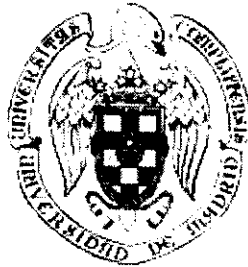


**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE VETERINARIA  
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA ANIMAL II**



**TESIS DOCTORAL**

**ISQUEMIA MESENTÉRICA EXPERIMENTAL EN CONEJOS:  
ESTUDIO DE LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA Y ACCIÓN DE LA  
SUPEROXIDO-DISMUTASA**

**ÁNGEL AGUILERA MARTÍNEZ**

**AÑO 2000**

*A mi esposa Matilde  
A mis hijos Marta y Ángel*

*Dejamos de temer aquello que  
se ha aprendido a entender*  
*Marie Curie*

## AGRADECIMIENTOS

A mi familia: mi esposa Matilde Manglano y mis hijos Marta y Angel Luis, los cuales han soportado sin una queja la usurpación del tiempo que ha supuesto la realización de este trabajo y que naturalmente les correspondía.

A mis padres, Luis y Ana María, cuyo ejemplo y estímulo me ha permitido sortear las dificultades y perseverar en el empeño.

A mi director de tesis Teniente Coronel Médico Dr. D. Patrocinio Moratinos Palomero, por sus conocimientos, desvelos y aportaciones a este trabajo, las cuales, junto a sus acertados consejos y su inestimable experiencia, han hecho posible esta tesis doctoral.

A la tutora de tesis, Dra. D<sup>a</sup>. Concepción García Botey, Profesora Titular del Departamento de Patología Animal II de la Facultad de Veterinaria de Madrid por sus buenos consejos e instrucciones, habiéndose prestado en todo momento y desinteresadamente a ayudarme en mis consultas.

Al General Veterinario D. Enrique Tabanera del Real y al General Médico D. Jesús Lobo González por su aliento y estímulo para la realización de esta tesis.

A los Jefes del Servicio de Medicina y Cirugía Experimental del Hospital Militar "Gómez Ullá", Coroneles Veterinarios D. José Manuel Pérez García y D. David Tabanera del Real por las facilidades otorgadas para el estudio y por permitirme disponer del personal y de las instalaciones del servicio.

A mis compañeros y amigos de este servicio, por la ayuda prestada en la preparación, la asistencia en las intervenciones quirúrgicas, análisis, necropsias, fotografías, estadística, edición de la tesis y en general por la paciencia de que han hecho gala durante el periodo de realización.

Mención especial quiero dedicar a los siguientes: Comandante Veterinario D. Fernando Pérez-Iñigo Alonso (†), el cual con sus profundos conocimientos quirúrgicos me alentó y me apoyó en el desarrollo de las intervenciones; Dr. en Biología D. Carlos Gutiérrez Ortega, inestimable colaborador, sin el cual no hubieran sido posibles la mayoría de las intervenciones quirúrgicas, análisis y proceso de datos; Bgda. Especialista de Veterinaria D. Felix Mellado Robledo por su indispensable labor como anestesista y ayudante quirúrgico; D. Pablo Hernández Garzón, veterinario responsable del gobierno del quirófano y de que todo el material estuviese siempre en su punto en el momento preciso; Comandante Veterinario D. Jesús Díaz-Regañón Jiménez por facilitarme el uso del equipo y por los apoyos físicos, intelectuales, materiales y morales; Bgda. D. Pablo Ruiz Hernández, responsable de los suministros y cuidados de los animales; Sgto. Especialista D. Antonio Sánchez Ruiz, responsable de la farmacia y de las curas; Comandante Veterinario D. Manuel Rivera Puertas por los apoyos de laboratorio y fotografía; Capitán de Veterinaria D. Manuel Meilan Teijeiro por su labor, ayudándome a conseguir todo lo necesario para el estudio; Cuidadores del animalario, Rafael Fernández Cubero y Víctor Romero Marrupe, los cuales, con su inestimable labor en la atención de los animales, colaboraron al éxito de las intervenciones.

Al Dr. en Biología D. Jerónimo Carnés Sánchez por hacerme partícipe de sus experiencias y desvelos.

Al Teniente Coronel Médico Dr. D. Francisco Guijarro Escribano del Servicio de Cirugía Vasculardel hospital, cuyo ejemplo supuso un gran estímulo y cuyo trabajo previo sirvió de idea para esta investigación.

A D. Luis Borreguero Béjar, responsable de la fotografía científica del hospital por excelente trabajo.

Al personal del Servicio de Anatomía Patológica que colaboró en el procesamiento

de las muestras histopatológicas.

A los responsables de las bibliotecas del hospital "Gomez Ulla" y de la Facultad de Veterinaria de Madrid por su inestimable ayuda en la recopilación de material bibliográfico.

A las numerosas personas del Hospital Militar "Gómez Ulla", de la Facultad de Veterinaria y de otros entornos, que de una u otra forma, han colaborado en la realización de este trabajo.

A todos, mi mayor agradecimiento. Este trabajo también lleva vuestro esfuerzo.

# ÍNDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1	Justificación .....	1
1.2	<b>Isquemia mesenterica e infarto intestinal agudo.....</b>	<b>1</b>
1.2.1	Antecedentes históricos.....	1
1.2.2	Concepto .....	2
1.2.3	Etiopatogenia .....	2
1.2.4	Fisiopatología.....	4
1.2.5	Clasificación.....	5
1.2.6	Tratamiento .....	6
1.3	<b>La isquemia mesentérica en la experimentación animal: modelos animales.....</b>	<b>6</b>
1.3.1	Modelos experimentales en conejos.....	6
1.3.2	Modelos experimentales en perros.....	9
1.3.3	Modelos experimentales en ratas .....	24
1.3.4	Modelos experimentales en gatos .....	32
1.3.5	Modelos experimentales en hámster .....	36
1.4	<b>Recuerdo morfofisiológico del aparato digestivo del conejo .....</b>	<b>37</b>
1.4.1	Generalidades.....	37
1.4.2	Vascularización intestinal en el conejo .....	38
1.5	<b>Radicales libres e isquemia intestinal.....</b>	<b>39</b>
1.5.1	Generalidades.....	39
1.5.2	Química y producción de los radicales libres del oxígeno .....	40
1.5.3	Acción de los radicales libres.....	42
1.5.4	Mecanismos de toxicidad.....	43
1.5.5	Papel de los radicales libres del oxígeno en situaciones de isquemia reperfusión .....	45
1.5.6	La lesión intestinal derivada de la acción de los radicales libres .....	47
1.5.7	Papel del neutrófilo .....	50
1.5.8	Radicales libres en otros procesos de isquemia reperfusión.....	52
1.5.9	Neutralización del daño producido por la isquemia-reperfusión.....	53
<b>2</b>	<b>INTERROGANTES, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DE INVESTIGACIÓN..</b>	<b>59</b>
2.1	Interrogantes .....	59
2.2	Hipótesis.....	59
2.2.1	Hipótesis conceptual .....	59
2.2.2	Hipótesis estadísticas: .....	59
2.3	Objetivos .....	60
<b>3</b>	<b>DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN .....</b>	<b>61</b>
3.1	<b>Instalaciones, animales y material .....</b>	<b>61</b>
3.1.1	Instalaciones.....	61
3.1.2	Animales .....	61
3.1.3	Material empleado.....	62
3.2	<b>Método.....</b>	<b>65</b>
3.2.1	Series experimentales.....	65
3.2.2	Metodología anestésica .....	67
3.2.3	Metodología quirúrgica.....	67
3.2.4	Metodología clínica.....	72
3.2.5	Infusión endovenosa de superóxido dismutasa en solución salina.....	73
3.2.6	Estudio de la peroxidación lipídica en segmentos intestinales.....	74
3.2.7	Metodología de eutanasia.....	75
3.2.8	Metodología de necropsia .....	75
3.2.9	Metodología histológica.....	76
3.2.10	Metodología estadística.....	77

3.3	Cronograma.....	78
4	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>80</b>
4.1	<b>Condiciones fisiológicas postquirúrgicas .....</b>	<b>80</b>
4.1.1	Ingesta de agua.....	80
4.1.2	Ingesta de alimentos.....	80
4.1.3	Deposiciones.....	80
4.2	<b>Supervivencia de animales sometidos a isquemia - reperfusión de la arteria mesentérica craneal .....</b>	<b>81</b>
4.2.1	Serie I: Operación simulada (Sham).....	81
4.2.2	Serie II: Isquemia AMC 15 minutos.....	84
4.2.3	Serie III: Isquemia AMC 30 minutos.....	86
4.2.4	Serie IV: Isquemia AMC 60 minutos.....	88
4.2.5	Serie V: Isquemia AMC 120 minutos.....	90
4.2.6	Inferencia estadística de la supervivencia a los diferentes tiempos de isquemia.....	92
4.3	<b>Supervivencia en la isquemia - reperfusión mesentérica en animales tratados con superóxido dismutasa .....</b>	<b>95</b>
4.3.1	Serie VI (SOD-1): supervivencia con SOD + SS.....	95
4.3.2	Serie VII (SOD-2): supervivencia con solución salina.....	98
4.3.3	Inferencia estadística.....	100
4.4	<b>Peroxidación lipídica intestinal en la isquemia-reperfusión mesentérica y modificaciones producidas por el tratamiento con SOD.....</b>	<b>100</b>
4.4.1	Curva patrón.....	101
4.4.2	Concentraciones intestinales de MDA.....	102
4.4.3	Inferencia estadística.....	103
4.5	<b>Alteraciones morfológicas.....</b>	<b>103</b>
4.5.1	Presencia de gas intestinal.....	103
4.5.2	Hemorragias intestinales.....	104
4.5.3	Observaciones en la necropsia.....	105
4.5.4	Estudio microscópico en las series de la curva de supervivencia: I, II, III, IV Y V.....	108
4.5.5	Lesiones histopatológicas comparativas en las series de la curva de supervivencia.....	112
4.5.6	Estudio microscópico en los animales de las series VI y VII.....	113
4.5.7	Estudio microscópico en las series de animales VIII, IX y X, para el estudio de la peroxidación lipídica.....	115
5	<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>122</b>
5.1	<b>Supervivencia en animales sometidos a isquemia-reperfusión de la arteria mesentérica craneal.....</b>	<b>122</b>
5.2	<b>Supervivencia en la isquemia-reperfusión mesentérica en relación al tratamiento preventivo con superóxido dismutasa .....</b>	<b>125</b>
5.3	<b>Peroxidación lipídica y su modificación por superóxido dismutasa.....</b>	<b>127</b>
5.4	<b>Lesiones.....</b>	<b>129</b>
5.4.1	Alteraciones fisiopatológicas.....	129
5.4.2	Lesiones macroscópicas.....	130
5.4.3	Lesiones microscópicas.....	131
5.4.4	Alteraciones en otros órganos.....	133
6	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>136</b>
7	<b>RESUMEN.....</b>	<b>137</b>
8	<b>SUMMARY .....</b>	<b>140</b>
9	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>143</b>
10	<b>GLOSARIO .....</b>	<b>155</b>

## 1 INTRODUCCIÓN

### 1.1 Justificación

La isquemia está involucrada en una amplia variedad de procesos patológicos humanos y animales. En el hombre la causa más común de muerte en el mundo occidental - cardiopatía isquémica - se produce por esta causa.

Entre los animales una buena parte de enfermedades cursan con situaciones isquémicas primarias o secundarias como sucede en procesos gastrointestinales - torsiones, vólvulos, invaginaciones, dilatación gástrica -, enfermedades parasitarias -estrongilosis-, y muchas de las que causan una mayor mortalidad. Para algunos autores como Chevillé,<sup>1</sup> la isquemia intestinal, es la principal causa de mortalidad en animales. Fenómenos isquémicos, a menudo se producen durante la cirugía, sobre todo cirugía vascular y trasplantes. Paradójicamente, durante la reperfusión el daño tisular puede incrementarse, al recibir el tejido isquémico nueva afluencia de sangre oxigenada.

El objetivo de este trabajo es estudiar en conejos Nueva Zelanda de la isquemia aguda de la arteria mesentérica craneal (AMC); definir la curva de mortalidad producida según los tiempos de isquemia; estudiar las lesiones producidas; cuantificar los radicales libres (RL) producidos durante la fase de isquemia-repermeabilización, y comprobar la eficacia terapéutica de la superóxido dismutasa (SOD), substancia que mediante su acción antioxidante actuaría como inhibidor de los efectos lesivos de la isquemia-reperfusión.

Este interés se justifica ya que en la práctica clínica el diagnóstico de las situaciones isquémicas es difícil y tardío, lo cual ocasiona retrasos en el tratamiento que traen como consecuencia una elevada morbi-mortalidad.<sup>2,3,4,5</sup>

### 1.2 Isquemia mesentérica e infarto intestinal agudo

#### 1.2.1 Antecedentes históricos

En 1843 Tiedeman, relató por primera vez la oclusión aguda de la AMC, que produjo la muerte por isquemia intestinal en un paciente de sesenta años.

En 1869 Chiene identificó por primera vez la obliteración crónica de las arterias mesentéricas y al describir sus hallazgos en autopsias observó la oclusión completa del tronco celiaco y de la AMC en sus orígenes respectivos sin que existiera infarto intestinal.

En 1894 Coucilman propuso por primera vez que el dolor abdominal pudiera ser consecuencia de la obstrucción de las arterias viscerales.<sup>6</sup>

Elliot en 1895, publicó el primer caso de un paciente que sobrevivió a una resección intestinal por necrosis secundaria a una isquemia mesentérica aguda.

Troter en 1943, distinguió entre las oclusiones agudas por trombosis sobre una arteria mesentérica arterioesclerótica y las producidas por oclusiones embólicas en pacientes que generalmente presentan una cardiopatía asociada.

En 1921 Klein describió la tercera causa de la isquemia mesentérica aguda, señalando la relación entre la insuficiencia cardíaca y la isquemia intestinal oclusiva.

Hasta 1935, la trombosis venosa mesentérica no fue descrita como entidad clínica diferente de la oclusión arterial.

Cuando Dunphy en 1936 descubrió en necropsias, que siete de los doce pacientes fallecidos por obstrucción vascular mesentérica, tenían historia de dolores abdominales recurrentes, fue aceptado de forma general que el dolor abdominal era de origen visceral.

En 1943, el cirujano ruso Ryvlin intentó sin éxito una embolectomía de la AMC.

Klass en 1951 publicó la realización de una embolectomía de la AMC fracasada,



ya que el paciente murió a los pocos días.

La primera embolectomía de la AMC a la que se asoció una resección intestinal con supervivencia del paciente, fue publicada por Stewart en 1951.

En 1957 Shaw y Rutledge publicaron la primera embolectomía de la AMC, que no precisó resección intestinal, señalando también la posibilidad de revisión abdominal tras la revascularización intestinal para verificar el estado de las asas intestinales.

En 1957 Mikkelsen fue el primero en utilizar la expresión "angina intestinal" para describir el dolor abdominal recurrente y se aventuró a manifestar que la cirugía de las arterias viscerales afectadas era factible y que la realización de ésta cirugía debería aliviar el dolor.

### 1.2.2 Concepto

La isquemia intestinal se produce por una disminución ó ausencia de flujo sanguíneo al intestino. La obliteración de la arteria mesentérica posterior tiene poca importancia clínica, a no ser que se encuentre asociada a estenosis u oclusión de las restantes arterias viscerales.<sup>7</sup>

Comprende una serie de síndromes clínicos de muy diversa presentación, con un pronóstico y mortalidad muy diferentes.<sup>8,9</sup>

La velocidad de instauración de la isquemia mesentérica va a condicionar la aparición de dos cuadros clínicos.

- La isquemia mesentérica crónica como resultado de la oclusión progresiva de la AMC.<sup>10</sup>
- La isquemia mesentérica aguda, consecutiva a la obstrucción súbita de la AMC y que tiene como consecuencia, una brusca caída de la perfusión en el territorio de la misma.<sup>11</sup>

Además de la obliteración de la arteria mesentérica, también pueden obstruirse las venas mesentéricas, produciendo trombosis venosas primarias (30 %), secundarias (60 %) o idiopáticas (10 %).<sup>46</sup> Entre las causas primarias, hay que citar la esplenectomía, la policitemia vera, la deficiencia de antitrombina III, la deficiencia de proteína C, la deficiencia de proteína S, trastornos de la coagulación, enfermedades mieloproliferativas, gestación, puerperio, uso de anticonceptivos orales y carcinomatosis. Entre las causas de las trombosis secundarias, hay que mencionar la hipertensión portal, la escleroterapia de varices esofágicas, el shunt porto-sistémico, la sepsis intraabdominal, pancreatitis, gastroenteritis, enfermedad inflamatoria del intestino, traumatismos abdominales y tumores malignos.

Para Anane-Sefah *et al*<sup>12</sup> y Naitove *et al*,<sup>13</sup> se entiende por trombosis venosa mesentérica primaria, a la oclusión de la vena mesentérica craneal sin factores predisponentes, como son, enfermedades hepáticas, homeopatías, traumatismos, anovulatorios etc., que pudieran inducir a la formación de trombos en el territorio esplácnico.

### 1.2.3 Etiopatogenia

En medicina humana, la causa más frecuente de isquemia mesentérica aguda (IMA), es la embolia.<sup>14</sup> En más del 90 % de los casos, el corazón izquierdo es el lugar de origen del émbolo.<sup>15, 16, 17</sup> Los pacientes en fibrilación auricular, ya sea por valvulopatía mitral, ó secundaria a cardiopatía isquémica, experimentan un estasis sanguíneo en la

aurícula izquierda que condiciona la formación de trombos.<sup>18</sup> También están expuestos los pacientes con daño endocárdico ventricular por infarto agudo de miocardio (IAM),<sup>19</sup> o zonas aneurismáticas, así como los portadores de prótesis cardíacas.<sup>20</sup> Fragmentos desprendidos de endocarditis verrugosa y tumorales de origen cardíaco, son también causas de embolismo.<sup>21, 19, 22</sup> Con mayor rareza, la trombosis venosa profunda (TVP) de miembros inferiores (MMII), puede embolizar el sistema arterial mesentérico a través de comunicaciones entre las cámaras cardíacas, originando una forma de embolia paradójica.<sup>18</sup>

La segunda gran causa de isquemia mesentérica aguda (IMA), es la trombosis.<sup>17</sup> Los pacientes portadores de estenosis arteriales significativas, o aneurismas, pueden experimentar fenómenos de trombosis locales, con la consiguiente obliteración de la luz del vaso.<sup>23</sup> La causa más frecuente de trombosis mesentérica es la arteriosclerosis, que suele afectar a los dos primeros centímetros de la AMC.<sup>24</sup>

La tercera causa, mucho menos frecuente de IMA, son los traumatismos.<sup>25</sup> La causa yatrogénica, ya sea quirúrgica o debida a exploraciones es excepcional. Contusiones abdominales graves por accidentes de tráfico, o laborales, pueden provocar arrancamientos ó compresiones locales por hematomas de los vasos mesentéricos.<sup>22</sup>

La IMA no oclusiva es producida en pacientes con bajo gasto cardíaco.<sup>26</sup> Los pacientes en estado de shock reaccionan con arterioespalmo del territorio esplácnico y apertura de shunts arteriovenosos precapilares, en un intento de mantener la perfusión de los órganos vitales.<sup>18</sup> Éste espasmo conduce a una isquemia del territorio intestinal con obstrucción orgánica demostrable.<sup>17</sup>

Ciertos productos, como ergotamínicos, vasopresina etc., pueden provocar arterioespalmo en el territorio de la AMC y condicionar el cuadro clínico de isquemia mesentérica aguda, sin mediación de bajo gasto cardíaco.<sup>27</sup>

En medicina veterinaria, la isquemia intestinal, es la principal causa de mortalidad en animales.<sup>1</sup> Son frecuentes las obstrucciones parciales o totales, producidas en los équidos como consecuencia de parasitaciones intestinales. Mas del 90 % de los caballos tienen lesiones inflamatorias en esta área aun cuando el control de helmintos parezca ser el adecuado.<sup>28</sup> El infarto suele deberse a trombosis de los vasos mesentéricos por migración de larvas de *Strongilus vulgaris* hasta la pared de la AMC. El trastorno es de difícil diagnóstico sin laparotomía y el índice de mortalidad es muy elevado.<sup>29</sup> En el ganado vacuno esta afección es rara, aunque ha sido descrita.<sup>30</sup>

En vacunos, en ocasiones se producen situaciones isquémicas como consecuencia de la ingestión de agentes vasoactivos, como ergotamina a partir de piensos infectados por hongos.<sup>31</sup>

La isquemia intestinal se produce con frecuencia por torsión mesentérica de distintas porciones del intestino delgado. La torsión del ciego o del colon mayor puede producirse por movimientos de rotación en el caballo, por ejemplo durante ataques de cólico de diferente etiología. Este proceso cursa con cifras de mortalidad de hasta el 70 % de los animales afectados.<sup>32, 33</sup> Durante la torsión, la obstrucción de la luz del colon y la oclusión vascular ocasionan necrosis de la mucosa y trombosis vascular derivada de los efectos combinados de la compresión transmural y de una isquemia normotérmica por interrupción del flujo sanguíneo.<sup>34</sup> La reperusión del colon puede producir lesiones aún mayores, conduciendo a un fallo multisistémico, debido a varios mecanismos, incluyendo aquellos mediados por factores inflamatorios y de la coagulación.<sup>35</sup> La gestación y el parto aumentan esta predisposición. La torsión del colon menor es mas rara debido probablemente a la pequeña longitud de su mesenterio.

En los pequeños animales, sobre todo perros y gatos, también es frecuente la

isquemia intestinal por torsión del intestino delgado o grueso.

### 1.2.4 Fisiopatología

La circulación sanguínea inadecuada o interrumpida hacia el intestino, es un problema común. La obstrucción de los vasos eferentes, el bloqueo de los aferentes así como un flujo reducido a través de una circulación abierta producen daño hipóxico al intestino.

Aunque existen diferentes causas de oclusión aguda de la circulación mesentérica, todas ellas conducen por la misma vía fisiopatológica, al infarto intestinal irreversible. Según Carbonell *et al*, una de las características más importantes de la isquemia intestinal aguda, es la repercusión generalizada de éste proceso en el resto del organismo.<sup>36</sup> La reacción inicial del intestino ante la isquemia es el espasmo, con arterias vacías y apulsátiles. Después de tres ó cuatro horas, el tono muscular desaparece y el intestino se vuelve cianótico, distendido y edematoso. Durante las horas siguientes se incrementa el edema y aparecen áreas de decoloración, siendo más frecuentes en la región ileocecal, que es la parte más distal en el origen embriológico, para el aporte sanguíneo, bien directamente por la AMC, ó colateralmente por el tronco común y arteria mesentérica caudal.<sup>37</sup>

El intestino se infarta progresivamente, apareciendo áreas verdosas o incluso negras de auténtica gangrena, siendo la perforación infrecuente. La destrucción del intestino es segmentaria, porque el flujo sanguíneo residual depende de diversos factores locales, como son: mecánicos, bioquímicos, hormonales y del contenido bacteriológico en sus diferentes asas.<sup>38, 39</sup> Dos hechos terminales aparecen constantemente en la isquemia intestinal aguda (IIA) por un lado, una moderada cantidad de líquido peritoneal turbio de olor nauseabundo y la presencia de burbujas de gas en el sistema venoso mesentérico posiblemente derivado de la actividad bacteriana en la pared intestinal.<sup>40</sup>

En la pared intestinal, la mucosa es la capa más sensible a los efectos de la isquemia, debido, a que es la capa metabólicamente más activa, a la particular disposición de sus vasos nutricios y a su proximidad a la flora bacteriana de la luz intestinal.<sup>41</sup>

Tras la instauración de una isquemia mesentérica aguda, el cambio más precoz detectado al microscopio óptico (MO) es el despegamiento del epitelio y la formación de un espacio (espacio de Gruenhagen) entre las células glandulares de revestimiento superficial y la membrana basal.<sup>42</sup> Las cúspides de las vellosidades comienzan a denudarse, acumulándose una membrana de epitelio necrótico, fibrina, células inflamatorias y bacterias. Más tarde aparece, el edema con hemorragia de la mucosa, que se extiende progresivamente a la submucosa. Estos cambios causan en la submucosa, la protrusión de las capas más internas del intestino en su luz, produciendo la imagen típica en huella dactilar. Con el tiempo, la mucosa se necrosa, úlceras y se desprende, extendiéndose la lesión isquémica a las capas más externas de la pared intestinal.

Al microscopio electrónico (ME), ocurren cambios sutiles en las células mucosas a los diez minutos de instaurada la isquemia.<sup>43</sup> A los treinta minutos son evidentes las alteraciones a nivel del retículo endoplásmico (RE) liso y rugoso, presentándose más tarde la afectación mitocondrial. Cuando llegan a romperse las membranas de los lisosomas, se liberan enzimas autolíticas, que al lesionar las células vecinas, inician un círculo vicioso de destrucción intestinal continua.<sup>42</sup>

La leucocitosis es un hallazgo precoz y el aumento de la hemoglobinemia y hematocrito es un reflejo de la hemoconcentración producida por la pérdida de plasma hacia la luz intestinal.<sup>44</sup> La caída de volemia efectiva provoca una importante

vasoconstricción periférica con severa hipoperfusión sistémica, que condiciona la aparición de una profunda y difícilmente corregible acidosis metabólica.

En la IMA la hipoamilasemia es un hallazgo precoz. Tardíamente, en el curso de un infarto mesentérico, los niveles de LDH, GOT, GPT y CPK están elevadas.<sup>45</sup>

1.2.5 Clasificación

En términos generales, las isquemias pueden clasificarse por su etiología del siguiente modo:

ISQUEMIAS OCLUSIVAS <i>EMBOLIGENAS</i>			
CARDIACAS:	ATEROEMBOLISMO	PARADOJICAS	YATROGENICAS
Fibrilación auricular (trombos auriculares).	Aterosclerosis	Desde la circulación sistémica a través de shunts derecha - izquierda.	Catéteres, guías, aire.
Infarto de miocardio (trombos murales).	Aneurismas		
Aneurismas ventriculares (trombos murales).			
Válvulas artificiales.			
Endocarditis.			
Tumores (mixomas, fibrosarcomas).			

ISQUEMIAS OCLUSIVAS <i>TROMBOGENAS</i>		
Aterosclerosis	Aneurismas	Arteritis

ISQUEMIAS OCLUSIVAS <i>TRAUMATICAS</i>	
YATROGENICAS	NO YATROGENICAS
Procedimientos diagnósticos invasivos y técnicas quirúrgicas	Directas: secciones, contusiones
Indirectas: compresión por hematomas	

ISQUEMIAS NO OCLUSIVAS: <i>SHOCK</i>		
CARDIOGÉNICO	SÉPTICO	HIPOVOLEMICO
Fallo cardíaco congestivo		Hemorrágico
Infarto agudo de miocardio		Quemaduras, vómitos y/o diarreas profusas
Arritmias graves		Pancreatitis necrohemorrágica

ISQUEMIAS NO OCLUSIVAS: <i>DROGAS</i>				
Ergotamínicos	Digoxina	Progestágenos	Vasopresina	Catecolaminas

### 1.2.6 Tratamiento

La insuficiencia mesentérica aguda acarrea una isquemia intestinal que termina por producir necrosis intestinal con perforación, peritonitis y muerte. Este cuadro, generalmente producido por la obstrucción de la AMC, fue inicialmente reconocido por Tiedeman en 1843 y tratado quirúrgicamente con éxito por primera vez, por Elliot en 1895.

En 1957 Shaw practicó la primera embolectomía de la AMC con éxito, sin necesidad de resección intestinal.

La mortalidad de la isquemia es elevada si no es intervenida, variando desde el 95% en pacientes con trombosis arterial, al 50% de pacientes con oclusión arterial embólica, 67% en pacientes con isquemia mesentérica no oclusiva y 30% en la trombosis venosa mesentérica.<sup>46</sup>

El único tratamiento actualmente favorable de la isquemia intestinal aguda IIA es el quirúrgico. Sin embargo el éxito de este tratamiento dependerá directamente de la prontitud del diagnóstico, con el fin de poder practicar una revascularización mesentérica, antes de que se produzcan lesiones intestinales irreversibles. Si la obstrucción es producida por una embolia, el tratamiento quirúrgico consistirá en una embolectomía (con catéter de Fogarty) de la AMC. Si por el contrario la oclusión, es una trombosis aguda, no podrá ser tratada simplemente con trombectomía, sino que es necesario una revascularización mesentérica, mediante endarterectomía de la arteria mesentérica craneal ó colocación de un injerto de vena ó protésico.

Una vez restablecido el flujo mesentérico, debe observarse meticulosamente el intestino, tras 10 ó 15 min de espera y comprobar si reaparece la coloración y pulso en las arcadas intestinales; el segmento intestinal con apariencia de necrosis, debe researse y restablecerse la continuidad por anastomosis término terminal del mismo.

Si se observan segmentos dudosos de intestino, es recomendable su resección y practicar una segunda laparotomía, "*second look operation*", al cabo de 24 horas, momento en el cual habrá que resear cualquier segmento intestinal que no esté totalmente recuperado, con el fin de evitar su necrosis y perforación.

La IIA no oclusiva es un cuadro de isquemia mesentérica aguda, pero que no tiene lesiones arteriales orgánicas que lo justifiquen. La isquemia intestinal en éste caso, está provocada por una vasoconstricción esplácnica generalizada, que imposibilita el adecuado aporte de oxígeno a la pared intestinal y termina por producir infarto y perforación intestinal. La causa más frecuente es el estado de shock causado por un bajo gasto cardíaco, sepsis etc. así como, por la intoxicación de determinados fármacos, como los digitálicos.<sup>25, 27</sup> El tratamiento de éstas isquemias mesentéricas no oclusivas es médico y consiste en corregir la causa que lo produce o suspender el fármaco causante de la intoxicación.

### 1.3 La isquemia mesentérica en la experimentación animal: modelos animales

#### 1.3.1 Modelos experimentales en conejos

En 1958 **Shapiro et al** utilizaron un modelo experimental de isquemia mesentérica en conejos, para valorar la repercusión que podría tener el déficit circulatorio intestinal sobre todo el sistema circulatorio<sup>47</sup> en conejos Nueva Zelanda, a los que bajo anestesia general y a través de una laparotomía media, pasaban un hilo de seda bajo la AMC, introduciéndolo después en un tubo rígido de plástico con suficiente longitud para poder ser enterrados en el tejido subcutáneo. El hilo quedaba suelto para, bajo anestesia local,

provocar una isquemia intestinal aguda anudando los extremos de la seda, retirando después el hilo y el tubo de plástico, sin necesidad de reabrir la cavidad abdominal.

Formaron cuatro series, tres de las cuales sufrieron isquemia aguda de la AMC durante 1 hora y en la cuarta serie se provocó la isquemia durante tiempo indefinido sin ningún tipo de tratamiento, observándose el tiempo de supervivencia. En dos de las tres series sometidas a una hora de isquemia, los conejos fueron tratados con dibenamíne (20 mg/kg) y antibióticos (neomicina 100 mg y bacitracina 10.000 U). La tercera no fue tratada.

En la serie sometida a una 1 hora de isquemia aguda, el 89 % de los animales murieron entre los 40 min y las 7 horas de la reperusión de la AMC.

En el examen postmortem, el intestino presentaba hemorragias localizadas y difusas intramurales y segmentos intestinales de coloración violácea difusa. También había edema en el íleon terminal. No se observó líquido hemorrágico en la luz intestinal, ni líquido peritoneal ni reacción inflamatoria en el peritoneo. Los cultivos en sangre y peritoneo fueron negativos.

Los animales, sometidos a una isquemia aguda permanente, se mantenían en buenas condiciones clínicas durante las seis primeras horas, pero después desarrollaban una severa hipotensión que les conducía en poco tiempo a la muerte.

En la serie tratada con antibióticos previamente a la isquemia intestinal, sobrevivieron el 76 %. Los restantes, aunque murieron, tuvieron una supervivencia más prolongada, que los de la serie no tratada. Sus hallazgos macroscópicos fueron idénticos a los encontrados en los animales no tratados después de 1 hora de isquemia.

Los conejos tras la isquemia intestinal desarrollaban un shock severo, del cual los animales supervivientes se recuperaban, hacia la sexta hora de la intervención, encontrándose bien desde el punto de vista clínico al día siguiente.

De forma adicional, se formó una nueva serie con nueve conejos, tratados previamente a 1 hora de isquemia de la AMC con antibióticos (neomicina y bacitracina), sacrificándolos a las 4 horas de repermeabilizar dicha arteria, encontrando, en dos de ellos hemorragia intramural intestinal, en otros tres, hemorragias puntiformes intestinales y en los últimos cuatro conejos, no se evidenciaron cambios macroscópicos.

En la última serie, 20 conejos fueron sometidos a IIA previamente tratados con dibenamíne, falleciendo solamente 5 animales (25 %) y alcanzando una supervivencia de un 75 % (15 conejos). De los animales fallecidos, tres presentaron nistagmus, ataxia y convulsiones, por lo que es posible que murieran por los efectos tóxicos del dibenamíne.

En 1973, **Caridis**, trabajó en otro modelo en conejos,<sup>39</sup> para estudiar la mortalidad y supervivencia de dichos animales, después de ser sometidos a una isquemia intestinal por clampaje de la AMC durante 1 hora, tratándolos con un lavado peritoneal intermitente. Para ello, emplearon conejos Nueva Zelanda, machos de 2 a 3 Kg, anestesiados con pentobarbital. Previa laparotomía media, se ligaba durante 1 hora la AMC y al cerrar la incisión se dejaba un catéter para el lavado peritoneal, con 50 ml de solución isotónica de dextrosa al 1.5 %, a la que se añadía ClK al 0.03 %. La presión sanguínea se midió con un catéter colocado en la arteria femoral. Se tomaron también muestras de sangre de la arteria femoral, antes de la oclusión de la AMC, justo antes de ser desclampada y cada hora durante las 6 horas siguientes en los animales supervivientes, para determinar la concentración de endotoxinas en plasma por la técnica descrita por Reinhold *et al*<sup>48</sup> El volumen plasmático se midió con seroalbúmina humana marcada, antes de provocar la oclusión de la AMC y a las 3 horas siguientes.

Utilizaron 46 conejos, agrupados en cinco series, 6 animales para la serie control y

el resto para las otras cuatro, con 10 conejos cada una. En la serie control, se ligó la AMC durante 1 hora. En la siguiente serie, además de la oclusión de la AMC durante 1 hora, se hicieron dos lavados peritoneales de 15 min de duración, uno, inmediatamente después de pinzar la AMC y otro, inmediatamente después de desclampar la AMC. En la siguiente, además del clampaje de la AMC durante 1 hora, los lavados peritoneales se hicieron cada 20 min, durante las 7 horas siguientes al mismo. En la siguiente, se hizo lo mismo que en la serie precedente reponiendo además el déficit plasmático, a las 3 horas de la oclusión de la AMC, para mantener la volemia normal. En la última serie, se hizo lo mismo que en la anterior y además se administró a cada uno, 5 gr de kanamicina en 30 ml de agua dentro de la luz del ciego, justo antes de desclampar y a las 4 horas siguientes.

En la serie control, la mortalidad fue del 100 %, entre las 2 y 3 horas del desclampaje de la AMC.

En la serie con oclusión de la AMC durante 1 hora y dos lavados peritoneales, se produjo la misma supervivencia y mortalidad que en la serie control. En la siguiente serie donde además de la oclusión de la AMC durante 1 hora se hacían lavados peritoneales cada 20 min, se encontró un aumento significativo de la supervivencia de los conejos, con respecto a las series previamente mencionadas.

En la serie donde se reemplazó el volumen plasmático, a las 3 horas de provocada la isquemia, no se encontró mejoría significativa de la supervivencia, con respecto a la serie anteriormente citada.

En la última serie, se produjo un aumento significativo en la supervivencia de los animales.

**Risueño et al** en 1991, realizan un estudio de los niveles de la actividad enzimática  $\beta$ -n-acetilhexosaminidásica en el intestino isquémico del conejo,<sup>49</sup> empleando para el trabajo 21 conejos de raza Nueva Zelanda, de ambos sexos, con pesos comprendidos entre 1,2 y 4 Kg anestesiados con pentobarbital sódico. Mediante una laparotomía media, resecaron un segmento de intestino delgado no isquémico de todos los animales, para el estudio de microscopía electrónica y la determinación de los niveles enzimáticos de  $\beta$ -n-acetilhexosaminidasa. A continuación, pinzaron la AMC, 1 hora en 4 animales, 2 horas en 6 animales, 3 horas en 6 animales y 4 horas en 5 animales. Al cabo de estos tiempos, extrajeron otro segmento de intestino delgado adyacente, para ser sometido al mismo estudio.

La actividad enzimática de  $\beta$ -n-acetilhexosaminidasa no mostró diferencias significativas en los diferentes tiempos de isquemia con respecto al control (sin isquemia).

A partir de la segunda hora de isquemia, en el estudio electromicroscópico, aparecían los signos de sufrimiento celular del tipo de la apoptosis, que afectaban a las células principales de las vellosidades.

A las 3 horas se incrementaba el número de núcleos de células principales con signos de apoptosis y comenzaban a afectarse algunas células caliciformes.

A la cuarta hora, la afectación de las células caliciformes fue muy manifiesta.

En 1994, **Guijarro**<sup>50</sup> estudió en conejos la isquemia intestinal, valorando las alteraciones morfológicas y funcionales provocadas por la oclusión aguda de la arteria mesentérica superior durante 30 y 60 minutos y la supervivencia y las variaciones del peso corporal durante 11 semanas, así como el efecto terapéutico de la fructosa 1-6 difosfato. Empleó para ello 140 animales de raza Nueva Zelanda, anestesiados con pentobarbital sódico y manteniendo la anestesia con gases. Los animales fueron distribuidos en siete series de 20 ejemplares cada una, la primera para el control de pesos, una segunda sham o

simulada a la que se practicó laparotomía pero no isquemia, la tercera y cuarta respectivamente, fueron sometidas a isquemia de la AMC durante 30 y 60 minutos, la quinta fue otra serie sham sin isquemia a la que se le tomaron muestras para su análisis, igual que a la sexta, con isquemia de 60 minutos y con la séptima, sometida a isquemia durante 60 minutos se realizó el ensayo clínico con fructosa 1-6 difosfato tomándose también muestras para su análisis.

Los animales fueron sometidos a laparotomía media, pinzándose por medio de un clip durante el tiempo necesario para cada serie la AMC.

No hubo diferencias significativas en la mortalidad entre las series isquémicas de 30 y 60 minutos, aunque encontró diferencias significativas en el tiempo medio de supervivencia a favor de la serie de 30 minutos.

La mortalidad durante las primeras 48 horas, osciló entre el 70% para la serie de 30 minutos de isquemia y el 83,3% para la serie de 60 minutos.

La supervivencia obtenida en la serie isquémica de 60 minutos tratada con fructosa 1-6 difosfato, fue significativamente mayor que la de la serie de 60 minutos sin tratamiento, lo cual indica el posible efecto beneficioso de esta substancia. El tiempo medio de supervivencia, también fue mas elevado en los animales tratados.

Los pesos medios, fueron significativamente mas bajos al final del periodo de observación, en los animales no tratados con fructosa 1-6 difosfato, en relación a los animales tratados.

Los resultados analíticos del suero sanguíneo, no ofrecen diferencias significativas entre los animales sometidos a isquemia, con y sin tratamiento y los controles por lo que no parecen de utilidad para el diagnóstico y pronóstico evolutivo de las lesiones isquémicas mesentéricas.

Las lesiones encontradas en los animales fallecidos, de las series isquémicas, consistieron fundamentalmente en denudación del epitelio de revestimiento superficial vellositario y glandular. En todos estos animales, se encontraron lesiones edematosas agudas de pulmón y hemorragias intersticiales y alveolares, lo cual puede considerarse como última causa de muerte

### 1.3.2 Modelos experimentales en perros

En 1963, **Adrian Marston** realizó un trabajo experimental en perros para conocer los cambios producidos en el volumen sanguíneo, después de provocar una isquemia aguda de la AMC, así como las alteraciones macroscópicas y microscópicas en la pared intestinal.<sup>51</sup> Utilizó 26 perros, con pesos comprendidos entre 11 y 19 kg, anestesiados con nembutal y midiendo la temperatura con una sonda intraesofágica. La isquemia aguda mesentérica fue provocada colocando un torniquete en el nacimiento de la AMC después de una laparotomía xifopubiana. El volumen sanguíneo se midió con albúmina marcada con I<sup>131</sup> al principio del experimento y una vez provocada la isquemia mesentérica, se volvió a medir en unos animales a intervalos horarios y en otros al principio y final del experimento. La presión sanguínea se valoró con una cánula intraórtica colocada a través de la arteria femoral mientras las muestras sanguíneas fueron tomadas por otra cánula insertada en la vena femoral. La presión portal se midió con una fina cánula colocada en la vena esplénica. En éste trabajo se formaron dos grupos de animales, 6 en el grupo control y 20 en el problema, ocluyendo en éstos últimos la AMC.

Inmediatamente de provocar la isquemia mesentérica, se observó palidez y vaciamiento arterial a lo largo del territorio intestinal. Al cabo de 3-4 horas, el intestino se puso cianótico y perdió su tono. A las 5-6 horas apareció edema y hemorragia intestinal,



con heces sanguinolentas. Después de 8-9 horas, el edema era más marcado y los trastornos en la coloración manifiestos, sobre todo en la región ileocecal. En ningún caso se observó perforación de pared intestinal, aunque sí apareció una pequeña cantidad de líquido peritoneal con aspecto turbio.

Todos los animales murieron entre las 8 y 16 horas de isquemia mesentérica. La presión arterial sufrió un progresivo descenso después de las primeras cuatro horas. La presión portal permaneció estable durante todo el tiempo de observación. Las variaciones del volumen sanguíneo fueron significativas, produciéndose una reducción media en el mismo del 35-40 %, según el tiempo transcurrido desde la ligadura de la AMC hasta la muerte del animal, mientras que el hematocrito experimentó a su vez un significativo incremento.

Histológicamente, la destrucción de la pared intestinal era evidente tras ligar durante 1 hora la AMC. Las vellosidades de la mucosa empezaron a desprenderse también en este momento, formando un conjunto de material necrótico y bacteriano. Un poco más tarde el edema y la hemorragia eran evidentes. También fue notorio, que mientras las arterias estaban vacías de sangre, las venas aparecían bastante dilatadas, sobre todo al final del período de observación isquémico.

En el grupo control no se produjeron estos síntomas, falleciendo uno de los animales con sintomatología respiratoria.

**Kobold et al** publicaron en 1963 un trabajo, en el que cuantificaron e identificaron distintas sustancias vasoactivas liberadas durante diferentes tipos de isquemia intestinal, experimental y clínica,<sup>52</sup> usando tres modelos para provocar respectivamente la oclusión venosa, arterial y mixta.

La oclusión venosa se produjo en diez perros en un segmento yeyunal de 20 pulgadas, al cual se le ligaron sus extremos, aislando y pinzando de forma indefinida las venas de dicho segmento y desclampándolas al cabo de una hora en otros diez animales.

La oclusión arterial de la AMC se realizó por un artilugio que se mantenía indefinidamente en unos casos y en otros se soltaba a las cuatro horas de ser provocada la isquemia mesentérica.

La oclusión mixta se provocaba por la oclusión simultánea de la arteria y vena mesentéricas superiores, de forma indefinida en unos casos y durante cuatro horas en otros.

Se comprobó que la oclusión vascular de un segmento yeyunal provocaba la liberación de sustancias vasoactivas, histamina, serotonina, catecolaminas y polipéptidos vasoactivos y la caída de la presión sanguínea.

No se estudió el modelo de oclusión venosa, con repermeabilización, porque se comprobó que los resultados eran muy parecidos a los encontrados con la oclusión venosa indefinida, produciéndose una trombosis secundaria después de una hora de isquemia venosa, que la convertía en indefinida en todos los casos.

Para estudiar si la hipotensión producida era debida a la liberación de sustancias vasoactivas, o a la pérdida de líquidos o sangre como consecuencia de la isquemia vascular mesentérica, se utilizaron 5 animales, a los que se provocó isquemia de la AMC durante 4 horas, al cabo de cuyo tiempo se repermeabilizó la misma, comprobándose una brusca caída de la tensión arterial, no acompañada de una elevación de sustancias vasoactivas en principio, aunque en cambio sí aumentaron significativamente al final de la experiencia (8 horas).

Para estudiar la relación entre las sustancias vasoactivas y la resección de segmentos intestinales estrangulados, se tomaron 5 animales, a los que se provocó una isquemia venosa durante 3 horas del segmento intestinal correspondiente. Al cabo de dicho

tiempo, se procedió a la resección de dicho segmento intestinal estrangulado, provocándose una hipotensión moderada y a un lavado de la cavidad peritoneal con 500 ml de suero salino. En los resultados los autores comprobaron, que todos los animales sobrevivieron no precisando apoyo fluidoterápico y que se producía una caída en los niveles de sustancias vasoactivas, después de la resección intestinal. Este dato hace pensar, que el origen de las sustancias vasoactivas ó de otros agentes tóxicos, estaría en el intestino, las cuales serían causantes, al menos en parte, de la hipotensión arterial.

En 1970 **Chiu et al** realizan una serie de experimentos para valorar las alteraciones morfológicas, hemodinámicas y metabólicas que ocurrían en el intestino cuando era sometido a situaciones de isquemia intestinal.<sup>42</sup> Formaron tres series de animales, utilizando para ello perros Mongrel, con un peso comprendido entre 15 y 20 kg.

En una serie, utilizando 30 animales, se provocó isquemia intestinal aguda, colocando un clamp vascular en el origen de la AMC durante 60 min. En otra serie, en la que se utilizaron sólo 6 animales, se instauró una isquemia intestinal regional mesentérica por la reducción del flujo en la AMC a 5 ml/kg/min a través de un by-pass colocado entre la arteria femoral y la AMC. En la última serie, también se usaron 6 animales y por medio del mismo puente femoral - a. mesentérica, el flujo se redujo 15 ml/kg/min.

Las lesiones encontradas en la mucosa intestinal se clasificaron en los siguientes grados:

*Grado 0.* Mucosa intestinal normal.

*Grado 1.* Desarrollo de un espacio subepitelial, denominado de Gruenhagen, que frecuentemente se localiza en la parte alta de las vellosidades. A veces puede haber congestión vascular.

*Grado 2.* Extensión del espacio subepitelial, que se acompaña de una moderada elevación de la capa epitelial desde la lámina propia.

*Grado 3.* Separación del epitelio de revestimiento superficial vellositario. Algunos puntos de las vellosidades están denudados de epitelio.

*Grado 4.* Vellosidades denudadas con presencia de la lámina propia y capilares dilatados. Puede observarse aumento de la celularidad en la lámina propia.

*Grado 5.* Digestión y desintegración de la lámina propia. Presencia de hemorragia y ulceración.

Consideran estos autores el espacio de Gruenhagen como la lesión más precoz de la mucosa intestinal observada en el microscopio óptico, cuando se provoca una IIA, siendo su ubicación a nivel subepitelial, cerca del apex o punta de la vellosidad. Es posible que el líquido acumulado en el este espacio proceda de los capilares, los cuales a veces, están distendidos y posiblemente la anoxia provocada por la isquemia, provoque un aumento de su permeabilidad.

Las lesiones intestinales que se produjeron en las tres series de animales, eran similares, observando que el momento de instaurarse el daño de la mucosa, estaba en función del flujo sanguíneo intestinal. Estos hallazgos, han sido confirmados en estudios realizados en gatos, ratas y humanos, que habían sufrido situaciones de bajo flujo intestinal.

También estudiaron la relación entre la lesión morfológica de la mucosa intestinal y su función de barrera comprobando que tras la administración de d-tubocuramina en la luz intestinal, el curare no cruza la barrera de la mucosa intestinal en el intestino normal, produciéndose por el contrario en situaciones de isquemia intestinal la muerte del animal por parálisis respiratoria poniendo de manifiesto, que la desintegración de la mucosa

intestinal, permite el paso del curare a través de dicha barrera intestinal.

La evolución del epitelio intestinal desintegrado fue otro de los problemas tratados en éste trabajo, para lo cual se continuó el estudio biopsico de la mucosa intestinal que había sufrido isquemia durante 30 min, comprobando que las células perdían citoplasma de su porción basal, mostrándose delgadas e irregulares, siendo progresivamente sustituidas por otras células que emigraban desde las criptas durante los dos o tres días siguientes a la isquemia.

En 1970, **Brown et al** estudiaron con microscopía electrónica las lesiones de la mucosa ileal en los estados de shock y de bajo flujo, para poder tener un mejor conocimiento de la secuencia lesional durante la oclusión de la AMC.<sup>43</sup> Emplearon 7 perros machos, anestesiados con nembutal, a los que, a través de una laparotomía media, se clampó la AMC durante 30 min. Las biopsias intestinales del íleon fueron obtenidas por una incisión, a lo largo del borde antimesentérico del íleon, previo a la isquemia y a los 3, 5, 10 y 30 minutos de clampaje de la AMC.

A los 3 min de isquemia mesentérica, no se observaron cambios por microscopía óptica (MO) ni electrónica (ME). A los 5 min, el aspecto de las biopsias al MO era normal, en cambio al ME aparecieron cambios en la célula localizados en la región infranuclear, observándose abolladuras y una palidez más intensa que en la zona supranuclear. Las mitocondrias tenían forma ovalada y los espacios intercelulares próximos a la membrana basal tenían un grosor más acentuado y eran más prominentes. A los 10 min, la imagen al MO era normal. Al ME se observaron cambios estructurales consistentes en, dilatación del retículo endoplásmico rugoso (RER) en la zona supranuclear, mitocondrias edematosas y con forma ovalada y pérdida de gránulos electrón densos. La membrana nuclear está separada de la periferia del núcleo por un fluido a modo de vacuola. Los espacios intercelulares estaban dilatados con lagunas conteniendo proteínas. Entre las microvellosidades había vesículas de aspecto claro. El aparato de Golgi era normal en la mayoría de las células, aunque podía presentar un daño precoz con fusión de los sacos y pequeñas dilataciones de los mismos. A los 30 min de la oclusión de la AMC, se observó con MO, una acumulación de líquido en el espacio subepitelial, con desprendimiento de células. Al ME, las células del epitelio de revestimiento tienen una apariencia borrosa homogénea. El reborde terminal de las microvellosidades desaparece completamente. Las mitocondrias son redondeadas y aparecen como sombras de sí mismas. El área infranuclear está muy dilatada y abollonada con fractura de membranas celulares, que pueden comunicar citoplasmas entre sí. Se observó así mismo material *protein-like*, dilatando los espacios intercelulares y obliterando las membranas basales. Las células de revestimiento superficial cilíndricas separadas por el líquido proteínico mencionado, se desprendían de la membrana basal dejando un espacio que al MO es el espacio de Gruenhagen. Entre las microvellosidades aparecían muchas microvesículas. El aparato de Golgi estaba tan distorsionado, que apenas era reconocible, aunque los lisosomas permanecían intactos. La mucosa entérica está obviamente disminuida. La doble lámina de la membrana basal no era discernible, estando dicha membrana basal engrosada y no guardando su contacto habitual con las células, debido a las roturas de las membranas intercelulares.

**Hashimoto et al** en 1971 publicaron un trabajo, con el propósito de valorar la lesión pulmonar producida por productos liberados de la vena mesentérica craneal, después de que la AMC fuese clampada durante 30 min, cuantificando también los cambios metabólicos, hemodinámicos, de plasma sanguíneo y niveles de catecolaminas, antes, durante y después de repermeabilizar la AMC ocluida.<sup>53</sup> Para ello utilizaron 30 perros,

anestesiados con tiopental sódico, 200 - 300 mg/kg vía IV y respiración espontánea, excepto aquellos animales a los cuales les fue abierto el tórax, en los cuales colocaron un tubo endotraqueal. Por medio de una laparotomía xifopubiana, se abordaba la AMC en su origen, provocando la isquemia mesentérica, colocando un clamp durante 30 min, comprobando la ausencia de pulso en las arterias de la pared intestinal, que se recuperaba al retirar el clamp.

Tomaron muestras de sangre arterial y registraron la presión sanguínea sistémica a través de un catéter colocado en la arteria femoral mientras que por un catéter colocado en la aurícula derecha a través de la vena yugular, se tomaron muestras de sangre venosa y se registró la presión venosa central. Los animales fueron divididos en seis series de 5 perros cada una, siendo todos ellos sometidos a IIA por clampaje de la AMC durante 30 min.

En la primera serie, los animales solamente fueron sometidos a isquemia, para ser sacrificados 48 horas después, con el objeto de valorar las lesiones orgánicas. Todos los animales sobrevivieron las primeras 48 h, siendo sacrificados en esa fecha y encontrando en 4 de ellos, ligera enteritis hemorrágica y en el otro una enteritis moderada. En todos se vieron gran número de petequias peritoneales y en dos animales se observó invaginación del intestino delgado.

Los animales de la segunda serie se utilizaron, para medir los cambios hemodinámicos y metabólicos antes de la isquemia y a los 20 min, al primer día, segundo, tercero y cuarto día, de ser provocada la isquemia de la AMC. Un animal murió a las 24 horas y otro a las 72 horas de provocarse la IIA. A los 20 min de la repermeabilización, el gasto cardíaco disminuyó significativamente y la resistencia vascular periférica aumentó significativamente con respecto a las cifras control. La necropsia, mostró ligera enteritis hemorrágica y gran número de petequias en peritoneo y en uno de ellos apareció hemorragia en el músculo ventricular izquierdo.

En la tercera serie, se midieron los niveles de catecolaminas en la arteria femoral, aurícula derecha y vena porta, a los 20 min y a las tres horas de repermeabilizar la AMC, comprobando que la norepinefrina (NE) aumentó significativamente a los 20 min y a las 3 horas de la perfusión intestinal, con respecto a las cifras basales (preisquemia), mientras que la epinefrina (E) no cambió.

En la cuarta serie, los cinco animales se utilizaron para la perfusión pulmonar con sangre procedente de la vena mesentérica craneal (VMC), después de haberse provocado 30 min de isquemia aguda de la AMC. Para ello abrieron el tórax y colocaron un extremo del catéter en la arteria pulmonar derecha inferior y el otro extremo en la VMC, utilizando una bomba (40 ml/min) para inducir la perfusión pulmonar durante 3 horas, justo después de iniciarse la repermeabilización de la AMC. Se apreciaron lesiones pulmonares congestivas, edematosas y trastornos de la capilaridad en 3 de los 5 animales usados, así como edema traqueal en un perro con congestión pulmonar.

En la quinta serie, los 5 animales se sometieron también a una isquemia aguda de la AMC durante 30 min y se determinó la presión sanguínea, la frecuencia cardíaca, el gasto cardíaco y la resistencia periférica, antes de provocarse la isquemia, a los 20 min, 1, 2 y 3 horas de repermeabilizarse la AMC.

La presión sanguínea empezó a disminuir inmediatamente de comenzar la oclusión de la AMC, para alcanzar el 75 % de su valor basal, a las 3 horas de la repermeabilización. La frecuencia cardíaca no varió significativamente durante el tiempo del experimento. El gasto cardíaco decreció al 75 % de su valor basal a los 30 min de la oclusión de la AMC, cayendo hasta un 50 % a las 3 horas de la repermeabilización. La resistencia vascular total periférica comenzó a subir inmediatamente de producirse la isquemia de la AMC, para alcanzar un 162 % de su valor basal, a las 3 horas de la perfusión de la AMC.

En la sexta serie, los animales fueron tratados previamente a la isquemia mesentérica, con fenoxibenzamina, en una solución de 0'5 mg por ml, a una dosis de 2'5 mg/kg de peso. Los cambios hemodinámicos y metabólicos se midieron de la misma manera que en el grupo precedente.

La presión sanguínea, la frecuencia cardíaca, el gasto cardíaco y la resistencia periférica vascular total no sufrieron alteraciones significativas al final del tiempo isquémico, ni en ésta serie, ni en la anterior; sin embargo, a las tres horas de repermeabilizar la AMC, el gasto cardíaco aumentó significativamente ( $p < 0,05$ ) en la serie tratada con fenoxibenzamina con respecto a la serie no tratada.

En 1972, **Chiu, Scott y Gurd**<sup>54</sup> diseñaron un trabajo experimental para poder determinar, si las sustancias tóxicas absorbidas a través de la barrera intestinal lesionada por la isquemia producida en la AMC, era la causa fundamental del colapso circulatorio observado después de repermeabilizar el flujo sanguíneo mesentérico. Utilizaron 28 perros con un peso comprendido entre 10 y 15 kg, anestesiados con pentobarbital sódico (30 mg/kg) e intubados endotraquealmente. Se monitorizaron la presión aórtica a través de un catéter introducido por la arteria femoral y la presión venosa central (PVC), por catéter a través de la vena femoral. También fue medido el gasto cardíaco y registrado el electrocardiograma (ECG). Las autopsias se practicaron, tanto en los animales que fallecieron como en los sacrificados.

Para realizar éste trabajo experimental constituyeron cuatro grupos, el primero de los cuales estaba compuesto por 9 animales, a los que se clampó la AMC durante tres horas. Los parámetros hemodinámicos fueron controlados hasta la muerte del animal o durante doce horas después de revascularizar la AMC. Fue medido el gasto cardíaco y las tomas sanguíneas se hicieron antes de desclampar la AMC y a las cuatro horas de repermeabilizarla. A las 24 y 48 horas de revascularizar el intestino se tomaron muestras diarréicas y nuevamente sanguíneas.

De los nueve perros sólo uno (11 %) sobrevivió más de tres días. La supervivencia media fue de 12 horas.

El segundo grupo estaba formado por 11 perros, a los cuales se les clampó la AMC con un clamp de Satinsky durante tres horas, iniciándose el tratamiento IV con suero salino o Ringer, inmediatamente de retirar el clamp vascular. La sueroterapia fue mantenida de 24 a 48 horas, con el propósito de reemplazar las pérdidas de líquidos y electrolitos y mantener la presión sanguínea y el hematocrito en cifras normales. Los animales no tomaron alimento durante 48 horas.

Siete perros (64 %) de los once utilizados sobrevivieron más de tres días. Al contrario del grupo I, ninguno murió en las primeras 24 horas; un perro murió a las 27 horas del experimento de un edema pulmonar y excesiva hemodilución; otros dos fallecieron entre las 26 y 27 horas del postoperatorio de una bronconeumonía y otro lo hizo a las 36 horas sin causas conocidas debido a los cambios postmortem.

En el Grupo III fueron usados 4 animales, a los cuales se les ligó la AMC en su origen. Después de tres horas de isquemia, se procedió a la infusión de suero Ringer (2.000 ml) durante dos horas, a través de un catéter colocado en la AMC distal a la ligadura. Con ésta técnica, se pretendía arrastrar todas las toxinas del territorio vascular intestinal, que deberían haber sido absorbidas por la mucosa dañada, a la circulación sistémica, a través de la circulación portal. La ligadura de la AMC no fue quitada, hasta el final del experimento, para evitar pérdidas hemáticas intestinales.

En el Grupo IV se utilizaron 4 animales con la misma técnica que la del grupo I. Los perros desarrollaron un colapso circulatorio al cabo de 2-4 horas de revascularizar la AMC.

Entre las 6 y 8 horas después de soltar el clamp vascular y una vez transcurridas aproximadamente 4 horas de hipotensión, se inició el tratamiento con sueroterapia (suero salino o Ringer) en cantidad suficiente, registrándose las alteraciones hemodinámicas de los animales.

En este grupo, se comprobó un efecto beneficioso de la fluidoterapia que fue sólo transitorio, ya que todos los animales murieron por shock irreversible, a las pocas horas del postoperatorio.

La mucosa intestinal mostró al cabo de las tres horas de isquemia, una mucosa hemorrágica y necrótica. La recuperación de las células epiteliales de la mucosa, se observó al microscopio óptico entre las 48 y 72 horas. Si el animal estaba deshidratado y continuaba teniendo diarreas, el proceso de regeneración de la mucosa intestinal sufría un retroceso. Las biopsias tomadas de los animales del grupo III al final de las 12 horas de acabado el experimento, mostraron intestinos delgados necróticos, mucho más dañados que los observados en los restantes animales de los otros grupos.

