

Implicación de las especies reactivas del oxígeno en el síndrome de isquemia y reperfusión provocado por medios farmacológicos en el intestino delgado de rata

José Giménez Crouseilles

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tesisenxarxa.net) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tesisenred.net) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

**Implicación de las especies reactivas del oxígeno en
el síndrome de isquemia y reperfusión provocado
por medios farmacológicos en el intestino
delgado de rata**

Tesis doctoral

José Giménez Crouseilles

2004

Universitat de Barcelona

Facultat de Medicina

Departament de Farmacologia i Química

Terapèutica

**Implicación de las especies reactivas del oxígeno en
el síndrome de isquemia y reperfusión provocado
por medios farmacológicos en el intestino
delgado de rata**

Tesis presentada por José Giménez Crouseilles para optar al grado de
Doctor en Medicina y Cirugía

Director: Prof. Pere Puig Parellada

2004

a mis padres

a Montse y Abril

Agradecimientos

Quiero agradecer a todas las personas que de una forma u otra me apoyaron en la realización de este trabajo. De forma especial al director de esta Tesis, el Dr. Pere Puig Parellada, por su dedicación y paciencia.

A mis compañeros de la Unitat de Farmacologia i Química Terapèutica de la Facultat de Medicina de la Universitat de Barcelona, por haberme ofrecido siempre su ayuda y disponibilidad para la elaboración de este trabajo.

Al Dr. Josep Lluís Vives Corrons, por la disponibilidad del laboratorio de bioquímica.

A la Fundació Agustí Pedro i Pons por la beca concedida.

Finalmente, también quiero dar las gracias a todas aquellas personas que me han apoyado con su amistad y cariño, y de manera muy especial a mi familia.

A todos, muchas gracias.

Índice

INTRODUCCIÓN	1
Evolución y células. La vida con oxígeno	2
Radical libre	3
Procedencia de las especies reactivas del oxígeno	5
Tipos de especies reactivas del oxígeno	12
Acciones de las especies reactivas del oxígeno	19
Sistema defensivo antioxidante	25
Monóxido de nitrógeno u óxido nítrico	40
Lesión por isquemia/reperfusión	62
Definición	63
Mecanismos de la lesión por isquemia/reperfusión en el intestino delgado ..	63
Especies reactivas del oxígeno	63
Leucocitos	77
Endotelio	87
El óxido nítrico en la isquemia/reperfusión	96
Reperfusión y daño tisular	99
Fenómeno del no reflujo en la isquemia/reperfusión	101
Precondicionamiento isquémico	102
OBJETIVO	103
METODOLOGÍA	105
Diseño del estudio, animales y métodos	106
Diseño	106

Población de estudio	106
Métodos de asignación a los grupos de estudio	106
Intervenciones	106
Definición de la variable respuesta	111
Relación de aparatos utilizados	112
Fármacos y reactivos	112
Metodología del análisis estadístico	113
RESULTADOS	115
Resultados descriptivos	116
Resultado del análisis de la influencia de la reperfusión en la lesión isquémica .	117
Resultado del análisis de los modelos de referencia	120
Resultado del análisis de la influencia del método para producir la lesión por isquemia/reperfusión	124
Resultado del análisis de la comparación de los métodos (físico y farmacológico) para producir la lesión por isquemia/reperfusión	137
DISCUSIÓN	145
Consideraciones sobre la metodología empleada	147
Variables respuesta	147
Perfusión de la luz intestinal	150
El modelo de isquemia/reperfusión física	152
Duración de la isquemia	152
Duración de la reperfusión	153
Influencia de la reperfusión en el síndrome de isquemia/reperfusión	154
El modelo de isquemia/reperfusión farmacológica	155
Influencia de la cirugía en el modelo experimental	162
Implicación de las especies reactivas del oxígeno e implicación del óxido nítrico en el síndrome de isquemia/reperfusión	162
Tratamiento con alopurinol	164
Tratamientos con superóxido dismutasa y catalasa	169
Tratamientos con N ^G -nitro-L-arginina metil éster y L-arginina	178
Consideraciones finales	188
CONCLUSIONES	191
BIBLIOGRAFÍA	193
ABREVIACIONES	223

Anexo I	227
Anexo II	235
Anexo III	239
Anexo IV	245

Introducción

Evolución y células, la vida con oxígeno¹⁻⁵

La vida se originó en la Tierra por una combinación fortuita entre la atmósfera, - compuesta por hidrógeno, gas amoníaco, metano y vapor de agua -, con oxígeno no molecular, altos niveles de radiación (ausencia de la capa de ozono), altas temperaturas y abundantes aguas pluviales, y a través de la formación e interacción de compuestos orgánicos prebióticos presentes en la superficie terrestre: aminoácidos, nucleótidos y azúcares producidos no biológicamente.

Las células primitivas, llamadas anaerobias estrictas, viven de la fermentación, absorbiendo compuestos orgánicos y generando ATP (adenosintrifosfato) anaeróbicamente. Es razonable suponer, por lo tanto, que evolucionaron en ausencia de oxígeno.

A medida que las reservas de compuestos orgánicos se fueron reduciendo con el tiempo, se produjo la evolución del aparato fotosintético, que permitió a las células manufacturar los compuestos orgánicos que necesitaban a partir de compuestos inorgánicos, utilizando la luz como fuente de energía. Sin embargo, los primeros fotosintetizadores fueron también bacterias anaeróbicas y su primitiva forma de fotosíntesis no generó oxígeno.

Las fuentes de hidrógeno de las que dependían las células fotosintéticas (hidrógeno, sulfhídrico y moléculas orgánicas con hidrógeno) se empobrecían, al escapar el propio hidrógeno al espacio. Como respuesta, las células desarrollaron un nuevo tipo de fotosíntesis que les permitió obtener el hidrógeno de las moléculas de agua eliminando oxígeno como producto residual, lo cual ocurrió hace unos 2.500 millones de años con la proliferación de las cianobacterias (los primeros organismos que liberaron oxígeno como producto residual de la fotosíntesis). Así, el oxígeno comenzó gradualmente a acumularse en el agua, en el suelo, en los sedimentos y en la atmósfera. La era aeróbica estaba comenzando.

El oxígeno es un gas tóxico y reactivo, capaz de oxidar los compuestos de carbono. Su aparición en la atmósfera impidió que continuara la primitiva síntesis no biológica de compuestos orgánicos. Su presencia supuso no sólo la inmediata oxidación de tales compuestos formando dióxido de carbono y agua, sino que ocasionó la formación de la capa de ozono, que redujo enormemente la cantidad de radiación ultravioleta que alcanzaba la superficie de la Tierra.

La consiguiente oxigenación de la biosfera impuso una severa presión evolutiva en muchos organismos que, hasta entonces, habían vivido y evolucionado en un mundo

anaerobio. Al ser el oxígeno tóxico para la vida primitiva, se fue convirtiendo en un agente contaminante cada vez más peligroso llegando a constituir una amenaza para su mismo productor, las cianobacterias. Muchos organismos, incapaces de tolerar este gas, tuvieron que refugiarse en nichos anaeróbicos, o extinguirse.

Por otro lado, forzó en un estadio temprano a otro grupo de células, a desarrollar mecanismos para su destoxificación intracelular, en los que se encuentran implicadas enzimas tales como catalasas, peroxidasas y superóxido dismutasas, que reaccionan con los radicales tóxicos producidos por el oxígeno y los convierten en compuestos orgánicos inocuos y agua. La evolución de estas enzimas protectoras permitió que las células toleraran la presencia del oxígeno.

Pronto, sin embargo, los microorganismos hallaron una solución a la problemática del oxígeno, desarrollando la capacidad de usar éste mediante la respiración. Esta solución no sólo los protegió, sino que además les aportó energía adicional, porque la respiración genera bastante más ATP que la fermentación.

Conforme iba creciendo la concentración de oxígeno en la atmósfera, aparecieron muchas especies no fotosintéticas que requerían de éste para sus procesos metabólicos, las primeras aeróbicas estrictas, quienes convirtieron un veneno potencial como el oxígeno, en un elemento utilísimo mediante la elegante solución de la respiración aeróbica. A través de este mecanismo, mucho más eficiente, las células podían generar suficiente ATP como para aumentar de tamaño y realizar funciones mucho más complejas. La respiración fue un prerequisite para el origen de las células eucariotas que se convertirían en el material de construcción de los organismos superiores.

Sin embargo, muchos de los productos que se originan durante la respiración celular son por naturaleza potentes oxidantes para otras moléculas, por lo que las células aerobias tienen que pagar un precio inevitable, y es la toxicidad de las especies reactivas del oxígeno de las que se han de defender.

Radical libre^{3,6-12}

Los electrones en los átomos ocupan regiones espaciales conocidas como orbitales. La estructura electrónica de un átomo o una molécula es termodinámicamente más estable si en cada orbital hay un máximo de dos electrones, que giran en direcciones opuestas, o sea, se hallan apareados. Un electrón no apareado es el que está solo en un orbital, con

dos posibles direcciones de giro. La mayoría de las sustancias presentes en el organismo contienen sólo electrones apareados y suelen ser, por tanto, químicamente estables.

En el pasado, la palabra radical se utilizó para indicar, por ejemplo, a un grupo como el metilo en la molécula de 2-metilpropano. Después se añadió la palabra libre. Dado que un radical ya es por sí una partícula libre, éste calificativo delante de radical actualmente se considera innecesario y obsoleto: todos los radicales son libres. A pesar de lo cual, y debido a la gran utilización del término “radical libre” en toda la bibliografía utilizada para referenciar ésta obra, en ocasiones a lo largo del texto utilizaremos el mencionado término para referirnos al concepto que a continuación definiremos. De acuerdo con el sistema de nomenclatura de la Comisión por la Nomenclatura de Química Inorgánica de la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada, indicamos como radical mediante un punto en formato superíndice, precediendo a la carga, si el compuesto la posee¹³.

Los radicales libres son especies químicas (átomos o moléculas) que contienen uno o más electrones desapareados en su orbital más externo, y pueden tener carga (positiva o negativa) o no.

Esta propiedad de tener electrones desapareados le puede conferir al radical una enorme reactividad química, que le conducirá a interactuar rápidamente con otros átomos o moléculas (radicales o no) con las que entre en contacto, tendiendo a ceder este electrón extra para estabilizar su orbital de valencia (radical reductor), a aceptar un electrón para estabilizar el electrón desapareado (radical oxidante), o a unirse a un no radical, en cuyo caso este último se convierte en un radical libre. Mediante estos mecanismos los radicales libres dan lugar a reacciones en cascada con formación de nuevos radicales libres. Sólo cuando coinciden dos radicales pueden combinar sus electrones desapareados y unirse mediante un enlace covalente, terminando así con dichas reacciones, aunque pueden existir de manera estable compuestos en forma de radical libre.

Las reacciones promovidas por los radicales libres se pueden dividir en reacciones de iniciación, de propagación y de terminación. Aunque son generalmente más reactivos que los no radicales, hay una gran variabilidad en dicha reactividad. El resultado de la reacción de un radical inorgánico con un compuesto orgánico, es la creación de un radical orgánico, el cual puede sufrir sucesivas reacciones hasta formar un compuesto más estable.

Los radicales libres son generados *in vivo* como productos del metabolismo normal. En el organismo pueden crearse intra y extracelularmente, mediante mecanismos en los que están implicados numerosos enzimas y tipos celulares. En condiciones normales,

la inmensa mayoría de los radicales libres proceden de la respiración aerobia y contienen oxígeno.

El radical más abundante en los sistemas biológicos es el oxígeno molecular. Su capacidad oxidante y la reactividad de las especies químicas generadas en su reducción vienen determinadas por sus estructuras electrónicas moleculares. En 1924 se estableció que el oxígeno molecular (O_2) es un diradical que posee dos electrones desapareados en su orbital más externo con giros paralelos ($\uparrow \cdot \bar{O} - \bar{O} \cdot \uparrow$). Esta disposición de los giros previene la adición directa de un par de electrones (para lo cual debería haber un giro paralelo y otro antiparalelo) a la molécula, necesitando una inversión del giro antes de que se pueda producir la unión, de acuerdo con el principio de exclusión de Pauli*, para evitar la colocación de dos giros electrónicos paralelos en el mismo orbital. Ya que el proceso de inversión del giro es lento comparado con la vida media de los elementos en colisión, el resultado es que el oxígeno en su estado fundamental es un oxidante relativamente débil, permitiendo la coexistencia de materia orgánica y oxígeno libre.

Una consecuencia de esta restricción del giro, es que el estado fundamental del oxígeno favorecerá la vía de reducción univalente del mismo, siempre que sea posible energéticamente.

Frecuentemente se utiliza de manera equivocada el término “radicales libres del oxígeno”, asignándosele a todas las especies reactivas del oxígeno intermedias, incluyendo aquellas formas moleculares que no son radicales. Es más apropiado hablar de *especies reactivas del oxígeno* en lugar de radicales libres del oxígeno, aunque esta denominación también podría matizarse, ya que como queda expuesto más adelante, existen especies con una muy alta y otras con una menor reactividad.

Procedencia de las especies reactivas del oxígeno^{3,14-19}

Las reacciones químicas consisten en la destrucción de enlaces químicos existentes en las moléculas que reaccionan, y la formación de otros nuevos para originar los productos de la reacción. Ello implica la ruptura de los orbitales moleculares y la aparición

* **Principio de exclusión de Pauli.** En un mismo átomo o sistema orbital, no pueden existir dos electrones con valores iguales en sus cuatro números cuánticos; deben diferir en al menos uno. Eso significa que ningún orbital puede contener más de dos electrones y que éstos deben tener sus respectivos giros apareados, o sea, orientados en sentidos opuestos¹².

transitoria de estructuras intermedias. Según sea el tipo de ruptura del enlace covalente, será la naturaleza de esas especies químicas intermedias y provisionales. La heterólisis es la desigualdad en el reparto de electrones respecto al de protones y origina dos especies químicas con carga eléctrica o iones, los cuales en principio tienen todos sus orbitales completos con dos electrones o vacíos. La homólisis produce radicales libres, ya que la ruptura del enlace covalente se hace de forma que cada uno de los electrones del orbital molecular del enlace, queda en cada una de las partes, en orbitales atómicos que contendrán cada uno de ellos uno de los electrones¹². Además, los radicales libres se pueden generar en reacciones de transferencia de electrones. En general estos procesos se producen a través de la absorción de radiación ionizante, ultravioleta, visible o térmica; o por reacciones redox tales como las de transferencia de electrones no enzimática, reacciones catalizadas por metales o procesos catalizados por enzimas^{20,21}.

Las reacciones en las que están implicados los radicales libres son fundamentales para el normal funcionamiento de un amplio espectro de procesos biológicos. Debido a la ubicuidad del oxígeno molecular en los organismos aeróbicos y su capacidad de aceptar fácilmente electrones, las especies reactivas del oxígeno en gran medida median las reacciones en las que se implica un radical libre a nivel celular.

En el organismo, las especies reactivas del oxígeno derivan de fuentes endógenas y exógenas:

Fuentes endógenas de especies reactivas del oxígeno

Los generados en los procesos biológicos intra y extracelulares normales y patológicos, en prácticamente todos los tejidos. Pueden producirse de forma exagerada e inadecuada, o en un medio en el que las defensas que normalmente protegen a los tejidos son insuficientes.

Transporte de electrónico a nivel de la mitocondria

El ATP se forma y consume continuamente. La fosforilación oxidativa es el proceso por el que se forma ATP. Cuando mediante una serie de transportadores (NADH-Q reductasa, citocromo reductasa y citocromo oxidasa) se transfieren electrones desde el NADH (nicotinamida adenindinucleótido reducido) o el FADH₂ (dinucleótido de flavina y adenina reducido) al oxígeno molecular, se libera una gran cantidad de energía. Ésta es la fuente principal de ATP en los organismos aeróbicos. La oxidación y la fosforilación son dos procesos asociados.

Por tanto, la cantidad de oxígeno reducido en la mitocondria depende de los requerimientos energéticos más que del oxígeno disponible. Está regulado de algún modo, por la relación ADP/ATP²².

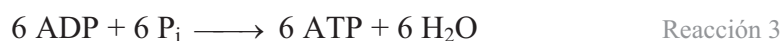
Aproximadamente el 95 % de todo el oxígeno consumido por las células de los mamíferos se metaboliza en la mitocondria, donde es reducido por 4 electrones, produciendo dos moléculas de agua sin formación de intermediarios tóxicos, mediante la vía de la reducción tetravalente, la cual está catalizada en última instancia por la citocromo oxidasa²³:



de manera simultánea el NADH es oxidado a NAD⁺ (nicotinamida adenindinucleótido),



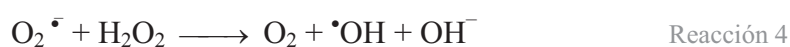
y se forman 6 moléculas de ATP a partir del ADP (adenosindifosfato) y P_i (ortofosfato)²²



Sin embargo, entre un 0,5 y un 2 % del oxígeno escapa de esta vía y sufre una reducción univalente^{15,24}. Como se ilustra en la figura 1, el oxígeno también puede ser reducido sucesivamente por un único electrón durante el metabolismo aeróbico normal y producir metabolitos reactivos del oxígeno parcialmente reducidos y altamente tóxicos, el anión superóxido (O₂^{•-}), el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y el radical hidroxilo (•OH)²⁴⁻²⁶. El porcentaje en la formación de radical superóxido, es directamente proporcional a la cantidad de oxígeno utilizado por la mitocondria²⁵.

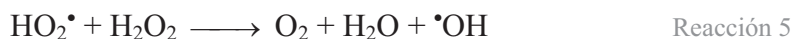
En el caso de las células hipóxicas, el predominio en los procesos de reducción de la cadena respiratoria, y acumulación celular de cofactores reducidos, puede aumentar la producción de radical superóxido por parte de los componentes del transporte electrónico^{14,27}.

Se puede producir radical hidroxilo por la interacción del radical superóxido con el peróxido de hidrógeno²⁸, es lo que se conoce como reacción de Haber-Weiss²⁹.



OH⁻, ion hidróxido.

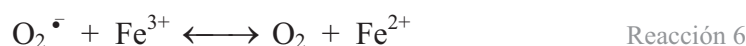
Aunque esta reseña bibliográfica (la 29) se ha utilizado en muchos casos para referenciar la reacción 4, no he encontrado en ella información específica sobre la misma. Haber y Weiss²⁹ lo que publican es que el dióxido de hidrógeno o radical hidroperoxilo, la forma protonada del radical superóxido (reacción 9, página 13), puede reaccionar con el peróxido de hidrógeno, produciéndose radical hidroxilo (reacción 5),



la cual según estos autores es una de las reacciones originales de Haber-Willstätter. Aunque lo más correcto sería tener en consideración todo esto, a lo largo del texto utilizaré, al igual que la mayoría de la bibliografía consultada, la denominación de reacción de Haber-Weiss.

Khan y Kasha³⁰ proponen que el radical hidroxilo no es la única especie reactiva del oxígeno producida en ésta reacción, y sustituyen el oxígeno molecular por el oxígeno singlete (¹O₂).

Se asume que la reacción de Haber-Weiss en solución acuosa, se produce a una velocidad demasiado lenta a bajas concentraciones de radical superóxido y peróxido de hidrógeno para tener una significación fisiológica, aunque termodinámicamente es posible³¹. La reacción se acelera por la presencia de metales de transición, algo que ya sugirieron Haber y Weiss²⁹, particularmente el hierro que actuaría como catalizador^{31,32}. Así, el radical superóxido reduce el hierro (reacción 6), el cual a su vez reduce el peróxido de hidrógeno para formar radical hidroxilo, es la reacción que describió Fenton en 1894 (reacción 7)³²⁻³⁴



Ya que normalmente la concentración de oxígeno es mayor que la de radical superóxido, esto favorece la reacción de oxidación del Fe²⁺ (reacción 6). Si la concentración intracelular de superóxido es mayor que la de oxígeno se reducirá el Fe³⁺ a Fe²⁺, favoreciéndose la reacción de Fenton³⁵.

Esta explicación ha sido criticada al considerar que otros agentes reductores, como el glutatión o el ácido ascórbico, presentes *in vivo* a mayores concentraciones que el superóxido, harían más probable la reducción a Fe³⁺ impidiendo la reacción de Fenton. Pero Rowley y Halliwell³⁶ muestran que los compuestos con radicales tiol, a concentraciones fisiológicas no previenen la formación de radical hidroxilo proveniente

de radical superóxido, en presencia de sales de hierro, sin embargo sí la previenen la superóxido dismutasa y la catalasa.

Koppenol³⁷ discute que la reacción de Haber-Weiss no se da en los medios biológicos en presencia de superóxido dismutasa, ya que ésta reacciona a una mayor velocidad de reacción específica (reacción 25, página 28) con el radical superóxido, de cómo reduce éste último al Fe^{3+} (reacción 6, $k^* = 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Sin embargo, en situaciones patológicas como la isquemia/reperfusión, en las que la formación de radical superóxido se incrementa, la de superóxido dismutasa se encuentra disminuida y funcionalmente desbordada, sí es factible que se produzca.

Por tanto, la reacción de Haber-Weiss catalizada por el sistema ferroso-férrico (o cuproso-cúprico), que pueden actuar como transportador de electrones, es una manera factible de crear radical hidroxilo en los sistemas biológicos dada la cantidad de compuestos ricos en hierro^{31,32,34}.

Sistemas de transporte electrónico a nivel del retículo endoplasmático y la membrana nuclear

Ambas membranas intracelulares contienen citocromos P450 y b5, los cuales por autooxidación pueden generar especies reactivas del oxígeno. La disociación de los complejos citocromo P450 puede formar peróxido de hidrógeno y otros productos intermedios peroxi. Por otro lado, pueden oxidar ácidos grasos insaturados, xenobióticos.

Sin embargo, es difícil evaluar la contribución de ambas membranas en la producción de radical superóxido y peróxido de hidrógeno en el conjunto de la producción celular.

Peroxisomas

A nivel celular, los peroxisomas son un lugar importante de producción de especies reactivas del oxígeno debido a su alta concentración en oxidasas³⁸.

Membrana plasmática

La membrana plasmática es un lugar crítico respecto a las reacciones de los radicales libres. Los generados extracelularmente deben atravesarla antes de reaccionar con otros componentes celulares, pudiendo iniciar su toxicidad en ésta.

* Constante de velocidad o velocidad de reacción específica.

Mención aparte merece la membrana plasmática de los fagocitos, la cual es una fuente importante de especies reactivas del oxígeno, debido a la presencia en la misma de la NADPH (nicotinamida adenindinucleótido fosfato reducido) oxidasa (ver más adelante).

Otra fuente potencial de especies reactivas del oxígeno es el metabolismo del ácido araquidónico. En la formación de prostaglandinas y leucotrienos se producen intermediarios peroxi, hidroperóxidos, radicales hidroxilo y radical superóxido³⁹⁻⁴².

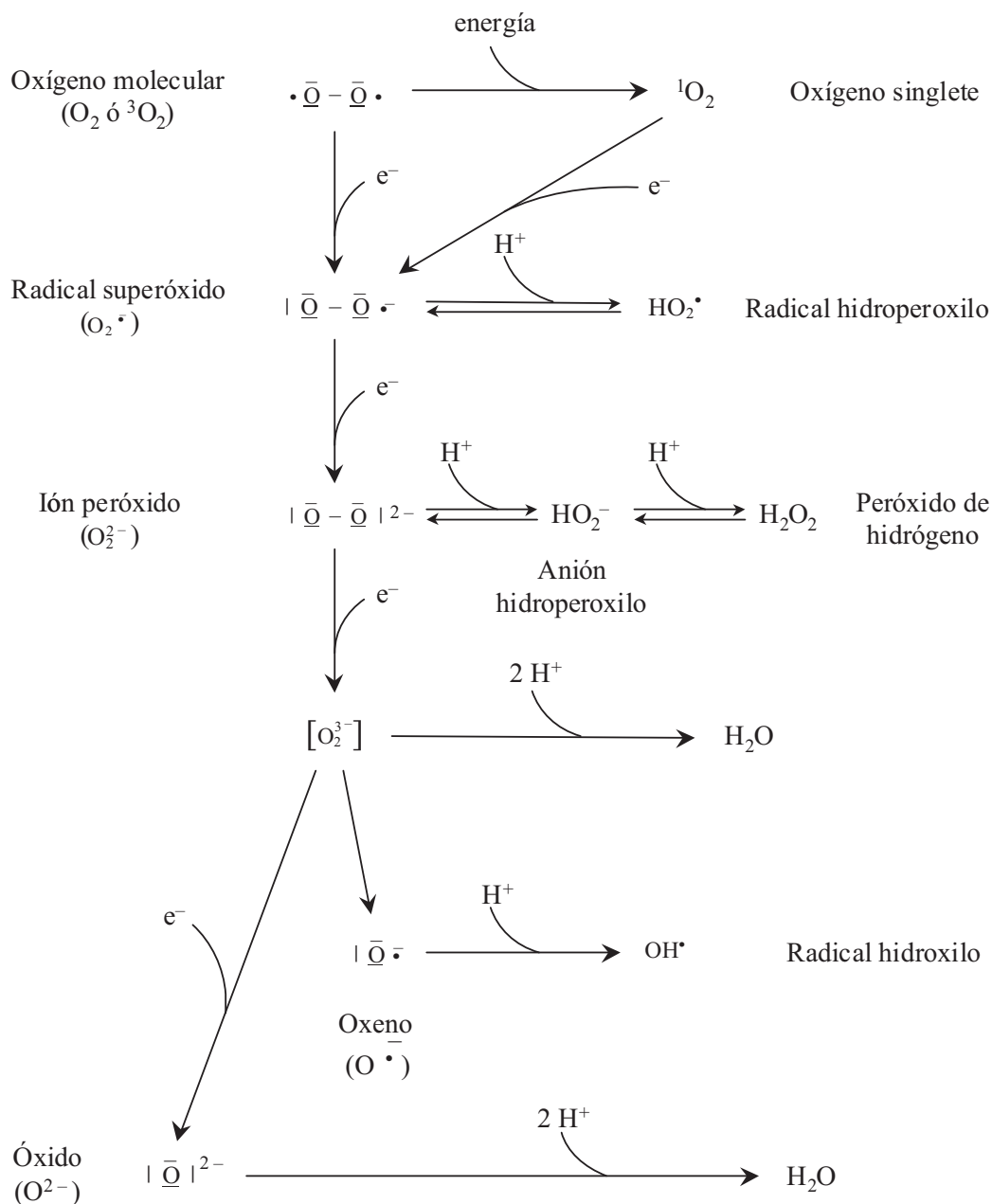


Figura 1. Reducción univalente del oxígeno. Se muestran las especies químicas derivadas de la reducción sucesiva, mediante un electrón, del oxígeno molecular. $[O_2^{3-}]$ es un elemento hipotético tras la reducción del oxígeno con tres electrones, se puede considerar el precursor del óxido y del oxeno. Modificado de Bast y cols.⁸, Green y Hill⁷ y Fridovich⁴³.

La ciclooxigenasa es también capaz de metabolizar xenobióticos a especies más tóxicas.

Otros

Numerosas enzimas generan especies reactivas del oxígeno durante su ciclo catalítico. La xantina oxidasa, enzima responsable de la conversión de hipoxantina en ácido úrico, es una fuente importante de radical superóxido^{44,45}, y probablemente la más estudiada. Su amplia distribución le confiere un importante papel en situaciones patológicas como la lesión por isquemia/reperfusión⁴⁶⁻⁵¹ (figura 4, página 65).

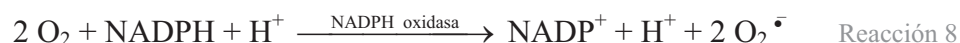
La aldehído oxidasa, estructuralmente similar a la xantina oxidasa, también genera radical superóxido. Las enzimas dihidroorotato deshidrogenasa, flavoprotein deshidrogenasa y la triptófano dioxigenasa, también utilizan el radical superóxido durante su ciclo catalítico^{2,14}.

Se produce radical superóxido por “accidentes químicos” (autooxidaciones), en que muchas moléculas del organismo reaccionan directamente con el oxígeno, por ejemplo en el caso de las catecolaminas, hemoglobina, mioglobina, tetrahidrofolatos, tioles, hidroquinonas, diversas cadenas de transporte electrónico, etc^{2,14,52,53}.

Las producidas por células inflamatorias^{54,55}

Sacando provecho de su agresividad química, las especies reactivas del oxígeno han sido incorporadas a ciertos mecanismos defensivos para la destrucción de bacterias o agentes extraños⁵⁶. Producidas durante la actividad fagocítica, en los procesos inflamatorios agudos y crónicos, son esenciales para la defensa contra la invasión microbiana^{57,58}.

La estimulación de los receptores de la membrana de los fagocitos por el complemento, endotoxinas, leucotrieno B₄, inmunocomplejos y factor activador de las plaquetas, activan la NADPH oxidasa que se encuentra en la membrana leucocitaria, la cual reduce el oxígeno molecular exclusivamente, generando grandes cantidades de radical superóxido⁵⁹⁻⁶¹. Este enzima cataliza la transferencia de electrones desde el NADPH (producto de la vía de las hexosas fosfato) al oxígeno molecular. Normalmente la NADPH oxidasa se encuentra en estado latente⁶¹.



Además, los leucocitos activados producen especies reactivas del oxígeno a través del metabolismo de ácido araquidónico en la vía de la ciclooxigenasa⁴¹.

En el llamado “estallido respiratorio o explosión oxidativa” (*respiratory burst*^{*}) se producen especies reactivas del oxígeno: radical superóxido, peróxido de hidrógeno, ácido hipocloroso, radical hidroxilo^{55,59}. Desgraciadamente, la formación de estas durante el ataque a los microorganismos, puede también dañar los tejidos del huésped.

Fuentes exógenas de especies reactivas del oxígeno

Los secundarios a agentes antineoplásicos como los antibióticos antraciclinas y otros antibióticos que dependen por ejemplo de la unión con metales para su actividad. Muchos de los efectos quimioterápicos y efectos colaterales citotóxicos de estos fármacos, se han atribuido a su capacidad para reducir el oxígeno a especies reactivas del oxígeno.

Los secundarios a influencias externas, tales como la irradiación de los organismos con radiaciones electromagnéticas (rayos X y γ), particularmente la radiación ionizante, la cual daña los tejidos por causar fisión del enlace del agua produciendo átomos de hidrógeno, electrones hidratados y radicales hidroxilo. En presencia de oxígeno además originará radical superóxido y peróxido de hidrógeno. La luz a longitudes de onda determinadas puede causar fotólisis de los enlaces químicos y producir radicales libres. Los ultrasonidos pueden producir unos efectos semejantes⁶².

Además, una amplia variedad de agentes ambientales incluyendo la hiperoxia, los polucionantes del aire (ozono y óxidos del nitrógeno y del azufre), algunos herbicidas e insecticidas, humo del tabaco, aditivos alimentarios, disolventes y el amplio grupo de los hidrocarburos aromáticos, etc., también pueden causar daño celular mediado por radicales libres.

Estos xenobióticos o ya son un radical libre, o son convertidos por el metabolismo intracelular y procesos de detoxificación.

Tipos de especies reactivas del oxígeno^{3,34,63-66}

Como se ha comentado previamente, el término especies reactivas de oxígeno se utiliza para designar de modo colectivo tanto los radicales de oxígeno (superóxido, hidroxilo)

* Recibe este nombre porque se describió primero como un aumento súbito en el consumo de oxígeno pocos segundos después de la interacción de la célula con el agente estimulante.

como las especies no radicales, que se comportan como oxidantes, particularmente el peróxido de hidrógeno, el oxígeno molecular "singlete" y el ácido hipocloroso.

Radicales libres del oxígeno

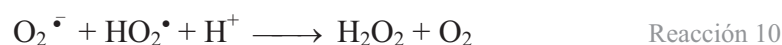
Radical superóxido o dióxido(1-) ($O_2^{\bullet-}$)^{2,15,52}

Aunque la denominación más correcta es la de dióxido(1-), utilizaremos a lo largo del texto, al igual que la mayoría de la bibliografía consultada, la denominación también permitida de superóxido¹³.

El anión superóxido es la base conjugada de un ácido débil, el radical hidroperoxilo (HO_2^{\bullet}), con el cual se equilibra. Ya que el pK_a para la reacción de disociación es 4.88, hay poco radical hidroperoxilo a valores fisiológicos de pH³¹. Sin embargo, a pH bajos la concentración de radical hidroperoxilo puede aumentar extraordinariamente (ej. tejidos isquémicos, superficie de los macrófagos activados, ...) ^{34,65}.



Ambos pueden reaccionar produciéndose la siguiente reacción de dismutación, originando peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno ($k^* = 8 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)³¹.



Es el único radical a partir del cual se pueden formar la mayoría de las especies reactivas del oxígeno (reacciones 4, 9, 10, 11 y figura 1). Se encuentra en estado reducido por la ganancia de un electrón ($\bullet \bar{O} - \bar{O} \bullet^-$), resultado de la reducción univalente del oxígeno molecular.

Puede dismutar espontáneamente produciendo peróxido de hidrógeno y oxígeno, aunque esta reacción es más lenta ($k \approx 2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)⁶⁴ que la dismutación observada en la reacción 10, probablemente debida a la repulsión electrostática³¹.



Así la dismutación es más rápida a valores de pH ácido, necesarios para protonar el radical superóxido más rápidamente, que a pH fisiológico. Según Fridovich^{2,52} a pH 7.8

* Constante de velocidad o velocidad de reacción específica.

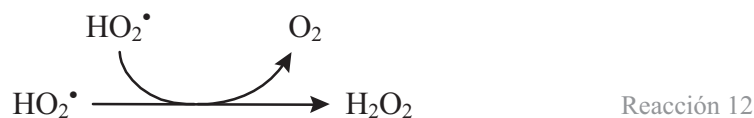
en un medio acuoso, la dismutación espontánea se produce a velocidad constante de $8 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Actúa fundamentalmente como un agente reductor donando su electrón extra. También lo puede hacer como agente oxidante, aunque de manera más pobre, en cuyo caso es reducido a peróxido de hidrógeno. Su reactividad química es alta en solventes orgánicos, aunque es poco reactivo en soluciones acuosas, lo que le permite difundir lejos de su lugar de formación, reaccionando con otras estructuras dentro de la célula, comprometiendo el funcionalismo de la misma. El producido extracelularmente es capaz de entrar en las células a través de los canales aniónicos transmembrana¹⁴. Ataca a moléculas como el ADN, fosfolípidos de la membrana, polisacáridos, tioles y aminas. Aunque se piensa que la mayoría de sus efectos dañinos derivan de su capacidad para generar radicales altamente tóxicos como el radical hidroxilo⁶⁵, también se le ha implicado en el inicio y en la terminación de la peroxidación lipídica⁶⁷.

Radical hidroperoxilo o dióxido de hidrógeno (HO_2^\bullet)^{2,52}

Aunque la denominación más correcta es la de dióxido de hidrógeno, utilizaremos a lo largo del texto, al igual que la mayoría de la bibliografía consultada, la denominación también permitida de hidroperoxilo¹³.

Es la forma protonada del radical superóxido, más liposoluble. Puede reaccionar espontáneamente con otro radical hidroperoxilo originando peróxido de hidrógeno ($k = 8 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)³¹:



Es un oxidante mucho más potente que el radical superóxido y su vida media es mayor. Tiene un papel más importante de lo que se pensaba en la lesión oxidativa y posee la capacidad de iniciar la peroxidación lipídica así como la oxidación de una amplia cantidad de compuestos biológicos^{21,65}. Sin embargo, también ha sido implicado en las reacciones de terminación de la peroxidación lipídica⁶⁸.

Radical hidroxilo o monóxido de hidrógeno ($^\bullet\text{OH}$)

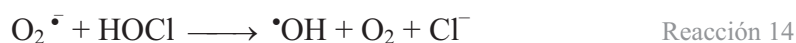
Aunque la denominación más correcta es la de monóxido de hidrógeno, utilizaremos a lo largo del texto, al igual que la mayoría de la bibliografía consultada, la denominación también permitida de hidroxilo¹³.

Estado reducido del oxígeno molecular por la ganancia de tres electrones (figura 1). Se genera también en las reacciones de Haber-Weiss o en la de Fenton (reacciones 4, 5 y 7, páginas 7 y 8).

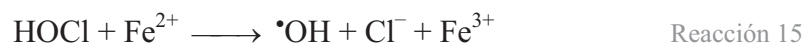
La radiación ionizante puede producir radical hidroxilo por la rotura del enlace covalente entre el oxígeno y un hidrógeno de una molécula de agua, reacción en la que también se generan electrones hidratados (e_{aq}^-) y otro oxidante, el radical hidrógeno (H^\bullet)¹.



Otros mecanismos por los que se puede formar radical hidroxilo *in vivo*, independiente de iones metálicos, implican en un caso al ácido peroxinitroso^{69,70} (reacción 43, página 49), aunque esta reacción ha sido puesta en duda^{37,71}. Otro caso es la interacción entre el radical superóxido y el ácido hipocloroso (HOCl), producidos ambos por los neutrófilos activados^{35,72}.



En presencia de hierro ferroso el ácido hipocloroso también puede producir radical hidroxilo³⁵.

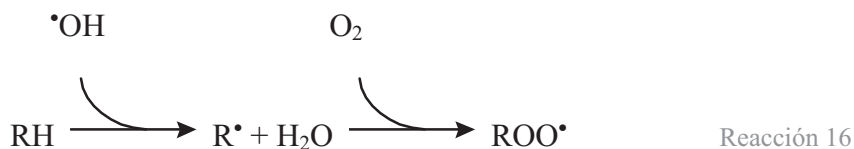


Es el oxidante más potente de los sistemas biológicos, el radical libre del oxígeno más reactivo que se conoce. Debido a ello su capacidad de difusión es mínima, reaccionando allí donde se produce^{3,34,65}. Se combina rápidamente con moléculas de su alrededor, cede o capta electrones, poniendo en marcha reacciones en cadena⁹. Su vida media es extremadamente corta (a 37 °C, 1×10^{-9} segundos). El radical superóxido y el peróxido de hidrógeno son menos reactivos, pueden difundir ciertas distancias desde su lugar de formación, generando radical hidroxilo cuando se encuentran con metales de transición. Reacciona con todas las moléculas biológicas conocidas, y muy relevante es el daño que produce en el ADN en el que induce mutaciones, en las enzimas a las que inactiva, y en las membranas en las que desencadena la peroxidación lipídica.

En el organismo no existen sistemas de defensa directos para neutralizar al radical hidroxilo.

Radicales secundarios a la lesión tisular*Radical peroxilo (ROO•)*

Lo más característico es su formación en la peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados (RH). (R•: radical alquilo)^{65,73}.



Relativa baja capacidad oxidante y una menor reactividad en relación con el radical hidroxilo, su vida media es mayor (a 37 °C, 1×10^{-2} segundos), lo que le confiere una mayor capacidad de difusión en los sistemas biológicos.

Puede captar un átomo de hidrógeno de un lípido produciendo una reacción en cadena (ROOH: hidroperóxido lipídico).



Los radicales peroxilo también iniciarán la oxidación de proteínas, carbohidratos, etc.

Radical alcóxido (RO•)

El radical superóxido puede reaccionar con los hidroperóxidos lipídicos y formar radicales alcóxido. Es por tanto, un radical orgánico. Su reactividad con los lípidos es intermedia entre el radical peroxilo y el hidroxilo (vida media a 37 °C, 1×10^{-6} segundos).

Óxidos de nitrógeno

En esta categoría se incluyen radicales como el óxido nítrico (NO•), al cual dedicamos un capítulo aparte, y el dióxido de nitrógeno (NO₂•).

Especies reactivas de oxígeno no radicales libres*Peróxido de hidrógeno (H₂O₂)*

El estado reducido del oxígeno molecular por la ganancia de dos electrones da ion peróxido (figura 1, página 10). Éste no es un radical libre ya que no posee electrones

desapareados. Todo ion peróxido formado, a pH fisiológico se protonará inmediatamente a peróxido de hidrógeno ($\text{H} : \bar{\text{O}} - \bar{\text{O}} : \text{H}$), ya que su $\text{p}K_a$ es muy alto. Muchos enzimas como la urato oxidasa o la glucosa oxidasa la producen por este mecanismo. La dismutación del radical superóxido, ya sea de manera espontánea (reacción 11, página 13) o catalizada por la superóxido dismutasa (reacción 25, página 28), es la fuente más importante de peróxido de hidrógeno. La reacción no catalizada entre dos radicales hidroperoxilo (reacción 12, página 14), y entre los radicales superóxido e hidroperoxilo (reacción 10, página 13), también lo producen.

El peróxido de hidrógeno es un oxidante y reductor débil, por ello es relativamente estable y poco reactivo en ausencia de iones metálicos. Por sí mismo oxida lentamente la mayoría de las moléculas orgánicas en un medio acuoso, esencialmente los grupos sulfhidrilo. No obstante, puede ser muy tóxico para las células, ya que reaccionando con el radical superóxido (reacción de Haber-Weiss, página 7 la reacción 4), o no (reacción de Fenton, página 8 la reacción 7), en presencia de iones de hierro o de cobre, que actúan como catalizadores, forman radicales altamente reactivos, como el radical hidroxilo³³.

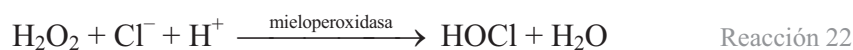
El peróxido de hidrógeno es además sustrato de la enzima mieloperoxidasa que cataliza una reacción en la cual se produce un producto altamente oxidante como el ácido hipocloroso (reacción 22, página 19).

Se mezcla muy bien con el agua y es tratado por el organismo como a la misma, lo que le proporciona una gran capacidad de difusión, atravesando con relativa facilidad las membranas. La base de esto reside en su estado no ionizado y de poca carga^{14,64}.

Oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$)

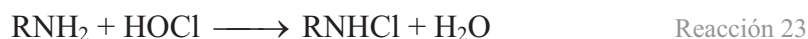
Como se ha comentado, el oxígeno molecular posee dos electrones desapareados. En su estado fundamental ($^3\Sigma_g^-, ^3\text{O}_2$) es un triplete con giros paralelos.

El oxígeno molecular puede absorber una determinada cantidad de energía (mínimo 23 kcal/mol), con lo que uno de sus electrones desapareados salta a un orbital de mayor energía e invierte su giro. Aunque esto no lo convierte en un radical, es una forma reactiva del oxígeno en la que se ha eliminado la restricción cinética que supone tener dos electrones desapareados con giros paralelos, incrementándose su capacidad oxidante. Es lo que se denomina oxígeno singlete, del que existen dos formas. El más importante en biología es la forma delta ($^1\Delta_g$) la cual tiene dos electrones apareados ocupando el mismo orbital, con el otro orbital vacío:

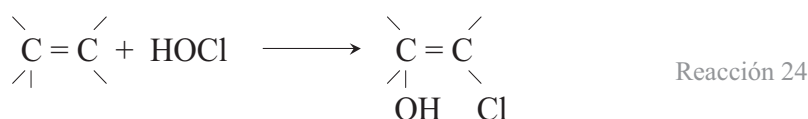


El ácido hipocloroso es un agente antibacteriano muy potente. Actúa a bajas concentraciones dañando las proteínas de membrana (al oxidar sus grupos sulfhidrilo) e impidiendo su función, mientras que a altas concentraciones las células sufren lisis por daño oxidativo generalizado (potenciales dianas son las aminas, aminoácidos, tioles, nucleótidos, hemoproteínas, ...). También puede producir una modificación oxidativa de la superóxido dismutasa, perdiendo ésta su actividad⁷⁶.

Reacciona especialmente rápido con ciertas aminas primarias para producir N-cloraminas (RNHCl). Son potentes oxidantes, aunque menos tóxicas que el ácido hipocloroso, varía en función de su lipofilia.



El ácido hipocloroso actuando en los dobles enlaces de ácidos grasos formará clorohidrinás⁷⁷.



Acciones de las especies reactivas del oxígeno^{16,21,78-80}

Hace cinco o seis décadas, se creía que los radicales libres eran tan reactivos y tan poco selectivos, que no podían estar implicados en los procesos bioquímicos normales. En esos tiempos, las publicaciones sobre la biología del radical libre casi siempre se limitaron a situaciones patológicas en las que se producían altas concentraciones de radicales tras la exposición a agentes externos, tales como la radiación de alta energía o sustancias tóxicas.

Sin embargo, hoy sabemos que no todas las acciones de los oxidantes tienen consecuencias perniciosas, y no todas las acciones de los antioxidantes tienen consecuencias beneficiosas. Vivimos en un mundo basado en reacciones redox, donde la oxidación y la reducción forman la base de nuestra capacidad de alimentar las reacciones de las que depende nuestra vida. Debido a que nuestras células están repletas de

sustancias reductoras y oxidantes, debemos minimizar reacciones no deseadas mediante barreras cinéticas o compartimentación física. En caso de enfermedad o lesión celular, se pueden violar estas barreras⁸¹.

El oxígeno es la “fuente de la vida evolucionada” y, paradójicamente, también es un agente lesivo de gran importancia por ser la fuente más abundante de especies reactivas. Por lo tanto, las especies reactivas del oxígeno tienen una doble acción en los organismos vivos:

1) Beneficiosa. Participando en la defensa frente a las infecciones^{56,58,59}, fagocitosis e inflamación, generando potentes quimiotácticos y activadores de los neutrófilos, formando parte del metabolismo normal, particularmente en la respiración mitocondrial, detoxificación microsomal (inducción enzimática de muchos fármacos como los barbitúricos, etc.), regulación del tono del músculo liso, síntesis de eicosanoides, regulación de la permeabilidad y tono vascular, etc.

Las especies reactivas del oxígeno son moléculas que se producen con gran rapidez, muy reactivas, y tienen una vida muy corta (de nanosegundos a segundos) con un radio de difusión muy pequeño (de ángstroms a micras). Están bien preparados para desempeñar el papel de segundos mensajeros en los sistemas rápidos de señalización celular que no requieren la síntesis de proteínas. Se sabe que las especies reactivas del oxígeno actúan como moléculas transmisoras de señales en varios tipos celulares, participando y modificando eventos fisiológicos relacionados con la unión ligando – receptor y activación transcripcional. Regulan o participan en el crecimiento, apoptosis, y en la respuesta adaptativa a la lesión o el estrés⁵¹.

2) Dañina. Producidos en exceso lesionan estructuras y ocasionan daño tisular.

Las especies reactivas del oxígeno se hallan a muy baja concentración en los seres vivos, y son tan inestables que apenas existen como tales durante poquísimos tiempo. Ya se ha comentado que su radio de acción es muy reducido, y a no ser que tengan una gran capacidad de difusión, acostumbran a agredir a las moléculas que tienen a su alrededor, al ser éstas las primeras con las que entran en contacto. Por ello las lesiones que producen las especies reactivas del oxígeno tienden a compartimentarse. Pero, aunque estas inicialmente producen únicamente efectos locales, las especies reactivas secundarias a ellas y a la degradación de productos producidos en las reacciones en las que se encuentran implicados, pueden tener efectos distantes al lugar donde se formaron.

Los mecanismos por los que las especies reactivas del oxígeno producen lesión celular son complejos. Por su avidez en aceptar electrones, pueden actuar sobre cualquier

molécula: ácidos nucleicos, proteínas (incluidos todos los enzimas), fosfolípidos (sobre todo los poliinsaturados presentes en las membranas de las células) y los carbohidratos. La reacción inicial genera un segundo radical, el cual puede entonces reaccionar con otras moléculas provocando reacciones en cadena. Debido a que éstas son reacciones químicas espontáneas, las leyes de la termodinámica exigen que la ganancia energética al formarse un nuevo enlace molecular, ha de ser mayor que la energía de disociación del antiguo enlace (el radical que se ha formado ha de ser más estable que el antiguo). Una consecuencia de la formación de radicales más y más estables es que la progresión de la reacción en cadena se orienta cada vez más a enlaces “susceptibles”, que requieran poca energía para ser disociados. Esto quiere decir que las especies reactivas del oxígeno tienen preferencia por producir alteraciones en unas determinadas moléculas.

La interacción de las especies reactivas del oxígeno con estas moléculas producirá una modificación estructural, que se traducirá en última instancia en una alteración funcional, como alteraciones en la defensa tisular, o en la interacciones entre las células, inactivación de factores metabólicos esenciales como las pirimidinas (NADPH, NADH), etc.

Lo malo no es que se generen especies reactivas en el organismo, fenómeno que ocurre constantemente en situaciones normales, sino que exista un desequilibrio entre su producción y su eliminación, que es lo que determina que aparezca o no enfermedad. A este efecto que producen las especies reactivas del oxígeno en los organismos vivos se ha denominado *estrés oxidativo* y no depende sólo de la agresividad química, sino también de la cantidad de éstos y del tiempo de exposición, así como del tipo de tejido que sufra el efecto, y de la eficacia de las defensas antioxidantes disponibles. Por tanto, para mantener la homeostasis se requiere una regeneración continua de la capacidad antioxidante.

Se pueden lesionar diversos tipos de estructuras diana, lo cual depende de la naturaleza del agente reactivo y de su lugar de generación. Como se apuntó previamente, una de las características de las especies reactivas del oxígeno es la tendencia a generar reacciones en cadena, o sea la lesión de unas moléculas puede originar la de otras, lo cual da como resultado una ampliación en el efecto lesivo final.

Acciones sobre los lípidos^{3,34,66}

Los lípidos de las membranas celulares contienen grandes cantidades de ácidos grasos poliinsaturados, ricos en grupos alquilo y cicloalquilo, los cuales son susceptibles de sufrir lesión oxidativa, durante la cual se pueden distinguir 3 fases: inicio, propagación y terminación.

Las especies reactivas del oxígeno derivadas de la xantina oxidasa pueden iniciar la peroxidación lipídica: el radical superóxido y peróxido de hidrógeno, y especies derivadas de los anteriores, oxígeno singlete, radicales hidroperoxilo e hidroxilo^{21,75}. Al radical superóxido e hidroperoxilo se les ha implicado tanto en el inicio, como en la terminación^{67,68}.

El proceso se inicia cuando una especie reactiva del oxígeno con suficiente reactividad, capta un átomo de hidrógeno de un grupo metileno, dejando un electrón desapareado en un carbono de las cadenas laterales de los fosfolípidos de las membranas, las cuales se fragmentan justamente por el carbono que se ha transformado en radical libre. Con ello las estructuras fosfolipídicas de las membranas se desorganizan y destruyen, afectando además de a la pared celular, las membranas citosólicas (mitocondrias, núcleo, etc.), con la consiguiente pérdida de su funcionamiento y eventual ruptura, liberándose el contenido de las organelas y de la misma célula. La liberación de enzimas lisosómicos puede además potenciar en daño celular inducido por las especies reactivas del oxígeno.

Durante la propagación, una serie de reacciones en cadena van produciendo sustancias tóxicas, que por sí mismas pueden capturar un átomo de hidrógeno de un ácido graso como el radical alcoxilo, radical peroxilo y productos α , β aldehídos insaturados, como el malondialdehído, y el citotóxico y mutagénico 4-hidroxinonenal, principal producto de la peroxidación lipídica (provenientes de los hidroperóxidos lipídicos formados en la reducción de los radicales peroxilo, junto con los gases hidrocarburos etano y pentano), el cual a su vez puede lesionar por su tendencia a reaccionar con grupos sulfhidrilo las proteínas de membrana, inactivando receptores, transportadores y enzimas (ver más adelante)^{82,83}. Un exceso de hidroperóxidos, por sí mismo ya interfiere en el funcionalismo de la membrana.

La presencia de metales de transición como el hierro o el cobre pueden catalizar la formación de compuestos iniciadores y acelerar la peroxidación lipídica. También se ha sugerido que durante la degradación de los compuestos derivados de la peroxidación lipídica se forma oxígeno singlete, el cual puede contribuir a la reacción en cadena.

Estas reacciones de propagación pueden continuar indefinidamente o pueden terminar por la intervención de un grupo de sustancias eliminadoras de radicales libres, algunas de las cuales son esenciales para la integridad celular, y pueden caer bajo la categoría general de defensas antioxidantes. Otros como el radical hidroperoxilo son radicales libres⁶⁸.

Acciones sobre las proteínas⁸⁴⁻⁸⁸

La susceptibilidad de las proteínas a la acción de las especies reactivas del oxígeno depende de los aminoácidos que la componen, la importancia y localización de los aminoácidos susceptibles que median la conformación y actividad de la proteína, y si el daño puede ser reparado. La localización celular de la proteína y la naturaleza de la amenaza también influye en la magnitud del daño.

Los aminoácidos, péptidos y moléculas de proteína, son susceptibles de sufrir el ataque de las especies reactivas del oxígeno oxidando sus grupos sulfhidrilo. Además de la alteración de las cadenas laterales de los aminoácidos, pueden producirse una serie de cambios físicos como la fragmentación de las cadenas polipeptídicas, agregación de las proteínas mediante enlaces cruzados (*cross linking*) covalente y no covalentemente a nivel tanto intra como intermolecular, y alteración de su conformación espacial que las hace muy susceptibles a la degradación proteolítica. Estos procesos oxidativos pueden estar catalizados por metales de transición. Además, la reacción de las especies reactivas del oxígeno con las proteínas también puede generar derivados que amplificarían el daño de la reacción inicial.

Los mecanismos de reparación directa son limitados. Como consecuencia de todo ello se produce una alteración de su funcionalismo.

Acciones sobre los hidratos de carbono

La producción de ATP está afectada en las dos rutas: glucolítica y oxidativa⁸⁹. Además la autooxidación de la glucosa puede generar radicales libres. Paralelamente la glucosa se puede unir a las proteínas en el grupo amino terminal iniciando la glicación de las mismas dando productos altamente reactivos (productos de Amadori, de Maillard,...)⁹⁰.

Tanto la autooxidación como la glicación de proteínas son reacciones extremadamente lentas (requieren días o semanas) y son responsables en gran medida de las interacciones glucosa – proteína, interacciones muy importantes pues la formación y detoxificación de las especies reactivas del oxígeno están moduladas por enzimas (superóxido dismutasa, catalasa, ...), disminuyendo la acción de éstas y exagerando los efectos de aquellas.

Acciones sobre el ADN^{74,89,91}

Las especies reactivas del oxígeno, por adición o abstracción, pueden producir alteraciones estructurales en el ADN, como la rotura de una o de las dos hebras y la alteración de las bases que la componen, produciendo la muerte celular y mutaciones. El peróxido de hidrógeno por su gran capacidad de difusión accedería al ADN, dañándolo

directa o indirectamente a través de la formación de radical hidroxilo vía reacción de Fenton. En particular, el radical hidroxilo es capaz de fijarse con extraordinaria avidez sobre todo a la timina y la citosina, alterando su estructura y rompiendo las hebras de ADN. De una manera más específica lo hace el oxígeno singlete fijándose sobre los residuos de guanina produciendo el elemento mutagénico 8-hidroxiguanina. Esto conlleva una replicación defectuosa.

Resumiendo, los radicales libres *per se* y los productos de lipoperoxidación lipídica, por medio de enlaces cruzados (*cross linking*) desnaturalizan lípidos, proteínas, azúcares y ácidos nucleicos, causando pérdida de su función.

