik L, Valeri R, Shepro D, Hechtman HB. Neutrophil and nonneutrophil-mediated injury in intestinal ischemia-reperfusion. *Ann Surg* 1993; 218: 444-54.

84. Mitsudo S, Lawrence JB. Pathology of intestinal ischemia. *Surg Clin North Am* 1992; 72: 43-63.
85. Chiu CJ, McArdle AH, Brown R, Scott HJ, Gurd FN. Intestinal mucosal lesion in low-flow states. I. A morphological, hemodynamic and metabolic reappraisal. *Arch Surg* 1970; 101: 478-483.
86. Park PO, Haglund U, Bulkley GB, Fält K. The sequence of development of intestinal tissue injury after strangulation ischemia and reperfusion. *Surgery* 1990; 107: 574-80.
87. Parks DA, Bulkley GB, Granger DN, Hamilton SR, McCord JM. Ischemic injury in the cat small intestine: role of the superoxide radicals. *Gastroenterology* 1982; 82: 9-15.
88. Boros M, Karacsony G, Kaszaki J, Nagy S. Reperfusion mucosal damage after complete intestinal ischemia in the dog: the effects of antioxidant and phospholipase A2 inhibitor therapy. *Surgery* 1993; 113: 184-91.
89. Bilbao J, García-Alonso I, Portugal V, Barcelo P, Ortiz J, Méndez J. Utilidad terapéutica de fármacos antioxidantes en el síndrome de reperfusión intestinal experimental. *Rev Esp Enf Digest* 1991; 80: 237-41.
90. Haglund U, Bulkley GB, Granger DN. Patophysiology of intestinal ischemic injury. *Acta Chir Scand* 1987; 153: 321-4.
91. Trier JS, Rubin CE. Electron microscopy of the small intestine: a review. *Gastroenterology* 1965; 49: 574-603.
92. Fernández Alonso A. Prostaglandinas e isquemia mesentérica. Tesis doctoral. Universidad de Oviedo 1990.
93. Grisham MB, Henández LA, Granger N. Xanthine oxidase and neutrophil infiltration in intestinal ischemia. *Am J Physiol* 1986 (*Gastrointest Liver Physiol* 14); 251: G567-74.
94. Rice-Evans CA, Diplock AT. Current status of antioxidant therapy. *Free Radic Biol Med* 1993; 15: 77-96.
95. García García J, Martín Rollan C, Refoyo Enríquez MA, Holgado Madruga M, Mariño Hernández E, Macías Núñez JF y cols. Improved survival in intestinal ischemia by allopurinol not related to xanthine-oxidase inhibition. *J Surg Res* 1990; 48: 144-6.
96. Godin DB, Bhimji S. Effects of allopurinol on myocardial ischemic injury induced by coronary artery ligation and reperfusion. *Biochem Pharm* 1987; 2101: 36-7.
97. Schiller HJ, Reilly PM, Bulkley GB. Antioxidant Therapy. *Crit Care Med* 1993; 21: S92-S102.

98. Parks DA, Granger DN, Bulkley GB... Soybean Trypsin inhibitor attenuates ischemic injury to the feline intestine. *Gastroenterology* 1985; 89: 6-12.
99. Van Ye TM, Roza AM, Pieper GM, Henderson J Jr, Jhonson CP, Adams MB. Inhibition of intestinal lipid peroxidation does not minimize morphologic damage. *J Surg Res* 1993; 55: 553-8.
100. Zimmerman BJ, Guillory DJ, Grisham MB, Gaginella TS, Granger DN. Role of leukotriene B₄ in granulocyte infiltration into the postischemic feline intestine. *Gastroenterology* 1990; 99: 1358-63.
101. Mc Evory GK. *Drug Informacion* 84: Bethesda. Former Editors, 1985.
102. Oredsson S, Plate G, Qvarfordt P. Allopurinol-a free radical scavenger-reduces reperfusion injury in skeletal muscle. *Eur J Vasc Surg* 1991; 5: 47-52.
103. Rynolds JEF. *The Extra Pharmacopeia*. 28 ed. London: The Pharmaceutical Press, 1982.
104. Pérez Suárez A. Efecto del alopurinol sobre la pancreatitis aguda experimental de la rata. Tesis doctoral. Universidad de Oviedo 1993.
105. Belzer FO, Southard JH. Principles of solid-organ preservation by cold storage. *Transplantation* 1988; 45: 673-6.
106. Haglund U, Rasmussen I. Oxygenation of the mucosa. *Br J Surg* 1993; 80: 955-6.
107. Otamiri TA, Tagesson C, Sjö Dahl R. Increased plasma malondialdehyde in patients with small intestinal strangulation obstruction. *Acta Chir Scand* 1988; 154: 283-85.
108. Davies SW, Ranjadayalan K, Wickens DG, Dormandy TL, Timmis AD. Lipid peroxidation with successful thrombolysis. *Lancet* 1990; 335: 741-3.
109. Bulkley GB, Kvietys PR, Parks DA, Perry MA, Granger DN. Relationship of blood flow and oxygen consumption to ischemic injury in the canine small intestine. *Gastroenterology* 1985; 89: 852-7.
110. Haglund U, Arvidsson S, Schoenberg MH. Oxyradicals and acute gastrointestinal mucosal damage. Novelli, Orsini, editores. *Oxygen free radicals in shock*. Basel, Karger, 1986: 197-204.
111. Myers SI, Hernández R. Oxygen free radical regulation of rat splanchnic blood flow. *Surgery* 1992; 112: 347-54.
112. Otamiri T, Sjö Dahl R, Tagesson C. An experimental model for studying reversible intestinal ischemia. *Act Chir Scand* 1987; 153: 51-6.