**Mahonar y Tyagy** en 1973 con objeto de estudiar el colapso circulatorio provocado por la liberación de la AMC después de ser clampada.<sup>55</sup> Diseñan un modelo en perros de 25-35 Kg., anestesiados con tiopental sódico, a los que por laparotomía media se provocó una isquemia intestinal aguda ligando la AMC en su origen. Formaron siete grupos con dos horas de isquemia y dos grupos más con 1 hora 30 min. Extrajeron muestras sanguíneas al cabo de 1, 2, 4 y 6 horas de desclampar la arteria, para conocer los siguientes parámetros: hematocrito, ácido láctico, ácido úrico, fosfatasa ácida y ribonucleasa. Consideraron animales supervivientes, aquellos que vivían más de 48 horas y fueron sometidos a necropsia entre el tercer y veintidós días de la operación, para valorar las lesiones extraintestinales.

En un grupo control estudiaron 11 perros, ligando la AMC durante 2 horas, sin ningún tipo de tratamiento. La mortalidad fue del 100 % y el rango de supervivencia estaba comprendido entre 7 y 8 horas.

A otro grupo se le sometió a la misma isquemia pero ligando el conducto pancreático 5-6 días antes. La mortalidad fue del 100 %, con un rango de supervivencia comprendido entre 4 horas y 6 horas 30 min

Otro grupo de 2 horas de isquemia, fue tratado con antibióticos (neomicina, bacitracina y estreptomina) y sulfamidas cuatro días antes de la IIA. La mortalidad fue del 100 % y el rango de supervivencia llegó a las 12 horas. Otro grupo tratado con hidrocortisona previamente a la IIA, tuvieron una mortalidad y supervivencia semejantes.

Otro de 2 horas fue tratado con dextrano y dextrosa al 5 % inmediatamente antes de desclampar la AMC. De los 6 perros utilizados, 4 sobrevivieron 30 horas y el resto indefinidamente.

El grupo de 2 horas de IIA, tratado previamente con hidrocortisona y sueroterapia inmediatamente después del desclampaje, al igual que otro tratado con epinefrina previamente a la IIA, tuvo una supervivencia del 100 %.

Un grupo isquémico de 1 hora 30 min sin ningún tipo de tratamiento, tuvo una supervivencia de 6 animales, sobreviviendo el resto entre 36 y 40 horas.

Un grupo sometido a 1 hora y 30 min de IIA, con ligadura de conducto pancreático, 5-6 días antes tuvo una mortalidad del 100 % y un rango de supervivencia entre 24 y 36 horas.

Durante la repermeabilización, todos los grupos tuvieron una progresiva hemoconcentración, siendo significativa, en los animales con ligadura del conducto pancreático.

En la necropsia practicada en los perros supervivientes del grupo tratado con epinefrina, previamente a la IIA por oclusión de la AMC durante 2 horas, se encontró un hallazgo característico en todos ellos, que consistió, en una invaginación del ID (intestino delgado) proximalmente a la válvula ileocecal. Este hallazgo no se encontró en la necropsia de ningún otro perro superviviente.

En 1973 Aho *et al* desarrollaron un trabajo experimental basado en la oclusión de la AMC, para estudiar las alteraciones por ME de la mucosa del intestino delgado.<sup>56</sup> Utilizaron seis perros, de 16 a 45 kg anestesiados con pentobarbital, e intubados. Las muestras para el estudio con microscopía óptica y microscopía electrónica fueron tomadas del borde antimesentérico de la mitad del yeyuno. Las biopsias se extrajeron inmediatamente de provocar la isquemia mesentérica, a los 15 y 30 minutos y a las 4 y 5 horas del tiempo postclampaje de la AMC. Previamente, definieron el patrón normal de la mucosa en el intestino delgado: células de la mucosa estrechas y con borde en cepillo regular; mitocondrias con forma redondeada u oval y matriz con escasa densidad; retículo endoplásmico con cisternas de membrana rugosa y lisa; aparato de Golgi bien desarrollado con un número apreciable de dictiosomas; numerosos lisosomas cuerpos electrodensos y vacuolas y vesículas en la parte apical de las células; longitud de las microvellosidades variable, frecuentemente más largas en las células apicales que en las criptas; espacios intracelulares estrechos con los complejos de unión visibles en la parte apical de las células. Además se observaban células con ultraestructura poco definida y RE vacuolizado.

Durante la oclusión de la AMC, por MO, pudo observarse el patrón intestinal dentro de la normalidad, al cabo de una hora de isquemia mesentérica, aunque los nucleolos eran prominentes y con alta densidad. Al cabo de dos horas de oclusión de la AMC, en algunas partes se observó que había desaparecido el borde en cepillo de las células de revestimiento vellositario. Después de tres horas de isquemia mesentérica, el núcleo presentaba aspecto picnótico y la cromatina homogeneizada, desapareciendo el borde en cepillo de las mismas. En las siguientes horas, los cambios se intensificaron.

Por M.E., después de 15 min de isquemia de la AMC, sólo se observaron ligeros cambios ultraestructurales. Los complejos de unión, los espacios intercelulares y las membranas celulares, eran normales tanto en la parte apical de las vellosidades, como en las criptas. Las mitocondrias no se alteraron. Después de 30 min, en algunas células de la parte apical de las vellosidades, las mitocondrias estaban edematosas y la densidad matricial disminuida, aunque, en la mayoría de las células, no se observaron cambios. Generalmente los ribosomas estaban pegados a las membranas. En algunas células la membrana nuclear era irregular. Se observaron linfocitos ocasionales entre las células de la mucosa, así como, en algunas áreas subepiteliales. El borde en cepillo, las membranas celulares y los lisosomas se presentaron normales, al igual que las zonas infranucleares. Durante la ventilación con oxígeno después de 30 min de oclusión de la AMC, no se observó edema infranuclear y los complejos de unión y las mitocondrias eran normales.

Después de una hora de isquemia, el número de células dañadas se incrementó. Las mitocondrias estaban edematosas y las densidades matriciales habían desaparecido. En algunas células se observó dilatación de las cisternas del RE y a veces ribosomas separados de él. El área infranuclear de las células estaba a veces distendida. El número de microvellosidades era reducido, intensificándose ésta circunstancia con los tiempos de isquemia más prolongados. La homogeneización de la cromatina era aparente sólo en las células de revestimiento apical. Los complejos de unión y las membranas celulares aparecían normales. El efecto favorable de la respiración con oxígeno fue claro en ésta fase, consiguiendo una apariencia normal de las mitocondrias y una ausencia de

homogeneización de la cromatina; sin embargo, se apreció dilatación de las cisternas del RE y áreas basales intracelulares edematosas.

Después de 2 horas de oclusión de la AMC, se observaron cambios en las células de la mucosa. En algunas de ellas, el borde en cepillo era irregular, estando en las mayoría de ellas dañado, con las microvellosidades completamente separadas. Los espacios intercelulares aparecían dilatados en la parte apical de las vellosidades, las membranas celulares mostraban disrupción y los complejos de unión distorsionados. El RE estaba también dilatado, formando grandes vacuolas y las mitocondrias edematosas. También se observaron estos cambios en las células de las criptas, aunque menos intensos. El efecto favorable del oxígeno fue observado en las células apicales y de las criptas. Los complejos de unión eran normales. Sólo pequeños cambios se observaron en los orgánulos. En algunas áreas, se vieron dilataciones de los espacios intercelulares cerca de la lámina basal.

Después de tres, cuatro y cinco horas de oclusión, los cambios celulares fueron similares a los descritos para las dos horas, pero de mayor intensidad. Se observó prominente vacuolización intracelular. Las uniones intercelulares se debilitaban y aparecían los espacios de Gruenhagen. Sólo fueron vistas unas pocas mitocondrias normales. La homogeneización de la cromatina era frecuente. Se vieron lisosomas aparentemente normales. El edema intercelular también fue observado en las criptas. El efecto protector del oxígeno fue también demostrado, al encontrar bastantes células conservadas y mitocondrias y RE normales. En algunas zonas, sin embargo, fue observado dilatación del RE, aunque los cambios nucleares fueron asombrosamente escasos. Los espacios intercelulares y las membranas celulares estaban también preservadas en bastantes zonas.

En 1978 **Carbonell et al** publicaron un trabajo, basado en el clampaje temporal de la AMC y su posterior revascularización, para estudiar las variaciones cuantitativas de la flora bacteriana intestinal, durante diversos períodos de isquemia-repermeabilización.<sup>36</sup> Para ello utilizaron 14 perros, de 20 Kg de peso medio, anestesiados con hidrato de cloral y uretano. Tras practicar laparotomía media, se clampó la AMC en la raíz aórtica, sin interrumpir la circulación colateral. Los animales se dividieron en tres series, de 2 horas, de 4 horas y de 6 horas de isquemia, permitiendo después de estas fases la revascularización.

Se tomó contenido intestinal para el estudio bacteriológico por punción directa de un asa, previamente a la oclusión arterial y cada hora, durante el período de isquemia y perfusión

En todas las series hubo un aumento significativo del número de colonias aisladas proporcional al tiempo de isquemia e incrementándose asimismo de forma proporcional durante las primeras horas de revascularización.

Los gérmenes identificados en la luz intestinal fueron: *Pseudomona areuginosa*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter aerogenes* y *Klebsiella spp*.

Al ocluir la AMC el intestino mostró intensa palidez y contractura espástica, desapareciendo el pulso y observándose una ingurgitación venosa junto con un punteado equimótico en el meso. Después de 1 hora de isquemia, cedió la palidez y la contractura, apareciendo bandas hemorrágicas en la mucosa intestinal. A las 2 horas de isquemia, el intestino se tornaba azulado. Al desclampar estos fenómenos regresaron rápidamente. A las 3 horas de isquemia la pared intestinal se volvió cianótica, perdiendo el brillo característico. A las 4 horas, estos fenómenos eran más manifiestos. Al liberar el clamp de la AMC, se observó un enrojecimiento intenso de todo el intestino, recuperación del latido arterial en el meso y conservación de la ingurgitación venosa de dicho meso, durante cierto



tiempo. A las 5 horas de isquemia, la pared intestinal estaba deslustrada, sin brillo, con intensa ingurgitación venosa y acusado punteado hemorrágico. A las 6 horas, el intestino aparecía edematoso, sin observarse recuperación del mismo tras el desclampaje de la AMC; también apareció exudado sanguinolento en la cavidad abdominal, sin observarse perforación intestinal.

En la serie isquémica de 2 horas, la oclusión de la AMC provocó lesiones, que afectaron inicialmente de forma casi exclusiva a las vellosidades y que continuaron progresando al desclampar la AMC. El desprendimiento del epitelio de la vellosidad se observó desde el minuto 15 de la revascularización, manteniéndose la vellosidad desnuda en las biopsias, a los 30, 45, 60 y 90 minutos. A los 120 min de la revascularización aparecía la lesión del corion de la vellosidad, perdiendo las paredes vasculares su integridad, produciéndose liberación del contenido hemático en la luz intestinal. A los 150 min de revascularización, las vellosidades aparecen disminuidas en longitud y aplanadas. La destrucción determinaba la desaparición de la mayor parte del tejido conectivo vascular de la vellosidad. Se conservaban sin embargo glándulas en la lámina propia, con capacidad regenerativa y por lo tanto responsables de la capacidad de regeneración de la mucosa, tras este período de 2 horas de isquemia.

En la serie de 4 horas, las lesiones observadas en la mucosa, afectaban a la totalidad de la mucosa. Los fenómenos hemorrágicos en superficie eran intensos y se manifestaban a partir de los 15 min de la revascularización. Durante los 45 y 60 min, progresaban los fenómenos de lisis, desprendiéndose la totalidad del corion de la vellosidad junto con células epiteliales. A los 90 min se observaba afectación de la zona germinativa de la vellosidad y de la porción más superficial de las glándulas. A los 150 min quedaban tan solo conservados los fondos de saco glandular y una delgada capa de células germinativas, sin afectación de la *muscularis mucosae*. Según lo expuesto es posible una regeneración de la mucosa a partir de los fondos de saco glandulares, aunque no existiera *restitutio ad integrum*.

Las alteraciones ultraestructurales encontradas en la mucosa intestinal fueron las siguientes:

- 2 horas de isquemia: vacuolizaciones citoplasmáticas y desestructuración de las microvellosidades del borde apical. A nivel más profundo, intensa afectación de los enterocitos, con vacuolización citoplasmática, alteración mitocondrial, picnosis nuclear y desorganización del borde apical.
- 4 y 6 horas de isquemia: fue difícil encontrar áreas conservadas y para localizarlas hubo que buscarlas en los fondos glandulares.
- Tras la desobstrucción, arterial, los capilares y arteriolas de la vellosidad aparecen extremadamente dilatados y rellenos de material hemático. A partir de los 15 min los vasos presentan fenómenos de trombosis que se inicia con agregación plaquetaria, seguida de degranulación de las plaquetas y aparición de redes de fibrina.

**Jamieson et al**<sup>50</sup> realizaron en 1979 un trabajo experimental para valorar la importancia que tiene la concentración del fosfato en los fluidos del cuerpo, para el diagnóstico precoz del infarto intestinal en perros mestizos de 20 a 35 kg, anestesiados con Nembutal y pentobarbital sódico. Con los 20 animales utilizados, se formaron tres grupos experimentales, el grupo control que no sufría isquemia mesentérica, otro grupo con necrosis intestinal por ligadura de la AMC y el último con necrosis provocada por ligadura de la VMC. A todos los animales se les perfundió 100 ml por hora de solución IV de Ringer lactato para asegurar una diuresis constante, colocando también una sonda vesical

para recoger la orina. La cateterización venosa y vesical servía, a su vez, para extraer las muestra sanguíneas y urinarias, inmediatamente después de la inducción anestésica y a las dos, cuatro, seis y ocho horas de tiempo quirúrgico, para determinar la creatinina y fosfato inorgánico en sangre y orina.

En la necropsia se comprobó que ocho perros del grupo con ligadura de la AMC y los diez del grupo con ligadura de la VMC, tenían el intestino inviable. Un animal del grupo con ligadura de la AMC, fue excluido del experimento porque el intestino era viable en el momento de la necropsia.

El intestino de los animales con ligadura de la AMC, estaba pálido y manchado con líquido peritoneal sanguinolento. En el grupo con ligadura venosa, el intestino estaba intensamente edematoso y hemorrágico, con una gran cantidad de líquido peritoneal hemorrágico en la cavidad abdominal.

La presión arterial media en los animales del grupo de ligadura de la AMC, disminuyó discretamente durante las ocho horas siguientes a la oclusión arterial; en cambio en los animales con ligadura de la VMC la presión arterial media cayó inmediatamente a la oclusión venosa y continuó disminuyendo paulatinamente en las ocho horas siguientes del experimento.

Los niveles séricos de fosfato aumentaron significativamente ( $p < 0.05$ ), a las dos, cuatro, seis y ocho horas, en los animales con isquemia arterial y venosa, con respecto al grupo control. La concentración de fosfato sérico fue más alta en el grupo con ligadura venosa que con la arterial. Los niveles de fosfato sérico en los dos animales que sufrieron nefrectomía bilateral junto a ligadura de la AMC, variaron con respecto a los animales que soportaron solamente ligadura de la AMC.

La concentración de fosfato urinario de los animales con ligadura arterial y venosa, no mostró cambios significativos con respecto al grupo control. Tampoco hubo variaciones significativas del aclaramiento de fosfato urinario, entre los tres grupos experimentales. En cambio, el aclaramiento de la creatinina cayó significativamente ( $p < 0.05$ ) a las dos, cuatro, seis y ocho horas, en el grupo con ligadura venosa, con respecto a los otros dos grupos.

Los hallazgos renales microscópicos de algunos animales a los que se les hizo una nefrectomía, no fueron significativamente diferentes, al comparar los tres grupos. Uno de los perros adicionales control, mostró depósitos tubulares de cristales de calcio y pielitis. No hubo calcificaciones significativas en los túbulos renales de los animales con ligadura arterial y venosa, a los que se realizó nefrectomía.

En 1980, **Pérez García et al**,<sup>57</sup> publican un estudio experimental en perros, con los cuadros anatomopatológicos que produce la isquemia intestinal, mediante el clampaje de la arteria y vena mesentéricas superiores, así como el proceso de revascularización intestinal y sus repercusiones tanto en el intestino, como en el hígado. Emplearon treinta perros anestesiados con anesital, que fueron sometidos a laparotomía media, tomando biopsias testigo de intestino delgado, grueso, colon e hígado y una disección cuidadosa de los vasos mesentéricos. En la primera serie se hicieron tres grupos de cinco animales; en uno de ellos, se clampó la AMC, en otro la VMC y en otro ambos vasos, manteniendo el clampaje durante 3 horas en cada grupo y tomando nuevas biopsias en lugares similares a los testigos, inmediatamente antes de desclampar y una hora después.

En la segunda serie se procedió del mismo modo, pero con un tiempo de clampaje de siete a nueve horas, tomando muestras para biopsia cada tres.

El clampaje de la AMC originaba una palidez intestinal persistente de sesenta a noventa minutos, para luego adquirir una coloración rojiza, que a partir de las cuatro horas

se transformaba en violácea. Precocemente, aparecía edema de pared, que persistía unas seis horas para después disminuir, al tiempo que el intestino mostraba dilatación y parálisis. También se producía inicialmente un hiperperistaltismo intestinal que se hacía máximo a los treinta minutos, para después ir progresivamente disminuyendo hasta paralizarse pasadas seis horas. El meso aparecía engrosado y pálido en un principio, adquiriendo después un tono rojizo y los vasos se presentaban vacíos y sin latido arterial.

El clampaje venoso, producía en el intestino una coloración azulada, que aumentaba hasta un color negro intenso a las dos horas de la oclusión del vaso. El edema era más intenso que en el clampaje arterial. El peristaltismo se comportaba de forma similar como en el clampaje arterial. El meso aparecía engrosado y cianótico con puntos hemorrágicos y venas turgentes, palpándose el latido arterial.

El clampaje simultáneo de la AMC y VMC, producía en el intestino zonas de coloración azulada, junto a otras zonas pálidas, que iban desapareciendo a medida que aumentaba el tiempo de isquemia, hasta transformarse en un tubo cianótico. El edema era más intenso que en el caso de clampaje arterial, pero menor que en el venoso. El peristaltismo se comportaba de forma similar al clampaje individual de los cualquiera de los vasos mesentéricos. El meso presentaba puntos hemorrágicos, edema, coloración azulada e ingurgitación venosa con ausencia de latido arterial.

En cuanto a la alteraciones microscópicas, el clampaje de la AMC durante tres horas producía pocas alteraciones. En el intestino delgado se producía tumefacción de vellosidades con deplección, plegamiento vascular y dilatación de linfáticos en la lámina propia. En el epitelio intestinal, los enterocitos apicales de las vellosidades mostraban tumefacción citoplasmática con incremento del citoplasma basal y aparición de pequeñas zonas edematosas que parecían separar el epitelio de la lámina propia. No se apreciaron alteraciones en el intestino grueso ni el hígado.

Después de tres horas de isquemia y una hora de revascularización, aparecen lesiones más significativas. En el intestino delgado se puede apreciar hemorragia de la lámina propia y necrosis epitelial en las vellosidades, que va desde la simple erosión hasta la destrucción total del epitelio. Los vasos se vuelven congestivos y en la lámina propia aparecen, edema, hemorragia y exudados de polinucleares neutrófilos. En el intestino grueso las lesiones son escasas, manifestándose únicamente tumefacción edematosa del corion y discreta dilatación de vasos linfáticos.

La oclusión arterial hasta las nueve horas, produce alteraciones histológicas cuya gravedad depende de la duración de la isquemia. A las seis horas, la mucosa del intestino delgado presenta tumefacción edematosa de la lámina propia y necrosis de vellosidades con pérdida superficial de sustancia. A las nueve horas de isquemia, la necrosis de la mucosa es más extensa y profunda, llegando hasta la destrucción total. En el intestino grueso, las lesiones son más tardías, pero después de las primeras seis horas, la necrosis de la mucosa se acelera y al final de las nueve horas se puede observar necrosis superficial de la mucosa.

El clampaje venoso durante tres horas produce en el intestino delgado, diferente grado de edema en el corion con dilatación de capilares, extravasación hemorrágica y necrosis de epitelio vellositario, en grado variable según la duración del clampaje de la VMC. En el intestino grueso, las lesiones hemorrágicas y necrosis son similares a las del intestino delgado. En el hígado se producen fenómenos de tumefacción en las zonas centrolobulillares.

Después de una hora de revascularización, tras tres horas de pinzamiento de la VMC, se producen en el intestino delgado, mayores grados de edema, hemorragia y necrosis epitelial que en el grupo de tres horas de clampaje venoso, llegando la necrosis a

afectar la casi totalidad de la mucosa, encontrándose pletóricos los vasos sanguíneos. En el intestino grueso y el hígado, las lesiones son similares, pero más intensas que cuando se clampa la VMC durante tres horas.

Cuando el pinzamiento de la VMC se prolonga hasta las nueve horas, se producen lesiones necrotizantes en las vellosidades intestinales, congestión vascular y capilar, exudación intersticial y focos de hemorragia, tanto en el corion como en la submucosa. En el intestino grueso, predomina las lesiones congestivas y hemorrágicas, que llegan a afectar incluso a las capas musculares. Las lesiones hepáticas no son diferentes del grupo, donde se clampa la VMC tres horas.

Cuando se provoca pinzamiento simultáneo de la AMC y VMC durante tres horas, se producen en el intestino delgado lesiones de tumefacción, hemorragia y necrosis similares a los grupos anteriores, aunque de menor intensidad, tanto durante el tiempo de isquemia como en la revascularización. El intestino grueso solo presenta discreto edema del corion durante la repermeabilización. El hígado no evidenció alteraciones significativas.

Cuando la oclusión de la AMC y VMC persiste hasta las nueve horas, además de las lesiones isquémicas de la mucosa del intestino delgado, se afectan también la submucosa e incluso las placas de Peyer. En el intestino grueso, las lesiones son más tardías, pero a partir de las seis horas, se acelera la hemorragia intersticial y la necrosis de la mucosa con progresiva lisis epitelial, quedando al final de las nueve horas, sólo algunas criptas glandulares con fenómenos necrobióticos. En el hígado aparece dilatación sinusoidal congestiva.

En 1983, **Sánchez Lozano** estudió el papel que juega la linfa en el síndrome de revascularización intestinal (SRI), tras una isquemia temporal de los vasos mesentéricos,<sup>58</sup> en perros mestizos de peso entre 15 y 30 Kg anestesiados con ketamina. Se canalizaba la vena yugular para realizar las extracciones sanguíneas, medir la presión venosa central (PVC), aporte de sueroterapia y para la transfusión de la linfa obtenida de los animales que habían sido sometidos a isquemia de la AMC.<sup>59</sup> Mediante laparotomía media, pasando una seda de 3/0 alrededor del nacimiento de la AMC, provocaba una isquemia intestinal aguda de 4 horas. Después de localizar la confluencia de la vena mesentérica craneal (VMC) y la vena esplénica, se ligaba la VMC dejando permeable la vena esplénica, la cual se utilizaba para medir la presión venosa portal (PVP).

Hizo 2 series, la primera formada por 35 perros de los que murieron 10 y en los cuales clampó la AMC y la VMC durante 4 horas y canalizó el conducto torácico en el cuello para recoger la linfa que posteriormente se iba a transfundir a los animales de la segunda serie. Inmediatamente después del clampaje de los vasos mesentéricos, el intestino cambió de color. Primero tomaba un tono azulado y después de tres horas de clampaje, negro. El peristaltismo cesaba después de tres horas de clampaje, la pared comenzaba a edematizarse y el exudado peritoneal aumentaba, siendo máximo una hora después de la reperfusión.

En la segunda empleó 10 animales, obteniendo una mortalidad cero. Transfundió la linfa de perros isquémicos a perros sanos a través de la vena yugular. En 3 animales se produjo exudado peritoneal, indicando que dicho exudado no solo se debe a un éstasis venoso, sino a un aumento de la permeabilidad provocada por las sustancias nocivas, que en su mayor parte y durante el período isquémico, son vehiculadas por la linfa.

Al comparar los resultados de las dos series, el autor comprobó una elevación significativa de la presión venosa central en la segunda serie, lo cual podía ser debido a factores tóxicos vehiculados por la linfa o a un aumento del poder oncótico de las proteínas

transfundidas con la linfa al pasar al espacio vascular, según opinión del autor. Los cultivos reiterados de sangre portal y de linfa fueron negativos, lo cual hacía pensar que el factor tóxico no era de origen bacteriano, sino fermentativo por rotura de las membranas lisosómicas. La elevación significativa de la enzima GOT en la segunda serie, iría a favor de la presencia de un factor tóxico vehiculado por la linfa. El autor también encontró alteraciones significativas del fibrinógeno, tiempo de protrombina y de coagulación, lo cual sería imputable a un sufrimiento hepático por factores tóxicos, ya que no existe isquemia de la arteria hepática.

En 1985 **Gómez Jiménez, et al**<sup>60</sup> para conocer la viabilidad de un asa intestinal, que ha sufrido isquemia, idearon un modelo experimental en perros, en los que provocaba períodos de isquemia y repermeabilización en el pedículo vascular del asa correspondiente.

Utilizaron 10 perros anestesiados con pentotal sódico e intubación endotraqueal. Después de la laparotomía media, elegían un segmento yeyunal proximal de unos 15-20 cm de longitud, con un pedículo lo suficientemente largo, para extraerlo fuera de la cavidad abdominal y colocarlo en el tejido celular subcutáneo. Después, tras aislar el segmento yeyunal del resto del tubo digestivo, restablecían la continuidad del mismo mediante anastomosis término-terminal. A continuación se colocaron microbalones y electrodos en la pared intestinal del segmento aislado, procurando que coincidieran en un mismo anillo muscular y a tres niveles diferentes: a 10 cm proximal a la anastomosis, a 10 cm distal a la anastomosis y en el punto medio del segmento aislado. El asa aislada era alojada en un túnel subcutáneo labrado a la izquierda de la incisión laparotómica, abocando sus extremos a la piel y marcando con seda el pedículo vascular para su identificación, con el fin de provocar isquemia.

A los ocho días de la intervención, después de inyectar anestesia a nivel de la cicatriz de la laparotomía, se identificaba el pedículo yeyunal aislado y se aplicaban dos pinzas bulldog a su nivel, para provocar isquemia. La revascularización se conseguía retirando dichas pinzas. Se formaron cinco series de animales, según el tiempo de isquemia, de 2 horas (2 animales), de 4 horas (2 animales), de 6 horas (2 animales), de 8 horas (3 animales) y de isquemia indefinida (1 animal).

En todas las series se estudió la función mecánica y motora de las asas aisladas y la morfología intestinal por microscopía óptica. Al producirse la isquemia se producía una desaparición inmediata y significativa de la función mecánica con respecto a los segmentos no isquémicos. A su vez, los segmentos isquémicos sufrían una disminución significativa de la función motora a partir de los cinco minutos de haber provocado dicha isquemia.

Durante la revascularización del asa aislada se obtuvieron los siguientes resultados: Con dos horas de isquemia, la función motora y mecánica alcanza la normalidad antes de las 48 horas de la revascularización. Con cuatro horas, la recuperación de la función motora y mecánica se produjo entre los días cuarto y séptimo, tras la revascularización. A partir de las 6 horas de isquemia intestinal no se produce una recuperación significativa de la función motora y mecánica después de la repermeabilización.

Los resultados morfológicos de las asas intestinales fueron los siguientes: En la serie I (isquemia 2 horas), apareció aumento del tejido conjuntivo a nivel de las vellosidades y de células caliciformes en la mucosa; la muscular estaba conservada. En la serie II (isquemia 4 horas), se encontró atrofia de la mucosa sin vellosidades y aumento del tejido conjuntivo fibroso; la muscular estaba conservada y había engrosamiento de la submucosa e hiperplasia de los plexos mioentéricos y submucoso. En la serie III (isquemia 6 horas), apareció mayor atrofia de la mucosa, con sustitución por tejido fibroso. A nivel de la muscular hay fibrosis con aparición de macrófagos con hemosiderina y mayor

hiperplasia neuromatosa a nivel de los plexos mioentéricos y submucoso. En la serie IV (isquemia 8 horas), la mucosa aparece completamente atrófica, con depósitos de fibrina, intensa fibrosis de la muscular e hiperplasia neuromatosa en los plexos de Meissner y Auerbach. Finalmente, en la serie V (isquemia indefinida), es evidente la necrosis de coagulación de la mucosa, con infiltrado de polinucleares neutrófilos, trombosis en vasos de la submucosa y fibrosis y necrosis coagulativa en la muscular y los plexos nerviosos intrínsecos.

Con objeto de conocer las repercusiones hepáticas de la isquemia intestinal, **Suso Alea et al** realizaron en 1988, un trabajo experimental con 25 perros anestesiados con pentotal sódico,<sup>61</sup> a los que se les inducía una isquemia intestinal por ligadura de la AMC con seda del nº 0, cerca de su nacimiento. Al final de la isquemia se tomaron muestras sanguíneas por punción de la vena cava. Se formaron 3 series, la primera de control con 9 animales a los que se aplicó todo el protocolo excepto la isquemia de la AMC. En la segunda serie se realizó una ligadura de la arteria hepática en 6 animales durante 3 horas y en la tercera, también de seis animales, se ligó la AMC durante 3 horas.

A la 3 horas de isquemia intestinal, hubo una elevación significativa de AST y ALT respecto a los valores basales. No hubo variaciones significativas en los niveles de fosfatasa alcalina (FA) entre la serie control y la serie con ligadura de la arteria hepática, pero se produjo un descenso significativo en los niveles de FA en los animales a los que se les clampó la AMC respecto a los valores basales.

No se detectó variación significativa de los niveles de GGT en ninguna de las tres series respecto a los valores basales y por el contrario, se encontró un aumento significativo de las cifras de glucemia en todos los grupos.

**Smirniotis, Labrou y Tsiftses**, publicaron en 1989 un modelo experimental, diseñado para conocer los cambios plasmáticos de la isoenzima CPK-BB y determinar su utilidad como marcador enzimático en el diagnóstico del infarto intestinal.<sup>62</sup> Utilizaron 12 perros anestesiados pentotal sódico. Se colocó un catéter en la vena cava craneal (VCC) a través de la vena yugular, para la extracción de muestras de sangre cada tres horas, tomando la primera muestra antes del inicio de la experiencia quirúrgica. Por medio de una laparotomía media supraumbilical se abordó la cavidad abdominal, para aislar un segmento de yeyuno de 50-60 cm de longitud, al cual se fue ocluido mediante dos clips no reabsorbibles.

Se realizaron dos series, la primera con 6 animales a los que se ocluyó el segmento intestinal aislado, durante 24 horas, pero no se provocó isquemia. En otra serie, con el mismo número de animales, se ocluyó el segmento intestinal y se interrumpió el flujo arterial de dicho segmento, mediante ligadura selectiva de las ramas aferentes al mismo durante 24 horas. Todos los animales se reexploraron al cabo de 24 horas para la valoración de la isquemia intestinal una vez finalizada la experiencia.

Los niveles plasmáticos de la isoenzima CPK-BB no mostraron variaciones significativas en los animales con oclusión del asa yeyunal, con respecto a los valores control previos a dicha oclusión.

En los animales a los que se provocó una isquemia regional intestinal, las cifras plasmáticas de la isoenzima CPK-BB, mostraron cifras elevadas y significativas a las 6 y 9 horas de dicha isquemia, con respecto a la serie no isquémica. A las 12 horas la isoenzima todavía estaba significativamente alta. A partir de la hora 15 no había diferencias entre las dos series.

**Hernández Antequera et al** en 1990, provocan una isquemia intestinal aguda en perros, para estudiar el efecto que la dopamina y el glucagón producían, al introducirlos en la luz del segmento intestinal isquémico.<sup>63</sup> Utilizaron 15 perros anestesiados con diacepan y anectine, con intubación endotraqueal. Durante la operación se mantuvo una vía IV con suero salino isotónico. Por medio de una laparotomía supraumbilical identificaron un segmento de ileon terminal de 50 cm, procediéndose al clampaje de sus extremos y a la ligadura de su pedículo vascular correspondiente. Se constituyeron tres grupos de 5 animales cada uno: en el primero de ellos, se provocó la isquemia intestinal, sin ningún otro tipo de tratamiento. En el siguiente grupo, se aplicó glucagón (2 mg disuelto en 20 ml de suero salino) en la luz intestinal previamente clampada. En el último, el segmento intestinal isquémico fue tratado con dopamina (0.1 mg disuelto en 20 ml de suero salino). De cada grupo se recogieron secciones intestinales de 10 cm de longitud, en los intervalos de 0, 10, 20, 30 y 60 min, fijándolos en formol para ser estudiados por microscopía óptica.

La evaluación de las lesiones se hizo según los grados descritos por Chiu *et al.*<sup>42</sup> En las muestras correspondientes a los 10 y 20 min de isquemia, no había diferencias significativas de lesión intestinal entre los tres grupos. A los 30 min aparecen diferencias significativas de lesión entre el grupo control y el grupo tratado con dopamina.

A los 60 min no había diferencias significativas entre los tres grupos, apareciendo alteraciones en todas las capas intestinales, incluyendo hemorragias, congestión e intenso daño en el epitelio de las vellosidades.

En un intento de profundizar en el diagnóstico de la isquemia mesentérica aguda, Gujarro<sup>50</sup> cita los trabajos de **Polson**, el cual en 1981 estudió el desarrollo de un enzima, ( $\beta$ -N acetilhexosaminidasa), que se asocia a la necrosis del intestino delgado. Para ello desarrolló dos modelos experimentales en perros. En el primero, después de ser anestesiados los animales con pentotal sódico y a través de una laparotomía media, se pinzaron la arteria y vena mesentéricas superiores durante 120 min, tomándose muestras sanguíneas de las venas porta y femoral, así como biopsias intestinales, antes del clampaje y a los 120, 240 y 360 min de provocarse la isquemia intestinal.

En el segundo modelo, a los perros se les provocaba una necrosis localizada en el intestino delgado, por obstrucción completa del mismo a través de un ojal abierto en la pared abdominal. Se tomaron muestras sanguíneas basales en la vena porta y femoral antes de provocar obstrucción y a los 120, 240 y 360 min después.

En el modelo con clampaje de los vasos mesentéricos, se comprobó un aumento significativo, de los niveles de la enzima ( $\beta$ -N acetilhexosaminidasa, en las venas porta y femoral, de las muestras sanguíneas correspondientes a 120, 240 y 360 min.

La actividad enzimática en la mucosa solo aumentó de forma significativa a los 240 y 360 min de provocada la isquemia intestinal.

### 1.3.3 Modelos experimentales en ratas

**Grosfeld et al** en 1983, idearon un modelo experimental en ratas, a las que provocaban una isquemia intestinal valorando el efecto de indometacina, prostaglandinas e ibuprofén.<sup>64</sup> Utilizaron 260 ratas Sprague-Dawley de 80 gramos a las cuales se les clampó la AMC durante 1 minuto con un clip de Heiftz para provocar una isquemia aguda.

Los animales fueron divididos en cinco series: La primera, de 80 ratas, se empleó como control y no recibió ningún tipo de tratamiento; en una 2ª serie, 20 animales fueron tratados con prostaglandinas (80 g/kg de peso IV); en la siguiente, 80 ratas, recibieron ibuprofén (12.5 mg/kg de peso IV); en otra serie, 60 animales se trataron con indometacina, (15 mg/kg de peso IV); en la última serie 110 ratas se trataron a la vez con

prostaglandina (80 g/kg) e indometacina (15 mg/kg). Todos los medicamentos fueron administrados inmediatamente antes de la laparotomía.

La supervivencia del grupo control fue de un 18 % y cayó a un 5 % en la serie tratada con indometacina. Las series tratadas con prostaglandinas, ibuprofén y con prostaglandinas + indometacina tuvieron una supervivencia más alta en respecto a la serie control.

La serie tratada con indometacina sufrió el mayor porcentaje de perforación intestinal de forma significativa con respecto a la serie control. Las series tratadas con prostaglandinas, ibuprofén y prostaglandinas + indometacina presentaron lesiones de perforación no significativas con respecto a la serie control. La serie tratada con ibuprofén presentó el menor grado de lesión necrótica intestinal con respecto a la serie control. Las series tratadas con prostaglandinas, indometacina y prostaglandinas + indometacina no presentaron diferencias significativas en las lesiones con respecto a la serie control.

**García García y Gómez Alonso**, estudiaron en 1988 la supervivencia de ratas tratadas con alopurinol, en un modelo experimental de isquemia intestinal aguda seguida de revascularización, así como, el comportamiento del principal de los sistemas de detoxificación intracelular, determinando la actividad de dicho sistema durante la isquemia y la revascularización.<sup>116</sup> Utilizaron ratas Wistar de ambos sexos, anestesiadas con equitesina intraperitoneal. La isquemia se provocaba colocando un clamp vascular atraumático en el origen de la AMC, durante 90 min, al cabo de dicho tiempo se retiraba el clamp comprobando la repermeabilización por el latido de las arcadas mesentéricas. Se formaron tres series de 30 animales cada una. En cada serie, 5 animales se usaron para estudiar la SOD en la pared intestinal y los restantes 25, para estudiar la supervivencia, que se evaluó en 48 horas. En la primera serie se provocó isquemia intestinal y no se aplicó ningún tipo de fármaco. En la segunda se administró a las ratas vía IV 100 mg/kg de alopurinol, dos horas antes de provocarse la isquemia. En la última serie, los animales recibieron la misma cantidad de alopurinol, pero el 75 % de la misma fue administrada veinticuatro horas antes de la isquemia vía oral y el resto vía IV 30 min antes de dicha isquemia.

Los animales de la serie control no experimentaron mortalidad.

La administración de alopurinol en dosis única no incrementó la supervivencia con respecto a las otras series. En la serie en la que los animales recibieron alopurinol en dos dosis, la supervivencia aumentó significativamente con respecto a las otras series.

La SOD disminuyó de forma significativa ( $p = 0.002$ ) en la pared intestinal, en todas las series, independientemente de que exista tratamiento o no con alopurinol y de la pauta de administración del mismo, durante la isquemia intestinal. Durante la fase de revascularización, la SOD disminuyó sólo en los grupos tratados con alopurinol.

Con el ánimo de valorar la influencia de ciertos agentes, como la angiotensina, radicales libres del oxígeno y vasopresina, en la mortalidad producida por la isquemia mesentérica y en el efecto terapéutico de algunas sustancias farmacológicas (glucagón, dopamina, alopurinol, antagonistas de la angiotensina y de la vasopresina) sobre dicha mortalidad, en 1988 **Boorstein, Dacey y Cronenwet**<sup>65</sup> desarrollaron un modelo experimental en ratas Sprague-Dawley anestesiadas con pentobarbital sódico. Por laparotomía media abordaron la AMC en su origen, provocando con un microclamp una isquemia de la AMC durante 85 min. Todas las ratas recibieron suero salino vía IV a dosis de 16 ml/kg/hora, empezando a los 25 min de iniciada la isquemia mesentérica y acabando a las dos horas de la repermeabilización.



En la serie control, a la cual no se provocó oclusión vascular, la supervivencia fue del 100 %. En la serie con isquemia mesentérica y tratada con suero salino, la supervivencia fue del 21 %. En la serie, tratada con glucagón (1.6 g/kg/min), la supervivencia fue del 86 %. En la siguiente, se administró dopamina (12 g/kg/min) vía IV durante las dos horas siguientes a la repermeabilización, obteniendo una supervivencia del 67 %. En dos series siguientes se administró un antagonista de la angiotensina (0.25 g/kg) en una y de la vasopresina (10 g/kg) en otra, en forma de bolo a los 25 min de provocarse la isquemia, obteniendo una supervivencia del 17 %. En la última serie los animales recibieron alopurinol (100 mg/kg) vía intraperitoneal (IP) 30 min antes de provocarse la isquemia intestinal, obteniéndose una supervivencia del 17 %.

Analizados los resultados, los autores comprobaron, que las ratas tratadas con glucagón mejoraron significativamente la supervivencia ( $p < 0.001$ ), igual que con dopamina ( $p < 0.06$ ) concluyendo que la angiotensina, la vasopresina y los radicales libres del oxígeno no contribuyen significativamente a la alta mortalidad observada después de la isquemia intestinal aguda, siendo el glucagón y la dopamina potenciales sustancias terapéuticas.

En 1989, **Holgado Madruga et al**, estudiaron el efecto de los inhibidores de la xantina oxidasa sobre el pronóstico de la isquemia intestinal aguda<sup>66</sup> en 42 ratas Wistar, anestesiadas con una solución mixta de: pentobarbital sódico, alcohol absoluto, hidrato de cloral, propilenglicol, sulfato de magnesio y agua destilada. Los animales se distribuyeron en dos bloques, el primero de ellos formado por tres grupos de seis animales cada uno, para el estudio de radicales superóxido implicados en la isquemia intestinal. Al primer grupo se le ocluyó la AMC durante 90 min; el segundo recibió el mismo tratamiento previa administración de 100 mg/kg de alopurinol dos horas antes de la intervención; al tercero se le practicó la misma operación, recibiendo el alopurinol por vía oral (75 % de la dosis) 24 horas antes y el resto (25 %) IV 30 min antes de la misma.

El segundo bloque estaba formado por cuatro grupos de seis animales cada uno, para evaluar la ruta metabólica de las purinas dependientes de la actividad de la xantina oxidasa, así como las concentraciones de alopurinol y oxipurinol. El primero de estos grupos no recibió ningún tipo de tratamiento médico ni quirúrgico; el segundo, tercero y cuarto fueron sometidos a isquemia por clampaje de la AMC y tratados con alopurinol con arreglo al mismo esquema que los grupos 1º, 2º y 3º respectivamente del primer bloque.

Para el estudio de radicales superóxido, se extrajo 1 ml de sangre de la vena renal izquierda, 1-2 min antes de retirar el clamp y permitir la revascularización y otro ml de la VMC 5 min después. Los radicales superóxido se determinaron por luminiscencia. Para la determinación de los metabolitos producidos en la vía de degradación de las purinas dependientes de la xantina - oxidasa, se tomaron muestras de intestino delgado, de sangre antes del desclampaje y a los 5 min de la revascularización y de hígado, inmediatamente después del desclampaje. La sangre se centrifugó, para separar el plasma y las muestras de intestino delgado e hígado se homogeneizaron en una solución tampón, centrifugaron y almacenaron para las determinaciones posteriores por cromatografía líquida de alta presión (HPLC).

La administración de alopurinol por vía oral y endovenosa, produjo un incremento significativo en la supervivencia de las ratas, respecto al grupo control y al tratado con alopurinol por vía endovenosa.

En los tres grupos se observó en un 66 % de los casos, un incremento estadísticamente significativo en la producción de radicales superóxido durante la revascularización respecto al período de isquemia.

Tanto en sangre como intestino e hígado, se observó una inhibición efectiva de la actividad de la xantina oxidasa por el alopurinol; ésta inhibición quedaba demostrada por un descenso del ácido úrico y un aumento de la xantina e hipoxantina.

**Ortiz Lacorzana et al** en 1990, investigan en ratas, la relación existente entre la reacción leucocitaria y las lesiones mucosas intestinales durante el síndrome de repermeabilización.<sup>67</sup> El trabajo se realizó en 50 ratas Sprague-Dawley, anestesiadas con pentobarbital sódico. Por medio de una laparotomía media, se aislaba y clampaba la AMC, durante 120 min. A las dos horas, se retiraba el clip, comprobando la recuperación vascular por el retorno del latido de los vasos intestinales.

Se hicieron 5 grupos, el primero de ellos de control formado por 10 animales sin clampaje de la AMC. En los otros cuatro grupos, constituidos por 10 animales cada uno, se clampó la AMC durante 120 min. De ellos, el primero no recibió ningún tipo de tratamiento; En el segundo, los animales recibieron dexametasona (6 mg/kg IP) a los 60 min de la isquemia. En el siguiente grupo, se utilizó ciclosporina A (20 mg/kg IP) la víspera de la intervención y 4 horas antes de la misma. En el último grupo, todos los animales fueron esplenectomizados inmediatamente antes de restaurarse el flujo mesentérico.

Todos los animales fueron sacrificados a los 30 min de retirar el clip, procediendo a extraer los seis últimos centímetros del íleon terminal.

Sobre cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina y mediante una técnica semicuantitativa se calculó el grado de lesión de la mucosa, llegando a la conclusión de que tan solo los animales tratados con ciclosporina A, lograron una disminución significativa ( $p < 0.05$ ) de la lesión intestinal. En cambio los animales tratados con dexametasona sufrieron un agravamiento ( $p < 0.01$ ) de la misma.

Se utilizaron dos técnicas complementarias para valorar la regeneración epitelial: recuento de figuras mitóticas sobre tinciones de H-E y cuantificación citofotométrica del ADN nuclear sobre tinciones de Feulgen. Los animales tratados con dexametasona o esplenectomía presentaban un índice mitótico significativamente inferior ( $p < 0.05$ ) al del grupo control.

La cuantificación citofotométrica del ADN nuclear, mostró que todos los animales sometidos a isquemia y revascularización (con o sin tratamiento asociado) presentaban un aumento significativo ( $p < 0.01$ ) en el contenido de ADN nuclear con respecto a los animales normales. En cambio dicho aumento es menor significativamente ( $p < 0.01$ ) en los animales tratados con ciclosporina A ó esplenectomía con respecto al grupo control.

En el mismo año, **Ortiz Lacorzana et al** en otro trabajo emplearon otro modelo experimental, para estudiar los efectos que ciertas drogas producen sobre la isquemia-repermeabilización intestinal de la rata.<sup>68</sup> Fueron utilizadas ratas hembras Sprague-Dawley anestesiadas con pentobarbital sódico, y éter etílico como anestesia suplementaria. Se utilizaron 25 ratas, con 5 en cada serie. Por laparotomía media se abordó la AMC, provocando isquemia por clampaje de la misma durante 120 min. En la serie control, se clampó la AMC durante dos horas sin administrarles otro tipo de medicación. En la segunda serie, se administró alopurinol (50 mg/kg) vía oral 48 horas antes del proceso quirúrgico. En la siguiente, se administró SOD (3.5 mg/kg vía IP) 30 min antes de provocar la isquemia mesentérica y la misma dosis vía IV justo después de repermeabilizar la AMC. En la siguiente, se inyectó ciclosporina A (20 mg/kg vía IP) diluida en una solución al 1/10 de etanol 96° e Intralipid 10 %, 24 y 4 horas antes de provocar la isquemia intestinal. La última serie fue tratada con alopurinol y ciclosporina A a las dosis

anteriormente mencionadas.

Los animales tratados con alopurinol, ciclosporina A y los dos medicamentos asociados, mostraron una mortalidad significativamente reducida con respecto al grupo control. El tiempo de supervivencia fue superior en los animales tratados con ciclosporina A con respecto a la serie control. También la supervivencia fue mas elevada en la serie tratada con Alopurinol asociado a ciclosporina A, con respecto a la serie control.

La longitud intestinal dañada se redujo significativamente en los animales tratados con SOD y también en los tratados con Alopurinol, con respecto al grupo control.

En 1990 **Sun, Farias y Markov**, estudiaron los efectos producidos por la fructosa 1-6 difosfato sobre las lesiones provocadas en el síndrome isquemia repermeabilización intestinal y en la mortalidad de las ratas.<sup>69</sup> Emplearon 33 ratas anestesiadas con pentobarbital, a las que se insertó un catéter en la arteria femoral para registrar la presión arterial y otro catéter en la vena femoral para la administración de drogas y fluidos. Todas las ratas respiraron aire ambiental 30 minutos antes de empezar la experiencia quirúrgica y oxígeno al 100 % durante la cirugía. A través de una laparotomía media, la AMC fue ocluida durante 30 minutos con un clamp vascular atraumático, provocando isquemia intestinal. La presión arterial y la frecuencia cardiaca se comprobaron continuamente a lo largo de la experiencia quirúrgica. Los gases arteriales, pH, glucosa y leucocitos se midieron antes de provocar la isquemia, a las 5 horas de la repermeabilización y diariamente durante 5 días ó hasta la muerte del animal. Las ratas se distribuyeron aleatoriamente en 4 grupos de 7 animales; el primero de ellos fue tratado con fructosa 1-6 difosfato antes de la intervención, el segundo con glucosa también pre-intervención, el tercero con fructosa 1-6 difosfato postreperusión y el cuarto con solución salina postreperusión. Todos ellos fueron comparados contra un grupo control formado por 5 ratas las cuales no fueron sometidas a ningún tipo de isquemia. No hubo diferencias significativas en la gasometría y el pH en ninguno de los cuatro grupos experimentales, antes de la oclusión, inmediatamente y a las 24 horas de la repermeabilización.

A las 24 horas de la isquemia, la presión arterial fue significativamente más baja en el grupo tratado con glucosa antes de la oclusión, que en el grupo tratado con fructosa 1-6 difosfato (FDP); también la presión arterial fue significativamente más baja en el grupo tratado con suero salino postreperusión, que en el grupo tratado con FDP.

Los leucocitos no variaron significativamente en ningún grupo antes de la isquemia mesentérica, ni a las 5 horas de la repermeabilización de la AMC; en cambio, a las 24 y 48 horas de la reperusión, el recuento leucocitario aumentó significativamente en los dos grupos tratados con FDP, con respecto a los tratados con glucosa y suero salino. No hubo diferencias significativas en los niveles de glucosa.

La actividad peristáltica se recuperó espontáneamente al retirar el clamp vascular, en los grupos tratados con FDP, mientras que las ratas tratadas con glucosa ó suero salino mantuvieron el intestino atónico hasta cerrar el abdomen.

La supervivencia de los animales tratados con FDP antes de la isquemia fue significativamente mayor que la del grupo tratado con glucosa; también la supervivencia fue mayor en los animales tratados con FDP después de la isquemia, que los tratados con suero salino.

En la autopsia, el intestino delgado de los dos grupos de ratas tratadas con FDP apareció normal, mientras que el de las ratas tratadas con glucosa ó suero salino que sobrevivieron menos de 24 horas, apareció congestivo cianótico y distendido.

En 1991, **Clark y Gewertz**, publican un trabajo estudiando la repercusión intestinal producida, por períodos intermitentes de isquemia-repermeabilización.<sup>70</sup> Utilizaron 25 ratas machos, anestesiadas con pentotal sódico. Tras una laparotomía media, extirparon el duodeno, páncreas, y colon y ligaron las arterias y venas renales. También hicieron una simpatectomía periadventicial de la AMC y establecieron un circuito extracorpóreo, recogiendo la sangre de la arteria carótida derecha y vena mesentérica, la cual por un sistema de bombeo era perfundida en la vena femoral derecha. La AMC estaba cateterizada y perfundida con sangre procedente de la arteria carótida izquierda, mediante sistema de bombeo.

En un grupo control se utilizaron 3 ratas que no sufrieron isquemia intestinal. En otro grupo se provocó isquemia intestinal, durante 30 min, por clampaje del circuito arterial, entre la arteria carótida izquierda y la AMC. En otro grupo, se provocó isquemia de 30 min de forma intermitente, es decir, dos períodos de isquemia de 15 min con una fase de repermeabilización de 5 min. En el siguiente, también se provocó una isquemia de intestinal de 30 min en forma intermitente, pero la fase de repermeabilización se realizó con sangre leucopénica (leucocitos  $< 500/\text{mm}^3$ ). En otro grupo, se provocó isquemia intestinal durante 45 min de forma intermitente, repermeabilizando el intestino durante 5 min cada 15 min de isquemia. En el último grupo se procedió también a una isquemia de 45 min, de forma intermitente, pero la repermeabilización se hizo con sangre leucopénica.

Una vez intervenidos los animales según el mencionado protocolo, se realizó una perfusión intestinal durante una hora con su propia sangre. Las muestras intestinales, fueron extraídas, después de la fase de isquemia intestinal y posteriormente después de 1 hora de reperfusión. Al finalizar los trabajos experimentales, todas las ratas fueron sacrificadas por exanguinación y las muestras intestinales se valoraron histológicamente según el modelo de Chiu *et al.*<sup>42</sup>

Las lesiones observadas en los animales sometidos a períodos de isquemia intermitente, tanto en los grupos de 30 como de 45 min, mostraron lesiones significativamente más importantes ( $p < 0.05$ ), que en aquellas ratas a las que se provocó la isquemia intestinal, de 30 ó 45 min, en forma continua.

**Temes, Kautren y Schwartz** en 1991,<sup>71</sup> basándose en estudios previos que demuestran que la isquemia celular produce un aumento del fósforo inorgánico (PI) y un descenso de la fosfocreatina (PC), emplearon la espectroscopia de la resonancia magnética fósforo nuclear (RMPN), como prueba idónea para detectar la isquemia intestinal. Para ello, en el trabajo experimental utilizaron 19 ratas machos Lewis, anestesiadas con pentobarbital sódico, Por medio de una laparotomía, extraían el intestino delgado, colocándolo en una gasa húmeda. Después de identificar los vasos rectos, desde el duodeno al ciego, formaron distintos grupos de animales, según el grado de isquemia intestinal provocada. La intensidad de dicha isquemia variaba según el número de vasos rectos ligados, lo cual se hizo de la siguiente manera: 1 vaso de cada 2, 2 de cada 3, 3 de cada 4 y 4 de cada 5. También se hizo un grupo control sin ligar ningún vaso.

La valoración de los diferentes cambios histológicos producidos en las ratas como consecuencia de la isquemia intestinal, se hicieron según los criterios descritos por Chiu *et al.*<sup>42</sup> Para ello, las ratas eran sacrificadas por sobredosis con pentobarbital sódico una vez que se habían estudiado con RMPN. Para delimitar el grado de isquemia intestinal, los autores establecieron un índice de isquemia, que quedaba determinado por la relación entre los picos de PI y PC (PI/PC).

El trazado de RMPN presentaba unos picos que se correlacionan con el contenido de los diferentes compuestos en fosfatos: como fosfato inorgánico (PI), fosfocreatina (PC)

y adenosin trifosfato alfa, beta y gamma ( $\alpha$ -ATP,  $\beta$ -ATP y  $\gamma$ -ATP). El registro de RMPN para un intestino normal se caracterizaba por la producción de picos manifiestos relacionados con la PC,  $\alpha$ -ATP,  $\beta$ -ATP y  $\gamma$ -ATP, con casi una ausencia del pico relativo al PI. Después de provocar una isquemia intestinal severa por la ligadura de la AMC y VMC, se comprobó un aumento significativo del pico del PI, con pérdida casi total de los picos referentes a PC,  $\alpha$ -ATP,  $\beta$ -ATP y  $\gamma$ -ATP.

Al comparar el registro de RMPN en los cuatro grupos de isquemia intestinal producidos por la ligadura de los vasos rectos y el grupo control, estos autores, evidenciaron, un aumento progresivo del pico referente a PI y una disminución de los picos relativos a PC,  $\alpha$ -ATP,  $\beta$ -ATP y  $\gamma$ -ATP, a medida que aumentaba el número de vasos rectos ligados, ó se agravaba la isquemia mesentérica. También comprobaron un aumento del índice de isquemia, según se intensificaba la isquemia intestinal. De la misma manera, observaron una correlación entre el índice de isquemia y los diferentes grados de lesión histológica producidos en la pared intestinal, de modo que los aumentos de dicho índice, están asociados con mayores lesiones histológicas isquémicas en el intestino de las ratas.

**Riera, Alonso y Rodríguez** estudian en 1991, el efecto del bloqueo producido por el alopurinol en la liberación de radicales libres del oxígeno (RLO), en ratas sometidas a isquemia aguda de la AMC, así como, las repercusiones sobre la mortalidad y las variaciones bioquímicas, hematológicas y morfológicas en dichos animales.<sup>72</sup> Utilizaron 50 ratas Wistar macho adultos, anestesiadas con tiopental sódico, distribuidas en cinco grupos de 10 ratas. En un grupo se practico una laparotomía media sin provocar isquemia. En otro grupo, se provocó isquemia durante 60 min por clampaje de la AMC. En los tres grupos siguientes, se inyectó alopurinol vía IP a una dosis normal (100 g/kg), doble (200 g/kg) y media (50 g/kg) respectivamente, 30 min antes de la isquemia. A las 24 horas se realiza una nueva laparotomía, tomando muestras de sangre, mediante punción de la vena cava posterior para realizar determinaciones analíticas. También se tomaron biopsias de intestino delgado, evaluándose según los criterios de Chiu *et al.*<sup>42</sup>

La mortalidad a las 24 horas fue nula en el grupo control (sin isquemia) y en los grupos de dosis normal y doble de alopurinol. En el grupo de isquemia reperfusión solamente murieron dos ratas y otra más en el grupo de media dosis de alopurinol. A pesar de estos resultados no se pudieron extraer resultados significativos.

Respecto a los valores analíticos, en el grupo donde se provocó isquemia reperfusión solamente durante 1 hora, se produjo una disminución significativa del hematocrito, del número y porcentaje de linfocitos, del volumen corpuscular medio (VCM) y de la Creatin-quinasa MB (CK-MB) y del ancho de distribución de los hematíes con respecto a la rata normal. Aumentó el ancho de distribución y volumen medio plaquetarios, la fosfatasa alcalina así como la concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM).

En el grupo en que se administró 100 g/kg de alopurinol, 30 min antes de la producción de la isquemia-reperfusión, se produjo una disminución significativa del ancho de distribución de los hematíes, del porcentaje de los linfocitos y del hematocrito en relación a ratas normales, aumentando el ancho de distribución plaquetario y la CHCM.; Disminuyó la CHCM con respecto al grupo de animales sometidos solamente a isquemia-repermeabilización.

En el grupo en que se administraron 200 g/kg de alopurinol, se observó una disminución significativa ( $p < 0.05$ ) del número de hematíes, con respecto a los animales tratados solamente con isquemia-reperfusión. A su vez, hubo un aumento significativo ( $p <$

0.05) del porcentaje de linfocitos con respecto a los animales tratados con 100 g/kg.

En las ratas normales no se apreciaron lesiones histológicas. El máximo daño histológico se observó, en una rata del grupo de isquemia-reperusión y en otra del grupo tratada con alopurinol a dosis de 50 g/kg. El grado mínimo, apareció sólo en los grupos tratados con alopurinol a dosis de 100 g/kg y 200 g/kg de peso. Los grados intermedios de lesión reunieron al 54 % de los animales.

En 1992, **Bilbao et al**<sup>73</sup> publicaron un trabajo en el cual ensayaban la utilidad del alfatocoferol y el ácido fólico en un modelo de isquemia y reperusión intestinal en ratas Sprague-Dawley hembras, anestesiadas con pentobarbital sódico, sometiénolas a dos horas de isquemia intestinal mediante oclusión de la AMC. Los diferentes tratamientos se administraron por perfusión lenta en la vía femoral durante los últimos 20 minutos de isquemia. Formaron cuatro series experimentales según el tratamiento administrado: no tratados, tratados con suero fisiológico, tratados con ácido fólico y tratados con alfatocoferol. En cada serie utilizaron dos grupos de experiencias: un grupo constaba de cinco lotes con cuatro animales cada uno, con un total de 20 animales, a los que se les dejaba evolucionar valorándose la mortalidad en las primeras 48 horas. En el otro grupo se utilizaron cinco lotes con cinco animales cada uno, sacrificándolos 30 minutos después de restablecer el flujo sanguíneo para realizar estudios morfológicos y bioquímicos. Bajo anestesia con éter, se reabría la laparotomía procediendo a canular duodeno y válvula ileocecal para lavar la luz intestinal con suero fisiológico a 37 °C; también se canuló la aorta abdominal para extraer sangre. Los estudios histológicos se realizaron sobre dos muestras de íleon terminal y otra extraída de una zona infartada, valorándose en ellas el grado de lesión histológica según la escala diseñada por los autores, modificada de Chiu. Los estudios bioquímicos (glucosa, SGOT, SGPT y GGT) se realizaron utilizando como controles a 10 ratas no manipuladas.

Los animales tratados con ácido fólico presentaron un descenso significativo de la mortalidad con respecto al grupo control. Los animales tratados con suero y alfatocoferol no presentaron dichos cambios significativos.

La administración de suero fisiológico se acompañó de un aumento significativo de las lesiones intestinales. Los animales tratados con alfatocoferol no disminuyeron las lesiones intestinales, mientras que el ácido fólico lograba disminuir significativamente la cantidad de intestino lesionado.

Los animales tratados con suero fisiológico, y con alfatocoferol, presentaron menos grado de lesión mucosa que el grupo control. La administración de ácido fólico también disminuyó significativamente el grado de lesión mucosa, en todas las series.