Todos los componentes celulares son capaces de reaccionar con las especies reactivas del oxígeno. La modificación química de estas moléculas produce alteraciones metabólicas y estructurales de las células, a las cuales en última instancia causan la muerte. Sin pretender ser exhaustiva, la siguiente tabla muestra algunas de las consecuencias derivadas de la acción nociva de las especies reactivas del oxígeno.

Tabla 1

Componente atacado	Consecuencia
<i>“Pequeñas moléculas”</i>	
Aminoácidos	Desnaturalización de las proteínas y enlaces cruzados (<i>cross linking</i>), inhibición enzimática.
Bases del ácido nucleico	Cambios en el ciclo celular, mutaciones.
Carbohidratos	Cambios en los receptores de la superficie celular.
Lípidos insaturados	Oxidación del colesterol y ácidos grasos. Enlaces cruzados. Cambios en la permeabilidad de las membranas de las organelas y de la célula.
Cofactores	Disminución en la disponibilidad y actividad de la nicotinamida y cofactores que contienen flavina.
Neurotransmisores	Disminución en la disponibilidad y actividad de neurotransmisores como serotonina y epinefrina.
Antioxidantes	Disminución en la disponibilidad, como el α -tocoferol y el β -caroteno.
<i>Macromoléculas</i>	
Proteínas	Escisión de las cadenas peptídicas, desnaturalización.
ADN	Escisión de las hebras, modificaciones en las bases.
Ácido hialurónico	Cambios en la viscosidad del líquido sinovial.

Debido al potencial dañino de las especies reactivas del oxígeno, las células dependen de unos elaborados mecanismos defensivos, descritos en el siguiente capítulo, que las metabolizan rápidamente previniendo una lesión significativa.

Sistema defensivo antioxidante^{8,9,11,18,64,66,92-97}

Una gran cantidad de especies vivas dependen del oxígeno molecular, sin embargo todos los tipos celulares son susceptibles a su toxicidad, la cual está relacionada con las especies reactivas del oxígeno. Por todo ello, es obvio que la primera y mejor defensa es evitar la generación de las mismas. Por ejemplo, la mayor parte del oxígeno que se consume en la respiración celular lo utiliza el sistema de la citocromo oxidasa, el cual lleva a cabo una reducción tetravalente del mismo hasta agua sin producir intermediarios reactivos²³ (reacción 1, página 7).

Sin embargo, las especies reactivas del oxígeno se producen continuamente como productos metabólicos en prácticamente todos los tejidos de los organismos aeróbicos en unas cantidades relativamente pequeñas, y presumiblemente en mayor cantidad en un gran número de situaciones patológicas^{9,11,18,73,91,98-103}. Sin una adecuada protección, las células y los tejidos sufrirían continuamente un daño oxidativo significativo.

A menudo el término eliminador (*scavenger*) y antioxidante se utilizan como sinónimos de manera incorrecta, para describir sustancias que descompondrán o inactivarán radicales libres y oxidantes. De hecho el término antioxidante es una amplia descripción de numerosas sustancias de las cuales los eliminadores representan sólo una categoría.

Un antioxidante se define como cualquier sustancia que, cuando está presente a concentraciones bajas en comparación con las del sustrato oxidable, retrasa o previene significativamente la oxidación de dicho sustrato^{66,92}. El término "sustrato oxidable" incluye casi todo lo que se encuentra en las células vivas, como proteínas, lípidos, carbohidratos, ADN, etc. Cada antioxidante actúa de una manera diferente.

Un eliminador de radicales libres, es una sustancia que donará un electrón a un radical libre inactivándolo, de esta interacción surgirá una especie radical del eliminador, la cual generalmente tiene poca reactividad y por lo tanto es poco dañina. Sin embargo, la interacción de algunos eliminadores con radicales libres producirá especies radicales bastante reactivas que pueden inactivar enzimas y promover la lesión oxidativa⁹².

Se ha desarrollado un importante sistema defensivo antioxidante, de prevención en la generación, intercepción una vez formados y reparación del daño oxidativo o eliminación de las moléculas dañadas; formado por eliminadores y neutralizadores no enzimáticos, así como sistemas enzimáticos. Las especies reactivas del oxígeno se pueden producir tanto en los medios acuosos como lipídicos, y para minimizar sus efectos dañinos existen antioxidantes hidro y liposolubles. El que existan tantos sistemas antioxidantes intra y extracelulares, y el que estén tan distribuidos en los seres vivos refleja la enorme importancia de estar a salvo de la oxidación. La regulación de la producción de antioxidantes biológicos está en última instancia bajo control genético, aunque parece que los fenómenos adaptativos (a influencias ambientales) también pueden ser importantes.

Las especies reactivas del oxígeno pueden ser eliminadas mediante sistemas enzimáticos y un sistema no enzimático de pequeñas moléculas. Es lo que se ha denominado *defensas primarias contra el daño oxidativo*. Como regla general la mayor concentración de antioxidantes enzimáticos es intracelular, mientras que la mayor concentración de la mayoría de los antioxidantes no enzimáticos se encuentra en el líquido extracelular. A su vez, los niveles de tanto un tipo de antioxidantes como del otro, varían extraordinariamente de un tejido a otro. Ya que las defensas antioxidantes no pueden ser completamente efectivas en todo momento, se ha desarrollado un sistema de enzimas reparadores que se encarga de eliminar las moléculas dañadas por las especies reactivas del oxígeno. Es lo que se ha denominado *defensas secundarias contra el daño oxidativo*. De manera que todo ello en su conjunto constituye un sistema perfectamente integrado que contrarresta el estrés oxidativo provocado por las especies reactivas del oxígeno.

Defensas primarias

Antioxidantes enzimáticos

A grandes rasgos se caracterizan por utilizar iones metálicos (hierro, cobre, zinc, manganeso y selenio) como elementos catalíticos esenciales.

Superóxido dismutasa (SOD)

El conocimiento de la producción biológica de radical superóxido, y por ende la existencia de la superóxido dismutasa, data de más de tres décadas^{44,104}.

La ubicuidad de este enzima en los organismos aeróbicos sugiere que constituye una importante defensa frente a la toxicidad del oxígeno. Sin embargo, aunque uno esperaría

encontrar superóxido dismutasa en todos los organismos que toleran el oxígeno, se han encontrado algunas excepciones (*Lactobacillus plantarum*, *Micoplasma pneumoniae*, y una difundida cepa de *Neisseria*) a las que les falta este enzima⁵². Por el contrario se halla en algunos anaerobios que lo toleran y en otros que no⁴³.

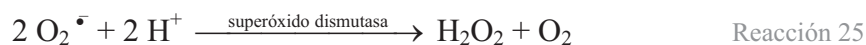
Existen diferentes isoformas de esta metaloenzima, diferenciándose en su estructura y según contenga uno u otro ion metálico en su centro activo, separándose en dos clases filogenéticas dependiendo de la similitud en la secuencia de aminoácidos, pero todas ellas catalizan la misma reacción química (reacción 25) con una eficacia comparable^{43,52}. Incluye enzimas localizadas en organelas, compartimentos subcelulares, y en pequeñas cantidades en líquidos extracelulares.

Excluyendo algunas excepciones^{2,52}, las diferentes superóxido dismutasas se distribuyen en las células eucariotas. La Cu,Zn-SOD de origen eucariota, aunque habitualmente se la describe como un enzima citoplasmático, también se ha localizado en el espacio intermembrana en la mitocondria¹⁰⁵, en el núcleo, lisosomas y en los peroxisomas³⁸; y la Mn-SOD de origen procariota, si bien se localiza esencialmente en la matriz mitocondrial, también se encuentra en el citosol, donde según Weisiger y Fridovich¹⁰⁵ tiene lugar su biosíntesis, siendo entonces transportada de alguna manera al interior de la mitocondria. La Cu,Zn-SOD se distribuye principalmente en los tejidos con gran actividad metabólica (hígado, riñón,...), y la Mn-SOD en aquellos que el proceso respiratorio es alto (hígado, riñón y miocardio). Es un patrón de distribución bastante constante entre los mamíferos¹⁰⁶. Existe otro tipo de superóxido dismutasa, estrechamente relacionada con la Mn-SOD que contiene hierro (Fe-SOD), de origen procariota, pero que sólo se encuentra en algunas especies de bacterias y plantas, junto o no, con la Mn-SOD^{2,43,52}. Otra es la superóxido dismutasa extracelular (EC-SOD), que también posee cobre y zinc, pero es muy diferente a la forma intracelular¹⁰⁷. Se secreta al plasma y líquido intersticial, donde es de lejos el isoenzima predominante. Sin embargo, de manera general a nivel tisular su presencia es menor aunque hay grandes diferencias entre especies¹⁰⁸. A diferencia de la Cu,Zn-SOD y la Mn-SOD, ésta muestra un patrón de distribución diferente, el cual no está relacionado con la actividad metabólica de los tejidos¹⁰⁶. En los mamíferos el 90-99 % de la EC-SOD se localiza en los tejidos, unida probablemente en su mayor parte a los proteoglicanos heparán sulfato en la superficie celular (principalmente del endotelio), en la membrana basal y en la matriz del tejido conectivo, lo cual determina la distribución y retención del enzima *in vivo*. Sin embargo, en algunos casos, puede almacenarse intracelularmente en vesículas secretoras, sin tenerse la certeza que contribuya en la protección contra el radical superóxido^{107,109}.

Por tanto, el ámbito de actuación de la superóxido dismutasa es muy amplio, puede hacerlo a nivel extracelular, pero fundamentalmente lo hace en el intracelular en la mitocondria y compartimentos citosólicos.

La regulación de la producción es sensible tanto a la cantidad de oxígeno tisular, como a la producción de radical superóxido intracelular. Se ha demostrado en ratas una mayor síntesis bajo tensiones altas de oxígeno^{26,28,43,52,64,110}.

Su función fue descrita por primera vez por McCord y Fridovich en 1969¹⁰⁴. Cataliza una reacción de dismutación que consiste en la oxidación de un radical superóxido a oxígeno molecular y la reducción de otro radical superóxido a peróxido de hidrógeno:



Puede producirse espontáneamente a pH 7,4 y a una $k^* \approx 2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (reacción 11, página 13), en cuyo caso se trata de una reacción de segundo orden dependiente de la concentración de radical superóxido^{2,52}, o ser acelerada aproximadamente 10.000 veces ($k = 2,3 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) por la acción de la superóxido dismutasa^{2,111,112}, siendo esta última una reacción de primer orden, por lo que la vida media del radical superóxido es independiente de su concentración^{2,52}.

La dismutación espontánea entre dos aniones superóxido probablemente es tan lenta, porque la repulsión electrostática previene el acercamiento que permitiría la transferencia electrónica. Por lo tanto, el sencillo mecanismo por catálisis de la reacción 25 implicaría alternar la reducción y oxidación del catalizador (superóxido dismutasa) durante los sucesivos encuentros con el radical superóxido. El catalizador de ese modo lograría transferir un electrón de un radical superóxido a otro sin la necesidad del acercamiento de ambos aniones. En el caso de la Cu,Zn-SOD, el cobre es el que participa en el ciclo catalítico, y fluctúa entre el estado cúprico y cuproso, mientras el zinc parece tener sólo una función estructural. Los estados trivalente y divalente de los metales son los implicados en el ciclo catalítico de la Mn-SOD y la Fe-SOD².

Por consiguiente, actúa protegiendo contra la toxicidad del radical superóxido, disminuyéndola o eliminándola, ya sea ésta directa o derivada de la interacción con otras especies reactivas del oxígeno^{43,52}. Se ha descrito además una actividad peroxidasa de la Cu,Zn-SOD¹¹³, que puede tener efectos perniciosos para las células por catalizar la formación de radicales libres usando eliminadores aniónicos y peróxido de hidrógeno como substratos¹¹⁴.

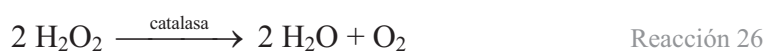
* Constante de velocidad o velocidad de reacción específica.

Debido a la rápida eliminación de radical superóxido, la superóxido dismutasa previene la producción de radical hidroxilo, reacciones 4, 41 y 43. Sin embargo, Yim y cols.¹¹⁵ muestran que a diferencia de la Mn-SOD, la Cu,Zn-SOD puede generar radical hidroxilo desde peróxido de hidrógeno.

La producción excesiva de superóxido dismutasa puede en ocasiones ser perjudicial^{67,68,115-117}.

Catalasa

La producción biológica de peróxido de hidrógeno y la existencia de catalasas y peroxidasas se conoce desde hace más de 120 años². La catalasa es un enzima que contiene hierro (grupo prostético hemo). Cataliza la transformación del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno molecular:



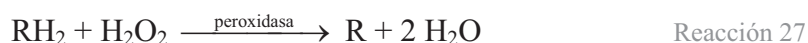
Actúa sobre todo cuando las concentraciones de peróxido de hidrógeno son altas²⁸. Se distribuye ampliamente por los tejidos, localizándose fundamentalmente en los peroxisomas, aunque también se ha descrito su presencia en la mitocondria del corazón, pero no en la de otros tejidos incluido el músculo esquelético²⁶. Su actividad varía no tan sólo según el órgano estudiado, sino en la misma célula.

Algunas células estimulan la producción de catalasa ante incrementos en la producción de peróxido de hidrógeno.

Como en el caso de la superóxido dismutasa la vida media de la catalasa también es corta, y al igual que la anterior debe producirse continuamente. Su actividad en el medio extracelular es insignificante.

Peroxidasa

Al igual que la catalasa también puede contener hierro. Reducen el peróxido de hidrógeno a agua, y utilizan una gran variedad de donadores de electrones para tal propósito.

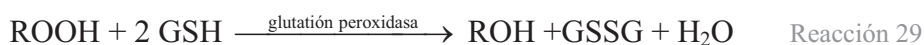


Ciclo redox del glutatión

Las glutatión peroxidadas son más importantes que la catalasa para eliminar el peróxido de hidrógeno en el ser humano, ya que actúan ante niveles bajos de éste. La glutatión peroxidasa cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno y de los hidroperóxidos lipídicos a agua en el primer caso, y alcoholes estables y agua en el segundo, mediante la oxidación del glutatión reducido (GSH) a glutatión oxidado (GSSG)



y



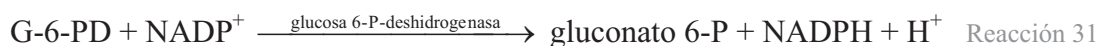
Hay dos tipos de glutatión peroxidasa, una que contiene selenio y otra que no lo posee, catalizan ambas reacciones aunque con diferente especificidad. La que contiene selenio reduce tanto el peróxido de hidrógeno como los hidroperóxidos orgánicos. La glutatión peroxidasa que no contiene selenio utiliza sobre todo los hidroperóxidos como sustrato.

Las poseen la mayoría de especies aerobias. A nivel intracelular se localizan en el citosol y en la matriz mitocondrial.

La reacción de reducción del GSH, catalizada por la glutatión reductasa (GSSG reductasa) se encarga de regenerar el GSH consumido, y es clave en la defensa antioxidante.



La glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G-6-PD) cataliza la regeneración del NADP^+ , en la vía de las pentosas fosfato.



Las glutatión S-transferasas constituyen un conjunto de enzimas que participan en la neutralización de radicales libres y utilizan como cofactor al GSH.

Estos tres sistemas enzimáticos (superóxido dismutasas, catalasa y peroxidadas) se protegen entre sí cuando se produce radical superóxido y/o peróxido de hidrógeno. Tienen por ello una acción sinérgica.

El radical superóxido inactiva la catalasa, a la que transforma accediendo al hierro, al estado poco activo ferroxi, y por convertir el compuesto intermedio ferril al estado relativamente inactivo ferril. A su vez, las peroxidasas que poseen hierro, también son inhibidas por conversión del mismo a la forma ferroxi. Por lo tanto la superóxido dismutasa protege a la catalasa y a la peroxidasa contra su inactivación¹¹⁸.

Al mismo tiempo, el peróxido de hidrógeno puede inactivar a la superóxido dismutasa¹¹⁹, acción prevenida por las catalasas y peroxidasas.

Como se ha apuntado anteriormente la Cu,Zn-SOD puede generar radical hidroxilo desde peróxido de hidrógeno¹¹⁵, lo cual se favorecerá por un incremento en los niveles de superóxido dismutasa o una disminución en la de catalasa y peroxidasas. Por tanto es esencial que las células posean unos niveles equilibrados entre los tres enzimas, constituyendo un equipo defensivo al respaldarse mutuamente^{14,52,118,119}.

Antioxidantes no enzimáticos

Se pueden subclasificar en antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos, lo cual permite proteger a todos los compartimentos del organismo. Hay interrelaciones importantes entre estos dos sistemas.

*α-tocoferol*¹²⁰

El *α*-tocoferol es el antioxidante liposoluble más efectivo e importante. Su concentración en los tejidos es más bien baja¹²¹. Se encuentra en las diversas membranas celulares, lipoproteínas plasmáticas y fluidos extracelulares como el alveolar. Actúa interrumpiendo las reacciones en cadena de autooxidación, al transformarse en un radical estable (no reactivo), neutralizando los radicales peroxilo y alcoxilo.

El átomo de hidrógeno del grupo hidroxílico fenólico del *α*-tocoferol es fácilmente eliminable. De este modo, los radicales peroxilo y alcoxilo formados durante la peroxidación lipídica, se combinan con el *α*-tocoferol en lugar de con otro ácido graso



generando un hidropéroxido orgánico y el radical tocoferol (*α*-tocoferol[•]), el cual es bastante estable y muy poco reactivo, por lo que se corta la reacción en cadena.

Sin embargo el *α*-tocoferol debe su potencia antioxidante no sólo a sus propiedades químicas, sino también a su movilidad y accesibilidad dentro de la membrana.

Aunque el α -tocoferol es un antioxidante liposoluble, el grupo hidroxilo de su núcleo está expuesto a la fase acuosa. Por lo tanto, es posible la interacción entre las especies reactivas del oxígeno y el α -tocoferol.

El radical tocoferol puede emigrar a la superficie de la membrana y reconvertirse en α -tocoferol reaccionando con el ácido ascórbico¹²². Tanto el ácido ascórbico como el α -tocoferol parecen reducir al mínimo los efectos de la peroxidación lipídica en las lipoproteínas y en las membranas, si el proceso ha comenzado. Los tioles, como el glutatión reducido (GSH), también pueden reaccionar con los radicales tocoferol y regenerarlos a tocoferol, y de forma inversa, los tocoferoles también pueden reparar los radicales tiol. Otro modo de regeneración se describe más adelante en la página 35 (reacción 36) al comentar las ubiquinonas.

En contraposición, una alta concentración de vitamina E puede generar radicales libres actuando como prooxidante:



Ácido ascórbico (Vitamina C)

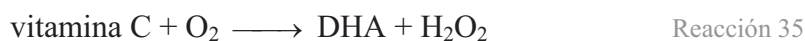
Vitamina hidrosoluble que se encuentra ampliamente distribuida en los fluidos intra y extracelulares. Entre sus muchas acciones antioxidantes descritas, destaca que actúa como un agente reductor u oxidante, reacciona directamente con los radicales superóxido, hidroperóxido, hidroxilo, diversos hidroperóxidos lipídicos, oxígeno singlete y ácido hipocloroso. Interactúa con el radical tocoferol para reconvertirlo a α -tocoferol¹²².

El radical deshidroascorbato (vitamina C[•]) es poco reactivo y en consecuencia en él suelen acabar las reacciones en cadena. Por disprotonación se produce vitamina C y deshidroascorbato (DHA)



Además, bajo ciertas condiciones el radical deshidroascorbato puede ser reducido enzimáticamente por el sistema dependiente del NADPH (NADH reductasa)¹²².

Paradójicamente la vitamina C también posee propiedades prooxidantes. Durante la oxidación de ésta se forma peróxido de hidrógeno:



Cantidades excesivas de vitamina C también pueden actuar como prooxidante en presencia de metales de transición (hierro, cobre,...), induciendo a la peroxidación lipídica por su capacidad en reducir el Fe^{3+} a Fe^{2+} , el cual es un potente inductor de la formación de radicales libres.

Las propiedades antioxidantes del ácido ascórbico predominarán en condiciones normales debido al efecto secuestro (ej. almacenamiento por parte de la ferritina) de los iones metálicos de transición, cosa que puede no ocurrir en caso de enfermedad, situación en la que estarían más disponibles.

Glutación reducido (GSH)

El glutación reducido, es un tripéptido (glutamato, cisteína y glicina) ampliamente distribuido a nivel celular. Es el elemento central de muchos sistemas detoxificadores, ya que es sustrato de glutación peroxidasas, transferasas y otros enzimas diversos. Además tiene un importante papel como neutralizador de radicales libres, en el metabolismo de diversos fármacos, etcétera.

Muchas de estas funciones fisiológicas derivan de sus propiedades químicas especiales. Contiene un grupo tiol (SH) y un enlace γ -glutamilo que es resistente a la degradación por las peptidasas normales, las cuales sólo actúan sobre los enlaces α -amino-acilo. El enlace entre el glutamato y la cisteína sólo es hidrolizable por la enzima γ -glutamil transpeptidasa, presente en la membrana plasmática.

Los grupos tiol son muy importantes en la protección contra los efectos perniciosos de las especies reactivas del oxígeno, ya que reaccionan fácilmente con ellas. Esta propiedad es consecuencia de la baja energía del enlace SH, inferior a la de casi todos los enlaces C-H y O-H. La reacción de los tioles con los radicales es tan rápida que se le considera de control por difusión. Es decir, la etapa lenta de la reacción viene dada por la velocidad a la cual el radical y la sustancia con el grupo tiol son capaces de difundir para encontrarse en el medio. Una vez se han encontrado casi siempre reaccionan.

Por ello es un cofactor esencial en diversos mecanismos enzimáticos (ver “Ciclo redox del glutación” en la página 30). El glutación reducido interactúa de manera directa y con facilidad con los radicales libres, especialmente con los hidroxilo y radicales orgánicos, donando un átomo de hidrógeno. Cuando el GSH se oxida, se forma glutación oxidado (GSSG), formado por dos moléculas de GSH unidas por un puente disulfuro entre las dos cisteínas.

Los grupos SH tienen importancia funcional en muchas proteínas y para protegerlos es necesario el GSH. Además tiene una actividad importante en el metabolismo xenobiótico y en la síntesis de leucotrienos. Puede también ayudar en el reciclaje del radical tocoferol.

Al igual que las vitaminas E y C, puede tener tanto acciones antioxidantes como oxidantes. El glutatión puede donar el átomo de hidrógeno de los grupos SH, produciéndose radicales GS[•] en vez de GSH. Estos pueden reaccionar con el oxígeno y producir radicales oxisulfuro, potencialmente dañinos como el RSO[•] y RSO[•].

Además el GSH puede inhibir la actividad de la catalasa de manera dosis dependiente¹²³.

Carotenos

Los carotenos, sustancias relacionadas con la vitamina A, representan otro de los sistemas antioxidantes utilizado por nuestro organismo. Se encuentran en las membranas a una concentración más baja que la de los tocoferoles. Debido a su gran liposolubilidad, actúan prioritariamente en los compartimentos más hidrófobos, en los que penetran con gran facilidad. El β-caroteno es su representante más destacado, especialmente eficaz para neutralizar el oxígeno singlete, disipa su energía sin producir lesión celular. El β-caroteno también puede actuar tanto como oxidante como prooxidante. A pequeñas presiones parciales de oxígeno (<150 Torr), muestra una excelente actividad, sin embargo a altas presiones parciales de oxígeno, muestra un efecto prooxidante autocatalítico con la consiguiente pérdida de su actividad antioxidante.

Otros antioxidantes no enzimáticos

Ácido úrico. Aunque la capacidad de éste para sufrir oxidaciones es un hecho conocido por los químicos orgánicos desde hace más de 150 años, tradicionalmente se le ha considerado un producto final del metabolismo de las purinas (en el hombre), metabólicamente inactivo y sin valor fisiológico. Sin embargo, esta ubicua molécula presente en cantidades significativas en los tejidos y fluidos corporales, a concentraciones fisiológicas es otro elemento con capacidad antioxidante. Protege por unirse a los metales de transición, y además neutraliza al radical hidroxilo, superóxido, oxígeno singlete, ácido hipocloroso y radicales peroxilo y alcoxilo, aunque tras ello queda oxidado pudiendo producir daño oxidativo. La forma radical libre del ácido úrico puede ser reducida por el ácido ascórbico^{92,124-127}.

La **coenzima Q¹²⁸** (ubiquinonas) es una molécula extremadamente versátil, implicada en un gran número de procesos celulares, aunque relacionados entre sí. En las mitocondrias

participa en la respiración, en el sistema de transferencia de electrones que conduce en última instancia a la producción de ATP.

Se ha propuesto la participación de la coenzima Q en la formación de radicales libres, fundamentalmente durante la isquemia y posterior reperfusión. Pero las pruebas son indirectas y no excluyen la participación de otras especies químicas.

Por otro lado experimentos a diversos niveles (sistemas subcelulares, animales intactos, humanos), apoyan el hecho de que la coenzima Q, principalmente en su estado reducido (ubiquinol), puede actuar como un antioxidante de las membranas celulares. Asienta el concepto que durante la evolución de las especies aeróbicas, se la seleccionó para proteger los diversos tipos de membranas en las que se halla, del daño producido por los radicales libres.

También se ha discutido que pueden actuar como antioxidantes proporcionando átomos de hidrógeno para reducir los radicales peroxilo y/o alcoxilo, así como a través de un mecanismo de oxidorreducción entre la forma reducida de la coenzima Q (CoQH₂) y el radical α -tocoferol, regenerándose a α -tocoferol, en la mitocondria.



Como consecuencia se genera otro radical, CoQH₂[•], el cual puede ser reciclado por la cadena de transporte electrónico mitocondrial¹¹.

Por tanto, bajo algunas circunstancias puede contribuir a la formación de radicales libres, provocando lesión celular, mientras que en otras parece proporcionar protección contra la mencionada lesión^{128,129}.

La **glucosa**, además de su función principal como sustrato para la producción de energía en las células de los mamíferos, también tiene un papel como antioxidante. A concentraciones fisiológicas se comporta como un eliminador de radical hidroxilo¹³⁰. Otros carbohidratos como la fructosa, galactosa, el extensamente utilizado manitol, etc., también son capaces de actuar como eliminadores de radical hidroxilo. Aunque antioxidantes débiles, su aportación cobra mayor relevancia si se presentan a altas concentraciones. No obstante, a la hiperglucemia se la ha implicado en la producción de radicales libres⁹⁰.

La **bilirrubina** es un pigmento biliar producido por el catabolismo del grupo hemo. La **albúmina** la transporta en el plasma, y en condiciones fisiológicas ambas pueden actuar como antioxidante. La bilirrubina unida a la albúmina, a concentraciones equimolares,

compite con el ácido úrico por los radicales peroxilo, pero es menos eficiente que la vitamina C en eliminarlos. Protege a los ácidos grasos transportados por la albúmina¹³¹.

Otras defensas antioxidantes (secuestradores de iones metálicos)

Además de los eliminadores de especies reactivas del oxígeno, el grupo de los antioxidantes incluye ciertos quelantes del hierro y el cobre como la transferrina, lactoferrina, ferritina, ceruloplasmina y albúmina, así como proteínas que se unen con grupos hemo.

Aunque estos compuestos no actúan directamente sobre las especies reactivas del oxígeno, son por definición antioxidantes ya que se unen con metales con actividad redox, por lo tanto previniendo o limitando la toxicidad derivada de los primeros³⁵. Son la principal defensa antioxidante en el plasma⁹². Así, si no hay iones metálicos disponibles, entonces el radical superóxido y el peróxido de hidrógeno pueden tener limitada, su capacidad para producir efectos dañinos.

Los metales de transición promueven reacciones en las que se producen especies reactivas del oxígeno^{34,35}. Los organismos tienen mucho cuidado con el manejo del hierro. Para minimizar la cantidad de hierro libre en el líquido extracelular y dentro de las células, utilizan proteínas tanto para su transporte (transferrina) como para su almacenamiento (ferritina, hemosiderina). Las 2/3 partes de los 4 g de hierro de una persona adulta se encuentran almacenados en la hemoglobina, un 10 % en la mioglobina, y el resto en una porción de enzimas que poseen hierro y en la transferrina. De modo similar, el cobre plasmático se une a la ceruloplasmina o a la albúmina, y por tanto es más difícil que estimule las reacciones de radicales libres.

La glicoproteína *transferrina* es el mayor transportador plasmático de hierro del organismo, ya que éste es prácticamente insoluble (dos moles Fe^{3+} por mol de proteína). En condiciones normales ésta sólo se encuentra saturada en un 30 %, por tanto la concentración plasmática de hierro libre es casi nula, por lo que no estarán disponibles para catalizar las reacciones de radicales libres en el plasma normal. Un pH ácido favorece la liberación de hierro de la transferrina, circunstancia que se puede observar por ejemplo en los tejidos hipóxicos.

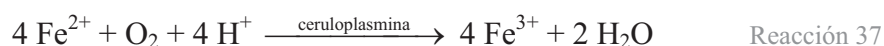
La proteína *lactoferrina*, al igual que la anterior puede unirse a dos moles Fe^{3+} por mol de proteína, con la particularidad de que lo hace a valores de pH tan bajos como 4,0. Presente en las secreciones, en la leche y liberada por los neutrófilos, también puede actuar como antioxidante.

En la célula la **ferritina** almacena el hierro no metabolizado, aunque ésta también se encuentra en el compartimiento extracelular. Aunque normalmente sólo se encuentra saturada en un 20%, tiene una gran capacidad (hasta 4500 iones Fe^{3+} por molécula de apoferritina), lo que representa la principal provisión de hierro fácilmente disponible. Incluso cataliza la oxidación de Fe^{2+} a Fe^{3+} para su almacenamiento, mediante una actividad ferroxidasa. Esta unión previene la participación del hierro en la reacción de Fenton. El hierro que se libera desde la ferritina requiere la reducción de Fe^{3+} a Fe^{2+} , lo que puede ser llevado a cabo por el óxido nítrico^{132,133} o el radical superóxido^{133,134}, aunque según Bolann y Ulvik¹³⁵ este último de forma limitada. También se ha implicado al peróxido de hidrógeno, peroxinitrito y radical hidroxilo³⁵. Las catecolaminas como la adrenalina o noradrenalina también son capaces de liberar, sobre todo en condiciones anaeróbicas, el hierro de la ferritina¹³⁶. La xantina deshidrogenasa, que no tiene capacidad ferroxidasa¹³⁷, está implicada en la movilización del hierro desde las reservas de ferritina^{138,139}. Igualmente, ya sea en condiciones aeróbicas o anaeróbicas, la xantina oxidasa mediante un mecanismo independiente a la producción de radical superóxido (aunque en condiciones aeróbicas éste representaría el 70 %), puede liberar hierro posiblemente mediante una transferencia electrónica directa desde la xantina oxidasa a la ferritina¹³⁴. A un pH de 6 el hierro se disocia de la ferritina.

La **glicil-L-histidil-L-lisina** es un tripéptido plasmático unido a cobre (GHK:Cu(II)), aunque no está considerado un secuestrador de iones metálicos, su efecto beneficioso viene dado por la capacidad de inhibir la liberación de hierro de la ferritina mediante un bloqueo físico de los canales por los que éste se libera¹³³.

Las **haptoglobinas** son proteínas plasmáticas que se unen a la hemoglobina liberada al medio extracelular, y las **hemopexinas** lo hacen con los grupos hemo, con el consiguiente efecto protector. Los complejos hemoglobina - haptoglobina y hemo - hemopexina son complejos poco activos en estimular reacciones de radicales libres, además rápidamente son eliminados de la circulación.

La glicoproteína plasmática **ceruloplasmina** tiene una función esencial en el metabolismo del hierro como un enzima ferroxidasa. Cataliza la oxidación de hierro ferroso a hierro férrico (susceptible de unirse a la transferrina) previniendo la reacción de Fenton, mientras reduce el oxígeno a agua³¹:



Así, a diferencia de la oxidación enzimática, la oxidación del hierro ferroso catalizado por la ceruloplasmina no produce especies reactivas del oxígeno, lo cual puede considerarse la principal de las acciones antioxidantes de este enzima. Aunque de menor

importancia, la ceruloplasmina también tiene la capacidad de reaccionar con el peróxido de hidrógeno y el radical superóxido, aunque en éste último caso a menor velocidad que la superóxido dismutasa ($k = 7 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).

También se ha observado que la ceruloplasmina es capaz de incorporar hierro a la apoferritina¹³³.

El cobre, además del hierro, también está implicado en la formación de radicales hidroxilo a partir de peróxido de hidrógeno^{33,34}. La mayor parte del cobre plasmático (95 %) se halla unido fuertemente a la ceruloplasmina (6 ó 7 mol de cobre por mol de proteína), y el que no lo está lo hace a la **albúmina** casi en su totalidad. Esta unión puede dañar a la albúmina, pero no tiene gran importancia si se tiene en cuenta las altas concentraciones de ésta y su rápido recambio. Evita que los iones de cobre puedan unirse a lugares más comprometedores como por ejemplo los grupos sulfhidrilo de las proteínas de membrana celular y producir lesión oxidativa al interaccionar por ejemplo con el peróxido de hidrógeno³³.

Además, la mayoría de compuestos con grupos tiol, tienen el potencial de eliminar radicales libres. La albúmina proporciona una rica fuente de grupos tiol en los líquidos extracelulares, aunque la albúmina por sí sola reacciona casualmente con el radical hidroxilo, teniendo un efecto menor³⁶. Cuando al cobre se une a la albúmina, el radical hidroxilo formado alrededor reacciona inmediatamente con ésta. Esta proteína también elimina el ácido hipocloroso en el plasma. La albúmina oxidada es rápidamente eliminada de la circulación y degradada.

Así pues, retener los iones metálicos es una defensa antioxidante importante, ya que estos no pueden estimular la formación de radicales hidroxilo, y por consiguiente el estrés oxidativo. Además, este secuestro permite utilizar al radical superóxido y al peróxido de hidrógeno para propósitos metabólicos, sin que logre hacer demasiado daño a los tejidos, siempre y cuando la cantidad de especies reactivas del oxígeno no llegue a ser suficiente para producir una lesión directa y/o movilizar los iones metálicos de sus lugares de almacenamiento.

Antioxidantes exógenos

Además de estas defensas naturales contra el estrés oxidativo, se han desarrollado una amplia variedad de antioxidantes sintéticos^{97,140}.

Muchos fármacos diseñados para otro propósito poseen una actividad antioxidante *in vitro*, como por ejemplo el alopurinol (ver en el capítulo *Discusión* las consideraciones

sobre este aspecto, página 165). En la mayoría de los casos esta observación es irrelevante, porque no alcanzan las concentraciones necesarias para complementar los mecanismos antioxidantes naturales.

También se pueden usar liposomas antioxidantes. Son liposomas que contienen antioxidantes liposolubles, o hidrosolubles, o enzimáticos, o una combinación entre varios de ellos¹⁴¹.

Antes que una sustancia pueda considerarse útil como antioxidante y/o eliminador de radicales libres, es necesario que cumpla tres prerequisites. Primero, el compuesto debe tener la facultad de interactuar con oxidantes y radicales libres biológicamente relevantes. Segundo, dado que estas interacciones pueden producir modificaciones químicas en el eliminador, el producto resultante debe ser menos dañino que el agente eliminado. Y finalmente, la sustancia propuesta debe presentarse a una concentración suficientemente alta, al menos en algunos compartimentos celulares para asegurar una reacción relevante desde el punto de vista cuantitativo.

Defensas secundarias

Ya que las defensas antioxidantes no son completamente efectivas en todo momento, se ha desarrollado un sistema de enzimas reparadores que se encarga de rehabilitar las proteínas dañadas por las especies reactivas del oxígeno, extraer los ácidos grasos oxidados de los fosfolípidos y reparar el ADN alterado. Las moléculas excesivamente dañadas no se reparan para minimizar la introducción de mutaciones.

Las *defensas secundarias* incluyen:

- Enzimas lipofílicas (fosfolipasas), que serían las responsables de la reconstrucción de los constituyentes de la membrana dañados o alterados. La predilección de la fosfolipasa A₂ por los lípidos oxidados puede proporcionar a las células un mecanismo protector adicional contra la peroxidación lipídica.
- Las células poseen un sistema de enzimas con capacidad para reparar directamente los polipéptidos moderadamente dañados reconstituyendo su estructura. Uno de estos sistemas, muy abundante, es la reducción de los puentes disulfuro oxidados. Si las proteínas han sido dañadas de manera más grave, las enzimas proteolíticas (proteasas, peptidasas) las degradarán en su mayoría, previniendo de esa manera su acumulación en la célula.
- Enzimas reparadoras del ADN. La mayoría de las células poseen diversos tipos de endonucleasas que específicamente reconocen diferentes modificaciones, provocadas

por las especies reactivas del oxígeno (radical hidroxilo, oxígeno singlete) u otros agentes como la radiación ultravioleta. Otras enzimas reparadoras del ADN son la exonucleasa, la ligasa, y la ADN glicosilasa.

Durante la isquemia/reperfusión se generan en exceso especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno, la eliminación de las cuales desborda la capacidad del sistema defensivo antioxidante fisiológico. Además durante la isquemia se pueden reducir las concentraciones de alguno de sus componentes^{51,89,96,142-146}. Todo esto es lo que provoca el estrés oxidativo que se observa en este proceso patológico y que describimos más adelante.

Monóxido de nitrógeno u óxido nítrico (NO•)¹⁴⁷⁻¹⁵⁸

Aunque la denominación más correcta es la de monóxido de nitrógeno, utilizaremos a lo largo del texto, al igual que la mayoría de la bibliografía consultada, la denominación de óxido nítrico¹³.

La primera indicación de que el organismo tiene una producción endógena de nitrato (NO₃⁻) data de 1916 cuando en estudios sobre el equilibrio dietético en humanos muestran que hay más nitrato excretado que el ingerido. Durante mucho tiempo se pensó que el exceso de nitrato lo producían los microorganismos intestinales, teniendo por tanto poca relevancia en la biología de los mamíferos. Se le consideraba sólo uno más de los gases nocivos en los tubos de escape de los vehículos que quemaban combustibles fósiles, causante de la lluvia ácida y destructor de la capa de ozono¹⁵².

En 1979 Ignarro y cols. al burbujear el líquido nutricio con óxido nítrico, observan que relajaba de manera rápida y pronunciada, aunque transitoria, cintas de arteria coronaria bovina previamente contraída, y que esto era antagonizado por hemoproteínas oxidadas y azul de metileno¹⁴⁷. Mas tarde Furchgott y Zawadzki¹⁵⁹ muestran que la acetilcolina interactúa con los receptores muscarínicos en las células endoteliales, estimulando la liberación de una o más sustancias que relajan el músculo liso subyacente, al cual se le denominó *endothelial derived relaxing factor* (EDRF). Palmer y cols.¹⁶⁰, Ignarro y

cols.¹⁶¹, y Moncada y cols.¹⁶² en 1987, demuestran que el EDRF y el óxido nítrico son la misma molécula.

Es como un arma de doble filo. Lo producen las células de los mamíferos, como mensajero intercelular en cantidad y momentos apropiados. Está implicado como modulador, en procesos fisiológicos tan diversos como la defensa del huésped y reacciones inmunológicas, la comunicación neuronal tanto a nivel central como periférico, la regulación del tono vascular y flujo sanguíneo, el control de la agregación plaquetaria, broncodilatación, etc.^{151,154,157,162-166}. A nivel gastrointestinal, además de estar implicado en su funcionalismo¹⁶⁷, ayuda a mantener la integridad de la mucosa contra las agresiones y a reparar las lesiones producidas por diversos modelos experimentales incluida la isquemia/reperfusión¹⁶⁸. Sin embargo, su síntesis excesiva y disregulada puede ser causa o un elemento más, que contribuye en numerosas patologías humanas^{91,102,151-154,157,165,166,169,170-172}, (ver “El óxido nítrico y la enfermedad” en la página 61).

Biosíntesis de óxido nítrico

El óxido nítrico se sintetiza en una gran variedad de células y tejidos. Tiene lugar a partir de la oxidación de uno de los átomos de nitrógeno del terminal guanidino del aminoácido L-arginina en una reacción catalizada por la óxido nítrico sintasa (NOS), y el cosustrato NADPH, con la concomitante formación de L-citrulina¹⁷³⁻¹⁷⁸. La N^o-hidroxi-L-arginina (NOH-ARG) es un intermediario en la biosíntesis del óxido nítrico^{179,180} (figura 2). El oxígeno incorporado por las NOS tanto en el óxido nítrico como en la L-citrulina deriva del oxígeno molecular^{177,179}.

Tanto el óxido nítrico como la L-citrulina se forman en cantidades equimolares por mol de L-arginina oxidada. Esta reacción es estereoespecífica, análogos de la L-arginina, como el N^G-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), incluyendo su enantiómero D-arginina, no son sustratos^{173,178,180}. La L-citrulina puede reciclarse a L-arginina^{181,182} (figura 2), sin embargo durante la hipoxia se reduce la actividad de esta vía sintética¹⁸².

Las NOS¹⁸⁰ son flavoproteínas diméricas, ambas subunidades son idénticas, cada una de ellas presenta dos dominios, uno con actividad oxigenasa y otro con actividad reductasa que actúan de manera independiente. Ambas subunidades se alinean interaccionando los dos dominios oxigenasa para formar el dímero, de forma que los dominios reductasa quedan como extensiones independientes. Las NOS contienen como cofactores, a la tetrahidrobiopterina (H₄B), a un grupo hemo, al flavín adenin dinucleótido (FAD) y al flavín mononucleótido (FMN), al igual que la NADPH-citocromo P-450 oxidoreductasa.

En ésta, ambos cofactores facilitan la reducción de las hemoproteínas estabilizando el radical que se genera dentro de la oxidoreductasa, de la misma manera las NOS pueden utilizar un mecanismo similar para generar óxido nítrico^{180,183}. Además de su participación en la catálisis, la L-arginina, la tetrahidrobiopterina y el grupo hemo también ayudan a formar y mantener este dímero activo a partir de los monómeros de proteína inactiva¹⁸⁴. Todos estos cofactores contienen lugares para unirse a la L-arginina, al NADPH, y a la calmodulina. El dominio oxidasa de la NOS contiene el grupo hemo, mientras que el dominio reductasa se une a la calmodulina, FMN, FAD y NADPH. Se cree que las flavinas aceptan electrones del NADPH y lo transfieren al grupo hemo el cual liga al oxígeno y cataliza la oxidación de la L-arginina a óxido nítrico y L-citrulina¹⁵⁸.

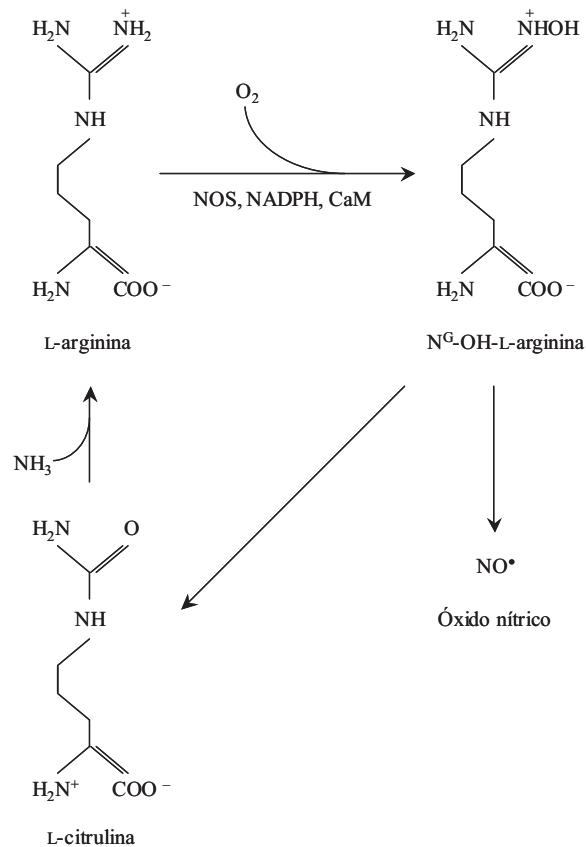


Figura 2. Biosíntesis de óxido nítrico desde la L-arginina, y reciclaje a L-citrulina¹⁵². NOS: NO sintasa constitutiva, NADPH: nicotinamida adenindinucleótido fosfato reducido, CaM: calmodulina.

Las células de los mamíferos están dotadas de al menos tres genes que codifican distintas isoformas de NOS. Existen dos NOS constitutivas, la eNOS (o ecNOS, o NOS-III) descrita inicialmente en las células endoteliales, aunque también se encuentra en los miocitos, osteoblastos, osteoclastos, plaquetas, etc.; y la nNOS (o ncNOS o NOS-I) originalmente descrita en las neuronas del sistema nervioso central, pero presente en una

variedad de tipos celulares como las neuronas periféricas no adrenérgicas no colinérgicas, músculo esquelético, células del islote pancreático, células de la mácula densa renal y ciertos tipos de células epiteliales¹⁸⁰. El tercer tipo de NOS, normalmente no se encuentra en las células, es inducible (iNOS o mNOS o NOS-II), requiriendo síntesis proteica en unas tres o cuatro horas, por estímulos inmunológicos (interferón- γ , interleucina-1, -2 y -6, factor de necrosis tumoral- α , leucotrienos, endotoxinas bacterianas, etc.)^{149,180,183,185-188}, y también en la hipoxia⁵¹. Fue identificada por primera vez en los macrófagos¹⁸³, pero se puede localizar en prácticamente todos los tipos celulares de los mamíferos, entre ellas las células de la mucosa intestinal¹⁸⁹. En algunas situaciones puede incrementar tanto la actividad como la cantidad de eNOS y nNOS, indicando que estas isoformas pueden de hecho ser inducidas. A la inversa, desde un principio se pensaba que la iNOS era inducible sólo en situaciones patológicas, y sin embargo puede detectarse en determinadas situaciones fisiológicas¹⁷⁰. Se han descrito diferencias entre sus pesos moleculares, 160 kDa la nNOS, 130 kDa la iNOS y 133 kDa la eNOS¹⁸⁰.

Todas estas enzimas son solubles, se encuentran en el citoplasma. Son NADPH dependientes¹⁷⁸, aunque todas las isoformas de NOS necesitan unirse a la calmodulina para su actividad, sólo la iNOS debido a su gran afinidad, permanece unida a ésta a pesar de los bajos niveles de calcio existentes en las células en reposo, es calcio independiente¹⁸³, y aunque el Mg^{2+} no es esencial para la formación de óxido nítrico, este catión incrementa la actividad de la iNOS¹⁴⁸. Las NOS constitutivas (eNOS y nNOS), calcio y calmodulina dependientes, fisiológicamente producen pequeñas cantidades de óxido nítrico durante cortos periodos de tiempo, en respuesta a elevaciones transitorias del calcio intracelular, provocada por ejemplo por diversos agonistas que dependen del endotelio (acetilcolina, bradicinina, sustancia P). La fosforilación de residuos específicos en la eNOS le proporciona más actividad a una concentración dada de calcio – calmodulina, lo que puede incrementar la síntesis de óxido nítrico en ausencia de un cambio en la concentración intracelular de calcio¹⁵⁸. Las NOS constitutivas llevan a cabo una serie de funciones fisiológicas vía activación de la guanilato ciclasa soluble, no confieren citotoxicidad; mientras que la iNOS puede producir de manera constante, durante largos periodos de tiempo, una gran cantidad de óxido nítrico hasta que el sustrato para producirlo se agota, pudiendo ser la responsable de la lesión y muerte tisular. Sin embargo en algunas circunstancias, por ejemplo tras la isquemia/reperfusión, una elevación suficiente y mantenida de calcio intracelular puede provocar que las NOS constitutivas produzcan cantidades citotóxicas de óxido nítrico¹⁵³, aunque Cuzzocrea y cols.¹⁹⁰ matizan que el agente lesionante es el peroxinitrito.

En condiciones fisiológicas, el estímulo más importante que controla la síntesis de óxido nítrico endotelial en las arteriolas es probablemente mecánico: el flujo pulsátil y las fuerzas de rozamiento. La hipoxia de las células endoteliales, hasta un nivel crítico, también induce su síntesis¹⁵¹. Ya se ha apuntado que estas células poseen receptores para varias sustancias vasoactivas, las cuales pueden estimular la síntesis de óxido nítrico al incrementar los niveles de calcio intracelular, como la acetilcolina, bradicinina, ADP, ATP, sustancia P, histamina, norepinefrina, serotonina, endotelina, etc^{159,165,188,191,192}. La estimulación de las células musculares lisas con agentes que actúen sobre los receptores α_1 adrenérgicos del músculo liso de las arterias mesentéricas induce contracción, que es contrarrestada por un incremento en la síntesis y liberación de óxido nítrico por parte del endotelio^{193,194}.

La L-arginina se encuentra en exceso en el citoplasma de la célula endotelial. Así, la producción de óxido nítrico viene determinada por la actividad del enzima más que por la disponibilidad del sustrato.

Por otro lado, la actividad de la NOS se puede inhibir con concentraciones elevadas de óxido nítrico. Éste se une al grupo prostético hemo de ésta, interfiriendo en el transporte de electrones y en la oxidación del sustrato. Las condiciones que favorecen el estado de oxidación más elevado (FeIII) aumentan este efecto de contrarregulación, mientras que las condiciones que favorecen el estado de oxidación más bajo (FeII) disminuyen drásticamente el efecto de inhibición de la síntesis de óxido nítrico por él mismo. Inhibe de forma distinta la actividad de las diferentes isoformas de NOS, siendo más notoria esta acción para la eNOS y la nNOS que para la iNOS. La insensibilidad de esta última permite la generación de altas concentraciones de óxido nítrico, ejerciendo así su función como agente citotóxico en la respuesta inmune y en procesos inflamatorios. Además, se ha observado que el proceso de fosforilación por la proteína quinasa regula de manera reversible la localización intracelular de las NOS constitutivas, atenuando la actividad de la eNOS.

Hay muchos mecanismos potenciales por los cuales se puede inhibir la síntesis de óxido nítrico. La estrategia más usada es el empleo de análogos estructurales de la L-arginina que actúan como inhibidores competitivos de la NOS, los cuales han sido esenciales para evaluar la contribución del óxido nítrico en los procesos fisiológicos y patológicos. Actúan como un falso sustrato para la enzima, bloqueando la producción de óxido nítrico endógeno. Entre ellas está la N^G-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME)^{149,165,170,195}, debido a la introducción del grupo N-nitro a la molécula de L-arginina. Posee una gran capacidad para inhibir las NOS constitutivas, y aunque notable es algo menor en el caso de las inducibles. Además, la capacidad para inhibir la producción de óxido nítrico depende también de otros factores como la cinética de entrada del análogo en la célula,

del grado de unión de estos compuestos al enzima, de su metabolismo en el interior de la célula y de la concentración intracelular de L-arginina.

A raíz de las evidencias de que la actividad mitocondrial se encuentra afectada por el óxido nítrico, se demuestra la existencia de una actividad NOS localizada en la membrana interna de la mitocondria¹⁹⁶⁻¹⁹⁸. Ninguna de las anteriores NOS está presente en la mitocondria a niveles relevantes desde el punto de vista fisiológico¹⁹⁹. La NO sintasa mitocondrial (mtNOS) se expresa de manera constitutiva, es calcio dependiente¹⁹⁶, aunque también hay datos que indican que ésta también puede ser inducible²⁴. La demostración de producción de óxido nítrico en la mitocondria²⁰⁰ sugiere la implicación de éste en procesos tales como la respiración y apoptosis.

La administración de L-NAME inhibe de manera competitiva la eNOS¹⁹⁵ de la mucosa intestinal¹⁸⁹. Incrementa la presión arterial sistémica²⁰¹, en la rata se acompaña de vasoconstricción renal, mesentérica, carotídea y en las arterias de las extremidades. Esto es debido a la inhibición de la producción basal de óxido nítrico que se produce en condiciones fisiológicas en estos lechos vasculares. Además reduce las fuerzas hidrodinámicas de dispersión que tienden a empujar a los leucocitos a lo largo del endotelio venular, aunque la adherencia dependiente de estas fuerzas hidrodinámicas sólo explica una pequeña fracción de la adhesión asociada con la inhibición de la síntesis de óxido nítrico²⁰². Promueve la adherencia y emigración de los leucocitos en las vénulas postcapilares²⁰²⁻²⁰⁴, aumenta la reactividad de los mastocitos^{204,205} e incrementa la permeabilidad microvascular^{203,204,206,207} y de la mucosa intestinal^{205,208}. Promueve la agregación plaquetoleucocitaria^{203,204,209,210}, agregación plaquetaria y adhesión de las mismas al endotelio^{163,211,212}. Con el D-NAME (N^G-nitro-D-arginina metil éster), sin embargo, no se observa ningún efecto^{202,206,208,209}.

Los glucocorticoides inhiben selectivamente la iNOS sin afectar a las formas constitutivas del enzima^{151,170,186}.

Se han detectado inhibidores endógenos de la NOS, como la dimetil arginina asimétrica (ADMA) y el PIN (proteína inhibidora de la nNOS). Actúan desestabilizando la dimerización de la NOS.

Bioquímica del óxido nítrico

El óxido nítrico es una molécula pequeña, sin carga, liposoluble, compuesta por dos átomos con siete electrones del nitrógeno y ocho del oxígeno. Dado que los orbitales pueden contener un máximo de dos electrones el orbital superior debe contener un electrón desapareado¹⁵⁵.



Monóxido de nitrógeno u óxido nítrico

Sin embargo, no por ser un radical libre se le debe considerar altamente reactivo, no necesariamente tiene una vida media corta, e intrínsecamente no es más reactivo que el oxígeno. Su reactividad química y citotoxicidad potencial ha sido muy sobrestimada *in vitro* por ignorar los elementos que lo anulan o eliminan como el radical superóxido^{160,161}. De manera que las diferentes vidas medias que se le han atribuido, varían en función de las condiciones experimentales de cada laboratorio.

Es un radical libre relativamente estable, que a diferencia de muchos radicales no reacciona rápidamente con la mayoría de sustancias biológicas, sólo lo hace con un selecto rango de moléculas. Es propenso a sufrir reacciones de transferencia o adición de electrones, especialmente con moléculas que tienen electrones desapareados y con metales de transición como el hierro del grupo hemo, y con el oxígeno molecular. Por ello el óxido nítrico es un importante mediador de la lesión provocada por especies reactivas del oxígeno, ya que contiene un electrón desapareado que lo hace reaccionar rápidamente con éstas^{35,213,214}.

La vida media del óxido nítrico *in vivo* está entre 1 y 10 segundos. Aunque ésta no es un valor constante, es inversamente proporcional a su concentración. Así, su vida media es mayor cuanto más diluido se encuentra^{37,155}.