113. Udassin R, Vromen A, Haskel Y. The time sequence of injury and recovery following transient reversible intestinal ischemia. *J Surg Res* 1994; 56: 221-5.
114. Bilbao J, García-Alonso I, Portugal V, Barceló P, Apecechea A, Méndez J. Eficacia de tratamientos antioxidantes (ácido fólico y alfatocoferol) en las lesiones intestinales inducidas por reperfusión. *Cir Esp* 1992; 51: 262-5.
115. Bragg L, Thompson JS, West WW. Intestinal diamine oxidase levels reflect ischemic injury. *J Surg Res* 1991; 50: 228-33.
116. Otamiri TA. Influence of quinacrine on plasma malondialdehyde after small intestinal ischemia and reperfusion. *Circ Shock* 1988; 24: 63-9.
117. Schoenberg MH, Muhl E, Sellin D, Younes M, Schildberg FW, Haglund U. Posthypotensive generation of superoxide free radicals-possible role in the pathogenesis of the intestinal mucosal damage. *Acta Chir Scand* 1984; 150: 301-9.
118. Otamiri T, Franzen L, Lindmark D, Tagesson C. Increased phospholipase A2 and decreased lysophospholipase activity in the small intestinal mucosa after ischaemia and revascularisation. *Gut* 1987; 28: 1445-53.
119. Otamiri T. Oxygen radicals, lipid peroxidation, and neutrophil infiltration after small-intestinal ischemia and reperfusion. *Surgery* 1989; 105: 593-7.
120. Gibson DD, Brackett DJ, Squires RA, Baila AK, Lerner MR, McCay PB y cols. Evidence that the large loss of glutathione observed in ischemia/reperfusion of the small intestine is not due to oxidation to glutathione disulfide. *Free Rad Biol Med* 1993; 14: 427-33.
121. Hamamoto I, Zhang S, Kokudo K, Todo S, Starzl TE. Role of xanthine-oxidase system in mucosal injury after intestinal preservation and transplantation. *Transplant Proc* 1993; 25: 1681.
122. Czyrco C, Steigman C, Turley DL, Drott HR, Ziegler MM. The role of reperfusion injury in occlusive ischemia of the neonate: malonaldehyde-derived fluorescent products and correlation of histology. *J Surg Research* 1991; 51: 1-4.
123. Moya Riera JJ, Fernández Alonso A, Martínez Rodríguez E. Efectos del alopurinol sobre la isquemia mesentérica experimental de la rata. *Rev Esp Enf Digest* 1991; 79: 15-20.
124. Müller AR, Langrehr JM, Nalesnik M, Hoffman RA, Lee TK, Lee KKW y col. Mucosal glutaminasa activity and histology as parameters of small bowel preservation injury. *J Surg Res* 1994; 56: 207-15.
125. Parks DA, Grogard B, Granger DN. Comparison of partial and complete arterial occlusion models for studying intestinal ischemia. *Surgery* 1982; 92: 896-901.

- 126.Grissinger KD, Granger DN. Mucosal injury induced by ischemia and reperfusion in the piglet intestine: influences of age and feeding. *Gastroenterology* 1989; 97: 920-6.
- 127.Slater TF. Overview of methods used for detecting lipid peroxidation. *Meth Enzimology* 1984; 105: 283-93.
- 128.Hinder RA, Stein HJ. Oxygen-derived free radicals. *Arch Surg* 1992; 126: 104-5.
- 129.Wong SHY, Knight JA, Hopfer SM, Zaharia O, Leach Jr CN, Sunderman Jr W. Lipoperoxidos in Plasma as measured by liquid-cromatographic separation of malondialdehyde-Thiobarbituric Acid Aduct. *Clin Chem* 1987; 33: 214-20.
- 130.Till GO, Hatherill JR, Tourtelotte WW, Lutz MJ, Eard PA. Lipid peroxidation and acute lung injury after thermal trauma to skin. *Am J Pathol* 1985; 119: 376-84.
- 131.Guteridge JMC, Halliwell B. The mesasurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *TIBS* 1990; 15: 129-35.
- 132.Bird RP, Draper HH. Comparative Studies on different methods of malondialdehyde determination. *Meth Enzimology* 1984; 105: 299-305.
- 133.Hoshino T, Maley WR, Bulkley GB, Williams GM. Ablation of free radical-mediated reperfusion injury for the salvage of kidneys taken from non-heartbeating donors. *Transplantation* 1988; 45: 488-92.
- 134.International Comitee of Medical Journal Editors. Uniform requeriments for manuscripts submitted to biomedical journals. *Br M J* 1991; 302: 338-41.
- 135.Mellow CG, Knight KR, Angel MF, Coe SA, O'Brien BMcC. The biochemical basis of secondary ischemia. *J Surg Research* 1992; 52: 226-32.
- 136.Hernández LA, Grisham MB, Von Ritter Ch, Granger DN. Biochemical localization of xanthine oxidase in cat small intestine. *Gastroenterology* 1987; 92: 1433.
- 137.Martinez Revuelta M. Alopurinol en la isquemia y reperfusion hepática experimental. Tesis doctoral. Universidad de Oviedo 1994.