La glucemia apenas se vio modificada por la isquemia. Las enzimas estudiadas, mostraron valores plasmáticos elevados en los animales isquémicos sin que la administración de suero y alfatocoferol produjera modificaciones significativas. Sin embargo, los animales tratados con ácido fólico presentaron una elevación significativa de GOT y LDH frente a los no tratados.

En 1999, **Carnés** realizó en ratas un estudio experimental de la curva de supervivencia durante un proceso de isquemia mesentérica aguda, valorando las alteraciones morfológico funcionales y el efecto del tratamiento con superóxido dismutasa.<sup>74</sup> Empleó para ello 210 ratas Wistar, anestesiadas con una mezcla de diazepam, atropina y ketamina a las que se les practicó una laparotomía media, ocluyendo la arteria mesentérica craneal durante diferentes tiempos, obteniendo una supervivencia inversamente proporcional al tiempo de isquemia. Los picos máximos de

mortalidad se produjeron entre las 0 y 48 horas posteriores a la reperfusión. La tasa de letalidad 50 se situó en hembras en torno a los 60 minutos, mientras que en los machos superó los 120. El tratamiento con SOD, dio como resultado un incremento no significativo de la supervivencia, tanto en machos como en hembras. El estudio histopatológico de los órganos revelaron una directa relación entre los tiempos de isquemia y la gravedad de las lesiones, las cuales no solo afectaron a los órganos intestinales, sino a otros, especialmente el pulmón. La cuantificación de niveles de malón dialdehído (MDA), dio como resultado un incremento significativo de los mismos tras la isquemia, encontrando valores inapreciables en animales control no sometidos a isquemia y en animales sometidos a isquemia y tratados con SOD.

#### 1.3.4 Modelos experimentales en gatos

En 1973 **Ahren y Haglund** estudiaron las lesiones de la mucosa intestinal en el gato, después de provocar una reducción temporal del flujo intestinal como consecuencia del clampaje de la AMC<sup>75</sup> según la técnica descrita por Haglund *et al* en 1972. Para ello, utilizaron 9 gatos anestesiados con cloralose. La metodología consistió, en una laparotomía media, abordando el intestino delgado y aislando entre 3 y 9 segmentos intestinales en cada animal, empezando desde el ligamento de Treitz, con un peso para cada segmento de 7-10 gramos y extirpando el tracto intestinal sobrante junto con el bazo. Los nervios espláncnicos de los segmentos intestinales y las glándulas adrenales, fueron cortados y sus extremos conectados con electrodos para su estimulación. La reducción de flujo intestinal, se provocó mediante la colocación de un clamp vascular en el nacimiento de la AMC, hasta reducir la tensión regional de la misma a 30 mm Hg durante 2 horas y media. A través de la arteria femoral los animales recibían heparina sistémica, siendo controlada la presión sistémica y tomadas muestras de sangre. Para mantener un pH constante, se perfundió una solución de bicarbonato (10 mEq CO<sub>3</sub>HNa en una solución de glucosa al 10 %), desde el inicio de la anestesia hasta el final del proceso experimental. Para disminuir los trastornos reológicos, se inyectaba a los animales también, 2 ml de una solución de dextrano cada 30 min durante la prueba experimental.

Se hicieron varios grupos según el tratamiento dado a los segmentos intestinales: en el primero fueron sometidos a isquemia, pero no tratados; en el segundo fueron perfundidos con suero salino oxigenado durante la fase de hipotensión regional; en el tercero, se perfundieron con suero salino nitrogenado, también durante la hipotensión; en el cuarto, los segmentos intestinales se mantuvieron ocupados con suero salino durante la fase hipotensiva, siendo necesario la ligadura de los cabos de dichos segmentos; en el quinto se llenaron con suero glucosado al 5,5 % y en el sexto la luz intestinal fue lavada con suero salino (200 - 300 ml) antes de provocar la hipotensión mesentérica.

Todos los animales, tanto los fallecidos durante la experiencia, como los supervivientes, que eran sacrificados al cabo de 1 hora de desclampar la AMC, fueron sometidos a un estudio anatomopatológico, valorando las lesiones según el protocolo de Chiu *et al*.<sup>42</sup>

El examen macroscópico postmortem de los segmentos intestinales de control, revelaron la presencia de lesiones hemorrágicas en 8 de los 9 animales utilizados. Las lesiones intestinales variaron, desde hemorragias petequiales hasta destrucción completa de la mucosa de los segmentos intestinales. No hubo diferencias significativas entre los segmentos intestinales de la serie control y los tratados con suero salino nitrogenado, así como los llenados con suero salino, suero glucosado o lavados inicialmente con suero salino. En cambio, sí observaron diferencias significativas en los segmentos intestinales

tratados con suero salino oxigenado con respecto a la serie control, encontrándose que todos los segmentos aparecían con aspecto normal, excepto en un animal que presentaba hemorragias petequiales. El examen microscópico reveló en la serie control, lesiones de la mucosa comprendidas en los grados 3-4 según la clasificación de Chiu en 6 de 8 gatos. En los segmentos intestinales perfundidos con suero salino oxigenado, se encontró mejoría significativa en todos los animales con respecto a la serie control, apareciendo lesiones comprendidas en los grados 0-2. En los segmentos perfundidos con suero salino nitrogenado, sólo en 3 gatos se encontró mejoría significativa (grados 0-1) con respecto al control. Los segmentos rellenados con suero glucosado, suero salino y lavados con suero salino no presentaban diferencias significativas con respecto a la serie control.

**Granger, Rutili y McCord**<sup>76</sup> estudian en 1981, la influencia que podían tener los radicales superóxido en la permeabilidad capilar intestinal, cuando éste tejido era sometido a isquemia de la AMC durante 1 hora en 33 gatos, anestesiados con clorhidrato de ketamina. Mediante una laparotomía xifopubiana, aislaron un segmento de íleon de 15-20 cm, conservando su pedículo vascular y linfático; el resto del intestino delgado, el intestino grueso y el bazo fueron extirpados. Seguidamente al aislamiento del segmento intestinal y antes de canular el vaso linfático, se administró heparina intravenosa (5 mg/kg) y la temperatura se mantuvo a 37 °C. El segmento ileal aislado se lavó con una solución de Tyrode, que permitió eliminar todo su contenido.

La isquemia mesentérica local se provocó colocando un clamp en el circuito arterial formado por la AMC y la arteria femoral, hasta reducir la tensión arterial a 30-40 mm Hg, durante 1 hora. La presión de la AMC era medida por sonda de presión conectada a un transductor. La sangre de la vena mesentérica era recogida por una cánula que la llevaba a un reservorio, para después reintegrarla en el animal por la vena yugular. El flujo linfático mesentérico se medía por una cánula colocada en un grueso vaso linfático del pedículo mesentérico; la concentración de proteínas en la linfa y en el plasma y el flujo linfático intestinal fueron medidos en todos los animales cuando la presión arterial local intestinal era normal y con una presión venosa local de 0 mm Hg.

Durante la situación de isquemia intestinal, es decir cuando la tensión arterial local disminuía a 30-40 mm Hg, se midieron también los parámetros de flujo linfático y concentración de proteínas en el plasma y la linfa, a intervalos de 15-20 min, durante la hora de isquemia intestinal.

Se emplearon cinco series de animales, de las cuales, cuatro sufrieron hipotensión mesentérica y otra se utilizó para administrar una endotoxina intravenosa. En la primera y segunda se administró respectivamente indometacina (2.5 mg/kg) y metilprednisolona (30 mg/kg) a cinco animales, 15 min antes de la oclusión parcial de la AMC. En la tercera, se administró benadryl y cimetidina (2 mg/kg) en cinco animales, 15 min antes de provocarse la hipotensión mesentérica. En la siguiente serie, se administró en seis animales superóxido dismutasa (SOD), vía intraarterial mesentérica (4 mg/kg), 15 min antes de desclampar la AMC. En otros cinco animales, a los que además de provocar la hipotensión de la AMC, se ligaron ambos riñones, se les administró vía intravenosa SOD (4 mg/kg) 30 min antes de desclampar la AMC. En la última serie no se provocó la hipotensión mecánica mesentérica, sino que se inyectó una suspensión de *Escherichia coli* (1 mg/kg) vía IV, haciendo los controles de flujo linfático y la concentración de proteínas en la linfa y plasma, antes y después de la administración de la endotoxina.

Con el fin de poder valorar la permeabilidad capilar en el intestino delgado y estudiar su influencia con distintos medicamentos, los autores utilizaron el coeficiente de reflexión osmótica, que viene definido por el flujo linfático y la relación entre la



concentración de proteínas en plasma y líquido linfático. Cuanto menor es el coeficiente de reflexión osmótico, mayor es la permeabilidad capilar intestinal.

Los valores del coeficiente de reflexión osmótico para la serie control (sin isquemia mesentérica) y para una hora de isquemia intestinal, fueron recogidos por los autores de estudio previos.<sup>77</sup> Al estudiar el coeficiente de reflexión osmótico en la serie control y de una hora de isquemia, observaron que en la serie en la que se solamente provocaba hipotensión de la AMC, se producía un aumento significativo de la permeabilidad capilar intestinal, con respecto a la serie control.

En las series tratadas con indometacina, metilprednisolona y benadryl y cimetidina se producía un aumento de la permeabilidad capilar provocado por la hipotensión de la AMC, la cual no variaba cuando se administraban aquellos medicamentos, con respecto a la serie donde sólo se provocaba hipotensión de la AMC.

En la serie tratada con SOD, utilizando la vía arterial o venosa, disminuyó significativamente la permeabilidad capilar con respecto a la serie en la que sólo se provocaba isquemia mesentérica y a las series tratadas con indometacina, metilprednisolona y benadryl y cimetidina.

Cuando a los animales se les administró endotoxina vía IV, a dosis letal, se produjo un aumento significativo de la permeabilidad capilar, con respecto a la serie control y una reducción de dicha permeabilidad con respecto a la serie en la que sólo se provocó isquemia intestinal y a las serie tratadas con indometacina, metilprednisolona y benadryl y cimetidina. Si las dosis de la endotoxina, no eran letales, no se producían aquellos efectos significativos.

Estos resultados indicaban, que los radicales superóxido eran primariamente responsables del aumento de permeabilidad capilar en la isquemia intestinal.

En 1984 **Schoenberg et al** crearon un modelo experimental, para valorar el papel que juegan los radicales superóxido en la patogénesis de la lesión de la mucosa intestinal,<sup>78</sup> durante la isquemia mesentérica en 21 gatos anestesiados con ketamina y xylazina. Tras una laparotomía media, el duodeno, el bazo y el colon fueron extirpados, aislando un 75 % del intestino delgado, conservando la perfusión por la AMC y la VMC. Los nervios espláncnicos que rodean a la AMC, portadores de fibras vasoconstrictoras simpáticas del intestino delgado, se conectaron a un electrodo de platino para su estimulación eléctrica. La AMC fue clampada durante dos horas mediante un clamp, que permitía reducir la presión regional intestinal a 25-30 mm Hg y regular su flujo. Se midieron la presión arterial sistémica a través de la arteria femoral y la presión regional intestinal por medio de un transductor colocado en la arteria ileocólica. A través de la vena femoral y durante el tiempo de la experiencia quirúrgica, todos los animales fueron perfundidos con una solución de glucosa al 10 % que contenía NaHCO<sub>3</sub> por 100 ml, para reducir la deshidratación de los animales. Siete animales recibieron SOD purificada según la técnica de McCord, a los 60 min de la hipotensión, en inyección IV de 15.000 UI/kg de peso.<sup>79</sup> También se tomaron muestras intestinales, antes del período hipotensivo, al final del tiempo isquémico, así como, a los 10 y 60 min de la reperfusión mesentérica, para estudio histológico y determinaciones de SOD, actividad de glutatión peroxidasa y GSH (glutatión).

En los animales no tratados con SOD, el flujo sanguíneo intestinal y la presión arterial regional descendieron durante el tiempo de hipotensión. Al cabo de 3 min de reperfusión la AMC, se produjo una reacción hiperémica intestinal, debido al incremento del flujo sanguíneo mesentérico que llegó a sobrepasar el nivel de flujo durante el tiempo de prehipotensión. A los 15 min de la reperfusión mesentérica, el flujo

sanguíneo intestinal y la presión sanguínea vuelven a descender significativamente.

Antes de provocarse la hipotensión, la mucosa intestinal no presentaba lesiones morfológicas. A las dos horas de la isquemia mesentérica y justo antes de soltar el clamp vascular, todos los gatos presentaron lesiones, doce animales de grado 2-3 y los otros dos de grado 4-5 según la clasificación de Chiu *et al.*<sup>42</sup> A los diez minutos de repermeabilizar el intestino, las lesiones de la mucosa intestinal fueron significativamente más graves, alcanzando ocho animales el grado 2-3 y seis animales el grado 4-5. A los sesenta minutos de la revascularización las lesiones se agravan aún más, alcanzando en doce animales el grado 4-5 y los otros dos el grado 2-3.

En el grupo de 7 animales tratados con SOD, no hubo diferencias significativas con respecto a la serie de animales no tratados, en las lesiones de la mucosa intestinal al final de las dos horas de isquemia intestinal, a pesar de realizar el tratamiento durante el tiempo de hipotensión, encontrándose cinco animales en grado 2-3, un animal en grado 0-1 y otro en grado 4-5. A los diez minutos y a los 60 minutos de la repermeabilización mesentérica, no hubo variaciones en las lesiones de la mucosa intestinal con respecto a la fase isquémica, permaneciendo por tanto, un animal en grado 0-1, cinco animales en grado 2-3 y otro animal en grado 4-5.

La actividad de glutatión peroxidasa (GPO) no varió significativamente en las series no tratadas y tratadas con SOD, con respecto a los niveles alcanzados en la fase prehipotensiva, durante el tiempo de hipotensión mesentérica. A los 60 min de la repermeabilización intestinal, los niveles de GPO aumentaron de forma no significativa en la serie de animales no tratados, en cambio, se incrementaron significativamente en la serie tratada con SOD. La concentración de glutatión (GSH) se redujo durante y después del período hipotensivo en los animales no tratados, pero no en la serie tratada con SOD.

**Dale, Parks y Granger** en 1986,<sup>80</sup> utilizaron para comparar las lesiones morfológicas que se producen en la mucosa intestinal durante la isquemia y la repermeabilización, un modelo experimental en 20 gatos anestesiados con ketamina. Mediante laparotomía media aislaban un segmento de 20-30 cm de íleon, conservando sus vasos sanguíneos y linfáticos, extirpando el resto del intestino delgado y grueso. Inmediatamente después del aislamiento del segmento ileal, administraban 1.000 UI/kg heparina sódica, por vía IV. La temperatura del animal se mantenía a 37 °C con una lámpara de infrarrojos. La evaporación y la deshidratación de los tejidos abdominales era reducida con la aplicación de compresas humedecidas. La perfusión del asa intestinal se mantenía mediante un circuito extracorpóreo colocado entre la AMC y la arteria femoral del animal, siendo cebado dicho circuito con sangre heparinizada de un animal donante. Mediante la colocación de un clamp de Gaskell en dicho circuito arterial se provocaba una situación de isquemia intestinal, al provocar una caída tensional regional a 25-35 mm Hg.

Al total de animales utilizados se les realizó una biopsia intestinal durante la fase preisquémica, constituyendo el grupo control. Al cabo de tres horas de isquemia, se volvía a tomar biopsia intestinal constituyendo el grupo de 3 horas de isquemia. En 7 animales se desclampó el circuito mesentérico y después de una hora de repermeabilización intestinal se tomó una nueva biopsia de intestino, formando el grupo de tres horas de isquemia y una hora de repermeabilización. En otros 7 animales la isquemia intestinal se prolongó durante cuatro horas, al cabo de las cuales se tomó biopsia intestinal, constituyendo el grupo de cuatro horas de isquemia. Finalmente en otros 6 animales con tres horas de isquemia, se perfundió el intestino con suero salino tratado con nitrógeno después de retirar el clamp.

En todos los grupos isquémicos se produjo una reducción significativa del grosor de la mucosa y de la altura de las vellosidades con respecto al grupo control. En ningún

grupo se encontró lesión de la muscularis mucosa.

La profundidad de las criptas no varió significativamente entre los grupos de tres horas de isquemia y en el de tres horas de isquemia y una hora de repermeabilización con respecto al grupo control; en cambio, se redujo significativamente en los grupos de cuatro horas de isquemia y en el tratado con suero salino nitrogenado, con respecto al grupo control.

La necrosis epitelial, tanto en las vellosidades como en las criptas fue significativa en todos los grupos excepto en el control.

En 1986 **Granger et al** trabajan en un modelo experimental para valorar el efecto que algunas sustancias ejercen sobre la xantina-oxidasa, así como los cambios de permeabilidad que se producen en el intestino del gato.<sup>81</sup> Utilizaron un modelo semejante, excepto pequeñas modificaciones, al descrito anteriormente por **Granger et al.**<sup>76</sup> El flujo linfático era medido por una cánula colocada en un gran vaso linfático sobresaliente del pedículo mesentérico. La sangre de la vena mesentérica del segmento intestinal aislado era recogida en un reservorio y enviada de nuevo al animal por la vena yugular.

Una vez aislado el segmento intestinal para su estudio, se procedía a la administración de heparina sódica a razón de 5 mg/kg de peso IV. La isquemia intestinal se provocaba por el clampaje del circuito extracorpóreo entre la AMC y la arteria femoral durante una hora. En todos los animales se midieron, el flujo linfático intestinal y la concentración de proteínas en la linfa y en el plasma, antes de provocarse la isquemia mesentérica, después de 45 minutos de hipotensión regional y al producirse la repermeabilización intestinal.

En una serie control, no se provocó clampaje de la AMC. En la siguiente serie, llamada isquémica, se provocó una hipotensión de la AMC durante una hora y no fue tratada con ningún fármaco. En otro grupo, la luz intestinal se trató con ácido fólico disuelto en solución Tyrode, 15 min antes de la hipotensión mesentérica. Por último, en otro grupo se colocó pterin-aldehído disuelto en solución Tyrode, también 15 min antes de la isquemia mesentérica.

El estudio demostró que tanto en el grupo isquémico como en los tratados con ácido fólico y con pterin-aldehído se produjo un aumento significativo de la permeabilidad vascular con respecto al grupo control.

### 1.3.5 Modelos experimentales en hámster

En 1990 **Boyd et al** trabajaron en un modelo experimental en hámster, provocando un síndrome de isquemia - revascularización intestinal, para comparar el efecto protector que podían producir algunas sustancias farmacológicas como gamma - hidroxibutirato (GHB), alopurinol y vitamina E.<sup>82</sup>

El estudio se hizo en 48 animales machos de 100 a 140 gr de peso, anestesiados con pentobarbital sódico, que fueron sometidos a una laparotomía media por la que se exteriorizó un segmento de 5 cm de yeyuno, ocluyéndose su circulación durante 30 min con un clamp atraumático. A las 3 horas de su repermeabilización fueron sacrificados, procediéndose al estudio histológico intestinal. El daño del intestino fue valorado según el método de Buell, quien consideraba dañados a los *villis* cuando presentaban hemorragias o cuando su parte alta estaba desnuda.

Los animales fueron divididos en ocho grupos, el primero de los cuales estaba formado por animales sometidos a la isquemia intestinal, sin tratar. El siguiente grupo se trató con 600 mg/kg de GHB, 30 min antes de la isquemia y una dosis suplementaria de 300 mg/kg a las 2 horas siguientes. En el tercer grupo se trató a los animales también con

GHB a la misma dosis que en el grupo anterior, con la diferencia de que los hámsters fueron calentados externamente para evitar el efecto hipotérmico que produce la GHB. En otro grupo, los animales fueron tratados con GHB (600 mg/kg) vía IP, justo antes de la repermeabilización y con 300 mg/kg 2 horas después. El quinto se trató con GHB y naloxone vía IP (0.4 mg/kg) 30 min antes de la inyección de GHB y 2 horas más tarde. Un sexto grupo de hámsters recibió naloxone en la misma manera que en el grupo anterior, pero sin GHB. Un séptimo siguiente grupo se trató con alopurinol vía IP (50 mg/kg) 24 horas y 2 horas antes de la isquemia. En el último grupo el tratamiento se efectuó con vitamina E (50 mg/kg/día) durante 5 días consecutivos antes del experimento y por vía oral.

El grupo de animales control presentó un daño significativo de la mucosa intestinal con respecto a la mucosa normal.

Los grupos tratados con GHB previo a la isquemia, GHB más calor, GHB postisquemia, GHB y naloxone y alopurinol, no presentaron daños significativos de la mucosa intestinal con respecto a la mucosa normal.

Los hámsters tratados solamente con naloxone y vitamina E tuvieron lesiones significativas con respecto a la mucosa normal.

Los animales tratados con alopurinol sufrieron lesiones más significativas en la mucosa intestinal que los tratados con GHB antes de la isquemia.

### 1.4 Recuerdo morfofisiológico del aparato digestivo del conejo

#### 1.4.1 Generalidades

Como recordatorio solo haremos mención a los órganos que han sido objeto de este estudio:

- *intestino delgado*: es un conducto tubular, cuya longitud oscila entre 2 y 3 metros. Se pueden distinguir tres porciones: duodeno, yeyuno e íleon. Su estructura morfológica está constituida de fuera a dentro por las siguientes capas:
  - a) *serosa*: capa externa de células mesoteliales y otra subyacente de tejido conectivo.
  - b) *muscular*: compuesta por una capa externa de músculo liso longitudinal y otra interna circular.
  - c) *submucosa*: capa de tejido conectivo.
  - d) *mucosa*: dividida a su vez en las siguientes estructuras:
    - *muscularis mucosae*: banda delgada de fibras musculares lisas longitudinales.
    - *lámina propia de la mucosa*: tejido conectivo que rodea a las glándulas. Y centra vellosidades
    - *epitelio de revestimiento superficial, glándulas y vellosidades*

La *mucosa* presenta gran número de pliegues, las válvulas conniventes ó de Kerkrim, que se proyectan en la luz intestinal. En la mucosa, hay millones de vellosidades (proyecciones digitiformes), cada una de las cuales está limitada externamente por una única capa de células de epitelio columnar o enterocitos, que en su superficie presentan un borde en cepillo de microvellosidades. Por el eje de las vellosidades, cursan el vaso quilífero central (capilar linfático) y vasos sanguíneos. La submucosa del intestino delgado, contiene nódulos linfáticos (placas de Peyer) a lo largo del borde antimesentérico.<sup>83</sup>

- *Intestino grueso*: consta de ciego, colon y recto. El colon comienza en la ampolla cecal. Por su aspecto anatómico se distinguen dos porciones: *colon proximal*, que presenta una fuerte segmentación a modo de abolladuras y el *colon distal* de paredes más lisas y cilíndrica. Su pared está compuesta por mucosa, submucosa, muscular y serosa. La capa muscular es doble: una capa interna circular y otra más externa longitudinal.  
El ciego es una porción individualizada del intestino grueso, de 30 a 50 cm y gran volumen (entre 250 y 600 ml) que termina en un saco ciego.<sup>84</sup>  
El *recto* es el último tramo intestinal, con aspecto arrosariado por la disposición lineal de los excrementos.
- *Hígado*: es la glándula más voluminosa del organismo y entre sus múltiples funciones metabólicas, está la secreción biliar de gran importancia digestiva. Su cuerpo está dividido en cuatro lóbulos, dos laterales y dos medios.
- *Páncreas*: glándula digestiva, constituida por un tejido difuso de color rosáceo oscuro, que se halla adosado al meso duodenal; elabora el jugo pancreático, que se vierte al duodeno mediante el conducto pancreático.

### 1.4.2 Vascularización intestinal en el conejo

La circulación sanguínea en el conejo está sometida a una serie de constantes, algunas de cuyos datos más característicos son:

- a) volumen sanguíneo total: 55'6-57'3 ml/kg
- b) volumen plasmático: 38'8 ml/kg
- c) volumen globular: 16'8-17'5 ml/kg

La presión sistólica del conejo adulto es de 110 mm de Hg (90-130) y la frecuencia de las pulsaciones oscila entre 150 y 340 latidos por minuto.

Es interesante destacar la existencia de derivaciones del torrente circulatorio, como el sistema porta-hepático, que funciona desde el intestino al hígado, antes de que la sangre venosa sea incorporada a la circulación general.<sup>84</sup> Las ramas arteriales de las arterias mesentéricas procedentes de la aorta se distribuyen por la pared intestinal a la que irrigan. Conviene indicar que la red vascular de la mucosa se capilariza a nivel del corion de las vellosidades, adoptando una distribución topográfica óptima que facilita la incorporación inmediata a la luz vascular, de las sustancias absorbidas a través del epitelio de la vellosidad y, sobre todo, de las que lo hacen a través del cemento intersticial.<sup>85</sup>

La circulación intestinal depende de dos troncos arteriales, que tienen su origen en la cara anterior de la aorta abdominal.<sup>86</sup>

*Arteria mesentérica cranealis*: nace inmediatamente por debajo del tronco celiaco. Su vascularización abarca casi todo el intestino y da las siguientes ramas:

- *Arteria pancreático-duodenal*, que se divide en rama craneal y rama caudal, las cuales vascularizan, el duodeno y el páncreas. La pancreático-duodenal craneal se anastomosa con su homónima de la arteria hepática, formándose una arcada entre la AMC y el tronco celiaco.
- *Arteria yeyunal*, que irriga todo el yeyuno por medio de múltiples ramas yeyunales.
- *Arteria ileocólica* que se encarga de vascularizar, la porción ileal del intestino delgado, el ciego, el apéndice a través de la arteria *appendix vermiformis* y la primera porción del colon.
- *Arterias cólicas*, media y siniestra, que vascularizan el colon proximal y distal.

La arteria cólica siniestra se anastomosa con la arteria mesentérica caudal, formándose una arcada vascular entre las arterias mesentéricas.  
*Arteria mesentérica caudalis*, genera las ramas sigmoideas y la *arteria rectalis cranealis*, que vascularizan la porción distal del colon y el recto.

## 1.5 Radicales libres e isquemia intestinal

### 1.5.1 Generalidades

La vida en la tierra surge en primera instancia en condiciones anaeróbicas, hasta la aparición de las primeras algas verde-azuladas con capacidad fotosintética.<sup>87</sup> Todas las decisiones evolutivas fueron hechas hasta entonces sin tener en cuenta el potencial tóxico del oxígeno, adoptando una química biológica basada en aminoácidos, lípidos y nucleótidos. La aparición del oxígeno, acumulándose en la atmósfera en conjunción con la luz, hace imposible la vida anaeróbica, haciendo a estas sustancias químicamente inestables, tendiendo a reaccionar para formar dióxido de carbono y otras sustancias oxidadas. Las primitivas formas de vida existentes entonces, tuvieron que optar por una de las dos opciones siguientes: evitar el oxígeno tratando de mantener a ultranza las características de la vida anaeróbica, de cuya evolución aún quedan ciertos reductos atrincherados en lugares a los que llega difícilmente el oxígeno, ó desarrollar defensas específicas contra la acción tóxica del mismo. La especie humana evolucionó de organismos que adoptaron esta última estrategia.<sup>88</sup>

Las moléculas de la inmensa mayoría de compuestos y materiales orgánicos, -es decir aquellos en los que predomina el elemento carbono- poseen un número par de electrones que, según las leyes de la química les confiere la estabilidad requerida para su existencia. Los radicales libres tienen un número impar de electrones y por ello son en general extremadamente lábiles y fugaces, cuya vida media puede ser incluso inferior a una milésima de segundo, constituyendo así una materia efímera e intangible, imposible de aislar, almacenar y manejar.

En las células aerobias, los principios inmediatos son metabolizados en el ciclo de Krebs, liberándose electrones e hidrogeniones, que son captados por la cadena de citocromos. Como consecuencia de todo ello, se produce energía (ATP) y CO<sub>2</sub> y el oxígeno molecular sufre una reducción tetravalente, completa y simultánea ( $4O_2 + 4H^+ + 4e^- = 2H_2O$ ) sin creación de productos intermedios.<sup>89</sup>

Sin embargo, una pequeña cantidad de este oxígeno (1-2 %) sufre una reducción univalente y secuencial, ocasionando la aparición de metabolitos intermediarios: anión superóxido (O<sub>2</sub>)<sup>•</sup>, peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), radicales hidroxilo (OH)<sup>•</sup> y quizá otros compuestos desconocidos por el momento, todos ellos altamente tóxicos y reactivos.<sup>90</sup>

Durante la última década se han hecho enormes avances en el entendimiento de la reacción del tejido sometido a reperusión tras la isquemia o a una hipotensión. Para una mejor comprensión han tenido un papel fundamental, dos observaciones: En primer lugar, que la reperusión *per se*, provoca una lesión hística considerablemente superior a la inducida por la isquemia por sí sola. Esto se puso muy claramente de manifiesto por el hecho de que las alteraciones histológicas en el intestino de felinos, producidas por la lesión tres horas de isquemia seguidas de una hora de reperusión, eran muy superiores a las observadas después de cuatro horas de isquemia sin reperusión.<sup>91</sup> En segundo lugar se ha demostrado, que el neutrófilo, es el principal mediador de la lesión adicional a la isquemia. Desde hace muchos años, se sabe, que los neutrófilos infiltran el miocardio después de un infarto, y, en un principio, se pensó, que su presencia era un factor

beneficioso para el proceso de curación.<sup>92</sup> Sin embargo en 1983 se observó, que el tamaño final del infarto de miocardio producido por el pinzamiento transitorio de la arteria coronaria del perro podría reducirse considerablemente, si se provocaba previamente una deplección de los neutrófilos circulantes en el animal.<sup>93</sup> Esto hizo pensar, que los neutrófilos intervenían activamente en la lesión del tejido durante la fase de reperfusión, tras la isquemia y, de hecho, determinaban en gran parte el tamaño del infarto.

### 1.5.2 Química y producción de los radicales libres del oxígeno

Las moléculas de la inmensa mayoría de los compuestos y materiales orgánicos –es decir, aquellos en los que el elemento carbono predomina- poseen un número par de electrones que según las leyes de la química, les confiere la estabilidad requerida para su existencia. Los radicales libres son moléculas que poseen un número impar de electrones y por ello son extremadamente inestables y fugaces, cuya persistencia (vida media), puede ser incluso muy inferior a una milésima de segundo. Por consiguiente, la mayoría de los radicales libres constituyen materia efímera e intangible, imposible de aislar, almacenar y manejar<sup>94</sup>.

Un radical libre es aquella especie química cargada o no, que tiene en su estructura un electrón desapareado. Se representa con un punto a la derecha del símbolo.<sup>95</sup>

En 1978, Irwin Fridovich, llamó la atención sobre la paradoja bioquímica del oxígeno con las siguientes palabras: «*De la misma manera que Jano, el oxígeno tiene dos caras, una benigna y otra maligna; el oxígeno molecular es virtualmente tóxico para todas las formas de vida y esa toxicidad se hace evidente al aumentar su concentración*».<sup>96</sup> Esta situación paradójica consiste, en que el oxígeno es esencial para las formas de vida aerobias, pero un exceso de oxígeno o bien un metabolismo inapropiado del mismo pueden ser tóxicos para el organismo, ésta dualidad conocida desde hace muchos años, está comenzando a ser entendida a través de las especies activas del oxígeno y los radicales libres de oxígeno (RLO).

Como es bien sabido, los mamíferos obtienen la mayor parte de su ATP (adenosin trifosfato) celular por medio de la reducción del oxígeno, en la que intervienen cuatro electrones, para formar H<sub>2</sub>O catalizado por la citocromoxidasa, en el sistema mitocondrial de transporte de electrones. Aproximadamente el 98 % de todo el oxígeno consumido por las células entra en las mitocondrias.<sup>97</sup> Sin embargo la presencia de oxígeno intracelular también permite la producción inadvertida de especies de oxígeno intermedias parcialmente reducidas, tóxicas.

Las formas más importantes, son el radical-anión *superóxido* (O<sub>2</sub>)<sup>\*</sup>, el *peróxido de hidrógeno* (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y el radical *hidroxilo* (OH)<sup>\*</sup>. Estas formas pueden producirse por la actividad de diversos enzimas oxidativos, en diferentes localizaciones de la célula, mitocondrias, lisosomas peroxisomas y membrana plasmática.<sup>98</sup>

Otra forma activa del oxígeno es el denominado *oxígeno singlete* (1O<sub>2</sub>), que se diferencia de la forma normal, (estado triplete 3O<sub>2</sub>), en que los electrones del orbital p antienlazante tienen espines opuestos. Esta forma es mucho más reactiva que el oxígeno triplete.<sup>95</sup>

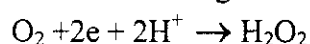
El *radical superóxido* se puede generar directamente, durante la autooxidación en las mitocondrias o enzimáticamente, por enzimas citoplasmáticas, como las deshidrogenasas flavoproteínicas (xantin-oxidasa, dehidroorotato oxidasa, aldehído oxidasa, purina oxidasa etc.<sup>99</sup> y otras oxidasas e hidrolasas, como la diamino oxidasa, galactosaoxidasa, triptofano 2,3 deoxigenasa y el citocromo P-450.<sup>100</sup> También puede producirse en reacciones no

enzimáticas del oxígeno con la cistina<sup>101</sup> ó la riboflavina ó activado por la luz. La producción enzimática de iones superóxido juega probablemente un papel importante en la defensa antibacteriana, mediante la fagocitosis por los leucocitos,<sup>102</sup> en las reacciones de oxidación que tienen lugar en las mitocondrias y en otros procesos.<sup>103</sup>

El superóxido tiene una vida media de algunos milisegundos, por lo cual, una vez producido, puede ser inactivado espontáneamente o más rápidamente por la enzima superóxido dismutasa (SOD), para dar agua oxigenada y oxígeno.<sup>104</sup>

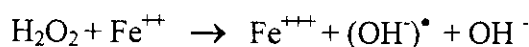


El peróxido de hidrógeno es producido ó por dismutación de  $(\text{O}_2^-)^\bullet$  como ya hemos visto ó directamente por las oxidasas presentes en los peroxisomas (orgánulos celulares ricos en catalasa.<sup>98</sup> Cuando la molécula de oxígeno recibe dos electrones, el producto formado es el agua oxigenada o peróxido de hidrógeno.

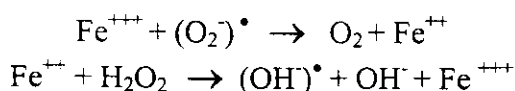


Esta forma es la menos reactiva de las especies del oxígeno activadas. Se forma en muchos procesos en los organismos vivos y es estable cuando no hay catalizadores que lo descompongan.<sup>105</sup> Existen muchas enzimas capaces de producir directamente peróxido de hidrógeno a partir del oxígeno, entre ellas, la glucosa oxidasa, las diaminoácido oxidasas, uricasa, alfa dihidroxiácido oxidasa ó sulfidril oxidasa.<sup>105</sup> También puede producirse por reacciones químicas, como la autooxidación del ácido ascórbico catalizada por el cobre.<sup>106</sup> Por otra parte, la dismutación del ion superóxido para formar peróxido de hidrógeno puede tener lugar de forma espontánea o por acción del enzima superóxido dismutasa.<sup>107</sup>

El radical hidroxilo que corresponde en teoría a la reducción parcial de la molécula de oxígeno por tres electrones no puede formarse directamente de esta forma. En cambio, sí puede aparecer en los sistemas biológicos como consecuencia de distintos procesos. Como se describió en 1944, puede formarse por radiolisis del agua por acción de la radiación gamma o de los rayos X.<sup>108</sup> Uno de los procesos más importantes de producción de radical hidroxilo es la reducción del agua oxigenada por ciertos iones metálicos, en especial el ion ferroso ( $\text{Fe}^{++}$ ). La mezcla de peróxido de hidrógeno y  $\text{Fe}^{++}$  se conoce como *reacción de Fenton*, quien ya indicó, en 1894, que esta mezcla era capaz de oxidar al ácido málico.<sup>109</sup>



Aunque esta reacción puede tener lugar con otros metales, el ion ferroso es el más importante en los sistemas biológicos, aportados por la transferrina, lactoferrina, hemoglobina ó ferritina.<sup>110</sup> El hierro, inicialmente en forma de iones férricos ( $\text{Fe}^{+++}$ ) reaccionaría con el radical superóxido y el ion ferroso formado lo haría entonces con el peróxido de hidrógeno.<sup>104</sup>

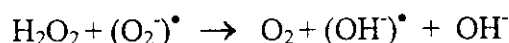


Estas dos reacciones son una fuente importante de radicales hidroxilo  $(\text{OH})^\bullet$  a partir del superóxido, ya que este último se dismuta fácilmente produciendo agua oxigenada, de modo que cualquier reacción que produzca  $(\text{O}_2^-)^\bullet$  producirá en última instancia  $(\text{OH})^\bullet$ , a menos que exista algún sistema específico de eliminación, frente a la



dismutación.

El radical hidroxilo también se puede formar a partir del  $(O_2)^{\bullet}$  y del  $(H_2O_2)$ , por la denominada reacción de Haber-Weiss:<sup>105</sup>



En los sistemas biológicos, también pueden generarse radicales hidroxilo en la transferencia de electrones a nivel microsomal.<sup>111</sup> El radical hidroxilo es una de las especies químicas más reactivas que se conocen, reaccionando con todas las sustancias orgánicas.<sup>112</sup>

La principal forma de producción de oxígeno singlete ( $1O_2$ ) en los sistemas biológicos, es la oxidación del NADPH en los microsomas y la actividad de varias enzimas como la lactoperoxidasa, xantina-oxidasa, lipooxigenasa, prostaglandin sintetasa y otras.<sup>106</sup> La luz especialmente la ultravioleta (UV), en presencia de fotoactivadores como la riboflavina, puede dar lugar al paso del oxígeno del estado triplete al singlete<sup>113</sup> Químicamente puede generarse por la acción del hipoclorito (que a su vez puede producirse por la acción del  $H_2O_2$  sobre el ion  $Cl^-$  en presencia de ciertas enzimas) sobre el  $H_2O_2$ , por la rotura de hidroperóxidos ó por la desproporción del agua oxigenada.<sup>114</sup>

Las formas activas del oxígeno (reducidas) tienen sus correspondientes sistemas enzimáticos intracelulares que las neutralizan, las cuales, bien sean de naturaleza enzimática ó no enzimática, reciben el nombre de antioxidantes ó agentes secuestradores de radicales libres (*scavengers*). En condiciones normales la presencia de un equilibrio entre prooxidantes y antioxidantes, impide que las estructuras celulares (membranas, ADN etc.) sufran daños oxidativos por los radicales libres.

Cuando los sistemas antioxidantes no son capaces de eliminar las formas activas del oxígeno, se produce un incremento de RLO, en la cascada de peroxidación lipídica, que a su vez descompensa aún más el equilibrio entre la prooxidación y antioxidación.<sup>99</sup>

Conviene destacar que estos sistemas de defensa son capaces de un cierto grado de adaptación compensador frente a un exceso eventual de radicales libres, siempre que este aumento tenga lugar de modo paulatino, como se ha visto en ratas sometidas a oxígeno hiperbárico y también en cultivos de microorganismos como estafilococos fecales y *Escherichia coli*,<sup>115</sup> pero no cuando este aumento tiene lugar de modo agudo, como ocurre en la revascularización postisquémica.<sup>116</sup>

Si por cualquier motivo se produce un exceso de  $(O_2)^{\bullet}$  y  $H_2O_2$  y/o una deficiencia en SOD y catalasas, el resultado puede ser un remanente de  $(O_2)^{\bullet}$  y  $H_2O_2$  que reaccionando entre sí dan lugar al radical  $(OH)^{\bullet}$ , el mayor oxidante conocido tanto de sustancias orgánicas como inorgánicas. En caso de que el radical hidroxilo interaccione con los lípidos, se inicia la "cascada de peroxidación lipídica".<sup>117</sup>

### 1.5.3 Acción de los radicales libres

Los RL son compuestos químicos extremadamente lábiles y de vida fugaz y las reacciones en las que participan son complejas, por lo que no es fácil determinar en qué momento y circunstancias intervienen. Los métodos utilizados para su valoración, sólo nos aportan evidencias indirectas, ya que ni los bloqueantes ni los neutralizadores de los RL, tienen especificidad absoluta.<sup>118</sup>

Estos hechos condicionan la investigación de los radicales libres en biología y en clínica, con graves inconvenientes, representados por la dificultad para detectar la

formación de los RL in vivo,<sup>119</sup> lo cual implica tener que estudiar los efectos que éstos producen sobre modelos experimentales a través del bloqueo de algún enzima del proceso (xantin-oxidasa) ó de la administración de sustancias neutralizadoras de los mismos.

La mayoría de los tóxicos químicos, medicamentos etc., se metabolizan en los tejidos especialmente en el hígado, mediante procesos de peroxidación lipídica.<sup>120</sup>

Estos tóxicos químicos, en su mayoría, no son biológicamente activos, sino que deben ser convertidos en metabolitos, que son los que actúan como tóxicos sobre las células diana. Aunque estos metabolitos pueden lesionar las membranas y las células por unirse mediante enlace covalente directo a las proteínas y lípidos de las membranas, sin embargo, un mecanismo más importante de lesión de las membranas, es la formación de RL reactivos y consiguiente peroxidación de los lípidos. Uno de los modelos más característicos de lesión química en el hígado, es la producida por el tetracloruro de carbono (CCl<sub>4</sub>).<sup>97</sup> Este hidrocarburo halogenado se utiliza en la industria de la limpieza en seco. El efecto tóxico se debe a la conversión del CCl<sub>4</sub> en un radical libre altamente reactivo, CCl<sub>3</sub>•, (CCl<sub>4</sub> + e → CCl<sub>3</sub>• + Cl), lo que ocurre en el retículo endoplásmico liso (REL) por la acción del sistema oxidasa de las enzimas que intervienen en el metabolismo de los fármacos liposolubles y de otras sustancias como el citocromo P-450. El CCl<sub>3</sub>•, es capaz de tomar átomos de hidrógeno de los ácidos grasos poliinsaturados y consecuentemente iniciar la peroxidación lipídica.<sup>121</sup> Inicialmente se produce la autooxidación de los ácidos grasos insaturados (polienoicos) presentes en los fosfolípidos de las membranas y formación de peróxidos orgánicos tras la reacción con el oxígeno. Esta reacción es autocatalítica, debido a que se forman nuevos radicales libres a partir de los propios radicales peróxido. Por consiguiente se produce, rápidamente la destrucción de la estructura y la alteración de la función del REL. Por lo tanto, no es de extrañar que la lesión hepática por CCl<sub>4</sub> sea grave y rápida.

En los tejidos se encuentra la xantina deshidrogenasa en estado normal, pero la isquemia induce su rápida transformación a la forma oxidada, proceso ligado a una proteasa y al calcio intracelular.<sup>122</sup> El paso de hipoxantina (aumentada por la acción de la isquemia) a xantina y ácido úrico es catabolizado por la XO, para lo cual es preciso la existencia de oxígeno (aportado durante la revascularización) con producción de RL.<sup>90</sup>

### 1.5.4 Mecanismos de toxicidad

Los productos activos de oxígeno ejercen una acción tóxica sobre los organismos vivos por dos mecanismos:

- Directo mediante la modificación de los ácidos nucleicos<sup>123</sup> despolimerización del ácido hialurónico de los mucopolisacáridos y del colágeno<sup>124</sup> ó por oxidación de los grupos sulfidrilos, lo que altera la integridad de las membranas celulares.<sup>125</sup>

- Indirecto, mediante la peroxidación lipídica, provocando la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados contenidos en los fosfolípidos de las membranas. La peroxidación de los lípidos se inicia por los radicales hidroxilos, que reaccionan con los ácidos grasos insaturados de los fosfolípidos de la membrana para generar radicales libres de ácidos orgánicos, que a su vez, reaccionan rápidamente con el oxígeno formándose peróxidos. Los peróxidos a su vez actúan entonces como radicales libres, iniciando una reacción catalítica en cadena que da lugar a una mayor pérdida de ácidos grasos insaturados y a una extensa lesión de la membrana.<sup>126</sup>

Así pues, los efectos tóxicos de los RLO, se producen en las membranas, lípidos, enlaces sulfidrilos de las proteínas y nucleótidos de ácido desoxirribonucleico (DNA).<sup>127</sup>

El lugar fundamental donde tiene lugar la peroxidación lipídica es la membrana celular, debido a su riqueza en ácidos grasos poliinsaturados. Las consecuencias son la alteración de su integridad y la pérdida de la función de organelas celulares, tales como mitocondrias.<sup>128</sup> También pueden producirse enlaces cruzados entre las proteínas, mediante la formación de enlaces disulfuros (los aminoácidos más lábiles son la

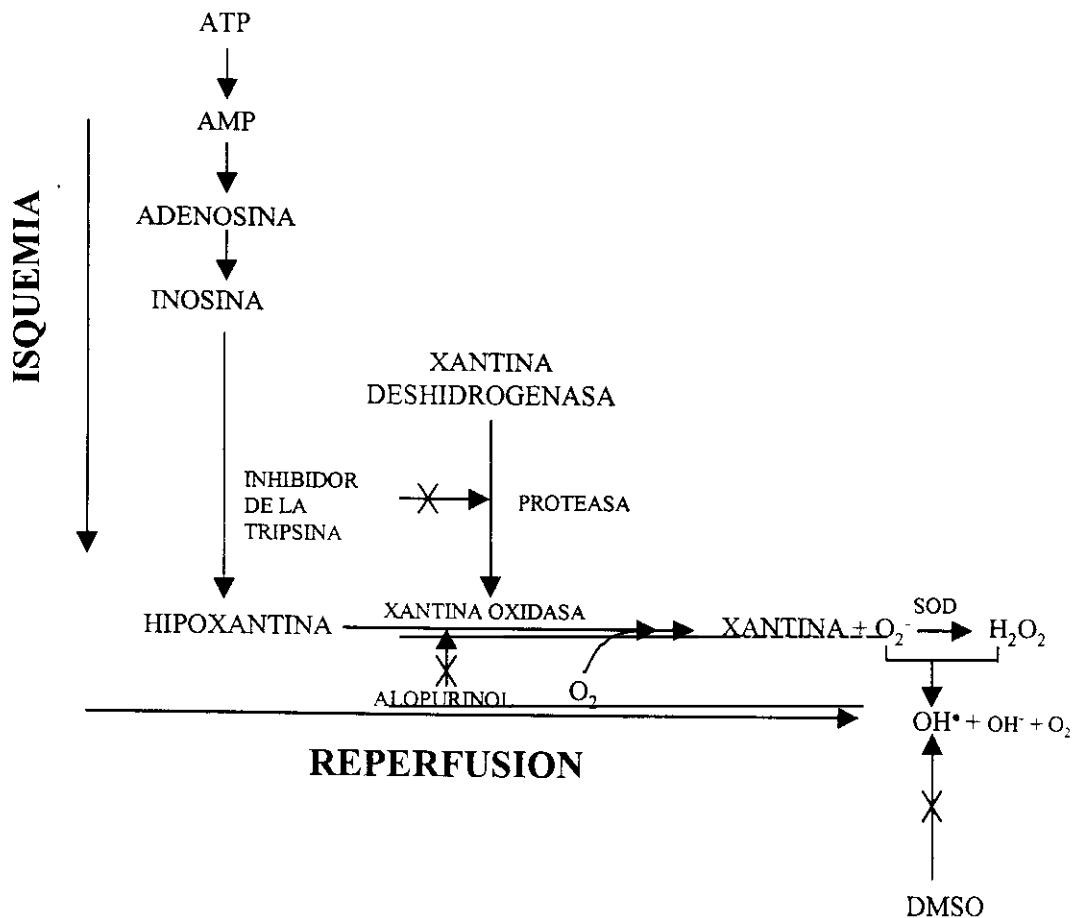


Fig 1: Mecanismo de producción de radicales libres del oxígeno en el intestino delgado isquémico.<sup>158</sup>

metioniona, histidina, cistina y lisina), que inactivan enzimas, especialmente los radicales sulfidrilos. Las interacciones con el ADN inducen mutaciones del código genético, que si no son reparados, dan lugar a alteraciones celulares e inhiben la replicación del DNA. En las lesiones del ADN están implicados los tres tipos de RLO.<sup>98</sup>

## 1.5.5 Papel de los radicales libres del oxígeno en situaciones de isquemia reperusión

Desde que en 1980 se implicó a los RLO como agentes causantes de lesiones tisulares responsables de la mortalidad de los individuos, han sido numerosos los trabajos desarrollados para conocer el funcionamiento bioquímico y fisiológico de estas moléculas de alta inestabilidad. Las lesiones producidas por la isquemia se agravan durante la revascularización, precisamente por la acción destructora de los RL.<sup>158</sup>

En condiciones fisiológicas normal, el 2 %-3 % del oxígeno es metabolizado en las células con producción de RL del mismo, que son convenientemente metabolizados por los sistemas de detoxificación celular (superóxido-dismutasa, catalasas, peroxidases etc.).

En los casos de isquemia aguda seguida de revascularización, tendría lugar una gran producción de RLO y de otros tipos, seguramente acompañada de una disminución de los mecanismos de detoxificación fisiológicos que serían responsables, al menos, en parte de las lesiones atribuidas hasta ahora a la isquemia.<sup>76</sup>

La lesión que se produce durante la isquemia-reperusión se origina por la producción de metabolitos reactivos del oxígeno, tales como el anión superóxido, el ácido hipocloroso (ClOH) y el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).<sup>81</sup> El primer paso es la deplección de ATP que es degradado a hipoxantina. (Fig. 1). En condiciones normales, la hipoxantina es oxidada por la enzima xantina deshidrogenasa, para dar lugar a xantina, utilizando el dinucleótido de nicotinamida adenina (NAD) en una reacción en que el NAD es convertido en NADH. Sin embargo, durante la isquemia, la xantina deshidrogenasa, que suele estar presente en grandes cantidades, es convertida en xantina oxidasa. Esta conversión enzimática cumple un papel clave en la hipótesis de la lesión de la reperusión mediada por los radicales de oxígeno. Recientemente se ha demostrado que la xantina oxidasa en el ser humano, se forma en tiempos de isquemia de una hora en el músculo esquelético, cuando se pone un torniquete.<sup>129</sup>

Otro hecho importante durante la isquemia es que se almacenan grandes cantidades de hipoxantina en los tejidos. Esta acumulación se produce por dos circunstancias:

- no hay xantina deshidrogenasa
- la xantina oxidasa utiliza oxígeno como sustrato, en vez de NAD para metabolizar la hipoxantina a xantina, pero como no hay oxígeno disponible por la isquemia, esa reacción no es posible de realizar dando lugar a un aumento de hipoxantina.

Las concentraciones elevadas de xantina oxidasa y de hipoxantina, no tienen un efecto desfavorable sobre los organismos, hasta que se produce la reperfusión. Cuando se reintroduce el oxígeno con la reperusión, la xantina oxidasa convierte la hipoxantina en xantina, generando gran cantidad de anión superóxido, el cual genera una cascada de reacciones que liberan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y otros metabolitos de oxígeno en el interior de las células endoteliales. El radical hidroxilo (OH) puede ser producido por la reacción del superóxido y el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en presencia de iones Fe<sup>++</sup> ó Cu<sup>++</sup> (reacción de Haber-Weiss) ó de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sólo en presencia de Fe<sup>++</sup> (reacción de Fenton).

Tras la activación de los neutrófilos, la mieloperoxidasa (MPO) que contienen produce ClOH. No se conocen bien los procesos concretos que enlazan la xantina oxidasa y los metabolitos reactivos del oxígeno con la actividad quimiotáctica. También, es poco conocida la naturaleza exacta de los agentes quimiotácticos que operan en las distintas situaciones de isquemia, si bien los productos del ácido araquidónico y los fragmentos del complemento, desempeñan un papel fundamental, sobre todo los últimos, en la isquemia miocárdica.<sup>130</sup> Al poco tiempo de la reperusión del tejido isquémico, los productos de degradación del ácido araquidónico se encuentran en concentraciones elevadas en el

plasma.<sup>131</sup>

Una consecuencia de la liberación de RLO es que el  $\text{Ca}^{++}$  libre intracelular aumenta extraordinariamente y se cree que éste es un paso importante en la activación de la fosfolipasa  $\text{A}_2$  de la membrana plasmática y la posterior generación de productos del ácido araquidónico.<sup>132</sup> Ciertamente la inhibición de los RLO con enzimas inhibidores de los mismos, se previene la liberación de los metabolitos del ácido araquidónico después de la repermeabilización.<sup>133</sup> y parece ser que el anión superóxido es un requisito previo para la puesta en marcha de la actividad quimiotáctica de los neutrófilos.<sup>134</sup>

No hay pruebas de que los productos de degradación del ácido araquidónico provoquen una lesión endotelial en la secuencia isquemia reperfusión. Sin embargo hay tres mecanismos que relacionan a los neutrófilos y a los metabolitos del ácido araquidónico para inducir lesión endotelial durante la repermeabilización:

- a) El leucotrieno  $\text{B}_4$ , producto de la lipooxigenasa y el tromboxano  $\text{A}_2$ , producto de la ciclooxigenasa son potentes quimioatrayentes<sup>135</sup> y son generados durante la isquemia-reperfusión en cantidad suficiente para inducir la diapedesis de los neutrófilos.<sup>131</sup> Datos experimentales han observado que la lesión en el miocardio después de un infarto, se reducía cuando se inhibían los productos de la lipooxigenasa.<sup>136</sup>
- b) Los metabolitos del ácido araquidónico pueden activar a los neutrófilos para producir más radicales de oxígeno y enzimas proteolíticos. El leucotrieno  $\text{B}_4$  es un estimulante de los neutrófilos para producir peróxido de hidrógeno y elastasa<sup>137</sup> y activa a los neutrófilos para que induzcan permeabilidad endotelial tanto in vitro como in vivo.<sup>138</sup> El tromboxano  $\text{A}_2$  también activa los neutrófilos y es mediador en la producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por parte de estos, después de la isquemia.<sup>139</sup>
- c) Los leucotrienos y el tromboxano intervienen en la perfusión de los tejidos, ya que tienen una acción directa sobre la microcirculación. La acción vasoconstrictora del tromboxano provoca una disminución de flujo a nivel capilar después de una reperfusión.<sup>140</sup> Este fenómeno se observa en la isquemia reperfusión del riñón, donde se discute si la lesión de repermeabilización depende o no de los neutrófilos.<sup>141</sup> Se piensa que el principal mecanismo de esta lesión es el desarrollo de un desequilibrio entre agentes vasodilatadores y vasoconstrictores. No se sabe si los leucotrienos  $\text{C}_4$  y  $\text{D}_4$  son importantes en la isquemia, aunque son potentes vasoconstrictores.<sup>142</sup> El leucotrieno  $\text{B}_4$  no influye directamente en el flujo sanguíneo.

El lugar de producción de los RLO pueden ser los leucocitos circulantes (polinucleares neutrófilos),<sup>143</sup> células endoteliales ó parenquimatosas del órgano de que se trate. Los neutrófilos harían uso de los RLO como armas antibacterianas.<sup>144</sup>

Aunque no está completamente aclarado, es posible que el lugar de producción de los RLO varíe según el órgano. Así, en el páncreas el origen sería exclusivamente tisular<sup>145</sup> mientras que en el intestino y pulmón hay datos que hacen pensar que se originan a expensas de la xantina-oxidasa (XO) y de los neutrófilos.<sup>93</sup>

En cuanto al momento en el que se produce la liberación de RL, según los trabajos realizados por Ceconi *et al*,<sup>146</sup> los niveles de MDA libre en el tejido son prácticamente inapreciables durante la isquemia y tras los primeros momentos de la reperfusión, y es transcurridos unos minutos cuando se dispara la peroxidación lipídica y se producen las reacciones que liberan MDA al tejido. Por lo tanto la peroxidación de las membranas se produce prácticamente por completo en la reperfusión. Gallagher *et al*<sup>147</sup> determinaron que la vida media de la SOD es de aproximadamente 22 minutos.

Garlick *et al*<sup>148</sup> demostraron por resonancia paramagnética que la liberación de RL se produce principalmente durante los primeros 10 minutos de la reperfusión. Slavikova *et al*,<sup>149</sup> determinaron por quimioluminiscencia, que en las primeras 4 horas posteriores a la reperfusión se producía un fuerte incremento de la liberación de especies reactivas de oxígeno, y que inmediatamente el organismo ponía en funcionamiento un sistema de protección antioxidante que evitara, en lo posible, la peroxidación lipídica de las membranas y que se prolongaba por espacio de 4 días después de la reperfusión.

### 1.5.6 La lesión intestinal derivada de la acción de los radicales libres

La mucosa intestinal, especialmente la del intestino delgado, es particularmente sensible a las lesiones producidas por la falta de oxígeno,<sup>150</sup> pero es durante la revascularización cuando se producen los mayores daños sobre las células del epitelio. Con la llegada de sangre a los tejidos anóxicos se produce una explosión en la formación de RL, que atacan directamente los dobles enlaces de los ácidos grasos poliinsaturados que forman las membranas celulares, formándose endoperóxidos lipídicos, capaces de volver a reaccionar con nuevas moléculas de ácidos grasos de la membrana y repetir el ciclo o bien metabolizarse para dar lugar a la formación de MDA. Este proceso denominado peroxidación lipídica provoca serias alteraciones en la estructura de las membranas celulares y en la funcionalidad de las células afectadas.

La destrucción de la membrana se inicia, principalmente, con la reintroducción de oxígeno en el medio, siendo suficientes tan solo 10 minutos de isquemia para que todos estos procesos se disparen. Pero este tipo de reacciones no solo ocurren en procesos patológicos de isquemia - reperfusión (I/R), sino que, como se ha podido comprobar recientemente, numerosas enfermedades cursan con cuadros de peroxidación de las membranas, afectando a la práctica totalidad de los órganos y sistemas, con consecuencia a veces fatales para los individuos.

Han sido publicadas lesiones en la mucosa digestiva, tanto en humanos como en modelos experimentales, causados por shock hemorrágicos e isquemias regionales intestinales.<sup>151</sup> La lesión de la mucosa intestinal dependerá a la vez de la duración e intensidad de la agresión isquémica.<sup>42</sup> Han sido observados pequeños cambios estructurales y funcionales en la mucosa intestinal, en períodos de 5-15 min de oclusión de la AMC y lesiones más severas cuando el tiempo de la isquemia aumentaba. Estudios ultraestructurales en íleon de perro, sugieren que el daño en la mucosa, ocurre después de 10 min de clampaje arterial, pero estos cambios son intracelulares, localizándose en el retículo endoplásmico (RE).<sup>152</sup> La lesión de la mucosa no está asociada con empeoramiento funcional de la misma, hasta los 30 min de oclusión mesentérica. A los 30 min de isquemia de la AMC, el espacio intracelular está incrementado y las células epiteliales están desintegradas de la membrana basal, con un máximo daño en las puntas de la vellosidades. A las 2 horas o más de isquemia de la AMC, se produce frecuentemente una separación del epitelio de revestimiento superficial vellositario, denudación completa de las vellosidades y desintegración de la lámina propia.<sup>152</sup>

La permeabilidad de la mucosa intestinal medida por el aclaramiento de la d-tubocuranina (PM= 682) y I<sup>125</sup>-albúmina (PM= 68.000), indica, que dicha permeabilidad aumenta significativamente después de 1-2 horas de oclusión de la AMC, según Groggaard *et al*.<sup>153</sup> y Kingham *et al*.<sup>154</sup> El aumento de la permeabilidad de la mucosa al producirse la reperfusión va acompañada de una intensificación de la filtración capilar, edema intersticial y una importante pérdida de agua y electrolitos en la luz intestinal.