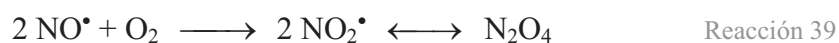
En la reactividad del óxido nítrico influyen el estado redox que adopte y las características del medio¹⁵⁵. Hay tres estados redox para el óxido nítrico: radical libre neutro (NO[•]), catión nitrosonio o nitrosilo (NO⁺) y anión nitroxilo u oxonitrato(1-) (NO⁻). Estos dos últimos se forman respectivamente por pérdida del electrón desapareado y por ganancia de un electrón en su órbita externa^{13,151}. El catión nitrosonio libre no subsiste largo tiempo en solución debido a que reacciona inmediatamente con agua para formar nitritos¹⁵⁵; aunque según Koppenol³⁷, desde el punto de vista termodinámico su formación *in vivo* es imposible. El anión nitroxilo es una especie reactiva con una vida media corta, reacciona más rápidamente con los grupos tiol que con otras especies derivadas del nitrógeno; el NADPH es otra diana. La Cu,Zn-SOD modula estos efectos biológicos por convertirlo rápidamente a óxido nítrico y viceversa^{215,216}, además ciertos agentes oxidantes, incluyendo el Fe³⁺, pueden convertir el anión nitroxilo a óxido nítrico²¹⁵. También puede reaccionar con el oxígeno para formar peroxinitrito* ($k^\dagger \approx 3\text{-}6 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)^{37,216}.

* Aunque la denominación más correcta es la de oxoperoxonitrato(1-), utilizaremos a lo largo del texto, al igual que la mayoría de la bibliografía consultada, la denominación también permitida de peroxinitrito¹³.

† Constante de velocidad o velocidad de reacción específica.



La reputación del óxido nítrico como una molécula muy reactiva viene de dos observaciones, la rápida formación de dióxido de nitrógeno (NO_2^\bullet) en mezclas de oxígeno con altas concentraciones de aquel en fase gaseosa²¹⁷, y de su aparentemente corta vida media en los primeros sistemas de bioensayo (cascadas de perfusión con solución oxigenada de Krebs-Henseleit), lo cual se atribuyó inicialmente a la reacción directa con el oxígeno para formar dióxido de nitrógeno, un tóxico y poderoso oxidante, capaz de iniciar la oxidación de los ácidos grasos y nitrosilación de los aminoácidos aromáticos.



Como se observa en las reacciones 39 y 40, la interacción entre el óxido nítrico y el oxígeno tiene el potencial de generar además del NO_2^\bullet otros potentes oxidantes nitrogenados, considerados como especies reactivas derivadas del óxido nítrico (ERDON) no radicales como el tetróxido de nitrógeno (N_2O_4), o el trióxido de nitrógeno (N_2O_3) capaces de iniciar la peroxidación lipídica, nitrosar residuos sulfhidrilo y tirosina. En sistemas acuosos el trióxido de nitrógeno se hidroliza rápidamente a nitrito (NO_2^-). Sin embargo, hay algunos estudios que sugieren que los intermediarios que se forman a partir de la autooxidación del óxido nítrico en un medio acuoso, son diferentes a los formados en fase gaseosa representándolos como NO_x . Las especies NO_x en medio acuoso se hidrolizan rápidamente a nitrito, y llevan a cabo reacciones de oxidación y nitrosación. Se ha visto que el ascorbato es un eliminador eficiente de estos intermediarios^{218,219}. El N_2O_3 es la ERDON predominante derivada de la autooxidación del óxido nítrico en los sistemas biológicos, el cual se produciría en las regiones hidrofóbas, como las membranas lipídicas¹⁵⁷.

La reacción entre el óxido nítrico y el oxígeno, en medio acuoso, es de segundo orden con respecto al NO^\bullet ²²⁰, lo cual hace que la vida media del óxido nítrico en solución acuosa, sea proporcional a su concentración, y permite a otras reacciones de primer orden del óxido nítrico predominar aun bajo condiciones aeróbicas. Como el óxido nítrico difunde fácilmente desde su lugar de producción, se diluye rápidamente, protegiéndolo de reaccionar con el oxígeno, por lo que estas reacciones sólo son factibles con concentraciones suprafisiológicas de óxido nítrico, en las que su autooxidación aumenta exponencialmente. En caso de producirse *in vivo*, se originará en condiciones patológicas en las que el óxido nítrico sea generado localmente en gran

cantidad. Por lo que este proceso de oxidación del óxido nítrico por el oxígeno molecular, es menos relevante en los sistemas biológicos normales²²¹.

Hay otras vías más admisibles que conducen a su destrucción. Son las reacciones del óxido nítrico con el anión superóxido^{213,222} o con metales de transición (por ej. el hierro del grupo hemo – $k = 10^2 - 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ – ²²²), que producirán elementos secundarios, algunos muy reactivos y potencialmente tóxicos, que a su vez son capaces de reaccionar con otras moléculas, oxidándolas o nitrándolas²²³.

En condiciones normales la concentración de radical superóxido generado por el metabolismo aeróbico se mantiene notablemente bajo gracias a la acción de la superóxido dismutasa (velocidad de desaparición de superóxido $2 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$, a una concentración normal aproximada del enzima de $10 \mu\text{M}$). Las concentraciones normales (nanomolar) de óxido nítrico son bajas para competir con ésta en la eliminación de radical superóxido (velocidad de desaparición de superóxido, $2 \times 10^2 \text{ s}^{-1}$). Sin embargo, bajo ciertas condiciones patológicas en las que el óxido nítrico se produce a altas concentraciones (de orden micromolar), se convierte en la única molécula biológica que compite con aquella por el radical superóxido (velocidad de desaparición de superóxido, $4 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$), siendo la superóxido dismutasa menos eficiente que él, además de tener una velocidad de reacción específica algo más lenta (ver página 28)³⁷.

La reacción entre el radical superóxido y el óxido nítrico ($k = 6,7 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) da como resultado la formación de anión peroxinitrito (ONOO^-)^{37,69,213,214}.



En esta reacción se liberan 22 kcal/mol por lo que es esencialmente irreversible (por ejemplo, termodinámicamente equivalente a la hidrólisis de dos ATPs)¹⁵⁵.

Dicha reacción se producirá con cierta facilidad en aquellas situaciones que predomine tanto la producción de óxido nítrico y radical superóxido³⁷. Por ejemplo, en la lesión inflamatoria, en la reperusión de tejidos isquémicos, los macrófagos y los neutrófilos producen ambos al mismo ritmo cuando se activan^{51,190,224,225}.

El anión peroxinitrito no es un radical libre ya que los electrones desapareados del óxido nítrico y el radical superóxido se combinan en él formando un nuevo enlace N–O^{155,214}. Puede alterar muchas moléculas biológicas produciendo por ejemplo *N*-nitrosaminas, *S*-nitrosotioles, mediante mecanismos de nitrosación, nitración o nitrosilación oxidativa, lo cual dependerá en gran medida de las cantidades y la velocidad de generación en un lugar determinado de radical superóxido y óxido nítrico^{223,226}. Pero lo que le hace

particularmente tóxico es su notable estabilidad (pK_a de 6,8 a 37 °C), dándole una mayor oportunidad para difundir a través de las células hasta su objetivo; y el hecho que reacciona relativamente despacio; haciendo de él un oxidante selectivo¹⁵⁵. La inusual estabilidad del anión peroxinitrito se debe a estar plegado en conformación *cis*, el cual mediante una reorganización interna producirá nitrato⁶⁹. A pH 7,4 sólo un 20 % del peroxinitrito estará protonado a ácido peroxinitroso con una conformación *trans* mucho más reactiva¹⁵⁵.



Dada su gran inestabilidad, éste último se descompondrá rápidamente en solución acuosa (vida media 1,9 segundos a pH 7,4), produciendo potentes oxidantes, que inicialmente se sugirió serían el radical hidroxilo (o un potente oxidante con una reactividad similar) y el dióxido de nitrógeno^{69,70}.



Sin embargo, según Koppenol^{37,71} esta última reacción no es factible desde el punto de vista termodinámico. Los peroxiácidos mientras tienen un enlace peróxido (O–O), normalmente no se disocian para formar radicales. Así, *a priori* es improbable que el ácido peroxinitroso (HO–ONO) sufra homólisis para formar radical hidroxilo y dióxido de nitrógeno. Koppenol y cols.²²⁷ argumentan que ésta reacción no es posible, y postulan que existe un isómero del ácido peroxinitroso, un compuesto con energía más elevada, siendo esta especie molecular el oxidante, el cual se comportaría con una reactividad parecida al radical hidroxilo, respecto a una gran variedad de moléculas biológicas. Puede representarse como HO••ONO³⁷. En cualquier caso, ya que la energía de activación del HO••ONO está cerca de la energía de disociación del enlace, el grupo OH debe ser muy parecido al radical hidroxilo. Por otro lado, el que el ácido peroxinitroso sufra homólisis o reaccione a través de un intermediario *trans*, es irrelevante en biología, ya que sus efectos serán los mismos³⁷.

Algunos trabajos han implicado al peroxinitrito* en la nitrosación de los tioles. Sin embargo, él por si mismo no es un agente nitrosador. En presencia de metales de transición, incluyendo los centros metálicos de la superóxido dismutasa y la mieloperoxidasa, puede actuar nitrando (añadiendo un grupo NO₂)^{37,155}. Un mecanismo por el que el peroxinitrito puede afectar la nitrosación es mediante la oxidación del óxido nítrico³⁷, la cual puede ocurrir cuando este último está presente a mayores

* A partir de aquí, el término peroxinitrito se utilizará para referir la suma de anión peroxinitrito y su ácido conjugado, el ácido peroxinitroso.

concentraciones que el radical superóxido²²². En condiciones puntuales, también se pueden considerar otros agentes nitrosantes como el N₂O₃ (referencias 37 y 70). La reacción entre el dióxido de carbono (CO₂) y el peroxinitrito ($k = 5.8 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, pH independiente) en medio acuoso, de gran importancia por la ubicuidad y cantidad del primero, implica la formación de especies que son más eficientes que el peroxinitrito o el óxido nítrico como agentes nitradores, como el anión nitrosoperoxocarbonato (ONOOCO₃⁻), el cual se descompone (un 33%) en radical carbonato (CO₃^{•-}) y dióxido de nitrógeno (NO₂[•])^{70,228}. La velocidad de la reacción entre el peroxinitrito con el CO₂ en los sistemas biológicos es más rápida que la descomposición no catalizada del peroxinitrito. Así, muchas de las reacciones del peroxinitrito *in vivo*, probablemente están mediadas por las especies reactivas derivadas de la reacción entre el dióxido de carbono y el peroxinitrito, que por el mismo peroxinitrito²²⁸.

Los procesos oxidativos iniciados por los radicales libres intermedios derivados de la descomposición del peroxinitrito son inhibidos por la producción excesiva de óxido nítrico o radical superóxido, mientras que la vía oxidativa que implica una reacción directa con el peroxinitrito no se altera⁷⁰.

El peroxinitrito puede reaccionar con peróxido de hidrógeno, produciendo oxígeno molecular, y al menos una parte de este oxígeno liberado, está en estado singlete (¹Δ_g)²²⁹, pudiendo contribuir en la citotoxicidad de los macrófagos.

La generación y reactividad del peroxinitrito y de las especies químicas que derivan de él, sugieren que esta vía es importante en las acciones fisiopatológicas del óxido nítrico. Ni el óxido nítrico ni el radical superóxido, se comportan como oxidantes fuertes respecto la mayoría de compuestos orgánicos. Sin embargo, el peroxinitrito es un oxidante potente y versátil, que ataca muchos tipos de moléculas biológicas y produce una rica variedad de productos²²².

El peroxinitrito produce peroxidación lipídica²³⁰, oxidación de los tioles²³¹, y nitración de los grupos funcionales de los aminoácidos^{232,233}, así como oxidación de los componentes del ADN⁹¹. Una reacción del peroxinitrito con una importancia biológica potencial, es la nitración de la tirosina en presencia de iones metálicos, lo cual puede contribuir a la inhibición y alteración de proteínas celulares clave. Aunque también se ha sugerido, que la nitración de la tirosina libre y de los residuos de tirosina en las proteínas, si bien se asocia principalmente con situaciones patológicas, puede tener un significativo y un no reconocido papel en la transmisión de señales, respuesta inmune y metabolismo proteico²³⁴. Por otro lado, aunque es menos potente que el óxido nítrico, también puede incrementar los niveles de guanosinmonofosfato cíclico (GMPc) y producir relajación vascular²³⁵. A concentraciones nanomolares ha mostrado que no es

capaz de dañar la célula endotelial, y sí tener un efecto protector en la lesión por isquemia/reperfusión al inhibir la exteriorización de P-selectina y la consiguiente interacción leucocito – célula endotelial²³⁶.

El óxido nítrico una vez sintetizado no se almacena, contrasta con la mayoría de los mensajeros intercelulares porque difunde rápida y libremente dentro de las células a través de las membranas celulares en la mayoría de los tejidos²³⁷ (en línea recta 50 μm por segundo), con poco consumo o reacción directa. La rápida difusión del óxido nítrico entre las células, en virtud a su lipofilia y pequeño tamaño, es crucial para entender su actividad biológica. La reacción con las moléculas diana depende de la concentración alcanzada^{153,155,238}.

Cuando el óxido nítrico difunde del endotelio a la sangre, reacciona rápidamente con el grupo hemo de la hemoglobina, por el que tiene una afinidad 10000 veces mayor que por el oxígeno, por lo que actúa como un eliminador intravascular, siendo ésta la principal vía de degradación del óxido nítrico endógeno. En ausencia de oxígeno, el óxido nítrico se une a la hemoglobina con una relativa estabilidad $[\text{Hb}(\text{Fe}^{2+})\text{-NO}]$, pero en su presencia se convierte inmediatamente en su metabolito estable nitrato (NO_3^-), oxidándose el hierro del grupo hemo, dando lugar a metahemoglobina (la metahemoglobin reductasa evitará su acumulación intracelular). El nitrato formado se elimina por el riñón. Unido al hierro férrico del grupo hemo puede nitrosar fenoles, aminas secundarias (mucho se ha escrito de las nitrosaminas debido a su potencial acción carcinogénica)^{153,155,239}.

También se ha propuesto una función de transporte de óxido nítrico por la hemoglobina, mediante la nitrosación de un residuo de cisteína formando *S*-nitrosohemoglobina (SNO-Hb), y por la $\text{Hb}(\text{Fe}^{2+})\text{-NO}$ (referencia 239).

Mecanismo de acción y acciones^{35,153,157,218,219,238,240-243}

Los efectos farmacológicos y los mecanismos de acción del óxido nítrico eran bien conocidos antes del descubrimiento de su formación endógena. A diferencia de los transmisores clásicos, que tienen estructuras complejas y su acción depende de una unión a un receptor específico, el óxido nítrico actúa mediante una amplia gama de reacciones químicas en virtud a su facilidad para formar uniones covalentes. El óxido nítrico no se almacena, sino que difunde fácilmente desde su lugar de formación, mientras que los mediadores clásicos normalmente se almacenan en gránulos desde los cuales se liberan tras el estímulo específico.

El óxido nítrico puede actuar como un regulador, un agente protector o un tóxico. Las acciones dependientes del óxido nítrico se han clasificado en dos categorías diferentes: efectos directos e indirectos. Los efectos directos son el resultado de las reacciones entre el óxido nítrico y moléculas específicas. Los efectos indirectos son los que resultan de reacciones entre especies reactivas derivadas del óxido nítrico (ERDON), con diversas biomoléculas. La bioquímica del peroxinitrito cae dentro de esta última categoría.

La ventaja de hacer distinción entre estas dos categorías es que la cinética de autooxidación limita los efectos indirectos a la presencia de altas concentraciones de óxido nítrico (localmente $> 10\text{-}20 \mu\text{M}$), derivado de la iNOS; mientras que los efectos directos probablemente dominan a bajas concentraciones (localmente $< 5\text{-}10 \mu\text{M}$), pudiendo proceder de las formas constitutivas de NOS y de la eNOS. Por tanto, el hecho que predominen las acciones directas o indirectas depende de las concentraciones de óxido nítrico.

EFECTOS DIRECTOS

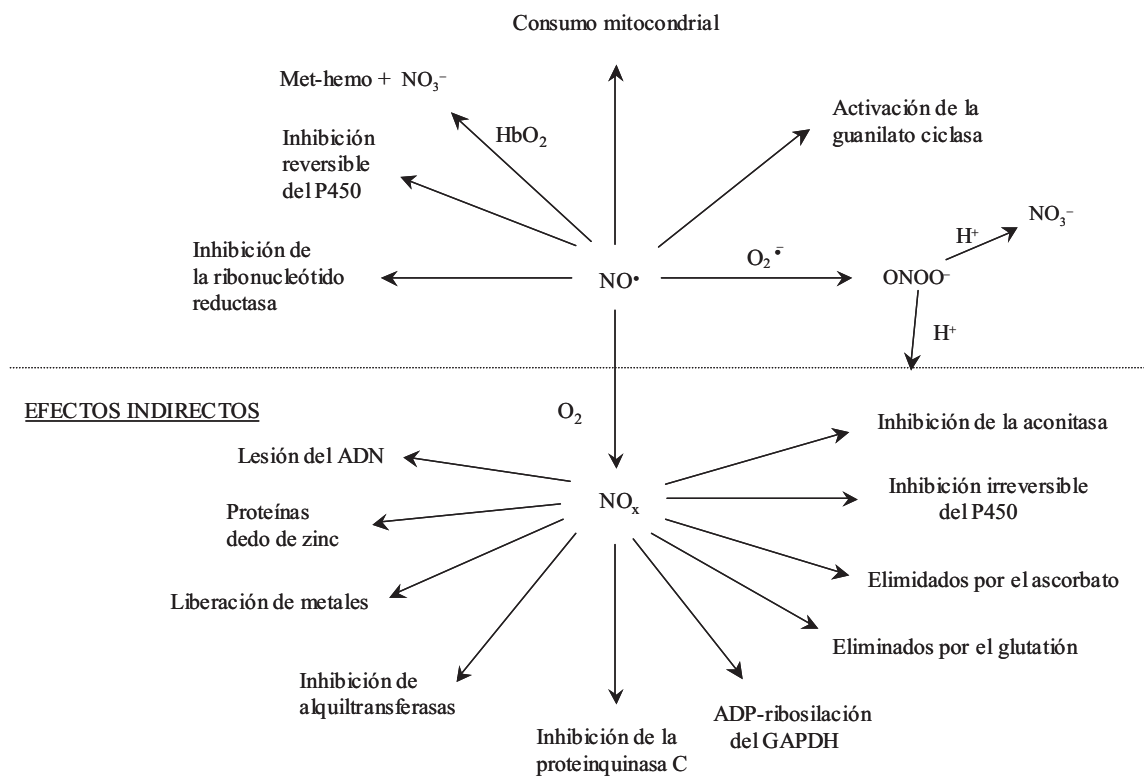


Figura 3. Resumen de las reacciones bioquímicas del óxido nítrico en cuanto a efectos directos e indirectos²¹⁸.

Otra importante consideración es la distancia del objetivo desde la fuente generadora de óxido nítrico. Las células o tejidos cercanos a dicha fuente puede experimentar tanto acciones directas como indirectas, los lejanos sólo sufrirán efectos directos debido a que

la concentración de óxido nítrico decrece como consecuencia de la difusión y del consumo biológico. Por lo tanto factores espaciales y temporales son importantes a la hora de considerar la química responsable de efectos biológicos concretos.

Efectos directos

Los efectos directos pueden ser tanto beneficiosos como perjudiciales. Consisten en reacciones en las que el óxido nítrico por sí mismo interactúa con las dianas biológicas, produciendo actividades tales como la regulación de la acción de la guanilato ciclasa soluble; protección antioxidante contra las especies reactivas del oxígeno, en la que el óxido nítrico directamente las capta y/o previene su formación; terminación de la peroxidación lipídica. El óxido nítrico puede ser consumido por la mitocondria y captado por la hemoglobina. Reacciona de manera reversible con enzimas como la citocromo P450 inhibiendo el metabolismo de diversas drogas. Produce radiosensibilización de las células hipóxicas.

Reacción con los metales

La reacción del óxido nítrico con algunos complejos con metales de transición (no todos) forma aductos metal-nitrosilo. Reacciona con diferentes estados de oxidación del hierro, cobre, cobalto o níquel, pero no con iones diamagnéticos como el zinc. Así, la reacción entre el óxido nítrico y los complejos metálicos dependen tanto de la valencia del metal, como de los ligandos en la esfera de coordinación. Las proteínas que contienen el grupo hemo son importantes en la biología del óxido nítrico. El óxido nítrico puede reaccionar tanto con el hierro en estado ferroso como férrico, aunque como regla general tiene mayor afinidad con los complejos con hierro ferroso.

En 1977 el grupo de Murad²⁴⁴ ya había propuesto que el óxido nítrico y sustancias a las que denominó “nitrocompuestos”, las cuales se metabolizaban liberando óxido nítrico, incrementaba la actividad de la guanilato ciclasa soluble, catalizando la formación de GMPc. Y manifestaban con gran visión que: “La activación de la guanilato ciclasa por parte del óxido nítrico es un mecanismo nuevo de regulación enzimática que puede estar implicado en la regulación de otros enzimas y sistemas”.

El óxido nítrico es el arquetipo de hormona local que actúa como un mediador paracrino o autacoide, es efectivo sólo en la vecindad de las células que lo producen. El que escapa al torrente circulatorio es inactivado a los pocos segundos. Difundiendo desde el lugar de síntesis, activa la guanilato ciclasa soluble de las células vecinas, aunque también puede actuar en la misma célula productora (efecto autocrino).

Así pues, el óxido nítrico activa a la guanilato ciclasa soluble interaccionando con el hierro ferroso del grupo prostético hemo^{165,240}, con el que tiene una afinidad mucho mayor que el oxígeno¹⁵⁵. Esto conduce a la formación de GMPc a partir del guanosintrifosfato (GTP), el cual actúa como segundo mensajero en muchas células, incluyendo nervios, músculo liso, monocitos y plaquetas²⁴⁵. El incremento de GMPc en el interior de las células afecta a proteína quinasa, fosfodiesterasas, canales iónicos, y posiblemente otras proteínas. La activación de la proteína quinasa dependiente del GMPc, en las células musculares lisas de los vasos sanguíneos, produce la desfosforilación de la cadena ligera de miosina causando relajación del músculo liso²⁴⁶, disminuyendo la resistencia vascular periférica y la presión arterial¹⁶⁶. Además, en determinadas circunstancias, el óxido nítrico produce hiperpolarización del músculo liso vascular como consecuencia de la activación de los canales de K⁺ dependientes del Ca⁺⁺, parece que en este caso, sin significativos cambios en la producción de GMPc en el músculo liso vascular²⁴⁷.

El óxido nítrico igualmente actúa sobre las plaquetas, las cuales a su vez también lo producen de manera idéntica al endotelio, actuando como un mecanismo de retroalimentación negativo, inhibiendo su activación y por ende la agregación¹⁶³ y adhesión^{211,212} plaquetaria. Esta acción es sinérgica a la de la prostaciclina¹⁶³, la cual inhibe la agregación de las plaquetas incrementando sus concentraciones de AMPc¹⁶⁵.

El GMPc está implicado en la inhibición de la adhesión y migración de los leucocitos²⁰³, y la proliferación tanto de células musculares lisas como de fibroblastos, acciones que contribuyen a la actividad antiaterogénica del óxido nítrico. Participa por tanto, en el control de la homeostasis de la vasculatura. La producción de óxido nítrico endotelial influye en la permeabilidad del endotelio a la albúmina^{203,206,207,248}.

El grupo hemo de la forma soluble de guanilato ciclasa es claramente uno de los lugares más sensibles e importantes en la acción del óxido nítrico.

Ya hemos comentado que uno de los mecanismos principales de control de las concentraciones de óxido nítrico *in vivo*, es la reacción directa entre éste y las metaloproteínas como la oximioglobina u oxihemoglobina ($k = 3-5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) para formar nitrato (NO₃⁻) y metamioglobina o metahemoglobina^{241,249}.

Cada vez hay más evidencias que las reacciones de oxidorreducción que sufren determinadas proteínas, pueden modificar actividades enzimáticas, representando una nueva vía en la red de comunicación celular. Puede modular la producción de metabolitos activos del ácido araquidónico activando directamente la ciclooxigenasa (COX-1 y COX-2). Es capaz por ello de inducir la síntesis de prostaciclina (PGI₂). Esto

no es extraño ya que este enzima contiene también un grupo hemo, al cual nitrosaría de manera análoga a la guanilato ciclasa soluble. Este efecto del óxido nítrico es independiente de la producción de GMPC¹⁵³.

El óxido nítrico puede inhibir de manera reversible enzimas que contienen metales de transición o intermediarios radicales libres en su ciclo catalítico, tales como lipoxigenasas, peroxidasas, la citocromo P-450, la tromboxano sintetasa, la catalasa y la ribonucleótido reductasa, un enzima fundamental en la síntesis de ADN, lo cual visto desde el punto de vista de la defensa del huésped, la inhibición de éste enzima inhibiría la replicación viral^{80,153,155,157,241,250}. El peroxinitrito en condiciones fisiológicas, a su vez puede controlar el tono vascular nitrando un residuo tirosina en la prostaciclina sintasa²²⁶.

En la mitocondria, cuando las concentraciones de óxido nítrico son bajas, éste se consume durante la respiración y no por autooxidación. Se le ha implicado en la inhibición de la respiración y el metabolismo energético al inhabilitar enzimas del ciclo de Krebs y de la cadena de transporte electrónico (aunque inicialmente se le implicó en la inhibición de la *cis*-aconitasa, quien realmente la inactiva es el peroxinitrito), esta inhibición es fácilmente reversible, con lo que puede actuar en los procesos reguladores que controlan la utilización del oxígeno tisular²⁵¹. También puede inhibir de manera reversible la citocromo-*c* oxidasa²⁴¹, por lo que se le ha propuesto en la regulación de la respiración mitocondrial, una acción que podría estar implicada tanto en sus efectos fisiológicos como patológicos, dado que puede incrementar temporalmente el escape de radical superóxido desde la cadena de transporte electrónico. El óxido nítrico a altas concentraciones puede sufrir autooxidación generando NO_x, y además si reacciona con la superóxido dismutasa mitocondrial, el radical superóxido no eliminado, puede hacerlo con el óxido nítrico y formar peroxinitrito, el cual dañaría la mitocondria de manera irreversible^{153,155,218,233}.

La inhibición de la ribonucleótido reductasa que cataliza la síntesis de los desoxi-ribonucleótidos del ADN, posee centros activos con capacidad potencial para reaccionar con el óxido nítrico, inhibiendo en ese caso la síntesis de ADN y la división celular, lo cual puede ser un mecanismo antitumoral.

Debido a sus efectos citotóxicos también está implicado en la defensa no específica del huésped contra numerosos patógenos, nitrosando los ácidos nucleicos y uniéndose a enzimas que poseen grupo hemo, incluyendo las implicadas en la respiración celular; y contra las células tumorales, aunque hay quien opina que la acción antitumoral de los macrófagos activados se debe más al peroxinitrito que al óxido nítrico.

Reacción con radicales o especies reactivas del oxígeno

Se ha observado que los radicales alquilo (R^\bullet), alcoxilo (RO^\bullet) y alquilperoxilo (ROO^\bullet), reaccionan rápidamente con el óxido nítrico ($k = 2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), produciéndose peroxinitritos orgánicos considerados como especies no radicales derivadas del nitrógeno^{171,238}, y mucho más estables que el peroxinitrito:



El radical peroxilo reacciona 10^6 veces más rápido con el óxido nítrico que con los lípidos, lo que puede implicar la terminación de las reacciones en cadena de la peroxidación lipídica. Esto puede ayudar a entender el efecto beneficioso del óxido nítrico en este proceso.

Ya se ha comentado ampliamente la reacción entre el óxido nítrico y el radical superóxido. Es probable que la reacción entre ambos para formar peroxinitrito, tenga un papel crucial en la regulación de las concentraciones de los dos primeros, y por ende en los efectos biológicos derivados de sus acciones. Esto le da al peroxinitrito una relevancia en la organización de funciones fisiológicas vitales a concentraciones nanomolares; sin embargo, a mayores concentraciones, puede oxidar biomoléculas con consecuencias patológicas importantes^{222,236}.

El óxido nítrico puede reaccionar con el radical hidroxilo a una gran velocidad ($k = 1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) dando ácido nitroso (HNO_2), considerado una especie reactiva del nitrógeno no radical:



Ya hemos comentado la reacción entre el óxido nítrico y el dióxido de nitrógeno (ver reacción 40, página 47) ($k = 2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).

Puntualizar que a pesar de lo expuesto, el óxido nítrico no reacciona con todos los radicales libres.

También puede reaccionar con el peróxido de hidrógeno y producir radical hidroxilo.



Efectos indirectos

Los efectos indirectos son aquellos que derivan de la química de las ERDON. Por tanto requieren una reacción previa ante el óxido nítrico y el oxígeno o el radical superóxido para formar NO_x (especies reactivas del óxido nítrico derivadas de su oxidación por el oxígeno molecular) en el primer caso y peroxinitrito en el segundo. Estos efectos implican a la química de las ERDON: oxidación, nitrosación y nitración. La química oxidativa consiste en quitar uno o dos electrones del sustrato así como reacciones de hidroxilación. La nitrosación sucede cuando un equivalente del NO^+ se añade a una amina, un tiol o a un grupo aromático. Y por último, la nitración de los grupos aromáticos implica la adición de un equivalente del NO_2^+ (ion nitronio).

De manera general, los efectos indirectos producidos por las ERDON se consideran perniciosos, pudiendo producir importantes modificaciones en una gran cantidad de moléculas biológicas: alteran proteínas afectando a la actividad de una gran variedad de enzimas, inician la peroxidación lipídica y dañan el ADN con consecuencias potencialmente perniciosas^{218,238}. Aunque el peroxinitrito a concentraciones nanomolares ha mostrado que no es capaz de dañar la célula endotelial, y sí tener un efecto protector en la lesión por reperfusión al inhibir la exteriorización de P-selectina y la consiguiente interacción leucocito – célula endotelial²³⁶.

Ya hemos comentado que la formación de especies derivadas de la oxidación del óxido nítrico incrementa exponencialmente con la concentración de este último. Dado que el oxígeno generalmente se encuentra en exceso *in vivo*, el óxido nítrico es la sustancia limitante en la reacción de autooxidación. La concentración de este último está limitada *in vivo*, por el consumo del mismo mediante vías asociadas con los efectos directos: metabolismo mitocondrial, captación por parte de la oxihemoglobina, etc.; las reacciones que conducen a la formación de ERDON requieren condiciones específicas en las que haya una concentración local elevada de óxido nítrico. La riqueza en la bioquímica del óxido nítrico puede atribuirse a la gran variedad de ERDON.

El óxido nítrico puede interactuar con las proteínas del plasma formando *S*-nitrosotioles, el más importante de los cuales es el que forma con la albúmina. Éstos no son inactivados por la hemoglobina de los hematíes, y tienen una vida media aproximada de 40 minutos, por lo que se pueden detectar en plasma a concentraciones 3 ó 4 órdenes de magnitud mayor que el óxido nítrico libre²⁵². Previamente se ha hecho referencia a la formación de *S*-nitrosohemoglobina²³⁹. Los *S*-nitrosotioles formados en los tejidos y sangre pueden servir como formas sustitutas de óxido nítrico o como reservorios del mismo, ya que liberan óxido nítrico por un periodo de tiempo y activan la guanilato ciclasa soluble *in vivo*. Es probable que a pH fisiológico, el óxido nítrico no reaccione

tan fácilmente con los grupos tiol para formar *S*-nitrosotioles, y sí lo hagan las especies derivadas de su oxidación por los que tienen una mayor afinidad. Ya se ha comentado anteriormente que el NO_x en medio acuoso es capaz de llevar a cabo nitrosaciones de los substratos con grupos amino y tiol. La reactividad de los grupos sulfhidrilo hacia las NO_x es 10⁶ veces mayor que hacia los ácidos nucleicos, y 10³ veces mayor que hacia otros aminoácidos excepto la tirosina. En éste contexto, el glutatión puede servir como un eliminador de NO_x y peroxinitrito, contribuyendo por tanto en la destoxicación de ERDON²⁴², que afectarían negativamente a las proteínas que poseen grupos tiol críticos para su función²³³.

Son por tanto especialmente importantes, las interacciones con grupos tiol de las proteínas, que pueden alterar su actividad, sobre todo en aquellas que contengan un grupo tiol crítico para su función, pudiendo contribuir a la citotoxicidad mediada por óxido nítrico. Moléculas reguladoras candidatas a sufrir nitración de los grupos tiol incluyen: proteínas implicadas en los procesos de transducción de señales, receptores como el NMDA (N-metil-D-aspartato), proteínas G, proteína quinasa, proteinfosfatasas, proteasas, ...²³³. Las ERDON pueden inhibir la actividad de la ribonucleótido reductasa, la proteína quinasa C, y la citocromo P450. En esta última, a diferencia del óxido nítrico las ERDON lo hacen de manera irreversible. Se ha propuesto que la ADP-ribosilación del gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) está mediada por el óxido nítrico, vía formación de un *S*-nitrosotiol. Inhiben proteínas reparadoras del ADN⁹¹ como la ADN alquiltransferasa (que repara los residuos O⁶-metilguanina y O⁶-metiltimina), o la proteína Fpg (que repara el daño oxidativo del ADN), las cuales poseen grupos tiol en su sitio activo. El peroxinitrito suprime el metabolismo de la 5-lipoxigenasa, el cual además puede *S*-nitrosilarla⁸⁰.

Aunque algunas enzimas pueden no afectarse en presencia de óxido nítrico, peroxinitrito o NO_x, sí pueden hacerlo los productos derivados de su actividad. Por ejemplo, no afecta la oxidación de la hipoxantina a ácido úrico por la xantina oxidasa, pero tiene efecto sobre la producción de superóxido, el cual puede reducir su concentración²⁵³.

También pueden inestabilizar las uniones de los metales^{132,254}, incrementando la concentración intracelular de complejos con metales de transición de bajo peso molecular promoviendo la toxicidad celular.

Las reacciones directas del óxido nítrico con componentes de la mitocondria y con la hemoglobina, previenen la formación de estas especies, lo mismo que antioxidantes endógenos como el glutatión y el ascorbato pueden tener un papel crítico al captar estas ERDON, previniendo su toxicidad.

Resumiendo, la bioquímica del óxido nítrico se puede simplificar con una razonable aproximación a sólo tres reacciones principales: su unión con el hierro ferroso del grupo hemo en la guanilato ciclasa soluble para activar el GMPc, su eliminación mediante la reacción con la oxihemoglobina y, la formación de especies reactivas derivadas del óxido nítrico. Ciertamente estas tres reacciones son una simplificación, pero un resumen razonable. La difusión es esencial para entender la capacidad del óxido nítrico de actuar como un modulador local, y es un determinante principal de su vida media biológica¹⁵⁵.

Mecanismos de defensa antioxidante y lesión dependiente del óxido nítrico^{153,155,171,218,255}

Se ha escrito mucho sobre los efectos potencialmente tóxicos del óxido nítrico, aunque la mayoría de ellos son, lo más probable, mediados por productos derivados de su oxidación.

El óxido nítrico, el peroxinitrito y las especies reactivas del oxígeno tienen la capacidad de liberar hierro de los depósitos tisulares^{35,132-135,254}, pudiendo entonces participar en la peroxidación lipídica y relacionarse con el proceso de lesión tisular. Ya se ha comentado la posibilidad de que las especies derivadas del óxido nítrico inhiban enzimas intracelulares clave que poseen centros hierro-azufre (Fe-S) produciendo derivados inactivos, estructuras del tipo Fe-RS-NO• (referencias 251, 241). A la inversa, también se ha sugerido que la pérdida de hierro intracelular, como los complejos Fe-RS-NO•, puedan actuar como un mecanismo protector, reduciendo la capacidad del hierro para participar en las acciones lesivas producidas por las especies reactivas del oxígeno. Apuntar que estos complejos con el tiempo se descompondrán después de ser liberados por las células, y si no se dan las condiciones necesarias para su regeneración, se liberará el hierro pudiendo participar en la lesión tisular^{153,241}, especialmente en situaciones como la inflamación en donde se producen especies reactivas del oxígeno. El óxido nítrico posee la capacidad tanto de proteger a las células de los efectos tóxicos mediados por reacciones tipo Fenton, al prevenir la formación de poderosos oxidantes; como de potenciar la lesión oxidativa tisular mediada por el hierro^{35,133}; dependiendo en última instancia de la cantidad de óxido nítrico y del estado antioxidante.

Además de sus acciones citotóxicas, el óxido nítrico también actúa como citoprotector. Posee propiedades antioxidantes, al captar y prevenir la formación de especies reactivas del oxígeno, suprimiendo el estrés oxidativo²⁵⁶. El flujo de óxido nítrico que se requiere para ello es tan bajo como 1-5 µM, pudiendo considerar los efectos antioxidantes se como efectos directos del óxido nítrico. Esto sucede si el peroxinitrito y los productos derivados de él son menos tóxicos que las especies derivadas desde el radical superóxido (radical hidroxilo, ácido hipocloroso, cloraminas, etc.), ya que uno de los principales

mecanismos de lesión asociada con la producción de óxido nítrico *in vivo* es debido a la reacción de éste con el radical superóxido, en la que se forma peroxinitrito^{37,69,213,214}, el cual oxidaría y nitraría una gran variedad de biomoléculas con consecuencias patológicas²²². El peroxinitrito puede alterar la superóxido dismutasa, inhibiéndola mediante la nitración de la tirosina, ésta a su vez en condiciones normales reduce la formación de peroxinitrito, ya que el superóxido es el factor limitante en su formación. La oxidación de los grupos tiol del glutatión agota en mayor o menor medida un importante mecanismo antioxidante, pero también actúa evitando la acción del peroxinitrito. El desbordar las defensas antioxidantes incrementa la posibilidad de alteración y destrucción de macromoléculas críticas tales como el ADN, enzimas, proteínas estructurales, polisacáridos y fosfolípidos de membrana. El daño de los componentes intracelulares mediado por el peroxinitrito está limitado por la superóxido dismutasa y el glutatión^{91,223,226,230-232,242}, la hemoglobina y el ácido úrico lo pueden hacer en el medio extracelular^{233,243}.

El óxido nítrico protege contra la toxicidad mediada por las especies reactivas del oxígeno derivadas del sistema hipoxantina/xantina oxidasa. En la isquemia/reperfusión, a medida que aumenta la concentración de óxido nítrico, la magnitud de la oxidación disminuye. Cuando se genera 2 o 3 veces más óxido nítrico que radical superóxido, el primero actúa como un mecanismo de defensa antioxidante aboliendo las acciones del peroxinitrito²²⁶. Sin embargo, altas concentraciones de óxido nítrico reaccionarían con el oxígeno molecular (autooxidación) produciendo NO_x con la posibilidad de inhibir proteínas con las correspondientes consecuencias.

El óxido nítrico también puede reaccionar rápidamente con radicales derivados de la peroxidación lipídica, y a pesar de encontrarse en la pared arterial a una concentración aproximadamente 100 veces menor que el α -tocoferol, lo hace de una manera más efectiva¹⁷¹.

Ya se ha apuntado la participación del óxido nítrico en la inmunidad y la inflamación, pudiendo representar una parte de la lesión tisular. Puede ser tanto citostático como citotóxico, no sólo para los microorganismos invasores sino también para las células que lo producen y las células vecinas. Por tanto, es probable que el óxido nítrico tenga una aportación multifactorial en las reacciones inflamatorias, yendo desde la vasodilatación y formación de edema, a través de la modulación de las terminaciones nerviosas, la actividad de los leucocitos, hasta la citotoxicidad celular¹⁶⁵.

Además, la descomposición del radical superóxido por parte del óxido nítrico producido por las células endoteliales, puede actuar como un modulador endógeno regulando la homeostasis de la barrera intestinal²¹⁰, la reactividad de los leucocitos^{204,257}, y las

interacciones entre el leucocito y el endotelio vascular, inhibiendo la adhesión leucocitaria^{202,258-260}.

En resumen, la toxicidad del óxido nítrico es modesta, deriva fundamentalmente de sus metabolitos oxidados (ONOO^- , NO_2^* ,...), cuando las acciones de éstos exceden la capacidad celular de detoxificarlos. El glutatión interactúa con las especies reactivas derivadas de la oxidación del óxido nítrico convirtiéndolas en otras menos tóxicas. La depleción del glutatión, la inhibición de la superóxido dismutasa mitocondrial, y quizás la pérdida de otros mecanismos defensivos antioxidantes pueden provocar un aumento en los niveles endógenos de especies reactivas del oxígeno producidas normalmente por el metabolismo, lo cual es probable aumente la toxicidad del óxido nítrico. Por este medio las especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno pueden actuar conjuntamente y causar peroxidación lipídica, romper las cadenas de ADN y producir lesiones irreversibles y muerte celulares. Por otro lado, el óxido nítrico protege del estrés oxidativo provocado por el radical superóxido, peróxido de hidrógeno y alquilperóxidos. Hay varias reacciones químicas que pueden explicar estos efectos protectores, tales como la prevención de la oxidación del grupo hemo por parte del peróxido de hidrógeno, inhibición de las oxidaciones tipo Fenton, y la disminución de la peroxidación lipídica. Todo junto muestra que el óxido nítrico a bajas concentraciones protege claramente contra la toxicidad mediada por los peróxidos²⁵⁵.

El óxido nítrico y la enfermedad^{91,102,151-154,157,165,166,169-172}

La amplia distribución de la NOS y las diversas acciones del óxido nítrico, sugiere que alteraciones en su síntesis pueden estar implicadas en la fisiopatología de numerosas enfermedades. Ya sea tanto por un incremento, o una disminución en su producción.

Sin pretender una presentación exhaustiva, la producción excesiva de óxido nítrico puede ser importante en diversas enfermedades neurodegenerativas, artritis reumatoide, colitis ulcerosa, estenosis pilórica hipertrófica, cirrosis, síndrome del distrés respiratorio del adulto, asma, choque séptico, cáncer, entre otras. Por otro lado, se observa una menor producción en pacientes con hipercolesterolemia y otros factores de riesgo de aterosclerosis como la hipertensión arterial, pudiendo contribuir a la aterogénesis, situación en la que ha mostrado su beneficio la administración de L-arginina.

Las células endoteliales vasculares, pueden producir óxido nítrico y radical superóxido, lo mismo que los leucocitos adheridos a éstas, con la posible interacción entre ambos, y las posibles consecuencias ya descritas, reguladoras o tóxicas. El óxido nítrico es un factor protector contra la arteriosclerosis al inhibir la peroxidación lipídica mediada por los metales, la lipooxigenasa, y prevenir la agregación y adhesión leucocitaria.

Como se describe en el siguiente capítulo, el óxido nítrico también está implicado en el síndrome de isquemia/reperfusión.

Lesión por isquemia/reperfusión^{49,51,261-266}

Desde hace muchos años se han evaluado las consecuencias funcionales que produce la falta de suministro de sangre a un tejido. Se asumía que la lesión se producía durante el periodo de hipoxia, y uno de los factores era la depleción de ATP (adenosintrifosfato)²⁶⁷⁻²⁷². Por ello, la restitución rápida del flujo sanguíneo a los tejidos isquémicos es esencial para detener la progresión de la lesión celular asociada a un aporte de oxígeno y nutrientes disminuidos²⁷³. Considerar únicamente esto, implicaría que acortar al máximo el periodo de isquemia sería la única intervención importante para disminuir el grado de lesión. Sin embargo, en la reperfusión se inician una serie de reacciones complejas que paradójicamente lesionan más los tejidos isquémicos, limitando su recuperación^{46,55,274-279}. A esto se le conoce desde 1951 como la *paradoja del oxígeno*²⁸⁰, pese a que los primeros en aplicar este término fueron Ruff y Strughold en 1939²⁸⁰. Sin embargo, fue en 1973 cuando Hearse y cols.²⁸¹ hicieron referencia por primera vez al concepto de lesión por reoxigenación, y Fridovich⁶ en 1979 implicando a las especies reactivas del oxígeno como factores causales.

Por lo tanto, hay básicamente dos eventos que pueden inducir la lesión tisular intestinal en situaciones de isquemia: la hipoxia y la reperfusión. Si bien es cierto que la isquemia producirá en última instancia la muerte tisular, si tiene una duración y severidad suficientes^{273,282}, el término “lesión isquémica” en muchos casos es una denominación equivocada.

La tolerancia a la hipoxia de los diversos tipos celulares, difiere dependiendo de las necesidades metabólicas y de los mecanismos adaptativos propios de cada tejido. Por ello la hipoxia transitoria (no prolongada) puede, no tener consecuencias aparentes, o acompañarse de una mayor resistencia a las consecuencias nocivas de un posterior periodo de hipoxia (condicionamiento isquémico), o ir seguida de una recuperación, o de un agravamiento de la lesión celular (lesión por reoxigenación).

Definición

La lesión por reperfusión es el daño que se le produce a un órgano o tejido durante la restitución del flujo sanguíneo, tras un episodio de isquemia. Aunque para ser más exactos debería decirse que es la hipoxia y no la isquemia la que determina el grado de lesión durante la reperfusión de los tejidos isquémicos, o mejor, durante la reoxigenación de los mismos. Esto puede distinguirse de la lesión causada por la isquemia *per se*, aunque las condiciones necesarias para causar la lesión por reperfusión se generan durante el periodo isquémico^{261,283-285}.

Pese a que se han propuesto diversos mecanismos para explicar la patogénesis de la lesión debida a la isquemia y posterior reperfusión (cambios en la tensión del oxígeno tisular²⁸⁶, pH²⁸⁶⁻²⁸⁸, vasocongestión^{48,278,282,289}, catecolaminas^{53,136,146,290}, acumulación de metabolitos del ácido araquidónico^{146,291-294}, activación de proteasas intracelulares^{47,295,296}, proteasas pancreáticas en la luz intestinal²⁹⁷⁻²⁹⁹, cambios en la homeostasis del calcio^{146,300-303}, activación de la fosfolipasa A₂^{264,304-307}, histamina³⁰⁸, entre otros⁵¹), la mayor parte de la atención se ha enfocado en la contribución de las especies reactivas del oxígeno^{46,48,264-266,309-315}, de los leucocitos^{48,55,266,316-319}, y del óxido nítrico^{190,225,248,266,315,320-324}.

Mecanismos de la lesión por isquemia/reperfusión en el intestino delgado

Especies reactivas del oxígeno

Las especies reactivas del oxígeno tienen un importante papel en la disfunción microvascular y lesión de las células parenquimatosas, que se observa tras la reperfusión de los tejidos y órganos isquémicos (estómago³²⁵⁻³²⁸, pulmón³²⁹⁻³³¹, músculo esquelético³³²⁻³³⁴, en el síndrome compartimental⁹⁹, hígado^{143,335,336}, corazón^{146,301,337-344}, riñón³⁴⁵⁻³⁴⁷, piel³⁴⁸⁻³⁵³, sistema nervioso³⁵⁴⁻³⁵⁸, e intestino delgado^{46,262,275,277,278,295,311-315,359-361}), los cuales deben exponerse al oxígeno molecular en la reperfusión para que se produzca la lesión celular^{277,281,325,333}. En este periodo se inician una serie de procesos que generan especies reactivas del oxígeno, que las implica como responsables primarios de la mencionada lesión^{46,48,49,261,265,309}.

Este concepto está respaldado por:

1. Utilizando diferentes técnicas, se pueden detectar de una manera directa diferentes especies reactivas del oxígeno en los tejidos reperfundidos^{145,283,362-370}. A su vez, encontrar en los tejidos postisquémicos productos derivados de la peroxidación lipídica (por ej. malondialdehído, hidroperóxidos lipídicos, 4-hidroxinonal, dienos

conjugados), glutatión oxidado y proteínas plasmáticas oxidadas, son pruebas indirectas de esta implicación^{82,83,88,145,304,310,334,371-379}.

2. La exposición de los tejidos a sistemas que generan especies reactivas del oxígeno exógenas en ausencia de isquemia/reperfusión, produce cambios estructurales y funcionales semejantes a los observados en los tejidos postisquémicos^{279,337,380-384}.
3. El tratamiento con sustancias que limitan la producción de oxidantes (por ej. los inhibidores de xantina oxidasa tales como el alopurinol^{257,275,276,283,296,373,385-391}, su metabolito oxipurinol^{312,374,386}, o pterin aldehído³⁸⁵), o que eliminan especies reactivas del oxígeno después de ser producidos (por ej. superóxido dismutasa, catalasa,...), atenúan la lesión por isquemia/reperfusión^{46,117,257,275,278,287,359,373,378,379,389,392,393}. El observar que la administración de eliminadores de radical hidroxilo o quelantes de hierro, son tan efectivas como la superóxido dismutasa o el alopurinol en reducir la disfunción del tejido postisquémico, hace pensar que el radical hidroxilo, contribuye en la patogénesis de la isquemia/reperfusión del intestino delgado^{276,295,359,373,394}.
4. La utilización de animales transgénicos (mutantes) que en condiciones normales poseen una mayor cantidad de superóxido dismutasa, muestran una mayor protección contra la lesión por isquemia/reperfusión^{378,395-397}. Asimismo, la inactivación funcional del gen Sod I en ratones, los hace más vulnerables a la lesión por isquemia/reperfusión³⁹⁸.

Aunque hay diversas fuentes potenciales de especies reactivas del oxígeno en los tejidos postisquémicos la mayor parte de la atención se ha enfocado en la xantina oxidasa, un enzima que se encuentra en las células parenquimatosas y en el endotelio vascular; y en la NADPH oxidasa de los leucocitos.

En los primeros trabajos en los que se valoraba la lesión en el intestino debida a isquemia/reperfusión, se observó que se producía un aumento en la permeabilidad vascular fundamentalmente durante la fase de reperfusión y podía bloquearse con la administración previa de las enzimas superóxido dismutasa^{46,278} y catalasa³⁹², o de alopurinol^{275,276}, un inhibidor de la xantina oxidasa, implicando a las especies reactivas del oxígeno en el daño mucoso observado.

Xantina oxidoreductasa^{50,399-402}

La xantina oxidoreductasa de los mamíferos existe en dos formas interconvertibles

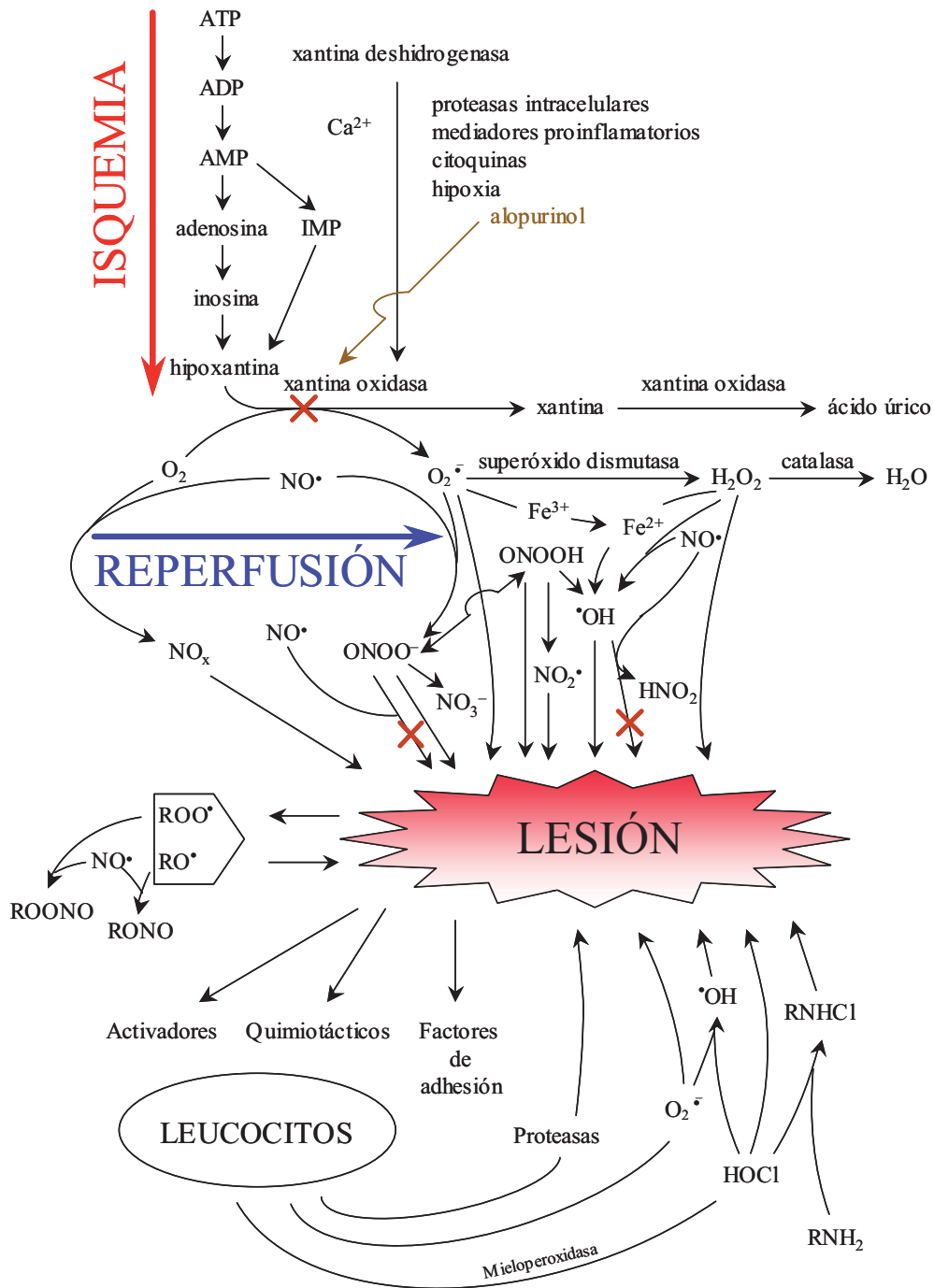


Figura 4. Esquema del mecanismo fisiopatológico de la lesión por isquemia/reperfusión. ATP: adenosintrifosfato, ADP: adenosindifosfato, AMP: adenosinmonofosfato, IMP: inosinmonofosfato, O₂: oxígeno molecular, O₂^{•-}: radical superóxido, H₂O₂: peróxido de hidrógeno, •OH: radical hidroxilo, H₂O₂: peróxido de hidrógeno, H₂O: agua, NO[•]: óxido nítrico, NO_x: especies reactivas del óxido nítrico derivadas de su oxidación por el oxígeno molecular, ONOO⁻: peroxinitrito, ONOOH: ácido peroxinitroso, NO₃⁻: nitrato, NO₂[•]: dióxido de nitrógeno, HNO₂: ácido nitroso, HNO₃: ácido nítrico, ROO[•]: radical peroxilo, RO[•]: radical alcóxido, ROONO y RONO: peroxinitritos orgánicos especies no radicales derivadas del nitrógeno, HOCl: ácido hipocloroso, RNH₂: aminas primarias, RNHCl: N-cloraminas.

funcionalmente distintas, la xantina deshidrogenasa y la xantina oxidasa, y son producto alternativo del mismo gen. Son las hidroxilasas que contienen molibdeno mejor estudiadas. Se localizan en el citosol y en la superficie de la membrana celular. Tienen un peso molecular de aproximadamente 300 kDa, compuesto por dos subunidades idénticas catalíticamente independientes. Cada una de estas se compone de tres dominios que contienen cuatro centros redox, un dominio *N*-terminal (20 kDa) con dos grupos Fe_2S_2 , un dominio central FAD (dinucleótido de flavina y adenina) (40 kDa), y un dominio *C*-terminal con un cofactor molibdeno (85 kDa)^{50,400-402}. Estas enzimas contienen alrededor de 1330 aminoácidos, cuya secuencia mantiene una homología de aproximadamente un 90 % entre las enzimas de la rata y de los humanos⁴⁰³. La xantina oxidasa y la xantina deshidrogenasa muestran reactividades diferentes hacia el oxígeno molecular y el NAD^+ , prefiriendo el primero la xantina oxidasa y el segundo la deshidrogenasa^{403,404}.

El ciclo catalítico incluye la hidroxilación oxidativa de sustratos como la hipoxantina y xantina al reaccionar con el molibdeno, aunque de manera excepcional el NADH entrega su electrón al FAD. A su vez, la reducción del NAD^+ o el oxígeno molecular tiene lugar en el FAD⁴⁰⁰⁻⁴⁰².

Distribución

La xantina oxidasa se encuentra ampliamente repartida entre las especies, desde bacterias hasta el hombre³⁹⁹. Aunque para ser más exactos debemos especificar que en los tejidos no isquémicos la forma predominante es la xantina deshidrogenasa o tipo D^{384,405,406}. Su distribución también es muy amplia, detectable en el plasma⁴⁰⁷⁻⁴¹⁰, leucocitos^{411,412}, macrófagos¹⁸⁷, y en las células parenquimatosas de múltiples tejidos (el intestino delgado, hígado, pulmón, células epiteliales de la glándula mamaria y consiguientemente en la leche de determinados mamíferos, son particularmente ricos) y en el endotelio vascular, menos en el de los grandes vasos, tanto arterias como venas y endocardio^{384,413}. Wajner y Harkness⁴¹⁴ observan una casi nula actividad xantina oxidasa en el cerebro y corazón, aunque las concentraciones de xantina deshidrogenasa son altas, también indican que en la placenta no hay actividad de ambas enzimas.

En el intestino delgado la xantina oxidasa se localiza principalmente en las células epiteliales de la mucosa⁴¹⁵, con un gradiente de mayor a menor que va desde las puntas a las bases de las vellosidades y desde la mucosa del ileon hasta la del duodeno.

Funciones

Es un enzima muy versátil, participa en la oxidación de una amplia variedad de

substratos tanto endógenos (por ej. purinas) como exógenos (por ej. alcohol). Su función más reconocida es como factor limitante de la degradación de los ácidos nucleicos, durante la cual las purinas son oxidadas hasta ácido úrico.

Mucho menos conocida es la capacidad de la xantina oxidoreductasa para catalizar la reducción de los nitratos y nitritos a óxido nítrico, en presencia de NADH, bajo condiciones de hipoxia. Esto junto con la localización vascular del enzima, sugiere que la xantina oxidoreductasa puede contribuir como fuente de óxido nítrico a partir de nitratos y nitritos endógenos en condiciones isquémicas, situaciones en las que la NOS no es efectiva, por lo que la actividad de ambas enzimas respecto a este aspecto se puede considerar complementaria⁴¹⁶. Los nitratos y nitritos inorgánicos aceptan electrones del centro molibdeno, en contraste de los nitratos orgánicos, que son reducidos en el centro FAD⁴⁰².

La activación de la xantina oxidasa desde la xantina deshidrogenasa (concepto que se discute más adelante), no sucede sólo en respuesta a proteasas e isquemia, sino también a una variedad de mediadores proinflamatorios (factor de necrosis tumoral alfa –TNF α –, interleucina-3, componente del complemento C5a, ...). Por lo que en condiciones fisiológicas la xantina oxidasa puede formar parte de un mecanismo defensivo antimicrobiano, dada su capacidad de producir radical superóxido y peróxido de hidrógeno; y en presencia de nitritos, óxido nítrico, que al reaccionar con el radical superóxido originará peroxinitrito. Las especies reactivas del oxígeno derivadas de ésta iniciarían una respuesta inflamatoria en la microvasculatura facilitando la destrucción de patógenos circulantes, pero que en el caso de la isquemia/reperfusión tiene unas connotaciones lesivas. Esta propiedad justifica su distribución y la gran cantidad de enzima presente en el epitelio intestinal, tracto biliar, leche materna^{50,402}. El óxido nítrico a su vez es capaz de inactivar la xantina oxidasa al reaccionar con un grupo tiol esencial del centro molibdeno reducido⁴¹⁷.

Otra dualidad del enzima es la ya comentada capacidad de producir potentes oxidantes, pero también genera ácido úrico, un potente antioxidante^{92,124-126}.

La estimulación celular con citoquinas como el interferón- γ inducen la síntesis de xantina deshidrogenasa, aunque al mismo tiempo produce una inhibición postranscripcional de la actividad de la xantina deshidrogenasa y xantina oxidasa, debido a la producción de óxido nítrico, también inducida por la mencionada citoquina, el cual puede reaccionar con los grupos Fe₂S₂ o los grupos sulfhidrilo de la xantina oxidasa inhibiendo su actividad¹⁸⁷. La inactivación de la xantina deshidrogenasa y xantina oxidasa puede representar otro aspecto protector del óxido nítrico en el lugar de la inflamación.

Además, la xantina oxidasa tiene una función importante en la absorción del hierro a nivel de la mucosa del intestino delgado¹³⁸. Oxidándolo a su estado férrico¹³⁷ promueve su incorporación a la transferrina de la mucosa¹³⁸. La xantina deshidrogenasa, que no tiene capacidad ferroxidasa¹³⁷, está implicada en la movilización del hierro desde las reservas de ferritina^{138,139}, lo mismo que la xantina oxidasa en condiciones de anaerobiosis, mediante un mecanismo independiente a la producción de radical superóxido¹³⁶. Ghio y cols.⁴¹⁸ informan que la concentración de hierro a su vez regula los niveles y la actividad de la xantina oxidoreductasa en el pulmón siguiendo una correlación positiva, sin causar conversión de xantina deshidrogenasa a xantina oxidasa. Algo que ya había sido descrito respecto a la xantina oxidasa intestinal. Esto sugiere la posibilidad que la producción de ácido úrico uno de los principales captadores de hierro en el líquido extracelular, está directamente influenciado por el mismo hierro, por regular la expresión y/o actividad de su enzima productora, la xantina oxidasa.

Isquemia/reperfusión y especies reactivas del oxígeno derivadas de la xantina oxidasa

El mecanismo de la lesión por reperfusión en el intestino delgado mediado por la xantina oxidasa fue propuesto por Granger y cols. en 1981⁴⁶. Esto se basa por un lado en el descubrimiento de McCord y Fridovich⁴⁴ en 1968, que la xantina produce radical superóxido cuando se oxida en presencia de xantina oxidasa; y por otro lado, que la hipoxantina derivada de la degradación del ATP se acumula en los tejidos y plasma durante la hipoxia^{419,420}. Postulan⁴⁶ la importancia del sistema hipoxantina/xantina oxidasa en la lesión por hipoxia/reoxigenación en el intestino delgado. Esta observación ha sido corroborada por numerosos trabajos basándose en la observación que el alopurinol, un potente inhibidor competitivo de la xantina oxidasa, proporciona protección contra la lesión por reperfusión comparable a la ofrecida por los eliminadores de especies reactivas del oxígeno (ver referencias bibliográficas en la página 64).

Durante la isquemia se detiene la fosforilación oxidativa mitocondrial, rompiéndose el equilibrio entre el consumo y la formación de ATP, debido a las bajas concentraciones de oxígeno. La producción celular de ATP se hace dependiente de la fosforilación anaerobia, la cual sólo compensa en parte la disminución de éste, con la consiguiente formación de lactato a partir de glucosa. Esto da lugar a niveles elevados de lactato y NADH (nicotinamida adenindinucleótido reducido), y bajos de NAD⁺ (nicotinamida adenindinucleótido), lo que determina la inhibición de la glucólisis y la caída de los niveles de ATP y ADP (adenosindifosfato) mientras su consumo aún continúa (se observa una depleción completa de ATP intestinal a los 20 minutos de isquemia, por lo que en isquemias más prolongadas no se observan descensos adicionales)^{271,272}. Aunque, Siems y cols.³⁷⁴ indican una rápida disminución de las concentraciones de los nucleótidos ATP y

GMP tras el comienzo de la isquemia, sin embargo discrepan en el sentido que no aprecian una completa depleción de estos metabolitos en las células epiteliales de mucosa intestinal. Lo mismo que Salzman y cols.⁴²¹ que tras 120 minutos de isquemia hallan una marcada disminución de los niveles de ATP, pero que no es total. Lo que sí está claro es (figura 5) el catabolismo del ATP a AMP (adenosinmonofosfato), posteriormente a adenosina, y esta última es degradada a inosina e hipoxantina^{367,377}. Una vía alternativa desde el AMP es a través del inosinmonofosfato (IMP) hasta la hipoxantina²⁷².

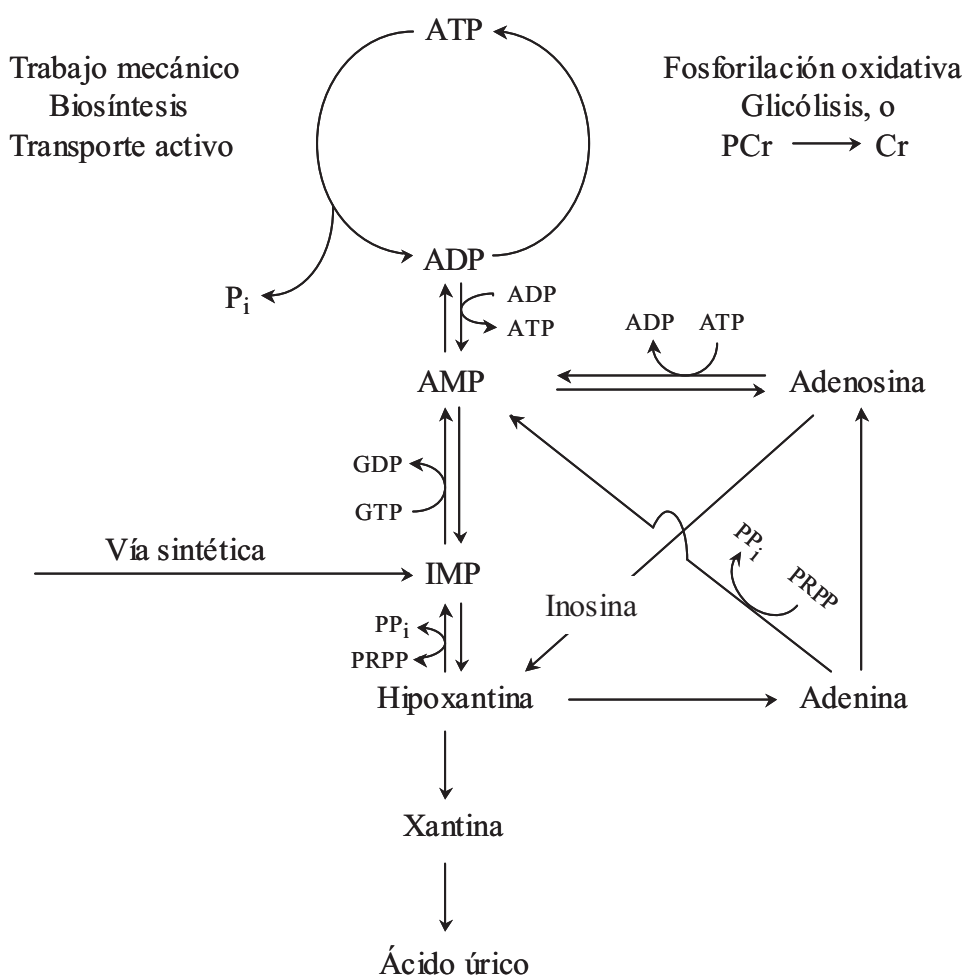
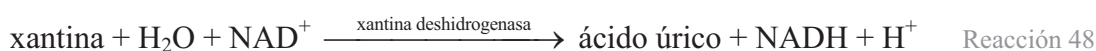
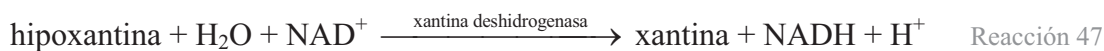


Figura 5. Representación esquemática de las vías biosintética, de degradación y recuperación de las purinas en la isquemia aguda²⁷². ATP: adenosintrifosfato, ADP: adenosindifosfato, Pi: fósforo inorgánico, PCr: fosfocreatina, AMP: adenosinmonofosfato, Cr: creatina, GDP: guanodifosfato, GTP: guanotrifosfato, IMP: inosinmonofosfato, PPi: pirofosfato, PRPP: 5-fosforibosil-1-pirofosfato.

Entre todos los tejidos la mucosa de la vellosidad intestinal contiene la mayor concentración de xantina deshidrogenasa, a la cual corresponde entre el 80 y el 90 % de

la actividad xantina oxidoreductasa total en el tejido sano^{47,406}. La xantina deshidrogenasa metaboliza a la hipoxantina hasta ácido úrico en dos pasos. Utiliza el NAD^+ como cosustrato receptor de electrones^{399,404}.



La xantina deshidrogenasa, al igual que la xantina oxidasa (ver reacciones 49 y 50, página 73), también puede producir radical superóxido cuando utiliza la hipoxantina o la xantina, y el oxígeno molecular como sustratos. De hecho la xantina deshidrogenasa, por sí misma, es considerablemente más eficiente que la xantina oxidasa en la producción de radical superóxido^{403,422,423}, pero en condiciones normales las células tienen grandes cantidades de NAD^+ , el cual competiría con el oxígeno molecular, y dado que la xantina deshidrogenasa tiene mayor afinidad por el primero que por el segundo, la producción de radical superóxido por este enzima en condiciones fisiológicas no tiene tanta relevancia^{400,403}.

Conversión de xantina deshidrogenasa a xantina oxidasa

Tras un periodo de isquemia intestinal, y como consecuencia de la depleción de ATP la actividad de la Ca^{++} -ATPasa decrece, aumentando la afluencia de calcio intracelular^{300,303}, lo cual provoca que la xantina deshidrogenasa en el intestino sea convertida, por proteólisis, de manera irreversible a xantina oxidasa^{47,404-406,424}. La proteólisis lo que hace es eliminar un fragmento polipeptídico *N*-terminal (20 kDa) de una de las subunidades⁴⁰⁰. Éste sin embargo no es esencial para la actividad oxidasa, pero sí parece ser esencial para mantener la conformación enzimática requerida para la unión e interacción apropiada con el NAD^+ (referencias 425 y 424). Un inhibidor de la tripsina proporciona *in vivo* una protección contra la lesión por isquemia/reperfusión, equiparable a los tratamientos con superóxido dismutasa y alopurinol²⁹⁵.

El punto más controvertido en la conversión de la xantina deshidrogenasa a xantina oxidasa en los tejidos isquémicos es la secuencia temporal. Según algunos trabajos esta conversión es máxima después de pocos minutos^{47,262,364}. En otros estudios, en algunos tejidos y varias especies de animales se ha visto que la conversión de xantina deshidrogenasa a xantina oxidasa ocurre mucho más lentamente y sólo se hace evidente después de varias horas de isquemia^{406,407,426,427}. Ya se ha comentado la escasa actividad xantina oxidasa, y la abundante xantina deshidrogenasa en tejidos como el cerebro y corazón, los cuales se dañan fácilmente tras la depleción de ATP. La estabilidad de la xantina deshidrogenasa a la conversión oxidativa (ver más adelante) o proteolítica sugiere

un mecanismo defensivo contra el daño causado por la xantina oxidasa⁴¹⁴. En el intestino delgado de rata el 50 % de la xantina deshidrogenasa se convierte en xantina oxidasa, sólo tras 2 horas de isquemia⁴⁰⁶.

Otros autores⁴²⁸ observan (en cultivos de células del endotelio microvascular pulmonar) que la conversión de xantina deshidrogenasa a xantina oxidasa no tan sólo es lenta sino insignificante, haciéndose más rápida durante la reoxigenación, y se reafirman argumentando que muchos de los trabajos referenciados^{48,275,407,427} utilizan para el estudio un órgano entero, el cual sufre periodos de perfusión, aunque limitados y reducidos, durante los cuales puede aportarse cierta cantidad de oxígeno. Apoya esto la observación de que en presencia de determinadas cantidades de oxígeno la xantina deshidrogenasa puede convertirse en xantina oxidasa⁴²⁸. Hay evidencia que la xantina deshidrogenasa plasmática se convierte a xantina oxidasa tras sólo un minuto de hipoxia^{407,410}.

Harrison⁴⁰² en su trabajo de revisión comenta que algunos autores que no advierten casi conversión en estudios *in vivo*, sugieren que los datos contradictorios sobre este asunto se pueden atribuir a la homogeneización del tejido y demás procedimientos, por el gran riesgo de la xantina oxidoreductasa a exponerse a proteasas durante el almacenamiento del tejido y su posterior manipulación. Meneshian y Bulkley⁵⁰ en otro trabajo de revisión comentan que al intentar aislar el enzima, o en presencia de calor, solventes orgánicos, proteasas, baja tensión de oxígeno, o bajo ciertas condiciones fisiopatológicas que incluyen la presencia de diversos mediadores proinflamatorios, se producirá la proteólisis de la xantina deshidrogenasa.

Hossain y cols.⁴²⁹, Sanders y cols.^{422,423} y Harrison⁴⁰² también apuntan que la xantina oxidasa no es esencial para la generación de especies reactivas del oxígeno por parte de la xantina oxidoreductasa. Aunque, como ya hemos comentado anteriormente la xantina deshidrogenasa prefiere donar sus electrones al NAD^+ , ésta también reducirá al oxígeno molecular, aunque de manera menos eficiente que la xantina oxidasa. Además, ambas formas del enzima muestran actividad NADH oxidasa, con capacidad para generar especies reactivas del oxígeno, siendo la xantina deshidrogenasa bastante más eficaz respecto a esto. Aunque los niveles elevados de NADH en la isquemia pueden servir para incrementar la producción de especies reactivas del oxígeno mediante la actividad NADH oxidasa de ambas formas del enzima, también se ha argumentado que una concentración elevada de NADH inhibiría la xantina deshidrogenasa desplazando el flujo de electrones hacia la xantina oxidasa con la consiguiente producción de especies reactivas del oxígeno. En consecuencia, una mayor actividad de la xantina oxidoreductasa en conjunto independientemente de la relación xantina

deshidrogenasa/xantina oxidasa, puede servir para incrementar los niveles de especies reactivas del oxígeno^{402,422}.

Friedl y cols. observan *in vitro* una conversión proteolítica rápida (entre 5 y 10 minutos) en células endoteliales, estimuladas por citoquinas como el componente del complemento C5a, o el factor de necrosis tumoral⁴³⁰. En un modelo *in vivo*, al tiempo de conversión se le debería añadir el de la producción de estos mediadores inflamatorios.

Terada y cols.⁴³¹ en su estudio *in vitro*, basándose en una observación previa de que la hipoxia disminuye la actividad de la xantina deshidrogenasa y la xantina oxidasa en la célula endotelial, muestran en su modelo de hipoxia crónica, que ésta induce un incremento en la actividad xantina oxidasa, que no implica una conversión irreversible de la xantina deshidrogenasa a xantina oxidasa, sino más bien un incremento en la suma de actividades de ambas enzimas. Kayyali y cols.⁴³² en otro estudio *in vitro* también observan que la hipoxia, incrementa la actividad xantina deshidrogenasa/xantina oxidasa independiente de síntesis proteica, para lo cual es necesario la fosforilación de la xantina oxidoreductasa a través de un mecanismo que implica a quinasas.

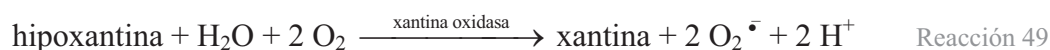
Una explicación física de la conversión no proteolítica de xantina deshidrogenasa a xantina oxidasa compatible con lo expuesto la hicieron Waud y Rajagopalan en 1976^{424,425}. Como ya se ha comentado, la xantina deshidrogenasa es la forma predominante con aproximadamente 14 grupos sulfhidrilos por unidad, en la proximidad de cada centro activo del enzima⁴²⁴. A medida que se van oxidando los grupos sulfhidrilos se forman puentes disulfuro, con una pérdida concomitante de la actividad deshidrogenasa. La conformación del enzima se altera a medida que el número de puentes disulfuro aumenta, lo cual va reduciendo su afinidad por el NAD^+ , hasta que finalmente se pierde la actividad deshidrogenasa formándose una forma reversible de xantina oxidasa, la cual posee aproximadamente 4 grupos sulfhidrilo. Parece ser que un número muy limitado de grupos sulfhidrilo son críticos para mantener la forma deshidrogenasa, y su oxidación sólo tiene lugar después de la de otros grupos sulfhidrilo de la misma molécula⁴²⁴. Kaminski y Jezewska⁴³³ observan que la oxidación de tan sólo un grupo sulfhidrilo en el centro activo del enzima es suficiente para que esta pierda la actividad dependiente del NAD^+ , ya que este grupo tiol esencial, en contraste con los otros no esenciales, está implicado en la unión del NAD^+ con el centro activo de la xantina deshidrogenasa. McManamann y Bain⁴³⁴, en un trabajo reciente demuestran que la conversión de xantina deshidrogenasa a xantina oxidasa implica un cambio estructural global que va unido a una reducción en el aparente tamaño hidrodinámico de la xantina oxidoreductasa. El cambio estructural expone la región circundante a Phe⁵⁶⁰. Cambios estructurales en esta región, parecen ser críticos en la interconversión entre ambas formas del enzima. Este trabajo no apoya las conclusiones basadas en la digestión

proteolítica, en la que alteraciones dentro de la región N-terminal rica en cisteína, por partición a nivel de Lys¹⁸⁵, es responsable de la conversión de xantina deshidrogenasa a xantina oxidasa^{424,434}.

En el tejido sano junto con la xantina deshidrogenasa, existe una segunda forma de xantina oxidasa que se encuentra junto a esta, aunque no deriva de ella. Parece ser un producto intermedio entre la forma deshidrogenasa y la oxidasa. Este tipo de xantina oxidasa puede utilizar como aceptor de electrones tanto al oxígeno como al NAD⁺ (ambos compiten entre sí por el mismo lugar de la molécula) aunque la afinidad es considerablemente mayor para el último. Este producto intermedio posee, y valga la redundancia, un número intermedio de grupos sulfhidrilo expuestos a la oxidación³⁹⁹.

En la proteólisis que sufre la xantina deshidrogenasa o la xantina oxidasa reversible para formar xantina oxidasa irreversible, como se ha comentado previamente, se elimina de la molécula precursora un fragmento polipeptídico de una de las subunidades de 20 kDa, el cual contiene aproximadamente 10 grupos sulfhidrilo³⁹⁹.

Ya se ha apuntado que la hipoxantina se acumula en los tejidos durante la hipoxia como resultado del catabolismo del ATP^{143,145,310,367,369,419-421,429}. Esta puede servir de sustrato tanto de la enzima xantina deshidrogenasa como de la xantina oxidasa. Al no haber suministro de oxígeno, esta mayor concentración tisular de hipoxantina no se metaboliza a xantina y ácido úrico vía xantina oxidasa. Sucede en el momento de la reperfusión, oxidándose las primeras hasta el último (figura 4, reacciones 49 y 50), todo ello catalizado por la xantina oxidasa que transfiere (reduce) en un paso los electrones al oxígeno molecular (en lugar del NAD⁺), y de esa manera se genera como un producto de la oxidación el radical superóxido^{44,435}.



Justo antes de la reperfusión el sistema xantina oxidasa carece sólo de un sustrato para generar especies reactivas del oxígeno, el oxígeno. Al iniciarse, éste es reintroducido de repente y en exceso, esto conlleva mediante la reducción univalente del mismo la generación de superóxido⁴⁴, y/o mediante la reducción divalente la formación de peróxido de hidrógeno⁴³⁶. El que se siga una vía u otra depende del pH, y de la tensión de oxígeno; el aumento de uno o ambos parámetros favorecería la reducción univalente⁴³⁶. Según Porras y cols.⁴⁵ cuando se mezcla xantina oxidasa con altas concentraciones de oxígeno, mediante la transferencia de 6 electrones producirá durante una fase de oxidación rápida 2 moléculas de H₂O₂, y 1 molécula de O₂^{• -} al final de esta

fase; otra molécula de $O_2^{\cdot -}$ se produce más lentamente (la velocidad de esta última fase depende de la concentración de oxígeno). Ambas especies reactivas del oxígeno en presencia de hierro pueden formar radicales hidroxilo (reacción 6 y 7, página 8), el cual parece mediar en la lesión microvascular inducida por isquemia/reperfusión^{276,295,373,394}. Considerando que el intestino es una fuente rica en hierro es probable que este catalice la reacción de Haber-Weiss (reacción 4, página 7) o de Fenton (reacción 7, página 8) a este nivel. La proporción relativa de radical superóxido y peróxido de hidrógeno liberados desde el sitio activo del enzima, dependen del pH, de la concentración de oxígeno molecular y de la concentración de sustrato¹⁴.

Al contrario que antiguamente, cuando se asumía como norma general que la xantina oxidasa producía como única especie reactiva del oxígeno radical superóxido⁴⁴, hoy se sabe que puede producir peróxido de hidrógeno^{45,436}. También se ha sugerido que en condiciones de anaerobiosis el enzima puede reducir el peróxido de hidrógeno a radical hidroxilo⁴³⁵, pero un trabajo posterior demostró que ello era debido a la contaminación inesperada de la preparación de xantina oxidasa con hierro, el cual se encuentra unido al enzima, y es el que cataliza la formación de radical hidroxilo desde el peróxido de hidrógeno⁴³⁷.

Por lo tanto, una producción masiva de especies reactivas del oxígeno puede desbordar las defensas antioxidantes naturales y producir daño oxidativo⁹⁶.

Síndrome de disfunción multiorgánico

Una gran cantidad de datos sugiere que la xantina oxidasa produce estrés oxidativo a nivel intracelular^{117,309,367,368,384,431}. Sin embargo, la xantina oxidasa también puede producir estrés oxidativo en tejidos remotos vía rutas extracelulares (por ej. intravascular) tras la liberación de la xantina oxidasa a la circulación^{391,407-410}, posiblemente por un mecanismo de transporte activo que no por citolisis⁴²⁸.

El intestino isquémico puede liberar a la circulación³⁰⁸ xantina deshidrogenasa (en el plasma es convertida rápida y reversiblemente a xantina oxidasa después de tan sólo un minuto de isquemia^{407,410}) y xantina oxidasa, la cual puede reaccionar con sustratos purínicos, los cuales se acumulan en grandes concentraciones durante la isquemia^{145,419-421} (la hipoxantina atraviesa fácilmente las membranas hasta el espacio extracelular). Esto en la reperfusión favorece la producción de especies reactivas del oxígeno intravasculares a través de la xantina oxidasa circulante o después de que la xantina oxidasa se una y concentre en la superficie de las células endoteliales vasculares.

Tan y cols.⁴¹⁰ observan que la xantina oxidasa se une a las células endoteliales vasculares de manera reversible, de forma parecida a como lo hace la heparina. Esto

junto con una vida media elevada (4 a 6 horas), sugiere que la xantina oxidasa intravascular se encuentra en equilibrio entre la fase vascular y los glicosaminoglicanos sulfatados (incluyendo el sulfato de heparina, heparina, ácido hialurónico, queratin sulfato, y condroitinsulfato) localizados en el glicocáliz de las células endoteliales y en la matriz intersticial. Los glicosaminoglicanos no se localizan sólo en la superficie de las células endoteliales, también se han identificado en fibroblastos y diversas membranas basales. Todas las células y componentes intersticiales tienen algún componente aniónico, con el que podría interaccionar la xantina oxidasa. Todo ello indica que la xantina oxidasa además de unirse a las células endoteliales lo hace a la mayoría de las células en los tejidos y en el intersticio. Por ello la actividad de la xantina oxidasa en la superficie celular puede ser considerablemente mayor que en el plasma.

Este patrón tan diseminado de unión y la concentración de la xantina oxidasa en el glicocáliz apunta a que la xantina oxidasa liberada por la isquemia intestinal puede causar un daño extenso y severo en la vasculatura, tejidos e intersticio, al reaccionar con los sustratos purínicos que se acumulan en el plasma durante la isquemia produciendo especies reactivas del oxígeno^{407,410}.

Además, los mediadores inflamatorios liberados como consecuencia de la reperfusión, pueden activar a leucocitos circulantes y células endoteliales, incrementando la presentación de moléculas de adhesión y promover la interacción neutrófilo – célula endotelial en múltiples lechos vasculares. Así, una consecuencia perjudicial añadida de la reperfusión de tejidos es el desarrollo de lesión en órganos no implicados en la lesión isquémica inicial (pulmón, hígado, corazón, ...)^{291,294,306,307,376,378,409,438-440}. A esto se le conoce como *Síndrome de disfunción multiorgánico*^{441,442}.

Uno de los aspectos más estudiados tras la reperfusión del intestino isquémico es la alteración remota a nivel pulmonar, objetivada por el escape transvascular de albúmina y disminución de los niveles de ATP^{306,307,409,439}. Koike y cols.³⁰⁶ implican a la activación de la fosfolipasa A₂ en este síndrome, generando mediadores lipídicos proinflamatorios que promueven la adhesión entre los leucocitos y la célula endotelial. Más tarde concretan que se trata del grupo IIA de la fosfolipasa A₂³⁰⁷. Terada y cols.⁴⁰⁹ observan que la actividad de la xantina oxidasa circulante se incrementa tras la reperfusión del intestino isquémico, produciendo una acumulación de leucocitos en el pulmón, lo cual apoya una función quimiotáctica (que se sumaría a la de otros mediadores inflamatorios) de la xantina oxidasa mediante la producción de especies reactivas del oxígeno, regulando el tráfico de leucocitos inflamatorios en múltiples órganos. Se ha sugerido que el radical superóxido derivado de la xantina oxidasa puede actuar sobre un componente del plasma normal convirtiéndolo en un potente quimiotáctico que atrae a los neutrófilos

al lugar de la inflamación^{15,52,443}, y que a diferencia de otros factores quimiotácticos (ej. fragmento C5_a del complemento), el factor que depende del superóxido no estimula la degranulación o la producción de radical superóxido en los leucocitos^{15,443}. Zimmerman y cols.³⁵⁹ matizan este concepto al no observar la producción de una sustancia con actividad quimiotáctica significativa tras la interacción entre el radical superóxido y el líquido extracelular de gato, que explique la infiltración de los granulocitos inducida por la reperfusión. Sin embargo, muestran que el peróxido de hidrógeno (el producto de la dismutación del radical superóxido) estimula la quimiotaxis en presencia de hierro catalíticamente activo (hemoglobina, ion ferroso) en el líquido extracelular en el momento de la reperfusión. Lo que está en consonancia con las observaciones de Terada y cols.⁴⁰⁹ los cuales apuntan que las especies reactivas del oxígeno derivadas de la xantina oxidasa circulante median la retención de neutrófilos en el pulmón, pero no su lesión, la cual sucedería por la conjunción con otros factores.

Schoenberg y cols.²⁹¹ implican además, a los metabolitos de las prostaglandinas en las alteraciones de la circulación sistémica y pulmonar, y en la disfunción cardiaca, observadas en su modelo de isquemia/reperfusión; Turnage y cols.²⁹⁴ al tromboxano A₂ liberado en el endotelio vascular pulmonar tras la isquemia/reperfusión intestinal, y Filep y cols.⁴³⁸ al PAF (factor activador de las plaquetas).

Horie y cols.⁴⁴⁰ muestran que la isquemia/reperfusión intestinal produce un incremento en la cantidad de P-selectina en diversos órganos, incluyendo el intestino delgado, hígado y pulmón, y que el óxido nítrico modula esta respuesta, disminuyendo el reclutamiento de los leucocitos en fase de rodamiento.

Así pues, el enzima xantina oxidasa, junto con su substrato la hipoxantina y la xantina son una fuente muy importante de superóxido en el tejido postisquémico^{275,276,367,385}. La observación de que la inhibición, depleción o inmunoneutralización de la xantina oxidasa reduce la lesión postisquémica apoya la teoría de que las especies reactivas del oxígeno derivadas de la misma contribuyen a la patogénesis de la lesión por isquemia/reperfusión^{48,49,51,261,262,264,265,309}.

En consecuencia, la contribución del sistema hipoxantina – xantina/xantina oxidasa en la isquemia/reperfusión puede ser fundamental, aunque más complejo de lo que se previó^{46,309,420}.

Como contrapunto, poniendo de manifiesto la ya referida doble vertiente en las propiedades de las especies reactivas del oxígeno, dañina y reguladora, Boros y cols.²⁵⁷ sugieren que éstas probablemente participan en la vasoregulación postoclusiva a través de la liberación local de histamina. La histamina es un potente dilatador arteriolar y del esfínter precapilar, la cual puede actuar a través de los receptores H₁ y H₂ presentes en la circulación mesentérica. Observan que el incremento de los niveles de histamina en la reperfusión, es proporcional a la duración de la isquemia, seguida de una rápida disminución en su concentración. Así pues, la histamina puede contribuir a la vasodilatación local compensatoria tras la isquemia intestinal, sin afectar a la presión arterial sistémica²⁵⁷. En la hiperemia reactiva que caracteriza la reperfusión del intestino isquémico, también se han implicado a los péptidos vasoactivos derivados de la rica red de nervios que posee este órgano⁴⁴⁴. Asimismo se ha descrito un mecanismo vasorelajante que depende del endotelio y que está modulado por el radical hidroxilo⁴⁴⁵. Otros trabajos muestran una acción vasodilatadora de las especies reactivas del oxígeno^{446,447} independiente del endotelio^{448,449}, aunque también pueden provocar vasoconstricción⁴⁴⁸.

Leucocitos^{48,65,319}

En la reperfusión del intestino isquémico se producen una serie alteraciones típicas de una respuesta inflamatoria aguda. La magnitud de esta respuesta está en gran parte determinada por la severidad^{267,284,450-452} y duración^{279,360,361,450,451,453} de la isquemia, ocasionando la pérdida vascular de proteínas y edema^{289,454,455}. Estos cambios se correlacionan positivamente con un infiltrado de células inflamatorias^{142,145,248,359,453,456,457}, de las cuales más del 80 % son neutrófilos³¹⁹.

Existen cuatro circunstancias que claramente implican a los leucocitos en la lesión por isquemia/reperfusión:

1. Se acumulan en los tejidos expuestos a la isquemia y reperfusión^{142,145,359,456,457}.
2. La depleción de los neutrófilos circulantes reduce de manera significativa la disfunción microvascular y de las células parenquimatosas^{317,318,455}.
3. Las sustancias que previenen la activación y/o la adhesión de los leucocitos a la célula endotelial son efectivas para prevenir la lesión por reperfusión^{145,316,317,453,455,456,458,459}.
4. Así como el empleo de animales genéticamente deficientes en moléculas que median la adhesión entre el leucocito y la célula endotelial⁴⁶⁰.

La cascada de eventos que conducen a la lesión por reperfusión la inicia las especies reactivas del oxígeno derivadas de la xantina oxidasa^{46,48,309,325,333}. Estas, junto a los mediadores proinflamatorios producidos y liberados tras las alteraciones en los constituyentes tisulares provocadas por estas especies reactivas, activan, atraen, y promueven la adherencia de los neutrófilos al endotelio microvascular^{142,145,316,359,431,458,459}, cuya actuación explicaría la ampliación del estrés oxidativo que ocurre después.

Mediante técnicas de microscopia intravital se ha podido cuantificar en la vasculatura la acumulación de los leucocitos durante la reperfusión del intestino delgado^{236,248,312,316,453,458} y, mediante determinación de la actividad mieloperoxidasa se ha cuantificado en el tejido la infiltración en la mucosa^{142,145,359,375,377-379,397,429,456,457,461-463}.

Entre las sustancias implicadas como responsables de la acumulación de los granulocitos tras la isquemia/reperfusión intestinal se encuentran las especies reactivas del oxígeno, el factor activador de las plaquetas, el leucotrieno B₄, la fosfolipasa A₂.

- **Especies reactivas del oxígeno.** Se ha sugerido que el radical superóxido actúa sobre un componente del plasma normal convirtiéndolo en un potente quimiotáctico que atrae a los neutrófilos al lugar de la inflamación^{15,52,443}, y que a diferencia de otros factores quimiotácticos (ej. fragmento C5_a del complemento), el factor que depende del superóxido no estimula la degranulación o la producción de radical superóxido en los leucocitos^{15,443}. Ya se ha aclarado en la página 76 que Zimmerman y cols.³⁵⁹ matizan este concepto implicando al peróxido de hidrógeno.

Perez y cols.⁴⁶⁴ implican a un lípido, derivado de la acción de cualquiera de las especies reactivas del oxígeno al actuar sobre el ácido araquidónico, con capacidad quimiocinética y quimiotáctica.

El radical superóxido reacciona con el óxido nítrico segregado por las células endoteliales, inactivándolo y evitando la acción antiadhesiva de éste último, y por consiguiente se produce un incremento en el número de leucocitos que se adhieren y emigran^{202,258-260}.

Además del radical superóxido, el peróxido de hidrógeno induce la adherencia de los neutrófilos por un mecanismo mediado por el PAF⁴⁵⁹.

Sea como fuere, ya sea porque las especies reactivas del oxígeno activan sustancias quimiotácticas y/o porque ellas mismas actúan como tales, el empleo de sustancias que evitan la formación de estas especies reactivas del oxígeno, disminuye de manera significativa la adhesión y la extravasación de los leucocitos, así como los niveles de

mieloperoxidasa que se observan normalmente tras la isquemia/reperfusión^{142,145,316,359,379,458,465}.

- Hay dos circunstancias que ponen en evidencia una participación del **factor activador de las plaquetas** (PAF) como mediador en la infiltración y adhesión de los granulocitos inducida por la reperfusión en el intestino postisquémico: una, que los niveles de PAF durante el periodo de reperfusión se encuentran aumentados y, otra que los antagonistas del receptor PAF atenúan el incremento, tanto de mieloperoxidasa como la adherencia y emigración de los leucocitos inducidos por la reperfusión^{266,312,438,459}. Sin embargo, el PAF no es responsable de la migración de los leucocitos dentro del intersticio⁴⁶⁶.
- De una manera similar también se ha implicado al **leucotrieno B₄** (LTB₄) como mediador de la infiltración y adhesión de los granulocitos tras la reperfusión en el intestino delgado. Los niveles de leucotrieno B₄ se encuentran elevados en el intestino postisquémico, y el antagonismo o la inhibición de su síntesis reduce la infiltración de los neutrófilos inducida por la reperfusión^{293,312}. Al igual que anteriormente, Bienvenu y cols.⁴⁶⁶, en su estudio sobre la migración de los leucocitos dentro del intersticio, indican que el leucotrieno B₄ no es responsable de ésta en su modelo de isquemia/reperfusión.
- La **fosfolipasa A₂** activada media en la formación de varios agentes proinflamatorios y sustancias potencialmente tóxicas, como los metabolitos del ácido araquidónico (ej. el leucotrieno B₄), lisofosfolípidos y PAF. Aunque también se le ha involucrado en la eliminación de productos derivados de la peroxidación lipídica de las membranas. Debido al mayor nivel de calcio intracelular se produce su activación durante la isquemia, y durante la reperfusión por la peroxidación dependiente de las especies reactivas del oxígeno. Su activación se asocia con infiltración de polimorfonucleares, además de peroxidación lipídica y mayor permeabilidad y lesión de la mucosa intestinal, lo cual se previene con inhibidores de la fosfolipasa A₂^{304,305}. Aunque otros autores utilizando la valoración histológica de la mucosa como índice de lesión, no observan que este tratamiento sea eficaz³⁸⁹.

Estos mediadores inflamatorios liberados a la circulación sanguínea como consecuencia de la reperfusión, junto con otros (TNF α , productos de la activación del complemento, depleción y/o inactivación del óxido nítrico, ...), pueden activar a los leucocitos circulantes y células endoteliales, incrementando la cantidad de moléculas de adhesión, y promover la interacción neutrófilo – célula endotelial en lechos vasculares de órganos remotos, dando origen al síndrome de disfunción multiorgánico.

Sustancias liberadas por los leucocitos

Los leucocitos están muy bien equipados para promover la inflamación. Su adherencia causa una lesión celular adicional por la liberación de oxidantes y diversas sustancias humorales. Entre los diversos mediadores liberados por los leucocitos, particularmente polimorfonucleares que contribuyen a la lesión por reperfusión, se encuentran:

- Las **especies reactivas del oxígeno** (radical superóxido, peróxido de hidrógeno, ácido hipocloroso, radical hidroxilo)^{54-56,59}.

La importante producción de superóxido por los leucocitos se lleva a cabo por medio de una NADPH oxidasa que se encuentra unida a la membrana leucocitaria⁵⁹⁻⁶¹ (reacción 7, página 8), y no vía xantina oxidasa, ya que no contienen cantidades significativas de la misma. Ésta cataliza la transferencia de electrones desde el NADPH (producto de la vía de las hexosas fosfato) al oxígeno molecular. Normalmente la NADPH oxidasa se encuentra en estado latente, pero se activa rápidamente por diversos mediadores inflamatorios (complemento, endotoxinas, leucotrieno B₄, inmunocomplejos, factor activador de las plaquetas, ...) que estimulan los receptores de la membrana de los leucocitos⁶¹. Esta última enzima no es inhibida por el alopurinol, pero sí inactivada por el óxido nítrico⁴⁶⁷.

Además, una vez activados también generan mieloperoxidasa, un enzima que cataliza a partir del peróxido de hidrógeno, la formación de ácido hipocloroso (reacción 22, página 19) y cloraminas (reacción 23, página 19). El ácido hipocloroso posee una gran capacidad bactericida y puede participar también en el inicio de la destrucción tisular.

- El neutrófilo activado produce **óxido nítrico**¹⁷⁶ a la vez que radical superóxido^{55,59}. Ambos pueden reaccionar y formar peroxinitrito^{69,213,214} (reacción 41, página 48), el cual es un agente citotóxico adicional que a su vez puede acabar formando potentes oxidantes^{37,69,71,224}. Ver “El óxido nítrico en la isquemia/reperfusión” en esta misma sección, página 97.
- **Citoquinas**. Por ejemplo el TNF α , importante sustancia proinflamatoria que produce disfunción endotelial e inhibe la liberación de óxido nítrico.
- **Enzimas proteolíticos**. Entre los más importantes están la elastasa, colagenasa y gelatinasa. Con ellas los neutrófilos puede degradar los componentes clave de la membrana basal de la célula endotelial y la matriz intersticial, así como las uniones proteicas que mantienen la función de la barrera endotelial^{54,296}.

- **Leucotrienos**, el más representativo es el leucotrieno B₄, producido por la vía de la lipooxigenasa en el metabolismo del ácido araquidónico. Es un potente agente quimiotáctico que activa a los neutrófilos, promueve su adherencia al endotelio y emigración al intersticio, así como la disfunción microvascular, la cual provoca una pérdida de proteína por aumento de permeabilidad³¹². No obstante, como ya se ha aclarado anteriormente, no interviene en la migración dentro del intersticio⁴⁶⁶. El óxido nítrico puede alterar la capacidad de esta célula para sintetizar leucotrieno B₄⁴⁶⁸.
- **Factor activador de las plaquetas**. Este fosfolípido es un potente mediador inflamatorio, producido no tan sólo por los neutrófilos y macrófagos, sino también por las células endoteliales y las plaquetas. En condiciones normales el PAF forma parte de las membranas celulares, el cual una vez liberado produce numerosos efectos: agregación y degranulación de las plaquetas, contracción del músculo liso, activación y quimiotaxis de los neutrófilos, e incrementa la permeabilidad vascular. El efecto del PAF sobre el tono vascular es variable. A bajas concentraciones produce vasodilatación, y en algunos tejidos vasoconstricción cuando ésta es elevada. Además produce marcada hipotensión, isquemia mesentérica, hemoconcentración y adherencia al endotelio y emigración de los leucocitos^{312,438}. Aunque como se ha señalado anteriormente no interviene en la migración dentro del intersticio⁴⁶⁶.

Moléculas para la adhesión en los leucocitos^{320,323,460}

Los neutrófilos circulantes son reclutados hacia los lugares inflamados y con lesión tisular mediante un proceso altamente regulado, el cual ocurre principalmente en la microvasculatura (vénulas postcapilares). Las moléculas de adhesión en la superficie de los neutrófilos y células endoteliales aseguran una secuencia ordenada de interacciones entre ambas células que promueve la adherencia y la posterior migración transendotelial de los leucocitos en el tejido inflamado.

Los neutrófilos presentan en su superficie unas glicoproteínas para la adhesión que interactúan en la superficie de la célula endotelial con unos ligandos durante la isquemia/reperfusión.

Las *β₂ integrinas* son unos heterodímeros formadas por una subunidad común β (CD18) que está unida de manera no covalente a una subunidad α, de la cual existen tres tipos inmunológicamente distintas, CD11a, CD11b y CD11c. El ligando específico de cada β₂ integrina depende principalmente de la cadena α asociada.

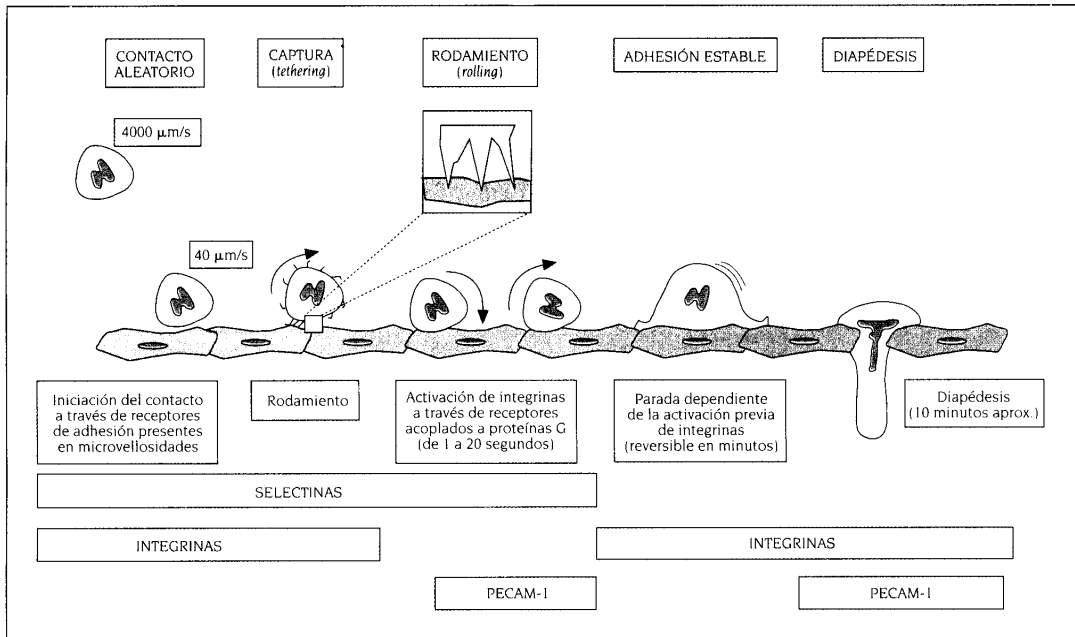


Figura 6. Interacciones celulares durante la adhesión leucocitaria y posterior migración transendotelial desde el torrente sanguíneo. Se indican las fases del proceso y las familias de moléculas implicadas en cada fase. Según Corbí López y cols.⁴⁶⁹.

Aunque los leucocitos circulantes en estado basal presentan cantidades sustanciales de integrinas diferentes en su superficie celular, estas glicoproteínas son funcionalmente inactivas. Su activación la provocan citoquinas y otros agentes quimiotácticos (péptidos bacterianos, PAF, leucotrieno B₄).

La CD11a/CD18[‡] se encuentra en la superficie de los neutrófilos y otras células inflamatorias en estado basal, e interactúa con otras glicoproteínas que se encuentran en la superficie de las células endoteliales, ICAM-1 (molécula de adhesión intracelular-1) y ICAM-2 (molécula de adhesión intracelular-2), promoviendo la adhesión firme de los leucocitos. Ya que la CD11a/CD18 no se encuentra almacenada de manera apreciable en los gránulos de los neutrófilos, no existe una reserva desde la cual se pueda movilizar una cantidad adicional a la superficie del neutrófilo activado. Los mediadores inflamatorios o citoquinas, e incluso la anoxia/reoxigenación, son incapaces de estimular la presencia de un mayor número de CD11a/CD18 en la superficie del neutrófilo.

Las CD11b/CD18[§] y CD11c/CD18^{**} se presentan principalmente en los granulocitos y

[‡] Denominaciones alternativas son: LFA-1 (antígeno asociado a la función del linfocito), $\alpha_L\beta_2$ (referencia 460).

[§] Denominaciones alternativas son: Mac-1, MO1, CR3, $\alpha_M\beta_2$ (referencia 460).

^{**} Denominaciones alternativas son: p150,95, $\alpha_X\beta_2$ (referencia 460).

monocitos. La mayor parte de estas glicoproteínas de adhesión se encuentran almacenadas en gránulos, y se pueden movilizar rápidamente a la superficie de los neutrófilos, al fusionarse la membrana de los gránulos con la membrana celular tras la estimulación. La activación de los neutrófilos por medio de mediadores inflamatorios o citoquinas, da como resultado una mayor presencia de ambas glicoproteínas en la superficie de los mismos, que oscila entre tres y diez veces. Asimismo, la anoxia/reoxigenación puede ser un estímulo para producir este mismo efecto, pero sólo con la CD11b/CD18⁴⁵³.

La adhesión de los neutrófilos no estimulados al endotelio, depende exclusivamente de la interacción CD11a – ICAM-1, mientras que la adhesión de los neutrófilos activados depende de las interacciones del CD11a y CD11b con el ICAM-1. No se ha determinado el ligando de CD11c.

Las *selectinas* se encuentran tanto en los neutrófilos, como en las células endoteliales. Modulan la adhesión entre ambos.

La L-selectina^{††} se encuentra en la superficie de los neutrófilos en estado de reposo. Está implicada en el rodamiento de los neutrófilos sobre las células endoteliales activadas, observado a los 10 minutos de la reperfusión⁴⁵³, pero no cuando éstas últimas están en estado de reposo, indicando que el ligando que se une a la L-selectina no está presente en las células endoteliales en condiciones de normalidad, como son la P-selectina y la E-selectina, entre otros. La unión de los neutrófilos con las células endoteliales mediada por la L-selectina no requiere la activación de los primeros^{65,460}.

La formación de agregados plaquetoleucocitarios implica la interacción entre la P-selectina de las plaquetas con su ligando en los leucocitos, evento que se observa en varias condiciones patológicas incluyendo la isquemia/reperfusión^{248,453}.

Otros aspectos de la interacción entre el leucocito y la célula endotelial

Fuerzas hidrodinámicas de dispersión o fuerzas de cizallamiento

La tendencia de los leucocitos a adherirse al endotelio vascular y consecuentemente a emigrar desde el torrente sanguíneo, no sólo está determinada por las fuerzas de adhesión generadas por las glicoproteínas en la superficie de las membranas celulares de los leucocitos activados y endotelio vascular, sino más bien por el equilibrio entre éstas

^{††} Denominaciones alternativas son: LAM-1 (molécula de adhesión leucocitaria), LECAM-1 (molécula de adhesión linfocito célula endotelial), CD62L⁴⁶⁰.

y las fuerzas hidrodinámicas de dispersión generadas por la microvasculatura, que tienden a barrerlos fuera de la superficie endotelial. Por tanto, una disminución de las fuerzas hidrodinámicas de dispersión promoverá su adherencia en las vénulas postcapilares, no en las arteriolas. En estas condiciones el leucotrieno B₄ y no el PAF está implicado en este proceso⁴⁷⁰.

El que no se observe en los procesos inflamatorios, ni acumulación, ni adherencia de leucocitos en la microvasculatura arterial, no se debe al hecho de unas fuerzas hidrodinámicas de dispersión mayores, que lo son, sino a la falta de ligandos para las glicoproteínas de adhesión de los leucocitos activados. Esta circunstancia se comprueba y corrobora en estados en los que las fuerzas hidrodinámicas de dispersión se encuentran disminuidas en la microvasculatura arterial, y no se observa ni acumulación ni adherencia de los leucocitos⁶⁵.

Rodamiento de los leucocitos

Hablamos de rodamiento de los leucocitos cuando los que se encuentran en el margen de la corriente sanguínea parecen rodar sobre la superficie endotelial a una menor velocidad que las células sanguíneas que circulan por el centro del vaso sanguíneo.

El primer paso en la interacción entre los leucocitos y las células endoteliales, implica una movilización de éstos desde la parte central de la corriente sanguínea hacia la pared vascular, rodando a continuación a lo largo del endotelio. El movimiento de los leucocitos hacia la pared venular puede estar causado por una interacción hidrodinámica entre los hematíes y estos, al pasar desde los capilares de diámetro menor a las vénulas postcapilares de mayor diámetro. La mayor velocidad de los hematíes desplazaría a los neutrófilos hacia el endotelio vascular.

En el rodamiento de los leucocitos a lo largo del endotelio existe una adhesión débil, que es suficiente para vencer las fuerzas de hidrodinámicas de dispersión a lo largo de la pared venular, si bien la velocidad de rodamiento es directamente proporcional a las mencionadas fuerzas. Para unas determinadas fuerzas hidrodinámicas de dispersión, la velocidad de rodamiento disminuye con la activación de los neutrófilos.

La interacción inicial entre el leucocito y la célula endotelial o rodamiento, es completamente dependiente de la familia de las selectinas. La L-selectina (ver página 83), presente de manera constitutiva en la superficie de los leucocitos (neutrófilos, monocitos y eosinófilos), parece ser esencial en la capacidad de estas células para iniciar el rodamiento en la microvasculatura, lo mismo que las selectinas inducibles en la superficie de la célula endotelial, P-selectina y E-selectina (ver páginas 94 y 95). La

glicoproteína ligando de la P-selectina (PSGL-1), presente en condiciones basales en los neutrófilos, pero que disminuye tras su activación, puede interactuar con la P-selectina y participar en el rodamiento con fuerzas hidrodinámicas de dispersión normales. El rodamiento es independiente de la adhesión mediada por el CD18.

El rodamiento es un requisito para una adhesión más firme del leucocito a la célula endotelial, y posterior emigración de aquel al intersticio.