Los cambios estructurales y funcionales en la mucosa intestinal, producidos por una oclusión parcial (reducción de la presión de la AMC a 30 mm Hg), son comparables a

los causados por una oclusión completa de la AMC, pero, es necesario aumentar el tiempo de isquemia en el modelo de oclusión parcial de la AMC, para producir idéntico daño en dicha mucosa intestinal, que en la isquemia completa de la AMC. Por ejemplo, son necesarias cuatro horas de oclusión parcial, para producir el mismo daño en la mucosa intestinal, que con una hora de isquemia de la AMC.<sup>42, 153</sup>

Han sido propuestos algunos mecanismos para explicar las lesiones de la mucosa intestinal, que se encuentra sometida a un proceso de isquemia-repermeabilización. Entre ellos están incluidos: hipoxia, activación de las proteasas intracelulares, acidosis, endotoxinas, histamina, activación de la tripsina intraluminal y coagulación intravascular. De todos ellos, la hipoxia es considerada como el factor más relevante en la lesión de la mucosa intestinal, durante la isquemia-repermeabilización.<sup>152</sup>

Lundgren y Haglund en 1978<sup>155</sup> propusieron la teoría del gradiente de O<sub>2</sub>, como hipótesis para explicar la marcada susceptibilidad de las vellosidades intestinales ante la isquemia. Según ésta teoría, la parte alta de las vellosidades llegan a estar virtualmente anóxicas en situaciones de isquemia intestinal, en cambio el flujo de la mucosa se mantiene, debido a los shunt que se establecen entre las arteriolas y vénulas en las bases de las vellosidades. Esta teoría es mantenida por la observación experimental encontrada en un estudio de mucosa intestinal de gato, donde se apreció una lesión severa en la punta de las vellosidades, ante un cuadro de hipoperfusión intestinal y una atenuación de dichas lesiones, cuando la luz intestinal además, se sometía a una perfusión con suero salino oxigenado.<sup>75</sup>

Entre la teoría del gradiente de oxígeno y la de los radicales libres, existe una marcada diferencia, que viene expresada por el momento de la lesión. Mientras que con la primera teoría, la lesión se produce durante la hipoxia, con la segunda, la lesión se desarrolla durante la repermeabilización. En realidad, los defensores de la teoría de gradiente de oxígeno han obtenido las muestras histológicas después de la reperfusión, para valorar la lesión de los tejidos intestinales, con lo cual ellos suponían que la lesión ocurría durante el período isquémico.<sup>75</sup> Debido a que es importante conocer el momento en que aparecen las lesiones de la mucosa intestinal durante la isquemia-repermeabilización, Granger *et al*<sup>152</sup> usando técnicas morfométricas, analizaron muestras histológicas de mucosa en intestino delgado obtenidas antes, durante y después de la isquemia intestinal, tras la provocación de 3 horas de oclusión parcial de la AMC.

La altura de las vellosidades, profundidad de las criptas y grosor de la mucosa, fueron medidas con un micrómetro ocular, después de una correcta orientación de las vellosidades, para la valoración morfológica de la lesión de la mucosa intestinal. Cada vellosidad de cada muestra era valorada individualmente según, el criterio anteriormente mencionado. Granger *et al*,<sup>152</sup> basados en éste análisis, pudieron demostrar lesiones significativas ( $p < 0.05$ ) de la mucosa intestinal producidas en las biopsias obtenidas durante la repermeabilización, con respecto a las muestras control (antes de la isquemia). Estos resultados eran coincidentes con los publicados por Schoenberg *et al*<sup>78</sup>

Las lesiones de la mucosa intestinal producidas durante la isquemia-repermeabilización de la AMC, no indican necesariamente que los RL sean los responsables del desarrollo de dichas lesiones. Para valorar el papel que los RLO juegan en las lesiones intestinales, durante la isquemia-repermeabilización, Parks y Granger, estudiaron mediante un análisis morfométrico, las preparaciones intestinales de las biopsias obtenidas después de la repermeabilización, en animales que habían sido tratados con SOD previamente a la isquemia, a dosis de 15.000 UI/kg de peso.<sup>91</sup> Parks y Granger comprobaron que los animales tratados con SOD, mantenían la altura de las vellosidades y se producía una reducción significativa, según los autores, de la necrosis epitelial y de la

inflamación de la punta de las vellosidades, con respecto a los animales no tratados. Este efecto protector de la SOD del intestino, durante la fase isquemia-repermeabilización, también fue observado por otros investigadores usando diversos modelos experimentales,<sup>156, 157</sup> con lo cual, dichos autores apoyaban la teoría de que los RLO juegan un papel importante en las lesiones de la mucosa intestinal durante la isquemia-repermeabilización.

Para valorar si la xantina oxidasa es la fuente de los RLO producidos durante el proceso de isquemia-repermeabilización intestinal, Parks *et al*<sup>158</sup> estudiaron por morfometría las biopsias obtenidas de la mucosa intestinal de gato, después de la repermeabilización mesentérica y tras haber sufrido los animales previamente una isquemia de 3 horas; un grupo de gatos fue tratado con alopurinol (inhibidor competitivo de la xantina-oxidasa) y otro grupo tratado con un inhibidor de la tripsina (previene la conversión de xantina deshidrogenasa en oxidasa). Parks *et al* encontraron que la mucosa intestinal de aquellos animales que habían sido tratados con alopurinol (ALLO) y con inhibidor de la tripsina (ITS), mantenía la altura de las vellosidades y se producía una significativa reducción, según los autores, de la necrosis epitelial, producidos durante la isquemia-repermeabilización del intestino. Estos hallazgos mantenían la hipótesis de que la xantina oxidasa era fuente de RLO en el intestino isquémico.

Mientras que los estudios morfológicos de la mucosa intestinal bajo el tratamiento de la SOD, ALLO y el ITS demostraban un efecto claramente protector para la integridad de la mucosa intestinal, sin embargo no quedaba aclarado, el grado de afectación funcional de dicha mucosa. Para comprobar si la SOD y el ITS mejoraba la absorción intestinal en mucosas sometidas a 3 horas de isquemia, se midieron los flujos netos de agua a través de la mucosa intestinal en los siguientes grupos de animales que se sometieron a 3 horas de isquemia: un grupo control, a los 150 min de isquemia, durante la repermeabilización, y en otros dos grupos tratados durante la fase isquémica con SOD e ITS. La capacidad de absorción intestinal de agua estaba significativamente reducida, según los autores, para los grupos de animales no tratados y los tratados, con respecto al grupo control, presumiblemente debido a la baja disponibilidad del O<sub>2</sub> provocado por la isquemia. Sin embargo el grupo de animales a los que se midió el flujo de agua a través de la mucosa durante la fase de repermeabilización y no tratados, se comprobó que el intestino, no solo no tenía capacidad de absorber agua, sino que había pérdida de la misma en la luz intestinal, posiblemente como resultado de la exudación de líquido al intersticio a través de la mucosa desestructurada.<sup>159</sup> Los grupos de animales que habían sido tratados durante la fase de isquemia con SOD e ITS, no sufrieron pérdida de agua en hacia la luz intestinal y aunque la capacidad de absorción de agua se vio disminuida con respecto al grupo control, sí se comprobó un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) de dicha capacidad de absorción con respecto al grupo estudiado en la fase de repermeabilización sin ningún tipo de tratamiento,<sup>152</sup> lo cual permitía suponer, según los autores, que los productos usados en el tratamiento, SOD e ITS, permiten conservar una funcionalidad significativa en la mucosa intestinal. Aunque los RLO parecen ser los mediadores primarios de las lesiones en la mucosa intestinal producidas por 3 horas de oclusión parcial de la AMC, en cambio hay evidencias de que dichos radicales juegan un papel menor en el daño tisular provocado por la oclusión total arterial.<sup>152</sup> Así, la SOD no modificó los cambios estructurales que se habían provocado en la mucosa intestinal por una oclusión arterial de 4 horas en los gatos,<sup>160</sup> tampoco la incidencia de necrosis transmural a las 8 y 12 horas de oclusión arterial en las ratas, ni modificó el aumento de la permeabilidad intestinal producido por 1 hora de oclusión arterial en los perros.<sup>153</sup>

La evidencia indirecta que apoya el importante papel que juegan los RLO en la



lesión de la mucosa intestinal, fue comprobado por Grogard *et al*<sup>153</sup> al observar que la perfusión intraluminal de hipoxantina-xantina oxidasa (complejo generador de  $O_2^-$ ), aumenta la permeabilidad de la mucosa intestinal para la albúmina, a un nivel comparable al que se produce por una oclusión parcial de la AMC durante 2 horas.<sup>91</sup>

El aumento de permeabilidad producida en la mucosa intestinal como consecuencia de la inyección intraarterial de una solución de hipoxantina-xantina oxidasa, es prevenida por la administración de la SOD.<sup>152</sup> Los cambios morfológicos producidos por la isquemia intestinal son semejantes a los observados por la radiaciones.<sup>161</sup>

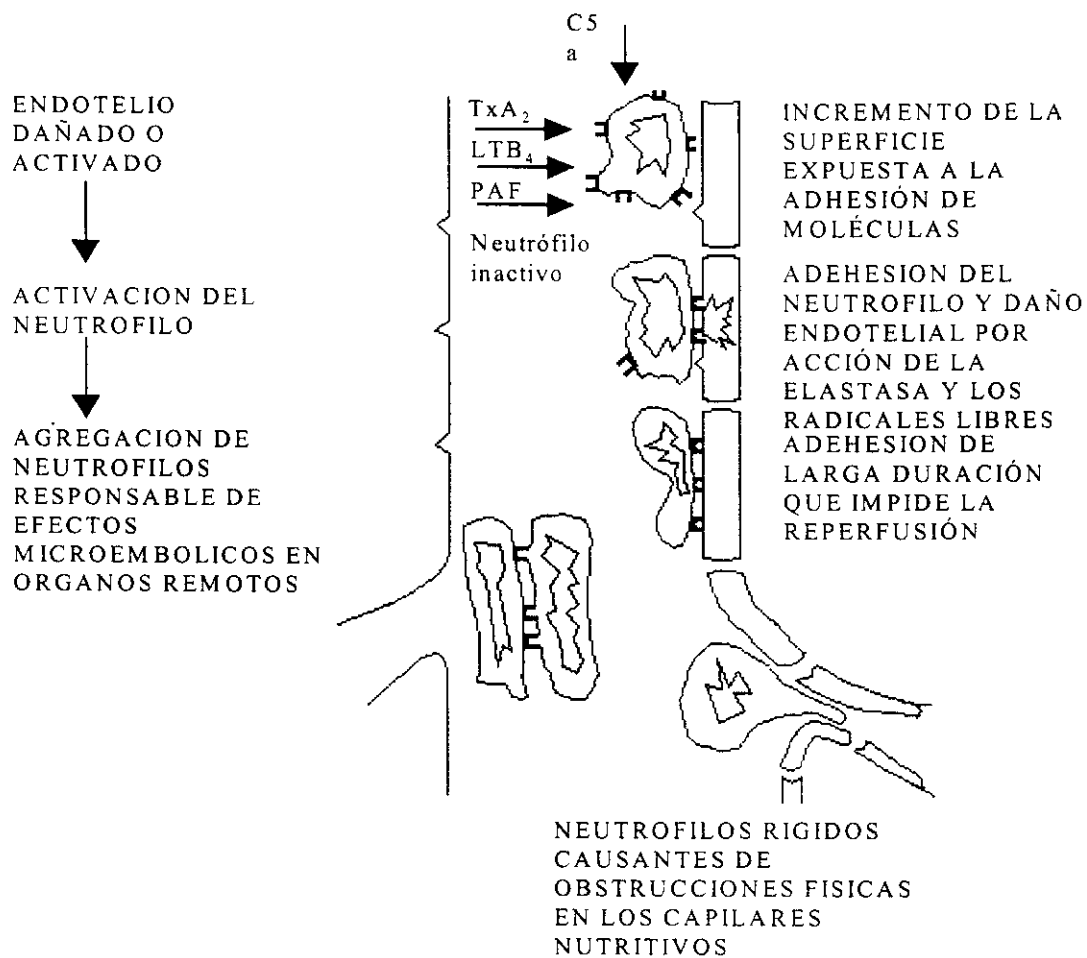


Fig 2: Consecuencias microvasculares de la activación del neutrófilo<sup>162</sup> (Hickman P, McCollum PT, Belch JF; modificada)

### 1.5.7 Papel del neutrófilo

Los polinucleares neutrófilos que penetran en un tejido que acaba de ser repermeabilizado, son activados, dando lugar a la síntesis de metabolitos del oxígeno y de enzimas proteolíticas e incrementando su capacidad de adherencia a los endotelios

vasculares.<sup>131</sup> Los mecanismos de producción del daño vascular inducido por los neutrófilos son obstrucción física, liberación de sustancias tóxicas e interacción con otros componentes de la sangre.<sup>162</sup> Los neutrófilos influyen en la circulación microvascular de tres diferentes maneras: (Fig. 2)

- obstrucción del flujo sanguíneo de los capilares
- adhesión al endotelio de las arteriolas precapilares y vénulas postcapilares y daño a este endotelio a través de la y los radicales libres
- formación de microagregados que pueden dar lugar a microémbolos los cuales pueden manifestar su acción en órganos remotos

Los neutrófilos pueden colonizar dos lugares: el esfínter precapilar y la vénula postcapilar. Si los neutrófilos activados se hacen rígidos, los capilares quedan taponados durante la reperfusión y se acentúa la lesión anóxica.<sup>163</sup> Sin embargo la mayoría de los neutrófilos se fijan en el endotelio de la vénula postcapilar, provocando la liberación de enzimas proteolíticas como la elastasa<sup>164</sup> y productos de oxidación generados por los propios neutrófilos, como el ClOH y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Las consecuencias son la desestructuración de las proteínas esenciales de la matriz estructural, como la elastina, que conducirá al aumento de la permeabilidad microvascular.

La presencia de los neutrófilos en el compartimento vascular es importante, pero se cree que es necesario que se produzca adherencia endotelial de los neutrófilos, para que se genere lesión microvascular. Esta hipótesis se vio apoyada cuando la lesión intestinal provocada por el síndrome de isquemia repermeabilización en los animales, se evitó tratando a aquellos con un anticuerpo monoclonal dirigido contra la glucoproteína con capacidad adherente de los neutrófilos, el llamado complejo CD18.<sup>165</sup> Este anticuerpo impedía la acumulación de neutrófilos en la mucosa intestinal durante la reperfusión, al bloquear el proceso de adherencia de los neutrófilos al endotelio vascular. Hay trabajos que también han comprobado la importancia del CD 18, al detectarse una reducción de la lesión y del aflujo de neutrófilos en órganos como el corazón y pulmones, tras la reperfusión subsiguiente a la isquemia de estos órganos.<sup>166, 167</sup>

También se ha demostrado que el receptor del endotelio para el CD 18, la molécula-1 de adherencia intercelular (ICAM-1 CD 54), interviene en la lesión de la reperfusión, ya que un anticuerpo que neutralice éste antígeno reduce el tamaño del infarto de miocardio, del mismo modo que lo hace el CD18.<sup>168</sup>

La adhesión de los neutrófilos en el endotelio es lo que desencadena la liberación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y proteasas en el medio extracelular.<sup>169</sup> Estos pareados, CD18/ICAM-1, son los únicos determinantes antagónicos de la adherencia endotelial de los neutrófilos, para los que se ha demostrado un papel en el proceso de lesión por isquemia-reperfusión.

Cuando los conejos sometidos a un estado de shock hipovolémico experimental, fueron tratados con un anticuerpo monoclonal CD 18, se redujo la mortalidad y también las necesidades en la reposición de líquidos durante y después del período de reanimación. Este dato ponía de manifiesto indirectamente, que la activación de los neutrófilos contribuye poderosamente al aumento de la permeabilidad.<sup>170</sup>

Se sabe que las plaquetas se agregan en respuesta a la acción del tromboxano y que podrían intensificar la lesión de isquemia-reperfusión, por los agregados microvasculares,<sup>131</sup> sin embargo se piensa que las plaquetas no intervienen directamente por varias razones: en primer lugar, no se acumulan en el tejido isquémico durante la repermeabilización, como se ha demostrado con la microscopía intravital del músculo esquelético<sup>171</sup> y con el empleo de plaquetas marcadas con <sup>131</sup>I como trazador,<sup>172</sup> lo cual

contrasta con la presencia uniforme de neutrófilos. En segundo lugar, las plaquetas no poseen antígeno CD 18; por tanto, la protección aportada al tejido repermeabilizado por los anticuerpos CD 18 no puede explicarse por un efecto sobre las plaquetas. Por último, aunque se sabe que las plaquetas estimuladas son fuente importante de tromboxano, es más probable que sean los neutrófilos las células responsables de la generación de tromboxano en la reperfusión de la isquemia, ya que una deplección previa de neutrófilos inhibe casi por completo el aumento de tromboxano sin afectar el recuento de plaquetas.<sup>173</sup>

Una consecuencia remota de la isquemia-reperfusión inducida por los neutrófilos, es la producción de edema pulmonar no cardiogénico, como manifestación inicial del síndrome de distrés respiratorio del adulto. Este cuadro es consecutivo a un trastorno de la permeabilidad para las proteínas de la microcirculación de los pulmones.<sup>174</sup> Se supone que cuanto mayor sea la masa de tejido isquémico y más prolongada la isquemia, más probable será que se produzca la lesión pulmonar a distancia. Los trabajos experimentales sugieren que la lesión pulmonar es producida también por el secuestro de neutrófilos activados dentro de la microcirculación pulmonar, por que la deplección de neutrófilos ó el empleo de inhibidores de la activación de los neutrófilos previenen el edema pulmonar.<sup>133</sup> No se sabe el mecanismo por el cual los neutrófilos se acumulan en los pulmones para causar una lesión, después de una isquemia en miembros inferiores. Es probable que intervengan mediadores como las citoquinas, que en situaciones experimentales estimulan la adherencia de los neutrófilos al endotelio pulmonar.<sup>175</sup> Las citoquinas también activan el endotelio para hacerlo adherente para los neutrófilos.<sup>176</sup>

### 1.5.8 Radicales libres en otros procesos de isquemia reperfusión

En intervenciones quirúrgicas de aorta abdominal, se producen alteraciones significativas del metabolismo anaerobio con peroxidación lipídica producida durante el clampaje aórtico y de forma diferida tras el desclampaje. La reperfusión, tras periodos de clampaje superiores a los 30 minutos, constituye un ejemplo adecuado para la valoración del síndrome de reperfusión mediado por radicales libres del oxígeno.<sup>177</sup>

La extracción de un órgano del donante, la conservación durante un tiempo más o menos prolongado y su posterior trasplante, son etapas de un proceso que se podría considerar equiparable a los de isquemia-repermeabilización.<sup>178</sup> Por lo cual el fracaso funcional de un órgano después del trasplante en parte está relacionado con el daño tisular causado por los RL generados durante la revascularización.<sup>179</sup>

Los RL también intervienen en la reperfusión que sigue a la cardioplejia, habiéndose demostrado que añadiendo neutralizadores de los RL a la solución cardiopléjica mejora la recuperación miocárdica.<sup>180</sup>

Durante estos procesos de isquemia, la xantina-deshidrogenasa (XD) se convierte a xantina-oxidasa (XO), dependiendo de la velocidad de esta reacción del propio órgano y de factores exógenos como la hipotermia, que disminuye la velocidad de este proceso.<sup>178</sup> También la isquemia provoca disminución de SOD, glutatión y alfatocoferol, lo cual favorecería la posterior peroxidación lipídica por los RL generados durante la revascularización. Por lo tanto la isquemia produce descenso de los sistemas de detoxificación celular, haciendo al órgano más sensible a los RL.<sup>181</sup>

La supervivencia de hígado a la isquemia se ha demostrado que está relacionada con el grado de alteración de la función mitocondrial y de la resíntesis de ATP.<sup>182</sup>

Cuando se administra CD 10 y alfatocoferol, que son potentes antioxidantes, actúan impidiendo alteraciones mitocondriales, pero son sólo eficaces cuando se administran antes de la reperfusión, lo cual apoya la hipótesis de que impiden la aparición

de fenómenos de peroxidación lipídica, que tienen lugar en la revascularización y son causados por los RL.<sup>183</sup>

Según estos hallazgos, aunque falta mucho por conocer, parece que será posible prolongar las situaciones isquémicas controlando aspectos del metabolismo de los RL en los órganos destinados al trasplante.<sup>179</sup>

También existe relación entre los RL y el shock, durante el cual tiene lugar una caída de los niveles de ATP sobre todo en páncreas, intestino e hígado,<sup>184</sup> lo que condiciona un aumento de la hipoxantina en plasma,<sup>123</sup> lo cual genera los RL, que acabarían produciendo trastornos de la permeabilidad capilar.<sup>179</sup>

En el shock séptico se ha comprobado gran aumento de productos procedentes de la peroxidación lipídica (eicosanoides)<sup>185</sup> cuya síntesis puede ser inhibida por antiinflamatorios no esteroideos, consiguiendo mejoras en la supervivencia.

Es conocido que en un primer estadio de la cicatrización, existe una notable disminución de la resistencia de los tejidos adyacentes a la herida, circunstancia debida a fenómenos de colagenólisis local,<sup>186</sup> posiblemente mediados por RL, ya que puede ser inhibida por la administración de neutralizadores de los mismos.<sup>187</sup> Según Shandall, los RL serían producidos por los neutrófilos,<sup>188</sup> que se disponen en los márgenes de la herida. La adecuada infiltración de leucocitos es fundamental para que se realice la actividad fagocitaria (mediante la producción de RL) y con ello la cicatrización. Pero un exceso de leucocitos puede tener efectos nocivos, ya que la producción aumentada de RL puede inducir fenómenos exagerados de colagenólisis local en los márgenes de la herida, hecho que es muy importante p.e. en las anastomosis intestinales, ya que su integridad depende de los primeros días del postoperatorio. Cuando disminuya la resistencia de los tejidos donde anclan las suturas se puede producir la dehiscencia de las mismas.<sup>187</sup>

### 1.5.9 Neutralización del daño producido por la isquemia-reperfusión

En condiciones fisiológicas normales, a pesar de originarse radicales libres en pequeña cantidad, no se producen lesiones de los órganos vivos, debido a que las células están provistas de mecanismos de neutralización. Los más conocidos son la superóxido-dismutasa (SOD), peroxidasas y catalasas.<sup>189</sup>

Desde que en 1980 se demostró la implicación de los RL en los procesos de I/R, y el carácter lesivo de éstos, se han realizado numerosos estudios dirigidos a la utilización de sustancias antioxidantes con el fin de neutralizar o de disminuir sus efectos. Su empleo abarca todo un espectro de posibilidades y compuestos, incluyendo sustancias que el organismo emplea como antioxidantes: vitaminas A, C y E, sustancias enzimáticas como SOD, catalasas o glutatión peroxidasa, extractos de plantas, aditivos alimentarios como butil hidroxianisol o butil hidroxitolueno,<sup>190</sup> alopurinol, fructosa 1-6 difosfato,<sup>50</sup> o incluso sobredietas de elementos traza como el selenio.

Los mecanismos que inhiben los daños causados por la isquemia-reperfusión son numerosos, lo cual ha sido aprovechado para utilizar varias sustancias con fines terapéuticos. Estos agentes actúan de varias maneras, como se resumen en la tabla siguiente:<sup>191</sup>

SUBSTANCIA	MODO DE ACCIÓN
<b>Secuestradores de radicales libres</b>	
Catalasa *	Secuestradores de radical superóxido y peróxido de hidrógeno
Superóxido dismutasa *	
Nafazatrom	
Manitol	Secuestradores de radicales hidroxilo
Dimetiltiourea	
Dimetilsulfóxido	
Mercaptopropionil glicina	
Histidina *	Secuestradores oxígeno singlete
<b>Inhibidores de la producción de radicales libres</b>	
Alopurinol	Inhibidor de la xantina oxidasa
Desferrioxamina	Agente quelante del hierro
<b>Inhibidores de neutrófilos</b>	
Adenosina *	Modula la generación de anión superóxido
Factor $\beta$ de crecimiento *	Inhiben la adhesibilidad del neutrófilo
Anticuerpos monoclonales complejos CD-CD18	
Antiproteasas	Inhiben la actividad proteásica del neutrófilo
Compuestos perfluorados	Suprimen la quimiotaxis del neutrófilo y la degranulación de los lisozimas
<b>Antioxidantes</b>	
Vitamina E ( $\alpha$ tocoferol) *	Interrumpen la peroxidación
Propanolol	
Bloqueadores de los canales de calcio	
Captopril	
Nafazatrom	
<b>Hipotermia</b>	
Hipotermia	Reduce el metabolismo

\* Mecanismo endógeno

Los antioxidantes más utilizados, haciendo especial referencia a la superóxido dismutasa, son los siguientes

#### *Antioxidantes no enzimáticos*

Las oxidaciones biológicas son reacciones de transferencia de electrones y dentro del complejo sistema del transporte de electrones nos encontramos con las siguientes sustancias:

#### Tocoferoles (Vitamina E)

La vitamina E se encuentra en la alimentación en forma de ésteres de tocoferol, que se hidrolizan en el intestino delgado y se absorbe igual que las demás vitaminas liposolubles, a nivel de la mucosa intestinal en presencia de sales biliares. En los recién nacidos la concentración en sangre es de tres a cinco veces inferior a los niveles maternos, lo cual ha invocado a pensar en que la aparición de la fibroplasia retrolental sobreviene a la carencia de tocoferoles en los prematuros por los efectos tóxicos del oxígeno en un ser con mecanismos antioxidantes incompletos.<sup>192</sup>

La vitamina E participa en la síntesis del hemo, que forma parte del grupo prostético de la catalasa, enzima antioxidante (secuestrador de hidroxiperóxidos). Se sabe que las dietas ricas en ácidos grasos poliinsaturados producen deficiencias en vitamina E, por lo cual es probable que los ácidos grasos poliinsaturados produzcan efectos perjudiciales sobre el equilibrio oxidación-antioxidación, al provocar un aumento de RL en la cascada peroxidativa lipídica y secundaria disminución de secuestradores, tales como la catalasa y la vitamina E. Así pues, la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados determina un aumento de las necesidades de catalasa y de

vitamina E, con el fin de recuperar el estado de equilibrio.

En diferentes especies animales (conejo, rata y cobaya) con la carencia de vitamina E se aprecia una degeneración hialina de las fibras musculares, con trastornos electrocardiográficos y apariencia de muerte súbita.<sup>192</sup> Por lo tanto la acción antioxidante de la vitamina E impide que otras sustancias se unan al oxígeno. Una función demostrada es la de impedir ó retrasar la peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados. Existen datos de que la grasa corporal procedente de animales alimentados con dietas carenciales de vitamina E, se enrancian por la acción del oxígeno atmosférico más deprisa, que la de animales alimentados con dietas ricas en vitamina E.<sup>193</sup>

En los animales de experimentación, la carencia de vitamina E da lugar a:

- distrofia muscular<sup>194</sup>
- anemia por mecanismo hemolítico (aumento de la fragilidad osmótica)<sup>195</sup>
- alteraciones en el metabolismo de la creatinina<sup>196</sup>
- aumento de la permeabilidad de las membranas lisosomales, facilitando la liberación de las enzimas<sup>197</sup>

### Ubiquinonas o Coenzima Q

Constituyen un mecanismo transportador de electrones y tienen una estructura química similar a la de los tocoferoles, exactamente a la del tocotrienol. Las ubiquinonas pueden ser alternativamente oxidadas o reducidas, gracias a la interconversión de quinonas en hidroquinonas. Hay que señalar que su síntesis se produce a partir de la tirosina con el concurso de las vitaminas C, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, ácido pantoténico y ácido fólico. La vitamina E, puede evitar la oxidación de las ubiquinonas, pero en el caso de haberse producido tal oxidación por la ausencia de vitamina E, no basta con aportarla, sino que hay que promover la síntesis de nuevas ubiquinonas.

### Ceruloplasmina

Es una proteína que tiene cobre (Cu) y que aparece en la fracción de las alfa-2-globulinas en el plasma de los vertebrados. La ceruloplasmina se puede considerar el más potente antioxidante sérico, realizando acciones preventivas ante los ácidos polienólicos oxidados.<sup>198</sup> Es un secuestrador de radicales superóxido.<sup>199</sup>

La ceruloplasmina representa el punto final de encuentro entre la bioquímica del hierro y la del cobre de las células aerobias. Freiden<sup>200</sup> llamó la atención sobre los iones metálicos para la evolución de las células aerobias y para las metaloproteínas desarrolladas para proteger a las células de los productos tóxicos del oxígeno, como son, el ion superóxido, el oxígeno singlete y el peróxido de hidrógeno. Este es el motivo de la amplia distribución de la SOD que contienen cobre o zinc y de las enzimas con grupo hemo como las catalasas y las peroxidases. A medida que los organismos se van haciendo complejos, la maquinaria celular utiliza el hierro y el cobre para producir proteínas transportadoras de oxígeno como son: hemoglobinas, hemotrinas y hemocianinas. Tal adaptación implica la elaboración de proteínas de transporte exclusivas para el hierro y el cobre (transferrina, ferritina y ceruloplasmina).

La ceruloplasmina tiene un doble papel en la prevención de las oxidaciones en el plasma sanguíneo:

- Previene la formación de RLO que pueden ser generados por oxidación no enzimática de complejos ferrosos a férricos.<sup>201</sup>
- Inhibe significativamente la peroxidación lipídica. Stocks en 1974,<sup>202</sup> indicó que la principal proteína sérica con actividad antioxidante, se encontraba en la fracción

alfa-2-globulina.

- La ceruloplasmina es un secuestrador de radicales superóxido,<sup>199</sup> por un sistema de funcionamiento similar al de la SOD, aunque la actividad de la ceruloplasmina frente a los ( $O_2^-$ ) es menos de 3000 veces, que la obtenida para las SOD, pero la acción eliminadora de la ceruloplasmina sobre el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) es el doble que el de las SOD.

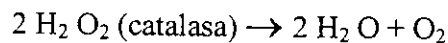
### Carotenos

Los carotenos, precursores de la vitamina A, poseen capacidad antioxidante, así como protección contra los RL inducidos en la peroxidación lipídica.<sup>203</sup>

### *Antioxidantes enzimáticos:*

#### *Catalasas*

Son hemoproteínas que transforman el peróxido de hidrógeno en agua y se localizan sobre todo en los peroxisomas.<sup>204</sup>



Ono midió la actividad de la catalasa en muchos hepatomas y en todos ellos encontró que estaba disminuida y que, además, la actividad de la catalasa estaba inversamente correlacionada con el crecimiento tumoral.<sup>205</sup> Wickramsinghe *et al* en 1970,<sup>206</sup> observaron que la actividad de la catalasa era cuatro veces superior en los tejidos normales que en los tumorales.

#### *Glutation peroxidasa (GSH)*

Es una macromolécula cuyo peso molecular se sitúa en torno a 85.000. Mills en 1957, habló de la glutacion peroxidasa como una enzima eritrocitaria que protegía a la hemoglobina de su ruptura oxidativa.<sup>207</sup> La glutacion peroxidasa es altamente específica para el glutacion, pero reacciona también con muchas hidroperoxidases. El sistema de la glutacion peroxidasa puede ser colapsado bruscamente cuando la formación de hidroperóxidos sobrepasa el índice de regeneración de la glutacion peroxidasa. Por ello (ante el exceso de hidroperoxidases) pueden ser explicadas alteraciones de la glutacion peroxidasa y de la vía metabólica de la pentosa, "pentosa-fosfato".

Las funciones establecidas para la glutacion peroxidasa son varias. Los hematíes humanos deficientes en glutacion peroxidasa son muy susceptibles a los cambios que sobre ellos inducen los productos oxidantes. La deficiencia de glutacion peroxidasa da como resultado, una condición clínica similar al favismo (deficiencia de la glucosa 6-P-deshidrogenasa). En las ratas con dietas deficitarias en selenio, en las que por lo tanto hay una reducción de la actividad de la glutacion peroxidasa, hay tendencia a la hemólisis producida por hidroperóxidos. De dichas observaciones se puede deducir, que la glutacion peroxidasa contribuye a preservar la integridad de la membrana de los eritrocitos. La glutacion peroxidasa es responsable de la eliminación de  $H_2O_2$  e hidroperóxidos de los lugares con bajos contenidos en catalasa o sin catalasa.<sup>208</sup> La glutacion peroxidasa se encuentra en el citosol y en la matriz mitocondrial, mientras que la catalasa abunda, más en los microsomas, peroxisomas y núcleos, lugares, donde la glutacion peroxidasa es difícil de encontrar. La GSH está involucrada en varios procesos metabólicos, como son: eliminación (secuestro) de  $H_2O_2$  de compartimentos bajos en catalasa, mutagénesis inducida por hidroperoxidases, protección de los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares, biosíntesis de prostaglandinas, regulación

de la síntesis de prostaciclina.<sup>209</sup>

Mills descubrió la glutathion  $H_2O_2$  oxido-reductasa, que es capaz de reducir varios hidroperóxidos a alcoholes. Entre los hidroperóxidos que acepta como substratos para su acción están: peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), etil hidroperóxido, T-butil-hidroperóxido, hidroperóxidos de ácidos grasos poliinsaturados, de ácidos nucleicos, de la prostaglandina  $G_2$ .<sup>207</sup>

#### *Superóxido dismutasa (SOD)*

Descubierta en 1968 por McCord y Fridovich, los cuales observaron que una enzima presente en los hematíes, era capaz de catalizar al ion superóxido y por esta capacidad se la denominó superóxido dismutasa.

En 1970, se encontró que esta sustancia contenía una molécula con cobre y zinc en la misma relación estequiométrica.

La SOD es una metaloproteína en cuya estructura se encuentra un grupo metálico unido a cuatro residuos de histidina. Actualmente se engloba a la SOD en tres familias dependiendo del grupo metálico que lleve en su estructura:<sup>123</sup>

- Cu/Zn-SOD
- Mn-SOD
- Fe-SOD

La Cu/Zn-SOD se encuentra en los citoplasmas celulares de los organismos eucariotas. Tiene un peso molecular aproximado de 32 kD y está formada por dos subunidades proteicas, cada una de las cuales presenta un centro activo que contiene un ion de cobre y otro de zinc.<sup>226</sup> Cada subunidad, está compuesta por 8 cadenas antiparalelas de 151 aminoácidos cada una, dispuestas en una estructura formando un cilindro con tres bucles exteriores. El ion cobre del centro activo, se une a la molécula a través de cuatro residuos de histidina (44, 46, 61 y 118), mientras que el átomo de Zn interacciona con el de Cu a través de la histidina 61 y se une a la molécula a través del carboxi terminal de las histidinas 69 y 78 y del grupo aspartato 81.

Durante la reacción de dismutación, el Cu realiza una reacción reversible de oxidación y reducción, eliminando de este modo los radicales superóxido y transformándolos en  $O_2$  y  $H_2O_2$ . El Zn no participa en la reacción del ciclo catalítico, pareciendo que su presencia es imprescindible para estabilizar la estructura de la molécula.

La Cu/Zn-SOD está presente en la mayoría de los tejidos, abundando en el interior de las células. A nivel extracelular, se la conoce como EC-SOD y adopta la forma de una glicoproteína tetramérica hidrofóbica, con un peso molecular de 135 KD y aunque su función no está clara, parece que actúa como agente antioxidante en los espacios extracelulares.

Los valores medios de la enzima en los tejidos varían sensiblemente según el sexo. En el duodeno, se ha comprobado que los niveles de Cu/Zn-SOD para hombres son de 471 UI/mg de proteína, mientras que en las mujeres, este valor se reduce a 311 UI/mg. Tampoco existe una relación entre los niveles de SOD extra e intracelular. En hombres la EC-SOD alcanza unos valores medios de 14 UI/mg de proteína y en mujeres estos valores son de 18 UI/mg.<sup>210</sup>

La Mn-SOD se encuentra sobre todo en las mitocondrias. Tiene un peso molecular entre 32 y 40 KD y cataliza la misma reacción que la Cu/Zn-SOD, aunque disminuye su actividad a pH elevados por encima de 7. Su concentración en duodeno, varía



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

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

La SOD es la enzima más importante de los sistemas de detoxificación. Se halla ampliamente distribuida en todas las células de la economía y transforma dos moléculas de radical superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ) en peróxido de hidrógeno.



La reacción de dismutación que provocan es muy rápida, con reacciones de  $2 \cdot 10^9$  moles por segundo. La enzima tiene un punto isoeléctrico entre 4,6 y 6,8 con una carga neta negativa la cual, aunque debería actuar como una barrera electrostática para la entrada de aniones superóxido, en realidad acelera enormemente la reacción de catálisis. Estudios cristalográficos demuestran que la estructura de la Cu/Zn-SOD presenta en la superficie un túnel de entrada cargado positivamente con la existencia de 8 residuos aminoacídicos de tipo lisina, los cuales crean un campo magnético que atrae y guía a los aniones superóxido. Lo más probable, es que estas características impidan una colisión con la enzima, orientando los aniones directamente al centro activo.

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

El mecanismo catalítico de la enzima, consiste en la reducción y reoxidación del anión superóxido, el cual es generado durante el metabolismo celular normal y mantenido en muy bajas concentraciones por la SOD. Estos aniones son reducidos y se forma una molécula mucho menos reactiva que es el peróxido de hidrógeno, el cual es rápidamente destruido por la catalasa.<sup>211</sup>

En diferentes estudios realizados *in vivo* se han encontrado diferencias en la actividad de la SOD entre las células normales y las cancerosas, manifestadas por una disminución frecuente de la actividad Cu/Zn-SOD y constante de la actividad Mn-SOD en estas últimas, disminución que se ha observado tanto en las células tumorales espontáneas, como en las células tumorales trasplantadas y en los tumores inducidos por virus, tanto *in vitro* como *in vivo*.<sup>212</sup>

En relación a la isquemia intestinal, trabajos experimentales<sup>213</sup> demuestran que en la isquemia mesentérica hay una disminución significativa de los valores de SOD producida en la pared intestinal en relación a la producida en animales no isquémicos. Este hecho puede justificar el daño tisular originado por la revascularización después de un tiempo de isquemia.

## 2 INTERROGANTES, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DE INVESTIGACIÓN

### 2.1 Interrogantes

El planteamiento de la investigación suscitó los siguientes interrogantes:

1. Al provocar una situación isquémica seguida de repermeabilización en el territorio irrigado por la AMC, ¿hay relación entre el tiempo de isquemia intestinal y la mortalidad en conejos?
2. En esta situación de isquemia-reperusión, ¿aumenta de forma mensurable la peroxidación lipídica debida a la producción de radicales libres de oxígeno?
3. El empleo de una sustancia antioxidante como la superóxido dismutasa, ¿disminuirá la producción de estos radicales libres?
4. El empleo de superóxido dismutasa, ¿aumentará la supervivencia de los animales en situaciones de isquemia-reperusión de la AMC?
5. Las lesiones tisulares producidas como consecuencia de la isquemia-reperusión, ¿están relacionadas con el tiempo de isquemia?
6. ¿Disminuirían estas lesiones por la acción de sustancias antioxidantes como la superóxido dismutasa?
7. ¿Sería útil el diseño de esta investigación como modelo experimental para posteriores investigaciones?

### 2.2 Hipótesis

En un intento por responder a las cuestiones planteadas se formularon las siguientes hipótesis:

#### 2.2.1 Hipótesis conceptual

La isquemia-reperusión intestinal provoca la peroxidación lipídica en las membranas celulares por la producción de radicales libres, efecto que puede disminuirse mediante el empleo de sustancias antioxidantes.

#### 2.2.2 Hipótesis estadísticas:

##### A. Hipótesis nulas:

- Los distintos tiempos de oclusión de la AMC, no influyen en la mortalidad de los animales.
- La isquemia-reperusión, no afecta a las membranas celulares y por tanto no hay peroxidación lipídica derivada de su acción.
- Las sustancias antioxidantes como la superóxido dismutasa, no tienen ninguna acción sobre la producción de radicales libres del oxígeno, en los procesos de isquemia-reperusión intestinal en conejos.
- La superóxido dismutasa, no incrementa la supervivencia, en los procesos de isquemia-reperusión intestinal en conejos.
- Las situaciones de isquemia mesentérica seguidas de repermeabilización, no producen alteraciones histopatológicas en el intestino.
- En el caso de que se produjera alguna lesión histopatológica en el proceso de isquemia reperusión, la superóxido dismutasa no disminuiría la intensidad de éstas.

- El diseño de esta investigación no tiene utilidad como modelo experimental para posteriores investigaciones..

### B. Hipótesis alternativa

- Rechazo de las hipótesis nulas

### 2.3 Objetivos

Sobre la base del desarrollo de un modelo experimental de isquemia-reperfusión en conejos mediante el clampaje de la arteria mesentérica craneal, el presente estudio tiene como fin rechazar o aceptar las hipótesis nulas, planteando los siguientes objetivos fundamentales:

- Demostrar la posible relación existente entre la mortalidad y el tiempo de obstrucción de la AMC.
- Comprobar que en los procesos isquémicos seguidos de repermeabilización del territorio intestinal, provocan un incremento de la peroxidación lipídica de estos tejidos como consecuencia de la acción de los radicales libres del oxígeno.
- Comprobar si el empleo sustancias antioxidantes y en concreto la enzima superóxido dismutasa es capaz de revertir este efecto sobre la peroxidación lipídica.
- Comprobar si el empleo de superoxido dismutasa mejora la supervivencia en animales sometidos a isquemia-reperfusión.
- Comprobar el grado de alteraciones morfo-histológicas que la isquemia-reperfusión provoca en la mucosa del intestino delgado.
- Comprobar si la superoxido dismutasa es capaz de disminuir las lesiones histológicas producidas por la isquemia - reperfusión
- Comprobar la utilidad del método de producción de isquemia - reperfusión intestinal

Se pretende por otra parte verificar si los resultados de este estudio coinciden o no con los de otros investigadores contribuyendo a aclarar las diferencias encontradas entre varios de estos modelos experimentales.

### 3 DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

#### 3.1 Instalaciones, animales y material

##### 3.1.1 Instalaciones

La presente investigación se desarrolló íntegramente en el Servicio de Medicina y Cirugía Experimental del Hospital Militar Central Gómez Ulla, concertado como hospital universitario de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid. Del Servicio de Anatomía Patológica de este hospital se ha recibido el apoyo necesario para el estudio histopatológico de las piezas anatómicas obtenidas a lo largo del estudio.

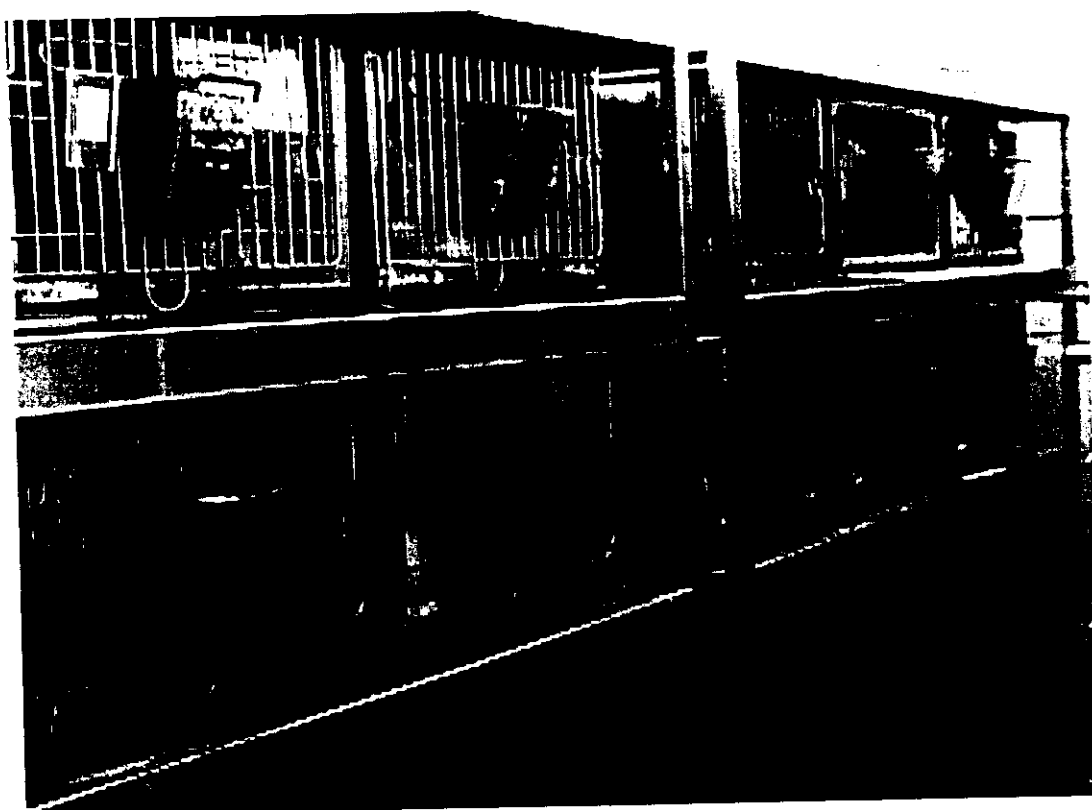


Fig 3: Conejos Nueva Zelanda utilizados en la experiencia. Animalario del Servicio de Medicina y Cirugía Experimental. Hospital "Gómez Ulla". Madrid.

##### 3.1.2 Animales

Se utilizaron 155 conejos Nueva Zelanda de ambos sexos, procedentes del animalario del mencionado Servicio de Medicina y Cirugía Experimental, con un peso medio de 2896 g ( $\sigma = 154$ ; rango 2742-3050 g). En todo momento se observaron las normas de la directiva 86/609 de la Unión Europea sobre alojamientos y cuidados a los animales de experimentación, así como el Real Decreto 223/1988 sobre Protección de Animales de experimentación, que transcribe esta directiva al ordenamiento jurídico

nacional.<sup>214, 215</sup>

#### *Cuidados y alimentación*

Los conejos se alojaron en jaulas individuales de acero inoxidable de 0.64 x 0.47 x 0.36 metros, con iluminación natural y artificial y temperatura controlada entre 22 °C y 25 °C.

La alimentación empleada durante el ensayo consistió en pienso especial para conejos (Piensos Hersanca), suministrado en tolvas a libre disposición de los animales. El pienso fue controlado para comprobar que su contenido en vitamina E no superase la cantidad de 100 mg/100 gr, ya que una cifra superior podría tener un cierto efecto protector contra la acción de los radicales libres producidos durante la fase de isquemia - reperfusión.

La ingesta de agua también *ad libitum*, se realizó por medio de frascos - biberones de 500 ml de capacidad acoplados a las jaulas, renovándose el agua diariamente.

La limpieza de estos recintos se realizó diariamente por el personal encargado del animalario, manteniéndose dentro de los estándares del servicio de acuerdo con las buenas prácticas de manejo de animales.

#### 3.1.3 Material empleado

##### *Material de anestesia*

- Caja de contención de metacrilato en forma de U con un sistema de guillotina que cierra un orificio por donde se exterioriza la cabeza del animal quedando inmovilizado y sin riesgo de sufrir lesiones o traumatismos. (fig. 11).
- Catéteres Abbocath-T 22G x 19 mm, y jeringuilla de 2 ml para la inducción anestésica por vía intranasal. (fig. 12).
- Mascarilla de plástico para acomodarla al hocico del animal y permitir la administración de los gases anestésicos durante el tiempo quirúrgico (fig. 13).
- Equipo anestésico con respirador volumétrico tipo Boyle® Internacional (Ohio, E.E.U.U) equipado con toma de gases de oxígeno y protóxido de nitrógeno y vaporizador para isofluorano.

##### *Medicación anestésica*

- Premedicación e inducción: mezcla de ketamina (Ketolar® 50 mg/ml) y xilazina (Rompun® 20 mg/ml), a partes iguales.
- Mantenimiento: mezcla de gases oxígeno y Protóxido de nitrógeno, más isofluorano (Forane®) vaporizado.

##### *Material quirúrgico*

- General: guantes, mascarillas, lencería, batas, paños, apósitos etc., todo ello convenientemente esterilizado mediante autoclave de vapor de agua u óxido de etileno.
- Máquina de rasurar (Professional Animal Grooming Model A-S. Oster Division of Sunbeam Corp. Milwaukee, Wisconsin), para depilar el abdomen del animal
- Material de preparación y asepsia del campo quirúrgico: tintura antiséptica a base de povidona yodada (Betadine®).
- Caja estándar de laparotomía: pinzas de disección y hemostáticas de diversos tamaños y tipos, tijeras de corte y disección, separador abdominal, portaagujas

etc.

- Mango de bisturí y hojas desechables Sterilklinge y "BB-520", para la incisión de la piel del abdomen.
- Electrocoagulador monopolar (modelo Elecktrotom 500 B. Martin. Model System 2000), para corte y hemostasia.
- Recipiente inoxidable estéril de 1/2 litro de capacidad para humedecer compresas en suero fisiológico.
- Gomas *Vessel-loop*, para el manejo atraumático de vasos sanguíneos.
- Clamp vascular atraumático (Spring clip Aesculap), para ocluir la AMC (fig. 14).
- Pinza de disección (Lower-Medicon), que permite controlar la AMC con el *Vessel-loop*.
- Material de sutura: daxon de 2/0 para cerrar pared abdominal y seda de 2/0 para cerrar la incisión dérmica.
- Reloj de pared con minutero y segundero para controlar el tiempo de isquemia.

#### *Material clínico*

- Catéter venoso Abbocath-T del nº 24, para canalizar la vena marginal de la oreja (fig. 16), usado para la infusión endovenosa de superóxido-dismutasa.
- Microinyector Meditrónica modelo A-99 para administrar soluciones volumétricas pequeñas repartidas en un determinado periodo de tiempo.
- Jeringuillas de 2 ml, acoplables al microinyector y a los catéteres..
- Superóxido dismutasa (SOD) de Cu y Zn, marca Sigma, procedente de eritrocitos de bovino, presentada en viales de 3000 U.I., liofilizada, con un 98% de proteína y conservada en solución de PBS (fosfato potásico).

#### *Material para la necropsia*

*Eutanasia:* Thiopental sódico (tiobarbital 1 gramo)

*Material e instrumental quirúrgico:*

- Formaldehído al 10%.
- Recipientes estériles de recogida de muestras de orina (Anaclin®), de 100 ml de volumen, y tubos de ensayo de material plástico, con tapón a rosca para guardar las piezas de necropsia.
- Rotulador indeleble para señalar los recipientes de recogida de muestras y tubos de ensayo.
- Etiquetas de papel para pegarlos en los recipientes y tubos de ensayo.
- Mesa de necropsia.
- Tijera curva de mediano tamaño, para cortar tejidos blandos.
- Pinzas grandes para la disección general del animal.
- Tijeras de Metzenbaum para la apertura del tubo digestivo.
- Batea (1 litro de capacidad) con suero fisiológico para lavar las piezas de necropsia.
- Balanza electrónica Sartorius®, Mod. 1405 MP-8, con una precisión de dos decimales (0.00 gr), para pesar las piezas de necropsia.

#### *Material de laboratorio*

Para el estudio de la peroxidación lipídica en los segmentos intestinales mediante el test del ácido tiobarbitúrico (TBA) se empleó el siguiente material:

- Cristalería habitual de laboratorio clínico: pipetas, probetas, matraces...

- Balanza automática electrónica de precisión Mini-Moba®, con precisión de mg, para preparar las muestras de los segmentos intestinales.
- Homogeneizador de vidrio Teen-Broek.
- Centrífuga de laboratorio.
- Micropipetas de 140 y 33  $\mu$ l.
- Espectrofotómetro con capacidad de lectura en la banda de 535 nm de longitud de onda.

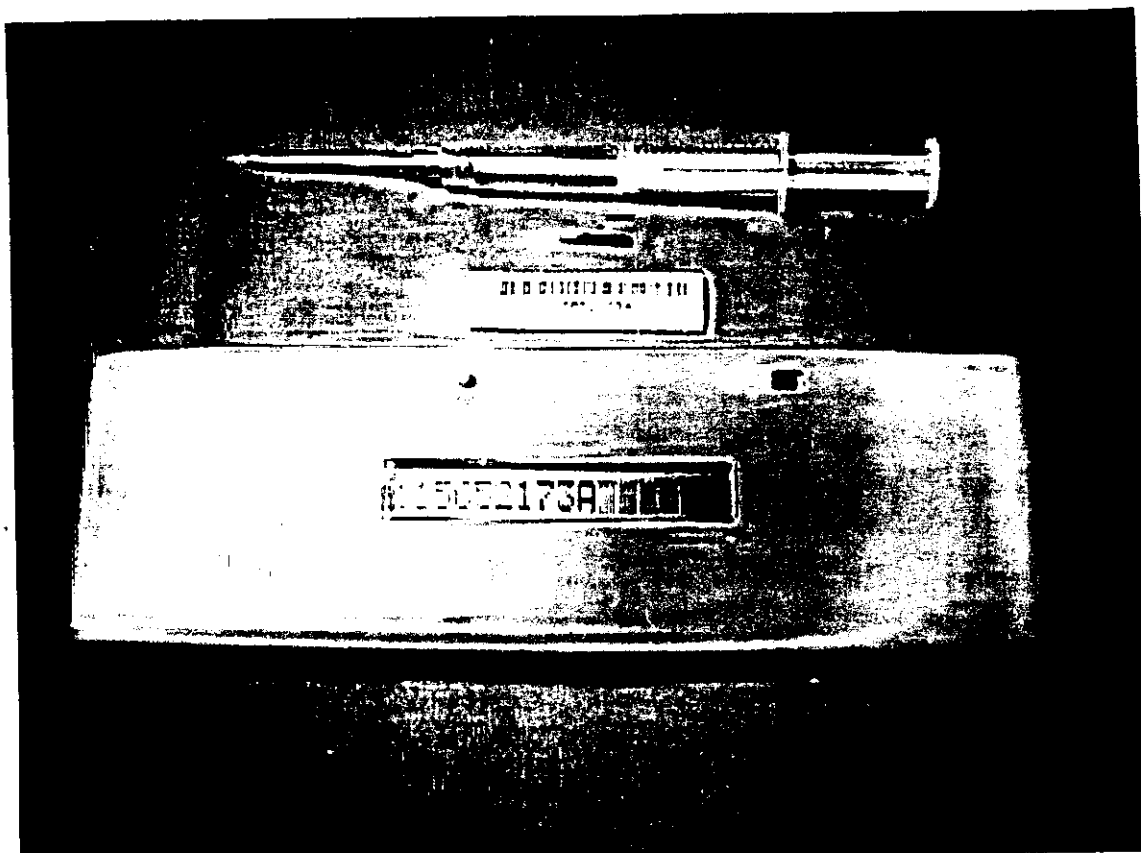


Fig 4: Sistema de identificación por microchip Avid

- Reactivos
  - Ácido pirogálico: Pirogalol.- Compuesto químico que se oxida rápidamente en presencia de la luz cuando está diluido.
  - Ácido gálico.- No es imprescindible para el ensayo, aunque al ser antioxidante del pirogalol es conveniente utilizarlo como patrón para compararlo con la muestra problema.
  - Hidróxido sódico (NaOH) 1 N.
  - Agua destilada a temperatura ambiente.
  - Hielo en cubitos

Para la realización del test del ácido tiobarbitúrico (TBA) fue necesario realizar las siguientes soluciones:

- Ácido fosfórico al 1% en agua destilada.
- Ácido tiobarbitúrico (TBA) al 0.6 % en agua destilada.
- Butil hidroxil tolueno (BHT) al 0,01 % en etanol.

Las soluciones de TBA y ácido fosfórico se prepararon el día del ensayo calentando para facilitar la disolución.

#### *Material para los estudios histopatológicos*

- *Incluser* automático de parafina Milles Scientific. Tissue - Tek Vip.
- *Microtomo* Reichert - Jung. Mod 2035 Boicut Leica instruments GmbH.
- *Microscopio óptico* Nikon optifot HFX-II A.
- *Cámara fotográfica* para las preparaciones Nikon Optifot FX 35- UA.

#### *Material diverso*

- Balanza semiautomática Arisó de 0 a 5 Kg para pesar los animales.
- Sistema electrónico de identificación Avid® consistente en microchips de identificación individual implantados por medio de una jeringuilla especial para sólidos por vía subcutánea y que pueden en todo momento ser leídos a distancia mediante dispositivo electrónico.
- Ordenador personal, para el análisis de datos con diversos paquetes comerciales de software para proceso de textos (Microsoft Word), hojas de cálculo (Microsoft Excel), gráficos (Microsoft Graph), y estadística (SPSS).

## **3.2 Método**

### **3.2.1 Series experimentales**

Los 155 animales empleados fueron distribuidos aleatoriamente para el estudio en las siguientes series:

#### *Estudio de supervivencia en animales sometidos a isquemia - reperfusión mesentérica*

- Serie I (S). Serie Operación Simulada (*sham operation*). Formada por 20 conejos para el estudio del modelo experimental; fueron sometidos a laparotomía y disección del tronco arterial mesentérico, dejando la cavidad abdominal abierta durante 120 minutos, aunque sin clampaje de la arteria, procediendo posteriormente al cierre de la herida operatoria.
- Serie II(15'). Serie isquémica de 15 minutos. Formada por 20 conejos para el estudio del modelo experimental de isquemia mesentérica mediante laparotomía y disección del tronco arterial mesentérico, con clampaje durante 15 minutos de la AMC.
- Serie III (30'). Serie isquémica de 30 minutos. Formada por 20 conejos para el estudio del modelo experimental de isquemia mesentérica mediante laparotomía y disección del tronco arterial mesentérico, con clampaje durante 30 minutos de la AMC.
- Serie IV (60'). Serie isquémica de 60 minutos. Formada por 20 conejos para el estudio del modelo experimental de isquemia mesentérica mediante laparotomía y disección del tronco arterial mesentérico, con clampaje durante 60 minutos de la AMC.
- Serie V (120'). Serie isquémica de 120 minutos. Formada por 20 conejos para el estudio del modelo experimental de isquemia mesentérica mediante laparotomía y disección del tronco arterial mesentérico, con clampaje durante 120 minutos de la AMC.



### 3. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN: MATERIAL Y MÉTODO

#### *Estudio comparativo de la supervivencia en situación de isquémica - reperfusión mesentérica, con y sin infusión de SOD*

- Serie VI (SOD-1). Formada por 10 animales a los que les fue practicada una laparotomía media y provocada una isquemia en la región mesentérica mediante el clampaje durante 60 minutos de la AMC, seguida de otros 60 minutos de reperfusión. Inmediatamente antes de la retirada del clamp para permitir la reperfusión, se administró una primera dosis de 200 U/kg de SOD disuelta en solución salina fisiológica (SS) en la proporción de 600 U/ml, en bolo intravenoso (IV), seguida de una segunda inyección IV de igual dosis (200 U/kg), administrada con un microinyector, durante los primeros diez minutos tras retirar el clamp.
- Serie VII (SOD-2). Formada por 10 animales a los que les fue practicada una laparotomía media y sometidos a 60 minutos de isquemia e igual tiempo de reperfusión. Justo antes de retirar el clamp que producía la isquemia y durante los diez minutos inmediatos posteriores, se administraron respectivamente dos dosis de 0,33 ml/kg de solución salina fisiológica, la primera en bolo IV y la segunda aplicada con microinyector regulado a 10 minutos.

#### *Estudio de la peroxidación lipídica en segmentos intestinales de animales sometidos a isquemia-repermeabilización con y sin tratamiento con superóxido dismutasa (test del TBA)*

- Serie VIII (TBA-C). Operación simulada, formada por 5 animales que fueron anestesiados durante 60 minutos, a los que se practicó una laparotomía sin provocar isquemia, se les tomó una muestra de intestino de 5 cm de la porción media de yeyuno, según la técnica descrita en 3.2.3 (Técnica quirúrgica; Extracción intraquirúrgica de segmentos intestinales), y finalmente fueron eutanasiados intraoperatoriamente.
- Serie IX (TBA-SOD). Serie isquémica, formada por 15 animales a los que se les practicó una laparotomía media y provocó una isquemia en la región mesentérica por clampaje de la AMC durante 60 minutos, seguida de otros 60 minutos de reperfusión. Inmediatamente antes de la retirada del clamp para permitir la reperfusión, se administró SOD antes y después de la reperfusión, con las mismas dosis y método que el reseñado en la serie VI. Al final de los 60 minutos de reperfusión, se les tomó una muestra de 5 cm de la porción media de yeyuno, con la técnica descrita en 3.2.3 y finalmente fueron eutanasiados intraoperatoriamente.
- Serie X (TBA-SS). Formada por 15 animales sometidos a isquemia en las mismas condiciones y con el mismo método que la serie IX (60 min I + 60 min R), excepto que se substituyó la solución de SOD en SS por únicamente SS, en volumen equivalente.

Las muestras tisulares de estas tres series VIII, IX y X, se obtuvieron para determinar, por medio del test del TBA, los valores de MDA, estableciendo los niveles de peroxidación lipídica basales, con tratamiento con SOD + SS y únicamente con SS respectivamente.