Migración transendotelial

Durante la inflamación aguda, una amplia proporción de los neutrófilos adheridos firmemente al endotelio de las vénulas postcapilares, migra a través de las uniones entre células endoteliales adyacentes e invaden el intersticio. Durante el movimiento de la célula se van formando nuevos procesos de adhesión en el frente y reduciéndose éstos en la cola. La migración celular a través del endotelio requiere que la adhesión no sea demasiado fuerte, ya que sino el leucocito quedaría inmovilizado. En este proceso está implicada la ICAM-1 y la CD11/CD18⁴⁵³, contribuyendo en mayor proporción la subunidad CD11a en comparación a la CD11b, aunque su contribución es aditiva. La PECAM-1 (molécula plaquetaria de adhesión celular-1, ver página 94) también está

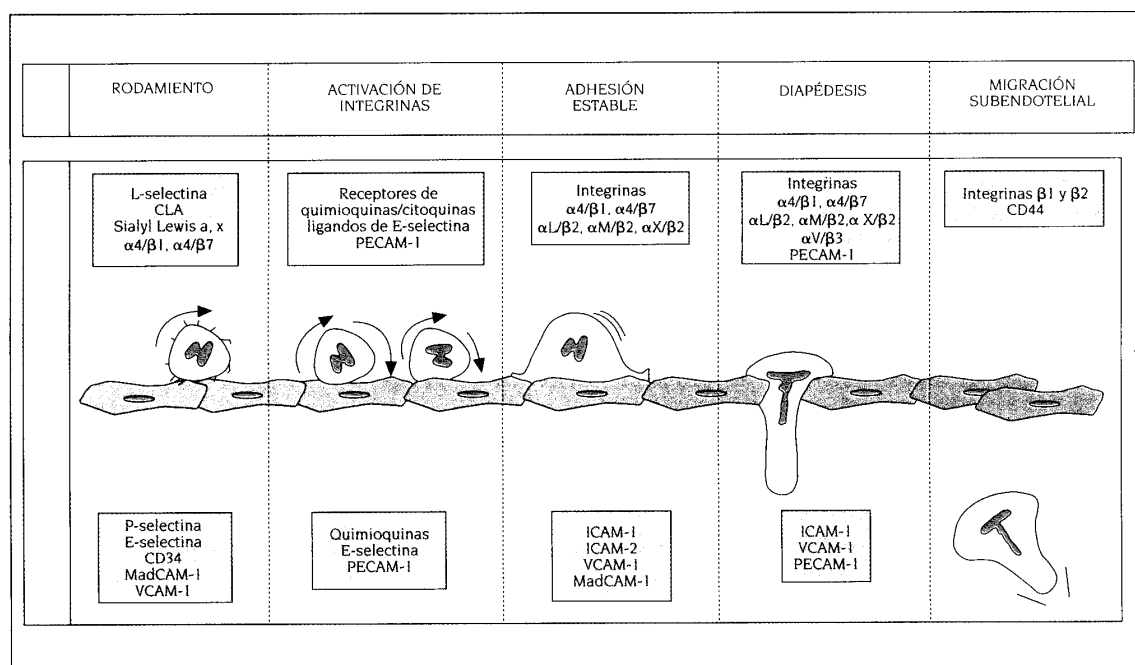


Figura 7. Receptores de adhesión específicamente implicados en cada una de las fases de la adhesión y migración transendotelial. Las moléculas de adhesión leucocitarias se indican en la parte superior y aquellas expresadas por las células endoteliales aparecen en la zona inferior. Según Corbí López y cols.⁴⁶⁹.

implicada en la migración transendotelial de los leucocitos, no así la E- o L-selectinas. Bienvenu y cols.⁴⁶⁶ en su estudio sobre los factores que modulan la migración de los leucocitos dentro del compartimiento extravascular, puntualizan que aunque la glicoproteína de adhesión leucocitaria CD11/CD18 es fundamental para la adherencia y emigración en las vénulas postcapilares, ésta no contribuye significativamente en la migración de los leucocitos a través del intersticio.

Isquemia/reperfusión y leucocitos

La lesión por isquemia/reperfusión y el aumento de permeabilidad vascular se correlaciona positivamente con el número de leucocitos emigrados⁴⁵³. Según Hernández y cols.³¹⁷, los leucocitos son los principales mediadores del incremento de permeabilidad vascular en este proceso. Ellos creen que el hecho que la superóxido dismutasa prevenga el incremento de permeabilidad vascular no implica claramente que las especies reactivas del oxígeno sean los mediadores últimos. Dado que ésta también previene el reclutamiento de los neutrófilos, apuntan que la principal función de las especies reactivas del oxígeno sería esta última, algo que ya fue sugerido por Del Maestro y cols.³⁸⁰. Por tanto, el que los neutrófilos sean uno de los principales mediadores de la lesión microvascular inducida por la reperfusión, no es una contradicción con la hipótesis de la xantina oxidasa como origen de la lesión por isquemia/reperfusión, si se toman en consideración los hechos que los inhibidores de la xantina oxidasa y los eliminadores de especies reactivas del oxígeno son bastante efectivos en prevenir la acumulación de los neutrófilos en la mucosa intestinal tras la reperfusión.

Los procesos que implican a los leucocitos en la lesión por isquemia/reperfusión parecen ser de importancia cuantitativa variable de órgano a órgano, quizás dependiendo de la variable acumulación de neutrófilos en los diferentes órganos sometidos a isquemia³⁷⁵.

En la isquemia/reperfusión también se activan los mastocitos y macrófagos que normalmente residen en el espacio intersticial inmediatamente adyacente a las vénulas postcapilares^{257,471}, detectándose en los tejidos postisquémicos los productos derivados de la activación de estas células (histamina, serotonina, citoquinas, PAF, así como proteasas que generan anafilatoxinas), amplificando la respuesta inflamatoria en la isquemia/reperfusión, pudiendo afectar a órganos distantes, lo cual puede estar directamente relacionado con el ya comentado síndrome de disfunción multiorgánico⁴⁷¹. Un factor que estimula la degranulación de los mastocitos son los oxidantes derivados de la xantina oxidasa. Boros y cols.²⁵⁷ demuestran que el alopurinol bloquea muy significativamente la liberación de histamina en el intestino postisquémico.

Kubes y cols.⁴⁵⁷ sugieren que los leucocitos localizados en el intersticio antes del proceso de isquemia/reperfusión contribuyen de manera más significativa en la disfunción mucosa, que aquellos que son reclutados por el mencionado proceso. Los mastocitos del espacio intersticial participan en el reclutamiento de leucocitos desde la sangre a los tejidos postisquémicos^{248,471}.

Resumiendo, el proceso se inicia con la producción de oxidantes derivados de la xantina oxidasa localizada en las células del parénquima intestinal, y/o como se describirá más adelante en las células del endotelio vascular, los cuales en ausencia de leucocitos ya pueden incrementar la permeabilidad vascular^{117,368,380,381,384}. Éstos junto con otros agentes quimiotácticos atraen a los neutrófilos, que más tarde se acumulan y adhieren al endotelio^{145,316,456,458,459,465} agravando la lesión parenquimatosa al producir diferentes agentes citotóxicos^{54,296}. La magnitud de esta lesión se correlaciona positivamente con el número de leucocitos adheridos y emigrados al intersticio⁴⁵³.

Endotelio^{472,188,473}

Las células endoteliales que forran mediante una monocapa la superficie interna de los vasos sanguíneos, forman una estructura vital y dinámica. Ésta tiene una función crucial en condiciones tanto fisiológicas como patológicas.

Aunque en 1909 Joseph Lister proporcionó evidencias de una participación activa de los vasos sanguíneos en el mantenimiento de la liquidez de la sangre⁴⁷², durante mucho tiempo se pensó que el endotelio vascular escasamente servía para separar la sangre del resto de las estructuras orgánicas, como una barrera cuya función es prevenir que los agentes nocivos penetren en la pared vascular. Hoy se sabe que no es un tejido pasivo, las células endoteliales son capaces de producir numerosas sustancias vasoactivas, lo cual sitúa al endotelio en una posición única como órgano endocrino, paracrino e incluso autocrino, con múltiples funciones. Por lo tanto, además de su misión como una barrera física permeable, su importancia radica en el gran número de funciones que regula. Una de ellas es el transporte capilar selectivo, permitiendo o facilitando el paso de determinadas sustancias e impidiendo el paso de otras contenidas en la sangre. Regula también los lípidos plasmáticos: metabolismo de lipoproteínas, control del exceso de colesterol, etc. Tiene propiedades antitrombóticas que inhiben la adhesión de las plaquetas, eritrocitos y leucocitos a la pared vascular, por lo tanto las células endoteliales son cruciales en el mantenimiento del flujo sanguíneo laminar. La alteración del

endotelio afecta a la fibrinólisis acelerando la coagulación intravascular. Tiene una importante función metabólica con respecto a sustancias vasoactivas, secreta sustancias como la prostaciclina, óxido nítrico, endotelina, factores de crecimiento en respuesta al daño, tanto a la pared vascular como al torrente sanguíneo, modulando entre otros factores la estructura y funcionalidad del músculo liso vascular. Sin embargo, estas sustancias destinadas a proteger, pueden activar respuestas con secuelas perjudiciales.

Está claro por tanto, que las células endoteliales son mucho más que una barrera semipermeable entre la sangre y el músculo liso vascular. De hecho el sistema endotelial puede considerarse como un órgano metabólico y endocrino sumamente activo.

Participación de la célula endotelial en la isquemia/reperfusión

Mientras que no se acepta de manera universal el concepto de lesión por reperfusión cuando se aplica a las células parenquimatosas, sí se reconoce de manera general, que la microvasculatura y particularmente sus células endoteliales, son muy vulnerables a las perniciosas consecuencias de la isquemia/reperfusión.

El hecho que la lesión por reperfusión pueda bloquearse con alopurinol en una amplia variedad de órganos, algunos de los cuales no parecen contener cantidades apreciables de xantina oxidasa en sus células parenquimatosas, enfocó la atención en la célula endotelial, en cuyo interior existe un sistema xantina oxidasa completamente operativo capaz de generar especies reactivas del oxígeno^{117,367,368,384}, de extraordinaria importancia ya que se encuentra en todos los órganos⁴¹³. Esto explica la lesión por reperfusión en lugares donde no se produce una acumulación de neutrófilos y/o en aquellos órganos en que sus células parenquimatosas no poseen el sistema xantina oxidasa. En estos últimos la célula endotelial puede actuar como mecanismo iniciador, atrayendo y activando a los neutrófilos, los cuales pueden causar una parte fundamental de la lesión^{54,296}.

Sin embargo el papel del endotelio es mucho más complejo^{49,263,474}. Se sabe que la hipoxia prolongada altera el potencial de membrana, perturba la distribución de los iones, incrementa el volumen intracelular, disminuye la fluidez de la membrana, y desestructura el citoesqueleto de las células endoteliales. Estos cambios pueden acompañarse del agotamiento de los recursos energéticos, de una menor liberación de agentes citoprotectores o moduladores endoteliales, así como de una mayor producción de mediadores proinflamatorios que contribuyen a la lesión celular, incluyendo el de las propias células endoteliales. A su vez, la hipoxia induce la expresión de algunos genes (ej. moléculas de adhesión, citoquinas) mientras que reprime la de otros (ej. cNOS).

Muchas de estas respuestas de la célula endotelial a la hipoxia (isquemia) se exacerban con la reoxigenación (reperfusión).

El cómo actúan todos estos factores es importante para entender el proceso de la isquemia/reperfusión.

Sustancias producidas por el endotelio que protegen de la lesión celular

Entre éstas destacamos:

Prostaciclina (PGI₂)⁴⁷⁵. Es el principal miembro de la familia de las prostaglandinas producido por el endotelio vascular, siendo éste su productor principal⁴⁷⁶. Actúa como una hormona local. Ejerce sus efectos activando la vía de la adenilato ciclasa, incrementando los niveles de AMPc. Produce una enérgica vasodilatación por relajar el músculo liso vascular; inhibe la agregación e induce la desagregación de las plaquetas (es la sustancia endógena más potente), aunque para prevenir la adhesión son necesarias concentraciones mucho mayores; previene la adherencia de los leucocitos polimorfonucleares; y estabiliza las membranas. En el mecanismo que regula las interacciones entre las plaquetas y la pared vascular, representa el contrapunto a las acciones del tromboxano A₂^{472,477}.

Cortos periodos de hipoxia (15 minutos) ya afectan a las células endoteliales disminuyendo la producción de prostaciclina por un mecanismo mediado en parte por las especies reactivas del oxígeno. Durante la reoxigenación, el peroxinitrito nítrico inactiva la PGI₂ sintasa, lo cual se correlaciona con una disminución en la producción de prostaciclina, dejando sin metabolizar a la prostaglandina H₂ (PGH₂), la cual puede causar vasospasmo, agregación plaquetaria y formación de trombos al estimular el receptor tromboxano A₂/PGH₂⁵¹. Otros autores apuntan una mayor liberación de prostaciclina a nivel esplácnico durante la isquemia y en los primeros momentos de la reperfusión, aunque no persiste mucho tiempo⁴⁷⁸. Hay numerosos datos sobre su papel beneficioso en la isquemia/reperfusión²⁶³.

La **adenosina** es un metabolito purínico, un importante regulador del metabolismo celular. Al igual que la anterior es vasodilatadora en la mayoría de los lechos vasculares, lo cual puede al menos en parte compensar el fenómeno del no reflujo que se da en la reperfusión⁴⁶¹ (ver página 102). Esta vasodilatación dependiente del endotelio parece implicar a los canales de potasio sensibles al ATP¹⁹¹. Inhibe la agregación plaquetaria, atenúa la adherencia de los polimorfonucleares a la célula endotelial, y la emigración de éstos al intersticio. También inhibe la producción de radical superóxido, particularmente en los polimorfonucleares activados^{140,461}, y parece incrementar la producción endotelial

de PGI₂. Por todo ello ha mostrado sus efectos beneficios en la isquemia/reperfusión^{263,287,319,377,461}. Además se cree que puede acelerar la regeneración postisquémica de las purinas deplecionadas durante ese periodo, aunque sobre esto hay datos contradictorios³⁷⁷.

Óxido nítrico (NO^{*}). Producido por las células endoteliales vasculares tanto en condiciones fisiológicas^{173,175}, como en la reperfusión de tejidos isquémicos^{225,321}. Las células endoteliales son sensibles a los cambios en la tensión de oxígeno sanguíneo. En caso de hipoxemia se libera óxido nítrico promoviendo vasodilatación. Sin embargo, cuando la tensión de oxígeno cae hasta un nivel crítico (PaO₂ < 30 mmHg) disminuye su producción¹⁵¹. El óxido nítrico endógeno protege al intestino de la lesión e inflamación inducida por la hipoxia, y el equilibrio entre los niveles locales de PAF y óxido nítrico modulan este resultado⁴⁷⁹. La inhibición de la formación endógena de óxido nítrico produce una mayor extravasación de albúmina y potencia el efecto del PAF sobre la permeabilidad vascular²⁰⁷.

Es un factor importante de la respuesta inflamatoria observada en los diferentes segmentos vasculares, y puede tener una función tanto protectora como lesiva. Actúa de una manera sinérgica con la PGI₂¹⁶³: vasodilatación¹⁶², inhibición de la agregación¹⁶³ y adhesión²¹¹ plaquetaria, y de la adherencia de los neutrófilos a la célula endotelial^{202,258-260}, modulando la cantidad de P-selectina⁴⁴⁰ y E-selectina²⁶⁰ en esta última. Además el óxido nítrico reacciona directamente con el radical superóxido neutralizándolo, situación que se da en condiciones normales ya que la producción del primero supera ampliamente la del segundo. La supresión de la formación de óxido nítrico mediante inhibidores de la NO sintasa produce una mayor liberación de endotelina-1 (referencia 480), sugiriendo una retroalimentación entre ambos sistemas^{481,482}. Al contrario que la endotelina-1, inhibe la mitogénesis y proliferación del músculo liso vascular, pudiendo regular tanto el tono, como el remodelado estructural de la pared vascular.

En la microcirculación mesentérica, el óxido nítrico inhibe la adherencia y emigración de los leucocitos en las vénulas postcapilares, la extravasación de albúmina, evita la degranulación de las células cebadas, la agregación y adhesión plaquetaria, y reduce la agregación entre las plaquetas y los leucocitos^{163,202-212,258,260}.

En estados de isquemia/reperfusión ha mostrado sus beneficios^{248,322,483-487}. Aunque un exceso en la producción de especies reactivas derivadas del óxido nítrico tiene consecuencias perniciosas^{51,190,224,225}. Ver “El óxido nítrico en la isquemia/reperfusión” en esta misma sección, página 96.

Sustancias producidas por el endotelio que median la lesión celular

Sustancias vasoconstrictoras. Las células endoteliales dañadas o excesivamente activadas pueden segregar sustancias vasoconstrictoras.

La *endotelina*^{188,488} es un péptido del cual hay tres tipos diferenciados estructural y farmacológicamente. El más importante, producido por la célula endotelial, es la endotelina-1 (ET-1), un vasoconstrictor potente y duradero cuando actúa sobre el receptor ET_A, lo que contrasta con su corta vida media sanguínea y concentración muy baja. Fundamentalmente es un mediador paracrino/autocrino. Estimula la liberación de tromboxano A₂ (TXA₂), potencia los efectos de otros vasoconstrictores como la noradrenalina y la 5-hidroxitriptamina (5-HT) y, asimismo, puede liberar potentes sustancias vasodilatadoras como la prostaciclina y el óxido nítrico antagonizando su acción^{481,482,489}. Por otro lado, la estimulación del receptor ET_B en las células endoteliales libera óxido nítrico contribuyendo a la vasorelajación. Özel y cols.⁴⁹⁰ muestran que la administración de endotelina incrementa los niveles de óxido nítrico tanto en condiciones normales como en su modelo de isquemia/reperfusión *in vivo*.

Más allá de la regulación del tono vascular, a las endotelinas se las ha implicado en multitud de funciones basándose en la amplia distribución y gran afinidad de sus receptores específicos^{477,482}. La endotelina-1 es capaz de inducir hemoconcentración, de incrementar la permeabilidad vascular en determinados lechos vasculares, incluyendo vías aéreas, tracto gastrointestinal y riñones. El PAF, actuando en concierto con ésta, puede mediar en parte esta acción sobre la permeabilidad vascular⁴⁹¹. También es capaz de promover la proliferación de las células endoteliales vasculares, del músculo liso vascular y de los fibroblastos, lo que producirá cambios estructurales en la pared del vaso. Tras la reperfusión del intestino isquémico se libera endotelina⁴⁹², lo cual puede prevenirse con alopurinol⁴⁹² o con antagonistas de los receptores de la endotelina⁴⁹⁰.

Tromboxano A₂ (TXA₂)⁴⁹³. La liberación de este potente vasoconstrictor puede dañar las células endoteliales, y producir agregación plaquetaria. Deteriora la perfusión microvascular, incrementa la presión hidrostática en la red capilar y altera el citoesqueleto de las células endoteliales ensanchando las uniones entre éstas, lo cual puede producir extravasación de fluido y proteína provocando edema. En el mecanismo que regula las interacciones entre las plaquetas y la pared vascular, representa el contrapunto a las acciones de la prostaciclina^{472,477}.

Factor de agregación plaquetaria (PAF). Como se ha comentado anteriormente en la página 81, es un fosfolípido omnipresente, sintetizado también por la célula endotelial⁴⁹⁴. Induce vasodilatación por liberación de sustancias vasodilatadoras, pero

independiente del óxido nítrico²⁰⁷. Es un potente inductor de la agregación plaquetaria, activa los polimorfonucleares y estimula la adherencia de éstos al endotelio vascular, así como su emigración. Además el PAF incrementa la permeabilidad vascular³¹² y de la mucosa intestinal, mediada por las especies reactivas del oxígeno producidas por los leucocitos residentes⁴⁹⁵. Este incremento de la permeabilidad mucosa, no se basa en la alteración histológica de la misma y, además, es rápidamente reversible en cuanto caen los niveles de PAF⁴⁹⁵.

Especies reactivas del oxígeno. Como ya se ha comentado, el endotelio vascular es capaz de producirlas por medio del enzima xantina oxidasa, especialmente durante la reperfusión^{117,367,368,384}. Otra fuente potencial es la NADPH oxidasa presente en la membrana de las células endoteliales, similar al complejo enzimático que se encuentra en la membrana de los leucocitos⁵¹. Estas especies reactivas del oxígeno junto con las que generan los leucocitos adheridos, más la alteración de la capacidad del endotelio para sintetizar óxido nítrico, rompen el equilibrio existente entre ambos a favor de las primeras. Los relativamente bajos niveles de óxido nítrico producidos, reaccionan con el abundante suministro de radical superóxido, quedando poco que se oponga a la interacción entre las células endoteliales, leucocitos y plaquetas, y mantenga el flujo sanguíneo óptimo a los tejidos, alterándose la vasodilatación mediada por éste.

Además, el anión superóxido y el óxido nítrico pueden actuar conjuntamente para producir lesión. Al reaccionar forman peroxinitrito^{37,69,213,214} (reacción 41, página 48), el cual es un agente citotóxico adicional, que a su vez puede acabar formando potentes oxidantes^{37,69,71,224}. También se puede producir daño endotelial inducido por la interacción entre el óxido nítrico y especies reactivas del oxígeno como el peróxido de hidrógeno, produciendo especies más reactivas⁴⁹⁶.

Ligandos endoteliales para las moléculas de adhesión^{65,263,320,323,460}

Además de los mediadores vasoactivos producidos por las células endoteliales, éstas pueden presentar, de la misma manera que los leucocitos, una serie de ligandos en su superficie. Contribuyen a la adhesión al contener en su superficie un complejo sistema de moléculas específicas para la misma, que pueden interactuar con ligandos de los leucocitos y plaquetas. Una mayor agregación entre los leucocitos y las plaquetas produce cambios en el flujo sanguíneo laminar y la generación de turbulencias. Estos cambios incrementan a su vez, la agregación de las plaquetas y la trombosis.

Estos ligandos de superficie son proteínas (inmunoglobulinas), o macromoléculas que contienen carbohidratos (selectinas). Como se ha expuesto en las páginas 81 a 83, los leucocitos (polimorfonucleares, linfocitos, monocitos) contienen un componente del

sistema de adhesión (CD11/CD18, L-selectina,...), los cuales se unen a los correspondientes ligandos en las células endoteliales (ICAM-1, ICAM-2, P-selectina, E-selectina, ...) ^{263,460}. El reclutamiento de los leucocitos en fase de rodamiento está mediado por la L-selectina y P-selectina, mientras que la adhesión firme de éstos a la célula endotelial lo está por la interacción entre la CD11/CD18 y la ICAM-1 ⁴⁵³. Este proceso de adherencia es un paso crucial en la activación de los leucocitos, tras lo cual liberan una variedad de mediadores humorales que pueden dañar a cualquier célula con la que entren en contacto (por ej. célula endotelial, célula parenquimatosa intestinal, etc.).

La superfamilia de las **inmunoglobulinas**, incluye un gran número de moléculas con múltiples dominios. Entre ellas las siguientes están implicadas en la interacción leucocito – célula endotelial.

La **ICAM-1** (molécula de adhesión intracelular-1, o CD54) interactúa tanto con la CD11a/CD18 como con la CD11b/CD18, que se hallan en la superficie de los leucocitos. La ICAM-1 se encuentra en la superficie de los leucocitos, fibroblastos, células epiteliales y en las células endoteliales en estado basal (a bajos niveles). Aumenta su número (mediante una síntesis *de novo*) en respuesta a la activación endotelial provocada por citoquinas y especies reactivas del oxígeno, lo que ayuda a mantener la adhesión leucocito – célula endotelial que sucede tras varias horas (requiere de 2 a 4 horas para su máxima expresión) de iniciada la reperfusión ^{49,319,379}. Al contrario, el óxido nítrico disminuye la cantidad basal en la superficie de la célula endotelial ³²⁰. La relevancia fisiológica en la regulación de la presentación de ICAM-1 en las células endoteliales viene dada por la observación que incrementos en ésta generalmente se asocian con niveles máximos de adherencia leucocitaria.

La **ICAM-2** (molécula de adhesión intracelular-2, o CD102) es una forma truncada de la ICAM-1, y al igual que ésta se encuentra en la superficie de las células endoteliales en estado basal, pero en una cantidad superior, unas diez veces más. La ICAM-2, sin embargo, no incrementa su número tras la estimulación de la célula endotelial con mediadores inflamatorios o citoquinas. Tiene un ligando para acoplarse a la CD11a/CD18, aunque la afinidad es más débil que la de la ICAM-1. Se ha sugerido que la ICAM-2, junto con la ICAM-1, contribuye a la migración transendotelial de los leucocitos de bajo nivel que ocurre en algunos tejidos sin un componente inflamatorio, como por ejemplo el intestino. Mientras que un mayor despliegue de la ICAM-1 en su superficie, media un mayor tráfico de leucocitos en las vénulas postcapilares de tejidos inflamados.

Otras inmunoglobulinas presentes en la célula endotelial son: la **VCAM-1** (molécula vascular de adhesión celular-1, o CD106), la cual es inducida por diversas citoquinas y está implicada en el rodamiento y adhesión de los leucocitos; y la **PECAM-1** (molécula plaquetaria de adhesión celular-1, o CD31) presente de manera constitutiva en los leucocitos, plaquetas y célula endotelial; está implicada en la adhesión de los dos primeros a ésta última, y en la migración transendotelial de los leucocitos.

Las **selectinas** se encuentran tanto en los neutrófilos como en las células endoteliales. Modulan la adhesión entre ambos (ver página 83).

La **P-selectina**^{*} en condiciones normales se encuentra almacenada en gránulos (cuerpos de Weibel-Palade), y puede ser movilizada rápidamente a la superficie de las células endoteliales activadas (en aproximadamente 5-10 minutos), alcanzándose su máxima expresión en 10-30 minutos, en respuesta a diversos estímulos inflamatorios (histamina, trombina, radical superóxido, peróxido de hidrógeno, disminución de óxido nítrico, ...), permaneciendo más tiempo en ésta cuando el estímulo está mediado por oxidantes. A las 4-6 horas de la reperfusión puede observarse una nueva exteriorización, que en este caso requiere síntesis proteica. Al contrario, el óxido nítrico previene la exteriorización de ésta en la superficie de la célula endotelial. Como se ha indicado previamente, está implicada en el rodamiento de los leucocitos, sobre todo en las primeras fases de la reperfusión del intestino isquémico, en donde se observa un rápido aumento en el rodamiento de los leucocitos, que persiste hasta por lo menos 60 minutos^{260,379,396,397,440,463,471,497}. Además de la L-selectina, se han descrito en la superficie de los neutrófilos otros ligandos para la P-selectina como el PSGL-1 (ver página 85), y un ligando 120-kilodalton⁴⁶⁰.

La **E-selectina**^{††} no está presente en la superficie de las células endoteliales no estimuladas, ni almacenada. Su exposición se induce tras la estimulación de aquellas por diversas citoquinas (interleucina-1, TNF α , ...) y especies reactivas del oxígeno, mediante un proceso que requiere síntesis proteica *de novo*. Ayuda a mantener la adhesión leucocito – célula endotelial tras varias horas de iniciada la reperfusión. La cantidad de E-selectina depende de la duración de la isquemia, hasta un máximo (45-60 minutos), a partir del cual ya no hay una mayor expresión³⁹⁷. Es improbable que participe durante los primeros 60 minutos de reperfusión del intestino isquémico, ya que la máxima inducción se produce a las 4 horas (3 a 6 horas) del estímulo inflamatorio. Actúa como

* Denominaciones alternativas son: PADGEM (proteína de membrana granular externa dependiente de la activación plaquetar), GMP-140 (proteína de membrana granular), CD62P⁴⁶⁰.

†† Denominaciones alternativas son: ELAM-1 (molécula de adhesión leucocito - célula endotelial), CD62E⁴⁶⁰.

un ligando quimiotáctico, ya que es quimiotáctico para los neutrófilos y el ligando para la L-selectina leucocitaria.

Respuesta de la microvasculatura a la isquemia/reperfusión⁴⁹

Aunque todas las células endoteliales de la microvasculatura están expuestas de manera similar a los efectos nocivos de la isquemia/reperfusión, la disfunción endotelial resultante se manifiesta de manera específica según el nivel que se trate dentro de la microcirculación. Parece ser que aquellas células que recubren las vénulas postcapilares, son las que soportan el mayor peso de esta respuesta.

La sobreproducción de radical superóxido por parte de la célula endotelial y los leucocitos activados y adheridos, inactiva al óxido nítrico endotelial, alterando a nivel de las arteriolas la vasorelajación mediada por éste.

A nivel de los capilares, la disfunción endotelial se manifiesta tanto por una mayor filtración de líquido al intersticio, debido a una mayor permeabilidad de la barrera endotelial vascular^{46,282,289,454,455,498}, como por una reducción en el número de capilares perfundidos. El taponamiento producido por los leucocitos activados³¹⁷ (unidos o no a plaquetas), junto con las células endoteliales edematosas y parcialmente desprendidas, dificultan el flujo sanguíneo. La acumulación de líquido intersticial dependiente de la pérdida de proteínas y líquido a nivel de las vénulas postcapilares, provocará la compresión de la microvasculatura, y por tanto impedirá el movimiento de los elementos sanguíneos en los capilares⁴⁹.

La disfunción de la célula endotelial en las vénulas postcapilares explica la mayor parte de las respuestas inflamatorias asociadas con la isquemia/reperfusión. Son rasgos característicos a este nivel, la adhesión leucocito – célula endotelial, la migración transendotelial de los leucocitos, la agregación plaquetoleucocitaria, la extravasación de albúmina y la mayor producción de oxidantes.

Posiblemente la respuesta de las vénulas a la isquemia/reperfusión más ampliamente estudiada, es el aumento de permeabilidad vascular, que refleja una reducción en las propiedades restrictivas de la barrera endotelial.

La reperfusión^{49,263,266} lleva consigo el aporte de oxígeno y la formación de una variedad de mediadores humorales de la inflamación y la lesión, incluyendo las especies reactivas del oxígeno (por ej. radical superóxido, peróxido de hidrógeno, radical hidroxilo), mediadores lipídicos (por ej. PAF, leucotrieno B₄), así como mediadores polipeptídicos (por ej. C5a). La disfunción endotelial sucede en fase temprana, en los primeros minutos

(2,5 minutos)⁴⁶³, la cual puede agravarse con la activación de los neutrófilos⁴⁹⁹ prácticamente igual en todas las formas de isquemia/reperfusión, y se puede desarrollar sin una lesión morfológica obvia. Las alteraciones morfológicas que acompañan a la reperfusión tras una isquemia prolongada, generalmente incluyen el edema celular, la pérdida de vesículas pinocitóticas, y el desprendimiento de la célula endotelial de la membrana basal subyacente.

La generación endotelial de una gran cantidad de radicales superóxido y una marcada reducción en la producción de óxido nítrico y PGI₂, más los factores quimiotácticos (PAF, leucotrieno B₄, C5a) promueven la agregación y adherencia de los leucocitos (principalmente polimorfonucleares) a la superficie del endotelio alterado. Esta adherencia la facilitan las moléculas de adhesión que se encuentran en la superficie del endotelio y promueven la diapedesis de los neutrófilos a través del mismo, adhiriéndose a las células del parénquima, donde liberan mediadores proinflamatorios (por ej. elastasa, radical superóxido, citoquinas y PAF) promoviendo más lesión celular.

Resumiendo, la lesión por reperfusión del intestino delgado implica una orquestada secuencia de acontecimientos celulares y moleculares, que se desarrollan a lo largo de varias horas, e implica a dos fases muy distintas pero relacionadas. Primero está la activación de las células endoteliales y epiteliales del intestino delgado, con la consiguiente producción de especies reactivas del oxígeno derivadas de la xantina oxidasa y pérdida de la capacidad para liberar óxido nítrico. Esto ocurre en los primeros minutos de la reperfusión. Y segundo, la amplificación de la lesión por los leucocitos, a partir de los 20-30 minutos de la reperfusión, haciéndose más profunda sobre las 4,5 horas.

El óxido nítrico en la isquemia/reperfusión^{320,322,323}

El óxido nítrico puede tener una función tanto protectora como perniciosa durante el proceso de isquemia/reperfusión tisular. En la microcirculación mesentérica el óxido nítrico ejerce su efecto protector a diferentes niveles: mantiene el flujo sanguíneo, inhibe la adherencia y emigración de los leucocitos, así como la agregación plaquetoleucocitaria, modula la reactividad de los mastocitos, mantiene la integridad de la barrera mucosa oponiéndose al incremento de permeabilidad de la misma evitando la extravasación de albúmina, y neutraliza la producción excesiva de especies reactivas del oxígeno como el radical superóxido^{203,204,210,248}. Sin embargo, también se ha implicado al óxido nítrico y a

sus metabolitos en la lesión asociada a la isquemia/reperfusión^{51,190,224,225}, aunque el peroxinitrito a concentraciones nanomolares no es capaz de dañar la célula endotelial, y sí tener un efecto protector en la lesión por reperfusión al inhibir la expresión de P-selectina y la consiguiente interacción leucocito – célula endotelial²³⁶.

Uno de los primeros signos de disfunción endotelial durante la isquemia/reperfusión en la vasculatura mesentérica, es una menor producción de óxido nítrico. Cuanto mayor es la duración de la isquemia menores son los niveles de óxido nítrico. Estos se recuperan al inicio de la reperfusión, para volver a caer posteriormente, persistiendo hasta que la iNOS empieza a producir grandes cantidades del mismo^{190,248,320-322,324,463}. Sin embargo, Takada y cols.²²⁵ en su modelo de isquemia/reperfusión, ya empiezan a ver un incremento en la producción de óxido nítrico después de los 30 minutos de reperfusión.

La inhibición de la producción de óxido nítrico imita la mayoría de las alteraciones microvasculares y perimicrovasculares que normalmente se producen en la isquemia/reperfusión, promueve una mayor adhesión de los leucocitos en las vénulas postcapilares^{202-204,248,260}, e incrementa la permeabilidad microvascular^{203,204,206,207,248,484} y de la mucosa intestinal^{205,208,484,485}. Aunque este incremento de la permeabilidad, en caso de no acompañarse de lesión por reperfusión, si exclusivamente se debe a la inhibición de la síntesis de óxido nítrico, aun restringe el paso de grandes moléculas como la albúmina, y por lo tanto el epitelio no pierde enteramente su función de barrera, ya que esta inhibición no se acompaña de lesión epitelial directa^{168,186,210}. Las fuentes exógenas de óxido nítrico, sin embargo, tienen un efecto beneficioso^{202,206,208,248,322,483-487}.

Por tanto, una menor producción de óxido nítrico durante la isquemia/reperfusión^{321,324} está de acuerdo con la acción protectora del mismo durante este proceso.

Harris⁴⁵⁵ en su estudio de la permeabilidad al agua en los capilares del mesenterio de rata, observa que, al inhibir la síntesis de óxido nítrico, los cambios en el cociente de filtración de fluido se deben a una alteración de la permeabilidad, más que a un trastorno en los gradientes de presión (incremento en la presión hidrostática arteriolar o disminución de la presión osmótica plasmática), lo cual depende directamente de la presencia de leucocitos adheridos al endotelio vascular en las vénulas postcapilares. En ausencia de los leucocitos, el L-NAME tiene un efecto antiinflamatorio produciendo una disminución de la permeabilidad a nivel capilar, o sea la alteración no se limita únicamente al lugar donde los leucocitos se encuentran adheridos.

Un efecto potencial por el que el óxido nítrico puede reducir la lesión por reperfusión, es debido a su efecto inhibitorio sobre las células inflamatorias. Los neutrófilos circulantes tienen una actividad crítica en la disfunción microvascular pero no en la disfunción

mucosa tras la isquemia/reperfusión del intestino delgado. Lo cual está de acuerdo con que los mecanismos de acción subyacentes a la permeabilidad epitelial y a la disfunción microvascular son diferentes²¹⁰. Esto se basa en el hecho que el tratamiento con el anticuerpo dirigido contra la β_2 integrina CD18, el cual previene la adhesión de los leucocitos a las vénulas postcapilares, reduce significativamente el incremento en la permeabilidad microvascular pero no afecta al aumento de la permeabilidad mucosa⁴⁵⁷. Los datos de este estudio sugieren que los neutrófilos que se adhieren y emigran fuera de la vasculatura, al menos no están implicados durante la primera hora de disfunción mucosa inducida por la reperfusión. Este concepto también lo observa Kubes²⁰⁸ con un modelo similar administrando L-NAME, pero sin provocar isquemia/reperfusión. Se han implicado a los oxidantes y las proteasas derivadas de los leucocitos en la disfunción microvascular asociada con diferentes modelos inflamatorios^{48,54,204,296,458}. Kubes y Granger²⁰⁶ en su estudio sobre la implicación del óxido nítrico en la permeabilidad microvascular muestra que la inhibición de la producción de óxido nítrico por el endotelio vascular produce un incremento reversible en la pérdida de proteína intravascular que está mediado por un mecanismo leucocito independiente y otro dependiente. Un respaldo adicional al mecanismo independiente de los leucocitos es la observación que la adherencia de los mismos empieza más o menos a los 15-25 minutos y alcanza su pico a los 30-40 minutos de la infusión del L-NAME^{206,320}. Hayward y Lefer⁴⁶³ en su modelo de isquemia/reperfusión observan que la acumulación de los neutrófilos se produce a los 20-30 minutos de reperfusión. Por tanto, el prevenir la infiltración de los neutrófilos circulantes en el intestino no explica todos los efectos protectores del óxido nítrico.

Está comprobado que los donadores de óxido nítrico reducen tanto la lesión microvascular como de la mucosa en el intestino reperfundido. Debido a que los neutrófilos adheridos no median las alteraciones de la permeabilidad mucosa en la isquemia/reperfusión del intestino delgado al menos durante los primeros 15-25 minutos, entonces el óxido nítrico debe tener otros efectos beneficiosos además de sus propiedades antiadhesivas. Se ha implicado a los neutrófilos extravasculares o mastocitos (aquellos que ya se encuentran en el intersticio), en lugar de la población de neutrófilos circulantes, como importantes mediadores en el incremento de la permeabilidad mucosa inducida por la reperfusión⁴⁵⁷. La inhibición de la síntesis de óxido nítrico activa a los mastocitos en la mucosa y consecuentemente incrementa la permeabilidad epitelial²⁰⁵. Además, el óxido nítrico reduce la reactividad de los mastocitos moderando su degranulación y la consiguiente liberación de mediadores inflamatorios como oxidantes, histamina, PAF, leucotrienos, ..., atenuando el reclutamiento de los leucocitos dependiente de éstas células^{248,260}. Dado que los oxidantes pueden activar directamente los mastocitos^{204,257}, la capacidad antioxidante del

óxido nítrico también puede prevenirla. Kurose y cols.²⁰⁴, muestran niveles de estrés oxidativo en los mastocitos expuestos a L-NAME, apoyando este concepto.

Otro efecto beneficioso del óxido nítrico independiente es que este puede inhibir la NADPH oxidasa leucocitaria y por consiguiente la producción de radical superóxido, al actuar directamente sobre un componente de la misma⁴⁶⁷. También reduce la producción de peróxido de hidrógeno en los leucocitos⁵⁰⁰. Por tanto, además de lo expuesto, el óxido nítrico también puede afectar directamente la citotoxicidad de los neutrófilos por alterar la reactividad de esta célula, afectando la capacidad a producir oxidantes^{467,500}, y sintetizar leucotrieno B₄⁴⁶⁸.

El óxido nítrico es un factor importante en la regulación de la permeabilidad microvascular en el intestino delgado. Este proceso regulador tiene lugar mediante la activación específica de la guanilato ciclasa citosólica que incrementa los niveles de GMPc⁵⁰¹.

Una mayor producción de superóxido en los tejidos postisquémicos inactiva al óxido nítrico producido por las células endoteliales, lo cual provoca adhesión entre los leucocitos y las células endoteliales y pérdida de proteína vascular^{202,258-260}. Esto se apoya en la observación que la respuesta inflamatoria aguda que se observa en el tejido postisquémico puede imitarse con inhibidores de la NO sintasa^{203,204,206,207,248}. A la inversa, un mecanismo potencial por el que los donadores de óxido nítrico y él mismo pueden prevenir el incremento de la permeabilidad mucosa inducida por la isquemia/reperfusión, es que actúa como captador del radical superóxido. Gaboury y cols.²⁵⁸ muestran que la capacidad antioxidante del plasma en la rata aumentó más del doble tras la administración de donadores de óxido nítrico a concentraciones que previenen la lesión mucosa inducida por la reperfusión, también que la administración *in vivo* de un sistema generador de superóxido puede inducir la afluencia de neutrófilos, y que la superóxido dismutasa y los donadores de óxido nítrico inhiben directamente esta respuesta, sugiriendo una capacidad antioxidante potencial del óxido nítrico. Algo que también indica Grisham²⁵⁹.

Reperusión y daño tisular

Sin duda, la alteración del metabolismo energético y el desequilibrio entre los sistemas prooxidante y antioxidante son dos componentes importantes del daño provocado por la isquemia/reperfusión de los tejidos isquémicos.

Durante la isquemia las células sufren cambios específicos en la actividad enzimática, función mitocondrial (donde se incrementa la producción de especies reactivas del oxígeno), estructura del citoesqueleto, transporte a través de las membranas, lo cual de una manera global predispone a la lesión por reperfusión.

De manera general, se admite que hay una merma en la cantidad y/o funcionalismo del sistema antioxidante durante la isquemia y la reperfusión^{51,89,142-146}, por lo que la capacidad defensiva se encuentra disminuida, siendo insuficiente para proporcionar una protección completa y sostenida contra una mayor producción de especies reactivas del oxígeno durante la reperfusión. Sin embargo, Lum y cols.¹¹⁷ en su modelo *in vitro* con células endoteliales no observan tal merma.

La isquemia/reperfusión del intestino produce lesiones que van desde sutiles cambios (incrementos) en la permeabilidad capilar^{46,282,289,454,455,498}, pasando por una pérdida de enzimas citosólicos a la circulación^{309,502-505}, cambios morfológicos microscópicos de la mucosa que se traducen en un aumento de la permeabilidad mucosa^{208,210,279,284,421,451,485}, hasta infarto transmural macroscópico^{267,282,503,506,507}, dependiendo de la severidad^{267,284,450-452} y duración^{279,360,361,450,451,453} de la isquemia. Hay básicamente dos circunstancias que pueden inducir lesión del tejido intestinal en estados isquémicos: la hipoxia durante el periodo de isquemia^{267,269,270,279,282,360,361,506-508} y la generación de especies reactivas del oxígeno tras la reperfusión del tejido isquémico^{46,48,49,142,261,265,275,277,278,282,309}.

Durante el periodo de isquemia y como consecuencia del metabolismo energético reducido, una amplia fracción de células sufren cambios bioquímicos y morfológicos asociados a la anoxia, pero en su mayoría permanecerán potencialmente viables, sólo una pequeña fracción será dañada de manera irreversible^{146,271,272,508}. La mucosa intestinal es especialmente sensible a la isquemia. En la rata, tras 60 minutos de isquemia completa, se producen prolongados cambios funcionales y estructurales, aunque la consiguiente recuperación puede ser completa⁵⁰⁷. Estudios estructurales demuestran que la lesión de la microvellosidad intestinal se produce en los primeros minutos de isquemia^{269,509}. El fenómeno más sobresaliente desde el punto de vista microscópico en este periodo, es el progresivo desprendimiento de las células epiteliales de la vellosidad, la cual empieza en las puntas de las vellosidades y acaba en las criptas^{267,360,361,507}. La pérdida de enzimas del borde en cepillo de la célula del epitelio intestinal (ej. maltasa) ocurre más rápidamente que la pérdida de enzimas citoplasmáticas como la lacticodeshidrogenasa (LDH), y esto precede claramente a la lesión de las células de la cripta, lo cual marca el inicio de posteriores lesiones irreversibles, ya que la reepitelización mucosa depende de la integridad de este último tipo celular⁵⁰⁴.

En la reperfusión hay un incremento en la velocidad con la que se desprenden las células epiteliales, así como una alteración de la membrana celular con la consiguiente pérdida de enzimas citoplasmáticos y muerte celular⁵⁰⁴. Sin embargo, en otras células pueden revertirse los cambios provocados por la isquemia y recuperar su función normal. Estas células potencialmente viables son por lo tanto críticas en el periodo de reperfusión, aunque tras ésta es difícil saber si las células dañadas pertenecieron realmente al grupo de las potencialmente viables¹⁴⁶. Por otro lado, tras largos periodos de isquemia la lesión debida al componente isquémico puede ser tan grande, que el neutralizar las especies reactivas del oxígeno y eliminar gran parte de la lesión correspondiente al periodo de reperfusión no represente una mejoría significativa^{279,282,360,361,508}.

Desde el punto de vista terapéutico, el concepto de lesión por reperfusión sólo puede establecerse si una intervención demuestra inequívocamente salvar las células viables tras la isquemia, después de la reperfusión¹⁴⁶.

Asimismo, la intensidad de la reacción inflamatoria en el tejido postisquémico puede ser tan grande que la lesión por reperfusión se manifieste además en órganos distantes. Ya se ha hecho referencia al síndrome de disfunción multiorgánico.

Hay una amplia variación en la tolerancia a la isquemia por parte de los distintos órganos. Esta variación parece relacionarse más con el órgano mismo y con las condiciones de isquemia, que con el agente farmacológico utilizado para la eliminación de las especies reactivas del oxígeno.

Las especies reactivas del oxígeno participan en la comunicación como transmisores de señales en varios tipos celulares, participando y modificando eventos fisiológicos relacionados a la unión ligando – receptor y activación transcripcional. Regulan o participan en el crecimiento, apoptosis, y en la respuesta adaptativa a la lesión o el estrés. Las vías intracelulares están implicadas en la muerte celular tras la reoxigenación, aunque la vía específica que conduce a la apoptosis o necrosis puede variar entre los tipos celulares⁵¹.

Fenómeno del no reflujo en la isquemia/reperfusión^{265,498}

Aparte de las alteraciones provocadas por la reperfusión de los tejidos isquémicos: pérdida de la integridad endotelial, edema intersticial, lesión de las células parenquimatosas, y disfunción orgánica; tras largos periodos de isquemia, al inicio del periodo de reperfusión se puede producir un fallo en la perfusión del flujo sanguíneo de

algunos capilares individuales provocando focos de isquemia local, con la consecuente prolongación de la hipoxia tisular durante la reperfusión.

Aparte de las especies reactivas del oxígeno derivadas de la xantina oxidasa⁵¹⁰, se han implicado a diversos mecanismos que promueven del fenómeno el no reflujo postisquémico, tales como la hinchazón de las células endoteliales, hemoconcentración con alteración de la fluidez de la sangre a nivel microvascular, incremento de la presión postcapilar, compresión extravascular inducida por el edema intersticial, trombosis de la microvasculatura, taponamiento de los capilares por los leucocitos.

Precondicionamiento isquémico

Además de los mecanismos descritos, se sabe que la exposición previa de los tejidos a breves periodos de isquemia, lo que se ha dado en llamar *precondicionamiento isquémico*, previene el desarrollo de la lesión celular inducida por una posterior interrupción del flujo sanguíneo de carácter más prolongado²⁶⁵. Este puede provocarse en muchas situaciones o mediante diversos factores, tanto intencionada como inadvertidamente^{511,512}.

El hecho de que la lesión por isquemia/reperfusión esté mediada por las especies reactivas del oxígeno, sugiere que la respuesta adaptativa a breves periodos de isquemia pueda implicar una mayor producción de enzimas antioxidantes en los tejidos afectos. En el intestino delgado, el preconditionamiento isquémico se asocia no sólo con una protección contra un posterior periodo de isquemia, sino también con una mayor actividad de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa en la mucosa^{49,513}. Osborne y cols.⁵¹³ en su estudio sobre el desarrollo de tolerancia en el intestino delgado tras un leve periodo de isquemia (15 minutos) muestran que el desarrollo de tolerancia oxidante en la mucosa del intestino delgado no implica una participación activa del mencionado epitelio. Se desarrolla tolerancia a las 24 horas, pero no a la hora o a las 72 horas tras el inicio de la primera isquemia. El mayor estado antioxidante que observan a las 24 horas tras la isquemia, es el resultado de cambios adaptativos en la lámina propia, y aunque no saben que tipo celular es el implicado señalan al endotelio como candidato.

Aparte de las especies reactivas del oxígeno, en el preconditionamiento también se ha implicado a los canales de potasio dependientes del ATP, a la proteína quinasa C, a la adenosina, a la producción de moco y a una potenciada respuesta inflamatoria^{51,265,512,514}.

Objetivo

Objetivo

Se han empleado multitud de modelos experimentales para estudiar la lesión por isquemia/reperfusión, tanto *in vivo* como *in vitro*. De los modelos empleados *in vivo* el denominador común en ellos es que la isquemia/reperfusión está provocada mediante un procedimiento mecánico, que es lo que a partir de ahora se denominará método físico, para distinguirlo del método farmacológico, que es el modelo que pretendemos estudiar y comparar con el primero, demostrando con ello que se puede producir lesión por isquemia/reperfusión mediada por sustancias químicas, y que en esta última están implicados las especies reactivas derivadas del oxígeno y el óxido nítrico.

El objetivo del estudio es desarrollar un modelo en el intestino de rata que permita:

- Cuantificar, si se producía, la magnitud de alteraciones propias del síndrome de isquemia/reperfusión provocado por medio de un mecanismo farmacológico, y comparar diferentes aspectos de la lesión: daño tisular y permeabilidad vascular (valorados respectivamente por los niveles de LDH y azul de Evans en el líquido perfundido por la luz del intestino sometido a intervención), en función del método empleado para producirla (físico o farmacológico).
- Determinar si factores clásicamente implicados, como las especies reactivas del oxígeno, y el óxido nítrico, que intervienen en la lesión por isquemia/reperfusión producida por un mecanismo físico (pinza hemostática) contribuyen de igual manera en la producción de la lesión por isquemia/reperfusión farmacológica.

Metodología

Diseño del estudio, animales y métodos

Diseño

Estudio experimental aleatorizado, sin enmascaramiento.

Población de estudio

Se utilizaron ratas Wistar macho, entre 270 y 330 gramos de peso, procedentes de Charles River, entre enero de 1991 y julio de 1995.

Durante la estabulación se les mantuvo en un ambiente controlado, con un ciclo lumínico de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, a una temperatura y humedad constantes de 18 a 23 °C y 40 a 70 % respectivamente. Hasta el momento de la experiencia fueron alimentados “ad libitum” con una dieta estándar para roedores y agua.

Métodos de asignación a los grupos de estudio

Se han empleado dos técnicas de asignación aleatoria: asignación aleatoria simple y asignación por bloques, utilizando un listado de números aleatorios generados por calculadora o una tabla respectivamente, según en la fase del estudio en la que nos encontráramos.

Intervenciones

Todas las experiencias se realizaron entre las 9 y las 15 horas, para evitar variaciones debidas a los ritmos circadianos.

El cuidado y manipulación de los animales se hizo de acuerdo con la normativa respecto a la protección de animales utilizados para experimentación y otros propósitos científicos^{515,516}.

Procedimiento general

Los animales se anestesian con uretano al 25 % (0,6 ml por cada 100 g de peso) por vía intraperitoneal, administrando dosis adicionales cuando fue necesario. Manteniéndose con respiración espontánea del aire de la habitación. Se administra por vía intravenosa (vena femoral) azul de Evans al 1 % en suero salino (20 mg/kg)⁵¹⁷. Tras laparotomía

media de unos 3 cm de longitud, se selecciona un asa de íleon* preferentemente irrigada por dos ramas de la arteria mesentérica superior, su longitud oscila entre los 3,5 y los 5,5 centímetros. Tras aclarar la luz intestinal de su contenido, se canula por ambos extremos con tubos de silicona de unos 3 mm de diámetro y se aseguran con hilo. Se hace pasar por su interior suero salino al 0,9 %.

La temperatura corporal de la rata se mantiene a 37 °C, ésta permanece durante toda la experiencia en decúbito lateral sobre una platina, calentada mediante unas resistencias, regulándose su temperatura por medio de un termostato. El líquido de perfusión (suero salino), a través de un serpentín, se calienta en un baño lo suficiente para que cuando llegue al intestino (velocidad de perfusión, 0,5 ml/min), éste tenga una temperatura aproximada de 37 °C (cosa que se comprueba en cada experiencia por medio de un sistema al que está acoplado un termómetro), evitándose así el enfriamiento del órgano. Así mismo, para evitar la desecación, se coloca una gasa humedecida de manera permanente con suero salino (superfusión a 0.5 ml/min y 37 °C), sobre el intestino canulado y mesenterio expuestos al medio ambiente.

Todas las experiencias constan de un primer periodo de 30 minutos, en el que no se recogen muestras de líquido de perfusión intestinal. Se considera un periodo de estabilización postquirúrgica. Y de un segundo periodo durante el cual ya se recogen muestras de líquido de perfusión. Éste a su vez se puede subdividir, o no, en diferentes subperiodos conforme al tipo de intervención que se lleve a cabo y según se detalla a continuación.

Cuando se somete al intestino delgado de la rata a un proceso de isquemia/reperfusión, sea por el procedimiento que sea, este segundo periodo consta de 3 subperiodos. Uno de 30 minutos o periodo control, durante el cual se recogen 3 muestras de todo el suero perfundido durante 10 minutos. A continuación un periodo de 60 minutos, o periodo de isquemia, durante el que se recogen 6 muestras de todo el suero perfundido a través del intestino, de 10 minutos de duración. A éste le seguirá un periodo de 30 minutos o periodo de reperfusión, durante el cual se recogen 12 muestras de todo el suero perfundido, durante 2 minutos los primeros 12 minutos y durante 3 el resto de dicho periodo (figura 8).

* Cuando a lo largo del texto, se hace referencia al intestino delgado, nos referimos al íleon. Siempre se ha estudiado la misma zona, ya que diferentes porciones del intestino delgado, muestran distintas sensibilidades a la lesión por isquemia/reperfusión³²¹.

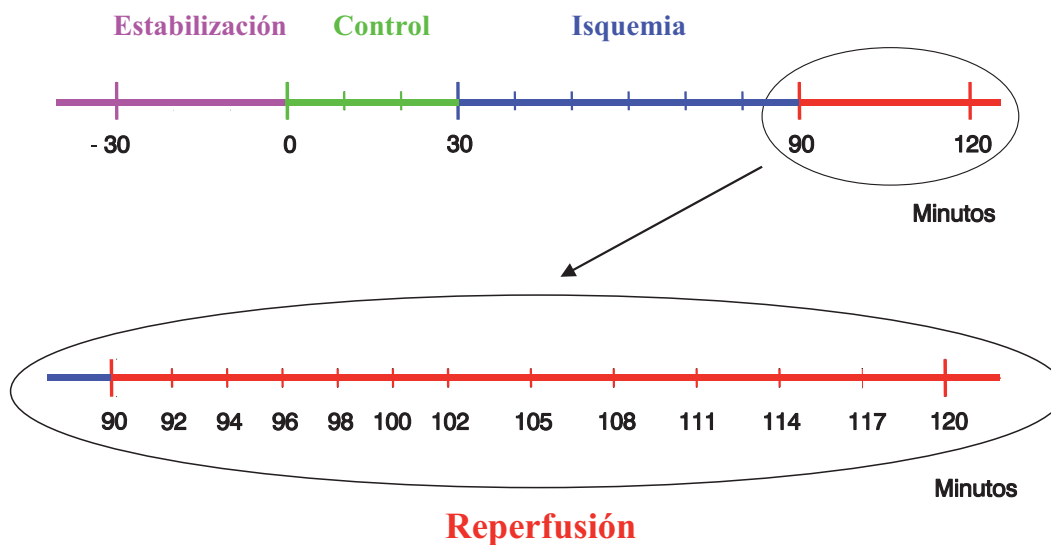


Figura 8. Escala de tiempo donde se detallan los diferentes periodos de que consta una experiencia en la que se produce el síndrome de isquemia/reperusión. Cada intervalo entre marcas verticales indica el periodo de tiempo durante el cual se está recogiendo una muestra.

Cuando se somete al intestino delgado a un proceso de isquemia sin reperusión, durante el periodo control se recogen muestras de la misma manera a como se detalló en el párrafo anterior. La diferencia es que la isquemia, en vez de 60 durará 90 minutos. Sin embargo, se respetan los intervalos de tiempo de recogida de muestras, y por tanto el número de éstas desde el minuto 30 hasta el 120.

A los animales pertenecientes al grupo control, obviamente no se les sometió a isquemia ni a reperusión, pero si se procedió a recoger muestras de líquido de perfusión intestinal de la misma manera que en los procedimientos anteriores.

Al finalizar la experiencia se sacrifica al animal mediante dislocación cervical.

Isquemia/reperusión física (I/R física)

Además de toda la intervención “Procedimiento general”, expuesta en el punto anterior, se emplea una pinza hemostática de superficies lisas para producir la isquemia, la cual se aplica a la rama de la arteria mesentérica que irriga el intestino seleccionado, se inicia lo

que se ha denominado periodo de isquemia, y se retira el instante anterior que da paso al periodo de reperfusión.

Los criterios utilizados para la retirada anticipada de los animales sometidos a dicha intervención han sido la necrosis aguda del intestino en los primeros minutos de isquemia (4 casos), o fallos en la técnica (2 casos).

Al grupo control de esta intervención se le somete únicamente a lo que se ha denominado intervención general.

Para controlar la lesión por reperfusión, a otro grupo experimental no se le provoca la misma, y se mantiene la isquemia 30 minutos más (90 minutos en total).

Isquemia/reperfusión farmacológica (I/R farmacológica)

Además de lo expresado en el apartado “Procedimiento general”, para realizar esta intervención se superfunde a una velocidad constante (30 ml/h), las arterias que irrigan el segmento intestinal perfundido con una sustancia vasoconstrictora (clorhidrato de noradrenalina $2,5 \cdot 10^{-3}$ M) en una solución de suero salino al 0,9 %. A continuación, y para provocar el periodo de reperfusión se retira el goteo de la sustancia vasoconstrictora y se coloca inmediatamente otro (velocidad del goteo: 60 ml/h) con dos sustancias, una vasodilatadora (clorhidrato de isoxsuprina $2 \cdot 10^{-3}$ M) y otra antagonista del vasoconstrictor (clorhidrato de timoxamina $2 \cdot 10^{-3}$ M) en solución de suero salino al 0,9 %. Hay que asegurarse que dichas sustancias sólo entren en contacto con las arterias seleccionadas y así produzcan sólo un efecto local (en el intestino seleccionado). De entrar al interior del abdomen se pueden producir alteraciones hemodinámicas no deseadas que obligarían a retirar anticipadamente al animal del estudio.

Para asegurar que también estos goteos tengan una temperatura de 37 °C, se comprueba al final de cada experiencia, utilizando la misma estrategia descrita para el líquido de perfusión.

El criterio utilizado para la retirada anticipada de los animales sometidos a dicha intervención ha sido el fallo en la técnica (5 casos).

Al grupo control de esta intervención se le somete únicamente a lo que se ha denominado intervención general.

Tratamientos

Los siguientes tratamientos farmacológicos se aplicaron a ambos modelos de *I/R física* e *I/R farmacológica*.

El **alopurinol** se administró a los animales por vía oral, en una suspensión de metilcelulosa al 1 %. La pauta de administración fue la siguiente: 50 mg/kg cada 12 horas, los dos días anteriores y 100 mg/kg el mismo día de la experiencia, 2 horas antes de la misma.

La **superóxido dismutasa (SOD)** (*Ontosein*[®]: orgoteina, actividad superóxido dismutasa 2.600 U/mg de proteína a pH 7,8*) ha sido administrada por vía intravenosa (vena femoral), en una solución de suero salino al 0,9 %. La pauta de administración fue, perfusión continua (velocidad de perfusión 1 ml/hora) de $1.000 \text{ U} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{hora}^{-1}$, desde 60 minutos antes de provocar la isquemia hasta el minuto 5 de la reperfusión (total 125 minutos).

La **catalasa** ha sido administrada por vía intravenosa (vena femoral), en una solución de suero salino al 0,9 %. La pauta de administración fue, perfusión continua (velocidad de perfusión 1 ml/hora) de $200.000 \text{ U} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{hora}^{-1}$, desde 60 minutos antes de provocar la isquemia hasta el minuto 5 de la reperfusión (total 125 minutos).

La **N^G-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME)** se administró a los animales por vía intravenosa (vena femoral), en una solución de suero salino al 0,9 %. La pauta de administración fue, perfusión continua de $15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{hora}^{-1}$ (velocidad de perfusión 1 ml/hora), desde el minuto 45 de isquemia hasta el minuto 30 de la reperfusión (total 45 minutos).

La **L-arginina** ha sido administrada por vía intravenosa (vena femoral), en una solución de suero salino al 0,9 %. La pauta de administración fue, perfusión continua (velocidad de perfusión 1 ml/hora) de $300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{hora}^{-1}$, desde el minuto 45 de isquemia hasta el minuto 30 de la reperfusión (total 45 minutos).

A los grupos control se les ha sometido a la misma manipulación que a los distintos grupos intervención. En caso de aplicación de un tratamiento, al grupo control se le ha administrado únicamente el vehículo con el que se administra el fármaco, o un fármaco idéntico sin la actividad específica del que se quiere controlar (D-NAME, D-arginina).

* Información suministrada por el laboratorio farmacéutico.

Definición de la variable respuesta

Un hecho característico en la reperfusión del intestino isquémico es el daño funcional y estructural de la mucosa^{267,269,270,502,504,509}, lo que produce un incremento del aclaramiento transmucoso de albúmina (y otras macromoléculas), por un aumento de la permeabilidad microvascular y de la mucosa intestinal^{46,208,210,248,279,284,312,421,451,484,485}, así como un incremento en la liberación de enzimas intracelulares debido al daño tisular^{451,502-505}. Para cuantificarlas, se mide respectivamente el azul de Evans extravasado (usado como marcador de la pérdida proteica intravascular), y el nivel del enzima citosólico lacticodeshidrogenasa (LDH) en el líquido de perfusión.

Para evaluar las alteraciones producidas durante el síndrome de isquemia reperfusión se utilizan los siguientes criterios.

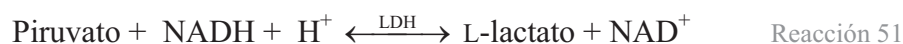
La permeabilidad vascular y de la mucosa intestinal a las proteínas del plasma es una medida muy utilizada para cuantificar la disfunción observada tras breves periodos de isquemia intestinal²⁸⁹. Diversos trabajos muestran una correlación positiva significativa entre el incremento en la permeabilidad microvascular, y la extravasación de ciertos colorantes, como el azul de Evans, administrados por vía intravenosa⁵¹⁸⁻⁵²⁰.

Para valorar la permeabilidad vascular y de la mucosa intestinal, se determina la acumulación de azul de Evans en el líquido de perfusión intestinal, el cual tras la administración intravenosa se une a las proteínas del plasma, en su mayor parte a la albúmina^{521,522}. Diversos trabajos muestran una correlación positiva significativa entre el incremento en la permeabilidad microvascular, y la extravasación de ciertos colorantes administrados por vía intravenosa⁵¹⁸⁻⁵²⁰. Esta valoración se hace con un espectrofotómetro, determinando la densidad óptica del líquido de perfusión intestinal a 620 nm.

El mantenimiento de la isquemia provoca la liberación de enzimas citosólicos por alteración de la estructura celular^{451,502-505}, pudiéndose apreciar desde alteraciones microscópicas hasta graves cambios macroscópicos^{267,282,503,506,507}.

Para evaluar la lesión tisular, se mide la cantidad de LDH liberada a la luz intestinal, un enzima presente en todas las células del organismo, que cataliza la conversión de piruvato en lactato. Esta ya ha sido utilizada como marcador del estrés oxidativo⁵¹. En el análisis de las muestras de líquido de perfusión, se utilizó para su determinación el test "Método estándar optimizado" de la Deutsche Gesellschaft für Klinische Chemie (Z. klin. Chem. u. klin. Biochem. 8 (1970) 658; 10 (1972) 182).

La determinación se basa en la siguiente reacción:



La actividad LDH liberada en el medio fue evaluada espectrofotométricamente a 340 nm midiendo el NAD^+ derivado de NADH usando al piruvato como sustrato. Una unidad de actividad LDH se define como la cantidad de enzima que produce un $\mu\text{mol/L}$ de NAD^+ por minuto.

Al acabar cada experiencia, se centrifugan las muestras de suero perfundido por la luz intestinal a 1500 g durante 10 minutos a 10 °C. Tras ello se recoge el sobrenadante (casi toda la muestra) y se almacena en una nevera a 4 °C a la espera de ser analizado de la manera descrita anteriormente.

Ambos parámetros fueron analizados siempre dentro de las 30 horas siguientes a la experiencia. En ocasiones se recurrió a mediciones repetidas.

Relación de aparatos utilizados

Microscopio Binocular Jena, platina termostataada diseñada especialmente para acoplarse al microscopio, baño Selecta, bomba peristáltica Pharmacia Biotch P1, bomba de perfusión Infors HT[®] Precidor Typ 5003, bomba de perfusión Braun Perfusor[®] IV, centrífuga Sorval RC5, espectrofotómetro Milton Roy Spectronic 301, espectrofotómetro Hicel Lisa.

Fármacos y reactivos

Uretano (Sigma), azul de Evans (Sigma), noradrenalina clorhidrato (Sigma), timoxamina clorhidrato (Roig-Farma), isoxsuprina clorhidrato (Roig-Farma), alopurinol (Sigma), metilcelulosa (Sigma), Ontosein[®] (orgoteina 8 mg) (Tedec-Meiji Farma S.A.), catalasa (Sigma), N^{G} -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) (Sigma), L-arginina (Sigma), N^{G} -nitro-D-arginina metil éster (D-NAME) (Sigma), D-arginina (Sigma).

Las determinaciones de la actividad lacticodeshidrogenasa se realizaron con material suministrado por los laboratorios Boehringer Mannheim.

Todos los preparados (soluciones, suspensiones) se prepararon el mismo día de la experiencia, exceptuando la solución de uretano que se puede almacenar durante días sin problemas.

Metodología del análisis estadístico

Se presenta un modelo de medidas repetidas, un diseño factorial mixto (diseño entre sujetos y diseño intrasujetos), donde los distintos tratamientos forman el factor entre grupos y el tiempo es el factor intragrupo.

Se procede a la evaluación de los datos mediante un análisis de la variancia de medidas repetidas, utilizando el test conservador, en el cual se ajustan los grados de libertad de la porción intrasujetos⁵²³, ya que las pruebas F habituales no tienen en cuenta la correlación serial⁵²⁴ que se da en el modelo que se presenta, y al no cumplirse en nuestros datos la condición de que estos sigan un patrón de esfericidad en la matriz de variancias/covariancias de las variables ortonormalizadas⁵²⁵.

A la matriz de datos se analiza con un programa MANOVA de la aplicación SPSS para Windows Versión 6.0.1 (Norusis, 1994), empleando contrastes tipo Simple y Helmert para el análisis de las diferencias entre tratamientos, utilizando el procedimiento de Bonferroni de comparaciones múltiples para controlar el incremento de probabilidad de cometer un error tipo I ($\alpha = 0,05$), en la aplicación de contrastes a posteriori⁵²⁵.

Un contraste en un tiempo dado entre dos tratamientos, consiste en restarle a la media de cada uno de los tratamientos, en el tiempo en cuestión, su correspondiente periodo control; una vez hecho, se calcula la diferencia entre los dos valores resultantes, su intervalo de confianza del 95 % y su significación estadística.

Aparte de los animales excluidos por necrosis intestinal o fallo en la técnica, ninguna rata perteneciente a los grupos control, grupos de referencia *I/R física* e *I/R farmacológica*, y grupos tratamiento, fue excluida del estudio o del análisis final de los datos.

Resultados

Resultados descriptivos

Los animales utilizados son ratas Wistar macho con un peso medio de 303,8 g (DE: 18,9 g), a las que se les seleccionó un segmento de intestino delgado de 4,4 cm de longitud media (DE: 0,6 cm).

La tabla 2 muestra las características de ambas variables de selección en los grupos implicados en análisis posteriores.

Tabla 2. Datos descriptivos de los animales en las variables de selección peso (gramos) y longitud del segmento intestinal (centímetros). Los datos se presentan como media y desviación estándar de la muestra. I/R: isquemia/reperfusión. L. s. i.: longitud del segmento de intestino delgado. SOD: superóxido dismutasa. L-NAME: N^G-nitro-L-arginina metil éster.

Grupo	Peso	L. s. i.	Nº casos
Control	306,2 (22,3)	4,7 (0,8)	31
Isquemia de 90' sin reperfusión	300,5 (17,5)	4,2 (0,6)	7
I/R física	297,8 (22,4)	4,4 (0,7)	35
I/R física + alopurinol	296,7 (19,8)	4,4 (0,6)	10
I/R física + SOD	305,5 (20,1)	4,3 (0,4)	8
I/R física + catalasa	305,2 (15,5)	4,1 (0,4)	8
I/R física + L-NAME	311,8 (18,4)	4,5 (0,4)	8
I/R física + L-arginina	311,7 (16,0)	4,5 (0,5)	8
I/R farmacológica	304,3 (10,9)	4,3 (0,5)	19
I/R farmacológica + alopurinol	296,0 (16,2)	4,6 (0,7)	10
I/R farmacológica + SOD	309,9 (19,9)	4,4 (0,3)	8
I/R farmacológica + catalasa	308,8 (15,1)	4,5 (0,4)	8
I/R farmacológica + L-NAME	306,8 (15,6)	4,5 (0,4)	8
I/R farmacológica + L-arginina	307,4 (15,6)	4,4 (0,7)	8

El estudio de comparabilidad inicial entre los grupos de animales respecto a estas dos

variables, nos proporciona un valor de F^* ($F_{13, 162, 0.05} = 0,82$) no significativo ($P = 0,635$) para la longitud del segmento intestinal; y otro, $F_{13, 162, 0.05} = 0,93$, igualmente no significativo ($P = 0,528$) para la variable peso.

De igual manera, tampoco existen diferencias estadísticamente significativas entre los periodos control de los animales pertenecientes a los grupos estudiados (son comparables), para las variables respuesta LDH ($UI \cdot ml^{-1} \cdot min^{-1} \cdot cm$ de intestino perfundido⁻¹) y azul de Evans (densidad óptica $\cdot 1000 \cdot ml^{-1} \cdot min^{-1} \cdot cm$ de intestino perfundido⁻¹). Para ver los resultados descriptivos de los mencionados periodos control en los distintos grupos, mirar las tablas 4 a 10 del anexo I (páginas 228 a 234).

Estos datos nos permiten concluir que, nada se opone a aceptar que los grupos son comparables.

Resultado del análisis de la influencia de la reperfusión en la lesión isquémica

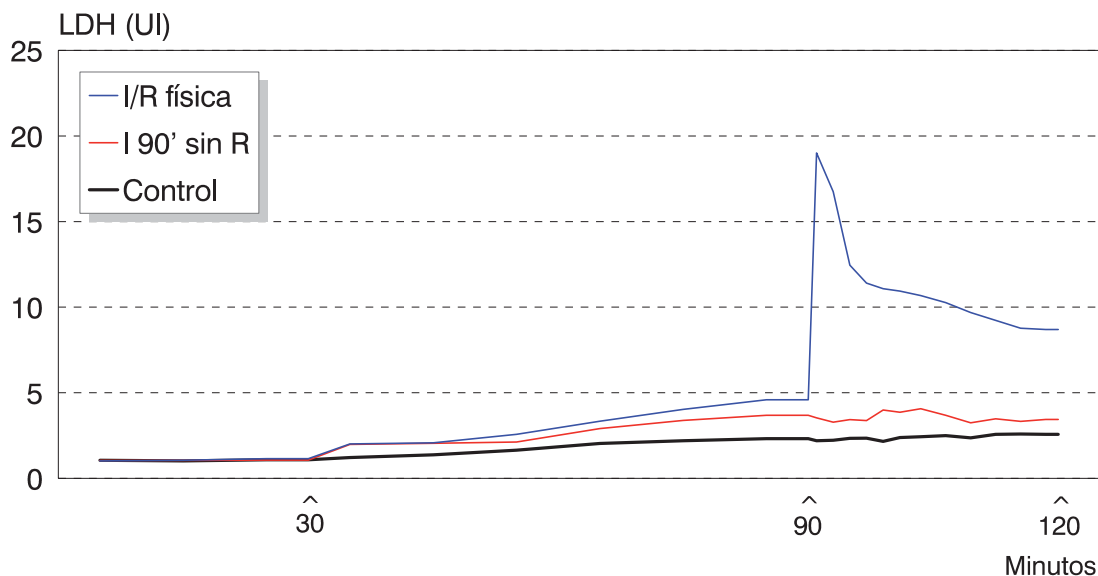
Las gráficas 1 y 2 muestran la evolución de los niveles de LDH ($UI \cdot ml^{-1} \cdot min^{-1} \cdot cm$ de intestino perfundido⁻¹) y azul de Evans (densidad óptica $\cdot 1000 \cdot ml^{-1} \cdot min^{-1} \cdot cm$ de intestino perfundido⁻¹) a lo largo de los periodos control, isquémico y de reperfusión, en el grupo *I/R física*; y de los periodos control e isquémico del grupo *I 90' sin R*, controlado por el grupo control.

Estudio de los niveles de LDH en el líquido de perfusión.

El estudio de comparabilidad inicial no se opone a aceptar que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los periodos control de los tres grupos, $P = 0,779$.

El análisis de los datos pone de manifiesto la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre el grupo *I/R física* y el grupo *I 90' sin R* ($P < 0,001$).

* $F_{gl_1, gl_2, \alpha}$. Donde gl_1 son los grados de libertad de la variancia entre grupos; gl_2 , los grados de libertad de la variancia intragrupos y; α , representa el riesgo α , el cual es la probabilidad de rechazar la hipótesis nula condicionada al hecho de que ésta sea verdadera (error tipo I).



Gráfica 1. Niveles de LDH ($\text{UI} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cm}$ de intestino perfundido⁻¹) en el líquido de perfusión intestinal. I: isquemia. R: reperusión. LDH (UI): unidades del sistema internacional de lacticodeshidrogenasa.

Se han aplicado contrastes entre los grupos *I 90' sin R* respecto al *I/R física*, controlado por el grupo control, para todos los tiempos estudiados. Tabla 11 en anexo II.

No se observan diferencias estadísticamente significativas entre *I 90' sin R* respecto al *I/R física* en el periodo comprendido entre los 30 y los 90 minutos del experimento.

Por otro lado, en el periodo comprendido entre los 90 y los 120 minutos del experimento, existen diferencias muy significativas en los niveles de LDH de ambos grupos. En los animales sometidos a reperusión estos niveles aumentan considerablemente, a diferencia de los que se les mantiene la isquemia hasta el final, que permanecen más o menos estables. La diferencia es máxima en el minuto 92 (en el grupo *I/R física*, minuto 2 de la reperusión y en el grupo *I 90' sin R*, minuto 62 de isquemia), 16,0 UI (IC95 %*: 10,6 a 21,4) ($P < 0,001$), lo que representa una diferencia del 86,6 %[#] (IC95 %: 57,2 a 115,9) si tomamos como referencia el valor del grupo *I/R física* y le damos el valor 100 %. Esto equivaldría a decir que el grupo *I 90' sin R* tiene unos niveles de LDH que son el 13,4 % de los observados en el grupo *I/R física*. Las diferencias se mantienen hasta el final (en el grupo *I/R física*, minuto 30 de la

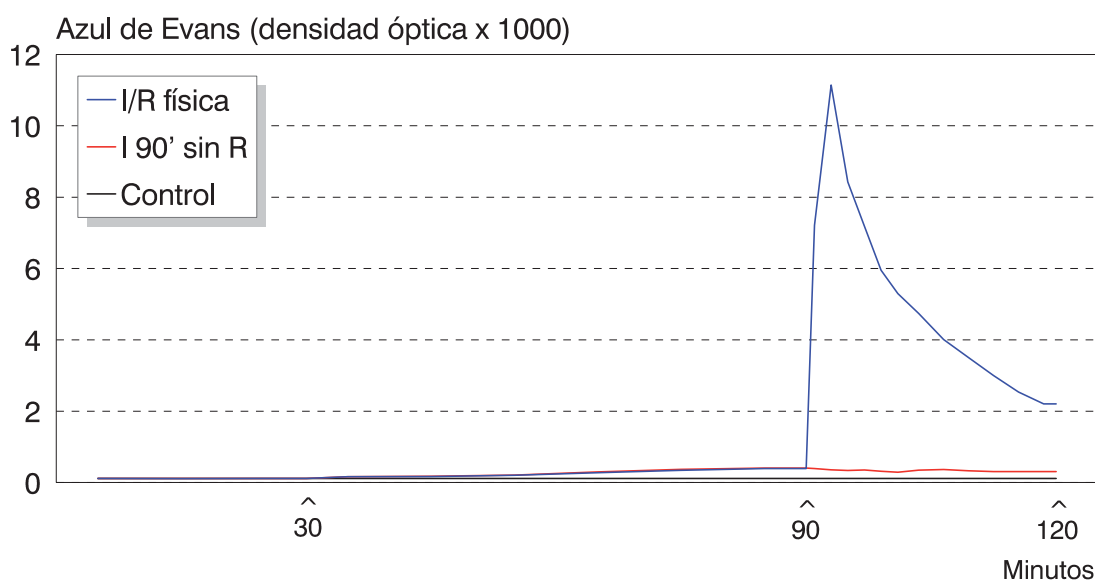
* IC95 %: Intervalo de confianza del 95 %.

[#] En este apartado, de aquí en adelante, los valores expresados en % tendrán como referencia del 100 % el nivel del grupo *I/R física*, en el intervalo de tiempo que nos estemos refiriendo.

reperusión y en el grupo *I 90' sin R*, minuto 90 de isquemia), 5,5 UI (IC95 %: 2,8 a 8,1) ($P < 0,001$), lo que representa una diferencia del 69,6 % (IC95 %: 35,5 a 103,6).

Estudio de los niveles de densidad óptica de azul de Evans en el líquido de perfusión.

El estudio de comparabilidad inicial no se opone a aceptar que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los periodos control de los tres grupos, $P = 0,905$.



Gráfica 2. Niveles de azul de Evans (densidad óptica $\cdot 1000 \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cm}$ de intestino perfundido⁻¹) en el líquido de perfusión intestinal. I: isquemia. R: reperusión.

El análisis de los datos pone de manifiesto la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre el grupo *I/R física* y el grupo *I 90' sin R* ($P < 0,001$).

Se han aplicado contrastes entre los grupos *I 90' sin R* respecto al *I/R física*, controlado por el grupo control, para todos los tiempos estudiados. Tabla 12 en anexo II.

No se observan diferencias estadísticamente significativas entre *I 90' sin R* respecto al *I/R física* en el periodo comprendido entre los 30 y los 90 minutos del experimento.

Sin embargo, en el periodo comprendido entre los 90 y los 120 minutos del experimento, existen diferencias muy significativas en los niveles de azul de Evans de ambos grupos. En los animales sometidos a reperusión estos niveles aumentan considerablemente, a diferencia de los que se le mantiene la isquemia hasta el final, que permanecen más o

menos estables. La diferencia es máxima en el minuto 94 (en el grupo *I/R física*, minuto 4 de la reperfusión y en el grupo *I 90' sin R*, minuto 64 de isquemia), 11,1 (IC95 %: 7,0 a 15,2) ($P < 0,001$), lo que representa una diferencia del 97,9 % (IC95 %: 61,9 a 133,8). Esto equivaldría a decir que el grupo *I 90' sin R* tiene unos niveles de azul de Evans que son el 2,1 % de los observados en el grupo *I/R física*. Las diferencias se mantienen hasta el final (en el grupo *I/R física*, minuto 30 de la reperfusión y en el grupo *I 90' sin R*, minuto 90 de isquemia), siendo en ese instante de 2,0 (IC95 %: 1,3 a 2,7) ($P < 0,001$), lo que representa una diferencia del 91,2 % (IC95 %: 59,1 a 123,4).

Resultado del análisis de los modelos de referencia

Antes de proseguir, aclarar que los resultados que mostraremos a partir de aquí hasta el final de la sección “Resultados”, se han obtenido tras el análisis de dos matrices de datos siguiendo el modelo estadístico descrito en la sección “Metodología”.

En una de las matrices se encuentran el grupo *control*, el *I/R física* y todos los grupos de animales a los que se le ha sometido a *I/R física* y han sido tratados con alopurinol (*I/R física + alopurinol*), SOD (*I/R física + SOD*), catalasa (*I/R física + catalasa*), L-NAME (*I/R física + L-NAME*) y L-arginina (*I/R física + L-arginina*). En la otra se hallan el grupo *control*, el *I/R farmacológica* y todos los grupos de animales a los que se le ha sometido a *I/R farmacológica* tratados con alopurinol (*I/R farmacológica + alopurinol*), SOD (*I/R farmacológica + SOD*), catalasa (*I/R farmacológica + catalasa*), L-NAME (*I/R farmacológica + L-NAME*) y L-arginina (*I/R farmacológica + L-arginina*).

En los resultados obtenidos de los análisis efectuados sobre una u otra matriz de datos, aunque nos refiramos en el texto, en las gráficas o en las tablas, únicamente a la diferencia o igualdad entre 2 grupos, existe en éstas la influencia de los restantes grupos que componen la matriz de datos. En ambos casos las matrices de datos están compuestas por 7 grupos, como ha sido especificado anteriormente.

El estudio de comparabilidad inicial no se opone a aceptar que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los periodos control del grupo *control*, del *I/R física* y todos los grupos *I/R física* con tratamiento: *alopurinol*, *SOD*, *catalasa*, *L-NAME* y *L-arginina*, para las variables respuesta LDH ($P = 0,938$) y azul de Evans ($P = 0,787$). Así como tampoco entre los periodos control del grupo *control*, del *I/R farmacológica* y todos los grupos *I/R farmacológica* con tratamiento: *alopurinol*, *SOD*, *catalasa*, *L-NAME* y *L-arginina*, para las mismas variables: LDH ($P = 0,995$) y azul de Evans ($P = 0,756$).

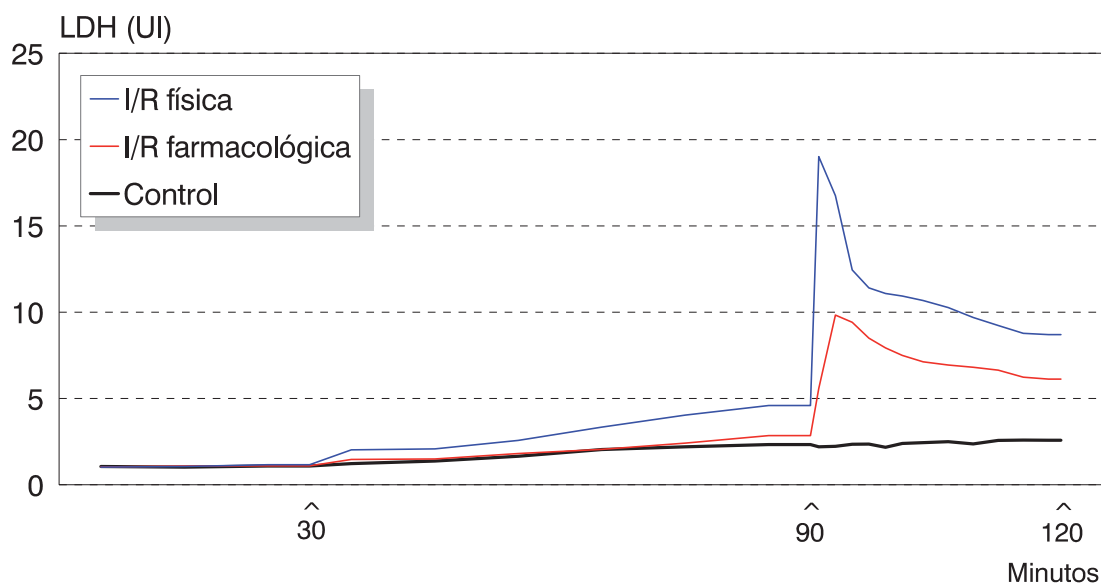
Las gráficas 3 y 4 muestran la evolución de los niveles de LDH ($\text{UI} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cm}$ de intestino perfundido⁻¹) y azul de Evans (densidad óptica $\cdot 1000 \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cm}$ de intestino perfundido⁻¹) a lo largo de los periodos control, isquémico y de reperfusión, en los grupos *I/R física*, *I/R química* y *control*.

Análisis del modelo isquemia/reperfusión física

El estudio se ha hecho comparando los grupos *I/R física* y *control*, manteniendo la influencia sobre ambos de los 5 grupos *I/R física* con tratamiento.

Estudio de los niveles de LDH en el líquido de perfusión.

El análisis de los datos pone de manifiesto la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los grupos *I/R física* y *control* ($P < 0,001$) (gráfica 3).



Gráfica 3. Niveles de LDH ($\text{UI} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cm}$ de intestino perfundido⁻¹) en el líquido de perfusión intestinal. I/R: isquemia/reperfusión. LDH (UI): unidades del sistema internacional de lacticodeshidrogenasa.

Se han aplicado contrastes para todos los tiempos estudiados. Tabla 13 en anexo III.

Se observan diferencias muy significativas desde el inicio de la isquemia hasta el final de la experiencia.

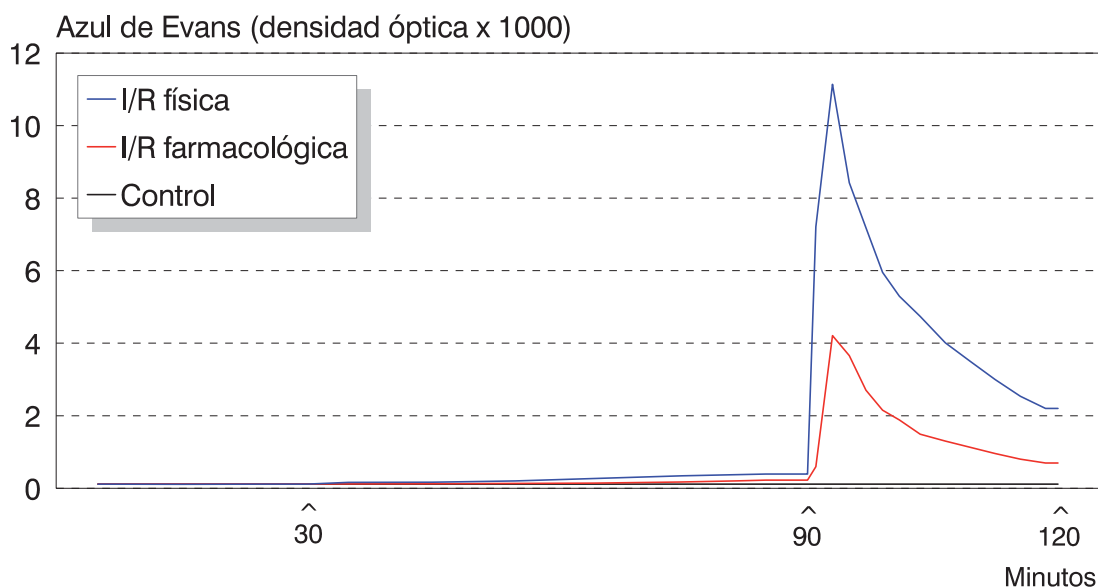
En el grupo *I/R física*, durante todo el periodo isquémico, los niveles de LDH se encuentran significativamente aumentados respecto a lo que le ocurre al grupo *control*

entre los tiempos 30 y 90 minutos. La máxima diferencia se observa en el minuto 90 (minuto 60 de la isquemia), 2,4 UI (IC95 %: 1,4 a 3,3) ($P < 0,001$), lo que representa un incremento de 2,9 veces (IC95 %: 2,1 a 3,6) respecto al grupo *control*.

Igualmente, en el grupo *I/R física*, durante todo el periodo de reperfusión se encuentran muy aumentados los niveles de LDH respecto a lo que le ocurre al grupo *control* entre los tiempos 90 y 120 minutos. La máxima diferencia se observa en el minuto 92 (minuto 2 de la reperfusión), 17,3 UI (IC95 %: 14,3 a 20,3) ($P < 0,001$), lo que representa un incremento de 16,2 veces (IC95 %: 13,6 a 18,8) respecto al grupo *control*, manteniéndose las diferencias hasta el minuto 120 (minuto 30 de la reperfusión), 6,3 UI (IC95 %: 4,9 a 7,8) ($P < 0,001$), lo que equivale un incremento en ese instante de 5,2 veces (IC95 %: 4,2 a 6,1) respecto al grupo *control*.

Estudio de los niveles de densidad óptica de azul de Evans en el líquido de perfusión.

El análisis de los datos pone de manifiesto la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los grupos *I/R física* y *control* ($P < 0,001$) (gráfica 4).



Gráfica 4. Niveles de azul de Evans (densidad óptica $\cdot 1000 \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cm}$ de intestino perfundido⁻¹) en el líquido de perfusión intestinal. I/R: isquemia/reperfusión.

Se han aplicado contrastes para todos los tiempos estudiados. Tabla 14 en anexo III.

Se observan diferencias muy significativas desde el inicio de la isquemia hasta el final de la experiencia.

En el grupo *I/R física*, durante todo el periodo isquémico, los niveles de azul de Evans se encuentran significativamente aumentados respecto a lo que le ocurre al grupo *control* entre los tiempos 30 y 90 minutos. La máxima diferencia se observa en el minuto 90 (minuto 60 de la isquemia), 0,3 (IC95 %: 0,2 a 0,4) ($P < 0,001$), lo que representa un incremento en los niveles de 188,4 veces (IC95 %: 135,6 a 241,2) respecto al grupo *control*.

Igualmente, en el grupo *I/R física*, durante todo el periodo de reperfusión se encuentran muy aumentados los niveles de azul de Evans respecto a lo que le ocurre al grupo *control* entre los tiempos 90 y 120 minutos. La máxima diferencia se observa en el minuto 94 (minuto 4 de la reperfusión), 11,3 (IC95 %: 8,5 a 14,2) ($P < 0,001$), lo que representa un incremento de 32979,0 veces (IC95 %: 41256,4 a 24701,6) respecto al grupo *control*, manteniéndose las diferencias hasta el minuto 120 (minuto 30 de la reperfusión), 2,2 (IC95 %: 1,5 a 2,8) ($P < 0,001$), lo que equivale un incremento en ese momento de 1893,2 veces (IC95 %: 1294,6 a 2490,5) respecto al grupo *control*.

Análisis del modelo isquemia/reperfusión farmacológica

El estudio se ha hecho comparando los grupos *I/R farmacológica* y *control*, manteniendo la influencia sobre ambos de los 5 grupos *I/R farmacológica* con tratamiento.

Estudio de los niveles de LDH en el líquido de perfusión.

El análisis de los datos pone de manifiesto la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los grupos *I/R farmacológica* y *control* ($P < 0,001$) (gráfica 3).

Se han aplicado contrastes para todos los tiempos estudiados. Tabla 15 en anexo III.

No se observan diferencias significativas en los niveles de LDH durante todo el periodo isquémico, en el grupo *I/R farmacológica*, respecto a lo que le ocurre al grupo *control* entre los tiempos 30 y 90 minutos.

Por el contrario, en el grupo *I/R farmacológica*, durante todo el periodo de reperfusión se encuentran aumentados los niveles de LDH respecto a lo que le ocurre al grupo *control* entre los tiempos 90 y 120 minutos. La máxima diferencia se observa en el minuto 94 (minuto 4 de la reperfusión), 7,6 UI (IC95 %: 5,7 a 9,4) ($P < 0,001$), lo que representa un incremento de 7,5 veces (IC95 %: 5,9 a 9,1) respecto al grupo *control*, manteniéndose las diferencias hasta el minuto 120 (minuto 30 de la reperfusión), 3,5 UI (IC95 %: 2,3 a

4,8) ($P < 0,001$), lo que equivale un incremento en ese momento de 3,3 veces (IC95 %: 2,5 a 4,2) respecto al grupo *control*.

Estudio de los niveles de densidad óptica de azul de Evans en el líquido de perfusión.

El análisis de los datos pone de manifiesto la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los grupos *I/R farmacológica* y *control* ($P < 0,001$) (gráfica 4).

Se han aplicado contrastes para todos los tiempos estudiados. Tabla 16 en anexo III.

En el grupo *I/R farmacológica*, existe un incremento estadísticamente significativa de los niveles de azul de Evans en los últimos 20 minutos del periodo isquémico, respecto a lo que le ocurre al grupo *control* entre los tiempos 70 y 90 minutos. La máxima diferencia se observa en el minuto 90 (minuto 60 de la isquemia), 0,1 (IC95 %: 0,05 a 0,15) ($P < 0,001$), lo que representa un incremento de 66,6 veces (IC95 %: 31,8 a 101,4) respecto al grupo *control*.

Por el contrario, en el grupo *I/R farmacológica*, durante todo el periodo reperusión se encuentran muy aumentados los niveles de azul de Evans respecto a lo que le ocurre al grupo *control* entre los tiempos 90 y 120 minutos. La máxima diferencia se observa en el minuto 94 (minuto 4 de la reperusión), 4,1 (IC95 %: 2,9 a 5,2) ($P < 0,001$), lo que equivale un incremento de 11888,4 veces (IC95 %: 8538,5 a 15238,3) respecto al grupo *control*, manteniéndose las diferencias hasta el minuto 120 (minuto 30 de la reperusión), 0,6 (IC95 %: 0,2 a 0,9) ($P < 0,001$), lo que representa un incremento en ese instante de 508,0 veces (IC95 %: 205,5 a 809,2) veces respecto al grupo *control*.

Resultado del análisis de la influencia del método para producir la lesión por isquemia/reperusión

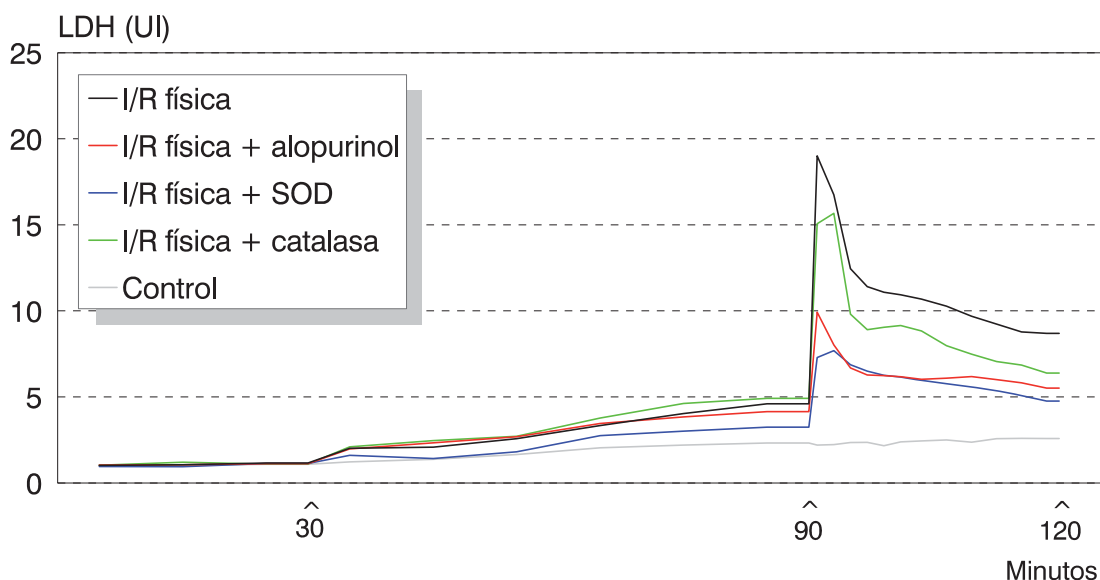
El análisis lo subdividimos en 4 subapartados.

Resultado del análisis de la influencia de las especies reactivas del oxígeno en la isquemia/reperusión mediada por un método físico

Las gráficas 5 y 6 muestran la evolución de los niveles de LDH ($\text{UI} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cm}$ de intestino perfundido⁻¹) y azul de Evans (densidad óptica $\cdot 1000 \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cm}$ de

intestino perfundido⁻¹) a lo largo de los periodos control, isquémico y de reperfusión, en los grupos *I/R física + alopurinol*, *I/R física + SOD* e *I/R física + catalasa*, respecto al grupo *I/R física*, controlados por el grupo *control*.

Estudio de los niveles de LDH en el líquido de perfusión.



Gráfica 5. Niveles de LDH ($\text{UI} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cm}$ de intestino perfundido⁻¹) en el líquido de perfusión intestinal. I/R: isquemia/reperfusión. LDH (UI): unidades del sistema internacional de lactocodeshidrogenasa. SOD: superóxido dismutasa.

El análisis de los datos pone de manifiesto la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre el grupo *I/R física* y los grupos *I/R física + alopurinol* ($P < 0,001$) e *I/R física + SOD* ($P < 0,001$), pero no con el *I/R física + catalasa* ($P = 0,074$).

Se han aplicado contrastes entre los grupos *I/R física con tratamiento* respecto al *I/R física*, controlados por el grupo *control*, para todos los tiempos estudiados de isquemia y de reperfusión. Tablas 17, 19 y 21 en anexo IV.

No se observan diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos con tratamiento respecto al grupo *I/R física* durante todo el periodo isquémico.

El tratamiento con *alopurinol* reduce de manera muy significativa los niveles de LDH durante toda la reperfusión, siendo máxima a los 2 minutos de dicho periodo (minuto 92 de la experiencia) con una diferencia de 9,6 UI (IC95 %: 5,3 a 13,9) ($P < 0,001$), lo que representa un 52,1 % (IC95 %: 28,7 a 75,4) menos respecto a los niveles observados en el grupo sin tratamiento, manteniéndose dicha reducción hasta el minuto 30 de la reperfusión (o lo que es lo mismo, hasta el minuto 120 de la experiencia). Los niveles de

LDH en ese momento son algo más de la mitad de los observados en el grupo *I/R física*, siendo la diferencia de 3,4 UI (IC95 %: 1,3 a 5,5) ($P < 0,001$), o sea un 43,4 % menos (IC95 %: 16,7 a 70,1). En proporción la máxima reducción se produce a los 4 minutos de la reperfusión, un 56,9 % (IC95 %: 36,6 a 77,3).

El tratamiento con *SOD* igualmente reduce de manera muy significativa los niveles de LDH en toda la reperfusión. Es máxima a los 2 minutos de dicho periodo con una reducción del 66,0 % (IC95 %: 40,4 a 91,5) respecto a los observados en el grupo sin tratamiento, lo que equivale una diferencia de 12,2 UI (IC95 %: 7,5 a 16,9) ($P < 0,001$), manteniéndose ésta hasta el minuto 30 de la reperfusión, momento en el que son algo menores a la mitad de los observados en el grupo *I/R física*, siendo la diferencia de 4,1 UI (IC95 %: 1,8 a 6,4) ($P < 0,001$), o sea un 52,3 % menos (IC95 %: 23,1 a 81,4).

El tratamiento con *catalasa*, como se ha indicado anteriormente, desde el punto de vista estadístico no reduce significativamente los niveles de LDH de manera global, aunque sí lo hace en valores absolutos. Analizando las diferencias en cada uno de los tiempos, se aprecia una reducción significativa a los 6 minutos de la reperfusión, un 25,7 % (IC95 %: 1,8 a 49,5) menos respecto a los niveles observados en el grupo sin tratamiento, lo que representa una diferencia de 3,0 UI (IC95 %: 0,2 a 5,8) ($P = 0,035$). Esta significación se mantiene esporádicamente hasta el minuto 30 de la reperfusión, con una diferencia en ese instante de 2,6 UI (IC95 %: 0,3 a 4,9) ($P = 0,028$), o sea un 32,7 % menos (IC95 %: 3,5 a 61,9) que los niveles observados en el grupo *I/R física*. La máxima diferencia en términos absolutos, se observa a los 2 minutos de la reperfusión, 4,5 UI (IC95 %: -0,2 a 9,2), pero ésta no es estadísticamente significativa, $P = 0,061$.

Estudio de los niveles de densidad óptica de azul de Evans en el líquido de perfusión.

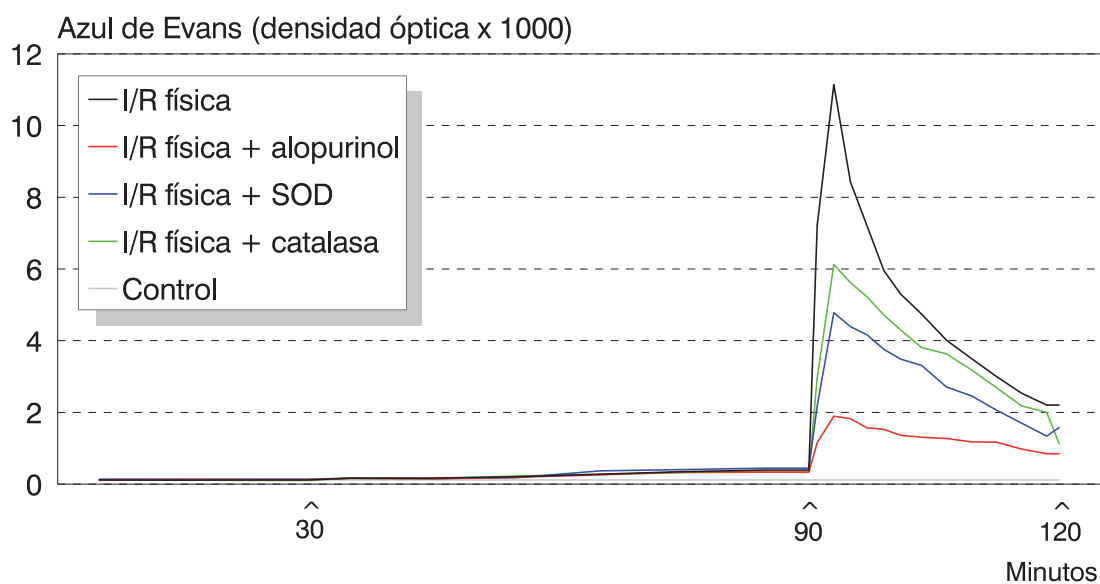
Existen diferencias estadísticamente significativas entre el grupo *I/R física* y los grupos *I/R física + alopurinol* ($P = 0,001$) e *I/R física + SOD* ($P = 0,032$), pero no con el *I/R física + catalasa* ($P = 0,087$).

La aplicación de los contrastes entre los grupos *I/R física con tratamiento* respecto al *I/R física*, controlados por el grupo *control*, para todos los tiempos estudiados de isquemia y de reperfusión están especificados en las tablas 18, 20 y 22 en el anexo IV.

No se observan diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos con tratamiento respecto al grupo *I/R física* durante todo el periodo isquémico.

El tratamiento con *alopurinol* reduce de manera muy significativa los niveles de azul de Evans durante toda la reperfusión. Es máxima a los 4 minutos de dicho periodo con una

reducción de 9,6 (IC95 %: 5,5 a 13,7) ($P < 0,001$), lo que equivale a un 84,4 % menos (IC95 %: 48,1 a 120,7) respecto a los niveles observados en el grupo sin tratamiento. Dicha reducción se mantiene hasta el minuto 30 de la reperfusion, instante en el que son algo mayores a un tercio de los observados en el grupo *I/R física*. La diferencia es de 1,4 (IC95 %: 0,4 a 2,4) ($P = 0,005$), o sea un 66,3 % menos (IC95 %: 20,5 a 112,0). En proporción la máxima reducción se produce a los 2 minutos de la reperfusion, un 85,8 % (IC95 %: 42,1 a 129,5).



Gráfica 6. Niveles de azul de Evans (densidad óptica \cdot 1000 \cdot ml⁻¹ \cdot min⁻¹ \cdot cm de intestino perfundido⁻¹) en el líquido de perfusión intestinal. I/R: isquemia/reperfusion. SOD: superóxido dismutasa.

El tratamiento con *SOD* reduce los niveles de azul de Evans durante la reperfusion, pero ésta deja de ser estadísticamente significativa a partir del minuto 12 de dicho periodo. El efecto máximo se observa a los 4 minutos en donde la diferencia es de 6,7 (IC95 %: 2,2 a 11,2) ($P = 0,004$), que representa una reducción del 59,1 % (IC95 %: 19,4 a 98,8) respecto a los niveles observados en el grupo sin tratamiento. Sin embargo, en el minuto 2 de la reperfusion, a pesar de haber una diferencia entre ambos grupos algo menor que la mencionada anteriormente, 5,3 (IC95 %: 1,8 a 8,8) ($P = 0,003$), en proporción el efecto del tratamiento es bastante mayor ya que su valor es un 72,1 % (IC95 %: 24,3 a 119,8) menor que el del grupo sin tratamiento.

El tratamiento con *catalasa*, como se ha indicado anteriormente, desde el punto de vista estadístico no reduce significativamente los niveles de azul de Evans de manera global, aunque sí lo hace en valores absolutos. Analizando las diferencias en cada uno de los tiempos, sólo se aprecia una reducción significativa en los primeros 4 minutos de la

reperusión. Proporcionalmente el efecto máximo del tratamiento se observa en el minuto 2 con una reducción del 60,9 % (IC95 %: 13,2 a 108,7) respecto a los niveles observados en el grupo sin tratamiento, lo que equivale a una diferencia de 4,5 (IC95 %: 1,0 a 7,9) (P = 0,013). Aunque en valores absolutos la máxima diferencia se produce en el minuto 4, donde ésta es de 5,3 (IC95 %: 0,8 a 9,8) (P = 0,021), representando sólo una reducción del 47,0 % (IC95 %: 7,3 a 86,7).

Resultado del análisis de la influencia de las especies reactivas del oxígeno en la isquemia/reperusión mediada por un método farmacológico

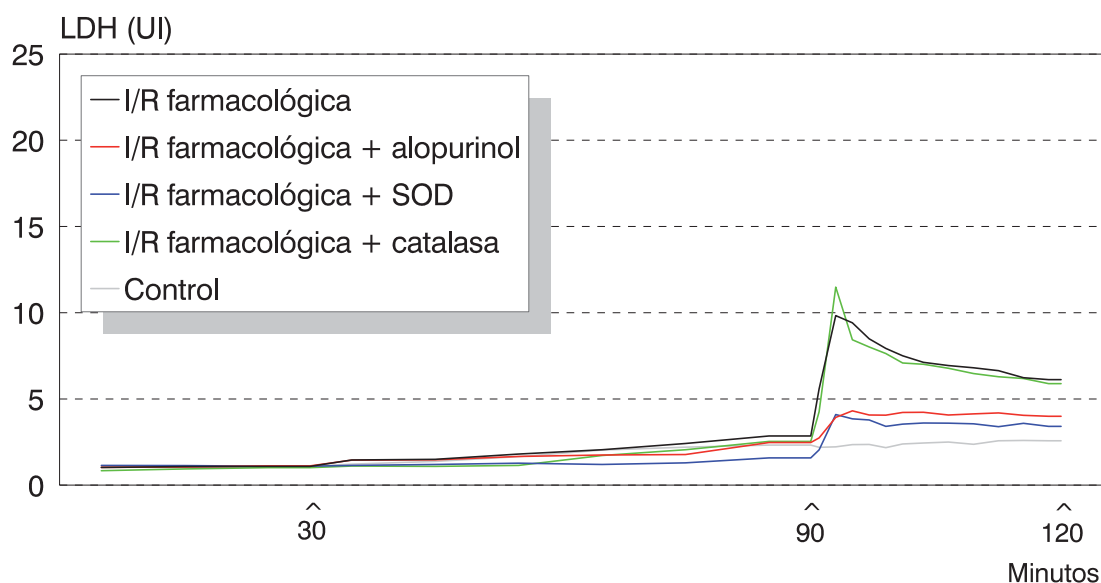
Las gráficas 7 y 8 muestran la evolución de los niveles de LDH ($\text{UI} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cm}$ de intestino perfundido⁻¹) y azul de Evans (densidad óptica $\cdot 1000 \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cm}$ de intestino perfundido⁻¹) a lo largo de los periodos control, isquémico y de reperusión, en los grupos *I/R farmacológica + alopurinol*, *I/R farmacológica + SOD* e *I/R farmacológica + catalasa*, respecto al grupo *I/R farmacológica*, controlados por el grupo *control*.

Estudio de los niveles de LDH en el líquido de perfusión.

El análisis de los datos pone de manifiesto la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre el grupo *I/R farmacológica* y los grupos *I/R farmacológica + alopurinol* (P = 0,001) e *I/R farmacológica + SOD* (P = 0,002), pero no con el *I/R farmacológica + catalasa* (P = 0,374).

La aplicación de los contrastes entre los grupos *I/R farmacológica* con tratamiento respecto al *I/R farmacológica*, controlados por el grupo *control*, para todos los tiempos estudiados de isquemia y de reperusión están especificados en las tablas 27, 29 y 31 en el anexo IV.

No se observan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos *I/R farmacológica + alopurinol* e *I/R farmacológica + catalasa* respecto al grupo *I/R farmacológica* durante todo el periodo isquémico. Sin embargo, en el grupo *I/R farmacológica + SOD*, sí existe una disminución de los niveles de LDH durante todo el periodo mencionado, siendo ésta significativa en los últimos 30 minutos. La máxima diferencia se observa al final de la isquemia (minuto 60 de este periodo, minuto 90 del experimento), y es de 1,3 UI (IC95 %: 0,4 a 2,3) (P = 0,006), lo que representa una reducción del 74,7 % (IC95 %: 22,5 a 126,9) de los niveles observados en el grupo sin tratamiento. Aunque en proporción la reducción máxima significativa se produce al minuto 40 de la isquemia, un 92,0 % (IC95 %: 7,3 a 176,7).



Gráfica 7. Niveles de LDH ($\text{UI} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cm}$ de intestino perfundido⁻¹) en el líquido de perfusión intestinal. I/R: isquemia/reperfusión. LDH (UI): unidades del sistema internacional de lacticodehidrogenasa. SOD: superóxido dismutasa.

El tratamiento con *alopurinol* reduce significativamente los niveles de LDH durante toda la reperusión. Es máxima a los 4 minutos de dicho periodo donde la diferencia es de 5,9 UI ($\text{IC}_{95} \%: 3,4 \text{ a } 8,4$) ($P < 0,001$), lo que representa un 67,3 % menos ($\text{IC}_{95} \%: 39,0 \text{ a } 95,6$) que los niveles observados en el grupo sin tratamiento, y manteniéndose ésta hasta el minuto 30 de la reperusión, momento en el cual los niveles son algo mayores a la mitad de los observados en el grupo *I/R farmacológica*, siendo la diferencia en ese momento de 2,1 UI ($\text{IC}_{95} \%: 0,4 \text{ a } 3,8$) ($P = 0,014$), o sea un 42,1 % menos ($\text{IC}_{95} \%: 8,9 \text{ a } 75,3$).