El resumen de la distribución de animales en series experimentales se muestra en la siguiente tabla:

### 3. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN: MATERIAL Y MÉTODO

ESTUDIO	SERIES		Descripción	Nº animales
	Nº	Alias		
Supervivencia	I	S	Operación Simulada (Sham)	20
	II	15'	Isquemia 15 minutos	20
	III	30'	Isquemia 30 minutos	20
	IV	60'	Isquemia 60 minutos	20
	V	120'	Isquemia 120 minutos	20
Ens. Clínico de Supervivencia con SOD	VI	SOD-1	Isquemia 60 min + SOD en SS	10
	VII	SOD-2	Isquemia 60 min + SS	10
Peroxidación lipídica con SOD: Test TBA	VIII	TBA-C	Test del TBA op. Simulada	5
	IX	TBA-SOD	Test del TBA (isquemia + SOD en SS)	15
	X	TBA-SS	Test del TBA (isquemia + SS)	15
TOTAL				155

#### 3.2.2 Metodología anestésica

Antes de ser sometidos al procedimiento quirúrgico, cada animal fue escogido entre varios del lote, siendo reconocido individualmente una semana antes para descartar aquellos que presentasen algún tipo de patología, alteración de constantes fisiológicas propias de su especie o defecto anatómico. Durante este periodo, todos los animales dispusieron de comida y bebida *ad libitum*, restringiéndose la ingesta de alimento sólido desde la tarde anterior a la intervención. El día de la intervención se comprobó el peso y se volvió a chequear el estado de salud de los animales volviendo a descartándose a los que no pasaron el reconocimiento. No se utilizó ninguna medicación previa a la anestesia.

Procedimiento: Introducido el conejo en la caja de contención para facilitar el manejo, se dejaba exteriorizada únicamente la cabeza, administrándose por vía endonasal, según el peso una dosis única de la mezcla inductora (ketamina + xilazina), de 1 a 1,5 ml por animal (15 mg/kg ketamina + 6 mg/kg xilazina), por medio de un catéter Abbocath-T 24G x 19 mm, desprovisto de su fiador metálico, utilizando únicamente la vaina exterior de teflón, para evitar posibles lesiones en la mucosa nasal debido a eventuales movimientos involuntarios del animal. La instilación nasal se realizó lentamente para prevenir el reflejo estornutatorio por irritación nasal.

El mantenimiento anestésico se hizo con anestesia gaseosa con isoflurano (Forane®), utilizando un respirador volumétrico conectado a una mascarilla aplicada a la cavidad oral y nasal del conejo. Todo el proceso anestésico se realizó en circuito semiabierto (sin recuperación de gases respirados), con un flujo de oxígeno de 2 litros/minuto combinado con protóxido de nitrógeno al 40 %, e isoflurano a concentración de 1.5 - 2.5% según demanda y respiración espontánea.

#### 3.2.3 Metodología quirúrgica

##### *Preparación del animal:*

Tras la comprobación del estado anestésico del animal, se rasuró la superficie abdominal, desde un punto situado cranealmente 5 cm al apéndice xifoides hasta la región pubiana en sentido longitudinal, y transversalmente en extensión suficiente para permitir un amplio campo estéril. Los restos de pelos, se eliminaron por aplicación

### 3. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN: MATERIAL Y MÉTODO

repetida de una banda de esparadrapo, dejando limpia toda la superficie abdominal..

Las cuatro extremidades del animal se rodeaban con vendas de gasa que se fijaban a la mesa, presentando una posición quirúrgica en decúbito supino. Las aletas móviles de la mesa se colocaban en ligera posición de V.

La asepsia del campo quirúrgico, se practicó mediante varios pases desde la línea media hacia el exterior con distintas compresas estériles impregnadas en povidona yodada.

#### *Preparación del personal y del equipo:*

Siguiendo los protocolos quirúrgicos habituales, todo el personal que intervino en las intervenciones (cirujano, ayudante, instrumentista) se cubrió la cabeza con gorro



Fig. 5: Inducción anestésica por vía endonasal

y la cara con mascarilla, procediendo después al lavado quirúrgico de manos y antebrazos con agua y jabón antisépticos, cubriendo a continuación tronco y extremidades superiores con bata estéril y manos con guantes asimismo estériles.

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

*Técnica quirúrgica*

Con el animal en decúbito supino, se limitó el campo quirúrgico con paños y sábanas estériles, practicando a continuación una laparotomía media, xifopubiana, con bisturí de hoja desechable para cortar la piel, electro-bisturí para seccionar los músculos rectos con una hemostasia cuidadosa de la zona y seccionando el peritoneo con tijera.

En un segundo tiempo, se colocó el separador abdominal interponiendo sendas compresas de gasa entre sus partes metálicas y el peritoneo del animal, situando el mango en posición caudal, para evitar compresiones en la caja torácica y abriendo sus valvas lo suficiente para permitir la manipulación abdominal. Para evitar erosiones intestinales y reducir la pérdida de líquido por evaporación, todo el separador se recubría con compresas humedecidas en suero fisiológico a 37°C

A continuación se extrajo el paquete visceral abdominal, colocando dos nuevas compresas húmedas y escurridas dobladas por la mitad, para que las manos del ayudante sujetasen y rechazasen el estómago y el bazo en dirección cefálica y las asas intestinales hacia el lado del cirujano.

Después de observar la vena renal izquierda y tomando como referencia la



Fig. 6: Disección y aislamiento de la arteria mesentérica craneal

glándula adrenal del mismo lado, el cirujano rechazaba con los dedos, por un lado el colon descendente hacia la línea media y por otro la glándula adrenal en sentido opuesto, para proceder después a incidir el retroperitoneo en su mitad con tijeras de Metzenbaum, y así observar el latido de la arteria mesentérica craneal, junto a su origen en la aorta abdominal.

Con una pinza de disección sujetando la adventicia de la AMC, y un disector

### 3. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN: MATERIAL Y MÉTODO

acodado se disecaba cuidadosamente la arteria en un tramo de 0,5 - 1 cm, suficiente para la posterior introducción del microclamp procediendo al despegamiento de la cara posterior arterial, con sumo cuidado para no perforarla. En caso de pequeñas roturas de los vasos linfáticos mesentéricos, estos eran coagulados con hemostasia eléctrica y con presión manual apoyada en gasas. Una vez despegada la pared posterior de la AMC, se pasaban dos cintas *vessel-loop* por medio de una pinza para poder elevar dicha arteria tirando de las mismas y de esa forma colocar manualmente el clamp vascular atraumático para producir la isquemia mesentérica. Después de pinzar la AMC se comprobó la isquemia, por la ausencia de latidos y cambios en la coloración de los troncos mesentéricos y en los vasos rectos de las asas intestinales, procediendo en este momento a poner en marcha el reloj de pared del quirófano, para medir el tiempo de la

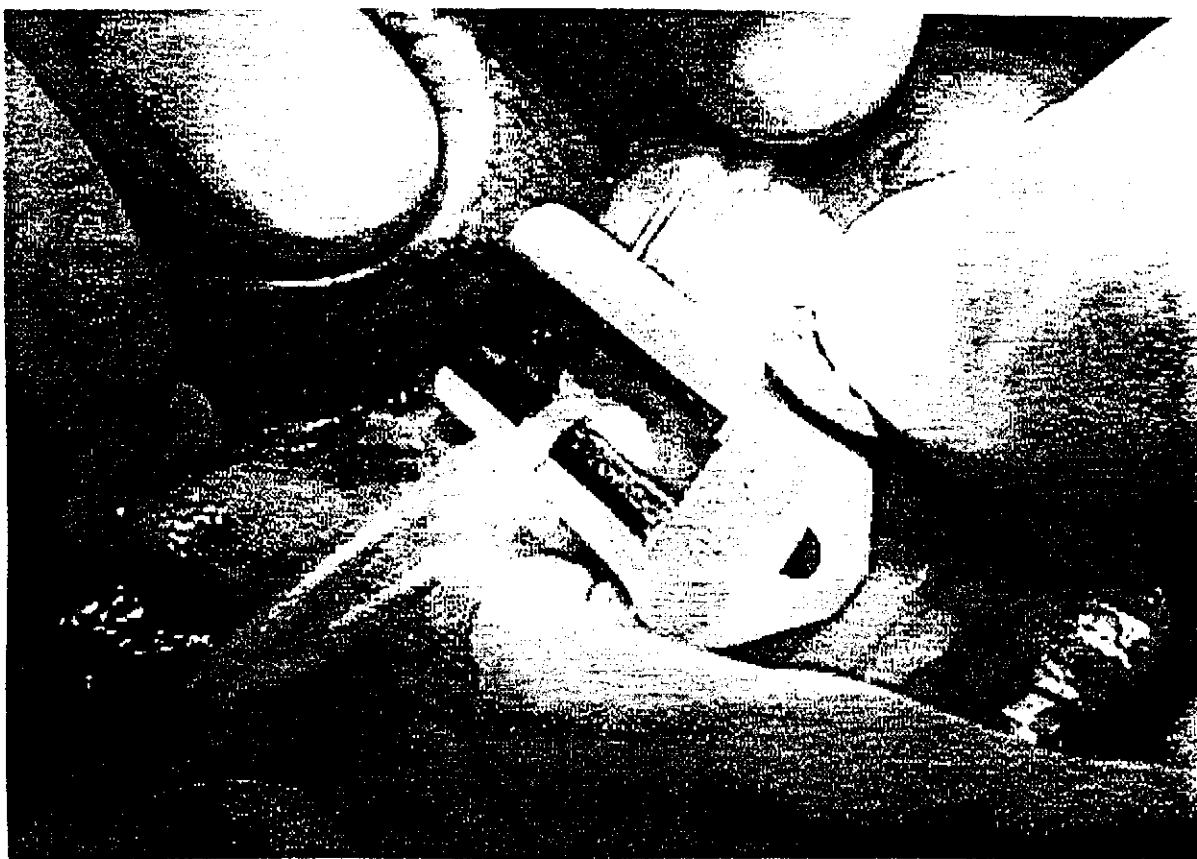


Fig. 7: Clampaje de la arteria mesentérica superior

isquemia.

Durante el tiempo de isquemia, se retiraba el separador del abdomen, manteniendo las asas intestinales cubiertas con compresas humedecida, para eliminar pesos innecesarios en el animal y evitar pérdidas de líquidos.

Con posterioridad, se procedió a la recuperación del animal o bien a la toma de muestras según los siguientes esquemas:

- *En las series destinadas a los estudios de supervivencia*, al final del tiempo de isquemia marcado por el reloj, se retiraba el clamp vascular y las cintas *vessel-loop* manualmente con una ligera tracción de dentro a fuera, comprobando la reperfusión de los vasos mesentéricos por el cambio de color de las asas intestinales y la recuperación del latido arterial en dichos vasos. Antes de comenzar a cerrar la herida

quirúrgica se valoraba por observación directa la presencia de gas en el intestino, especialmente en la porción delgada y en el ciego, así como la aparición de focos hemorrágicos de color rojo oscuro, en la luz intestinal del intestino delgado, puntiformes en forma de manchas aisladas o en sabana, adquiriendo este aspecto oscuro todo un tramo intestinal. Después de comprobar la correcta hemostasia, se procedía a cerrar el peritoneo parietal anterior y los músculos rectos del abdomen en un solo plano con Dexon del 2/0 con aguja circular en sutura continua, y la piel con seda del 2/0 con aguja recta triangular, en sutura discontinua. La herida quirúrgica se cubría con tintura antiséptica aplicando colodión estéril como apósito líquido, para proteger la herida. Antes de proceder a despertar a los animales y aprovechando su estado anestésico se les implantó un microchip subcutáneamente en la región



**Fig. 8:** Aspecto del intestino y peritoneo antes del pinzamiento y obliteración de la AMC

cervical, próximo a la base de la oreja izquierda con el fin de poderlos identificar electrónicamente en cualquier momento de la experiencia por medio del lector electrónico mencionado en el apartado de material. Una vez concluido el acto quirúrgico los animales se trasladaban a la sala anexa, hasta la recuperación del estado de vigilia. Luego se trasladaban al animalario alojándolos en jaulas individuales durante las 11 semanas que duró la experiencia en las series de supervivencia. A los siete días de la intervención, se comprobó la evolución de la herida abdominal externa, eliminando los puntos de sutura de seda de la piel, limpiando dicha herida y tras aplicar un antiséptico, se reintegraba el animal a su jaula.

- *En las series destinadas a la extracción intraquirúrgica de segmentos intestinales para realizar el test del TBA, una vez transcurrido el tiempo de isquemia y reperfusión de la AMC y con el animal aún en condiciones de anestesia quirúrgica, se pinzaba un segmento de yeyuno, en una longitud de 5 cm, con doble pinza para cada extremo, es decir empleando 4 pinzas, resecaando el mesoperitoneo, pinzando o*



**Fig. 9:** Comprobación del estado isquémico. Ausencia de riego sanguíneo después del pinzamiento de la AMC

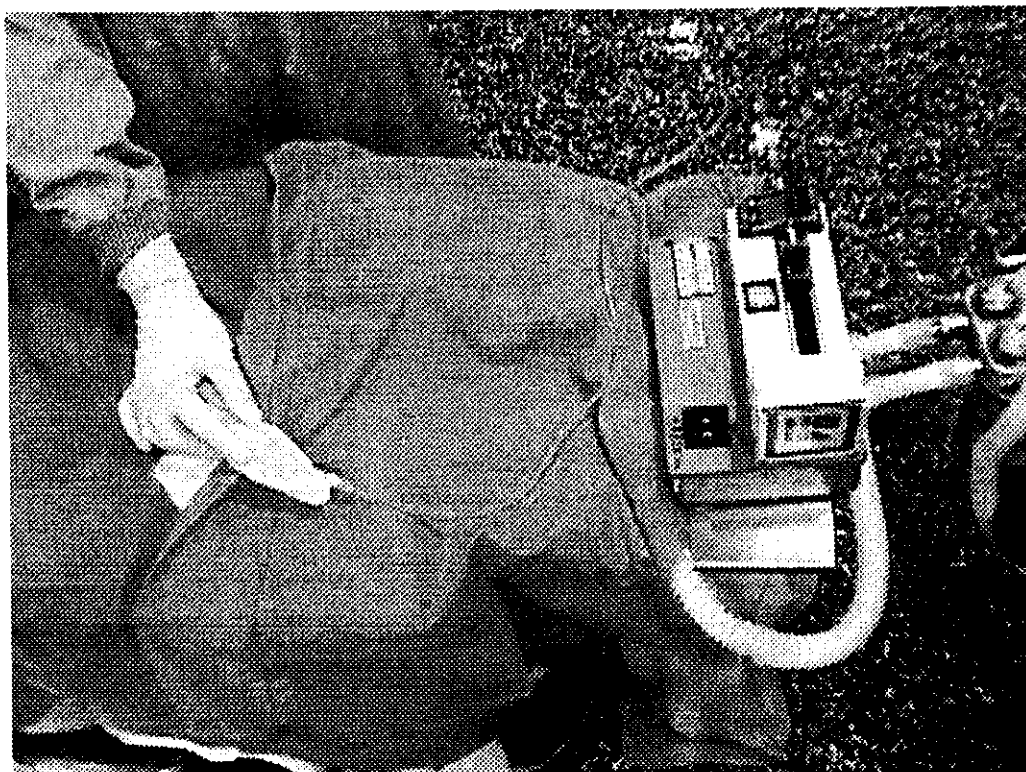
coagulando cualquier vaso sangrante y seccionando entre las dos pinzas con tijera para retirar el segmento intestinal, junto a las dos pinzas de cada extremo dejando las otras dos en el intestino, para evitar vertidos fecales a la cavidad abdominal. Una vez extraído el segmento, en una zona auxiliar se preparaba la muestra, quitando las pinzas que obliteraban los extremos, eliminando el contenido fecal por medio de una jeringuilla sin aguja cargada con solución salina fisiológica introducida por uno de sus extremos, aclarando la luz intestinal con nueva solución salina fisiológica e introduciendo el segmento en un frasco de toma de muestras, el cual era inmediatamente rotulado para su posterior identificación y llevado a congelación a  $-28^{\circ}\text{C}$ . Todo este procedimiento se realizó en el menor intervalo de tiempo posible, para evitar alteraciones en las muestras. Concluida la extracción de las muestras intestinales, se procedió a la eutanasia del animal según la técnica descrita en 3.2.7. Este mismo procedimiento de toma de muestras, fue practicado también en los animales de la serie VIII (TBA-C) tras la operación simulada

#### 3.2.4 Metodología clínica

Tras el procedimiento quirúrgico, los animales fueron introducidos en jaulas

individuales, donde las primeras 72 horas se realizó un seguimiento de las condiciones fisiológicas vitales comprobando la ingestión de agua y alimentos y la emisión y aspecto de las heces.

Posteriormente y durante las 11 semanas que duró el estudio, se realizó la observación clínica de todos los animales sometidos a estudio de supervivencia anotando los tiempos de fallecimiento y recogiendo los cadáveres para proceder a su



**Fig. 10:** Infusión I.V. de superóxido dismutasa durante la reperusión

necropsia con la mayor prontitud.

En ningún caso se aplicó durante este periodo terapia alguna, medicamentosa o electrolítica.

### 3.2.5 Infusión endovenosa de superóxido dismutasa en solución salina

Empleamos superóxido-dismutasa de Cu y Zn, de marca Sigma procedente de eritrocitos de bovino, presentada en viales de 3000 U.I., liofilizada y con un 98% de proteína. Los viales se prepararon con arreglo al siguiente protocolo aplicado a todos los animales de las series que se indican: Se disuelve un vial de SOD (3000 unidades) en 5 ml de solución salina fisiológica (SS) obteniendo una concentración de 600 UI/ml. Este vial se conserva en congelación a  $-28^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su uso.

15 minutos antes del tiempo previsto para la retirada del microclamp que provoca la isquemia sobre la AMC, se canaliza mediante un catéter Abocath del nº 24, una de las venas marginales de la oreja del conejo. Esta operación se facilitaba mediante la aplicación sobre la piel de  $\beta$ -limoneno para conseguir una mayor ingurgitación de los vasos superficiales.



### 3. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN: MATERIAL Y MÉTODO

En cada conejo se inyectaron dos dosis de 200 UI/kg de peso de SOD disueltas en SS, la primera administrada con jeringuilla en bolo endovenoso inmediatamente antes del desclampaje de la AMC, y la segunda, administrada mediante microinyector de precisión, durante los 10 primeros minutos de reperfusión, contados a partir de la retirada del clamp.

Estas dosis se aplicaron tanto para las series del estudio de supervivencia con SOD (serie VI) como para las del estudio de la peroxidación lipídica con SOD (serie IX).

A los animales de las series VII y X se les aplicó únicamente solución salina fisiológica, inyectándoles dos dosis de 0,33 ml/kg, la primera en bolo y la segunda con microinyector, inmediatamente antes de la retirada de la pinza de oclusión de la AMC y durante los primeros 10 minutos posteriores respectivamente.

#### 3.2.6 Estudio de la peroxidación lipídica en segmentos intestinales

Se emplearon tres series; la serie VIII (TBA-C) de 5 animales (TBA-C), utilizada como control para averiguar los niveles de MDA en los segmentos intestinales obtenidos de los animales no sometidos a isquemia, aunque sí al resto del proceso quirúrgico (operación simulada).

La toma de muestras se hizo a cada conejo, según lo expresado en 3.2.3. Metodología quirúrgica.

Otras dos series, la IX y X (TBA-SS y TBA-SOD), de quince animales cada una, fueron sometidas a laparotomía media y clampaje de la AMC, produciendo una isquemia intestinal de 1 hora de duración. Al término de esta se administró a la serie IX una solución de SOD en SS y a la serie X, únicamente solución salina según la metodología descrita en 3.2.5, permitiendo una reperfusión de 1 hora tras retirar el clamp. Al final de esta hora, los animales fueron sacrificados, tomando una muestra de 5 cm de pared intestinal de la porción central del yeyuno, para su análisis mediante el test del TBA, según el método de Ohkawa *et al*, que se describe a continuación:

1. Pesar en balanza 50 mg de pared intestinal y depositarla en un homogeneizador Ten-Broek preenfriado a -20°C.
2. Agregar 1 ml de tampón fosfato de pH 7, macerando hasta homogeneizar la mezcla.
3. Centrifugar a 5500 rpm durante 20 minutos a temperaturas entre 0 y 5°C.
4. En un tubo de ensayo se depositan 140 µl del sobrenadante y se agrega 1 ml de ácido fosfórico al 1% con el fin de detener la producción de RL, 33 µl de butilhidroxi-tolueno (BHT) diluido al 0,01% en alcohol etílico para impedir la neoformación de RL y 0,6 ml de TBA al 0,6% diluido en agua destilada, como reactivo de color frente al MDA, sometiendo la mezcla a ebullición con agitación suave, durante 45 min, apareciendo una tonalidad rosada.
5. Enfriar en baño con hielo y agregar 1,4 ml de n-butanol para disolver la fase orgánica, agitando el tubo y centrifugando a 4000 rpm durante 15 min. a una temperatura entre 0 y 5°C.
6. Del sobrenadante o fase orgánica, se toma la cantidad necesaria en una cubeta de espectrofotómetro, para realizar una lectura a 535 nm de longitud de onda.

Para la obtención de los valores estándar, se preparó una solución madre de MDA a una concentración de 706 ηM MDA/ml. Esta solución se diluyó al 1/10 en tampón fosfato de pH 7, quedando la nueva solución a concentración de 70,6 ηM MDA/ml, a

### 3. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN: MATERIAL Y MÉTODO

partir de la cual se realizaron diluciones seriadas 1:1 según la tabla siguiente:

	<i>Sol MDA</i>	<i>Tampón fosfato pH 7</i>	<i>Concentración final MDA</i>
Tubo 1	0,14 ml de sol 70,6 nM	0,86 ml	9,88 $\eta$ M
Tubo 2	1 ml del tubo 1	1 ml	4,94 $\eta$ M
Tubo 3	1 ml del tubo 2	1 ml	2,47 $\eta$ M
Tubo 4	1 ml del tubo 3	1 ml	1,24 $\eta$ M
Tubo 5	1 ml del tubo 4	1 ml	0,62 $\eta$ M
Tubo 6	1 ml del tubo 5	1 ml	0,31 $\eta$ M
Tubo 7	1 ml del tubo 6	1 ml	0,15 $\eta$ M
Tubo 8	1 ml del tubo 7	1 ml	0,077 $\eta$ M

Tras haber realizado las diluciones se procedió con cada tubo, de modo similar al que se realizaría mas tarde con las muestras de intestino siguiendo todo el protocolo en las mismas condiciones.

La recta patrón de regresión se calculó utilizando concentraciones conocidas decrecientes de MDA, y enfrentándolas con sus correspondientes densidades ópticas (absorbancias) obtenidas en el espectrofotómetro para obtener la función general de la misma:  $y = a + bx$ , en la que  $a =$  constante y  $b =$  pendiente de la recta. Sobre esta recta patrón, se realizó la recta de regresión, tomando como resultado válido un coeficiente de regresión  $R$  igual o mayor que 0,95, lo que indica que el 95% de los puntos se encuentran dentro de la correlación lineal, calculando la ordenada en el origen y la pendiente de la recta, así como el grado de correlación entre los puntos.

#### 3.2.7 Metodología de eutanasia

Todos los animales sometidos a la observación durante las 11 semanas que duró la experiencia, fueron sacrificados en el caso de que no hubieran fallecido espontáneamente durante el proceso, mediante sobredosis anestésica con la aplicación de tiopental sódico intracardiaco, produciéndose la muerte a los pocos instantes y con ausencia de dolor.

Los animales de las series objeto del estudio de la peroxidación lipídica (test del TBA), fueron sacrificados intraoperatoriamente por el mismo procedimiento, inmediatamente después de la obtención de las muestras para su estudio analítico.

#### 3.2.8 Metodología de necropsia

##### *Procedimiento*

Se comenzaba seccionando la piel desde el mentón hasta el pubis, observando el aspecto de la misma y tejido subcutáneo adyacente. Se abrían los músculos rectos del abdomen, continuando con la incisión por el esternón en la caja torácica. Se observaron *in situ* las vísceras abdominales y torácicas así como la arteria mesentérica craneal y las estructuras próximas a la misma advirtiendo la existencia de adherencias, lesiones, posibles roturas o coágulos. Se recogió dicha arteria con sus estructuras próximas para su estudio microscópico, introduciendo la muestra en un tubo de ensayo con formol al 10%.

#### *Extracción de los órganos*

Se abrieron las cavidades torácica y abdominal, practicando un corte a nivel de la laringe supraglótica y mediante disección roma (digital) del paquete visceral toraco-abdominal, se desinsertaba el diafragma. A continuación se seccionaba el recto, previa ligadura doble del mismo, extrayendo todo el paquete visceral junto. Posteriormente se extendía el intestino y se separaban las distintas vísceras de la cavidad abdominal. Así mismo se liberaban las vísceras retroperitoneales, lavando todo el conjunto con solución salina fisiológica.

#### *Sistemática de la disección*

La tráquea y pulmones se separaban del esófago, timo y corazón. Para separar el esófago, se seccionaba la unión con la tráquea, traccionando progresivamente. Con las tijeras de Metzenbaum se abría longitudinalmente la tráquea, seccionando el paquete vascular pulmonar y bronquial de cada pulmón, para separarlos del timo y corazón.

El timo y corazón se separaban mediante disección con bisturí.

El Hígado y vesícula se liberaban, primero el lóbulo hepático caudal adyacente a estómago y después separando todo el hígado mediante un corte a nivel del hilio.

El esófago se seccionaba a nivel del cardias, para aislarlo del estómago. El estómago se cortaba a nivel del píloro y se abría siguiendo la curvatura mayor para extraer el contenido digestivo y proceder al lavado.

Las porciones del intestino delgado se aislaban y abrían longitudinalmente. Dichos segmentos se lavaban con suero fisiológico antes de ser introducidos en formol.

El apéndice cecal, el ciego el colon y el recto se aislaban y se abrían longitudinalmente.

Los riñones se liberaban eliminando la grasa perirrenal y cortando el pedículo vascular, obteniendo la víscera con la cápsula propia del órgano.

El bazo se obtuvo seccionando los vasos del hilio quedando de esta forma liberado.

El páncreas se aisló de su lecho duodeno-peritoneal por disección de sus límites.

El aparato genital se liberó en las hembras por transección del mesosalpinx, liberando los cuernos uterinos y seccionando la vagina; en los machos se liberaron los testículos seccionando la uretra y los conductos deferentes en su porción media.

#### *Toma de muestras*

Se tomaron porciones de hígado, riñones, pulmones, corazón, AMC e intestino: 2 cm de yeyuno, 2 cm íleon y 2 cm colon proximal. Los segmentos intestinales abiertos longitudinalmente, se enrollaron en espiral sobre sí mismos, atravesándolos transversalmente con un alfiler con objeto de facilitar la posterior sección con el microtomo y poder observar en el estudio microscópico varias áreas simultáneamente.

Las porciones de órganos se introdujeron en frascos de toma de muestras los cuales inmediatamente se rellenaron con aldehído fórmico al 10% para su correcta conservación, se rotularon con medios indelebles con el número de la serie, el número del grupo y el número del animal y finalmente se remitieron, debidamente etiquetados, al laboratorio de anatomía patológica para su estudio.

#### 3.2.9 Metodología histológica

Para el estudio de las piezas de necropsia se siguieron los siguientes pasos:

- Preparación y tallado de piezas

- Inclusión en parafina.
- Realización de cortes histológicos con un espesor de 3 micras mediante microtomo rotatorio.
- Desparafinación y mantenimiento en estufa a 100° C, durante 30 minutos.

Posteriormente y previa tinción con diversas técnicas: hematoxilina-eosina, Giemsa, P.A.S. (para aldehídos de Schiff) y tricrómica de Masson, estos cortes fueron estudiados mediante microscopía óptica.

La gravedad de las lesiones intestinales se valoró con arreglo al método de Chiu modificado, clasificando las lesiones en los siguientes grados:

- *Grado 0.* Mucosa intestinal normal.
- *Grado 1.* Desarrollo del espacio subepitelial de Gruenhagen
- *Grado 2.* Pérdida parcial del epitelio de revestimiento vellositario superficial, con vellosidades denudadas.
- *Grado 3.* Pérdida total del epitelio vellositario y necrosis intensa del epitelio glandular de la mucosa.
- *Grado 4.* La necrosis se hace evidente en las capas musculares y se pierde la mucosa en su totalidad.

#### 3.2.10 Metodología estadística

El presente trabajo pretende confirmar las hipótesis alternativas, evidenciando relaciones causales entre variables independientes y dependientes, empleando para conseguirlo varios tipos de diseños de investigación:

- Un estudio básico de supervivencia apoyado en una investigación experimental en el que se registran datos para un periodo de tiempo (11 semanas) y además se incorpora el momento en que se produce el evento muerte (estudio longitudinal) en animales sometidos a diferentes tiempos de isquemia mesentérica de la AMC.
- Un ensayo de modificación de la supervivencia (longitudinal) en animales sometidos a un tiempo determinado (tiempo de mortalidad  $\cong$  50) de isquemia de la AMC y tratados con un antioxidante (SOD) comparado con otro grupo sin tratamiento.
- Un ensayo clínico, para determinar la peroxidación lipídica en segmentos intestinales normales, isquémicos y tratados con SOD, calculando en cada grupo las concentraciones de MDA; en este estudio, los animales son sacrificados en un momento dado (estudio transversal).

El proceso estadístico difiere según el tipo de estudio, detallándose en los siguientes apartados:

##### 1) Estudios de supervivencia

- Variables:
  - Independiente: diferentes tiempos de isquemia a que son sometidas las series
  - Dependiente: mortalidad
- Matriz de datos: Los resultados de la supervivencia se exponen tabulados. El estudio estadístico llevado a cabo fue:
  - Valoración de la supervivencia (proporción acumulada de supervivencia), por el método descrito por Kaplan y Meier en 1958<sup>216</sup>, agrupando el tiempo de participación de cada sujeto en intervalos de tiempo predeterminados y calculando las probabilidades de supervivencia mediante la estimación de las probabilidades condicionadas de supervivencia correspondientes a cada uno

de los intervalos de tiempo.

- Test del  $\chi^2$  donde se obtienen los valores de la distribución Chi cuadrado, la p de Pearson y el grado de significación para un error unilateral de  $p = 0,05$ .

#### 2) Estudios de ensayo clínico

- Variables:

Independientes: diferentes tiempos de isquemia a que son sometidas las series.

Dependientes:

- Cuantitativas: datos mensurables: niveles de MDA
- Categóricas: Presencia o ausencia de un determinado carácter cualitativo (ej. Alteraciones histopatológicas).
- Para medir la distribución de datos, se emplearon los siguientes índices estadísticos:

Medidas basadas en momentos:

- Medidas de tendencia central: Media aritmética
- Medidas de dispersión: Desviación estándar

Medidas basadas en ordenaciones:

- Medidas de tendencia central: Mediana (valor central de un conjunto de observaciones)
- Medidas de dispersión: Cuartiles 25 y 75 (Describen la posición de un sujeto dentro del grupo de referencia)

Test de la T de Student para muestras emparejadas para obtener el grado de significación para un error unilateral de  $p = 0,05$

#### 3) Representaciones gráficas

- Para los estudios de supervivencia se emplean diagramas de líneas representando en el eje de ordenadas el tiempo en días y en el de abscisas las proporciones de supervivencia.
- Para los gráficos comparativos de supervivencia (variables categóricas) entre diferentes series, usamos gráficos de barras apiladas por la facilidad de interpretación de este tipo de gráficos, pudiendo incluir en uno solo varias series y observar a la vez la supervivencia y la mortalidad

#### 3.3 Cronograma

Para la realización de este trabajo experimental se programaron las siguientes etapas por orden cronológico:

- Preparación de los animales, del material y del equipo
- Primer bloque de intervenciones quirúrgicas realizando las series isquémicas para el estudio de la supervivencia basal, seguidas del control clínico postoperatorio de los animales y en su caso realizando las necropsias y la toma de muestras para los estudios histopatológicos que se fueron realizando durante el transcurso de la experiencia.
- Cálculo de las curvas de supervivencia de las series anteriores, mediante el correspondiente estudio estadístico.
- Segundo bloque de intervenciones quirúrgicas realizando las series isquémicas

### 3. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN: MATERIAL Y MÉTODO

para el estudio de la supervivencia en animales tratados con superóxido dismutasa, seguidas del control clínico postoperatorio de los animales y realizando las necropsias precisas y la toma de muestras para los estudios histopatológicos.

- Cálculo de las curvas de supervivencia de la serie tratada con el antioxidante, mediante el correspondiente estudio estadístico y comparativo con la serie control tratada con solución salina.
- Tercer bloque de intervenciones quirúrgicas realizando otras 3 series, una control sometida a operación simulada, otra isquémica tratada con antioxidante (superóxido dismutasa) y solución salina y otra únicamente con solución salina para el estudio de la peroxidación lipídica. Los animales de estas series fueron sacrificados al final de la intervención tomando muestras para determinar el posible aumento comparativo de malon-dialdehído libre en el tejido intestinal isquémico, como metabolito final de la acción de los radicales libres y el efecto del tratamiento con superóxido dismutasa en la concentración de esta substancia.

El último paso, consistió en ordenar los resultados obtenidos, extrayendo las conclusiones correspondientes y sometiéndolas a discusión con otros autores, escribiendo el correspondiente trabajo.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Condiciones fisiológicas postquirúrgicas

#### 4.1.1 Ingesta de agua

En la tabla siguiente se recoge el porcentaje de animales respecto al total de vivos en cada serie, que bebió agua en los periodos de tiempo señalados.

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

#### INGESTA DE AGUA

SERIES EXPERIMENTALES						
TIEMPO HORAS	II (15')	III (30')	IV (60')	V (120')	VI (SOD)	VII (SS)
0-24	100%	85%	65%	10%	70%	60%
24-48	100%	100%	83,3%	0%	100%	100%
48-72	100%	100%	100%	100%	100%	100%

#### 4.1.2 Ingesta de alimentos

En la tabla siguiente se expone el porcentaje de animales respecto al total de vivos en cada serie, que ingirieron alimento en los tiempos señalados.

A medida que aumenta el tiempo de isquemia, los animales inician más tardíamente la ingestión de alimento, debido presuntamente a la gravedad de las lesiones isquémicas. Ninguno de los animales que fallecieron entre el momento de la reperfusión y las 48 horas posteriores ingirió alimento alguno.

#### INGESTA DE ALIMENTOS

SERIES EXPERIMENTALES						
TIEMPO HORAS	II (15')	III (30')	IV (60')	V (120')	VI (SOD)	VII (SS)
0-24	75%	35%	30%	0%	40%	40%
24-48	100%	100%	83,3%	0%	50%	40%
48-72	100%	100%	100%	100%	100%	100%

#### 4.1.3 Deposiciones

En la tabla siguiente se presentan los porcentajes de animales con respecto al total de supervivientes en cada momento que emitió deposiciones en los intervalos que se indica en la tabla.

A las 72 horas los animales de las series isquémicas II, III y IV (15, 30 y 60'), habían recuperado el ritmo normal de deposiciones, con presencia de heces en el 100%

de los casos. En la serie V (120' de isquemia), ninguno de los dos animales supervivientes había realizado deposiciones a las 72 horas.

Los animales de las series VI y VII arrojan resultados similares a los de la serie IV ya que todas ellas soportaron similares tiempos de isquemia (60').

### DEPOSICIONES

SERIE EXPERIMENTALES						
TIEMPO HORAS	II (15')	III (30')	IV (60')	V (120')	VI (SOD)	VII (SS)
0-24	75%	35%	40%	0%	40%	40%
24-48	75%	75%	83,3%	0%	40%	40%
48-72	100%	100%	100%	0%	100%	100%

#### 4.2 Supervivencia de animales sometidos a isquemia - reperfusión de la arteria mesentérica craneal

Todos los animales fueron observados durante un periodo de 77 días (11 semanas), anotando las bajas que se produjeron durante este tiempo.

##### 4.2.1 Serie I: Operación simulada (Sham)

*Tabla de datos*

Tiempo Días	Estado	Supervivencia acumulada	Error standard	Eventos acumulados	Número Restante
2	0	9500	0487	1	19
77	1			1	18
77	1			1	17
77	1			1	16
77	1			1	15
77	1			1	14
77	1			1	13
77	1			1	12
77	1			1	11
77	1			1	10
77	1			1	9
77	1			1	8
77	1			1	7
77	1			1	6
77	1			1	5
77	1			1	4
77	1			1	3
77	1			1	2
77	1			1	1
77	1			1	0



1 = vivo 0 = muerto

Número de casos: 20

Supervivientes: 19 ( 95.00%)

Eventos terminales (muertos): 1

	Tiempo de supervivencia	Error estándar	95% Intervalo de confianza
Media:	73	4	66 – 80
Mediana:	-	-	-

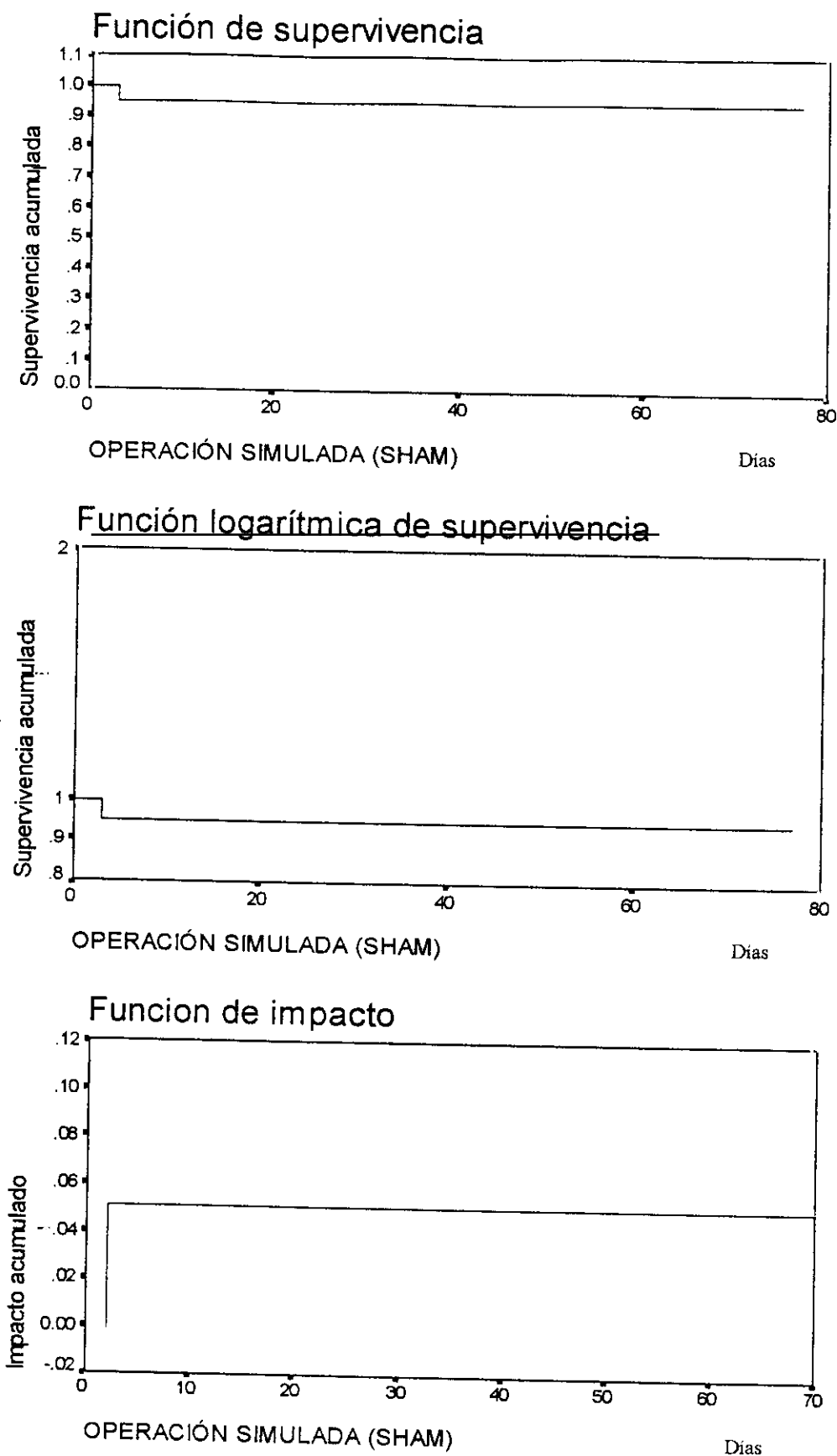
Limitado a 77 días

#### Percentiles

	25.00	50.00	75.00
Valor	-	-	-
Error estándar	-	-	-

#### Valoración

La *supervivencia* de la serie al final de los 77 días de observación, fue del 95% falleciendo un único animal durante el primer día postintervención. La media aritmética no tiene utilidad estadística, al no ser una distribución normal, no pudiendo calcularse la mediana debido a que no fallecen la mitad de los animales



**Fig. 11:** Representación gráfica de la supervivencia en la serie "Operación simulada (Sham)"; Funciones decimal, logarítmica y de impacto.

## 4.2.2 Serie II: Isquemia AMC 15 minutos

## Tabla de datos

Tiempo Días	Estado	Supervivencia acumulada	Error standard	Eventos acumulados	Número Restante
14	0	9500	0487	1	19
77	1			1	18
77	1			1	17
77	1			1	16
77	1			1	15
77	1			1	14
77	1			1	13
77	1			1	12
77	1			1	11
77	1			1	10
77	1			1	9
77	1			1	8
77	1			1	7
77	1			1	6
77	1			1	5
77	1			1	4
77	1			1	3
77	1			1	2
77	1			1	1
77	1			1	0

1 = vivo 0 = muerto

Número de casos: 20

Supervivientes: 19 ( 95.00%)

Eventos terminales (muertos): 1

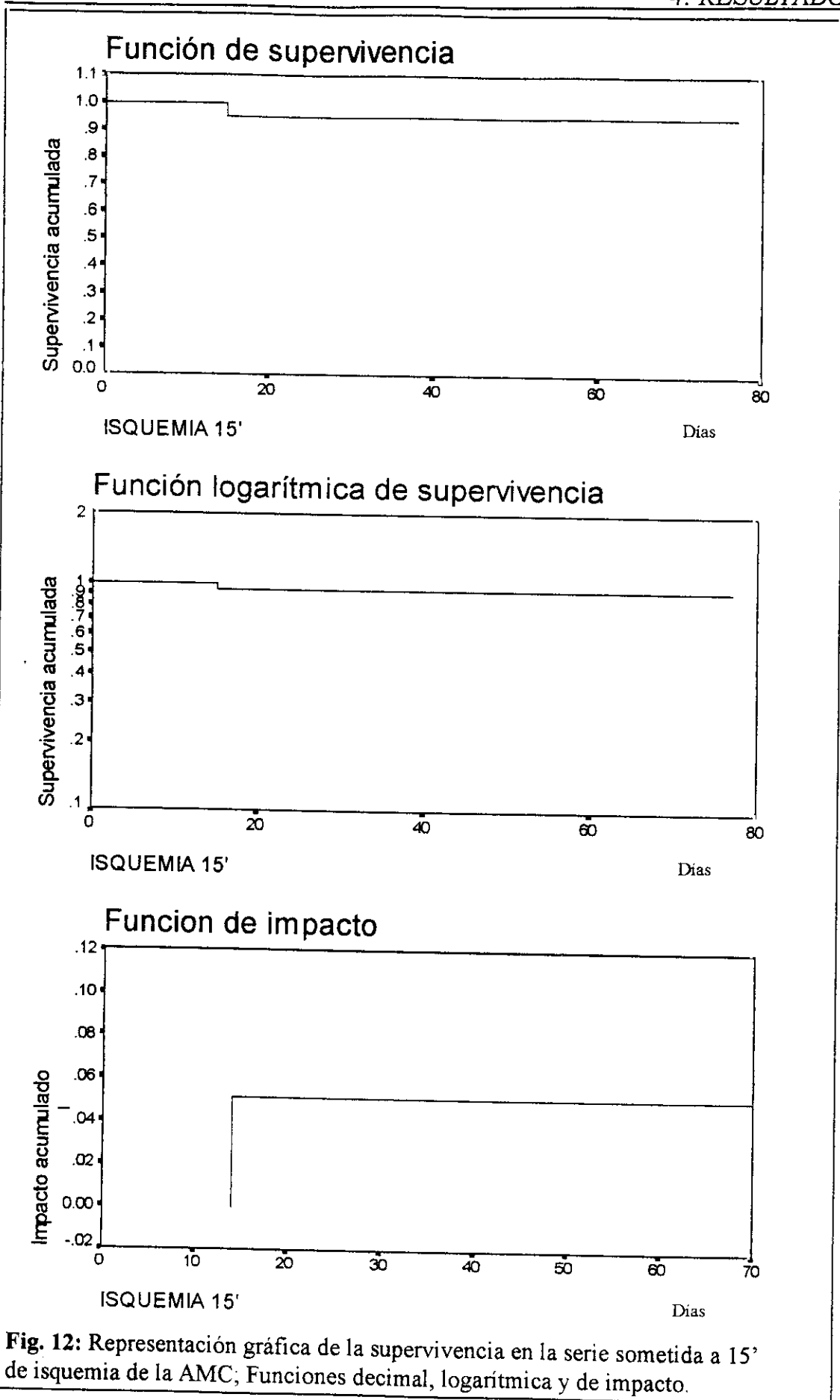
	Tiempo de supervivencia	Error estándar	95% Intervalo de confianza
Media:	74	3	68 - 80
Mediana:	-	-	-

Limitado a 77 días

	Percentiles		
	25.00	50.00	75.00
Valor	-	-	-
Error estándar	-	-	-

## Valoración

La supervivencia de la serie al final de los 77 días de observación, fue del 95% falleciendo un único animal durante el decimotercer día postintervención. La media aritmética no tiene utilidad estadística, al no ser una distribución normal, no pudiendo calcularse la mediana debido a que no fallecen la mitad de los animales.



**Fig. 12:** Representación gráfica de la supervivencia en la serie sometida a 15' de isquemia de la AMC; Funciones decimal, logarítmica y de impacto.

## 4.2.3 Serie III: Isquemia AMC 30 minutos

Tabla de datos

Tiempo Días	Estado	Supervivencia acumulada	Error standard	Eventos acumulados	Número Restante
1	0			1	19
1	0			2	18
1	0			3	17
1	0			4	16
1	0			5	15
1	0			6	14
1	0	6500	1067	7	13
77	1			7	12
77	1			7	11
77	1			7	10
77	1			7	9
77	1			7	8
77	1			7	7
77	1			7	6
77	1			7	5
77	1			7	4
77	1			7	3
77	1			7	2
77	1			7	1
77	1			7	0

1 = vivo 0 = muerto

Número de casos: 20

Supervivientes: 13 ( 65.00%)

Eventos terminales (muertos): 7

	Tiempo de supervivencia	Error estándar	95% Intervalo de confianza
Media:	50	8	35 - 66
Mediana:	-	-	-

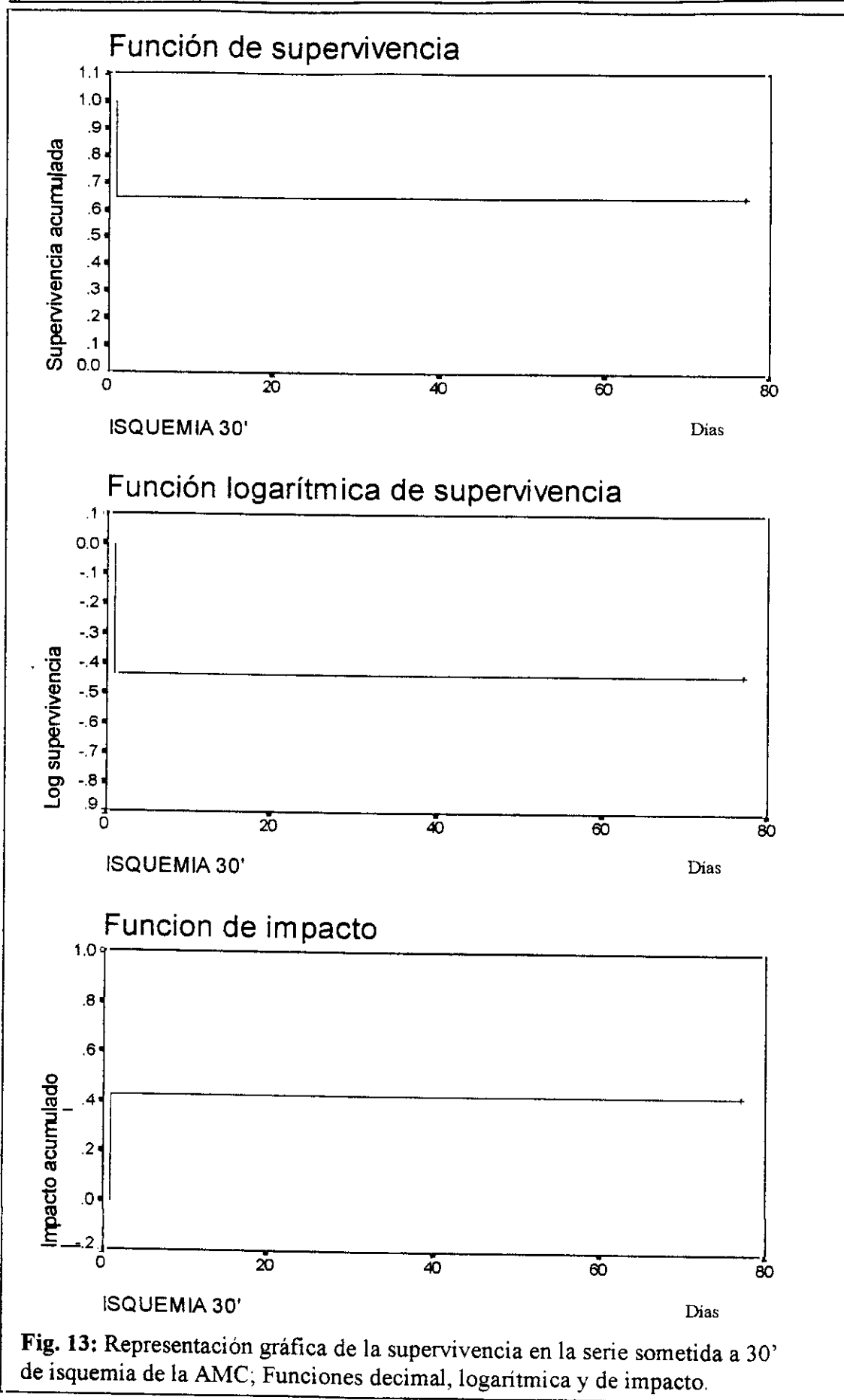
Limitado a 77 días

## Percentiles

	25.00	50.00	75.00
Valor	-	-	1.00
Error estándar	-	-	-

## Valoración

La supervivencia de la serie al final de los 77 días de observación, fue del 65% falleciendo siete animales, todos ellos durante el primer día postintervención. La media aritmética no tiene utilidad estadística, al no ser una distribución normal, no pudiendo calcularse la mediana debido a que no fallecen la mitad de los animales.



**Fig. 13:** Representación gráfica de la supervivencia en la serie sometida a 30' de isquemia de la AMC; Funciones decimal, logarítmica y de impacto.

## 4.2.4 Serie IV: Isquemia AMC 60 minutos

## Tabla de datos

Tiempo Días	Estado	Supervivencia acumulada	Error standard	Eventos acumulados	Número Restante
1	0			1	19
1	0			2	18
1	0			3	17
1	0			4	16
1	0			5	15
1	0			6	14
1	0			7	13
1	0	6000	1095	8	12
2	0	5500	1112	9	11
4	0	5000	1118	10	10
5	0	4500	1112	11	9
11	0	4000	1095	12	8
77	1			12	7
77	1			12	6
77	1			12	5
77	1			12	4
77	1			12	3
77	1			12	2
77	1			12	1
77	1			12	0

1 = vivo 0 = muerto

Número de casos: 20

Supervivientes: 8 ( 40.00%)

Eventos terminales (muertos): 12

	Tiempo de supervivencia	Error estándar	95% Intervalo de confianza
Media:	32	8	16 - 48
Mediana:	4	3	0 - 11

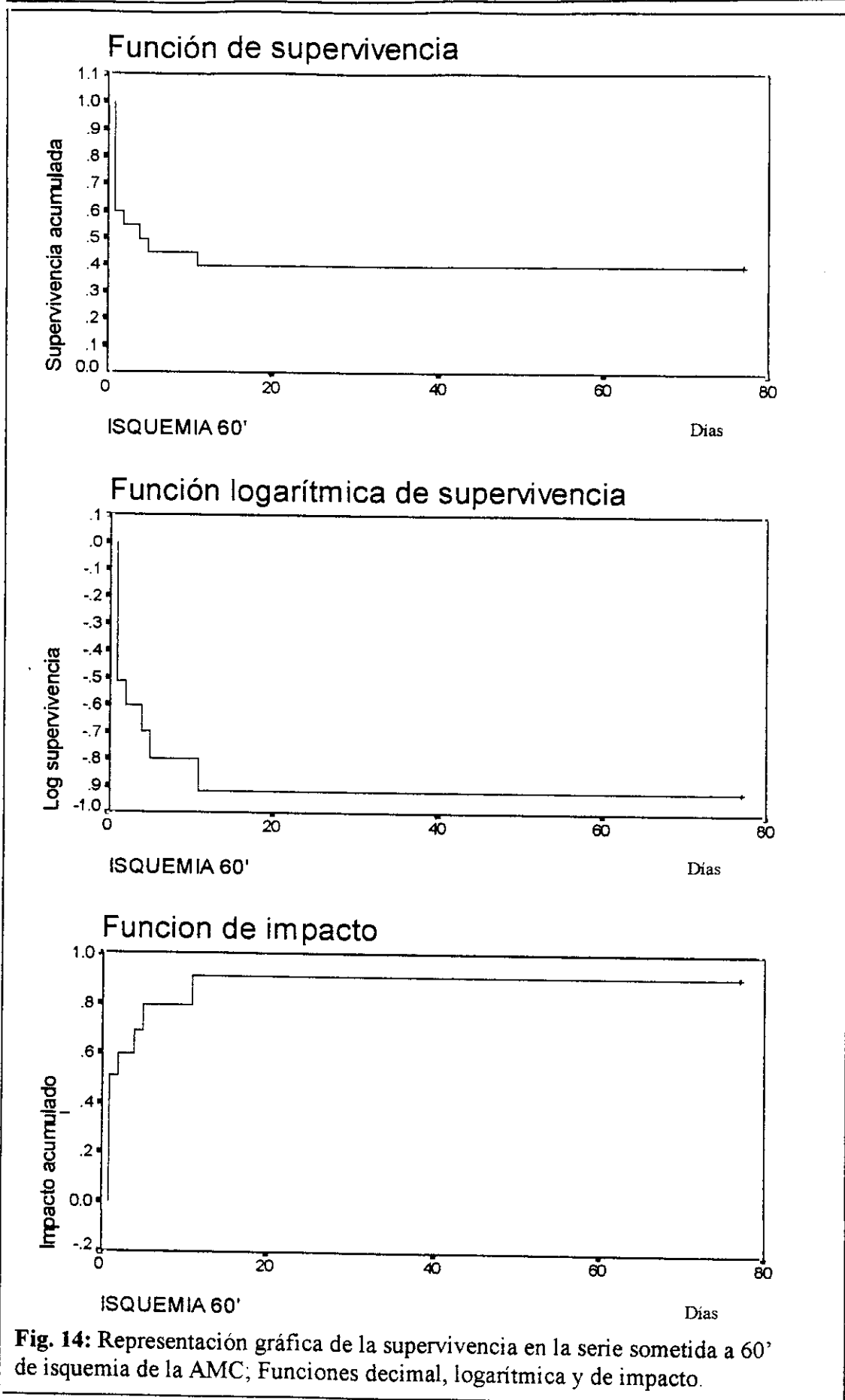
Limitado a 77 días

## Percentiles

	25.00	50.00	75.00
Valor	-	4.00	1.00
Error estándar	-	3.35	-

## Valoración

La supervivencia de la serie al final de los 77 días de observación, fue del 40% falleciendo doce animales, de ellos ocho antes de la 24 horas postintervención, uno durante el primer día, uno durante el tercero, uno durante el cuarto y el último durante el décimo. La media aritmética no tiene utilidad estadística, al no ser una distribución normal. La mediana por el contrario es de gran valor indicativo y es de 4 días.





## 4.2.5 Serie V: Isquemia AMC 120 minutos

## Tabla de datos

Tiempo Días	Estado	Supervivencia acumulada	Error standard	Eventos acumulados	Número Restante
1	0			1	19
1	0			2	18
1	0			3	17
1	0			4	16
1	0			5	15
1	0			6	14
1	0			7	13
1	0			8	12
1	0			9	11
1	0			10	10
1	0			11	9
1	0			12	8
1	0			13	7
1	0			14	6
1	0			15	5
1	0			16	4
1	0	1500	0798	17	3
2	0	1000	0671	18	2
77	1			18	1
77	1			18	0

1 = vivo 0 = muerto

Número de casos: 20

Supervivientes: 2 ( 10.00%)

Eventos terminales (muertos): 18

	Tiempo de supervivencia	Error estándar	95% Intervalo de confianza
<u>Media:</u>	9	5	0 - 19
<u>Mediana:</u>	1	-	-

Limitado a 77 días

	Percentiles		
	25.00	50.00	75.00
Valor	1	1	1
Error estándar	-	-	-

## Valoración

La supervivencia de la serie al final de los 77 días de observación, fue del 10% falleciendo dieciocho animales, de ellos diecisiete antes de la 24 horas postintervención, y uno durante el primer día. La media aritmética no tiene utilidad estadística, al no ser una distribución normal. La mediana de la supervivencia por el contrario es de gran valor indicativo y es de 1 día.

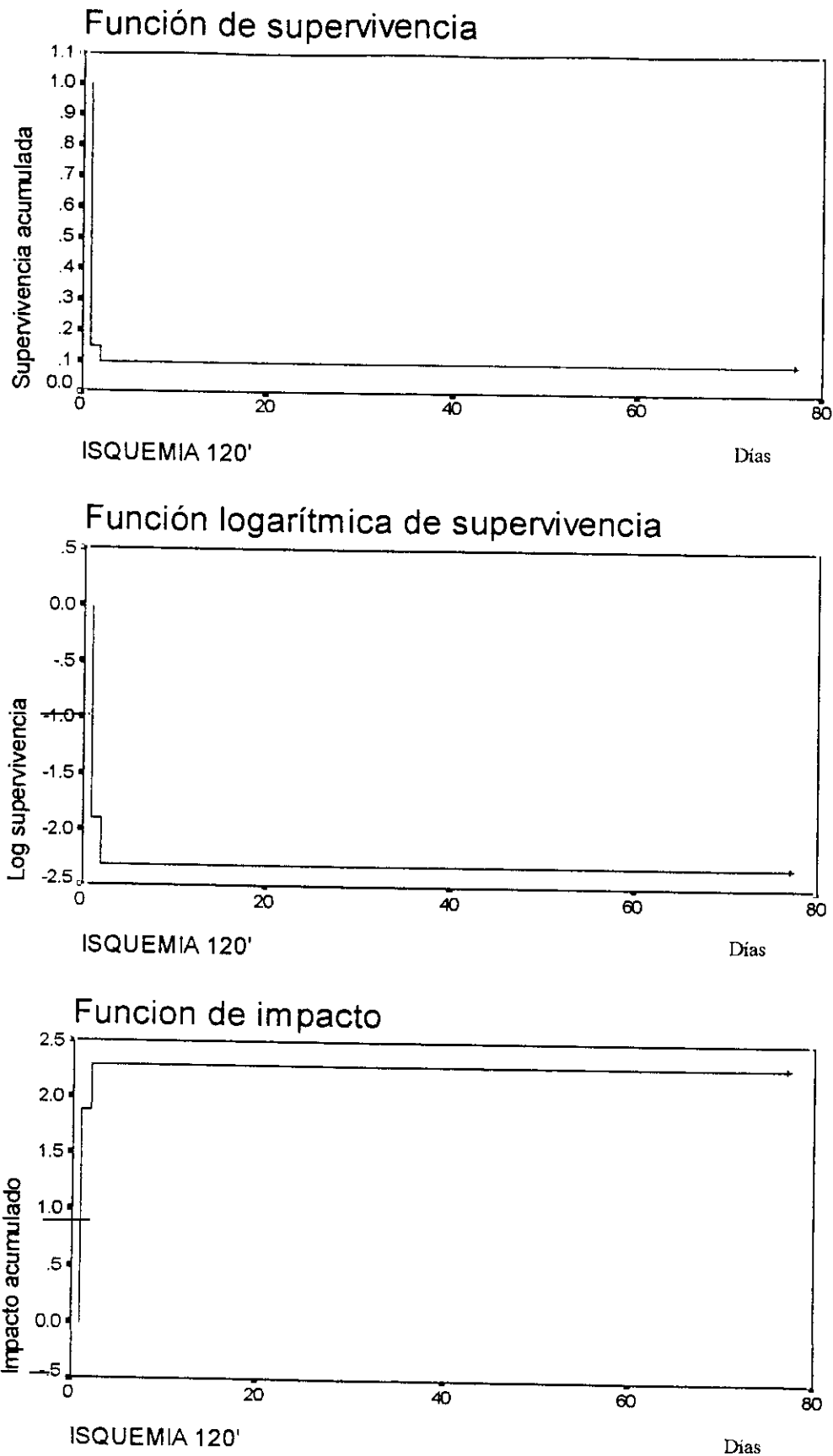


Fig. 15: Representación gráfica de la supervivencia en la serie sometida a 120' de isquemia de la AMC; Funciones decimal, logarítmica y de impacto.