El tratamiento con *SOD* igualmente reduce de manera significativa los niveles de LDH en toda la reperusión. Es máxima a los 4 minutos de dicho periodo con una diferencia de 5,8 UI ($\text{IC}_{95} \%: 3,1 \text{ a } 8,5$) ($P < 0,001$), lo que representa una reducción del 66,1 % ($\text{IC}_{95} \%: 35,5 \text{ a } 96,6$) respecto a los observados en el grupo sin tratamiento. Esta se mantiene hasta el minuto 30 de la reperusión, con unos niveles de LDH en ese instante algo menores a la mitad de los observados en el grupo *I/R farmacológica*, siendo la diferencia de 2,8 UI ($\text{IC}_{95} \%: 1,0 \text{ a } 4,6$) ($P = 0,003$), o sea un 54,8 % menos ($\text{IC}_{95} \%: 19,0 \text{ a } 90,6$). En proporción la máxima reducción se produce a los 2 minutos de la reperusión, un 79,7 % ($\text{IC}_{95} \%: 38,3 \text{ a } 121,1$).

El tratamiento con *catalasa*, como se ha indicado anteriormente, globalmente y desde el punto de vista estadístico no reduce de manera significativa los niveles de LDH. La

aplicación de los contrastes pone de manifiesto que tampoco lo hace de manera aislada en ninguno de los tiempos estudiados.

Estudio de los niveles de densidad óptica de azul de Evans en el líquido de perfusión.

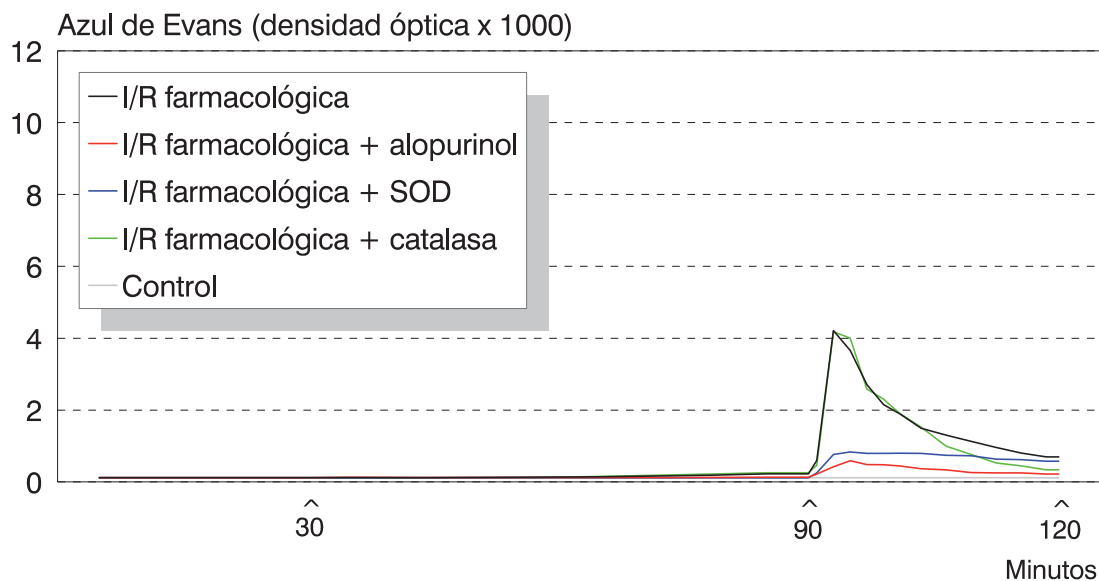
Existen diferencias estadísticamente significativas entre el grupo *I/R farmacológica* y los grupos *I/R farmacológica + alopurinol* ($P < 0,001$) e *I/R farmacológica + SOD* ($P = 0,003$), pero no con el *I/R farmacológica + catalasa* ($P = 0,549$).

La aplicación de los contrastes entre los grupos *I/R farmacológica* con tratamiento respecto al *I/R farmacológica*, controlados por el grupo *control*, para todos los tiempos estudiados de isquemia y de reperfusión están especificados en las tablas 28, 30 y 32 en el anexo IV.

No se observan diferencias estadísticamente significativas entre el grupo *I/R farmacológica + catalasa* respecto al grupo *I/R farmacológica* durante todo el periodo isquémico. Sin embargo, en los grupos *I/R farmacológica + alopurinol* e *I/R farmacológica + SOD*, sí existe una disminución estadísticamente significativa de los niveles de azul de Evans en los últimos 20 minutos de la isquemia. La máxima diferencia se obtiene al final del periodo, en el grupo *I/R farmacológica + alopurinol* ésta es de 0,09 (IC95 %: 0,02 a 0,16) ($P = 0,018$) lo que equivale a una reducción del 85,5 % (IC95 %: 15,4 a 155,6) de los niveles observados en el grupo sin tratar. Para el tratado con *SOD*, la diferencia es de 0,10 (IC95 %: 0,03 a 0,18) ($P = 0,010$), lo que representa una reducción del 100 % (IC95 %: 24,4 a 175,6) respecto al grupo sin tratar.

El tratamiento con *alopurinol* reduce significativamente los niveles de azul de Evans durante toda la reperfusión. Es máxima a los 4 minutos de dicho periodo con una diferencia de 3,8 (IC95 %: 2,2 a 5,3) ($P < 0,001$) lo que equivale una reducción del 92,6 % (IC95 %: 54,8 a 130,4) respecto a los observados en el grupo sin tratamiento. Esta se mantiene hasta el minuto 30 de la reperfusión, los niveles de azul de Evans en ese instante son un 82,6 % inferiores (IC95 %: 2,9 a 162,2) a los observados en el grupo *I/R farmacológica*, y la diferencia es de 0,5 (IC95 %: 0,02 a 0,9) ($P = 0,043$).

El tratamiento con *SOD* reduce los niveles de azul de Evans durante la reperfusión, pero ésta deja de ser estadísticamente significativa a partir del minuto 12 de dicho periodo. El efecto máximo se observa a los 4 minutos en donde la diferencia es de 3,4 (IC95 %: 1,8 a 5,1) ($P < 0,001$), que es una reducción del 84,1 % (IC95 %: 43,3 a 124,8) respecto a los observados en el grupo sin tratamiento.



Gráfica 8. Niveles de azul de Evans (densidad óptica \cdot 1000 \cdot ml⁻¹ \cdot min⁻¹ \cdot cm de intestino perfundido⁻¹) en el líquido de perfusión intestinal. I/R: isquemia/reperfusión. SOD: superóxido dismutasa.

El tratamiento con *catalasa*, como se ha indicado anteriormente, globalmente y desde el punto de vista estadístico no reduce de manera significativa los niveles de azul de Evans. La aplicación de los contrastes pone de manifiesto que tampoco lo hace de manera aislada en ninguno de los tiempos estudiados.

Resultado del análisis de la influencia del óxido nítrico en la isquemia/reperfusión mediada por un método físico

Las gráficas 9 y 10^{§§} muestran la evolución de los niveles de LDH (UI \cdot ml⁻¹ \cdot min⁻¹ \cdot cm de intestino perfundido⁻¹) y azul de Evans (densidad óptica \cdot 1000 \cdot ml⁻¹ \cdot min⁻¹ \cdot cm de intestino perfundido⁻¹) a lo largo de los periodos control, isquémico y de reperfusión, en los grupos *I/R física + L-NAME* e *I/R física + L-arginina*, respecto al grupo *I/R física*, controlados por el grupo *control*.

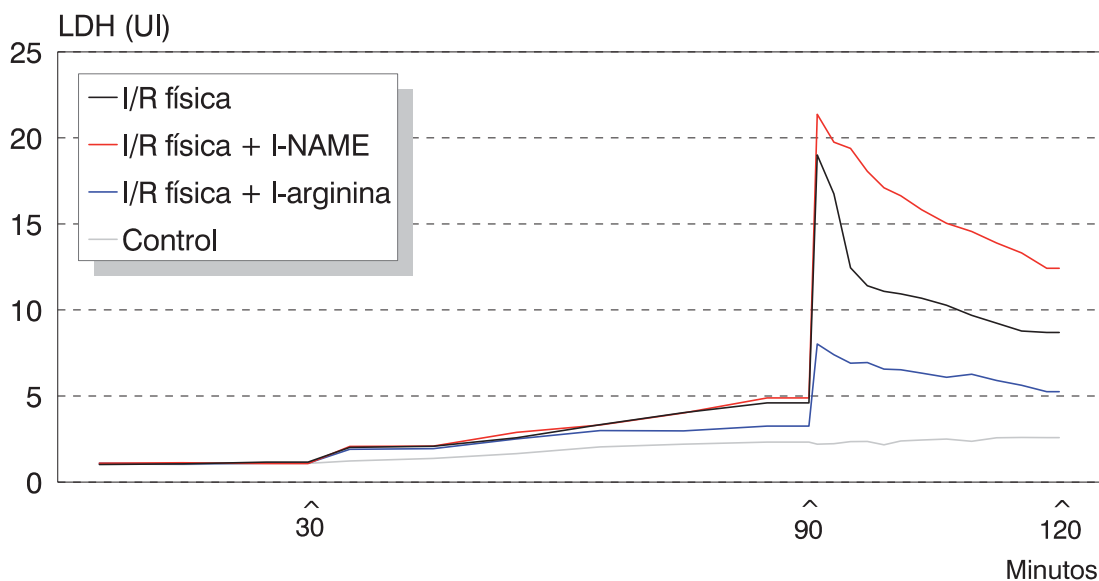
Estudio de los niveles de LDH en el líquido de perfusión.

Existen diferencias estadísticamente significativas entre el grupo *I/R física* y los grupos *I/R física + L-NAME* ($P = 0,003$) e *I/R física + L-arginina* ($P < 0,001$).

^{§§} Advertencia: la gráfica 10 posee una escala diferente al resto de las gráficas que representan la densidad óptica de Azul de Evans.

La aplicación de los contrastes entre los grupos *I/R física* con tratamiento respecto al *I/R física*, controlados por el grupo *control*, para todos los tiempos estudiados de isquemia y de reperfusion están especificados en las tablas 23, y 25 en el anexo IV.

No se observan diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos con tratamiento respecto al grupo *I/R física* durante todo el periodo isquémico.



Gráfica 9. Niveles de LDH ($\text{UI} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cm}$ de intestino perfundido⁻¹) en el líquido de perfusión intestinal. I/R: isquemia/reperfusion. LDH (UI): unidades del sistema internacional de lacticodehidrogenasa. L-NAME: N^G-nitro-L-arginina metil éster.

El tratamiento con *L-NAME* aumenta de manera muy significativa los niveles de LDH durante casi toda la reperfusion. Y puntualizo casi, porque a pesar que sí aumentan los niveles de LDH durante los primeros 4 minutos de la reperfusion, no lo hacen de manera estadísticamente significativa. Al minuto 6 de la reperfusion es cuando se empiezan a observar diferencias estadísticamente significativas, siendo además en éste momento cuando es máxima, con un aumento de 6,6 UI (IC95 %: 3,8 a 9,4) ($P < 0,001$) lo que representa un incremento del 56,3 % (IC95 %: 32,4 a 80,1) respecto a los niveles observados en el grupo sin tratamiento, manteniéndose éste hasta el minuto 30 de la reperfusion, momento en el son superiores en 3,5 UI (IC95 %: 1,2 a 5,8) ($P = 0,003$) respecto a los observados en el grupo sin tratamiento, lo que representa un incremento del 44,4 % (IC95 %: 15,2 a 73,5) respecto a los observados en el grupo *I/R física*. En proporción el incremento máximo se produce a los 8 minutos de la reperfusion, un 59,5 %.

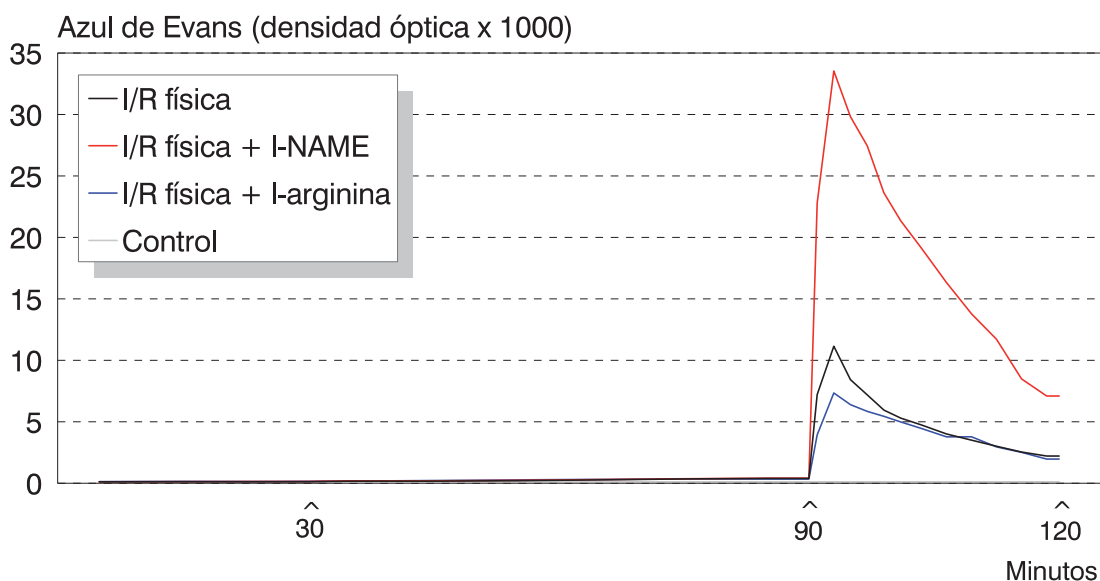
El tratamiento con *L-arginina*, por el contrario, reduce de manera muy significativa los niveles de LDH en toda la reperfusion, siendo máxima a los 2 minutos de dicho periodo

en la que la reducción es del 62,4 % (IC95 %: 36,9 a 88,0) respecto a los observados en el grupo sin tratamiento, lo que equivale a una diferencia de 11,5 UI (IC95 %: 6,8 a 16,2) ($P < 0,001$). Ésta se mantiene hasta el minuto 30 de la reperfusión, instante en el que los niveles de LDH son aproximadamente la mitad de los observados en el grupo *I/R física*, siendo la diferencia en ese momento de 3,7 UI (IC95 %: 1,4 a 6,0) ($P = 0,002$) o sea un 46,9 % menos (IC95 %: 17,7 a 76,1).

Estudio de los niveles de densidad óptica de azul de Evans en el líquido de perfusión.

El análisis de los datos pone de manifiesto la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre el grupo *I/R física* y el grupo *I/R física + L-NAME* ($P < 0,001$), pero no con el *I/R física + L-arginina* ($P = 0,178$).

La aplicación de los contrastes entre los grupos *I/R física* con tratamiento respecto al *I/R física*, controlados por el grupo *control*, para todos los tiempos estudiados de isquemia y de reperfusión están especificados en las tablas 24 y 26 en el anexo IV.



Gráfica 10. Niveles de azul de Evans (densidad óptica · 1000 · ml⁻¹ · min⁻¹ · cm de intestino perfundido⁻¹) en el líquido de perfusión intestinal. I/R: isquemia/reperfusión. L-NAME: N^G-nitro-L-arginina metil éster. Hacer notar que esta gráfica posee una escala diferente al resto de las gráficas que representan la densidad óptica de Azul de Evans.

No se observan diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos con tratamiento respecto al grupo *I/R física* durante todo el periodo isquémico.

El tratamiento con *L-NAME* aumenta de manera muy significativa los niveles de azul de Evans durante toda la reperfusión. La diferencia absoluta es máxima a los 4 minutos de

dicho periodo, 22,1 (IC95 %: 17,6 a 26,6) ($P < 0,001$) lo que representa un incremento del 194,4 % (IC95 %: 154,7 a 234,1) respecto a los observados en el grupo sin tratamiento. Ésta se mantiene hasta el minuto 30 de la reperfusión, con unos niveles en ese momento superiores en más de tres veces los observados en el grupo *I/R física*, lo que equivale a un incremento del 224,1 % (IC95 %: 174,1 a 274,1), la diferencia es de 4,8 (IC95 %: 3,7 a 5,9) ($P < 0,001$). En proporción el incremento máximo se produce a los 18 minutos de la reperfusión, siendo el valor del grupo tratado un 303,8 % (IC95 %: 260,2 a 347,5) mayor que el del grupo sin tratamiento, la diferencia entre ambos grupos en ese instante es de 12,2 (IC95 %: 10,4 a 13,9) ($P < 0,001$).

El tratamiento con *L-arginina*, como se ha indicado anteriormente, globalmente y desde el punto de vista estadístico no reduce de manera significativa los niveles de azul de Evans. Con la aplicación de los contrastes se pone de manifiesto que sólo existe una reducción estadísticamente significativa en los primeros 2 minutos de la reperfusión, con una reducción del 48,1 % (IC95 %: 0,3 a 95,8) respecto a los niveles observados en el grupo sin tratamiento, lo que representa una diferencia de 3,5 (IC95 %: 0,02 a 7,0) ($P = 0,048$). Aunque en valores absolutos ésta se produce en el minuto 4, donde la diferencia es de 4,1 (IC95 %: -0,4 a 8,6), pero aunque por poco no es estadísticamente significativa, $P = 0,071$.

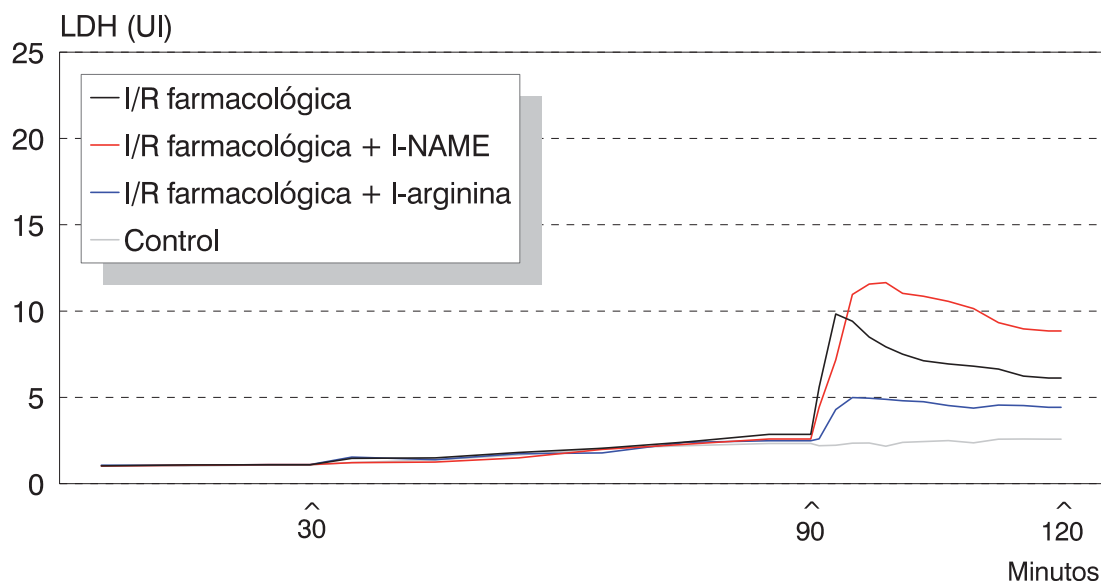
Resultado del análisis de la influencia del óxido nítrico en la isquemia/reperfusión mediada por un método farmacológico

Las gráficas 11 y 12 muestran la evolución de los niveles de LDH ($\text{UI} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cm}$ de intestino perfundido⁻¹) y azul de Evans (densidad óptica $\cdot 1000 \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cm}$ de intestino perfundido⁻¹) a lo largo de los periodos control, isquémico y de reperfusión, en los grupos *I/R farmacológica + L-NAME* e *I/R farmacológica + L-arginina*, respecto al grupo *I/R farmacológica*, controlados por el grupo *control*.

Estudio de los niveles de LDH en el líquido de perfusión.

Existen diferencias estadísticamente significativas entre el grupo *I/R farmacológica* y los grupos *I/R farmacológica + L-NAME* ($P = 0,002$) e *I/R farmacológica + L-arginina* ($P = 0,007$).

La aplicación de los contrastes entre los grupos *I/R farmacológica* con tratamiento respecto al *I/R farmacológica*, controlados por el grupo *control*, para todos los tiempos estudiados de isquemia y de reperfusión están especificados en las tablas 33, y 35 en el anexo IV.



Gráfica 11. Niveles de LDH ($\text{UI} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cm}$ de intestino perfundido⁻¹) en el líquido de perfusión intestinal. I/R: isquemia/reperfusión. LDH (UI): unidades del sistema internacional de lactodeshidrogenasa. L-NAME: N^G-nitro-L-arginina metil éster.

No se observan diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos con tratamiento respecto al grupo *I/R farmacológica* durante todo el periodo isquémico.

El tratamiento con *L-NAME* aumenta de manera muy significativa los niveles de LDH durante casi toda la reperfusión. Matizo casi porque los valores de LDH durante los 4 primeros minutos de la reperfusión son menores que los observados en el grupo *I/R farmacológica*, aunque estas diferencias no son estadísticamente significativas. A partir del minuto 6 de la reperfusión los niveles de LDH en el líquido de perfusión son mayores en el grupo con tratamiento que en el grupo sin tratamiento, siendo estas diferencias estadísticamente significativas a partir del minuto 8. La máxima diferencia entre ambos grupos se observa en el minuto 15, 3,7 UI (IC95 %: 1,7 a 5,7) ($P < 0,001$), lo que representa un incremento del 61,8 % (IC95 %: 28,9 a 94,6) respecto al grupo sin tratamiento, y manteniéndose éste hasta el minuto 30 de la reperfusión, momento en el que los niveles de LDH son superiores en 2,7 UI (IC95 %: 0,9 a 4,5) ($P = 0,004$) a los observados en el grupo *I/R farmacológica*, o lo que es lo mismo un 54,0 % (IC95 %: 89,8 a 18,2).

El tratamiento con *L-arginina* por el contrario, reduce significativamente los niveles de LDH en toda la reperfusión, siendo máxima a los 4 minutos de dicho periodo en donde ésta es del 63,3 % (IC95 %: 32,8 a 93,8) respecto a los niveles observados en el grupo sin tratamiento, lo que equivale una diferencia de 5,5 UI (IC95 %: 2,9 a 8,2) ($P < 0,001$). Esta se mantiene hasta el minuto 27 de la reperfusión, con unos niveles de LDH de

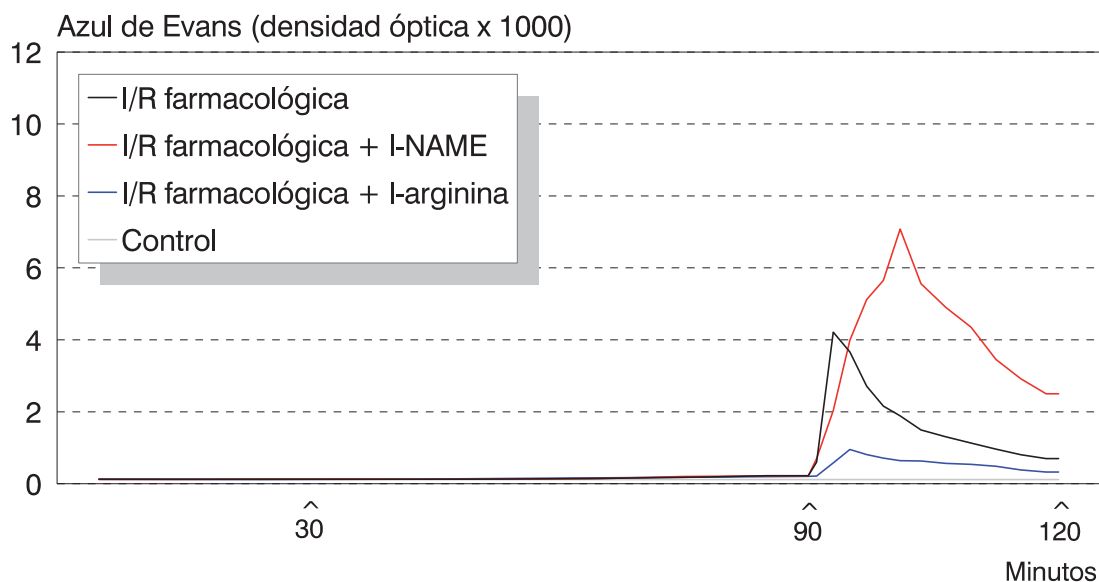
aproximadamente dos tercios de los observados en el grupo *I/R farmacológica*, en ese momento la diferencia es de 1,7 UI (IC95 %: 0,01 a 3,4) ($P = 0,049$), o sea un 33,2 % menos (IC95 %: 0,3 a 66,1). En proporción la máxima reducción se produce a los 2 minutos de la reperfusión, donde el valor del grupo con tratamiento es un 66,3 % menor (IC95 %: 24,9 a 107,6) al del grupo sin tratamiento.

Estudio de los niveles de densidad óptica de azul de Evans en el líquido de perfusión.

El análisis de los datos pone de manifiesto la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre el grupo *I/R farmacológica* y los grupos *I/R farmacológica + L-NAME* ($P < 0,001$) e *I/R farmacológica + L-arginina* ($P = 0,002$).

La aplicación de los contrastes entre los grupos *I/R farmacológica* con tratamiento respecto al *I/R farmacológica*, controlados por el grupo *control*, para todos los tiempos estudiados de isquemia y de reperfusión están especificados en las tablas 34 y 36 en el anexo IV.

No se observan diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos con tratamiento respecto al grupo *I/R farmacológica* durante todo el periodo isquémico.



Gráfica 12. Niveles de azul de Evans (densidad óptica $\cdot 1000 \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cm}$ de intestino perfundido⁻¹) en el líquido de perfusión intestinal. I/R: isquemia/reperfusión. L-NAME: N^G-nitro-L-arginina metil éster.

El tratamiento con *L-NAME* aumenta de manera muy significativa los niveles de azul de Evans durante casi toda la reperfusión. La primera diferencia significativa desde el punto de vista estadístico se observa al minuto 4 del periodo mencionado. Al contrario de lo

que sucede en los minutos siguientes, los niveles de azul de Evans en el grupo con tratamiento son menores al grupo sin tratamiento. La diferencia, en ese momento, entre ambos grupos es de 2,2 (IC95 %: 0,5 a 3,8) ($P = 0,011$) lo que representa un 53,3 % menos (IC95 %: 12,5 a 94,0). A partir del minuto 8, es cuando empiezan a producirse incrementos estadísticamente significativos en los niveles de azul de Evans, siendo máximo a los 12 minutos con un aumento de 5,2 (IC95 %: 3,9 a 6,5) ($P < 0,001$), lo que representa un 294,3 % (IC95 %: 221,9 a 366,7) más respecto a los observados en el grupo sin tratamiento, y manteniéndose éste hasta el minuto 30 de la reperfusión, con unos niveles superiores en más de cuatro veces de los observados en el grupo *I/R farmacológica*, donde la diferencia es de 1,8 (IC95 %: 1,3 a 2,3) ($P < 0,001$), o sea un 312,3 % más (IC95 %: 398,2 a 226,4). En proporción el incremento máximo se produce a los 21 minutos de la reperfusión siendo el valor del grupo con tratamiento un 320,2 % (IC95 %: 252,0 a 388,5) mayor al del grupo sin tratamiento.

El tratamiento con *L-arginina* reduce significativamente los niveles de azul de Evans durante la reperfusión, pero ésta deja de ser estadísticamente significativa a partir del minuto 10 de dicho periodo. El efecto máximo se observa a los 4 minutos en donde la diferencia es de 3,6 (IC95 %: 2,0 a 5,3) ($P < 0,001$), lo que representa una reducción del 88,8 % (IC95 %: 48,1 a 129,6) respecto a los niveles observados en el grupo sin tratamiento.

Control del efecto de L-NAME y L-arginina.

Aparte se realizaron unas experiencias para controlar el efecto tanto de L-NAME como de la L-arginina, con sus enantiómeros inactivos D-NAME y D-arginina, utilizando una pauta de administración idéntica. En estas no se aprecia influencia de estos tratamientos sobre el grupo de referencia sometido a isquemia/reperfusión que únicamente recibe suero por vía intravenosa (resultados no mostrados).

Resultado del análisis de la comparación de los métodos (físico y farmacológico) para producir la lesión por isquemia/reperfusión

Los apartados precedentes a esta sección de resultados nos describen el particular comportamiento de la lesión por isquemia/reperfusión en sus distintas fases y la

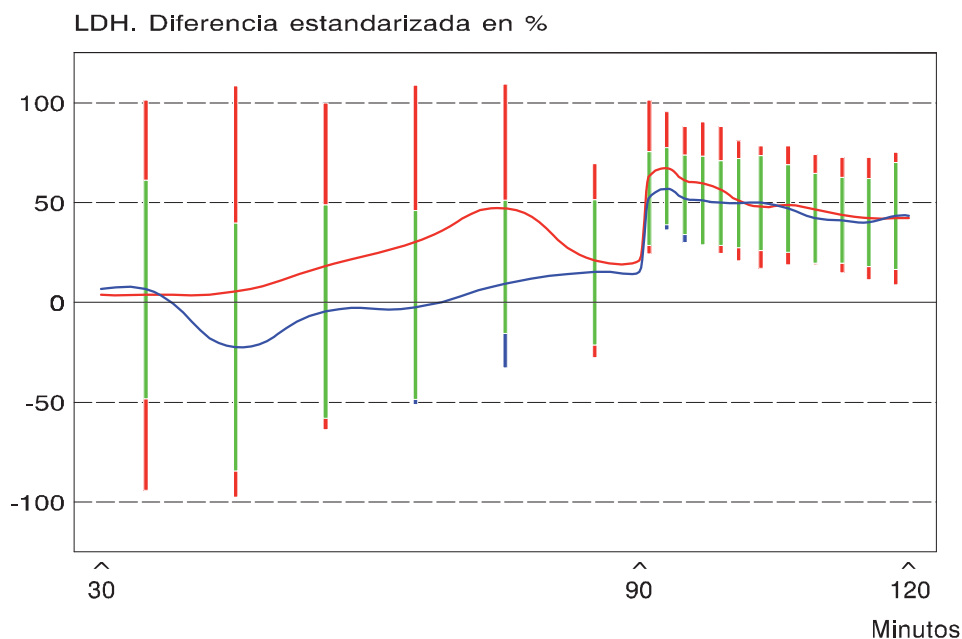
influencia de los diferentes tratamientos empleados sobre la misma, según el método empleado para producirla.

En el presente apartado se comparan las diferencias estandarizadas en tanto por ciento, de los niveles de LDH ($\text{UI} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cm de intestino perfundido}^{-1}$) y azul de Evans (densidad óptica $\cdot 1000 \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cm de intestino perfundido}^{-1}$) en el líquido de perfusión intestinal, después de los distintos tratamientos a los que se han sometido los grupos *I/R física* e *I/R farmacológica*.

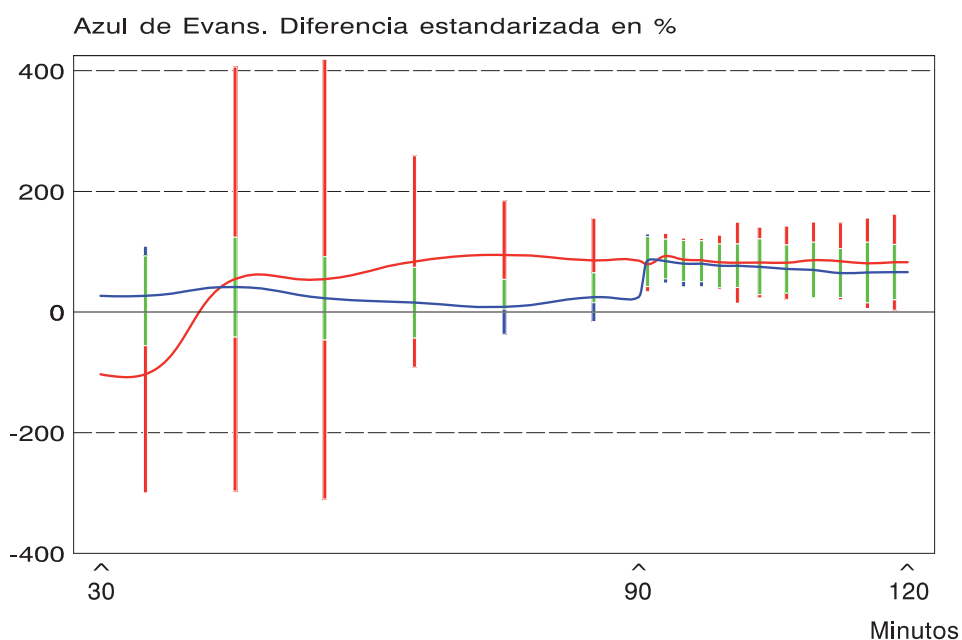
De manera que, si para un tratamiento determinado los intervalos de confianza del 95 % de las diferencias estandarizadas en tanto por ciento, entre los grupos *I/R física* e *I/R física* con los respectivos tratamientos y entre los grupos *I/R farmacológica* e *I/R farmacológica* con los respectivos tratamientos se solapan en un tiempo dado, podemos decir que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los dos métodos, en ese tiempo y para este tratamiento en concreto. Se concluirá que hay diferencias significativas, si ocurre lo contrario, o sea, que ambos intervalos de confianza del 95 % no tengan puntos en común.

Las diferencias encontradas en los niveles de LDH (gráficas 5 y 7) y azul de Evans (gráficas 6 y 8) entre los grupos de animales a los que se le ha sometido a *I/R física* o *I/R farmacológica* y han sido tratados en cada caso con *alopurinol*, *SOD* o *catalasa*, respecto a los grupos *I/R física* o *I/R farmacológica*; son proporcionalmente iguales desde el punto de vista estadístico en todos los tiempos estudiados y en ambos modelos (modelo físico y modelo farmacológico), como se muestra en las gráficas 13 y 14, y en las tablas 17, 18, 27 y 28 del anexo IV (tratamiento con *alopurinol*); en las gráficas 15 y 16, y en las tablas 19, 20, 29 y 30 del anexo IV (tratamiento con *SOD*); y en las gráficas 17 y 18, y en las tablas 21, 22, 31 y 32 del anexo IV (tratamiento con *catalasa*).

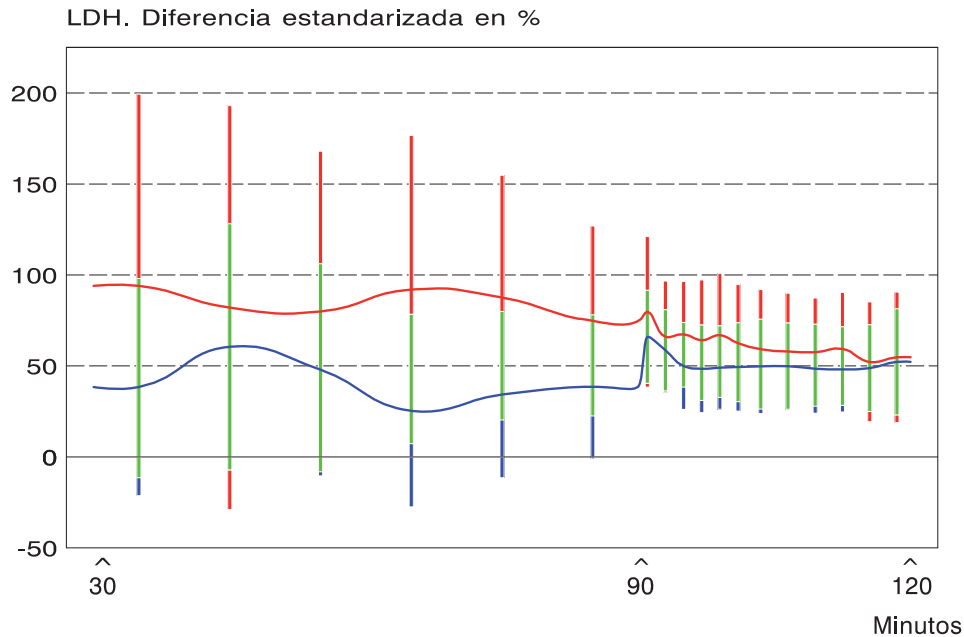
Los grupos de animales a los que se le ha sometido a *I/R física* o *I/R farmacológica* y han sido tratados con *L-NAME* o *L-arginina*, tienen unas diferencias respecto a los grupos de referencia sin tratamiento, en los niveles de LDH (gráficas 9 y 11) y azul de Evans (gráficas 10 y 12), que son proporcionalmente iguales desde el punto de vista estadístico, en todos los tiempos estudiados al comparar ambos modelos. Excepto en los grupos de animales tratados con *L-NAME*, en los que durante los primeros diez minutos de la reperusión las diferencias de los grupos con este tratamiento respecto a los grupos de referencia sin tratamiento, en los niveles de azul de Evans, no son proporcionalmente iguales. Como se muestra en las gráficas 19 y 20, y en las tablas 23, 24, 33 y 34 del anexo IV (tratamiento con *L-NAME*); y en las gráficas 21 y 22, y en las tablas 25, 26, 35 y 36 del anexo IV (tratamiento con *L-arginina*).



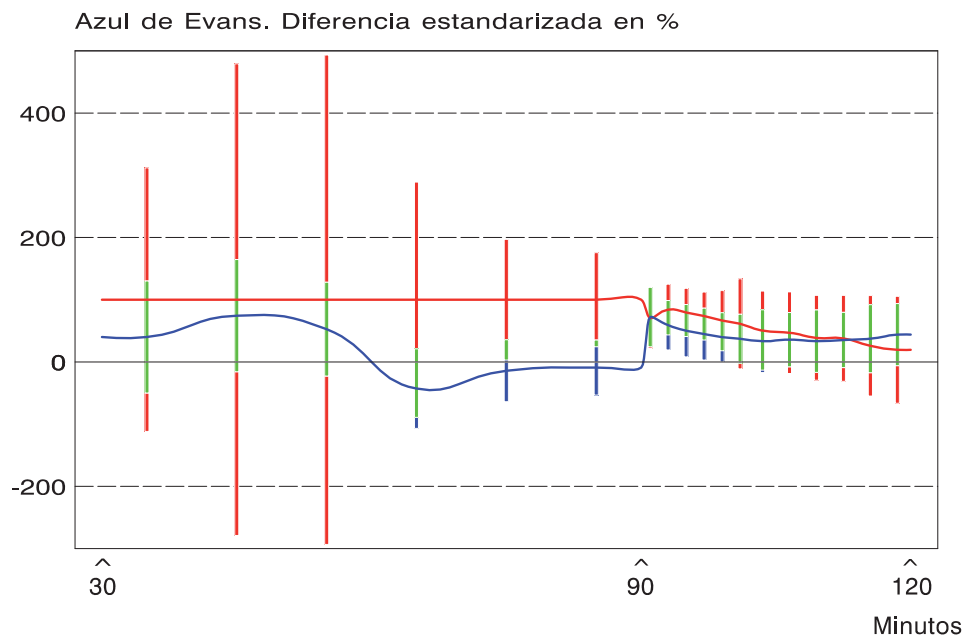
Gráfica 13. Diferencia estandarizada en tanto por ciento de los niveles de LDH ($\text{UI} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cm}$ de intestino perfundido⁻¹) en el líquido de perfusión intestinal, tras tratar con *alopurinol*. Mostrado como media aritmética (línea) e intervalo de confianza del 95 % (barra). (—) diferencia estandarizada entre I/R física e I/R física tratado con *alopurinol*. (—) diferencia estandarizada entre I/R química e I/R química tratado con *alopurinol*. (—) zona común entre ambos modelos.



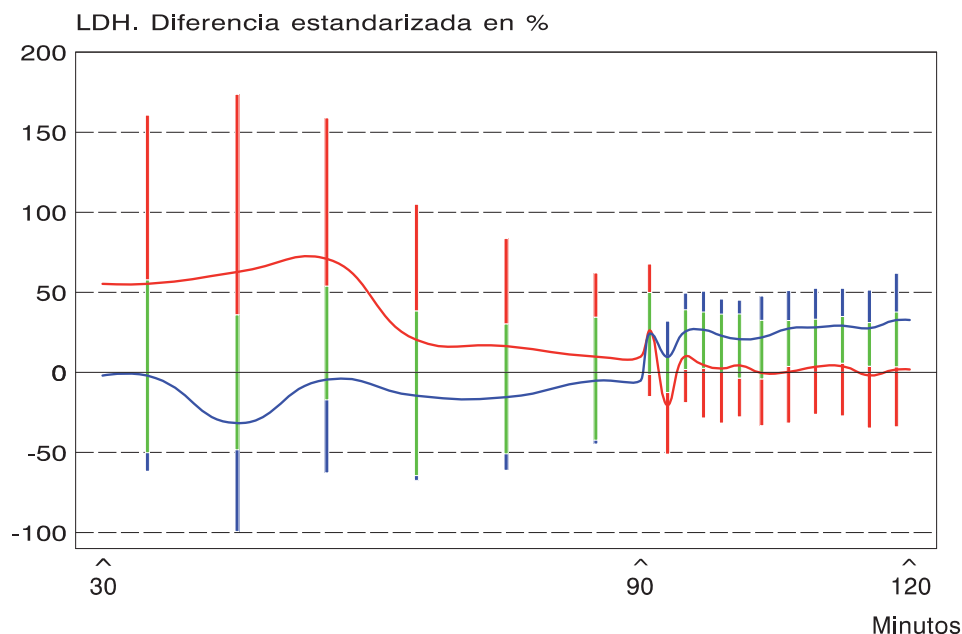
Gráfica 14. Diferencia estandarizada en tanto por ciento de los niveles de azul de Evans (densidad óptica $\cdot 1000 \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cm}$ de intestino perfundido⁻¹) en el líquido de perfusión intestinal, tras tratar con *alopurinol*. Mostrado como media aritmética (línea) e intervalo de confianza del 95 % (barra). (—) diferencia estandarizada entre I/R física e I/R física tratado con *alopurinol*. (—) diferencia estandarizada entre I/R química e I/R química tratado con *alopurinol*. (—) zona común entre ambos modelos.



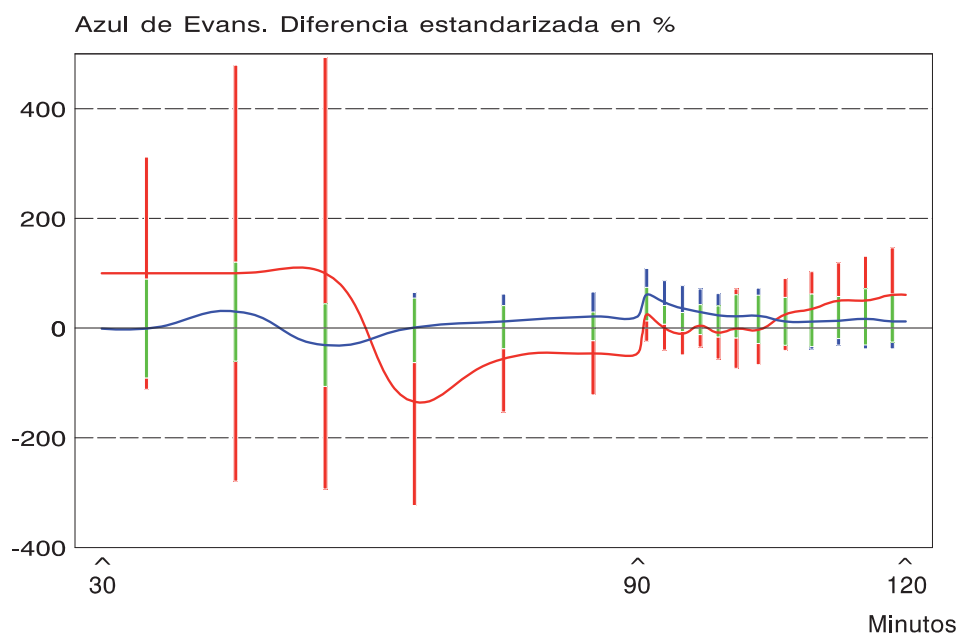
Gráfica 15. Diferencia estandarizada en tanto por ciento de los niveles de LDH ($\text{UI} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cm}$ de intestino perfundido⁻¹) en el líquido de perfusión intestinal, tras tratar con *superóxido dismutasa*. Mostrado como media aritmética (línea) e intervalo de confianza del 95 % (barra). (—) diferencia estandarizada entre I/R física e I/R física tratado con *superóxido dismutasa*. (—) diferencia estandarizada entre I/R química e I/R química tratado con *superóxido dismutasa*. (—) zona común entre ambos modelos.



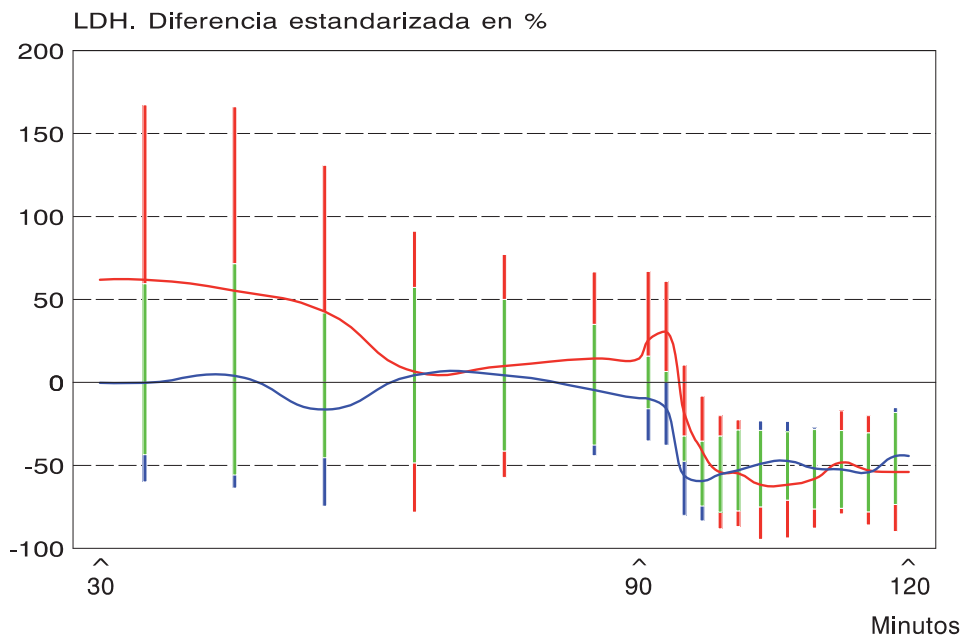
Gráfica 16. Diferencia estandarizada en tanto por ciento de los niveles de azul de Evans (densidad óptica $\cdot 1000 \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cm}$ de intestino perfundido⁻¹) en el líquido de perfusión intestinal, tras tratar con *superóxido dismutasa*. Mostrado como media aritmética (línea) e intervalo de confianza del 95 % (barra). (—) diferencia estandarizada entre I/R física e I/R física tratado con *superóxido dismutasa*. (—) diferencia estandarizada entre I/R química e I/R química tratado con *superóxido dismutasa*. (—) zona común entre ambos modelos.



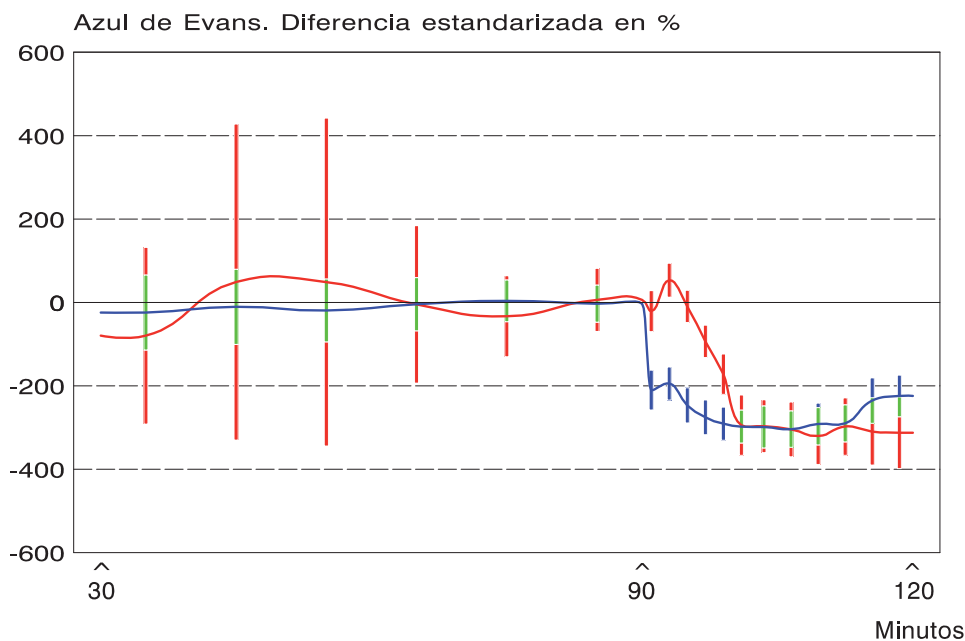
Gráfica 17. Diferencia estandarizada en tanto por ciento de los niveles de LDH ($\text{UI} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cm}$ de intestino perfundido⁻¹) en el líquido de perfusión intestinal, tras tratar con *catalasa*. Mostrado como media aritmética (línea) e intervalo de confianza del 95 % (barra). (—) diferencia estandarizada entre I/R física e I/R física tratado con *catalasa*. (—) diferencia estandarizada entre I/R química e I/R química tratado con *catalasa*. (—) zona común entre ambos modelos.



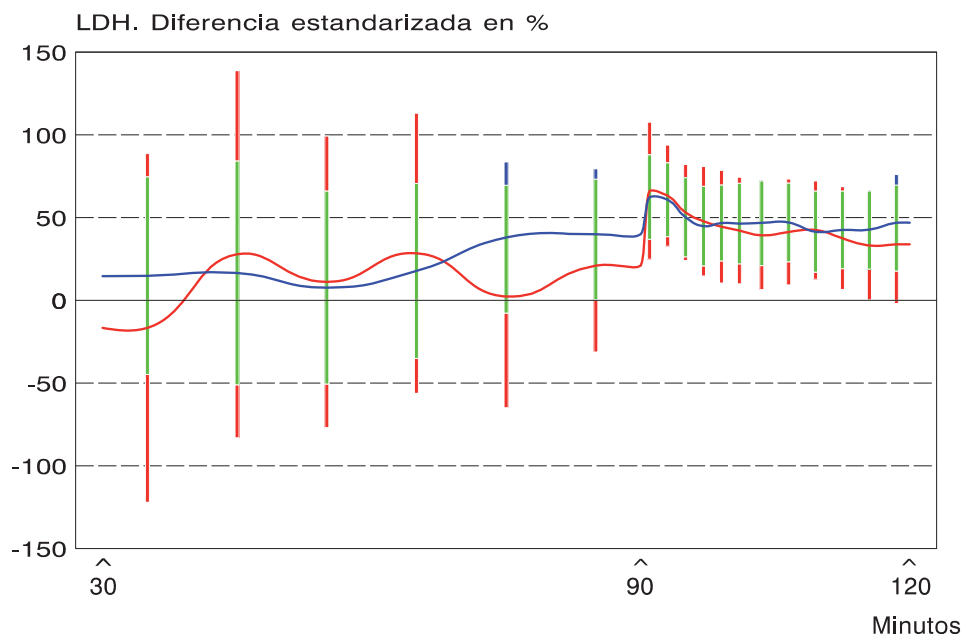
Gráfica 18. Diferencia estandarizada en tanto por ciento de los niveles de azul de Evans (densidad óptica $\cdot 1000 \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cm}$ de intestino perfundido⁻¹) en el líquido de perfusión intestinal, tras tratar con *catalasa*. Mostrado como media aritmética (línea) e intervalo de confianza del 95 % (barra). (—) diferencia estandarizada entre I/R física e I/R física tratado con *catalasa*. (—) diferencia estandarizada entre I/R química e I/R química tratado con *catalasa*. (—) zona común entre ambos modelos.



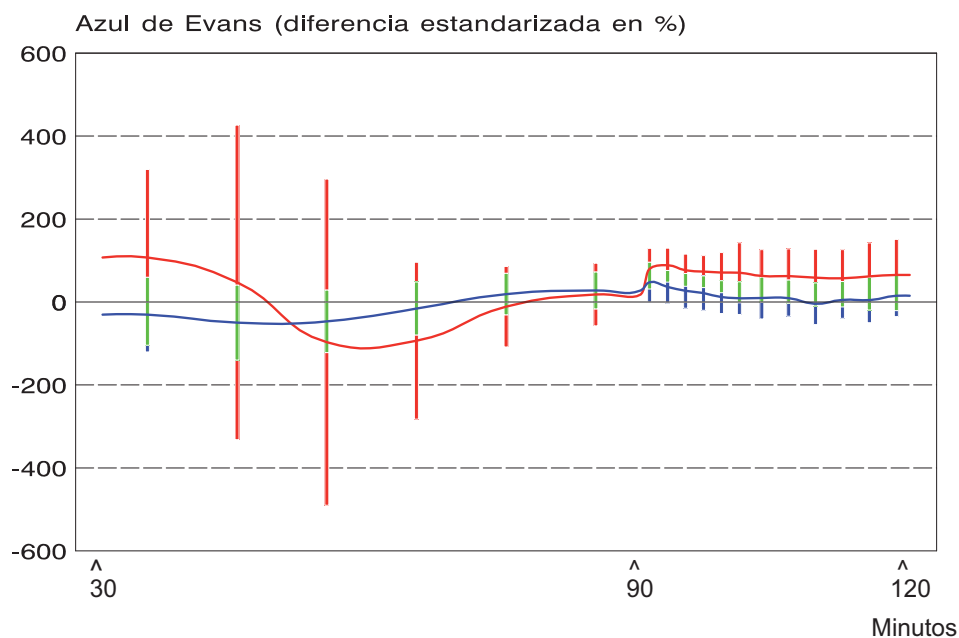
Gráfica 19. Diferencia estandarizada en tanto por ciento de los niveles de LDH ($\text{UI} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cm}$ de intestino perfundido⁻¹) en el líquido de perfusión intestinal, tras tratar con *N^G-nitro-L-arginina metil éster*. Mostrado como media aritmética (línea) e intervalo de confianza del 95 % (barra). (—) diferencia estandarizada entre I/R física e I/R física tratado con *N^G-nitro-L-arginina metil éster*. (—) diferencia estandarizada entre I/R química e I/R química tratado *N^G-nitro-L-arginina metil éster*. (—) zona común entre ambos modelos.



Gráfica 20. Diferencia estandarizada en tanto por ciento de los niveles de azul de Evans (densidad óptica $\cdot 1000 \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cm}$ de intestino perfundido⁻¹) en el líquido de perfusión intestinal, tras tratar con *N^G-nitro-L-arginina metil éster*. Mostrado como media aritmética (línea) e intervalo de confianza del 95 % (barra). (—) diferencia estandarizada entre I/R física e I/R física tratado con *N^G-nitro-L-arginina metil éster*. (—) diferencia estandarizada entre I/R química e I/R química tratado con *N^G-nitro-L-arginina metil éster*. (—) zona común entre ambos modelos.



Gráfica 21. Diferencia estandarizada en tanto por ciento de los niveles de LDH ($\text{UI} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cm}$ de intestino perfundido⁻¹) en el líquido de perfusión intestinal, tras tratar con *L-arginina*. Mostrado como media aritmética (línea) e intervalo de confianza del 95 % (barra). (—) diferencia estandarizada entre I/R física e I/R física tratado con *L-arginina*. (—) diferencia estandarizada entre I/R química e I/R química tratado con *L-arginina*. (—) zona común entre ambos modelos.