## 4.2.6 Inferencia estadística de la supervivencia a los diferentes tiempos de isquemia

Los cálculos se realizaron por medio del test del  $\chi^2$  de **Pearson**, comparando la supervivencia (o mortalidad) de cada serie con diferentes tiempos de isquemia, con la serie control, sometida a operación simulada (Sham), sin isquemia mesentérica, para valorar como el incremento del tiempo de isquemia por si solo y sin considerar otros factores influye en la supervivencia de los animales.

*Resultados de las series*

- Serie Isquemia AMC 15 minutos

	O. Simulada	ISQ 15'	Suma
Muertos	1	1	2
Supervivientes	19	19	38
<b>Totales</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>40</b>

Casos	$\chi^2$	Grados de libertad	Significación
20	0.00	1	P = 1.000

- Serie Isquemia AMC 30 minutos

	O. Simulada	ISQ 30'	Suma
Muertos	1	7	8
Supervivientes	19	13	32
<b>Totales</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>40</b>

Casos	$\chi^2$	Grados de libertad	Significación
20	2.8125	1	P = 0.0935

- Serie Isquemia AMC 60 minutos

	O. Simulada	ISQ 60'	Suma
Muertos	1	12	13
Supervivientes	19	8	27
<b>Totales</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>40</b>

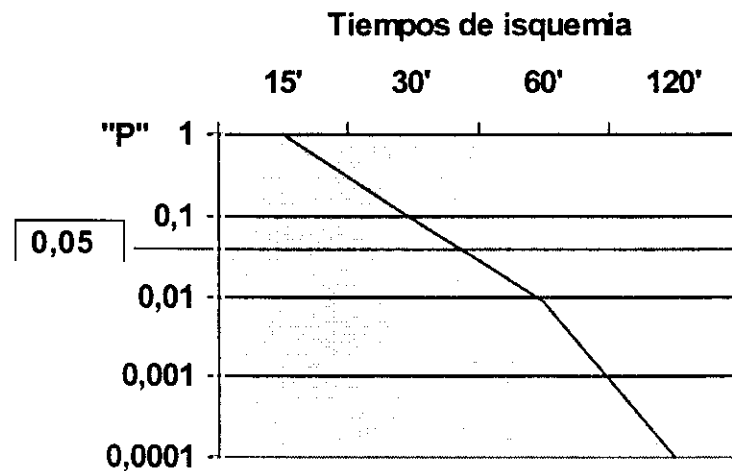
Casos	$\chi^2$	Grados de libertad	Significación
20	6.8946	1	P = 0.0086

- Serie Isquemia AMC 120 minutos

	O. Simulada	ISQ 120'	Suma
Muertos	1	18	19
Supervivientes	19	2	21
<b>Totales</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>40</b>

Casos	$\chi^2$	Grados de libertad	Significación
20	14.4862	1	P = 0.0001

Los índices probabilísticos obtenidos para cada serie, los cuales van disminuyendo desde P=1 para 15 minutos de isquemia, hasta P=0.0001 para 120 minutos de isquemia, indican que la mortalidad debida a ésta en el conejo, aumenta progresiva y proporcionalmente al tiempo de isquemia. No son significativas las diferencias de supervivencia entre los animales de la serie control y los de las series isquémicas de 15 y 30 minutos, por los que las muertes obtenidas en estas series no pueden atribuirse a la isquemia mesentérica. A partir de los 60 minutos de isquemia, esta diferencia comienza a hacerse significativa (P=0,0086) y es máxima a los 120 minutos de isquemia (p=0.0001), falleciendo 18 de los animales de la serie por razones estadísticamente achacables a la isquemia intestinal. En la figura 16 puede observarse la



**Fig. 16** : Evolución de la significación (P) de la mortalidad, en relación al tiempo de isquemia. (P<0,05 = significativo)

evolución de la significación, en relación al tiempo de isquemia.

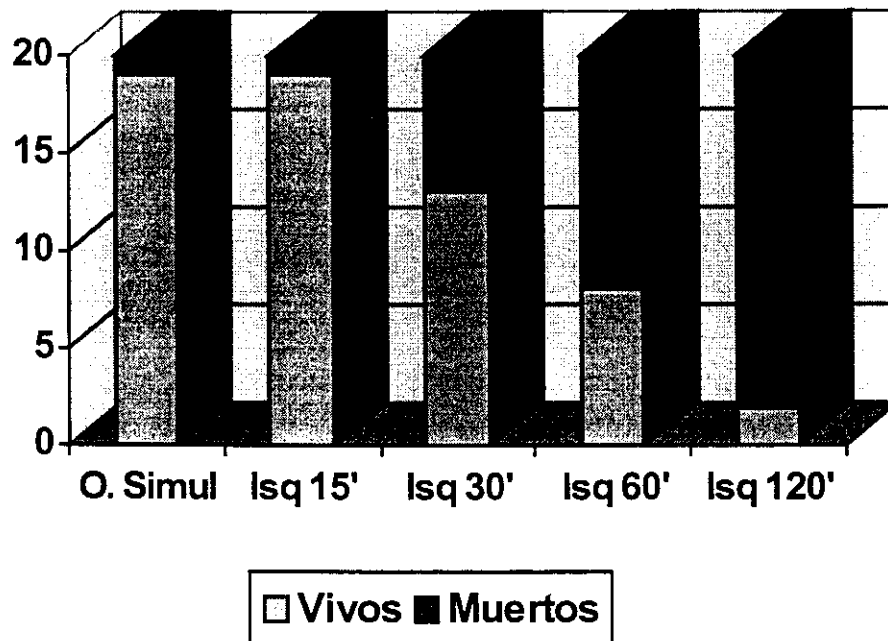
#### *Resultados globales*

Considerados globalmente los resultados de todas las series, se calculó el  $\chi^2$  de todas ellas, según el test de Pearson, obteniendo una correlación directa (P<0,001), entre el tiempo de isquemia y la mortalidad (inversa entre el tiempo de isquemia y la supervivencia).

	O. Simulada	ISQ 15'	ISQ 30'	ISQ 60'	ISQ 120'	Suma
Muertos	1	1	7	12	18	39
Supervivientes	19	19	13	8	2	61
Totales	20	20	20	20	20	100

Casos	$\chi^2$	Grados de libertad	Significación
20	45.5	4	P < 0.001

En la figura 17, puede apreciarse la evolución global de la supervivencia y mortalidad a los diferentes tiempos de isquemia de la AMC, apreciándose la disminución de supervivencia y el incremento de mortalidad cuando aumenta el tiempo de isquemia.



**Fig 17:** Supervivencia y mortalidad a diferentes tiempos de isquemia de la arteria mesentérica craneal

### 4.3 Supervivencia en la isquemia - reperfusión mesentérica en animales tratados con superóxido dismutasa

De la misma forma que los animales de las series del estudio básico de supervivencia, los de este estudio fueron observados durante un periodo de 77 días (11 semanas), anotando las bajas que se produjeron durante este tiempo.

Una vez estudiada la supervivencia básica durante los diferentes tiempos se aplicó SOD disuelto en SS, como inhibidor de la peroxidación lipídica inducida por los radicales libres de  $O_2$  a una serie de 10 animales sometidos a 60 minutos de IMC + 1 hora de reperfusión, comparando los resultados con los obtenidos en una serie control de otros 10 animales, sometidos a los mismos procedimientos operatorios, con los mismos tiempos de isquemia y reperfusión pero con solución salina en lugar de SOD + SS.

Se empleó para ello la serie de 60 minutos de isquemia, porque en el estudio previo de supervivencia, esta serie fue la que más se aproximaba a la tasa media de mortalidad ( $TM_{50}$ ) a lo largo de las 11 semanas de observación, pudiendo por tanto comparar fácilmente los resultados de ambas series con y sin tratamiento.

#### 4.3.1 Serie VI (SOD-1): supervivencia con SOD + SS

##### Tabla de datos

Tiempo Días	Estado	Supervivencia acumulada	Error standard	Eventos acumulados	Número Restante
1	0			1	9
1	0			2	8
1	0	7000	1449	3	7
13	0	6000	1549	4	6
77	1			4	5
77	1			4	4
77	1			4	3
77	1			4	2
77	1			4	1
77	1			4	0

1 = vivo 0 = muerto

Número de casos: 10

Supervivientes: 6 ( 60.00%)

Eventos terminales (muertos): 4

	Tiempo de supervivencia	Error estándar	95% Intervalo de confianza
Media:	48	11	26 - 70
Mediana:	-	-	-

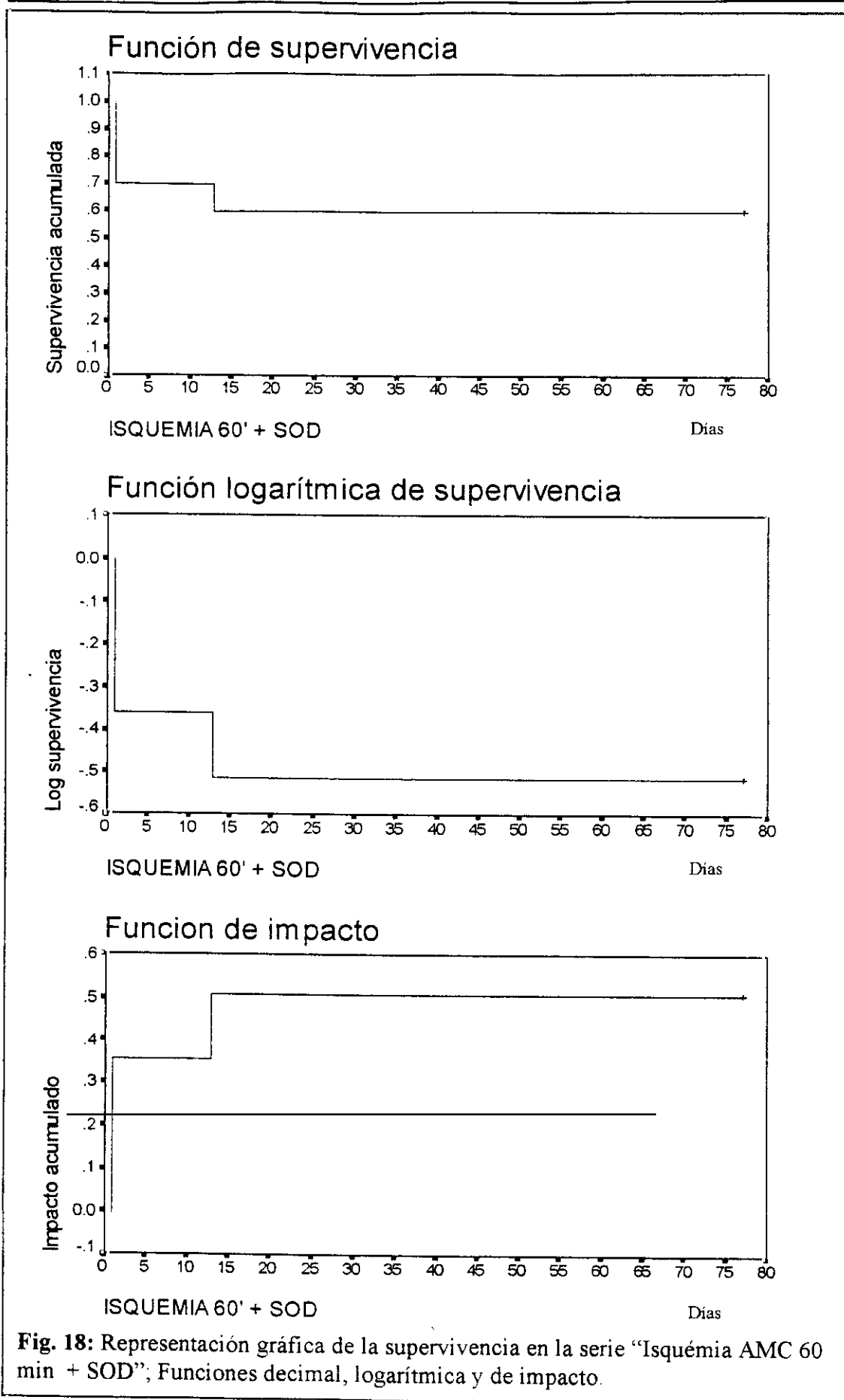
Limitado a 77 días

##### Percentiles

	25.00	50.00	75.00
Valor	-	-	1.00
Error estándar	-	-	-

##### *Valoración*

La *supervivencia* de la serie al final de los 77 días de observación, fue del 60% falleciendo cuatro de diez animales, de ellos tres antes de la 24 horas post-intervención y uno durante el día duodécimo. La media aritmética de la supervivencia no tiene utilidad estadística, al no ser una distribución normal. La mediana no se puede calcular al sobrevivir mas del 50% de los animales.



**Fig. 18:** Representación gráfica de la supervivencia en la serie "Isquémia AMC 60 min + SOD"; Funciones decimal, logarítmica y de impacto.



## 4.3.2 Serie VII (SOD-2): supervivencia con solución salina

Tabla de datos

Tiempo Días	Estado	Supervivencia acumulada	Error standard	Eventos acumulados	Número Restante
1	0			1	9
1	0	8000	1265	2	8
4	0	7000	1449	3	7
6	0	6000	1549	4	6
9	0	5000	1581	5	5
77	1			5	4
77	1			5	3
77	1			5	2
77	1			5	1
77	1			5	0

1 = vivo 0 = muerto

Número de casos: 10

Supervivientes: 5 ( 50.00%)

Eventos terminales (muertos): 5

	Tiempo de supervivencia	Error estándar	95% Intervalo de confianza
Media:	41	12	18 – 63
Mediana:	9	-	-

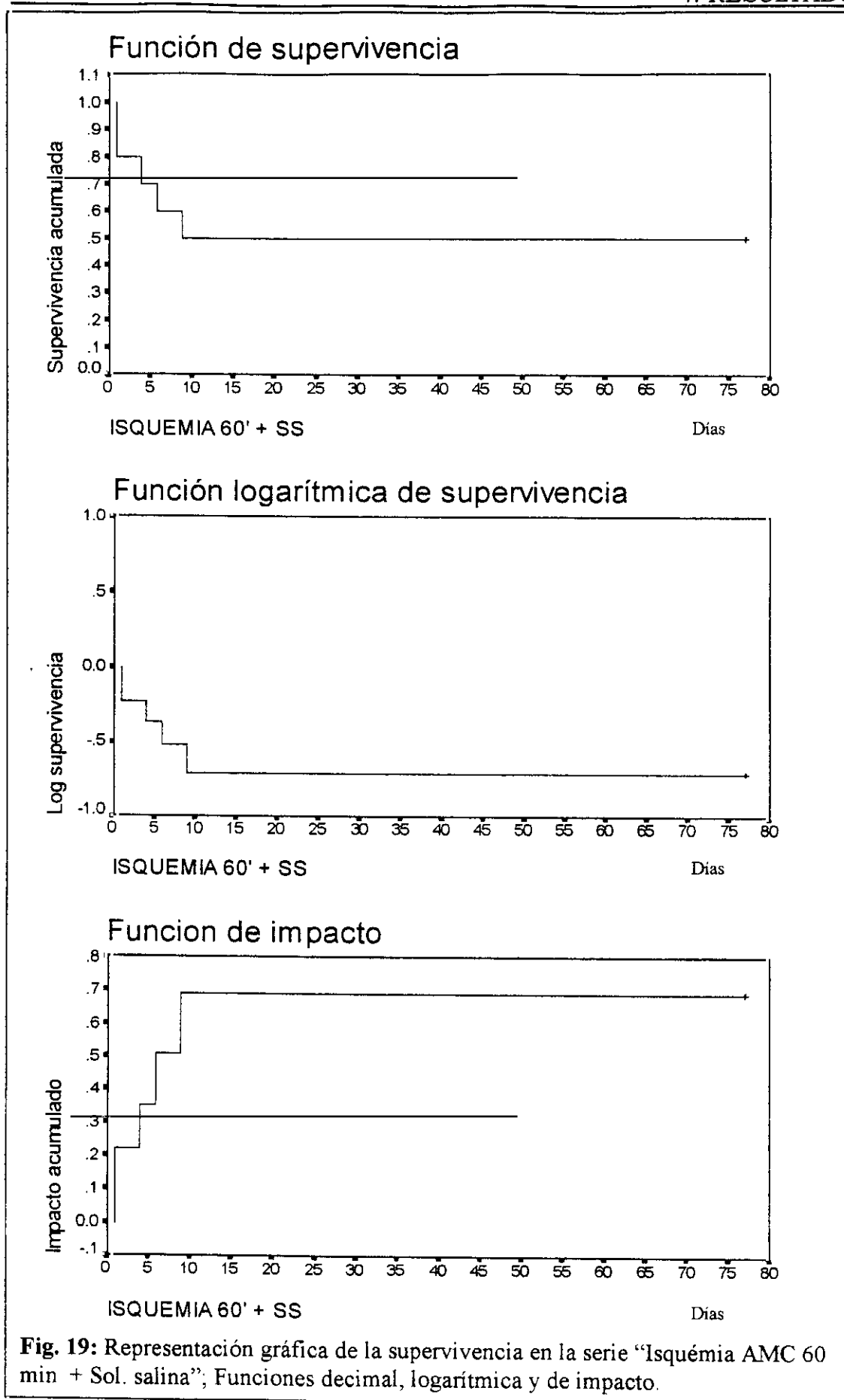
Limitado a 77 días

## Percentiles

	25.00	50.00	75.00
Valor	-	9.00	4.00
Error estándar	-	-	4.35

## Valoración

La supervivencia de la serie al final de los 77 días de observación, fue del 50% falleciendo cuatro animales, de ellos tres antes de la 24 horas post-intervención y uno durante el día duodécimo. La media aritmética de la supervivencia no tiene utilidad estadística, al no ser una distribución normal. La mediana por el contrario fue de 9 días.



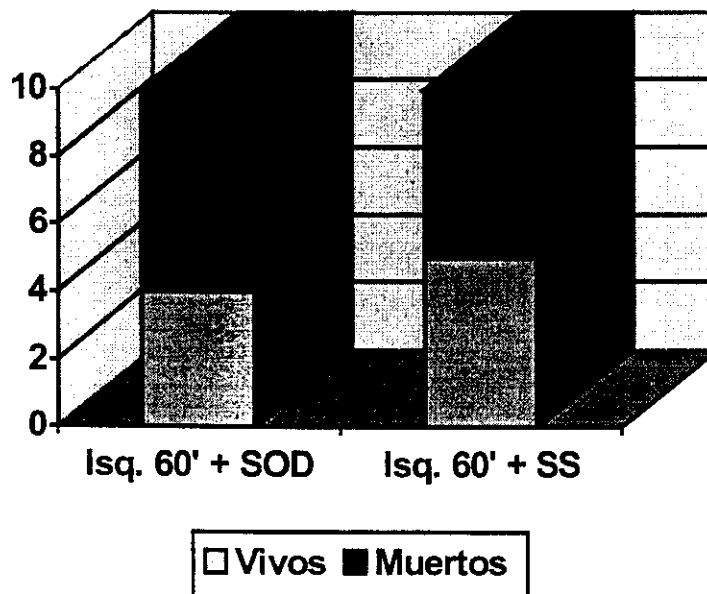
## 4.3.3 Inferencia estadística

Test  $\chi^2$  de Pearson

	ISQ 60' + SOD en SS	ISQ 60' + SS	Suma
<i>Muertos</i>	5	6	9
<b>Supervivientes</b>	5	4	11
<b>Totales</b>	10	10	20

Casos	$\chi^2$	Grados de libertad	Significación
10	0.1010	1	P = 0.7506

La administración de superóxido dismutasa en solución salina durante la fase de reperfusión, a la serie de animales sometidos a una hora de isquemia mas una hora de reperfusión, en nuestras condiciones experimentales de estudio, no provocó un incremento estadísticamente significativo en la supervivencia en comparación con la serie a la que le fue administrada únicamente solución salina.



**Figura 20:** Supervivencia y mortalidad a los 60 minutos de isquemia mesentérica con y sin tratamiento con SOD

#### 4.4 Peroxidación lipídica intestinal en la isquemia-reperfusión mesentérica y modificaciones producidas por el tratamiento con SOD

Este estudio se realizó comparando los resultados obtenidos en animales de tres series experimentales, VIII (TBA-C -operación simulada-), IX (TBA-SOD -aplicación de SOD en SS-) y X (TBA\_SS -aplicación de solución salina-).

Se determinó en primer lugar la curva patrón de concentraciones de MDA partiendo de concentraciones conocidas de MDA para construir con ellas la recta de regresión. Seguidamente se valoraron las concentraciones de MDA en los segmentos intestinales obtenidos tras la intervención quirúrgica de los animales, y se procedió a la tabulación de los resultados.

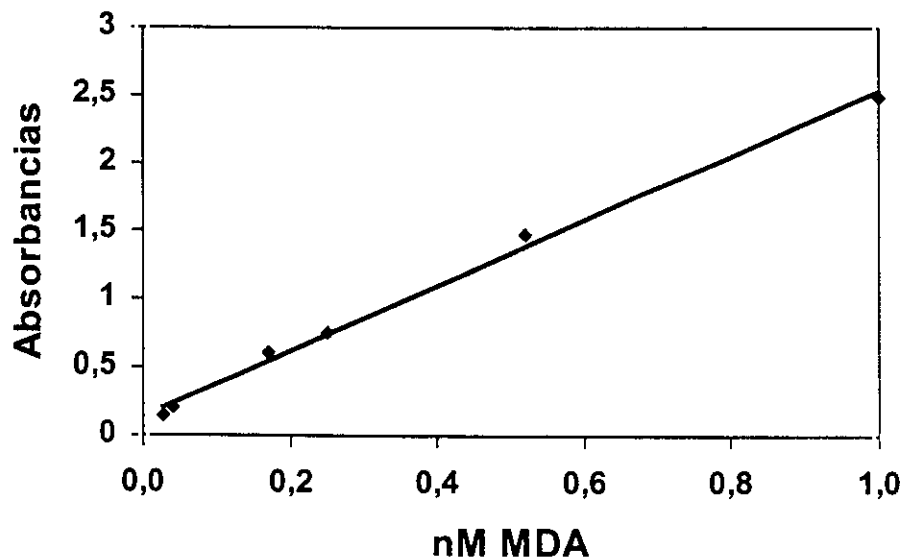
#### 4.4.1 Curva patrón

Los valores obtenidos de las absorbancias correspondientes a las concentraciones seriadas conocidas de MDA, permitieron representar la curva patrón que se expresa en la figura 21

Los valores obtenidos para la recta patrón de regresión  $y = a + bx$ , fueron  $a = 0,1559$  y  $b = 0,2764$ , quedando la ecuación general de la recta como sigue:

$$y = 0,1559 + 0,2764 x$$

El coeficiente de regresión lineal  $R$  fue de  $0,9866$  y  $R^2$  de  $0,9735$ , lo que pone de



**Figura 21:** Valoración de la concentración de malon dialdehído: recta patrón de regresión.

manifiesto que el 97,3 % de la variación total de las absorbancias es explicado por la recta de regresión, habiendo por tanto una buena correlación lineal entre absorbancias y concentraciones.

De la recta de regresión se obtuvo esta ecuación general:

$$\eta\text{M MDA} / \text{gr tejido} = (\text{DO}_{\text{abs}} - 0,1559) / 0,2764 \times 20 / 0,14$$

## 4.4.2 Concentraciones intestinales de MDA

Las concentraciones de MDA encontradas en las muestras de intestino delgado en las series estudiadas, control (no isquémica) e isquémicas, tratadas con SOD disuelto en solución salina y únicamente con solución salina respectivamente, se reflejan en el cuadro siguiente:

<b><math>\eta</math>M MDA/gr tejido</b>			
<b>SERIES ANIMALES</b>			
<b>CONEJO N°</b>	<b>Serie VIII TBA - C (operación simulada)</b>	<b>Serie IX TBA - SOD Isquemia - Reperf. + SOD en SS</b>	<b>Serie X TBA - SS Isquemia - Reperf. + Sol Salina</b>
1	Indetectable	Indetectable	30.546
2	Indetectable	Indetectable	17.108
3	Indetectable	Indetectable	69.309
4	Indetectable	Indetectable	69.309
5	Indetectable	Indetectable	74.478
6	-	Indetectable	33.647
7	-	Indetectable	129.781
8	-	Indetectable	28.478
9	-	Indetectable	42.950
10	-	Indetectable	19.175
11	-	Indetectable	77.579
12	-	Indetectable	73.444
13	-	Indetectable	78.096
14	-	Indetectable	74.995
15	-	Indetectable	1.085

## • Serie TBA-SS:

Evaluación de la normalidad:

Test de Saphiro-Wilks: no vulneración del supuesto de normalidad ( $p = 0,2820$ ).

	TBA-SS
Animales empleados	15
Casos válidos:	15

Resultados:

<b><math>\eta</math>M MDA/gr tejido</b>	
Media:	54.6654
Mediana:	69.3095
Error standard	8.6441
Varianza	1120.8020
Desv. Standard	33.4784

Interv. confianza 95%: 36.1257-73.2051

- Series TBA-S (operación simulada) y TBA-SOD (tratada con SOD):  
Los valores obtenidos fueron todos inferiores o iguales al límite de detección del método (0,000002532 nm /gr tejido).

	TBA-C	TBA-SOD
Animales empleados	5	15
Casos válidos:	5	15

#### 4.4.3 Inferencia estadística

Los valores de MDA obtenidos en las series de operación simulada y tratada con superóxido dismutasa son tan bajos que escapan al límite de detección del método. No obstante se calculó la T de Student para muestras emparejadas comparando la serie tratada con SOD con la tratada con SS, asignando a todos los valores de la primera la concentración de MDA correspondiente al nivel mínimo de detección (0,000002532 nm /gr tejido), obteniendo un nivel de significación muy elevado ( $P < 0,0001$ ). Este resultado pone de manifiesto de manera inequívoca que el tratamiento con superóxido dismutasa produce una disminución estadísticamente significativa de malon dialdehído, y por tanto de la peroxidación lipídica.

T de Student para muestras emparejadas

Serie	Variable	Numero de pares	Correlac	Sig, 2 colas	Media	DE	EE de la Media
TBA SOD	ηM/MDA /gr	15	-	-	0,000002	0,000	0,000
TBA SS					54,6653	33,478	8,644

Diferencias entre muestras pareadas			Valor t	GL	Significación (P)
Media	DE	EE de la Media			
-54,6653	33,478	8,644	-6,32	14	<,0001

## 4.5 Alteraciones morfológicas

### 4.5.1 Presencia de gas intestinal

Se realizó por observación directa del intestino, especialmente a nivel del intestino grueso y ciego, en las series destinadas al estudio de supervivencia (I, II, III, IV y V) y al de supervivencia con tratamiento con SOD (VI y VII). La observación se hizo al finalizar el tiempo de isquemia, inmediatamente antes de la fase de reperfusión.

La siguiente tabla recoge los porcentajes de animales de las series (I, II, III, IV y V) con los niveles de observación de la variable categórica "presencia de gas intestinal" en el estudio de supervivencia. Se establecen las siguientes: grado 0 significa ausencia de gas; grado 1: dilatación intestinal moderada; grado 3: dilatación intestinal intensa.

La valoración del gas intestinal observado en el intestino en los animales de las series de supervivencia al finalizar el tiempo de isquemia fue la resumida en la siguiente

tabla:

	GRADO	SERIES EXPERIMENTALES				
		I (S)	II (15')	III (30')	IV (60')	V (120')
<b>GAS INTESTINAL</b>	0	100%	100%	30%	20%	0%
	1	0%	0%	70%	30%	10%
	2	0%	0%	0%	50%	90%

Los resultados de las series VI y VII del estudio de supervivencia con tratamiento con SOD, se resumen en la siguiente al finalizar el tiempo de isquemia fueron los siguientes:

	GRADO	SERIES EXPERIMENTALES	
		VI (SOD-1)	VII (SOD-2)
<b>PRESENCIA DE GAS</b>	0	30%	20%
	1	70%	70%
	2	0%	10%

Comparando los resultados entre las series, al aumentar el tiempo de isquemia, aumenta la presencia de gas intestinal, relacionándose este parámetro con la falta de motilidad del intestino y el incremento de las fermentaciones. En los animales del estudio de supervivencia con SOD, no hay diferencias significativas entre los grados de gas intestinal encontrados en los animales tratados con esta sustancia (VI) y los tratados con placebo (VII).

#### 4.5.2 Hemorragias intestinales

Se estudió el cambio de la tonalidad de la pared intestinal en el momento de la reperfusión, en las series del estudio de supervivencia, observando el color del intestino especialmente en su porción delgada.

Además de los cambios de color debidos a los diferentes estatus del intestino, isquémico (cianótico) o perfundido (rojo cereza), se observaron extravasaciones sanguíneas en forma de hemorragias intraluminales, que se apreciaron como manchas de color oscuro en el interior del lumen intestinal, apareciendo en las proporciones expresadas en la siguiente tabla:

<b>HEMORRAGIAS INTESTINALES</b>		<b>SERIES EXPERIMENTALES</b>				
<b>GRADO</b>		I (S)	II (15')	III (30')	IV (60')	V (120')
		0	100%	100%	73%	40%
	1	0%	0%	27%	40%	40%
	2	0%	0%	0%	20%	53%

0 = Ausencia de hemorragias  
1 = Hemorragias focales  
2 = Hemorragias en sabana

Comparando los resultados, se observa que la extensión de la hemorragia aumenta al incrementarse el tiempo de isquemia, siendo inapreciables con tiempos de 15 minutos, moderadas a los 30 minutos de isquemia, de cierta consideración (60 % de los animales), a los 60 minutos de isquemia e importantes (93% de los animales) a los

120 minutos de isquemia.

#### 4.5.3 Observaciones en la necropsia

Se describen a continuación las alteraciones patológicas de los animales que fallecieron como consecuencia de la I/R, puesto que los supervivientes, a los que se sacrificó al final de la experiencia no presentaron ninguna alteración macroscópica visible, excepción hecha de las adherencias. Por lo mismo se excluyen los animales de la serie control para el estudio de la peroxidación lipídica: Serie VIII (TBA-C).

Se consideraron las siguientes alteraciones: adherencias, alteraciones en órganos, ascitis o derrame pleural, perforación intestinal, gas intestinal, hemorragias en luz intestinal, desvitalización intestinal.

#### *Adherencias*

Se observaron adherencias en torno a la AMC como consecuencia de la manipulación a que fue sometida durante la intervención. Las presentaron el 100% de los animales sacrificados, de todas las series, salvo los de la Serie VIII (TBA-C), cuya AMC no fue manipulada. Los animales sacrificados presentaron adherencias alrededor de la arteria, dificultando según los casos, su localización. Los animales muertos por causa del proceso no presentaron adherencias postquirúrgicas debido al escaso intervalo de tiempo entre la operación y la muerte.

#### *Alteraciones en órganos*

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

En la serie I de operación simulada, el animal muerto en el primer día post-intervención presentaba edema agudo de pulmón, hemorragia pulmonar y congestión vascular simple en hígado y riñones. El animal muerto de la serie II, con isquemia de 15 minutos, mostró edema agudo de pulmón y congestión vascular en hígado y riñones.

La siguiente tabla recoge los porcentajes de animales de las series (III, IV y V) que presentaron el grado de lesión de la variable categórica "alteraciones en órganos". Únicamente se recogen los resultados de las necropsias de los individuos fallecidos como consecuencia de IMA. Como variable dependiente figuran los casos de lesiones hepáticas, renales y pulmonares, definiéndose cada una como variable categórica, según la cual, grado 0 significa ausencia de lesiones y grado 1: presencia de edema y/o hemorragia pulmonar; o de congestión vascular y/o zonas necróticas en riñones; o de congestión vascular en hígado.

LESIONES	GRADO	SERIES EXPERIMENTALES		
		III (30')	IV (60')	V (120')
HEPÁTICAS	0	50%	40%	35%
	1	50%	60%	65%
RENALES	0	70%	40%	30%
	1	30%	60%	70%
PULMONARES	0	30%	20%	10%
	1	70%	80%	90%

**Inferencia estadística:** Comparando los resultados entre las series, al aumentar el tiempo de isquemia, es mayor el porcentaje de individuos con lesiones orgánicas, hasta alcanzar cifras elevadas. También se observa como el pulmón es el órgano más afectado, en cuanto que las lesiones son más intensas con tiempos de isquemia menores



y su frecuencia mantiene el mayor valor con tiempos de isquemia más altos.

En cuanto a los animales sacrificados, al final de la experiencia el 100% presentó aspecto normal de los órganos mencionados.

#### *Ascitis y derrame pleural*

La ausencia de derrame fue valorada como 0 y la presencia como 1. La siguiente tabla muestra los porcentajes de animales de cada serie, que presentaron o no alguna de estas manifestaciones.

LESIONES	GRADO	SERIES EXPERIMENTALES		
		III (30')	IV (60')	V (120')
ASCITIS	0	100%	90%	85%
	1	0%	10%	15%
DERRAME PLEURAL	0	100%	100%	90%
	1	0%	0%	10%

**Inferencia estadística:** La presencia de derrame (entre 0,50 ml y 1 ml), solo se evidenció en las series IV y V (ascitis) y únicamente en la serie V en el caso de derrame pleural.

El 100% de animales sacrificados, al final de la experiencia, independientemente de la serie, estuvo libre de ascitis y derrame pleural.

#### *Perforación intestinal*

En ningún caso tanto en los animales muertos por causa natural, como en los sacrificados, se observó perforación intestinal.

#### *Presencia de gas intestinal*

Fue valorada como grado 0 la ausencia de gas; grado 1 presencia moderada y grado 2 presencia de gas abundante en luz intestinal. Los resultados se recogen en la siguiente tabla:

GAS INTESTINAL	SERIES EXPERIMENTALES		
	III (30')	IV (60')	V (120')
0	30%	20%	0%
1	70%	30%	10%
2	0%	50%	90%

Porcentaje de animales fallecidos por la isquemia, respecto de la presencia de gas intestinal.

**Inferencia estadística:** se aprecia que el hallazgo de gas en intestino en los animales fallecidos por la isquemia fue un hallazgo frecuente, y que la frecuencia de aparición de gas y su intensidad aumentaron con el tiempo de isquemia.

Tan solo un 5% de los animales de las series anteriores, sacrificados al final de la observación, presentaron gases intestinales de grado 1 y un 2,5% de grado 2, no achacables al proceso isquémico puesto que sobrevivieron todo el tiempo de observación.

*Hemorragias en luz intestinal*

Fueron valoradas como grado 0: ausencia; 1: hemorragia focal; 2: hemorragia en sábana. Los resultados se recogen en la siguiente tabla:

HEMORRAGIA INTESTINAL	SERIES EXPERIMENTALES		
	III (30')	IV (60')	V (120')
0	90%	50%	0%
1	10%	25%	25%
2	0%	25%	75%

Porcentaje de animales que presentaron hemorragia intestinal en el momento de la necropsia.

En ninguna necropsia de los animales supervivientes a la isquemia, sacrificados al final de la experiencia, se observó hemorragia intestinal.

*Desvitalización intestinal*

Fue valorada como 0: ausencia; 1: desvitalización discreta; 2: desvitalización moderada; 3: desvitalización intensa. Los resultados de las series del estudio de supervivencia, se recogen en la tabla siguiente como porcentaje de animales y grado de desvitalización intestinal observado:

GRADO DE DESVITALIZACIÓN	SERIES EXPERIMENTALES		
	III (30')	IV (60')	V (120')
0	10%	0%	0%
1	90%	50%	0%
2	0%	30%	20%
3	0%	20%	80%

En las series de supervivencia con el ensayo de tratamiento con SOD en comparación con SS (ambas 60 minutos de isquemia), se obtuvieron los siguientes:

GRADO DE DESVITALIZACIÓN	SERIES EXPERIMENTALES	
	VI (SOD-1)	VII (SOD-2)
0	0%	0%
1	60%	50%
2	30%	30%
3	10%	20%

**Inferencia estadística:** la intensidad de la desvitalización esta directamente relacionada con el tiempo de isquemia. La mayor severidad de las lesiones aparece en la serie V, en la que el 100% de los animales mostraron desvitalización intestinal, siendo muy intensa en el 80%.

Ninguno de los animales que sobrevivieron a la isquemia y fueron sacrificados al final de la experiencia, presentaron desvitalización intestinal.

En la serie para el ensayo de la eficacia de la SOD los resultados son similares a los encontrados en la serie de supervivencia de 60 minutos de isquemia, si bien hay un

ligero menor grado de desvitalización, no significativo, entre la serie tratada con SOD respecto a la tratada con solución salina.

#### 4.5.4 Estudio microscópico en las series de la curva de supervivencia: I, II, III, IV Y V *Serie I (Sham)*

El estudio microscópico de las piezas anatómicas de los animales de la serie I dio como resultado la ausencia de lesiones, puesto que no se realizó pinzamiento de la AMC, por lo que la descripción de la anatomía patológica, se refiere únicamente a las series: II; III; IV y V. La única muerte en la serie I o control se produjo post-intervención (sham operation), debida a edema y hemorragia agudos de pulmón y shock cardiocirculatorio.

#### *Serie II(15 minutos de IMA)*

No murió ningún animal por causa directa del proceso de I/R. El único animal fallecido lo fue durante el decimotercer día post-intervención, por proceso neumónico, complicado con edema agudo de pulmón y shock hemodinámico. Los animales sacrificados al final de la experiencia mostraron:

- Hígado: sin lesiones valorables macroscópicas ni microscópicas. En 2 casos se apreció discreto aumento del infiltrado linfohistiocitario portal, sin claro valor patológico.
- Riñones: sin alteraciones macroscópicas ni microscópicas valorables.
- Pulmones: sin alteraciones macroscópicas ni microscópicas valorables, salvo un caso en el que se observó alveolitis descamativa focal y leve infiltrado inflamatorio intersticial linfocitario.
- Páncreas: sin alteraciones morfológicas valorables ni macro ni microscópicas, en ningún caso.
- AMC: en el 100% de los animales mostró permeabilidad y calibre normales y ausencia de lesiones de la pared vascular. Se observaron adherencias grasas y fibrosas laxas de la arteria y tejidos circundantes en el 100% de casos, como consecuencia de la manipulación durante la intervención.
- Ganglios linfáticos mesentéricos: el 100% de casos mostraron morfología sin alteraciones valorables. Aunque presentaron reactividad inespecífica, con hiperplasia folicular linfoide, observable también en los animales controles.
- Yeyuno: la totalidad de los individuos presentaron yeyuno viable. El aspecto microscópico y microscópico estuvo dentro de la normalidad.
- Íleon: no presentaron en ningún caso alteraciones, macroscópicas, ni microscópicas valorables.
- Colón. No presentó alteraciones macroscópicas ni microscópicas, en la totalidad de casos.

En resumen, en ninguno de los animales de la serie II, se observaron alteraciones valorables, salvo las adherencias laxas de la AMC, y en el caso fallecido al décimo tercer día con proceso neumónico, en el que tampoco se demostraron lesiones orgánicas o intestinales, salvo en pulmón.

#### *Serie III (30 minutos de IMA)*

El número total de animales muertos, tras el cuadro experimental, fue de 7 (35%), el resto -13(65%)- sobrevivió durante los 77 días de observación. Las lesiones encontradas fueron las siguientes:

- Hígado: ausencia de lesiones en los 20 casos -100%- tanto en animales fallecidos como en supervivientes.
- Riñones: en los animales supervivientes no se observaron lesiones. En los fallecidos en 4 de los 7 casos, se apreciaron imágenes de NTA (necrosis tubular aguda) debido posiblemente al shock isquémico. Mientras que en 3 casos, no se observaron lesiones valorables. Posiblemente en dependencia con el tiempo de supervivencia tras la isquemia.
- Pulmones: en supervivientes, no se observaron lesiones. En los fallecidos se observó edema agudo de pulmón y hemorragia pulmonar en 3 casos, edema agudo de pulmón y congestión vascular en 5 casos y sin alteraciones valorables en 2 casos.
- Páncreas: el 100% sin alteraciones morfológicas valorables ni macro ni microscópicas.
- AMC: en el 100% de los animales mostró permeabilidad y calibre normales y ausencia de lesiones de la pared vascular. Se observaron adherencias grasas y fibrosas laxas de la arteria y tejidos circundantes en el 100% de los animales supervivientes, como consecuencia de la manipulación durante la intervención. No se observaron adherencias en AMC de los animales fallecidos tras I/R.
- Ganglios linfáticos mesentéricos: el 100% de casos mostraron morfología sin alteraciones valorables. Aunque presentaron reactividad inespecífica, con hiperplasia folicular linfoide, observable también en los animales controles.
- Yeyuno: en animales supervivientes sin lesiones en el 100% de los 13 casos. En los fallecidos, macroscópicamente mostraron congestión vascular intensa todos ellos -7-. En 7 casos se produjo separación del epitelio de revestimiento vellositario (Grado 1) y en 4 además se produjo pérdida de este epitelio del apex vellositario (grado 2). En dos casos se observaron hemorragias de consideración y necrosis de la mucosa (grado 3).
- Íleon: sin lesiones en el 100% de animales supervivientes. En los fallecidos se observó macroscópicamente congestión vascular intensa en todos los casos y separación de la basal del epitelio de revestimiento apical vellositario (Grado 1). En 4 casos se produjo además pérdida parcial de este último (grado 2). En 3 casos se apreciaron además hemorragias intersticiales de consideración y necrosis de la mucosa (grado 3).
- Colón. No presentó alteraciones macroscópicas ni microscópicas, en la totalidad de casos.

En resumen, en esta serie, se observaron lesiones intestinales de importancia en los animales fallecidos a nivel de yeyuno, íleon y pulmón, y en menor proporción al nivel renal.

##### *Serie IV(60 minutos de IMA)*

El número total de animales muertos, tras el cuadro experimental, fue de 12 (60%), el resto -8 (40%)- sobrevivió durante los 77 días de observación. Las lesiones encontradas fueron las siguientes:

- Hígado: Ausencia de lesiones en los animales supervivientes. En los fallecidos se observó, en 4 congestión vascular moderada y en 8 congestión vascular intensa, posiblemente asociada a I/R.
- Riñones: en los animales supervivientes no se observaron lesiones. En los fallecidos en 8 de los 12 casos, se apreciaron imágenes de NTA (necrosis tubular aguda) debido posiblemente al shock isquémico. Mientras que en 4 casos, se

observó únicamente congestión vascular. Posiblemente en dependencia con el tiempo de supervivencia tras la isquemia.

- Pulmones: en supervivientes durante todo el tiempo de observación -8-, no se observaron lesiones. En los fallecidos se observó edema agudo de pulmón y hemorragia pulmonar en 8 casos. Edema agudo de pulmón y congestión vascular en los 12 casos. En los animales muertos el 4° y 10° día presentaron proceso neumónico además de edema agudo de pulmón y congestión vascular pulmonar.
- Páncreas: el 100% sin alteraciones morfológicas valorables ni macro ni microscópicas.
- AMC: en el 100% de los animales mostró permeabilidad y calibre normales y ausencia de lesiones de la pared vascular. Se observaron adherencias grasas y fibrosas laxas de la arteria y tejidos circundantes en el 100% de los animales supervivientes a partir del 4° día -10 casos-, como consecuencia de la manipulación durante la intervención. No se observaron adherencias en AMC de los animales fallecidos tras I/R o durante el primer día postintervención -10 casos-.
- Ganglios linfáticos mesentéricos: el 100% de casos mostraron morfología sin alteraciones valorables. Aunque presentaron reactividad inespecífica, con hiperplasia folicular linfoide, observable también en los animales controles.
- Yeyuno: en animales supervivientes sin lesiones en 8 casos; en los otros 4 se observaron alteraciones consistentes en aumento del infiltrado linfocitario leve, tendencia a la pérdida y desprendimiento de epitelio superficial vellositario (grado 1) por menor adherencia del mismo. En los fallecidos, macroscópicamente mostraron congestión vascular intensa todos -12 casos-. En 7 casos se produjo pérdida del epitelio del apex vellositario (grado 2). En 5 casos se observaron hemorragias de consideración en la mucosa y pérdida de la lámina propia por necrosis (grado 3). En 4 casos se observó lesión necrótica en capas musculares, con intensa desvitalización transmural. Las fibras musculares muestran homogeneización de citoplasma y borramiento nuclear. A nivel de los ganglios nerviosos vegetativos parasimpático del plexo mientérico de Auerbach, se observan neuronas en necrobiosis con cromatolisis y pérdida nucleolar (grado 4).
- Íleon: en animales supervivientes, los hallazgos fueron similares a los del yeyuno, sin lesiones en 8 casos; en los otros 4 se observaron alteraciones consistentes en aumento del infiltrado linfocitario leve, tendencia a la pérdida y desprendimiento de epitelio superficial vellositario (grado 1) por menor adherencia del mismo. Todos los fallecidos -12 casos-, macroscópicamente mostraron congestión vascular intensa. En 7 casos se produjo pérdida del epitelio del apex vellositario (grado 2). En 5 casos se observaron hemorragias de consideración en la mucosa y pérdida de la lámina propia por necrosis (grado 3). En 4 casos se observó lesión necrótica en capas musculares, con intensa desvitalización transmural. Las fibras musculares muestran homogeneización de citoplasma y borramiento nuclear. A nivel de los ganglios nerviosos vegetativos parasimpáticos del plexo mientérico de Auerbach, se observan neuronas en necrobiosis con cromatolisis y pérdida nucleolar (grado 4). Sin lesiones en el 100% de animales supervivientes.
- Colón. No presentó alteraciones macroscópicas ni microscópicas, en la totalidad de casos. Solo en un caso de los fallecidos mostró descamación parcial del epitelio de revestimiento superficial de la mucosa.

En resumen, en esta serie, se observaron lesiones intestinales de importancia en los animales fallecidos a nivel de yeyuno, íleon y en órganos alejados como pulmón, y en menor proporción al nivel renal, que se tradujeron en fallo generalizado y muerte, atribuible en todos los casos al cuadro isquémico.

*Serie V(120 minutos de IMA)*

El número total de animales muertos, tras el cuadro experimental, fue de 18 (90%), el resto -2 (10%)- sobrevivió durante los 77 días de observación. Las lesiones encontradas fueron las siguientes:

- Hígado: ausencia de lesiones en los animales supervivientes. En los fallecidos se observó, en 2 congestión vascular moderada y en 16 congestión vascular intensa, posiblemente asociada a I/R.
- Riñones: en los animales supervivientes no se observaron lesiones. En los fallecidos en 14 de los 18 casos, se apreciaron imágenes de NTA (necrosis tubular aguda) debido posiblemente al shock isquémico. Mientras que en 4 casos, se observó únicamente congestión vascular. Posiblemente en dependencia con el escaso tiempo de supervivencia tras la isquemia.
- Pulmones: en los animales supervivientes durante todo el tiempo de observación -2-, no se observaron lesiones. En los fallecidos se observó edema agudo de pulmón y hemorragia pulmonar en 14 casos, edema agudo de pulmón y congestión vascular en los 18 casos.
- Páncreas: el 100% sin alteraciones morfológicas valorables ni macro ni microscópicas.
- AMC: en el 100% de los animales mostró permeabilidad y calibre normales y ausencia de lesiones de la pared vascular. Se observaron adherencias grasas y fibrosas laxas de la arteria y tejidos circundantes en los dos animales supervivientes, como consecuencia de la manipulación durante la intervención. No se observaron adherencias en AMC de los animales fallecidos tras I/R o durante el primer día postintervención -18 casos-.
- Ganglios linfáticos mesentéricos: el 100% de casos mostraron morfología sin alteraciones valorables. Aunque presentaron reactividad inespecífica, con hiperplasia folicular linfoide, observable también en los animales controles.
- Yeyuno: en los 2 animales supervivientes se observaron alteraciones consistentes en aumento del infiltrado linfocitario leve, tendencia al desprendimiento de epitelio superficial vellositario (grado 1) por menor adherencia del mismo. En los 18 fallecidos, macroscópicamente mostraron congestión vascular intensa todos 100%. En 4 casos se produjo pérdida del epitelio del apex vellositario (grado 2). En 14 casos se observaron hemorragias de consideración en la mucosa y pérdida de la lámina propia por necrosis (grado 3). En 12 casos se observó lesión necrótica en capas musculares, con intensa desvitalización transmural (grado 4). Las fibras musculares mostraban homogeneización del citoplasma y borramiento nuclear. A nivel de los ganglios nerviosos vegetativos parasimpáticos del plexo mientérico de Auerbach, se observaron neuronas en necrobiosis con cromatolisis y pérdida nucleolar.
- Íleon: en animales supervivientes, (2 casos), los hallazgos fueron similares a los del yeyuno, con alteraciones consistentes en infiltrado linfocitario discretamente aumentado en la lámina propia y tendencia al desprendimiento del epitelio superficial de la punta de las vellosidades, por menor adherencia del mismo. En los 18 fallecidos, macroscópicamente, se observó congestión

vascular intensa (100%). En 4 casos se produjo pérdida del epitelio del apéndice vellositario (grado 2). En 13 casos se observaron hemorragias considerables en la mucosa y pérdida de la lámina propia por necrosis (grado 3). En 11 casos se observaron lesiones necróticas en capas musculares, con intensa desvitalización transmural (grado 4). Las fibras musculares mostraban homogeneización del citoplasma y borramiento nuclear. A nivel de los ganglios nerviosos vegetativos parasimpáticos del plexo mesentérico de Auerbach se observaron neuronas en necrobiosis, con cromatólisis y pérdida nucleolar.

- **Colón.** No presentó alteraciones macroscópicas ni microscópicas en los dos animales supervivientes. En los fallecidos tres casos mostraron descamación parcial del epitelio de revestimiento superficial de la mucosa.

En resumen, en esta serie, se observaron lesiones intestinales de gran importancia en los animales fallecidos a nivel de yeyuno, íleon y en órganos alejados como pulmón, y en menor proporción a nivel renal, que se tradujeron en fallo generalizado y muerte, atribuible en todos los casos al cuadro isquémico intestinal.

#### 4.5.5 Lesiones histopatológicas comparativas en las series de la curva de supervivencia

En la siguiente tabla se recoge el número de animales de cada serie que presentaron lesiones histológicas, y entre paréntesis, el porcentaje relativo respecto al número total de fallecimientos de cada serie.

Independientemente del grado de las lesiones, se observa que en todas las series aparecen lesiones de importancia en el intestino delgado, área regada por la AMC, lo que evidencia la relación entre la interrupción experimental del flujo sanguíneo y la aparición de lesiones histológicas. El colón en general no mostró alteraciones o fueron discretas.

La AMC permanece normal en todas las series, sin perforaciones, obstrucciones, o lesión parietal. En todos los casos fue permeable tras la retirada del microclamp.

En cuanto a los resultados en otros órganos: el páncreas no mostró ninguna alteración. En los ganglios linfáticos mesentéricos se observó reactividad inespecífica en los límites de la normalidad.

El hígado presenta una tasa de afectación semejante en todas las series, independientemente del tiempo de isquemia utilizado y de escaso grado. Las lesiones en el pulmón aumentan a medida que la isquemia intestinal se prolonga en el tiempo alcanzando en la serie V el 100% de los casos. Las lesiones en yeyuno e íleon fueron similares dentro de la misma serie y progresivas con el tiempo de isquemia en grado de afectación y cantidad de animales afectados, alcanzando en la serie V el 100%. Las lesiones en el colon fueron de escasa importancia en todas las series.

En la tabla siguiente, se muestra el número de animales, y porcentajes relativos, de los grupos de fallecidos de cada serie, en que aparecen alteraciones histológicas, en los diferentes órganos.

ÓRGANO	SERIES EXPERIMENTALES							
	II (15')		III (30')		IV (60')		V (120')	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Hígado	0/1	0	0/7	0	12/12	100	18/18	100
Riñones	0	0	4/7	57,14	12/12	100	18/18	100
Pulmones	1/1	100	7/7	100	12/12	100	18/18	100
Páncreas	0/1	0	0/7	0	0/12	0	0/18	0
AMC	0/1	0	0/7	0	0/12	0	0/18	0
Ganglios	0/1	0	0/7	0	0/12	0	0/18	0
Yeyuno	0/1	0	7/7	100	12/12	100	18/18	100
Ileon	0/1	0	7/7	100	12/12	100	18/18	100
Colon	0/1	0	0/7	0	1/12	8,33	3/18	16,66

#### 4.5.6 Estudio microscópico en los animales de las series VI y VII

En los animales supervivientes de la serie 6 (SOD-1) y 7 (SOD-2), los hallazgos histológicos fueron similares. También fueron similares los hallazgos correspondientes a los animales muertos por el cuadro de I/R en ambas series. Por lo que el estudio histológico se describe en conjunto.

El número total de animales muertos, tras el cuadro experimental, en la serie VI fue de 4 (40%), el resto -6 (60%)- sobrevivió durante los 77 días de observación. En la serie VII los animales muertos tras la isquemia fueron 5 (50%) y el resto 5 (50%) sobrevivieron los 77 días de observación hasta su sacrificio.

- Hígado: ausencia de lesiones en los animales supervivientes. En los fallecidos se observó: serie VI en todos -4- congestión vascular moderada; serie VII también en todos los casos -5- congestión vascular moderada. Posiblemente asociada a I/R.
- Riñones: en los animales supervivientes no se observaron lesiones. En los fallecidos de la serie VI en 2 de los 4 casos, se apreciaron imágenes de NTA (necrosis tubular aguda) debido posiblemente al shock isquémico. Mientras que en los otros 2 casos, se observó únicamente congestión vascular. Posiblemente en dependencia con el tiempo de supervivencia tras la isquemia. En la serie VII, se observó en 2 casos, con NTA y el resto -3- casos congestión vascular moderada. Es posible que la menor afectación con respecto a la serie IV de la curva de supervivencia, se deba los tratamientos con suero o SOD respectivamente en las series VI y VII. Lo mismo podría decirse de la diferencia encontrada entre las series VI y VII.
- Pulmones: en supervivientes durante todo el tiempo de observación, no se observaron lesiones. En los fallecidos de la serie VI se observó edema agudo de pulmón; hemorragia y congestión vascular pulmonar en los 4 casos. En la serie VII hubo 3 casos con idénticas lesiones a las citadas y en los otros 2 casos, solo se apreció congestión y edema agudo de pulmón.
- Páncreas: el 100% de los animales de las series VI y VII, sin alteraciones morfológicas valorables ni macro ni microscópicas.
- AMC: en el 100% de los animales mostró permeabilidad y calibre normales y ausencia de lesiones de la pared vascular. Se observaron adherencias grasas y fibrosas laxas de la arteria y tejidos circundantes en el 100% de los animales supervivientes, como consecuencia de la manipulación durante la intervención. No se observaron adherencias en AMC de los animales fallecidos tras I/R o



durante el primer día postintervención. Los hallazgos fueron similares para las series VI y VII.

- Ganglios linfáticos mesentéricos: el 100% de casos mostraron morfología sin alteraciones valorables. Aunque presentaron reactividad inespecífica, con hiperplasia folicular linfoide, observable también en los animales controles.
- Yeyuno: en animales supervivientes de la serie VI sin lesiones en 3 casos; en el caso restante se observaron alteraciones consistentes en aumento del infiltrado linfocitario leve, tendencia a la pérdida y desprendimiento de epitelio superficial vellositario (grado 1) por menor adherencia del mismo. En la serie VII en 4 casos no se observaron alteraciones y en un caso se observaron alteraciones consistentes en aumento del infiltrado linfocitario leve, tendencia a la pérdida y desprendimiento de epitelio superficial vellositario (grado 1) por menor adherencia del mismo. En los fallecidos de la serie VI, macroscópicamente mostraron congestión vascular intensa todos -4 casos-. En los 4 casos se produjo pérdida del epitelio del apex vellositario (grado 2). En 3 casos se observaron hemorragias de consideración en la mucosa y pérdida de la lámina propia por necrosis (grado 3). En 2 se observaron lesiones necróticas en capas musculares, y desvitalización transmural. Las fibras musculares en estos 2 casos mostraron homogeneización de citoplasma y borramiento nuclear. A nivel de los ganglios nerviosos vegetativos parasimpático del plexo mientérico de Auerbach, se observan neuronas en necrobiosis con cromatolisis y pérdida nucleolar en 3 casos. En los fallecidos de la serie VII, macroscópicamente mostraron congestión vascular intensa todos -5casos-. En 4 casos se produjo pérdida del epitelio del apex vellositario (grado 2). En 4 casos se observaron hemorragias de consideración en la mucosa y pérdida de la lámina propia por necrosis (grado 3). En 3 se observaron lesiones necróticas en capas musculares, y desvitalización transmural. Las fibras musculares en estos 3 casos mostraron homogeneización de citoplasma y borramiento nuclear. A nivel de los ganglios nerviosos vegetativos parasimpático del plexo mientérico de Auerbach, se observan neuronas en necrobiosis con cromatolisis y pérdida nucleolar en 4 casos.
- Íleon: las lesiones son similares a las del yeyuno. En animales supervivientes de la serie VI sin lesiones en 3 casos; en el caso restante se observaron alteraciones consistentes en aumento del infiltrado linfocitario leve, tendencia a la pérdida y desprendimiento de epitelio superficial vellositario (grado 1) por menor adherencia del mismo. En la serie VII en 4 casos no se observaron alteraciones y en un caso se observaron alteraciones consistentes en aumento del infiltrado linfocitario leve, tendencia a la pérdida y desprendimiento de epitelio superficial vellositario (grado 1) por menor adherencia del mismo. En los fallecidos de la serie VI, macroscópicamente mostraron congestión vascular intensa todos -4 casos-. En los 4 casos se produjo pérdida del epitelio del apex vellositario (grado 2). En 3 casos se observaron hemorragias de consideración en la mucosa y pérdida de la lámina propia por necrosis (grado 3). En 3 se observaron lesiones necróticas en capas musculares, y desvitalización transmural. Las fibras musculares en estos 3 casos mostraron homogeneización de citoplasma y borramiento nuclear. A nivel de los ganglios nerviosos vegetativos parasimpático del plexo mientérico de Auerbach, se observan neuronas en necrobiosis con cromatolisis y pérdida nucleolar en 3 casos (grado 4). En los fallecidos de la serie VII, macroscópicamente mostraron congestión

vascular intensa todos -5 casos-. En 4 casos se produjo pérdida del epitelio del apex vellositario (grado 2). En 4 casos se observaron hemorragias de consideración en la mucosa y pérdida de la lámina propia por necrosis. (grado 3). En 3 se observaron lesiones necróticas en capas musculares, y desvitalización transmural. Las fibras musculares en estos 3 casos mostraron homogeneización de citoplasma y borramiento nuclear. A nivel de los ganglios nerviosos vegetativos parasimpático del plexo mientérico de Auerbach, se observan neuronas en necrobiosis con cromatolisis y pérdida nucleolar en 3 casos (grado 4).

En resumen, en esta serie, se observaron lesiones intestinales de importancia en los animales fallecidos a nivel de yeyuno, íleon y en órganos alejados como pulmón, y en menor proporción a nivel renal, que se tradujeron en fallo generalizado y muerte. atribuible en todos los casos al cuadro isquémico.

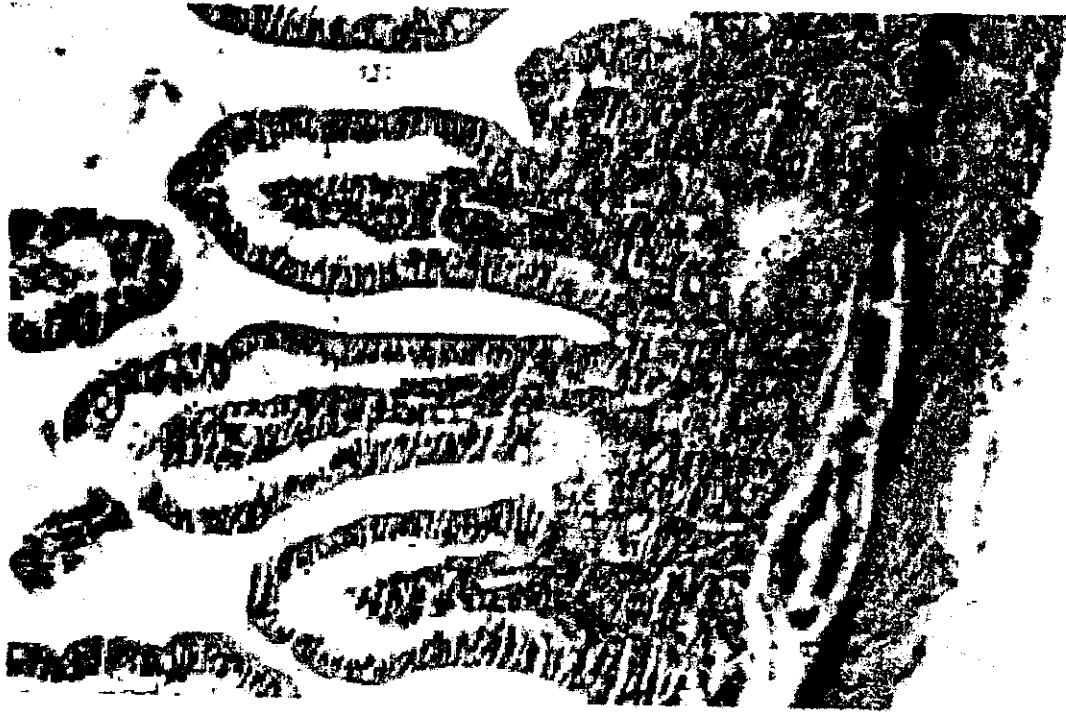
### 4.5.7 Estudio microscópico en las series de animales VIII, IX y X, para el estudio de la peroxidación lipídica

En la serie VIII o control (TBA-C), no se observaron lesiones ni macro ni microscópicas, en órganos de los 5 animales de la serie.

Todos los animales de la serie IX (TBA-SOD) y de la serie X (TBA-SS), fueron sacrificados tras una hora de reperfusión. No se produjeron muertes espontáneas en ese tiempo. Los hallazgos histológicos fueron similares, por lo que el estudio histológico se hace en conjunto.

- Hígado: ausencia de lesiones de consideración en los estudios de microscopía óptica, en ambas series. En todos los casos se produjo congestión vascular sinusoidal de moderada intensidad.
- Riñones: ausencia de lesiones de consideración en todos los casos de ambas series. En todos los casos de ambas series se observó congestión vascular de moderada intensidad.
- Pulmones: en 7 casos (7/15) se observó edema agudo de pulmón y congestión vascular. En el resto sin alteraciones.
- Páncreas: el 100% de los animales, sin alteraciones morfológicas valorables ni macro ni microscópicas.
- AMC: en el 100% de los animales de las series IX y X mostraron permeabilidad y calibre normales y ausencia de lesiones de la pared vascular. No se observaron adherencias.
- Ganglios linfáticos mesentéricos: el 100% de casos mostraron morfología sin alteraciones valorables. Presentaron reactividad inespecífica, con hiperplasia folicular linfoide, todos los casos.
- Yeyuno: en todos los casos de la serie IX (15), se observó edema discreto moderado en la lámina propia y submucosa. En 10 casos se observó además hemorragias focales (10/15) en la lámina propia y aparición del espacio de Gruenhagen (grado 1) y denudación del epitelio de la punta de las vellosidades en otras áreas (grado 2). En la serie X se observó en todos los casos (15) edema moderado en la lámina propia y submucosa. En 12 casos, se observaron amplias hemorragias en la lámina propia y aparición del espacio de Gruenhagen (grado 1) y denudación del epitelio de la punta de las vellosidades (grado 2). En 2 casos se produjo pérdida total del epitelio vellositario y necrosis parcial del epitelio glandular (grado 3).

- Ileon: en la serie IX se observó en todos los casos (15), edema discreto en la lámina propia y submucosa. En 9 casos (9/15) se observaron además hemorragias focales en la lámina propia y aparición del espacio de Gruenhagen (grado 1) y focálmente, denudación del epitelio de la punta vellositaria (grado 2). En la serie X se observó en todos los casos (15) edema discreto - moderado de la lámina propia y submucosa. En 10 casos (10/15) se observaron además hemorragias en la lámina propia y aparición del espacio de Gruenhagen (grado 1) y denudación del epitelio de la punta vellositaria en amplias áreas (grado 2)



**Figura 22:** Isquemia 60 minutos; lesiones en yeyuno: espacios de Gruenhagen a nivel de las vellosidades. (Hematoxilina-eosina x 600).



**Figura 23:** Isquemia 30 minutos; lesiones en yeyuno: vista detallada de una vellosidad mostrando la lesión inicial (espacios de Gruenhagen). (Hematoxilina-eosina x 1000).



**Figura 24:** Denudación completa del epitelio vellositario, con necrosis parcial del resto de la mucosa (grado 3). (Hematoxilina-eosina x 100).



**Figura 25:** Detalle de la fotografía anterior. (Hematoxilina-eosina x 600).



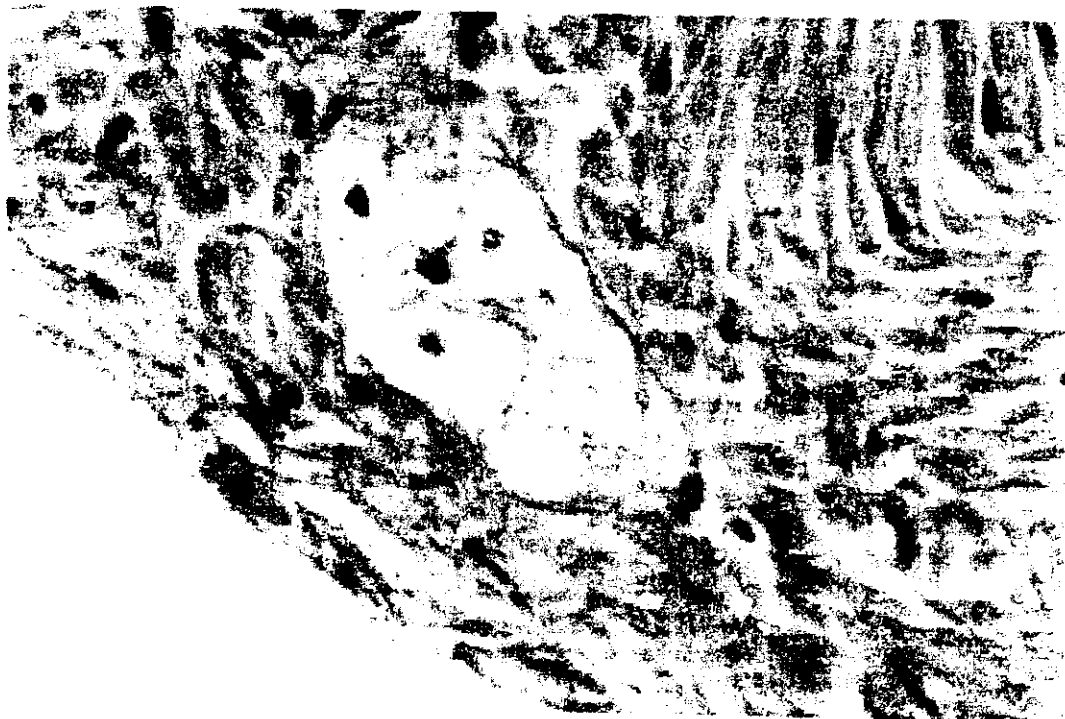
**Figura 26:** Isquemia 120 minutos: Denudación completa del epitelio vellositario, con pérdida del epitelio de las criptas de la lámina propia (grado 4). (Hematoxilina-eosina x 150).



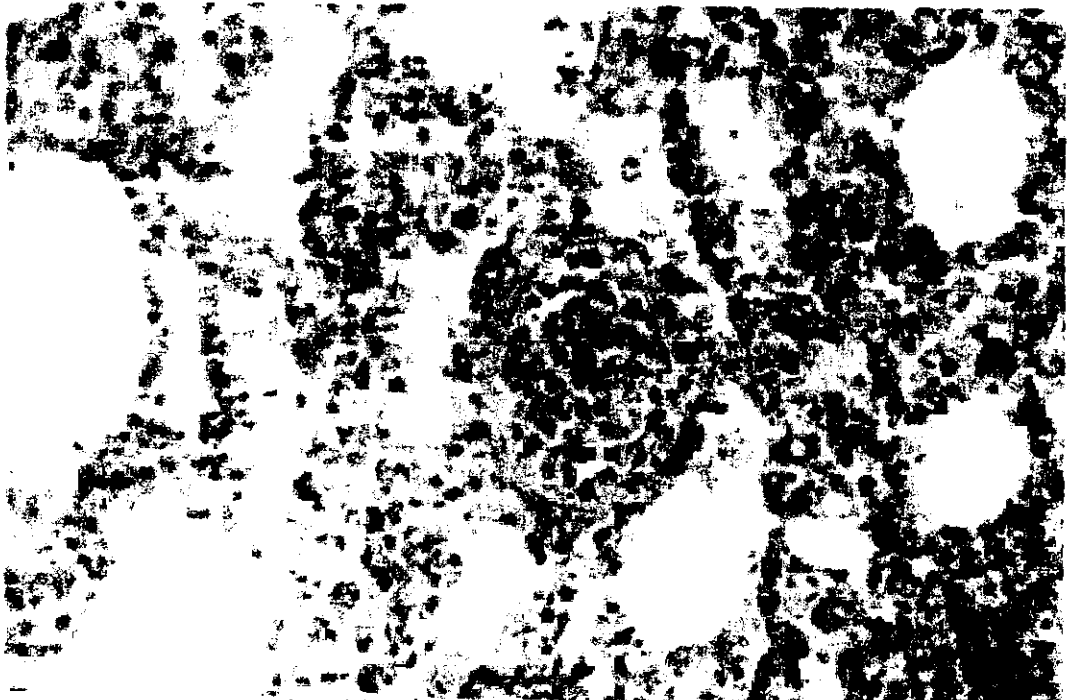
**Figura 27:** Isquemia 120 minutos: Necrosis completa transmural, vellosidades y lámina propia denudadas de epitelio (grado 4). (Hematoxilina-eosina x 100).



**Figura 28:** Isquemia 120 minutos: necrosis de coagulación a nivel de las capas musculares. Las fibras musculares han perdido el núcleo y el citoplasma aparece rosado y homogéneo (grado 4). (Hematoxilina-eosina x 400).



**Figura 29:** Isquemia 120 minutos: ganglio vegetativo parasimpático correspondiente al plexo mioentérico de Auerbach mostrando neuronas ganglionares con gran picnosis nuclear y vacuolización citoplasmática así como pérdida de pericitos (grado 4). (Hematoxilina-eosina x 1000).



**Figura 30:** Isquemia 120 minutos: sección de parénquima pulmonar, mostrando gran congestión vascular, a nivel de los tabiques interalveolares. También se observa inicio de marginación leucocitaria. (Hematoxilina-eosina x 400).



**Figura 31:** Isquemia 120 minutos: borramiento de la estructura alveolar; los alveolos aparecen ocupados por exudados propios del edema agudo de pulmón y hemorragia. (Hematoxilina-eosina x 400).



## 5 DISCUSIÓN

### 5.1 Supervivencia en animales sometidos a isquemia-reperfusión de la arteria mesentérica craneal.

En nuestro estudio de supervivencia, varios grupos de animales fueron sometidos a diferentes tiempos de isquemia de la arteria mesentérica craneal, observando que la supervivencia se va reduciendo a medida que aumenta el tiempo de isquemia en dicho vaso. El cálculo estadístico, demostró la implicación del tiempo de isquemia en las posibilidades de supervivencia, disminuyendo la supervivencia, en relación únicamente a la variable "tiempo".

Nosotros obtenemos, con tiempos de 15 minutos de isquemia, una supervivencia del 95%; con 30 minutos del 65%; con 60 minutos una supervivencia del 40 % y de tan solo el 10% con 120 minutos, apreciándose una evidente y directa relación entre mortalidad y el tiempo de isquemia, comprobada mediante el estudio estadístico correspondiente, en el que se encuentran diferencias muy significativas de supervivencia a partir de los 60 minutos de isquemia respecto a la serie control ( $p=0,008$ ) aumentando esas diferencias en la serie isquémica de 120 min ( $p=0,000$ ). Respecto a las series isquémicas de 15 y 30 min las diferencias de supervivencia no son significativas ( $p=1,00$  y  $p=0,09$  respectivamente)

En la bibliografía consultada, se han encontrado trabajos en los que se hace una valoración de la supervivencia o mortalidad en animales sometidos a diferentes tiempos de isquemia: Shapiro *et al*,<sup>47</sup> en 1958, someten a isquemia a la AMC durante una hora a conejos, obteniendo una supervivencia del 11% en los animales sin ningún tipo de tratamiento. Caridis, Cuevas y Fine,<sup>39</sup> en 1972 obtienen una supervivencia del 0% (mortalidad del 100%) entre las 2 y tres horas postreperfusión, también tras una isquemia de 1 hora de la AMC. Guijarro en 1994,<sup>50</sup> obtiene una supervivencia del 50% tras 30 minutos de isquemia y de un 40% después de 60 minutos. En otro trabajo realizado en conejos, Guijarro *et al*<sup>217</sup> encontraron una relación directa entre el tiempo de oclusión mesentérica, la gravedad de las lesiones y el aumento de la mortalidad.

En perros, Hashimoto y Thal,<sup>53</sup> en 1971 obtienen una supervivencia del 100% a las 48 horas tras 30 minutos de isquemia. Chiu *et al*<sup>42</sup> en 1970 obtienen una supervivencia del 11% tras tres horas de clampaje de la AMC. Mahonar y Tyagy<sup>55</sup> en 1973, obtienen una supervivencia del 0% (mortalidad 100%) tras ligar la AMC durante 2 horas, con un rango de supervivencia entre 7 y 8 horas.

En ratas, en 1983, Grosfeld *et al*<sup>64</sup> encuentran una supervivencia del 18% en ratas sometidas a 1 hora de isquemia mesentérica. Boorstein *et al*<sup>65</sup> en 1958 provocan isquemia clampando durante 85 minutos la AMC de un grupo de ratas y obteniendo un 21% de supervivencia en un lote tratado con solución salina. Riera *et al* en 1991, obtienen un 80% de supervivencia tras 60 minutos de oclusión de la AMC. Fernández, Martínez y Vega,<sup>218</sup> sometieron a ratas a un pinzamiento de la AMC durante 30 minutos, obteniendo una supervivencia del 7% a las 24 horas. Sun, Farias y Markov,<sup>69</sup> también tras 30 minutos de isquemia, obtuvieron una supervivencia del 57% a las 48 horas en ratas macho. Sawchuck *et al*<sup>219</sup> después de 90 minutos de pinzamiento arterial, obtuvieron un 15% de supervivencia. Ben-Dahan *et al*<sup>220</sup> tras 120 minutos de oclusión vascular encontraron una mortalidad del 34% a las 24 horas de observación. Resultados parecidos obtuvieron Boornstein, Lawrence y Cronenwett,<sup>65</sup> también con 120 minutos de isquemia y una mortalidad del 24% a las 48 horas. Carnés *et al*<sup>221</sup> en 1997, publican el periodo de supervivencia para cuatro periodos de tiempo diferentes en ratas

encontrando una significación estadística entre el tiempo de isquemia y la mortalidad. Carnés en 1999,<sup>74</sup> encuentra una mortalidad que variaba desde el 0% con 15 minutos de isquemia mesentérica al 100% a los 180 minutos con una tasa de letalidad 50 en torno a los 60 minutos para las hembras y de más de 120 minutos para los machos.

En hámsters, Boyd *et al*<sup>82</sup> tras 30 minutos de isquemia mesentérica obtuvieron una supervivencia del 25%.

En clínica humana, Martínez *et al*<sup>222</sup> encontraron, que los fallecimientos se incrementaban progresivamente al aumentar el tiempo de isquemia, observando que eran máximos tras 60 horas de isquemia y que transcurrido este tiempo, descendían bruscamente hasta niveles inferiores al 4%.

Considerando estos trabajos se observa que los autores obtienen diferentes porcentajes de supervivencia con los mismos animales para iguales tiempos de IMA, advirtiendo que no está bien determinada una tasa letal media aproximada. Es significativo en algunos casos, las grandes diferencias de mortalidad y así, en conejos, entre el 11% de supervivencia de Saphiro tras 1 hora de isquemia y el 40% observado por Guijarro<sup>50</sup> después de los mismos 60 minutos en la misma especie animal, nuestros resultados se aproximan a éste último.

Si bien estas diferencias ponen de manifiesto la existencia de un desacuerdo patente entre los autores sobre la relación tiempo de isquemia - supervivencia, sin embargo, todos comparten la idea de que la mortalidad se incrementa cuanto mayor es el tiempo de la anoxia intestinal.

Otro de los hallazgos encontrados en el estudio de supervivencia es el hecho de que la mortalidad de los animales sometidos a isquemia intestinal se produce sobre todo en los primeros días post-intervención y especialmente en los primeros dos días. De los 38 animales sometidos a isquemia que fallecieron durante el estudio, 34 lo hicieron durante las primeras 24-48 horas, lo cual supone un porcentaje del 89,47%. Tras pasado este umbral de tiempo, la mortalidad total obtenida durante los siguientes 75 días, se redujo a un poco significativo 10,43%. Con este hecho comprobamos que la isquemia mesentérica aguda, cursa con mortalidad también de forma aguda, por lo que, en futuros estudios experimentales de supervivencia, los tiempos de observación podrían reducirse, siendo suficiente una semana de observación en lugar de las 11 semanas empleadas en este estudio.

Del mismo hallazgo se desprende que en la pauta terapéutica a seguir en situaciones de isquemia intestinal lo más importante es encontrar tratamientos medicamentosos o quirúrgicos que ayuden a superar este corto y crítico periodo de tiempo.

En cuanto a las causas de la mortalidad y según la bibliografía consultada, son varios y no uno sólo, los factores que pueden explicar las lesiones isquémicas que conducen a la muerte. Desde hace años, numerosos autores apoyan la teoría de que los RL son agentes primordiales implicados en la producción de las lesiones isquémicas; otros sostienen que las lesiones más graves se producen por la propia destrucción celular del tejido durante la isquemia; algunos basan su teoría en la acción desmesurada de las células polimorfonucleares tras la revascularización; por último, un cuarto grupo, relaciona las altas tasas de mortalidad con la sepsis generalizada que acompaña al ambiente anaerobio. Creemos que todos y cada uno de estos hechos ayudan a comprender mejor el proceso isquémico.

Se mantiene que los RL, juegan un papel primordial en el agravamiento de las lesiones debido a las peculiaridades que presentan y a la facilidad con que se generan. Los RL son, posiblemente, los agentes menos sujetos a control desde el momento en el

que se inicia la manipulación del animal. Gil *et al*<sup>223</sup> describieron la lipoperoxidación de las membranas con 3 procedimientos anestésicos, lo que aporta una idea sobre la actuación de los RL. Si durante el desarrollo del proceso isquémico y la posterior revascularización, se produce un pico en la producción de estas sustancias, es lógico pensar que su implicación en las lesiones sea de considerable importancia. No obstante, la principal duda surge cuando se valora su actividad y si potencialmente son capaces de provocar la muerte a un individuo isquémico por sí solos.

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

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

La proliferación bacteriana masiva y la liberación de endotoxinas que se produce como consecuencia del microambiente favorable durante la falta de oxígeno, constituye un factor de importancia. Esta proliferación bacteriana puede traducirse en una infección que afecte a la totalidad del organismo. Como consecuencia, se origina vasodilatación periférica y aumento del gasto cardíaco. Todo ello conduce a un fallo multiorgánico con afectación de otros órganos. Fontes *et al*<sup>224</sup> demostraron que tras un cuadro experimental de I/R se inducía un fallo en la médula ósea, provocando a corto plazo una depresión de la granulopoyesis, y por tanto un aumento de la posibilidad de sepsis generalizada. En estos casos se provocan cambios histológicos que revelan una inflamación sistémica y el intestino muestra signos evidentes de edema intersticial y de necrosis isquémica.

En el presente trabajo, aunque no se valoró de manera directa la presencia de bacterias como consecuencia de la isquemia, se hizo un seguimiento de los animales que presentaron gas intestinal después del período isquémico, encontrándose una clara relación entre el tiempo de isquemia y la abundante presencia de gas, lo cual puede ser índice de sepsis intestinal, hecho que dejamos pendiente de ulteriores investigaciones.

Igualmente, se contrastó que las lesiones tisulares e histológicas producidas por la falta de sangre oxigenada, en muchas ocasiones son de un grado de severidad tan elevado que, harían inviable la recuperación del intestino conduciendo a la muerte del animal.

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

Considerando la gran cantidad de factores que participan en este cuadro patológico, es importante conocer la curva de supervivencia, la cual desvela la existencia de diferencias entre lesiones reversibles e irreversibles, lo que determinan la posibilidad de un tratamiento y la posible supervivencia.

Otro factor implicado en la supervivencia digno de tener en cuenta es el estatus anestésico del animal. En la mayoría de los modelos experimentales de isquemia intestinal revisados, no se menciona este estatus, limitándose los autores a citar el fármaco inductor. Los distintos modelos experimentales realizados en conejos, encontrados en la bibliografía fueron hechos empleando pentobarbital sódico. En nuestro trabajo, usamos para la inducción una mezcla de ketamina y xilazina, que dadas sus propiedades farmacológicas, analgésicas, miorelajantes y ansiolíticas, proporciona un estado de relajación muy favorable y menos agresivo para los prolongados procesos de intervención quirúrgica, especialmente en las series de mayor tiempo de isquemia, continuándose la fase operatoria con anestesia gaseosa con una mezcla de oxígeno, protóxido de nitrógeno e isofluorano. En este sentido, obtenemos unas supervivencias ligeramente superiores a las citadas por Guijarro *et al*<sup>225</sup> en 1997, en similares condiciones de isquemia pero empleando pentotal sódico como agente anestésico.

Además de la reversión farmacológica de los agentes anestésicos, en el postoperatorio inmediato se producen cambios funcionales en el individuo, como consecuencia del traumatismo quirúrgico que es importante valorar.

Aunque el efecto anestésico desaparece en pocos minutos tras finalizar la intervención quirúrgica, además de la mayor o menor cantidad de gases anestésicos respirados, el efecto traumático de la operación puede tener alguna implicación en la evolución postquirúrgica del animal. En este efecto traumático se incluiría la producción de endotoxinas bacterianas y la proliferación bacteriana, la gravedad de las lesiones, tanto intestinales como sistémicas, la disfunción de la circulación sistémica, la disminución de los sistemas detoxificadores del organismo, y la innumerable cantidad de procesos anómalos que desencadena el infarto intestinal con la alteración de la homeostasis del organismo.

## **5.2 Supervivencia en la isquemia-reperfusión mesentérica en relación al tratamiento preventivo con superóxido dismutasa**

Hasta el momento se han empleado muchas sustancias a base de antioxidantes y secuestradores de los radicales con el fin de mejorar la supervivencia de los procesos isquémicos. En el presente trabajo se empleó una enzima, la superóxido dismutasa (SOD), para tratar de modificar los índices de supervivencia de las series animales a las que se practicó un clampaje de la AMC y posterior reperfusión, obteniendo una ligera reducción de la mortalidad no significativa.

Los resultados obtenidos por los diversos autores han sido muy desiguales y la mayoría de ellos están sujetos a las variables dependientes, entre las que destacan los tiempos de isquemia, el tipo de antioxidante empleado o la concentración de éstos. Muchos de estos trabajos, independientemente de la sustancia utilizada, informan de efectos terapéuticos o protectores considerables, pero al igual que en los hallazgos obtenidos por nosotros, estas mejoras no siempre resultaron estadísticamente significativas.

Entre los diferentes autores consultados, no encontramos un acuerdo claro en relación con el tiempo de isquemia de la AMC que se ha de aplicar para experimentar el efecto de algún tratamiento, por lo que nosotros hemos tratado de aproximarnos al tiempo más cercano de nuestras series de supervivencia que produce el 50% de la mortalidad (TI-50), empleando según este criterio la serie de 60 minutos de isquemia, para los ensayos comparados de supervivencia en animales tratados con superóxido dismutasa.

Las series tratadas con SOD aumentaron un no significativo 10% los valores de supervivencia en relación a los controles (del 50% en la serie tratada con S.S. a 60% en la serie con SOD). Otros autores, como Ortíz-Lacorzana *et al*<sup>68</sup> obtuvieron en ratas un aumento de la supervivencia, también estadísticamente no significativo. Dalsing *et al*<sup>157</sup> encontraron que ratas macho tratadas exclusivamente con SOD aumentaban la tasa de supervivencia un 25%, pero este aumento tampoco resultó estadísticamente significativa.

Este aspecto pondría de manifiesto, una vez más, que aunque los RL juegan un papel importante en las lesiones por I/R, no son los únicos responsables del cuadro patológico. La muerte de los individuos tras la I/R, depende de múltiples factores que se potencian unos a otros, llevando al organismo a un estado de shock irreversible.

Probablemente, el efecto incompleto de la SOD reside en la incapacidad de evitar las lesiones de destrucción masiva producidas por la falta de oxígeno y en la imposibilidad de prevenir la activación de los neutrófilos, responsables en su mayoría de las lesiones producidas durante la reperfusión. Granger *et al*<sup>81</sup> demostraron que el tratamiento con SOD no ejerce un efecto directo sobre la inhibición de adherencia leucocitaria al endotelio de los vasos.

En condiciones fisiológicas normales, las células están provistas de mecanismos de neutralización frente a RL, presentando niveles adecuados de SOD, tanto en su interior como en fluidos extracelulares. Ambas formas difieren en la masa molecular relativa, y aunque el papel biológico que desempeña la SOD extracelular no está aclarado totalmente, parece ser que se asocia a las superficies de las células endoteliales, protegiéndolas frente a agentes oxidantes.<sup>226</sup> Cuando se produce un aporte exógeno de la enzima, los niveles extracelulares se elevan de forma considerable, aunque el efecto protector que realizan no parece ser muy elevado. Kyle *et al*<sup>227</sup> demostraron que es necesario que la enzima sea incorporada a las células por endocitosis a fin de que el efecto protector sea máximo. Este hecho supone una aportación manifiesta a la implicación de la SOD en la supervivencia de los animales. Es probable que animales sometidos a poco tiempo de isquemia, en los que las células no han sufrido un daño grave, tengan más probabilidades de supervivencia que los animales sometidos a un tiempo muy prolongado de isquemia, puesto que las células estarían más dañadas y el mecanismo de endocitosis más alterado.

La SOD sería capaz de reducir, moderar y atenuar las lesiones en el propio órgano isquémico, siempre que este sea en cierto modo viable tras la falta de oxígeno, pero no es capaz de proteger al individuo completo de las consecuencias que se derivan de la insuficiencia de oxígeno que se produce durante la oclusión experimental de la arteria, debido a la acción limitada de las funciones que realiza. Probablemente esta es una de las causas por la que ciertos autores encuentran resultados más evidentes cuando combinan varias sustancias antioxidantes que actúan a diferentes niveles. Homans *et al*<sup>228</sup> y Tanaka *et al*,<sup>229</sup> en los años 1992 y 1993 respectivamente, y de forma independiente, estudiaron el efecto sobre tejidos isquémicos del tratamiento combinado a base de SOD y catalasa, encontrando, en ambos casos, una mejora en las lesiones histológicas.

Algunos autores, con el fin de aumentar la supervivencia y disminuir el efecto lesivo de los RL, han administrado la SOD conjugada con sustancias como el polietilenglicol con el fin de aumentar la vida media del enzima, haciendo que se libere gradualmente en el medio y dotando al individuo de un tratamiento con efecto retardado. En el presente trabajo se aplicó la enzima libre, no conjugada a otras sustancias puesto que se consideró que la actuación de los RL es masiva con la

reintroducción de sangre oxigenada en el torrente circulatorio, y el efecto de la liberación de la SOD tras las 12 o 24 horas posteriores a la reperfusión tendría pocas o nulas propiedades protectoras en el animal.

El tratamiento más eficaz con SOD sería el realizado sobre lesiones que no fueran irreversibles, aplicándolo antes de la aparición masiva de RL, preparando así una primera barrera protectora y evitando un pico en la concentración.

### 5.3 Peroxidación lipídica y su modificación por superóxido dismutasa

Otamiri,<sup>230</sup> al valorar la permeabilidad vascular y cuantificar los niveles de MDA libre en el intestino, en ratas sometidas a I/R intestinal pudo observar que la isquemia, seguida de reperfusión, incrementaba la permeabilidad vascular y el contenido de MDA libre en la mucosa, asociado a un incremento de la peroxidación lipídica.

Este MDA liberado es un metabolito secundario de la actuación de los RL, que puede considerarse como indicador fiable del efecto de éstos sobre las membranas, de modo que su cuantificación libre en el tejido proporcione una aproximación veraz al proceso de peroxidación lipídica y a la génesis de un desequilibrio en el microambiente del tejido anóxico. Esta explosión de RL en el medio no sólo ejerce un efecto lesivo a nivel intestinal sino que es capaz de afectar a órganos más distales, induciendo la destrucción de las membranas.

En nuestro modelo experimental se sometió a una serie de conejos a 60 minutos de isquemia seguidos de otros 60 minutos de reperfusión, encontrándose un aumento considerable de los niveles de MDA libre que, valorados mediante el test del TBA, alcanzaron un valor medio de 54.6654 (DE=33.4784) nmoles de MDA por gramo de tejido. La estrategia de infusión de la SOD en dos tiempos, inmediatamente antes de la reperfusión y durante los 10 minutos inmediatamente posteriores a ésta, siguió lo expuesto en los trabajos de Ceconi *et al*,<sup>146</sup> que afirmaron que los niveles de MDA libre en el tejido son prácticamente inapreciables durante la isquemia y tras los primeros momentos de la reperfusión, y es transcurridos unos minutos cuando se dispara la peroxidación lipídica y se producen las reacciones que liberan MDA al tejido. Con este fin se eligieron estos tiempos de infusión, con objeto de que la actividad del enzima fuese máxima coincidiendo con el momento de mayor concentración de radicales.

Los resultados obtenidos cumplieron el supuesto de normalidad, realizado mediante el test de Shapiro-Wilks, con una distribución homogénea de los valores, lo que se traduce en una respuesta similar de todos los animales ante el episodio de I/R.

En la serie control en que se realizó únicamente una operación simulada, con laparotomía, pero sin isquemia, se tomaron muestras a fin de establecer los valores normales, observando que la cantidad de MDA libre en yeyuno era indetectable, lo que apoyaba la hipótesis de un incremento significativo de la peroxidación lipídica y de la destrucción celular tras la I/R. Estos resultados coinciden con los obtenidos por otros autores, así Horton y Walker<sup>231</sup> encuentran un aumento de la concentración de MDA en el plasma de tejido isquémico intestinal, determinado mediante HPLC, con respecto a un grupo control y Van Ye *et al*<sup>232</sup> obtuvieron un incremento significativo del MDA libre en intestino con tan sólo 10 minutos de isquemia y 60 minutos de reperfusión.

Actualmente, los antioxidantes se encuentran en concentraciones elevadas en numerosos alimentos, añadiéndose incluso en los piensos para animales (vitamina E), para evitar el enranciamiento prematuro de las grasas. Por este motivo, en el presente trabajo se seleccionó cuidadosamente la alimentación asegurando que el pienso

suministrado a los conejos de las series experimentales, no superase la cantidad de 100 mg/100 gr de vitamina E, ya que concentraciones altas de antioxidante en la dieta podrían posiblemente influir en los resultados finales, modificando las concentraciones finales de MDA.

La presencia de RL en el organismo afecta, también, de manera singular a los propios hematíes. Aunque sus membranas contienen gran cantidad de sustancias antioxidantes, también son especialmente ricas en ácidos grasos poliinsaturados y además presentan canales aniónicos, a través de los cuales pueden penetrar sustancias como el radical superóxido; éste, en presencia del catión hierro se transforma mediante la reacción de Fenton en radical hidroxilo, agente altamente tóxico. La hemoglobina estimula la peroxidación lipídica debido a la presencia de átomos de hierro en su estructura, generándose una nueva cascada de peroxidación y de liberación de otros RL.<sup>230</sup> Este hecho explica la posibilidad de valorar la peroxidación lipídica directamente en plasma tras un episodio de isquemia en cualquier región del organismo.<sup>233</sup>

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

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

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

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

Deshmukh *et al*<sup>234</sup> en 1997, utilizaron ratones transgénicos con sobreexpresión de Cu/Zn SOD. Los expusieron a 45 minutos de isquemia mesentérica con 4 horas de repermeabilización y los compararon con un grupo control de ratones no manipulados genéticamente y sometidos al mismo período de isquemia reperusión. A continuación cuantificaron los niveles de MDA en intestino para cada uno de los dos grupos y encontraron que los animales transgénicos presentaban unos niveles de MDA significativamente inferiores a los que presentaban los animales del grupo control, demostrando así que la sobreexpresión de SOD reducía las lesiones del epitelio y atenuaba los procesos de peroxidación lipídica durante la I/R.

Nuestros resultados son similares ya que comprobamos que en la serie de animales isquémicos a los que se administró solución salina, los niveles de MDA aumentaron considerablemente, mientras que en la serie tratada con SOD, estos valores se mantuvieron en todos los animales muy bajos (por debajo del límite de detección del método).

## 5.4 Lesiones

### 5.4.1 Alteraciones fisiopatológicas

#### *Producción de gas intestinal*

Se observó antes de la reperfusión, al finalizar el tiempo de isquemia, como manifestación indirecta de los efectos producidos por ésta.

Durante la isquemia el ambiente anaerobio facilita un microclima favorable para el desarrollo de numerosas especies bacterianas, habituales de los tramos finales del intestino, con un aumento incontrolado de la proliferación bacteriana y la consiguiente hiperproducción gaseosa. Todo esto, unido a la disminución del peristaltismo intestinal, consecuencia de la anoxia, favorece el acúmulo de bolsas de gas en las porciones distales del intestino.<sup>46</sup> Carbonell *et al* demostraron un aumento significativo de bacterias, principalmente Gram negativos y anaerobios, en la luz intestinal,<sup>36</sup> cuando producían I/R experimental en ratas, comprobando también que el número de estas no se reducía tras la reperfusión. El aumento de colonias bacterianas, sería responsable además de una producción anormal de endotoxinas, induciendo importantes reacciones biológicas. No sólo el intestino y las estructuras próximas se ven afectadas por la presencia de endotoxinas, sino que éstas pueden alcanzar el torrente sanguíneo y pasar a la circulación sistémica, extendiendo la sepsis a regiones alejadas, principalmente a hígado y pulmones. Fontes *et al*,<sup>224</sup> valoraron en ratas macho sometidas a 45 minutos de IMA, la actividad de mieloperoxidasa en pulmón, encontrando lesiones irreversibles en el mismo como consecuencia de endotoxinas liberadas durante isquemia mesentérica.

En nuestra experiencia, este gas se encontraba a menudo en el intestino grueso y otras veces en el ciego, llegando en ocasiones a duplicar su volumen normal. Se manifestó, sobre todo, en los animales sometidos a mayor tiempo de oclusión vascular, siendo su incidencia prácticamente nula en las series de poco tiempo de anoxia.

En las series I y II no se encontró ningún animal con exceso de gas en el intestino, en cambio en la serie V (isquemia 120 minutos), el 100% de los animales presentaron meteorismo en diferente proporción. Entre estas dos series, en las III y IV, se apreció un aumento progresivo de la intensidad de la aparición de gas intestinal, de manera creciente a medida que aumentaba el tiempo de isquemia.

#### *Hemorragias intestinales*

Se estudiaron tras los diferentes periodos de isquemia, viendo el cambio de tonalidad de la pared intestinal, con regiones rojo oscuro, repartidas de forma irregular a lo largo de todo el intestino. A medida que el tiempo de anoxia aumentaba, se observaron extravasaciones sanguíneas en forma de hemorragias intraluminales, apareciendo un 93% en la serie V (120 minutos de isquemia), en la que un 53% de animales presentaron hemorragia en sábana y un 40% hemorragias focales. Esta extravasación masiva hacia la luz intestinal, fue contrastada por Bounous,<sup>151</sup> quien la describió diciendo que "la serosa presenta un aspecto rojo oscuro por la abundante acumulación de sangre en el lumen". Bounous realizó un seguimiento en humanos, identificando numerosos parámetros en la descripción del proceso isquémico como mortalidad, síntomas, etiología, alteraciones estructurales, tanto microscópicas como macroscópicas.

La pérdida masiva de sangre consecuente al proceso isquémico puede tener repercusiones serias a la hora de la recuperación del animal, puesto que favorece el debilitamiento del animal, y el agravamiento del proceso patológico, ya que implica un posible shock hemorrágico y menor capacidad de recuperación. La rotura masiva de los



vasos afectaría inicialmente a aquellos de pequeño y mediano calibre, interconectados directamente con la mucosa y submucosa, que pueden ser destruidos por la acción de la isquemia propiamente dicha, acompañada de necrosis celulares, desepitelización masiva de la mucosa y destrucción mural, vertiendo el contenido hacia la luz simplemente por una diferencia de presiones. Animales con esta afección, de carácter muy agudo, tendrían muy mermadas sus posibilidades de revertir el cuadro isquémico, puesto que las lesiones serían prácticamente irreversibles. Martínez *et al*<sup>222</sup> encuentran en pacientes con cuadros prolongados de isquemia intestinal, lesiones irreversibles del intestino, con hemorragia transmural y un aspecto inviable del intestino.

La afluencia masiva de sangre al intestino, mezclada con el mucus y el contenido intestinal, ofrece una explicación a la presencia de heces hemorrágicas en los animales que realizaron deposiciones en las horas posteriores así como a la mayor presencia de sangre en heces, en aquellos con mayor tiempo de isquemia mesentérica.

#### 5.4.2 Lesiones macroscópicas

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

Las áreas más afectadas por una falta de riego sanguíneo son las regiones más distales, quedando atenuados los procesos isquémicos cuanto más próxima está la zona al posible riego de otro tronco arterial. Tales son los casos del duodeno y del colon, los cuales, aunque reciben su principal aportación sanguínea de la AMC, pueden ser regados respectivamente por la arteria celíaca y por la arteria mesentérica caudal. En estos casos, cuando se produce una disminución en el aporte sanguíneo, ésta puede ser suplida momentáneamente por el riego de éstas arterias.

La gravedad de las lesiones intestinales producidas como consecuencia de la isquemia, fue proporcional al tiempo de ésta, siendo máxima en los conejos de la serie V (120 minutos de isquemia) y mínima en los animales de la serie II (15 minutos de isquemia).

#### *Desvitalización intestinal*

Pocos minutos después de la oclusión arterial, el intestino adquiere una tonalidad violácea, rojo oscuro, con congestión y aspecto deslustrado. Cuando el tiempo de isquemia se prolonga, aparecen áreas de color rojo violáceo más intenso y aspecto desvitalizado siendo tanto más abundantes cuanto mayor es el tiempo de isquemia. Esta manifestación es explicable, por la necrosis isquémica por anoxia. Al no circular la sangre, esta se acumula en las arterias, el latido desaparece y la sangre no se oxigena, tornándose en un rojo violáceo intenso como consecuencia del acúmulo de CO<sub>2</sub>. Este fenómeno se revierte inmediatamente tras la reentrada de sangre, observándose una recuperación del latido y un restablecimiento de la coloración arterial normal.

Destaca la ausencia de perforación intestinal en todos los animales de las diferentes series, en coincidencia con lo señalado por Bounus,<sup>40</sup> quien tras realizar un seguimiento en casos humanos con isquemia mesentérica no encontró ningún caso de perforación de la pared del intestino; en cambio, comprobó que enfermos que revirtieron el proceso isquémico y sobrevivieron a este, desarrollaron con más facilidad ulceraciones y erosiones de la pared intestinal.

La explicación a la ausencia de roturas en la pared podría hallarse en que el cuadro isquémico es lo suficientemente prolongado como para causar lesiones muy

severas e incluso producir la muerte, pero no es suficiente para una rotura completa de la serosa, que produzca una perforación parcial del tubo intestinal. Joison afirma que en períodos prolongados de ausencia de riego, cuando las lesiones isquémicas se transforman en infarto agudo, se produce la necrosis generalizada con perforación intestinal y los primeros síntomas de peritonitis y sepsis.

En algunas ocasiones la pared intestinal se torna por completo necrótica, aunque no se alcanza la perforación intestinal debido a que el animal fallece antes, debido a la gravedad de las lesiones isquémicas. En caso de supervivencia del animal, esto se traduciría en una necrosis lítica, que conduciría a la perforación y rotura de la pared intestinal. Este hecho es fácilmente observable en el caso de la mucosa, puesto que la necrosis requiere menos tiempo. En efecto, puede verificarse que a nivel intestinal, un suficiente tiempo de isquemia, produce en primer lugar necrosis de coagulación, seguida de necrosis lítica, sobre todo a nivel de la mucosa, aunque las lesiones de las capas musculares y serosa se producirían con mayor lentitud y aunque la viabilidad de la pared intestinal ya no sea posible, no se verifica la perforación por fallecimiento previo del animal.

Dato característico, observado en los animales sometidos a isquemia, independientemente de la serie, es la mayor manifestación de las placas de Peyer como una protrusión en la serosa (Ortíz Lacorzana *et al*<sup>68</sup>), observable a los pocos minutos de isquemia. Las placas aparecen como nódulos blanquecinos de pequeño tamaño y superficie granulosa, que se distribuyen a lo largo de todo el intestino delgado, muy posiblemente debido a un adelgazamiento de la pared. Pocos autores se hacen eco de esta mayor manifestación de los nódulos linfáticos del intestino. La presencia de una hipertrofia de los nódulos linfáticos intestinales pudiera ser una de las claves del aumento del infiltrado linfocitario en tejidos isquémicos y la puesta en marcha de la respuesta inmunológica como consecuencia del shock isquémico. En ningún caso aumenta el número de placas de Peyer distribuidas por el intestino, lo que ocurre es un aumento del tamaño y un cambio de color, sin que se detecte éxtasis linfática secundaria.

Aunque autores como Camporro y Van Ye *et al*,<sup>232</sup> afirman que el tratamiento con SOD, reduciría significativamente las alteraciones histológicas y ultraestructurales del tejido sometido a isquemia y posterior reperfusión, disminuyendo las lesiones en la mucosa, en nuestro trabajo se observa una ligera reducción en el grado de desvitalización intestinal, aunque no significativa.

#### 5.4.3 Lesiones microscópicas.

##### *Intestino delgado*

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

Estas lesiones originarían un shock orgánico, con hemorragias masivas y

liberación anormal de productos celulares, como proteasas e hidrolasas que agravarían el daño producido por la isquemia. Si las lesiones generadas como consecuencia de la anoxia celular son de gran magnitud, estas se acentúan aún más cuando se restablece la circulación y la sangre oxigenada vuelve a ocupar las arterias intestinales. Parks y Granger <sup>91</sup> afirman que el cuadro hipóxico por sí solo no juega un papel tan importante en la patogénesis de la isquemia intestinal, sino que simplemente actúa como llave para iniciar una serie de procesos lesivos que se disparan con la reintroducción de sangre.

Clark y Gewertz <sup>70</sup> comprobaron este hecho sometiendo a ratas a breves episodios de isquemia seguidos por unos pocos minutos de reperfusión, en los que encontraron más lesiones que si realizaba un tiempo prolongado de isquemia seguido de un único momento de revascularización. Las lesiones microscópicas que encontraban eran más agudas en procesos intermitentes que en cuadros continuos.

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

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

El epitelio intestinal es uno de los tejidos que menos tiempo tardan en regenerarse tras una lesión, estimándose en horas el plazo normal para que esto suceda.

Los episodios isquémicos, no son una excepción y tras padecerlos el intestino se regenera en plazos especialmente breves.

En los resultados obtenidos en nuestro trabajo, al tratarse de un estudio a largo plazo (11 semanas), no se comprobó el periodo en el cual se producía la *restitutio ad integrum* del epitelio, pero si se observó, que al finalizar éste plazo, la mayoría de los animales que sobrevivieron al episodio isquémico, recuperaron totalmente su epitelio, si bien en los animales sometidos a mayor tiempo de isquemia, quedaron lesiones remanentes de pequeña intensidad (grado 1), compatibles con una funcionalidad y homeostasis normales similar a la que tenían que tenían antes de la intervención.

Por el contrario, en los animales con lesiones severas en el intestino, afectación del sistema nervioso autónomo entérico, alteración del peristaltismo y alteraciones severas en la microcirculación, probablemente se haga inviable la reentrada de sangre, impidiendo la reepitelización de la mucosa y ocasionando el fallecimiento del animal.

Este hecho explicaría la "barrera crítica" de las 60 horas para la supervivencia, puesto que transcurrido este tiempo, los animales supervivientes habrían regenerado el epitelio intestinal, siempre que las lesiones sistémicas no sean especialmente importantes.

#### *Intestino grueso*

Aunque el colon está irrigado por las arterias cólicas, procedentes de la AMC, la arteria cólica sinistrea se anastomosa con la arteria mesentérica caudal, formando una arcada vascular responsable del aporte sanguíneo a ésta parte del tracto intestinal. Este

hecho es el responsable de que, tras la obliteración de la AMC, no se encuentren lesiones de importancia en el intestino grueso.

En nuestro trabajo, las lesiones encontradas en las muestras de colon fueron de intensidad mínima (descamación parcial del epitelio de revestimiento) y restringidas únicamente a los animales sometidos a elevados tiempos de isquemia -60 y 120 minutos- y pueden ser atribuidas más al fallo multiorgánico que se genera tras la isquemia mesentérica, que a la falta de aporte sanguíneo al intestino grueso.

#### 5.4.4 Alteraciones en otros órganos

Hay que señalar que las lesiones isquémicas no se producen únicamente en la región privada de riego, sino que también afectan a otros órganos, siendo de especial trascendencia las producidas en el pulmón. En nuestro trabajo, la gravedad de las lesiones producidas tras la isquemia intestinal, fue en gran medida proporcional al tiempo de anoxia tisular, con un patrón similar en animales sometidos a las mismas condiciones.

##### *Arteria Mesentérica Craneal*

El 100% de los individuos sometidos a IMA presentó una correcta reperfusión tras la retirada del microclamp que obstruía el flujo de sangre a través de la arteria. hecho que se comprobó por observación de la recuperación del latido arterial en el momento del desclampaje y por el cambio de color del intestino afectado.

Macroscópicamente, en los animales que revertieron el cuadro isquémico y que sobrevivieron las 11 semanas, la AMC presentaba adherencias periféricas, hecho justificable por la disección quirúrgica. Estas adherencias no se pudieron observar en los animales que murieron por causas atribuibles a la isquemia y que fallecieron mayoritariamente en las primeras 24-48 horas post intervención.

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

Todo ello permite deducir, que la arteria fue manipulada correctamente y que las lesiones encontradas, tanto en el intestino, como en el resto de estructuras, se debieron única y exclusivamente al cuadro anóxico provocado por el pinzamiento de la AMC y al posterior efecto de la repermeabilización.

##### *Pulmones*

El pulmón es un órgano especialmente vulnerable tras la I/R del intestino. Schmelting *et al*,<sup>174</sup> encontraron en ratas sometidas a diversos tiempos de isquemia que, tras 120 minutos de reperfusión, en todas ellas se producía un aumento de la permeabilidad pulmonar con afectación de las células endoteliales y reducción de la energía almacenada en forma de fosfatos en el tejido pulmonar. Las lesiones pulmonares fueron de mayor intensidad a medida que el tiempo de isquemia fue mayor.

Estos resultados sugieren que la isquemia mesentérica no es un proceso estrictamente localizado en el territorio arterial correspondiente sino que afecta también a órganos alejados y especialmente al pulmón.

En nuestro estudio, las alteraciones macroscópicas más frecuentes en los animales fallecidos, fueron congestión vascular, edema agudo de pulmón y en algunos casos hemorragias pulmonares, confirmándose estos resultados por el estudio microscópico. Los animales supervivientes, salvo un fallecido de la serie II (15 minutos

de isquemia) que murió como consecuencia de un proceso neumónico complicado con edema agudo de pulmón y shock hemodinámico, no presentaron lesiones

Estas lesiones, incluyendo la presencia de infiltrado linfocitario, y alteraciones en los tabiques alveolares, según Lorente *et al.*,<sup>235</sup> además de tener un importante componente mecánico y bioquímico, pueden tener su origen en un estado de sepsis generalizada, la cual, en pocas horas provocaría cambios histológicos a nivel sistémico, especialmente de carácter pulmonar.

El edema agudo se produciría como resultado de una lesión vascular difusa de los vasos de la microcirculación, con acumulación de líquido intersticial en los tabiques interalveolares, que se manifestaría como un engrosamiento del espacio intersticial en tabiques interalveolares y producción del líquido edematoso en el lumen alveolar como consecuencia de una presión capilar anómala.

A causa de la isquemia se liberan mediadores inflamatorios y quimioatrayentes de neutrófilos, del tipo de endotoxinas, citoquinas y productos derivados de la cascada del ácido araquidónico; ello provoca una retención de estos elementos celulares en los intersticios; así se explicaría el aumento considerable de infiltrado leucocitario que se observa en el tejido pulmonar. Simpson *et al.*,<sup>166</sup> afirman que un porcentaje muy importante de las manifestaciones patológicas producidas en el pulmón tras la I/R mesentérica, se deben a la presencia de polimorfonucleares (PMN), y estas lesiones se atenúan considerablemente por un tratamiento que induzca neutropenia.

Los PMN, además de aumentar el edema, se adhieren al endotelio vascular provocando una alteración fisiológica de la respiración como consecuencia de una congestión vascular.

### Higado

Poggetti *et al.*<sup>236</sup> encuentran lesiones hepáticas postisquémicas, aunque en ningún caso tan significativas como las del pulmón. Suso Alea *et al.*<sup>61</sup> apuntan que estas lesiones hepáticas afectan más severamente al metabolismo que a la propia estructura anatómica.

En nuestro trabajo, la necropsia reveló que la principal lesión observada fue la congestión hepática, de intensidad proporcional al tiempo de isquemia y presente en los animales fallecidos sometidos a elevados tiempos de isquemia (60 y 120 minutos), con ausencia de lesiones en los supervivientes y en los animales sometidos a tiempos inferiores.

El estudio microscópico confirmó la congestión vascular con focos de necrosis y afectación de células de Kupffer.

La congestión vascular es atribuible, al igual que las lesiones pulmonares, a un fallo hemodinámico general, ya que el hígado, al ser la víscera con mayor metabolismo de todo el organismo por la que atraviesa toda la sangre procedente del intestino a través de la circulación portal, recibiría todas las sustancias anormales y tóxicas que se generan como consecuencia de la isquemia, incluyendo factores inflamatorios, quimioatrayentes, citoquinas y demás sustancias anómalas, que alcanzarían el torrente sanguíneo sistémico, previo paso a través del hígado.

En estas condiciones, la presencia de PMN, contribuiría a agravar estas lesiones hepáticas, las cuales pueden constituir una de las causas de la génesis del síndrome de fallo multiorgánico, encontrado en algunos animales.

En resumen, si bien aparecen lesiones moderadas en el hígado de animales fallecidos sometidos a elevados tiempos de I/R, la ausencia de lesiones en los no fallecidos que se recuperaron, confirmaría la baja severidad de las lesiones hepáticas, las

cuales pueden ser completamente revertidas durante el tiempo de observación.

#### *Pancreas*

No se han encontrado trabajos en la bibliografía consultada que hagan referencia a lesiones pancreáticas en estudios de isquemia - reperfusión.

En nuestro trabajo no hemos encontrado lesiones morfológicas, macroscópicas o microscópicas en ninguno de los animales estudiados, sometidos a isquemia o no..

#### *Riñones*

No se ha encontrado en la bibliografía, estudios renales tras la isquemia intestinal; tan sólo Stanton *et al*<sup>237</sup> mencionan en clínica humana un 6% de enfermos con complicaciones renales en un estudio llevado a cabo con 23 pacientes de isquemia mesentérica.

En nuestro trabajo, encontramos alteraciones renales como congestión vascular y necrosis tubular aguda.

La congestión vascular, apareció en algunos de los animales fallecidos sometidos a 60 minutos (4 de 12) y a 120 minutos de IMA (4 de 18). No se encontró en ningún animal sometido a tiempos inferiores.

La NTA se presentó en intensidad creciente en relación con el tiempo de isquemia, apareciendo en algunos de los animales fallecidos sometidos a 30 minutos de IMA (4 de 7), a 60 minutos (8 de 12) y siendo máximas en los fallecidos con 120 minutos de IMA (14 de 18).

En los animales de las series del estudio de peroxidación lipídica, sacrificados intraquirúrgicamente, no se observaron lesiones renales, solo congestión vascular de moderada intensidad, probablemente por falta de tiempo para el desarrollo de lesiones más intensas.

Estas lesiones, al igual que las hepáticas, parecen ser debidas más al fallo multiorgánico que se genera después de la isquemia mesentérica, que a una consecuencia directa de ésta.

## 6 CONCLUSIONES

1. La isquemia por oclusión y posterior repermeabilización de la arteria mesentérica craneal en conejos Nueva-Zelanda, provocó tasas de mortalidad significativas y directamente proporcionales al tiempo de isquemia.
2. El proceso cursó de forma aguda, ya que la mortalidad se produjo principalmente durante las primeras 24 horas postisquemia, disminuyendo drásticamente a las 48 horas y siendo esporádica a partir del 2º día. Las posibilidades de supervivencia ante la isquemia aguda de la arteria mesentérica craneal fue prácticamente de la totalidad de los animales que lograron sobrevivir 48 horas después de la reperfusión.
3. La prueba del TBA demostró elevados niveles de MDA, indicadores de peroxidación lipídica en la pared del intestino delgado del conejo, como consecuencia de la acción de los radicales libres del oxígeno en animales sometidos a isquemia - reperfusión de la AMC.
4. La utilización de superóxido dismutasa como antioxidante, disminuyó de forma muy acusada esta peroxidación lipídica, disminuyendo muy significativamente los niveles de MDA.
5. La utilización de superóxido dismutasa, produjo un ligero incremento -no significativo- de la supervivencia, provocada por la oclusión y posterior repermeabilización de la arteria mesentérica craneal.
6. La isquemia - reperfusión de la arteria mesentérica craneal, provocó alteraciones histopatológicas en el intestino delgado así como lesiones multiorgánicas a distancia de intensidad proporcional al tiempo de isquemia y que por sí solas justifican el fallecimiento de los animales en esta situación.
7. El tratamiento con superóxido dismutasa durante la fase de reperfusión fue capaz de disminuir la intensidad de las lesiones histopatológicas producidas por la isquemia - reperfusión.
8. El modelo experimental de isquemia - reperfusión intestinal estudiado en conejos, ha demostrado ser válido y útil, para estudios de supervivencia en estos animales, si bien por el carácter agudo de este proceso, puede reducirse el tiempo de observación de 11 semanas post intervención, sin modificación de resultados.
9. El modelo también se ha demostrado de utilidad, en ensayos clínicos de medicamentos y sustancias destinadas a la terapia y prevención de las consecuencias del síndrome de isquemia - reperfusión intestinal.

## 7 RESUMEN

### Introducción

La isquemia en diferentes órganos está involucrada en una amplia variedad de procesos patológicos humanos y animales, siendo la causa más común de muerte en el mundo occidental. Paradójicamente, el alivio de la situación isquémica mediante la reperfusión puede incrementar el daño.

El propósito de este trabajo es el estudio a nivel experimental en conejos Nueva Zelanda, de la isquemia aguda de la arteria mesentérica craneal (AMC), la cuantificación de la peroxidación lipídica producida por los radicales libres (RL) durante la fase de reperfusión, así como la eficacia terapéutica de antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD). Los objetivos concretos son:

- Desarrollar una técnica experimental adecuada de producción de isquemia aguda de la arteria mesentérica craneal en el conejo mediante la obstrucción quirúrgica de la AMC y posterior reperfusión de la misma.
- Efectuar con dicho modelo un estudio de supervivencia a distintos tiempos de isquemia (control, 15, 30, 60 y 120 minutos). Establecer el tiempo de isquemia que produce una tasa de mortalidad 50.
- Valorar el daño tisular provocado por la isquemia-reperfusión en el territorio intestinal irrigado por esta arteria, estudiando las alteraciones morfológicas producidas a diferentes tiempos.
- Determinar el grado de peroxidación lipídica producida en el intestino por dicha isquemia-reperfusión, valorando analíticamente la producción de radicales libres mediante el test del ácido tiobarbitúrico (TBA).
- Comprobar el efecto de sustancias antioxidantes como la superóxido-dismutasa de Zn sobre la peroxidación lipídica valorando las modificaciones en la tasa de supervivencia, la producción de radicales libres en los órganos y los cambios morfológicos y funcionales en relación con animales testigos en los animales sometidos a isquemia y tratados.

### Material y método

El estudio se realizó en las instalaciones quirúrgicas y animalario del servicio de Cirugía Experimental del Hospital Militar Gómez Ulla,

Se emplearon 165 animales distribuidos en 11 series. Para el estudio de supervivencia se emplearon 5 series de 20 conejos cada una de las cuales fue sometida a 0, 15, 30, 60 y 120 minutos de isquemia respectivamente. Para el ensayo clínico de supervivencia con SOD, se emplearon dos series de 10 animales cada una, que fueron sometidas a 60 minutos de isquemia, aplicando en una de ellas una terapia preventiva de SOD y en la otra, usada como control, solución salina fisiológica. Para el estudio de la peroxidación lipídica en animales tratados con SOD y sin tratar, se emplearon tres series de 15 animales, una de ellas usada como control para ver los niveles basales de MDA en animales no isquémicos y otras dos en las que los animales fueron sometidos a 60 minutos de isquemia y tratados con SOD o con solución salina fisiológica en cada caso.

La anestesia se realizó induciendo con una mezcla de ketamina y xilazina por vía endonasal y manteniendo la anestesia con una mezcla gaseosa de oxígeno y protóxido de nitrógeno en la que se vaporizaba isoflurano, a través de un equipo Boyle.

Las intervenciones quirúrgicas se desarrollaron en un quirófano experimental con su equipamiento habitual, empleando una caja estándar de cirugía abdominal, añadiendo



únicamente como material específico un disector curvado para aislar la AMC, unas cintas *vessel-loop* de goma para manejar este vaso y un microclamp de material plástico y aplicación digital para provocar la isquemia.

La infusión intravenosa de SOD o SS, se realizó a través de un microsistema de infusión con un catéter venoso Abocath del nº 24, que se insertó en una de las venas marginales de la oreja del conejo, y se conectó a una jeringuilla de insulina acoplada a un microinyector de precisión, administrando 2 dosis de 200 UI/kg de SOD en 0,33 ml/kg de SS o solo 0,33 ml/kg de SS, la primera en bolo antes de la reperfusión y la segunda durante los primeros 10 minutos tras ésta.

La peroxidación lipídica de los segmentos intestinales se estudió realizando el test del TBA, con material estándar de laboratorio y un espectrofotómetro con capacidad de lectura en la banda de los 535 nm. Con patrones de MDA, se calibró el sistema construyendo una recta patrón de regresión a la que se sometieron todos los problemas.

Las necropsias de los animales muertos o sacrificados se realizaron sistemáticamente, obteniendo muestras de los órganos para su posterior examen histopatológico que se realizó en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Militar Gómez Ulla.

El estudio estadístico, se hizo para las series de supervivencia mediante el método de Kaplan-Meier, utilizándose el test del  $\chi^2$  para obtener los valores comparativos de la distribución Chi cuadrado, la p de Pearson y el grado de significación para un error unilateral de  $p = 0,05$ . Para el ensayo clínico valorando la peroxidación lipídica determinando los niveles cualitativos de MDA, se empleó el test de la T de Student para muestras emparejadas y obteniendo de igual forma el grado de significación para un error unilateral de  $p = 0,05$ .

### Resultados y discusión

La supervivencia en animales sometidos a isquemia de la AMC, disminuye de forma proporcional y significativa ( $p < 0,001$ ) al tiempo de isquemia, variando desde un 95% de supervivientes con 15 minutos de isquemia, 65% con 30 minutos, 40% con 60 minutos y solamente un 10% con 120 minutos. La mortalidad provocada por la isquemia sigue un camino inverso, incrementándose en proporción al tiempo de isquemia.

En la serie de 15 minutos de isquemia el único fallecimiento se produjo en las primeras 24 horas post intervención. En la serie de 30 minutos fallecieron 7 animales, todos ellos también durante las primeras 24 horas. De la serie isquémica de 60 minutos fallecieron 12 animales, 8 de ellos las primeras 24 horas, uno al segundo día otro en el 4º, otro en el quinto y otro en el undécimo. En la última serie sometida a 120 minutos de isquemia, de los 18 animales muertos, 17 fallecieron en las primeras 24 horas y uno al segundo día. En total las bajas de toda la experiencia de supervivencia fueron 38 (47,5 %). De ellas el 86,9 % se produjeron en las primeras 24 horas, 5,3 % en el 2º día y un 2,60 % los días 4º, 5º y 11º. Por lo que se puede afirmar que la mortalidad en todas las series se produce principalmente durante las primeras 24 horas, disminuyendo drásticamente el 2º día y siendo esporádica a partir de éste.

En la serie sometida a isquemia durante 60 minutos y tratada con SOD (200 x 2 UI/kg) la supervivencia no fue significativamente superior ( $p = 0,75$ ) a la de los animales de la serie control que fueron tratados en las mismas condiciones de isquemia únicamente con solución salina. La SOD, a pesar de su demostrado efecto terapéutico apreciable en el manejo clínico de la isquemia, posiblemente debido a las lesiones multiorgánicas a distancia de carácter irreversible ya instauradas como consecuencia de

la anoxia intestinal, no fue eficaz en nuestras condiciones de estudio para modificar sensiblemente la supervivencia.

Animales sometidos a 60 minutos de isquemia y posterior repermeabilización durante otros 60 minutos, presentaron un elevado incremento de los niveles de MDA (media 54,6654  $\eta\text{m}/\text{gr}$ ), valorado mediante el test del TBA en intestino delgado, como índice de la peroxidación lipídica, respecto a un grupo control de animales sometidos a operación simulada (sham) sin isquemia (MDA medio inferior a 0,000002532  $\eta\text{m}/\text{gr}$ , límite de detección del método). Al aplicar SOD (dos dosis de 200 UI/kg) en otra serie de animales sometidos a las mismas condiciones de isquemia - reperusión, los valores de MDA tisular, disminuyeron de forma muy significativa ( $p < 0,00001$ ) hasta niveles similares a los de animales no sometidos a isquemia.

Las lesiones producidas por la isquemia - reperusión de la arteria mesentérica craneal, fueron de intensidad creciente y proporcional al tiempo de isquemia. En intestino delgado las lesiones variaron desde ausencia de lesión (grado 0), a lesiones de grado 1 (desarrollo del espacio subepitelial de Gruenhagen) hasta grado 4 (necrosis y pérdida de materia evidente en capas musculares, con pérdida de la totalidad de la mucosa), dependiendo de los tiempos de isquemia, siendo máximas con 120 minutos de isquemia.

En otros órganos se produjeron lesiones a distancia, especialmente en pulmones, ocasionando situaciones de fallo multiorgánico que condujeron a la muerte de los animales con elevados tiempos de isquemia y a la recuperación total de aquellos sometidos a tiempos bajos de isquemia.

### Conclusiones

La isquemia y posterior repermeabilización de la arteria mesentérica craneal en conejos Nueva-Zelanda, provocó unas tasas de mortalidad, significativa y directamente proporcionales con relación al tiempo de isquemia.

Cursa predominantemente de forma aguda, aumentando las posibilidades de supervivencia con el paso del tiempo ya que la mortalidad se produjo principalmente durante las primeras 24 horas postisquemia disminuyendo drásticamente a las 48 horas y siendo esporádica a partir del 2º día.

La prueba del TBA demostró elevados niveles de MDA, indicadores de peroxidación lipídica en el intestino delgado del conejo, como consecuencia de la acción de los radicales libres del oxígeno en animales sometidos a isquemia - reperusión de la AMC.

La utilización de superóxido dismutasa como antioxidante, disminuyó de forma muy acusada esta peroxidación lipídica, disminuyendo muy significativamente los niveles de MDA.

La utilización de superóxido dismutasa, produjo un ligero incremento -no significativo- de la supervivencia, provocada por la oclusión y posterior repermeabilización de la arteria mesentérica craneal.

La isquemia - reperusión de la arteria mesentérica craneal, provocó alteraciones histopatológicas en el intestino delgado así como lesiones multiorgánicas a distancia de intensidad proporcional al tiempo de isquemia y que por si solas justifican el fallecimiento de los animales en esta situación.

El modelo experimental estudiado, ha demostrado ser válido y útil, para estudios de supervivencia en conejos, aunque, puede reducirse el tiempo de observación de 11 semanas, así como en ensayos de medicamentos destinadas a la terapia y prevención del síndrome de isquemia - reperusión intestinal.

## 8 SUMMARY

### Introduction

The ischaemia in different organs is involved in a wide variety of human and animal pathological processes, being common cause of death in the western world. Paradoxically, the relief of the ischaemic status by means of the reperfusion can increase the damage.

The purpose of this work is to study in experimental New Zealand rabbits, the acute ischaemia of the artery mesenteric cranealis, the quantification of the lipid peroxidation occasioned by oxygen free radicals (RLO) during the repermeabilización phase, and the therapeutic effectiveness of superoxide dismutase (SOD). The specific objectives looked are:

- Developing an adequate experimental technique of production of acute ischaemia in intestinal region in the rabbit by surgical obstruction of the arteria mesenteric cranealis (AMC), followed by a period of reperfusion.
- Performing with this model a study of survival at different times of ischaemia (sham, 15, 30, 60 and 120 minutes), establishing the time in which an approximate rate of 50% of mortality takes place.
- Vaulting the tisular damage caused by the ischaemia - reperfusion on the intestinal territory irrigated by this artery, studying the morphologic alterations taken place in the different times.
- Determining the degree of lipid peroxidation that take place in the small bowel as a consequence of this ischaemia-reperfusion, vaulting the production of oxygen free radicals (RLO) with the test of the thiobarbituric acid (TBA).
- Checking the therapeutic effect over the ischaemia lesions of antioxidative substances like Zn-superoxide-dismutase over the lipid peroxidation, vaulting the modifications on the survival rates, the production of oxygen free radicals in the organs and morphologic and functional changes.

### Material and method

The study was carried out in the surgical rooms and animal experimentation facilities of the Service of Experimental Medicine and Surgery, in the Military Central Hospital Gómez Ulla, in Madrid.

165 animals were used distributed in 11 series. For the study of survival, 5 series of 20 rabbits each one were employed and subjected at 0, 15, 30, 60 and 120 minutes of ischaemia respectively, letting later a free repermeabilization. For the clinical assay of survival with SOD, two series of 10 animals were used, being subjected to 60 minutes of ischemia, and applying in one of them a preventive therapy of SOD and in the other one, used as control, physiologic saline solution. Finally, three series of 15 animals were used to evaluate the basal levels of MDA, one of them as a control in non ischemic animals and other two subjected to 60 minutes of ischemia, treated with SOD or physiologic saline solution respectively.

The anaesthesia was induced with an endonasal mixture of ketamine and xilazine and maintained with oxygen and nitrogen protoxide gas mixture, in which isofluorano were vaporised, through of an anaesthesia equipment Boyle.

The surgical operations were performed in an experimental surgical room with habitual equipment, employing a estándar box of abdominal surgery, added of a specific material as a dissection clamp, *vessel-loop* rubber strips, and a microclamp of plastic

material for clamping the mesenteric artery, causing of ischaemia.

The infusion of SOD or SS, was carried out by IV injection through an infusion microsystem composed by venous catheter Abocath (num. 24), to be inserted in one of the marginal veins of the rabbit ear and a insulin syringe coupled to a precision microinjector able to supply the established dose for each animal in the exact time for each experience (10 minutes).

The lipid peroxidation of the intestinal segments was studied carrying out the TBA test, with estándar laboratory equipment and a spectrophotometer with reading capacity at the band of 535 nm. The system was calibrated with known samples of MDA, and a regression pattern line was drawing to be compared with the problem samples.

The necropsy of dead or euthanasied animals were carried out systematically, obtaining samples from the internal organs, to be later histopatologically examined in the Service of Pathological Anatomy of the Hospital Gómez Ulla.

The statistical study, was made for the survival series by the method of Kaplan-Meier, using the test of square Chi to obtain the comparative values of the distribution, the P of Pearson and the significance degree for an unilateral error of  $p = 0,05$ . Student T test was used (for matched samples and an unilateral error of  $p = 0,05$ ) for the clinical assay testing the lipid peroxidation by determination of the quantitative levels of MDA,

### Results and discussion

The survival time in animals subjected to ischemia of the AMC, decreases in a proportional and significant relation ( $p < 0,001$ ) with the time of ischemia, varying from 95% of surviving with 15 minutes of ischemia, 65% with 30 minutes, 40% with 60 minutes and only a 10% with 120 minutes. The mortality caused by the ischemia follows an inverse road, being increased in proportion at the time of ischemia.

In the 15 minutes ischemic series the only animal deceased, did it in the first 24 hours post operation. 7 animals from 30' series died all of them also during the first 24 hours. 12 animals of the ischemic series of 60 minutes died, 8 of them the first 24 hours, one in the second day, another in the 4th, another in the 5th and another in the eleventh. In the last series subjected to 120 minutes of ischemia, 17 of the 18 animals died in the first 24 hours and one to the second day. The deceased animals of the whole experience were 38 (47,5%). The 86.9% of deaths took place in the first 24 hours, 5.3% in the 2° day and 2,60% the days 4°, 5° and 11°. The mortality in all the series takes place mainly during the first 24 hours, diminishing drastically during the second day and making sporadic from this date.

The survival was not significantly higher ( $p = 0,75$ ) for the 60 min ischemic animals 60 minutes tried with SOD (200 x 2 IU/kg), that the control series treated only with saline solution. This is possibly due to distant multiorganic lesions established as a consequence of the intestinal anoxia.

Animals subjected to 60 minutes of ischemia and later repermeabilización during other 60 minutes, presented a very significant increment ( $p < 0,00001$ ) of the quantity of measurable MDA, indicative of the lipid peroxidation (TBA Mean 54,6654 m/gr) tested by the test of the TBA, in affected intestinal segments in relation with a control group without ischemia. When applying SOD (200 x 2 IU/kg) in another series of ischaemic animals (60 min ischemia and 60 min reperfusion), these figures of tissue MDA, lowered until levels below the limit of detection of the method (0,000002532 (m/gr), in the same way that animals not subjected to ischemia.

The lesions provoked by AMC ischemia, were of increased intensity and

proportional to the ischemia time. In the thin bowel the lesions varied from degree 0 (no lesion), to degree 1 (development of the subepitelial Gruenhagen space), until degree 4 (necrosis and substance lack in muscular layers, with loss of the mucous), depending on the ischemia time, becoming maximum at 120 minutes of ischemia.

Distance lesions were produced in far organs, specially lungs, provoking situations with multiorganic failure and shock, that led the animals subjected to high ischemia time to dead and those subjected to low ischemia time to survival with a total recovery.

### Conclusions

The occlusion and later repermeabilización of arteria mesenteric cranealis, causes an increment of the mortality in New-Zealand rabbits, significantly proportional at the time of ischemia.

The mortality takes place mainly during the first 24 hours post-ischemia, diminishing drastically the 2º day and being sporadic after this date, reason why it is possible to state that the course of ischemia is predominantly acute, increasing the possibilities of survival only letting the time pass.

The ischemia-reperfusion of the artery mesenteric cranealis causes a quantifiable increment in the lipid peroxidation of the small intestinal mucosae in the rabbit, as consequence of the action of the oxygen free radicals. This increment can be evaluated with the TBA test

The use of the enzyme superoxide dismutase as an antioxidant, diminishes in a very significant way the lipid peroxidación of the small bowel mucosae in the AMC ischaemic rabbit.

The use of the enzyme superoxide dismutase like antioxidant, increase lightly, although without statistical significance, the survival rate caused by the occlusion and later repermeabilización of arteria mesenteric cranealis.

More consequences of ischemia-reperfusion in the territory of artery mesenteric cranealis, are morphologic and histopathologic alterations that take place not only in the thin bowel, but in far organs, in which provokes multiorganic distance lesions, that justify by themselves the death of the animals.

The experimental model has demonstrated to be useful and valuable for survival studies, although it is possible to reduce the proposed observation time (11 weeks); it also may be useful in clinical assay of drugs and products intended to therapy and prevention of the ischemia - reperfusion syndrome.

## 9 BIBLIOGRAFÍA

1. **Cheville, NF.** Introduction to Veterinary Pathologie. 1ª ed. Ed. Iowa State University Press. Iowa (USA) 4.1988.228-229
2. **Ottinger LW, Austen WG.** A study of 136 patients with mesenteric infarction. Surg Gynecol Obstet 1967; 124: 251-261
3. **Bergan JJ, Dry L, Conn J, Trippel OH.** Intestinal ischemic syndrome. Ann Surg 1969; 169: 120-6
4. **Bergan JJ, Dean RN, Conn J, Yao JST.** Revascularization in treatment of mesenteric infarction. Ann Surg 1975; 182: 430-438
5. **Sachs S, Morton J, Schwartz S.** Acute mesenteric ischemia. Surg 1982, 10:646-653
6. **Coulcilman WT.** Three cases of occlusion of the superior mesenteric artery. Boston Med Surg J 1894; 130:4
7. **Sobregrau RC, Viver E, Jiménez Cossío JA, Castromil E, Rodríguez Mori A.** Insuficiencia vascular abdominal crónica. Med Clín 1973; 60(4): 203-207
8. **Hugon J, Bounus G.** Intestinal lesions in low flow states: electron microscopic study. SJ Boley Ed. Vascular disorders of the intestine. New York: Appleton Century Crofts, 1971; 123-144.
9. **Smith SL, Tutton RH, Ochsner SF.** Roentnografic aspect of intestinal ischemia. Am J Roentg 1972; 116: 249
10. **Dick AP, Graff R.** An arteriographic study of mesenteric arterial disease. Gut 1967; 8: 206-12
11. **Kaufman S, Harrington DP.** Superior mesenteric artery embolization: An angiographic emergency. Radiology. 1977; 124: 625-630
12. **Naitove A, Weisman RE.** Primary mesenteric venous trombosis. Ann Surg 1965; 161: 516
13. **Anane-Sefan JC, Blair E, Recler S.** Primary mesenteric venous occlusive disease. Surg Gynecol. Obstet 1975; 141: 740
14. **Crawford ES, Morris GC, Myhre HO.** Celiac axis, superior mesenteric artery and inferior mesenteric artery occlusion: surgical considerations. Surgery 1977; 82(6): 856-866
15. **Atwell RB.** Superior mesenteric artery embolectomy. Surg Gynecol Obstet 1961; 112: 257
16. **Bave AE, Austen WG.** Superior mesenteric artery embolism. Surg Ginecol Obstet. 1963; 116: 474
17. **Matesanz JM, Acín F.** Insuficiencia arterial aguda. Tratado de Cirugía. Ediciones Toray. Barcelona 1988: 649-657
18. **Robbins SL, Kumar V, Cotran R.** Trastornos hídricos y hemodinámicos. En: Patología estructural y funcional. Ed. McGraw-Hill Interamericana de España SA, 1990: 87-123
19. **Elliot JJ.** Arterial embolization. Problems of source, multiplicity, recurrence and delayed treatment. Surgery 1980; 88: 833
20. **Hammond CL.** Biological versus mechanical valves. Analysis of 1.116 valves inserted into 1.012 adult patients with 4.818 patient year and 5.327 valve-year follow-up. Thorac Cardiovasc Surg. 1987; 93: 182
21. **Heath.** Pulmonary hypertension due to myxoma of the right atrium with special reference to the behaviour of embolism of myxoma in the lung. Am Heart J. 1964; 68: 227

22. **Dayal Y, Delellis RA.** El tubo digestivo: Intestino delgado. En: Patología estructural y funcional. Robbins SL, Ramzi SC, Vinay K editores. Interamericana McGraw-Hill 1990: 873-1032
23. **Nathan H, Bernstein R, Blatt C.** Mesenteric infarction. *Am. J. Gastroenterology.* 1970; 53: 539
24. **Pierce GE, Brockenbrough ED.** The spectrum of mesenteric infarction. *Am. J. Surg.* 1970; 119: 233
25. **Porto J, Gesto R.** Etiología de la isquemia mesentérica. *Gastrum* 1988; 26: 26-28
26. **Price WE, Rohrer GV, Jacobson ED.** Mesenteric vascular diseases. *Gastroenterology* 1969; 57: 599
27. **Williams LF, Anastasia LF, Hasiotis CA, Bosniak MA, Byrne JJ.** Nonocclusive mesenteric infarction. *Am J Surg* 1967; 114: 376-381
28. **Blood DC, Henderson O.M.** Medicina Veterinaria 6ª ed. Ed. Interamericana - Mexicol. 1996: 207; 1115
29. **Blood DC, Radositis OM.** Medicina Veterinaria 7ª ed. Ed. Interamericana - McGraw Hill. 1998: 175-189
30. **Hungerford, TG.** Diseases of Livestock. 9ª ed. Ed. McGraw Hill. Roseville (Australia), 1990: 216-217; 458-459
31. **Robinson WF, Huxtable CRR.** Clinipathologic Principles for Veterinary Medicine. Ed. Cambridge University Press. Cambridge 1988: 171-172
32. **Fischer AT Jr, Meagher DM.** Strangulating torsions of the equine large colon. *Compend Contin Educ pract Vet.* 1985; 8:25-30
33. **Harrison IW.** Equine large intestinal volvulus: A review of 124 cases. *Vet Surg.* 1988; 17:77-81
34. **Synder JR, Pascoe JR, Olander HJ.** Strangulating volvulus of the ascending colon in horses. *J Am Vet Med Assoc.* 1989; 195: 757-764
35. **McAnulty JF, Stone WC, Darien BJ.** The effects of Ischemia and Reperfusion on Mucosal Respiratory Function, Adenosine Triphosphate, Electrolite and Water Content in the Ascending Colon of Ponies. *Vet Surgery.* 1997; 26: 172-181
36. **Carbonell C, Borrás M, García E, Camps B.** Estudio experimental de la isquemia aguda intestinal y su revascularización. Aspectos bacteriológicos. *Cir Esp* 1978; 32 (2): 99-104
37. **Marston A.** Causes of death in mesenteric arterial occlusion. I. Local and general affects of devascularization of the bowel. *Ann Surg* 1963; 15: 952-959
38. **Noonan CD.** Effect of timed occlusion at various levels of mesenteric arteries and veins. *Radiology* 1968; 90: 99-106
39. **Caridis DT.** Treatment of acute ischemia of the intestine by peritoneal lavage in the rabbit. *Surg Gynecol Obstet.* 1973; 35: 199-202
40. **Bounous, G.** Metabolic changes in intestinal mucosa during hemorrhagic shock. *Canad J Surg.* 1965; 8 332
41. **Williams RA, Wilson SE.** A model for the study of monocclusive intestinal ischemia. *Br. J. Exp Pthol* 1980; 61: 461-464
42. **Chiu CJ, McArle AH, Brown R, Scott HJ, Gurd FN.** Intestinal mucosal lesions in low-flow states I. A morphological, hemodynamic and metabolic reappraisal. *Arch. Surg.* 1970; 101: 478-483
43. **Brown RA, Chiu CJ, Scott HJ, Gurd FN.** Ultrastructural changes in the canine ileal mucosal cell after mesenteric arterial occlusion. *Arch Sur.* 1970; 101: 290-297
44. **Marston A.** Patterns of intestinal. *Ann R. Coll Surg Engl.* 1964; M 35: 151-181
45. **Graeber G, Cafferty P, Reardon M, Curley C, Ackerman N, Harmon J.** Changes

- in serum total creatine phosphokinase (CPK) and its isoenzymes caused by experimental ligation of the superior mesenteric artery. *Ann Surg* 1981; 193(4): 499-505
46. **Bradbury W, Brittenden J, McBride K, Ruckley CV.** Mesenteric ischaemia: a multidisciplinary approach. *Br J Surg* 1995; 82: 1446-1459
  47. **Shapiro PB, Bronstein B, Frank ED, Fine J.** Host resistance to hemorrhagic shock. XI. Role of deficient flow through intestine in development of irreversibility. *Biology of medicine* 1958; 97: 372-376
  48. **Reinhold R.B., Fine J.A.** Technique for quantitative measurement of endotoxine in human plasma. *Proc. Soc. Exp. Biol Med* 1971; 137: 334
  49. **Risueño AJC, Gómez AA, Villar LE, García CE, García SJ, corral de la Calle J.** Evolución de los niveles de la actividad enzimática B-N-acetilhexosaminidásica en el intestino isquémico. Estudio experimental. *Cirugía Española* 1991. 49(1): 26-28
  50. **Guijarro F.** Alteraciones morfológico-funcionales en la isquemia aguda de la arteria mesentérica superior. Efecto de la fructosa 1-6 difosfato: estudio experimental en conejos. 1994. Tesis Doctoral. Departamento de Cirugía de la UCM. 66-138
  51. **Adrian Marston BM.** Causes of death in mesenteric arterial occlusion: I. Local and general effects of devascularization of the bowel. *Ann Surg* 1963; 156(6): 952-959
  52. **Kobold EE, Thal AP.** Quantitation and identification of vasoactive substances liberated during various types of experimental and clinical intestinal ischemia. *Surgery, Gynecology, Obstetrics.* 1963; 315-322
  53. **Hashimoto E, Thal AP.** The lung lesion produced by materials released from the superior mesenteric vein after superior mesenteric arterial occlusion. *Japanese Circulation Jour.* 1971; 35. 1071-1080
  54. **Chiu CJ, Scott HJ, Gurd FN.** Volume deficit toxic absorption: a study of canine shock after mesenteric arterial occlusion. *Ann Surg* 1972; 175(4): 479-488
  55. **Mahonar M, Tyagi RP.** Experimental intestinal ischemic shock in dogs. *Am. J. Physiol.* 1973; 4: 887-91
  56. **Aho AJ, Arstila AV, Ahonen J, Inberg MV, Scheinin TM.** Ultrastructural alterations in ischaemic lesion of small intestinal mucosa in experimental superior mesenteric artery occlusion. *Scand J Gastroent* 1973; 8: 439-447
  57. **Pérez M, Gómez A, Pérez A y Battaner E.** Función hepática e isquemia intestinal. *Cir Esp* 1980; 34 (2): 93-102
  58. **Sanchez L.** La linfa en el síndrome de revascularización intestinal. *Rev. quir. Esp.* 1983; 10 (5) : 62-70
  59. **Sánchez L.** El síndrome de revascularización intestinal. Estudio experimental. *Rev Quir Esp* 1980; 7(3): 134-140
  60. **Gómez JA, Ponce Marco JL, Martín Lorenzo JG, Sánchez BF, Martínez de Haro L, Ortuño PG et al** *Cirugía Española.* 1985; 39 (1): 103-109
  61. **Suso Alea F, Gómez A, Gonzalez J, García J, Cuadrado F, Ramos A.** Repercusión hepática de la isquemia intestinal aguda. Estudio experimental. *Rev Esp Enf Ap Digest* 1988; 74(3): 219-224
  62. **Smirniotis VE, Labrou AT, Tsiftses DD.** Niveles plasmáticos de la isoenzima creatinina fosfoquinasa BB durante la isquemia intestinal experimental. *Anales de Cirugía Vascul* 1989; 3(1): 8-10
  63. **Hernández AE, De Miguel E, Santamaría L, Rodríguez-Montes JA, García Sancho L.** Research in surgery. 1990. 2(2): 68-71
  64. **Grosfeld JL, Kamman K, Gross K, Cikrit D, Ross D, Wolfe M, y cols.** Comparative effects of indomethacin, prostuglandin E1, and ibuprofen on bowel



- ischemia. *J Pediatr Surg*. 1983; 18(6): 738-42
65. **Boorstein JM, Dacey LJ, Cronenwet JL.** Pharmacologic treatment of occlusive mesenteric ischemia in rats. *Jour Surg Research*. 1988; 44: 555-560
  66. **Holgado Madruga M, Refoyo Enriquez A, Mariño Hernandez E, Martín Rollan C, Garcia Garcia J, Macías Nuñez JF.** Inhibidores de la xantina oxidasa en el pronóstico de la isquemia intestinal aguda. *An Med Intern*. 1989. 6(4): 177-182
  67. **Ortiz-Lacorzana J, García-Alonso I, Portugal V, Méndez J.** Influencia del peso corporal y del período de isquemia mesentérica aguda en la mortalidad de ratas sometidas a revascularización intestinal. *Rev Esp Enf Digest* 1990; 77 (4): 263-267
  68. **Ortiz Lacorzana J, García-Alonso I, Apechea A, Iturburu I.** The immune system and oxygen derived free radicals in small bowell reperfusion injury in the rat. *Research in Surgery* 1990; 2 (3): 106-111
  69. **Sun J, Farias L, Markov A.** Fructose 1-6 Diphosphate prevents intestinal ischemic reperfusion injury and death in rats. *Gastroenterology* 1990; 98: 117-126.
  70. **Clark E, Gewertz B.** Intermittent ischemia potentiates intestinal reperfusion injury. *J Vasc Surg* 1991; 14: 601-606
  71. **Temes RT, Kauten RJ, Schwartz MZ.** Nuclear magnetic resonance as a noninvasive method of dia-gnosing intestinal ischenia: Technique and preliminary results. *Journal of pediatric surgery* 1991; 26(7): 775-779
  72. **Riera JM, Alonso AF, Rodriguez BM.** Efectos del alopurinol sobre la isquemia mesentérica experimental en la rata. *Rev. Esp. Enf. Digest* 1991; 79(1): 15-20
  73. **Bilbao J, García-Alonso I, Portugal P, Barceló P, Apechea A, Méndez J.** Eficacia de tratamientos antioxidantes (ácido fólico y alfatocoferol) en las lesiones intestinales inducidas por reperusión. *Cir Esp* 1992; 51 (4): 262-265
  74. **Carnés J.** Estudio de la curva de supervivencia durante un proceso de isquemia mesentérica aguda. Alteraciones morfológico-funcionales y efecto del tratamiento con Superóxido dismutasa: estudio experimental en *Rattus norvergicus* 1999. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Biológicas. UCM: 71-77
  75. **Ahren C, Haglund U.** Mucosal lesions in the small intestine of the cat during low flow. *Acta Physiol* 1973; 88: 541-550
  76. **Granger DN, Rutili G, McCord JM.** Superoxide radicals in feline intestinal ischemia, *Gastroenterology* 1981; 81(1): 22-9
  77. **Granger DN, Taylor AE.** Permeability of intestinal capillaries to endogenous macromolecules. *Am J Physiol*. 1980; 238: H457-64
  78. **Shoenberg M, Muhl E, Sellin D, Younes M, Schildbreg W, Haglund U.** Posthypotensive generation of soperoxide free radicals possible role in the pathogenesis of the intestinal mucosal damage. *Acta Chir Scand* 1984; 150:301-309
  79. **McCord JM, Fridovich I.** The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase. *J. Biol. Chem* 1968. 243: 5753-5760
  80. **Dale A, Parks DA, Granger DN.** Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation. *Am J Physiol*. 1986; 250: G749-G753
  81. **Granger N, McCord J, Parks D, Hollwarth M.** Xanthine oxidase inhibitors attenuate ischemia-induced vascular permeability changes in the cat intestine. *Gastroenterology* 1986; 90: 80-84
  82. **Boyd A, Sherman I, Saibil F, Mamelak M.** The protective effect of a-hydroxybutirate in regional intestinal ischemia in the hamster. *Gastroenterology* 1990; 99: 860-862
  83. **Varela G, Mataix J.** Digestión. Fundamentos de fisiología animal. Ediciones Universidad de Navarra SA. Pamplona 1979: 341-372
  84. **Lleonart F, Valls R, Costa P, Campo JL, Castelló JA, Pontes M.** Tratado de

- Cunicultura. Tomo 1. Principios básicos, mejora y selección. Alimentación. 1980; 85-96
85. **Nuñez A.** Circulación vascular. Regulación. Circulación capilar. sistema linfático. En: Fundamentos de fisiología animal. Ediciones Universidad de Navarra SA. Pamplona 1979; 271-295
  86. **Barone R, Pavaux C, Blin PC, Cup P.** Atlas D'anatomie du Lapin. Masson y Cie, Paris, 1973; 115-144
  87. **Fridovich I.** The biology of oxygen radicals. Science 1978; 201: 875-880
  88. **Wesigier RA.** Oxygen radicals and ischemic tissue injury. Gastroenterology 1986; 90 (2): 494-7
  89. **Kouvi Ph.** Les radicaux libres. J Chir. 1986; 123(3): 188-196
  90. **Mc Cord JM.** Oxygen-derived free radicals in postischemia tissue injury. N Engl J Med 1984; 32 (3): 159-163
  91. **Parks D, Granger N.** Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation. Am J Physiol 1986; 250 (13): G749-G753
  92. **Moon VH.** Shock and related capillary phenomena. New York: Oxford University Press, 1938: 72-3
  93. **Romson JL, Hook BG, Kunkel SL, Abrams GD, Shork MA, Lucchesi BR.** Reduction of the extent of ischemic myocardial injury by neutrophil depletion in the dog. Circulation 1983; 67: 1016-23
  94. **Ballester, M.** Antioxidantes, radicales libres y salud. Un enfoque químico-orgánico-físico. Med Clin. Barcelona 1996. 107: 509-515
  95. **Romero AD, Calvo RM, Villalva Martín MP, Amiguet García JA, Bueno GJ.** Radicales libres y especies activadas del oxígeno. Química. Biología e implicaciones en patología médica. An. Med. Intern. 1987; 4-13 pp (1 Pt): 672-679
  96. **Freeman BA, Crapo JD.** Free radicals and tissue injury. Lab invest 1982; 12: 797-808
  97. **Halliwell BA, Gutteridge J.** Free Radical in Biology and Medicine. 1989. Oxford University Press. 2ª Edición. Lipid peroxidation: a radical chain reaction: 218-242
  98. **Cotran RS, Kumar V, Robbins SL.** Patología estructural y funcional. El tracto gastrointestinal 1995. Interamericana. McGraw Hill. España (Madrid). 5ª Edición. Lesión y muerte celular: 3-26
  99. **Behar D., Czapski G, Rabami J et al** The acid dissociation constant and decay kinetics of perhydroxyl radical. J Phys Chem. 1970; 74: 3-209
  100. **Fox RB, Parad RB, Demiling RH, Merrigan MJ.** Permeability of isolated rat lungs perfused wuth purine and xantine oxidase under constant perfusing pressure. Physiology of oxygen radicals. Clinical physiology series. American physiological society 1986; pp: 163-69
  101. **Barton JP, Parker JE.** The radiolysis of oxigenates cysteine solutions at neutral pH. The role of R<sub>2</sub>SSSR and O<sub>2</sub>. Int J Radiat Phys Chem. 1970; 2: 159-166
  102. **Rosen H, Klebanoff SJ.** Hydroxyl radical generation by polymorphonuclear leukocytes measured by electron spin resonance spectroscopy. J. Clin. Invest. 1979; 64: 1725-1729
  103. **Forman HJ, Kennedy JA.** Role of superoxide radical and mitochondrial dehydrogenasa reactions. Biochem Biophys Res Commun. 1974; 60: 1044-1050
  104. **Grisham MB, McCord JM.** Chemistry and cytotoxicity of reactive oxigen radicals. Clinical physiology series American physiological society. Bethesda. Maryland 1986; pp: 1-18
  105. **Fridovich I.** Oxygen radicals, hydrogen peroxide and oxigen toxicity. Ed: Pryor WA.

- Free radicals in biology. Vol 1. Academic Press. New York, 1986; pp: 239
106. **Koryckadahl M, Richardson T.** Initiation of oxidative changes in foods. Symposium: oxidative changes in milk. *J Dairy Sci.* 1981; 63: 1181-1208
  107. **Michelson AM, McCord JM, Fridovich I.** Superoxide dismutase. Academic Press, New York, 1977
  108. **Weis J.** Radiochemistry of aqueous solutions. *Nature, London* 1944; 153: 748-750
  109. **Walling CH.** Fenton's Reagent Revisited. *Acc Chem Res* 1975; 8: 125-131
  110. **Sadrzadeh SM, Graf E, Panter PE.** Hemoglobin A biologic Fenton reagent. *J. Biol. Chem.* 1984; 259: 1435-1456
  111. **Cohen G, Cederbaum.** Chemical evidence for production of hydroxyl radicals during microsomal electron transfer. *Science* 1979, 204: 66-68
  112. **Romero AV, Villacampa M, Villalba Martín MP, Guerrero NL, Farrer VM, Cabeza LF, y cols.** Prooxidación y antioxidación en gastroenterología. Importancia de las radicales libres. *Rev. Esp. Enf. Digest.* 1990; 77 (1): 64-72
  113. **Aurand LW, Boone NH, Giddings GG.** Superoxide and singlet oxygen in milk peroxidation. *J. Dairy Sc.* 1977; 60 (3): 363369
  114. **Gunstone FD.** Determination of the structure of fatty acids. Galliard T, Mercer EI editores. Recent advances in the chemistry of plant lipids. Academic Press, New York 1975; pp: 34-35
  115. **Hoffman M, Stevens JB, Auto AP.** Adaptation to hyperoxia in the neonatal rats. Kinetic parameters of the oxygen mediated induction of long superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase. *Toxicology.* 1980; 215-25
  116. **García García J, Gómez Alonso A.** Radicales libres en patología digestiva. *Rev Esp Enf Ap Digest.* 1988; 73(6): 729-734
  117. **Alvira RD, Villacampa MM, Martín VMP, Navarro GL, CF, Velázquez FM Lamban CF y cols.** Prooxidación y antioxidación en gastroenterología. Importancia de los radicales libres. *Rev Esp Enf Diges.* 1990; 77(1): 64:72
  118. **Greenwald RA.** Handbook of methods for oxygen radical research. CRC Press, Florida 3. edit, 1987
  119. **Maestro RF, Bjork J, Arfors KE.** Increase in microvascular permeability induced by enzymatically generated free radicals. In vivo study. *Microvas Res.* 1981; 22: 239-254
  120. **Plumer JL, Beckwith AL, Bartin FM, Admas JF, Cousin MJ.** Free radical formation in vivo and hepatotoxicity due to anesthesia with halothane. *Anesthesiology* 1982; 57 (16): 1-16
  121. **Slater TF.** Free radicals mechanism in tissue injury. *Biochem J.* 1984; 222: 1
  122. **Engerson TD, McKelvey TG, Rhune DB.** Conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemic rats tissues. *J. Clin. Invest.* 1987; 79: 1564-70
  123. **Brawn K, Fridovich I.** Superoxide radical and superoxide dismutase. Threat and defensa. *Acta Physiol Scand.* 1980; 492: 9-18
  124. **Matsumara G, Herp A, Pigman W.** Depolymerisation of hyaluronic acid by antioxidants and reduction. *Radiat Res.* 1966; 28: 735-52
  125. **Allen JE, Guodman DEP, Besarab A, Rasmusen H, Studies on biochemical basis of oxygen toxicity.** *Biochem. Biophys Acta* 1973; 320: 334-40
  126. **Takehige K, Takayanagi K, Minakami J.** Reduced coenzyme Q10 an antioxidant of lipid peroxidation in bovine heart mitochondria. En: Yamanura Y, Folkers K, Ito Y, editores. Biomedical and clinical aspects of coenzyme Q. vol 2. Amsterdam, Elsevier/North Holland Biomedical Press 1980; 15-26
  127. **Cotran RC, Kumar V, Robbins SL.** Lesion y adaptación. En: Patología estructural

- y funcional, 4ª edición española. Interamericana de España SA. 1990; 1-38
128. **Pryor WA.** The role of free radical reactions in biological systems. En: Pryor WA, editor. Free radicals in biology. Vol 1. Acad Press New York 1976; pp: 1-49
  129. **Frield H.P,** Smith DJ, Till GO, Thomson PD, Louis DS Ward PA. Ischemia reperfusion in humans. AM J Pathol. 1990; 136: 491-5
  130. **Pinckard RN, O'Rourke RA, Crawford MH.** Complement localization and mediation of ischemic injury in baboon myocardium. J. Clin. Invest. 1980; 66: 1050-6
  131. **Welbourn C, Goldman G, Paterson I, Valeri C, Shepro D, Hetchman H.** Pathophysiology of ischaemia reperfusion injury: central role of neutrophil. Br J Surg 1991; 78: 651-655
  132. **Ernster L.** Biochemistry of reoxygenation injury. Crit Care Med. 1988; 16: 947-53
  133. **Klausner JM, Paterson IS, Kobzik L, Valeri CR, Shepro D, Hechtman HB.** Oxygen free radicals mediate ischemia-induced lung injury. Surgery. 1989; 104: 192-199
  134. **Petrone WE, English DF, Wong K, McCord JM.** Free radicals and inflammation superoxide dependant activation of a neutrophil chemotactic factor in plasma. Proc. Natl. Acad. Sci. 1980; 77: 1159-63
  135. **Gimbrone MA, Brock AF, Schafer AI.** Leukotriene B4 stimulates polymorphonuclear leukocyte adhesion to cultured vascular endothelial cells. J Clin Invest. 1984; 74: 1552-5
  136. **Mullane KM, Read N, Salmon JA, Moncada S.** Role of leukocytes in acute myocardial infarction in anesthetized dogs: relationship to myocardial salvage by anti-inflammatory drugs. J. Pharmacol. Exp. Ther. 1984; 228: 510-22
  137. **Smedly LA, Tounesen MG, Sandhans RA.** Neutrophil-mediated injury to endothelial cell. Enhancement by endotoxin and essential role of neutrophil elastase. J. Clin. Invest. 1986; 77: 1233-43
  138. **Afors K, Lunberg C, Lindbom L, Lundberg K, Beatty P, Harlan J.** A monoclonal antibody to the membrane glycoprotein complex CD 18 inhibits polymorphonuclear leukocyte accumulation and plasma leakage in vivo. Blood 1987; 69 (1): 338-340.
  139. **Paterson IS, Klausner JM, Goldman G.** Tromboxane mediates the ischemia-induced neutrophil oxidative burst. Surgery 1989; 106: 224-9
  140. **Ogletree ML.** Overview of physiological and pathological effects of thromboxane A2. Faseb J. 1987; 46: 133-8
  141. **Klausner JM, Paterson IS, Goldman G.** Post-ischemia renal injuries mediated by neutrophils and leukotrienes. Am J Physiol. 1989; 256: F794 - F802
  142. **Samuelson B.** Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. Science 1983; 220: 568-75
  143. **Luchessi BR, Mullane KM.** Leukocytes and ischemia induced myocardial injury. Ann. Rev Pharmacol. Toxicol. 1986; 26: 201-24
  144. **Emerit J, Droy-Lefaix MT, Likforman J, Diemert MC.** Les radicaux libres oxigénés et maladies inflammatoires de l'intestin. J Chir (Paris). 1989, 126 n° 5: 289-293
  145. **Sarr MG, Bulkey GB, Cameron JL.** Temporal efficacy of allopurinol during the induction of acute pancreatitis in the ex vivo perfused canine pancreas. Surgery 1987; 101: 342-345
  146. **Ceconi C, Cargnoni A, Pasini E, Condorelli E, Curello S, Ferrari R.** Evaluation of phospholipid peroxidation as malondialdehyde during myocardial ischemia and reperfusion injury. Am J Physiol 1991; 260: H1057-H1061

147. **Gallagher KP, Buda A, Pace D, Gerren A, Shalafer M.** Failure of superoxide dismutase and catalase to alter size of infarctation in conscious dogs after 3 hours of occlusion followed by reperfusion. *Circulation* 1986; 73: 1065-1073
148. **Garlick PB, Davies M, Hearse D, Slater T.** Direct detection of free radicals in the reperfused rat heart using electron spin resonance spectroscopy. *Cir Res* 1987; 76: 678-686
149. **Slavikova H, Lojek A, Hamar J, Duskova M, Kubala L, Vondrazek J, Ciz M.** Total antioxidant capacity of serum increased in early but not late period after intestinal ischemia in rats. *Free Radic Biol Med* 1998; 1 (25): 9-18.
150. **Robinson J, Mirkovitch V, Winistörfer B, Daegesser R.** Response of the intestinal mucosa to the ischemia. *Gut* 1981; 22: 512-527
151. **Bounus G.** Acute necrosis of the intestinal mucosa. *Gastroenterology* 1982; 82 :1457-1467
152. **Granger DN, Hollwarth ME, Parks DA.** Ischemia reperfusion injury: role of oxygen derived free radicals. *Acta physiol Scand.* 1986; 548: 47-63
153. **Grogaard DN, Parks DA, Granger DN, McCord JM, Forsberg J.** Effects of ischemia and superoxide radicals on mucosal albumin clearance in the dog intestine. *Am J Physiol.* 1982; 5: 448-454
154. **Kingham JG, Whorwell PJ, Loehry CA.** Small intestinal permeability I. Effects of ischemia and exposure to acetyl salicylate. *Gut.* 1976; 17: 354-361
155. **Lundgren O, Haglund U.** The parthophysiology of the intestinal countercurrent exchanger. *Life Sci* 1978; 23: 1411-1422
156. **Schoenberg M, Muhl E, Sellin D, Younes M, Schildberg W, Haglund U.** Posthypotensive generation of superoxide free readicals possible role in the pathogenesis of the intestinal mucosal damage. *Acta Chir Scand* 1984; 150:301-309
157. **Dalsing M, Grosfeld J, Shiffler M, Vane D, Hull M, Baehner R, Weber T.** Superoxide dismutase : a cellular protective enzyme in bowell ischemia. *J Surg Res* 1983; 34: 589-593
158. **Parks DA, Bulkley GB, Granger DN.** Role of oxigen derived free radicals in digestive tract diseases. *Surgery* 1983; 94: 415-422
159. **Cook BH/ Wilson FR, Taylor AE.** Intestinal fluid loss in hemorrhagic shock. *Am J. Physiol* 1971; 22: 1494-1498
160. **Parks DA, Grogaard B, Granger DN.** Comparacion of partial and complete arterial occlusion models for studying intestinal ischemia. *Surgery* 1982; 92: 869-901
161. **Forsberg JO, Jung B, Larson B.** Mucosal protection durin irradiation of exteriorizad rat ileum. Effect of hypoxia induced by starch microspheres. *Acta Radiol.* 1978; 17: 485-500
162. **Hickman P, McCollum PT, Belch JF.** Neutrophils may contribute to the morbidity and mortality of claudicants. *Brit Jour of Surgery.* 1994; 81: 790-798
163. **Engler RL, Dahlgren MD, Morris DD, Peterson MA, Schmid-Schonbeing GW.** Role of leukocytes in response to acute myocardial ischemia and reflow in dogs. *Am J. Physiol.* 1986; 251: H 314-22
164. **Carden DL, Korthuis RJ.** Role of neutrophilic elastase in postischemia granulocyte extravasation and microvascular dysfunction in skeletal muscle. *Faseb J.* 1990; 49. A 1248
165. **Hernández L, Grisham M, Twohig B, Afors K, Harlan J, Granger N.** Role of neutrophils in ischemia-reperfusion induced microvascular injury. *Am J Physiol* 1987; 253: H699-H703
166. **Simpson PJ, Todd RF, Fantone JC, Mickelson JK, Griffin JD, Luchesi BR.**

- Reduction of experimental canine myocardial reperfusion injury by a monoclonal antibody (anti CD 11b) that inhibit leukocyte adhesion. *J. Clin Invest* 1988; 81: 624-9
167. **Horgan MJ, Wright SD, Malik AB.** Protective effect of monoclonal antibody IB4 directed against leucocyte adhesion glycoprotein CD 18 in reperfusion lung injury. *Am Respir Dis.* 1989. 139: A-303
168. **Seewaldt-Becker E, Rothlein R, Dammgen JW.** En: Springer T, Anderson D, Rosenthal A, Rothlein R, editores. *Leukocyte adhesion molecules, structure, function and regulation.* New York: Springer-Verlag, 1990; 138-48
169. **Nathan C, Srimal S, Farber C.** Cytokine-induced respiratory burst of human neutrophils: dependence on extracellular matrix proteins and CD 11/CD18 integrins. *J Cell Biol.* 1989; 109: 1341-9
170. **Vedder NB, Fouty BW, Winn RK, Harlam JM.** Role of neutrophils in generalized reperfusion injury associated with resuscitation from shock. *surgery* 1989; 106: 509-16
171. **Barroso Aranda J, Schmid-Schonbein GW, Zweifach BW, Engler RL.** Granulocytes and no reflow phenomenon in irreversible hemorrhagic shock. *Cir Res.* 1988; 63: 437-47
172. **Anner H, Kaufman RP, Kobzik L, Valeri CR, Shepro D, Hechtman HB.** Pulmonary Leukosequestration induced by hind limb ischemia. *Ann Surg* 1987; 206: 642-8
173. **Klausner JM, Paterson IS, Valeri CR, Shepro D, Hechtman HB.** Limb ischemia-induced increase in permeability is mediated by leucocytes and leukotrienes. *Ann Surg.* 1988; 208: 755-60
174. **Schmeling D, Caty G, Oldham T, Guice K, Hinshaw D.** Evidence for neutrophil related acute lung injury after intestinal ischemia-reperfusion. *Surgery* 1989; 106:195-202
175. **Stephens KE, Ishizaka A, Larrick JW, Raffin TA.** Tumor necrosis factor causes increased pulmonary permeability and edema. *Am Rev. Respir. Dis.* 1988; 137: 1364-70
176. **Pober JS, Gimbrone JA, Lapierre LA.** Overlapping patterns of activation of human endothelial cells by interleukin 1, tumor necrosis, and immune interferon. *J. Immunol* 1986; 137: 1893-6
177. **Miralles M, Hidalgo JM, Covas MI, Gallart L, Cotillas J, Gimenez A, Corominas A y Cairols MA.** Generación de radicales libres de oxígeno durante el clampaje aórtico prolongado. *Angiología* 1995 (4): 181-186
178. **Southard JH, Marsh DL, McAnulthy JF, Belzer FD.** Oxygen-derived free radical damage in organ preservation: activity of superoxide dismutase and xantine oxidase. *Surgery* 1987; 101: 566-70
179. **Parks DA, Bulkley GB, Granger DN, Hamilton SR, McCord JM.** Ischemic injury in the rat small intestine: role of superoxide radicals. *Gastroenterology* 1982; 82(1): 9-15
180. **Shlafer ML, Bolli R, Likich RF, Hartley CJ, Roberts R.** Enhancement of recovery of myocardial function by oxigen-free radical scavengers after reversible region ischemia. *Circulation (Suppl)* 1982; 66: 85-89
181. **Werns SS, Sjea M, Luchessi B.** Free radical and myocardial injury pharmacological implications. *Circulation* 1986; 74: 1-5
182. **Marubayashi S, Kiyohiko D, Ochi K, Kawasaki T.** Role of free radicals in ischemic rat liver cell injury: Prevention of damage by a-tocopherol administration. *Surgery* 1986; 99 (2): 184-192
183. **Suminoto K, Inagaki K, Ito H.** Ischemic damage prevention by coenzyme Q 10

- treatment of the donor before orthotopic liver transplantation. Biochemical and histologic findings. *Surgery* 1987; 102: 821-27
184. **Cunningham SK, Keavenny TV.** Splanchnic organ adenine nucleotidase and their metabolites in hemorrhagic shock. *Ir J Med Sci.* 1977; 146: 136-143
185. **Warner BW, Hasselgreh PO, James HO.** Superoxide dismutase in rats with sepsis. *Arch Surg.* 1987; 122: 1142-46
186. **Hogstrom H, Haglund U.** Postoperative decrease in suture holding capacity in laparotomy wound and anastomosis. *Acta Chir Scand.* 1985; 151:533-35
187. **Hogstrom H, Haglund U.** Neutropenia prevents decrease in strength of rat intestinal anastomoses. Partial effect of oxygen free radicals scavengers and allopurinol. *Surgery.* 1986; 99:716-20
188. **Shandall A, William ST, Hallet MB, Young HL.** Colonic healing. A role for polymorphonuclear leucocyte and oxygen radical production. *Brit. J. Surg.* 1986; 73: 225-28
189. **Tolmasoff Jm, Ono T, Cutler RG.** Superoxide dismutase. Correlation with life span and specific metabolic rate in primate species. *Proct. Natl. Acad. Sci.* 1980; 77: 2777-81
190. **Giménez R.** Radicales libres y antioxidantes en clínica humana. *Laboratorios Zambón.* 1993:12-21
191. **Grace PA.** Ischaemia-reperfusion injury. *Brit Jour of Surgery.* 1994; 81: 637-647
192. **Leboulanger J.** Las vitaminas. *Bioquímica. Mecanismo de acción. Interés terapéutico.* Servicio científico Roche. 1981. Pp: 66-67
193. **Gutteridge JMC, Rowley DA, Halliwell B, Westermark T.** Increased non protein-bound-iron and decreased protection against superoxide radical damage in cerebral fluid from patients with neuronal ceroid lipofuscinosis. *Lancet* 1982; ii: 459-460
194. **Manson KE, Telford IR.** Some manifestation of vitamin E deficiency in the monkey. *Arch. Path.* 1974; 43: 363-373
195. **Porter FS, Fich CD, Diuming JS, Vitamin E deficiency in the monkey.** Further studies of the anemia with emphases in bones marrows morphology. *Blood* 1962; 20:471-477
196. **Gerber GB, Gerber C, Koszalka TR, Emmel WM.** Creatine metabolism in vitamin E deficiency in the rat. *Am J Physiol.* 1962; 202: 453-460
197. **Bunyan J, Green J, Diplok AT.** Lysosomal enzymes and vitamin E deficiency muscular dystrophy, encephalomalacia and exudative diatesis in the chick. *Br J Nutr.* 1967; 2: 127-136
198. **Dormandy TL.** Free radicals oxidation and antioxidants. *Lancet.* 1978. I: 674-650
199. **Goldstein IM, Kaplan HB, Edelson HS, Weissman G.** Ceruloplasmin, a scavenger of superoxide anion radicals. *J Biol Chem.* 1979; 254: 4040-4045
200. **Freiden E.** Ceruloplasmin: a link between copper and iron metabolism. *Adv Chem Ser.* 1971; 100: 292-331
201. **Alvira R, Villalba Martín MP, Amiguet García JA, Irurzum PL, Gómez JB.** Radicales libres y especies activadas del oxígeno. *Química, biología e implicaciones en patología médica. Sistemas defensivos ante los radicales libres. Sistemas antioxidantes enzimáticos.* *An Med Intern.* 1988; 3(5): 146-151
202. **Stocks J, Gutteridge JMC, Sharp RJ, Dormandy TL.** Assay using brain homogenate for measuring antioxidant activity in biological fluids. *Clin Sci. Mol. Med.* 1974; 47: 223-233
203. **Kanner J, Kinsella JF.** Initiation of lipid peroxidation by a peroxidase - hydrogen

- peroxide/halide system. *Lipids*. 1983. 18: 204-210
204. **Koubi Ph**. Les radicaux libres. *J Chir*. 1986. 123(3): 188-196
205. **Ono T**. Enzyme patterns and malignancy of experimental hepatomas. En: Yoshida T, editor. *Biological and biochemical evaluation in experimental hepatomas*. Japanese Cancer Association Tokio 1966; pp 189
206. **Wickramsinghe RH, Reddy Pk, Willee CA**. Superoxide anions and other components of human renal adenocarcinoma. *Clin Biochem* 1970; 9: 24-30
207. **Mills GC**. Hemoglobin catabolism I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *J Biol. Chem* 1958; 229: 189-197
208. **Voetman AA, Loos JA, Roos D**. Changes in the levels of glutathione in phagocytosing human neutrophils. *Blood* 1980; 55: 741-747
209. **Shamberger RJ**. Selenium in health and disease. En: Industrial health foundation Inc, (edit). *Proceeding of the Symposium on selenium-tellurium in the environment*. Pittsburg 1976; pp: 253-267
210. **Marklund S**. Human copper-containing superoxido dismutase of high molecular weight. *Proc Natl Acad Sci* 1982; 79: 7634-7638
211. **Rosseau P**. Superoxido dismutases: Production and therapeutic potential. *Phar Tech Eur* 1966; 8(9): 24-28
212. **Weisinger RA, Fridovich I**. Mitochondrial superóxide dismutase. Site of synthesis and intramitochondrial localization. *J. Biol. Chem*. 1973; 248: 4793-4796
213. **Jiménez Vaquero I, García Criado FJ, García García J, Ludeña MC, Muñoz de la Espada Merlo Córdoba JB, López Vlado C y Gómez Alonso A**. Modelo experimental de isquemia-reperfusión. Valoración de lesiones y efecto profiláctico del alopurinol. *Cir Española*. Vol 58. Dic 1995. Nº 6: 516-520
214. **Directiva del Consejo de las Comunidades Europeas 86/609/CEE de 24 de noviembre de 1986**: Protección de los animales utilizados para la experimentación y otros fines científicos. B.O. de las Comunidades Europeas 18-dic-1986: L358/1-358/28
215. **Real Decreto 223/1988** sobre protección de animales utilizados para experimentación. Y otros fines científicos. *Boletín Oficial del Estado* nº 67/1988: 8509-8512
216. **Domenech Massons**. *Diseño y Estadística en Ciencias de la Salud Métodos estadísticos UD4*. Editorial Gráficas Signo SA. Espluges de llobregat (Barcelona). Ed. 1997: 3-33
217. **Guijarro J, Moratinos P, Aguilera A**. Perfil de la supervivencia durante diferentes tiempos de isquemia mesentérica: estudio experimental. *Cir Esp* 1995; 6: 493-496
218. **Fernández A, Martínez E, Vega J**. Efectos de la prostaglandina E2 sobre la isquemia mesentérica experimental en la rata. *Rev Esp Enf Ap Digest* 1987, 72 (6): 659-665
219. **Sawchuk A, Canal D, Slaughter M, Bearman D, O'connor T, Grosfeld JL**. A comparasion between fructosa 1-6 diphosphate, glucose, or normal saline infusions and species-specific blood exchange transfusions in the treatment of bowel ischemia. *Surgery* 1986; 100(4): 665-670
220. **Ben-Dahan J, Gross D, Abu-Daluc H, Klin B, Landau E, Nyska A, Krausz M**. Effect of prostaglandin and leukotriene antagonists in acute mesenteric artery occlusion. *Eur Surg Res* 1988; 20: 310-319
221. **Carnés J, Moratinos P, Gutierrez C, Aguilera A, Guijarro F**. Curva de supervivencia en el síndrome de isquemia-reperfusión de la arteria mesentérica



- craneal: estudio experimental en ratas. *Med Mil (Esp)* 1997; 53(3): 211-216
222. **Martínez M, Conde R, Gómez D y Puñal J.** La isquemia mesentérica aguda: un grave problema en patología digestiva. *Rev Esp Enf Ap Digest* 1985; 68 (2): 121-126
223. **Gil J, Bello M, Rojas A, Rodríguez J, Martínez P, López J.** Lipoperoxidation in three different anesthesiologic procedures. VIII Biennial Meeting International Society for Free Radical Research. Abstract Book. 1996: 177
224. **Fontes B, Moore F, Moore E, Koike K, Kim F, Trew C, Peterson V.** Gut ischemia induces bone marrow failure and increases risk of infection. *J Surg Res* 1994; 57: 505-509
225. **Guijarro J, Moratinos P, Delgado J, Aguilera A.** Recuperación postoperatoria: influencia del tiempo de isquemia mesentérica aguda y del tratamiento con fructosa 1-6 difosfato. Estudio experimental en conejos. *Med Mil (Esp)* 1997; 53 (2): 109-113
226. **Marklund S.** Extracellular superoxide dismutase in human tissues and human cell lines. *J Clin Invest* 1984; 74: 1398-1403
227. **Kyle M, Nakae D, Sakaida I, Miccadei S, Farber J.** Endocytosis of superoxide dismutase is required in order for the enzyme to protect hepatocytes from the toxicity of Hydrogen peroxide. *J Biol Chem* 1988; 263 (8): 3784-3789
228. **Homans D, Asinger R, Pavek T, Crampton M, Lindstrom P, Peterson D, Bache R.** Effect of superoxide dismutase and catalase on regional dysfunction after exercise-induced ischemia. *Am J Physiol* 1992; 263 (2): H392-H398
229. **Tanaka M, Richard V, Murry C, Jennings R, Reimer K.** Superoxide dismutase plus catalase therapy delays neither cell death nor the loss of the TCC reaction in experimental myocardial infarction in dogs. *J Mol Cell Cardiol* 1993; 25 (4): 367-378
230. **Otamiri T.** Oxygen radicals, lipid peroxidation, and neutrophil infiltration after small-intestinal ischemia and reperfusion. *Surgery* 1989; 105: 593-597
231. **Horton H, Walker P.** Oxygen radicals, lipid peroxidation and permeability changes after intestinal ischemia and reperfusion. *J Appl Physiol* 1993; 74 (4): 1515-1520
232. **Van Ye T, Roza A, Pieper G, Henderson J, Johnson C, Adams M.** Inhibition of intestinal lipid peroxidation does not minimize morphologic damage. *J Surg Res* 1993; 55: 555-558
233. **Gutiérrez C, Carnés J, Aguilera A, Moratinos P.** Utilidad del test del TBA en la valoración del MDA como producto final de la peroxidación lipídica: posibles implicaciones terapéuticas. Libro de resúmenes de las Sesiones Científicas del Centenario del Hospital "Gómez Ulla". 1996: 64
234. **Deshmukh DR, Mirochnitchenko O, Ghole V, Agnese D, Shah P, Reddell M, Brolin R, Inouye M.** Intestinal ischemia and reperfusion injury in transgenic mice overexpressing copper-zinc superoxide dismutase. *Am J Physiol* 1997; 273 (4): C1130-C1135
235. **Lorente J, Fernández P, Marcos M, Mon E, Guigou N, Pascual T, Delgado M.** Disfunción multiorgánica y cambios histológicos en la sepsis experimental. *Medicina Intensiva*. 1996; 20(7): 333-389
236. **Poggetti R, Moore F, Moore E, Bensard D, Anderson B Banerjee A.** Liver injury is a reversible neutrophil-mediated event following gut ischemia. *Arch Surg* 1992; 127: 175-179.
237. **Stanton P, Hollier P, Seidel T, Rosenthal D, Clark M, Lamis P.** Chronic intestinal ischemia: Diagnosis and therapy. *J Vasc Surg* 1986; 4: 338-344.

## 10 GLOSARIO

AGV	Ácidos grasos volátiles
AMC	Arteria mesentérica craneal
AMP	Adenosin monofosfato
ATP	Adenosin trifosfato
BHT	Butil hidroxi tolueno
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E	Epinefrina
ECG	Electrocardiograma
FA	Fosfatasa alcalina
FDP	fructosa 1-6 difosfato
GHB	Gamma - hidroxibutirato
GPO	Glutation peroxidasa
GSH	Glutation
HPLC	Cromatografía líquida de altas presión
IAM	Infarto agudo de miocardio
IIA	Isquemia intestinal aguda
IMA	Isquemia mesentérica aguda
IP	Intraperitoneal
I/R	Isquemia - reperfusión
IV	Intravenoso
MDA	Malón dialdehido
ME	Microscopio electrónico
MO	Microscopio óptico
NE	Norepinefrina
NTA	Necrosis tubular aguda
PC	Fosfocreatina
PI	Fósforo inorgánico
PMN	Polimorfonucleares neutrófilos
PVC	Presión venosa central
PVP	Presión venosa portal
RE	Retículo endoplásmico
REL	Retículo endoplásmico liso
RER	Retículo endoplásmico rugoso
RL	Radicales libres
RLO	Radicales libres del oxígeno
RMPN	Resonancia magnética fósforo nuclear
SOD	Superóxido dismutasa
SRI	Síndrome de revascularización intestinal
SS	Solución salina fisiológica
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TVP	Trombosis venosa profunda
UV	Ultravioleta
VCC	Vena cava craneal
VMC	Vena mesentérica craneal
XD	Xantina-deshidrogenasa
XO	Xantina-oxidasa