Gráfica 22. Diferencia estandarizada en tanto por ciento de los niveles de azul de Evans (densidad óptica $\cdot 1000 \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cm}$ de intestino perfundido⁻¹) en el líquido de perfusión intestinal, tras tratar con *L-arginina*. Mostrado como media aritmética (línea) e intervalo de confianza del 95 % (barra). (—) diferencia estandarizada entre I/R física e I/R física tratado con *L-arginina*. (—) diferencia estandarizada entre I/R química e I/R química tratado con *L-arginina*. (—) zona común entre ambos modelos.

Discusión

Discusión

Se han ideado diferentes modelos experimentales para aclarar los mecanismos implicados en la patogénesis de la isquemia/reperfusión intestinal, que intentan imitar la situación clínica, no sin dificultad. Ya que la enfermedad isquémica del intestino delgado se puede caracterizar tanto por un cese o por una reducción en el flujo sanguíneo, se han empleado modelos experimentales en los que se provoca, o una isquemia total, o una isquemia parcial o hipoperfusión.

Prácticamente toda la literatura concerniente al estudio de la lesión por isquemia/reperfusión, ya sea *in vitro*^{117,296,367,368,384,386,393,431,458,459,465,526}, o la gran cantidad de modelos *in vivo*, están basados en experimentos en los que el mecanismo por el que se produce la lesión comporta toda una serie de procedimientos físicos, en algunos casos bastante engorrosos (oclusión arterial mecánica parcial [referencias 145, 277, 278, 283, 284, 316, 317, 396, 451, 454, 456, 457, 527, 528] o total [referencias 225, 294, 318, 321, 360, 378, 397, 421, 450, 478, 486, 487, 505, 509, 529-531], hipotensión regional mediante circuito de circulación extracorpórea con el que se regula el flujo sanguíneo o la presión arterial^{46,142,275,277,317,393,450,454,456}, tracción mecánica del paquete vascular que irriga un segmento intestinal^{373,451}, hemorragia^{396,466,532}, trasplante de órganos^{429,533}, ...), lo cual permite el estudio de las características de la lesión por isquemia/reperfusión de manera bastante eficiente, pero desgraciadamente no contempla situaciones que se pueden dar en patología como isquemias y reperfusiones más o menos transitorias mediadas por factores humorales (químicos), como en el caso de las isquemias no oclusivas^{503,527,534,535}. Hay muchos factores implicados en la regulación de la circulación mesentérica (sistema nervioso autónomo, condiciones circulatorias, agentes vasoactivos, metabolitos, autorregulación, ...). Una alteración en uno o varios de estos factores puede producir una vasoconstricción persistente, la cual se considera el principal factor de la isquemia intestinal no oclusiva^{527,535}. Por otro lado, estudios clínicos muestran que la alteración histológica es la misma, ya sea el proceso causal la oclusión completa de la arteria o vena, o una vasoconstricción esplácnica prolongada y severa, algo que se puede hacer extensivo a las alteraciones clínicas y de laboratorio⁵⁰³.

Así, el principal objetivo fue el desarrollar un modelo experimental en la rata, que permitiera cuantificar las alteraciones producidas por isquemia/reperfusión mediada por sustancias químicas y poder observar las características diferenciales respecto al modelo clásico de isquemia/reperfusión producido por un mecanismo físico, donde las especies reactivas del oxígeno y el óxido nítrico tienen un papel muy relevante.

Consideraciones sobre la metodología empleada

Variables respuesta.

En el presente modelo (intestino de rata perfundido), lo primero fue comprobar que la isquemia/reperfusión producida por un mecanismo físico (pinza hemostática) tenía unas características funcionales similares a los modelos clásicos de isquemia/reperfusión descritos por Granger⁴⁶, Parks²⁷⁵, ..., en el que las especies reactivas del oxígeno tienen un papel fundamental en las alteraciones asociadas a la reperfusión de tejidos isquémicos.

Una de las primeras manifestaciones del daño intestinal promovida por la isquemia/reperfusión es el incremento de la permeabilidad capilar que desencadena la aparición de edema tisular y la extravasación de líquido a la luz intestinal, los cuales son indicadores sutiles de lesión isquémica^{46,282,289,454,455,498}. Posiblemente, la respuesta de las vénulas a la isquemia/reperfusión más ampliamente estudiada es la permeabilidad vascular aumentada, que refleja una reducción en las propiedades restrictivas de la barrera endotelial debido al estrés oxidativo^{46,117,368,380-382,384} y a la adhesión entre el leucocito y la célula endotelial^{145,316,453,456,458,459,465}.

El mantenimiento de la isquemia provoca la liberación de enzimas citosólicos por alteración de la estructura celular^{451,502-505}, pudiéndose apreciar desde alteraciones microscópicas hasta graves cambios macroscópicos^{267,282,503,506,507}.

Un hecho característico en la reperfusión del intestino isquémico es el daño funcional y estructural de la mucosa^{267,269,270,502,504,509}, lo que produce un incremento del aclaramiento transmucoso de albúmina (y otras macromoléculas) por un aumento de la permeabilidad microvascular y de la mucosa intestinal^{46,208,210,248,279,284,312,421,451,484,485}, así como un incremento en la liberación de enzimas intracelulares debido al daño tisular^{451,502-505}, lo cual está directamente relacionado tanto con la duración^{279,360,361,450,451,453} como con la severidad de la isquemia^{267,284,450-452}. A mayor duración de la anoxia, más producción de especies reactivas del oxígeno en la reoxigenación³⁶⁷, hasta un tiempo máximo³⁶⁸. Para cuantificarlas, se mide respectivamente el azul de Evans extravasado (usado como marcador de la pérdida proteica intravascular) y el nivel del enzima citosólico LDH en el líquido de perfusión.

Densidad óptica de azul de Evans

La permeabilidad vascular y de la mucosa intestinal a las proteínas del plasma es una medida muy utilizada para cuantificar la disfunción observada tras breves periodos de

isquemia intestinal²⁸⁹. Diversos trabajos muestran una correlación positiva significativa entre el incremento en la permeabilidad microvascular, y la extravasación de ciertos colorantes administrados por vía intravenosa⁵¹⁸⁻⁵²⁰. Aunque el azul de Evans no se comporta exactamente como la I¹²⁵-albúmina desde el punto de vista farmacocinético⁵²², ambos sirven para evaluar la permeabilidad de los vasos sanguíneos a las proteínas del plasma de aproximadamente 60 kDa de peso molecular⁵¹⁹.

Una de las principales funciones del epitelio intestinal es separar el contenido luminal del líquido intersticial. Por lo que en condiciones normales esta membrana mucosa es relativamente impermeable y una barrera altamente selectiva, que permite únicamente el paso de pequeñas cantidades de proteínas plasmáticas a la luz intestinal. Esta función de barrera se atribuye a la disposición de las uniones entre las caras adosadas de los enterocitos, en su zona apical se encuentran estrechamente unidas, en condiciones normales estas uniones excluyen el movimiento pasivo de compuestos hidrófilos sin carga con un radio molecular superior a 11,5 Å⁵³⁶. El epitelio intestinal es una membrana que contiene gran cantidad de poros de distinto tamaño, de por lo menos tres tipos. Los mayores (con radio mayor a 6,0 nm) ocupan sólo el 1 % de la superficie mucosa, los más numerosos son poros de pequeño tamaño (0,7 nm de radio) y, por último, poros muy pequeños (menos de 0,4 nm de radio) que ocupan el 0,001 % del área mucosa⁵³⁷.

El aclaramiento de sustancias del plasma al lumen depende de las propiedades fisicoquímicas de éstas (tamaño, forma, carga) y de las barreras que han de atravesar. A saber, el endotelio vascular, el intersticio y las células epiteliales intestinales.

La albúmina tiene restringido su paso al intersticio en condiciones normales⁵³⁸. Esta función la llevan a cabo los capilares y se encuentra alterada tras una hora de isquemia, produciéndose un incremento en la filtración capilar por reducción en las propiedades restrictivas de éstos a las macromoléculas endógenas²⁸⁹. Dado que el azul de Evans se une a las proteínas del plasma, en su mayor parte a la albúmina^{521,522}, el encontrar una cantidad significativa del colorante en el líquido de perfusión nos indica un incremento en la permeabilidad capilar y de la mucosa intestinal.

El azul de Evans administrado por vía intravenosa se distribuye rápidamente por el intersticio intestinal, ya que como explican Crissinger y cols.²⁸⁵, el endotelio capilar del intestino delgado ofrece una limitación insignificante al movimiento de pequeñas moléculas. Se comportaría aproximadamente como el EDTA, otra sustancia de

pequeño tamaño y muy hidrófila, con la que el equilibrio entre la concentración plasmática y la del intersticio a los 10 minutos es del 100 %.

Así se evita el inconveniente de otros autores que utilizan albúmina marcada con elementos radiactivos^{307,388,450,457,485,505,513}, la cual sí necesita varias horas para equilibrar su concentración entre el líquido intersticial intestinal y el plasma, debido a la significativa restricción de los capilares intestinales al paso de ésta⁵³⁸.

Según Crissinger y cols.²⁸⁵, se ha de ser consciente de este equilibrio cuando se intentan interpretar estudios en los que se administra la albúmina marcada poco antes de tomar las medidas de aclaramiento. Ya que la concentración intersticial de soluto representa la verdadera fuerza conductora del aclaramiento mucoso, lo presumible es que el aclaramiento se incremente progresivamente hasta que se alcanzase el equilibrio completo. También debe tenerse en cuenta, que el aclaramiento de albúmina puede no reflejar la permeabilidad mucosa *per se* en una situación en la que la permeabilidad capilar (y por tanto la concentración de soluto intersticial) se encuentra alterada. Para que el aclaramiento de albúmina sea un fiel reflejo de la permeabilidad mucosa, la concentración intersticial de soluto debe ser constante.

Crissinger y cols.²⁸⁵ apuntan que una desventaja potencial del uso de pequeñas moléculas, en el caso del presente trabajo el azul de Evans, es que el aclaramiento puede producirse por dos vías diferentes (transcelular y/o paracelular). Sin embargo, el azul de Evans es una molécula muy hidrófila y es muy difícil su paso a través de la membrana celular^{536,539}. Además se encuentra unida prácticamente en su totalidad a las proteínas plasmáticas, principalmente la albúmina^{521,522}.

Dado que la reperusión del intestino isquémico reduce el espesor de la mucosa, la altura de la vellosidad y la profundidad de las criptas, con desprendimiento epitelial y desorganización de la lámina propia^{267,277,278,507}, el aclaramiento de azul de Evans a través de los capilares y mucosa intestinal proporcionará un índice del daño funcional y morfológico producido durante la isquemia/reperusión.

Enzima laticodeshidrogenasa (LDH)

Se llevaron a cabo unas cuantas experiencias para determinar cual de entre una selección de enzimas intracelulares podría ser el que mejor representase la lesión tisular en el presente modelo experimental. De entre todos, la que mostró mejor sensibilidad y especificidad fue la lactato deshidrogenasa.

Hay una fuerte correlación entre la magnitud del aclaramiento de albúmina (o lo que es lo mismo, de azul de Evans^{519,520}) y la liberación de enzimas intracelulares con la valoración histológica de la lesión mucosa, lo cual indica que ambos son unos índices cuantitativos de confianza de la integridad de la mucosa⁴⁵⁰.

Clásicamente, la valoración histológica ha sido y es uno de los parámetros más utilizados para valorar la lesión de la mucosa intestinal (referencias 225, 267, 268, 277, 278, 283, 302, 321, 360, 361, 374, 486, 487, 507, 509, 526, 529, 530, 540). El uso del aclaramiento de azul de Evans como indicador de la permeabilidad vascular y mucosa, y de la LDH como índice de destrucción tisular, tiene varias ventajas. Proporciona medidas cuantitativas, objetivas, reproducibles y útiles de la integridad mucosa y del tejido intestinal. Las medidas se pueden obtener durante todo el experimento, y de esa manera evaluar en cada instante la permeabilidad y el daño tisular. Con lo que son claramente superiores a la evaluación histológica ya que son menos subjetivas, más reproducibles y menos difíciles de realizar.

Perfusión de la luz intestinal.

Se utiliza suero salino para la perfusión intraluminal del intestino delgado, ya que la perfusión de cualquier líquido nutricio puede enmascarar la magnitud de la lesión tanto durante la isquemia como en la reperfusión. Se ha demostrado que la perfusión intraluminal de glucosa y electrolitos, minimiza la lesión morfológica, incrementa el contenido de ATP y preserva el funcionalismo a nivel de la mucosa intestinal^{268,283,541,542}). Tampoco se ha oxigenado, porque aunque este procedimiento no proteja completamente de la lesión isquémica, sí ha mostrado su efectividad durante la fase de reperfusión, al disminuir los trastornos de la estructura, función y carga energética de la mucosa intestinal^{283,421,541,542}.

El suero salino para perfusión se calienta, de tal manera que cuando por medio de la bomba peristáltica llega al segmento intestinal seleccionado, lo haga a $37\text{ °C} \pm 0,5$ (ver metodología). Esto es importante ya que, como demuestran Kurlberg y cols.⁵²⁶, la perfusión intraluminal del intestino delgado a diferentes temperaturas puede modificar los cambios fisiopatológicos de la hipoperfusión (isquemia), reduciéndose el nivel del daño de la mucosa intestinal a temperaturas más bajas, lo que está de acuerdo con Hossain y cols.⁴²⁹

La concentración de azul de Evans en la luz intestinal puede estar influida por una serie de factores: la permeabilidad vascular y mucosa, la velocidad de perfusión luminal, la absorción y secreción intestinal, y la concentración plasmática. La

concentración luminal de LDH además vendrá determinada por la mayor o menor cantidad de tejido dañado.

En éste modelo experimental, los únicos factores que son variables y que, por lo tanto, determinan la concentración luminal son la permeabilidad mucosa y vascular en el caso del azul de Evans y, además, la destrucción tisular en el de la LDH.

La velocidad de perfusión luminal es constante. Tras probar distintas velocidades que oscilaron entre 0'25 y 3 ml/min (0'25, 0'3, 0'5, 1, 1'2, 1'5, 2'1 y 3 ml/min), la de 0'5 ml/min se mostró como la más idónea, ya que permite un intercambio muy satisfactorio entre el líquido de perfusión luminal y la mucosa intestinal, y no da lugar a una concentración demasiado elevada en el primero que nos pudiera reducir el gradiente de difusión entre el plasma y la luz intestinal, ni una concentración demasiado baja que no nos permitiese medir, por falta de sensibilidad, la LDH o el azul de Evans. Además, y esto es una consideración meramente técnica, nos permite recoger la cantidad mínima de muestra (1 mililitro, necesario para llevar a cabo los análisis de laboratorio) durante un periodo de 2 minutos, que es el intervalo de tiempo más corto durante el que se recoge una muestra de líquido de perfusión intestinal (Metodología, páginas 107 y 108). Si se utiliza una velocidad inferior, el conflicto vendría dado por el escaso volumen de algunas de las muestras recogidas al inicio de la reperfusión, con lo que debería alargarse el intervalo de recogida de las mismas, reduciendo el número de estas, con la consiguiente pérdida de información.

La recogida de muestras del suero salino perfundido a través de la luz intestinal se realizó cada 10 minutos durante los periodos control e isquémico. Este intervalo de tiempo es apropiado, ya que las variaciones en las variables respuesta durante estos periodos son mínimas. Un asunto bien distinto es el periodo de reperfusión; aquí es donde se producen las modificaciones más significativas de las variables respuesta, por lo que para ajustar lo máximo posible el comportamiento de estas se reducen los intervalos de recogida de muestras a 2 minutos durante los 12 primeros minutos de la reperfusión, y a 3 minutos el resto del periodo, hasta los 30 minutos. Del Maestro y cols.³⁸⁰ en su trabajo sobre la influencia de las especies reactivas del oxígeno derivadas de la xantina oxidasa sobre la permeabilidad vascular, muestran que el dextrano (150.000 kDa) marcado con fluoresceína se extravasa a través de las vénulas postcapilares a los 2 minutos de aplicar una solución con hipoxantina y xantina oxidasa, alcanzándose un máximo a los 10 minutos. Esto está en sintonía con diversos trabajos en los que se detecta directamente la presencia de gran cantidad de especies reactivas del oxígeno en los primeros minutos (desde segundos a 4 minutos) de la reperfusión del tejido isquémico, cayendo a partir de entonces hasta el minuto 30 de reperfusión^{283,344,362,363,366,368,369}.

En el modelo experimental que se presenta, se analiza todo el suero perfundido a través de la luz intestinal, a los tiempos mostrados en la figura 8 (página 108), lo cual es una ventaja sobre otros modelos ya que permite valorar las alteraciones producidas en todo instante, lo que es particularmente valioso en el periodo de reperfusión.

Se ha sugerido²⁹⁷ que en la fase inicial de la isquemia, proteasas intraluminales intestinales, especialmente la elastasa, contribuyen de manera sustancial a la pérdida de las proteínas del borde en cepillo de la mucosa intestinal, y no se reemplazarían de igual modo por la falta de riego sanguíneo. Tras la desaparición del borde en cepillo en la fase de isquemia avanzada, se pierde la protección de las glicoproteínas resistentes a la tripsina. En ese momento las estructuras subyacentes son accesibles a la acción de las endopeptidasas pancreáticas presentes a lo largo de la pared y luz intestinal. La perfusión de suero salino elimina casi totalmente la tripsina y elastasa de la luz intestinal^{297,298}.

Por todo lo expuesto, en nuestro modelo experimental es difícil que las proteasas pancreáticas^{297,299}, bilis y otros factores presentes en la luz intestinal²⁹⁸ tengan alguna influencia en la lesión observada durante la isquemia y posterior reperfusión.

El modelo de isquemia/reperfusión física

Como quedó explicado en la sección de metodología, para provocar la isquemia física se interrumpe la circulación sanguínea de la rama de la arteria mesentérica que irriga el segmento intestinal seleccionado con una pinza hemostática, y para producir la reperfusión física se retira, restituyéndose el flujo sanguíneo.

Duración de la isquemia

Ya que la magnitud de la lesión por reperfusión depende entre otros factores de la duración de la isquemia^{117,279,296,360,361,367,384,408,450,451,453}, se realizan unas experiencias, que no presentamos, en las primeras fases del trabajo que determinarían la duración del periodo isquémico. La que produjese la lesión por reperfusión más idónea, en vistas a que el modelo experimental fuese útil (sensible) para medir alteraciones de diferente intensidad y el efecto de determinadas sustancias farmacológicas con fines terapéuticos.

En estas experiencias se sometió al intestino a 15, 30 y 60 minutos de isquemia respectivamente, con 60 minutos de reperfusión, usando el método físico. Se emplea el periodo mínimo de 15 minutos porque, aunque se han observado cambios estructurales y funcionales en la mucosa intestinal tras cortos periodos de oclusión (menos de 15 minutos) de la arteria mesentérica superior^{267,279,452}, estos cambios son intracelulares²⁶⁹. Aunque, Otamiri y cols.⁴⁵¹ con su modelo de isquemia/reperfusión observan en la

reperfusion una mayor permeabilidad mucosa al dextrano 3000 tras 10 o más minutos de isquemia. Vaughan y cols.³⁸⁸ observan que 20 minutos de isquemia completa intestinal y posterior reperfusion se asocia con significativas alteraciones hemodinámicas y metabólicas (valoradas mediante la presión arterial media, frecuencia cardiaca, pH, pCO₂, pO₂, HCO₃⁻, hematocrito).

Observamos que en la reperfusion el aumento de la permeabilidad vascular y mucosa, y la lesión tisular medida por los niveles de LDH, está directamente relacionado con la duración del periodo isquémico, algo que se acepta de manera general^{117,279,296,360,361,367,384,408,450,451,453}. También se realizaron experiencias con periodos de isquemia superiores a los 60 minutos (120 y 240 minutos), siguiendo a algunos trabajos publicados^{275,279,282}, pero la lesión fue excesiva, lo que representaba más un inconveniente que una ventaja. Hay trabajos^{279,282,360,361,508} que tras una isquemia total han fracasado en demostrar que se agrave la lesión durante la reperfusion. Esto se puede explicar si la lesión producida durante un prolongado periodo de isquemia es demasiado severa, lo cual no permitirá detectar exacerbaciones en la misma durante la reperfusion, así como por la diferente cualidad del método empleado para producir la isquemia⁴⁵². Inauen y cols.²⁹⁶ con su modelo *in vitro* corroboran este concepto, observan que tras anoxias de 2 o más horas en las que se produce una lesión cercana a la máxima, la adición de neutrófilos produce un efecto insignificante, sin embargo, tras periodos de anoxia de 1 hora o inferiores (moderada lesión celular), el añadir neutrófilos intensifica la lesión celular. Henninger y cols.⁵⁰⁸ valoran la influencia de la isquemia en la respiración celular y mitocondrial del enterocito, observan que la supresión de esta última es reversible con periodos inferiores a 60 minutos de isquemia, e irreversible con periodos mayores, lo cual también estaría en sintonía con lo expuesto.

La duda estuvo en tomar como referencia al grupo *isquemia 30 minutos* o al *isquemia 60 minutos*. Ésta se despejó al hacer las primeras pruebas de *isquemia química* (ver más adelante) valorando el nivel de LDH en el líquido de perfusión. Los 30 minutos de isquemia química no eran suficientes para provocar en la reperfusion una mínima parte de la lesión observada en la reperfusion tras 30 minutos de isquemia física. Como se anticipó en el apartado de metodología se eligió los 60 minutos de isquemia, por ser más sensible.

Duración de la reperfusion

En estas pruebas previas, también se aplicaron periodos de reperfusion de hasta una hora en algunas experiencias. Dado que los últimos 30 minutos no aportan nada significativo, se escoge un tiempo de reperfusion de 30 minutos.

Tal y como se comenta en la sección de resultados, al comparar los niveles de LDH y azul de Evans en las muestras de líquido de perfusión intestinal del grupo de referencia *I/R física*, con las del grupo *control* (gráficas 1 y 2, páginas 118 y 119, y en las tablas 13 y 14 del anexo III, páginas 240 y 241), se aprecian unas claras diferencias, confirmadas estadísticamente, durante el periodo de 60 minutos de isquemia. Esto está en sintonía con el concepto de lesión isquémica, la cual es más severa cuanto más intensa y duradera es^{267,279,284,360,361,450-453}. Sin embargo, representa una pequeña porción de las alteraciones que se observan durante la reperfusión.

Las alteraciones que causa la reperfusión se inician y son más intensas durante los primeros minutos, que es cuando se produce el aporte de oxígeno con la consiguiente producción masiva de especies reactivas del oxígeno, las cuales desbordan la capacidad defensiva antioxidante del tejido que además, posiblemente, ya se encuentren mermadas debido a la isquemia^{51,89,96,142-146}. Lum y cols.¹¹⁷ en su modelo *in vitro* con células endoteliales no observan tal merma.

Como se aprecia en los gráficos 1 y 2, la lesión celular se produce sobre todo al inicio de la reperfusión liberándose más LDH; también se observan niveles decrecientes de azul de Evans a lo largo del mencionado periodo. El hecho de que la pérdida del epitelio no se reemplaza completamente hasta los 2 o 3 días⁵¹³, lo que nos da a entender que la disminución de los niveles de azul de Evans se debe a una disminución de la permeabilidad vascular.

Por todo ello, se puede manifestar que el modelo experimental de *I/R física* en intestino de rata aquí utilizado se comporta de manera semejante a como lo hacen los modelos clásicamente utilizados.

Influencia de la reperfusión en el síndrome de isquemia/reperfusión

En éste modelo experimental, se estudia la influencia de la reperfusión en la lesión por isquemia/reperfusión. Para analizar esto se utiliza un grupo de animales a los que se les provoca 90 minutos de isquemia intestinal, o sea, no se reperfunde a los 60 minutos de isquemia.

Los resultados que se muestran en las gráficas 1 y 2 (páginas 118 y 119) y en las tablas 11 y 12 del anexo II (páginas 236 y 237) son contundentes. Si bien es evidente que tras un periodo prolongado de isquemia intestinal se acaban produciendo graves lesiones irreversibles^{267,282,503,506,507}, tras un periodo relativamente corto de isquemia (60 minutos) la lesión isquémica, medida en este modelo por los niveles de LDH en el líquido de perfusión intestinal, sólo representa entre el 13,5 % de lo que se observa en

los 2 primeros minutos en caso de reperfusión tras 60 minutos de isquemia, y el 30,5 %, de lo que se aprecia a los 30 minutos de reperfusión tras 60 minutos de isquemia. De manera análoga, la permeabilidad intestinal al azul de Evans en caso de isquemia oscila sólo entre el 2,1% (minuto 94) a un 8,8 % (minuto 120) de lo que se observa en la reperfusión tras 60 minutos de isquemia. Lo cual está de acuerdo con otros trabajos^{277,318,360,361,389,504} que determinan que si no se produce reperfusión la lesión isquémica permanece largo tiempo sin cambios.

Por tanto, tras periodos relativamente cortos de isquemia es en la reperfusión donde se produce la mayor parte de la lesión, y refuerza el concepto ya establecido, de que las especies reactivas del oxígeno están implicadas en la lesión producida por la reperfusión del tejido isquémico. Éste debe ser reexpuesto al oxígeno molecular, que es el origen de las especies reactivas del oxígeno, para causar lesión en el momento de la reperfusión (figura 4, página 65).

El modelo de isquemia/reperfusión farmacológica

La pretensión durante el desarrollo del modelo experimental para el estudio del síndrome de isquemia/reperfusión farmacológico, fue el encontrar uno que se pareciera lo máximo posible al síndrome de isquemia/reperfusión inducido por un método físico. Para ello se probaron diferentes pautas de administración con diferentes sustancias (Tabla 3). Se ensayó con diversas concentraciones de clorhidrato de noradrenalina (en adelante noradrenalina), administrada en forma de superfusión sobre las ramas de la arteria mesentérica que irrigan el segmento intestinal seleccionado durante 60 minutos para provocar la isquemia; junto, o no, con distintas concentraciones de sustancias antagonista de la noradrenalina (clorhidrato de timoxamina) y/o vasodilatadora (clorhidrato de isoxsuprina), administradas de igual manera para inducir la fase de reperfusión. Para más detalles, ver Metodología página 109. Al igual que el suero salino para perfusión, el líquido de superfusión se calentó de tal manera que cuando llega a las ramas de la arteria mesentérica este se encuentre a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5$. Kurlberg y cols.⁵²⁶ muestran la importancia de ello en su modelo *in vitro*, al perfundir las ramas de la arteria mesentérica a diferentes temperaturas modifican los cambios que produce la isquemia, observan menor lesión de la mucosa a bajas temperaturas. Lo que está de acuerdo con Hossain y cols.⁴²⁹.

La catecolamina noradrenalina, es un agente simpaticomimético de acción directa, con efectos pronunciados sobre los receptores α adrenérgicos, y menos marcados sobre los receptores β . Es un neurotransmisor que produce vasoconstricción actuando sobre los α -adrenoceptores del músculo liso vascular.

Tabla 3. Serie de pautas de administración ensayadas para producir el síndrome de isquemia/reperfusión farmacológico.

Pauta	Isquemia	Reperusión
I	Noradrenalina $5 \cdot 10^{-3}$ M	Suero
II	Noradrenalina 10^{-3} M	Isoxsuprina 10^{-3} M
III	Noradrenalina $2,5 \cdot 10^{-3}$ M	Isoxsuprina 10^{-3} M
IV	Noradrenalina $5 \cdot 10^{-4}$ M	Timoxamina e isoxsuprina 10^{-3} M
V	Noradrenalina 10^{-3} M	Timoxamina e isoxsuprina 10^{-3} M
VI	Noradrenalina $3 \cdot 10^{-3}$ M	Timoxamina e isoxsuprina 10^{-3} M
VII	Noradrenalina $5 \cdot 10^{-3}$ M	Timoxamina e isoxsuprina 10^{-3} M
VIII	Noradrenalina $2 \cdot 10^{-3}$ M	Timoxamina e isoxsuprina $2 \cdot 10^{-3}$ M
IX	Noradrenalina $2,5 \cdot 10^{-3}$ M	Timoxamina e isoxsuprina $2 \cdot 10^{-3}$ M
X	Noradrenalina $3 \cdot 10^{-3}$ M	Timoxamina e isoxsuprina $2 \cdot 10^{-3}$ M
XI	Suero	Timoxamina e isoxsuprina $2 \cdot 10^{-3}$ M

Se escoge la noradrenalina por su rápida acción vasoconstrictora cuando se aplica localmente y por su fácil manejo.

Para provocar la isquemia farmacológica se utilizaron diversas concentraciones de noradrenalina, desde 10^{-3} a $5 \cdot 10^{-3}$ M*, formando parte junto con la administración posterior, o no, de clorhidrato de timoxamina (en adelante timoxamina) y/o clorhidrato de isoxsuprina (en adelante isoxsuprina), de diferentes pautas de administración para provocar el síndrome de isquemia/reperfusión farmacológico (Tabla 3).

Tras el estudio de los resultados de las pautas seleccionadas se escoge la concentración de $2,5 \cdot 10^{-3}$ M, porque cuando se administra en la misma pauta con la timoxamina e isoxsuprina, producen unas alteraciones (niveles de azul de Evans y LDH en el líquido de perfusión intestinal) semejantes a las del modelo de isquemia/reperfusión físico, aunque cuantitativamente inferiores. Concentraciones inferiores a $2,5 \cdot 10^{-3}$ M provocaron alteraciones menores, y concentraciones superiores a $2,5 \cdot 10^{-3}$ M no proporcionaron diferencias significativas respecto a ésta, con el inconveniente de un mayor riesgo de efectos secundarios.

* En pruebas previas se utilizaron concentraciones menores y mayores, pero sin alcanzar el objetivo deseado.

La timoxamina es una fenoxialquilamina, que actúa como antagonista competitivo de los receptores α adrenérgicos, además posee actividad vasodilatadora y una ligera acción antihistamínica⁵⁴³.

La isoxsuprina deriva de la *p*-hidroxifeniletanolamina con grandes grupos sustitutivos a nivel del nitrógeno. Es un vasodilatador, produce relajación vascular directa. Además, es agonista del receptor β_2 adrenérgico si bien también actúa sobre los β_1 , con una ligera acción antagonista α ⁵⁴⁴. Asimismo posee acción hemorreológica.

La timoxamina e isoxsuprina se utilizan para inducir la reperfusión farmacológica, porque sus efectos antagonizan la acción de la noradrenalina y son fármacos que se han empleado en el tratamiento de diversos trastornos vasculares periféricos.

Antes de utilizar timoxamina junto con isoxsuprina para producir la reperfusión farmacológica, se hizo una prueba previa (pauta de administración I, tabla 3) en la que no se emplearon estas sustancias. En su lugar se usó suero salino pretendiendo hacer una especie de lavado. El resultado no difería del grupo control (resultados no mostrados), y no se observan diferencias en los niveles de azul de Evans y LDH en el líquido de perfusión intestinal respecto al periodo isquémico. Esto está de acuerdo con el concepto que la lesión por reperfusión se produce por el aporte súbito de oxígeno a un tejido previamente isquémico (o anóxico) lo cual, junto con los cambios fisiopatológicos que se producen durante la isquemia, provoca la producción masiva de especies reactivas del oxígeno que desbordan las defensas antioxidantes⁹⁶. En este caso, el aporte súbito de oxígeno seguramente no se produce, primero porque la noradrenalina continua actuando durante los primeros minutos de la reperfusión, a pesar de haberse retirado su administración, y segundo, que al no administrar la timoxamina para contrarrestar la acción de la anterior, y el vasodilatador isoxsuprina, no se origina una vasodilatación brusca que es lo que provocaría un aporte masivo de oxígeno al tejido isquémico. Además, esto también es congruente con los trabajos en los que si en la reperfusión se suministra poca cantidad de oxígeno^{277,325,333} o se hace de una manera gradual³²⁵, produce una lesión menor.

Así pues, para provocar la reperfusión farmacológica se aplicó isoxsuprina sola y en combinación con timoxamina. Cuando se administró sola (pautas de administración II y III, tabla 3) los niveles de azul de Evans y de LDH en el líquido de perfusión intestinal aumentaban muy poco durante el periodo de reperfusión (resultados no mostrados), lo cual hacía al modelo experimental muy poco sensible para valoraciones posteriores.

Por ello se decide el empleo de otra sustancia que potencie la reperfusión. La combinación de isoxsuprina con timoxamina se administró a diferentes concentraciones tras la

superfusión de noradrenalina en diferentes pautas, como se muestra en la tabla 3, con el objetivo de provocar el síndrome de isquemia/reperfusión farmacológico lo más parecido al síndrome de isquemia/reperfusión físico.

Tras el estudio de los resultados de las pautas seleccionadas se escoge la concentración de $2 \cdot 10^{-3}$ M, porque con ella nos acercamos lo máximo que pudimos al objetivo propuesto.

Quizás se pueda discutir, o se pueda no estar de acuerdo en la manera con la que se administra tanto la noradrenalina, como la timoxamina y la isoxsuprina; por superfusión en lugar de hacerlo por vía intravenosa local, como sería o al menos es lo que se asemejaría más a la situación fisiológica. Pero en este modelo experimental, administrarlo localmente por vía intravenosa en las ramas de la arteria mesentérica que irrigan el segmento intestinal seleccionado, sin producir una obstrucción o ni siquiera un traumatismo de la arteria, se antoja muy complicado. Además, de lo que se trata no es de buscar el modelo más fisiológico desde el punto de vista de la administración, sino lo que se busca es un efecto que esté en sintonía con la fisiopatología de la isquemia/reperfusión, independientemente de si las sustancias administradas lo han sido en forma de perfusión, superfusión, etc. Se persigue un modelo que permita reproducir y cuantificar una situación, una y otra vez, sin gran dificultad metodológica, por lo que se considera que la administración en forma de superfusión es suficiente para obtener este objetivo.

Aunque no se puede descartar, lo más probable es que la autooxidación que puede sufrir la noradrenalina durante el proceso de superfusión sea irrelevante en nuestro modelo experimental. De hecho, si ocurre a pH fisiológico, este suceso *per se* es extremadamente lento⁵³. Allen y cols.¹³⁶ muestran que las catecolaminas como la noradrenalina son capaces de liberar, sobre todo en condiciones anaeróbicas, el hierro de la ferritina, así como interactuar con la ferritina en presencia del sistema xantina oxidasa produciendo un importante incremento en la producción de radical hidroxilo, suceso que puede ser relevante durante la reperfusión al interactuar el peróxido de hidrógeno resultado de la actividad de la xantina oxidasa y el hierro liberado. Lo mismo que antes, no se puede descartar que este proceso tenga relevancia en nuestro modelo de isquemia/reperfusión por ser un factor no controlado, pero dado que la superfusión se hace únicamente en una parte de la arteria que irriga el segmento intestinal sometido a isquemia/reperfusión, su relevancia se intuye como mínima si es que la tiene.

Los resultados obtenidos tras provocar la *I/R farmacológica* se muestran en las gráficas 3 y 4 (páginas 121 y 122) y en las tablas 4, 15 y 16 en anexos I y III respectivamente. De manera general, se observa que durante el periodo isquémico no hay diferencias estadísticamente significativas entre el grupo *I/R farmacológica* y el *control*, éstas sólo existen cuando se valora la diferencia en los niveles de azul de Evans durante los 20

últimos minutos de isquemia. No obstante, y sólo desde un punto de vista descriptivo hacer notar que los niveles de LDH como de azul de Evans son mayores en el grupo *I/R farmacológica* que en el *control*. Por otro lado, sí se aprecian diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos durante todo el periodo de reperfusión, destacando que los máximos niveles de LDH y azul de Evans en el líquido de perfusión se alcanzasen al minuto 4 de la reperfusión.

Así, ya se pueden anotar dos características diferenciales entre el grupo *I/R física* y el *I/R farmacológica*. La primera que la isquemia de 60 minutos es más severa en el primero que en el segundo, y la segunda que la reperfusión en el grupo *I/R farmacológica*, además de ser menos severa, la máxima alteración tarda un poco más en producirse.

El que durante la isquemia del grupo *I/R farmacológica* se observen unos niveles de LDH y azul de Evans que presentan una mayor coincidencia con el grupo control que con la isquemia física, puede poner en duda que la aplicación de noradrenalina no sea, o no se haga de la manera más adecuada. Además, en su aplicación clínica, se sabe que durante la infusión prolongada de noradrenalina, para mantener estable la presión arterial, su efecto presor puede disminuir, lo cual obliga a aumentar el ritmo de inyección. Baykal y cols.²⁹⁰ utilizan un modelo experimental en ratón para el estudio de la influencia de la tolerancia a la adrenalina en la lesión por isquemia/reperfusión, mediante la administración creciente de adrenalina intravenosa durante 5 días. Observan una menor peroxidación lipídica en el intestino delgado tras la isquemia/reperfusión y una menor afectación pulmonar, por lo que sugieren que la tolerancia a la adrenalina puede tener un efecto protector. En nuestro modelo es improbable que la administración de noradrenalina produzca una tolerancia como la que describen Baykal y cols. y, por tanto, que la menor alteración que se produce durante la reperfusión del grupo *I/R farmacológica* tenga alguna relación con el mencionado proceso.

El endotelio regula el nivel de contracción de los vasos sanguíneos⁵⁴⁵. La estimulación de las células musculares lisas con agentes que actúen sobre los receptores α_1 adrenérgicos del músculo liso de las arterias mesentéricas induce contracción, que es contrarrestada por un incremento en la síntesis y liberación de óxido nítrico por parte del endotelio¹⁹³. Un trabajo posterior¹⁹⁴ muestra que hay dos subtipos de receptores α_1 adrenérgicos y que son capaces de mediar efectos opuestos en el tono vascular en la misma preparación. Los α_{1A} -adrenoceptores median la respuesta contráctil y los α_{1D} -adrenoceptores fueron implicados en el efecto vasorelajante dependiente del endotelio. La estimulación de los α_{1D} -adrenoceptores localizados en las células endoteliales de la red vascular del mesenterio de rata con fenilefrina y noradrenalina, a concentraciones nanomolares, actúan a través de la estimulación de la fosfolipasa C, seguida por generación de inositol monofosfato y activación de la NO sintasa. El efecto relajante del

agonista α_1 depende de la capacidad del endotelio para generar óxido nítrico. La estimulación de los α_{1A} -adrenoceptores con altas concentraciones de noradrenalina producirá el efecto neto observado de vasoconstricción en el territorio superfundido con ésta. Sin embargo, en los grupos en los que se utiliza el modelo de isquemia/reperfusión farmacológica no se puede descartar que este mecanismo de contrarregulación durante el periodo isquémico sea completamente irrelevante, y sea uno de los factores de la menor severidad de la isquemia, que explicaría la diferente intensidad en la lesión por reperfusión entre el modelo físico y el farmacológico, lo cual será motivo de discusión posteriormente.

Se hace una superfusión de noradrenalina sobre un segmento arterial muy reducido a una concentración muy elevada. Pese a ello, no se puede asegurar que durante la hora que dura la isquemia ésta es total, y no se produce aunque sea durante breves instantes, aportación de oxígeno al tejido. Lo que sí se ha comprobado, quizás de una manera un poco grosera con el microscopio óptico, es que el flujo sanguíneo distal se encuentra detenido durante toda la hora.

Otro aspecto que refuerza de una manera indirecta que la vasoconstricción es efectiva, aunque sea parcialmente, sino totalmente, es que la administración de timoxamina e isoxsuprina tras una hora de superfusión de noradrenalina produce un aumento en los niveles de azul de Evans y LDH en el líquido de perfusión intestinal (gráficas 3 y 4, páginas 121 y 122), a semejanza, aunque de menor intensidad, de la isquemia/reperfusión física. Y además, con la pauta de administración XI (Tabla 3, página 156) que controla justamente el efecto de la noradrenalina, en la que se administra suero durante el tiempo que debería administrarse ésta, no se produce durante todo el tiempo que dura la experiencia un aumento en los niveles de azul de Evans y LDH respecto al grupo control (resultados no mostrados), ni siquiera durante lo últimos 30 minutos en los que se administra timoxamina e isoxsuprina. Lo cual demuestra que la vasodilatación que puedan ocasionar estas sustancias no produce un aumento en los niveles de azul de Evans y LDH en el líquido de perfusión intestinal, si no va precedida de un periodo de vasoconstricción. Lo cual está de acuerdo con la definición expresada con anterioridad de que se produce lesión por reperfusión si previamente ha existido un periodo isquémico^{283-285,261}.

El intestino denervado es capaz de autorregular el flujo sanguíneo entre un amplio rango de presiones. La reducción del flujo sanguíneo no debe por sí misma inducir lesión en el intestino. Sólo cuando el flujo sanguíneo se reduce hasta un cierto límite, se limitará el aporte de oxígeno y el tejido entrará en fase de hipoxia⁴⁵⁴. Por tanto, para que se produzca lesión por isquemia/reperfusión es necesario en primer lugar una reducción suficiente del flujo sanguíneo. Durante las reducciones moderadas de éste (menos de un 35 % de la

normalidad) de al menos dos horas, se produce un incremento compensatorio en la extracción del oxígeno, lo cual mantiene el aporte tisular del mismo en niveles normales. En este caso, no hay alteración en el aclaramiento de albúmina transmucosa durante la reperfusión. Las reducciones más severas del flujo sanguíneo producen disminuciones directamente proporcionales del aporte de oxígeno a los tejidos, y sólo cuando este último se reduce un 50 % o más, el aclaramiento transmucoso de albúmina aumenta en la reperfusión^{283,284}.

El que la reperfusión farmacológica sea menos severa que la física está en concordancia con el concepto de que la lesión por reperfusión es proporcional a la severidad de la isquemia^{267,284,450-452}. Pero no necesariamente el hecho de que la máxima alteración tarda un poco más en producirse, al cual le daríamos una explicación más metodológica. Dado que para provocar la reperfusión farmacológica se debe dejar de administrar la noradrenalina, e inmediatamente superfundir timoxamina e isoxsuprina, y sin contar lo que tarda el experimentador en este proceso (entre 5 y 10 segundos). Hemos de pensar que las sustancias administradas para inducir la reperfusión tardarán unos segundos en actuar, y esta acción, se supone, no será máxima al instante, sino progresiva para alcanzar su máximo a los pocos minutos (de 2 a 4 minutos), lo cual hace pensar que el aporte de oxígeno seguramente no es súbito al no producirse, lo más probable, una vasodilatación brusca e inmediata tras el cese de la administración de noradrenalina. Esta interpretación también podría ser válida, aunque en menor medida, para explicar que la reperfusión farmacológica sea menos severa que la física. En menor medida, porque en trabajos en los que se discute el concepto de reperfusión hipóxica^{277,325,333} o gradual³²⁵, lo son en un grado mucho mayor que en el modelo de *I/R farmacológica*, donde a los pocos minutos ya se aprecia una “vasodilatación reactiva”. Latham²⁸⁰ en 1951 ya concluye que para eliminar completamente el riesgo de la reacción paradójica del oxígeno, se debe administrar éste lentamente.

Puede añadirse la hipótesis⁵⁴⁶, confirmada posteriormente^{547,548}, que hay una excesiva pO_2 (presión parcial de oxígeno) durante la reperfusión debida a la acidez del tejido hipóxico, el efecto Bohr y la hiperemia reactiva. Además, se sabe que la acción de la xantina oxidasa, una importante fuente de especies reactivas del oxígeno, está exacerbada por una pO_2 elevada⁴³⁶. Esto también apoya que la reperfusión anóxica produzca menos lesión, y que en nuestro modelo de isquemia/reperfusión farmacológica, en la que hay una reperfusión gradual, encontremos menos lesión.

Al inicio de la reperfusión, tras la isquemia provocada por un mecanismo físico, se produce una hiperemia debido a una vasodilatación local compensatoria a la isquemia⁴⁵⁴. Se ha implicado a la histamina, péptidos vasoactivos, especies reactivas del oxígeno, óxido nítrico, adenosina, ...^{191,257,444-447,449}. Esto provoca un mayor aporte de oxígeno,

que a su vez provocará una mayor producción de especies reactivas del oxígeno, lo cual potenciará la vasodilatación. De ahí la importancia de administrar la timoxamina e isoxsuprina, no tan sólo para que deje de actuar la noradrenalina, sino para inducir una vasodilatación que se asemeje a la descrita la cual, a su vez, al inducir la producción de especies reactivas del oxígeno reducirán la vasoconstricción producida por la norepinefrina⁴⁴⁹.

Influencia de la cirugía en el modelo experimental

El intestino delgado es muy susceptible al estrés quirúrgico, aun cuando éste se produzca en localizaciones remotas. La laparotomía y la leve manipulación del intestino provocan estrés oxidativo en el epitelio intestinal unos 30-120 minutos después (alteración máxima a los 60 minutos), en forma de alteraciones estructurales, funcionales y bioquímicas reversibles en 24 horas^{549,550}, parcialmente debido a una mayor actividad de la xantina oxidasa⁵⁴⁹⁻⁵⁵¹ y una disminución de los niveles de GSH^{549,551}. Estas alteraciones pueden prevenirse con inhibidores de la xantina oxidasa como el alopurinol⁵⁵⁰, y con L-arginina⁵⁵¹.

A su vez, la manipulación quirúrgica del intestino delgado puede producir alteraciones en órganos distantes como el pulmón⁵⁵², lo cual está relacionado con el estrés oxidativo postquirúrgico que se observa en la mucosa de este órgano tras su manipulación⁵⁴⁹⁻⁵⁵¹.

No se puede descartar la influencia de la manipulación quirúrgica, ni su magnitud en el modelo experimental que aquí se presenta. A esta variable se la ha controlado con el grupo de animales sometidos al mismo procedimiento quirúrgico y manipulación intestinal (canulación y perfusión con suero salino) que los grupos a los que se les provoca isquemia sola o isquemia y reperfusión intestinal con o sin tratamiento, denominado *grupo control*.

Implicación de las especies reactivas del oxígeno e implicación del óxido nítrico en el síndrome de isquemia/reperfusión

Dada la naturaleza transitoria de las especies reactivas del oxígeno, y las dificultades inherentes en las técnicas para detectar de manera precisa los niveles de éstas, una gran mayoría de los investigadores que trabajan en este campo emplean estrategias indirectas para demostrar el papel fundamental de las mismas en las alteraciones que se asocian con la reperfusión de tejidos isquémicos. Desde el inicio se basó en la observación que la administración de sustancias que previenen la formación de especies reactivas del oxígeno o que las captan neutralizándolas, disminuían la lesión producida por la reperfusión^{46,116,142,275,278,362,384,392}, aunque hay que aclarar que si bien en algunos

modelos experimentales se ha apreciado una protección significativa, en otros estas sustancias no han tenido efecto^{273,274,279,344,368}.

Se han estudiado una gran variedad de procedimientos terapéuticos (reperusión hipóxica, reperusión gradual, oxigenación de la luz intestinal, acondicionamiento isquémico, hipertermia preisquémica, piruvato intraluminal, crear tolerancia a las catecolaminas)^{290,325,333,421,511,513,514,529,530,541,542} y agentes farmacológicos (referencias 46, 96, 140, 248, 257, 276, 283, 287, 302, 304, 305, 312, 359, 373, 374, 377, 379, 385, 386, 389, 392, 394, 409, 453, 456, 485-487, 540, 553-556) en un intento de preservar a los tejidos de la disfunción y/o lesión que tiene lugar después de la reperusión que sigue a la isquemia. Estos fármacos son de estructura química diversa y tienen una gran variedad de mecanismos de acción.

Se pueden clasificar de una manera general como sustancias que reemplazan o proporcionan agentes citoprotectores (por ejemplo la L-arginina en el caso del óxido nítrico); sustancias que inhiben o bloquean, o bien la producción de agentes proinflamatorios, o bien a estos últimos directamente (por ejemplo el alopurinol en la primera situación y la superóxido dismutasa en la segunda, en el caso del radical superóxido); y sustancias inhibitoras de la acción de los neutrófilos y sus mediadores.

Las estrategias utilizadas en este trabajo para demostrar la implicación de las especies reactivas del oxígeno, y el óxido nítrico, en el síndrome de isquemia/reperusión mediado farmacológicamente fueron inhibir la xantina oxidasa por el alopurinol, eliminar el radical superóxido mediante la administración de superóxido dismutasa (Ontosein[®]: orgoteina), eliminar el peróxido de hidrógeno mediante la administración de catalasa, la administración de L-arginina para incrementar la formación de óxido nítrico, y administrar N^G-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) para inhibir su síntesis.

Se trata de valorar el efecto de estos fármacos en el modelo experimental de referencia *I/R física* en el intestino delgado de rata, y compararlo con el modelo experimental *I/R farmacológica*.

Aunque se implica al radical hidroxilo como uno de los agentes principales que en última instancia intervienen en la lesión tisular dependiente de la isquemia/reperusión^{276,295,373,394}, en este trabajo no se utiliza alguna sustancia que lo elimine. Debido a su gran reactividad y su indiscriminada actividad, en un modelo como el que se presenta: *in vivo* y con el animal entero, muestra *a priori* una gran dificultad para que este tratamiento fuese eficaz⁷⁵, el eliminador debe estar presente a una gran concentración, representando una gran proporción de las moléculas presentes en el lugar donde se produzca el radical hidroxilo¹⁴⁰. Por ello la estrategia utilizada fue la de eliminar los

precursores del radical hidroxilo, el radical superóxido y el peróxido de hidrógeno, o incrementar la formación de óxido nítrico para eliminar los efectos perniciosos derivados del peroxinitrito, y para que reaccione directamente con el radical hidroxilo eliminando su toxicidad, lo cual por otro lado podría considerarse como la estrategia utilizada para eliminar el radical hidroxilo.

Tratamiento con alopurinol

La administración de alopurinol disminuye la lesión tisular tras la isquemia/reperfusión en una gran variedad de modelos tanto *in vitro*^{296,368,384,431} como *in vivo*^{142,257,275,276,316,355,385,386,388,389,391,492}. Estos efectos beneficiosos han proporcionado poderosas evidencias que implican a la xantina oxidasa como fuente de especies reactivas del oxígeno en los tejidos isquémicos. Surgió la cuestión de si los efectos del alopurinol pueden no estar relacionada con su capacidad para inhibir la xantina oxidasa^{557,558}.

En un trabajo publicado en 1986, Biemond y cols.¹³⁴ comprueban que la xantina oxidasa es capaz de movilizar el hierro desde la ferritina, tanto en condiciones aeróbicas (aunque en este caso el radical superóxido representa el 70 % del mecanismo) como anaeróbicas. Apuntan que la liberación de hierro desde la ferritina ya se produce durante la isquemia por un mecanismo independiente del radical superóxido, el cual catalizaría la formación de radical hidroxilo desde el anión superóxido producido por la xantina oxidasa en la reperfusión. Sugieren que la inhibición de la liberación del hierro desde la ferritina es también un efecto importante del tratamiento con alopurinol.

Posteriormente, Hernández y cols.³⁹⁴ comprueban la importancia del hierro en la patogenia de la lesión por reperfusión. Basándose en que la incorporación del hierro a la transferrina de la mucosa está catalizado por la xantina oxidasa¹³⁸ mediante una actividad ferroxidasa susceptible de ser completamente abolida por el alopurinol¹³⁷, la cual parece implicar a los grupos prostéticos del enzima más que al radical superóxido y peróxido de hidrógeno generados en la reoxidación de la misma, también apuntan la posibilidad de que la protección deparada por el alopurinol puede estar directamente relacionada, más a las alteraciones en la disponibilidad de hierro mediadas por la xantina oxidasa, que a la producción de especies reactivas del oxígeno mediante este enzima.

El peróxido de hidrógeno producido por la xantina oxidasa, a su vez puede promover la reacción de Fenton al liberar hierro de la hemoglobina⁵⁵⁹.

Otros trabajos^{125,560-562} han sugerido que los efectos beneficiosos del alopurinol en modelos de isquemia/reperfusión, pueden deberse a la propiedad de éste para captar radicales libres más que por su capacidad para inhibir la xantina oxidasa.

El alopurinol y su principal metabolito activo, el oxipurinol, pueden captar de manera no específica el radical hidroxilo *in vitro*⁵⁶². Además, capta al radical superóxido⁵⁶⁰ y al ácido hipocloroso, un oxidante derivado de los neutrófilos que también ha sido implicado en la lesión microvascular asociada a la isquemia/reperfusión^{125,561}.

La mayor parte de las pruebas respecto a su capacidad de eliminador de especies reactivas del oxígeno provienen de observaciones en modelos no biológicos e *in vitro*. Además, la concentración de alopurinol en estos experimentos exceden los niveles terapéuticos en el suero en varios ordenes de magnitud³⁸⁷. Así, la actividad eliminadora de radical hidroxilo observada por Moorhouse y cols.⁵⁶², por ejemplo, requiere concentraciones de alopurinol que excedan de 0.5 mM, y en el caso de Faure y cols.⁵⁶³ que también sugieren una actividad antioxidante directa del alopurinol, las concentraciones alcanzadas en su modelo experimental son de 2.0 mM, más de 100 veces las concentraciones séricas obtenidas tras aplicar una pauta de administración de alopurinol clásica en modelos de isquemia/reperfusión *in vivo*^{387,390}. Peterson y cols.⁵⁶⁰ observan que la capacidad del alopurinol para actuar como eliminador de radical superóxido *in vitro* sólo es mínimamente efectiva a altas concentraciones (9 mM), algo que no consiguen Terada y cols.⁴³¹ con concentraciones de alopurinol 100 µM. Das y cols.⁵⁶¹ en su estudio *in vitro* en el que examinan la capacidad del alopurinol y el oxipurinol para captar radicales libres, observan que son incapaces de eliminar radical superóxido y radical hidroxilo a la concentración 1 µM. Sin embargo, sí es efectiva con el ácido hipocloroso, aunque a más bajas concentraciones no tiene esta propiedad.

Zimmerman y cols.³⁸⁷ al aplicar las pautas de administración y dosis de alopurinol empleadas en estudios clásicos *in vivo* de isquemia/reperfusión, en los que las especies reactivas del oxígeno median la lesión, muestran como no se alcanzan en suero ni en el líquido intersticial (entre 10 y 20 µM de alopurinol/oxipurinol) niveles suficientes para captar el radical hidroxilo *in vitro*. Sin embargo, sí lo son para inhibir la actividad catalítica de la xantina oxidasa.

Con el trabajo de Klein y cols.³⁹⁰, cuyo objetivo fue diferenciar cuantitativamente entre las actividades del alopurinol: inhibitoria sobre la xantina oxidasa, de la de eliminador de especies reactivas del oxígeno, tanto *in vitro* como *in vivo*, se zanja definitivamente la cuestión al concluir que la acción principal de este fármaco administrado a ratas por vía oral a las dosis de entre 2 y 100 mg · kg⁻¹ · día⁻¹ durante 2 días consecutivos, es la inhibición de la xantina oxidasa de modo dosis dependiente, y no se aprecia actividad antioxidante

alguna. En este mismo trabajo³⁹⁰ se cita una comunicación personal de Irwin Fridovich en donde apunta que: “en los sistemas biológicos, en los que hay una enorme cantidad de dianas orgánicas endógenas para las especies reactivas del oxígeno, la alta reactividad y el corto radio de acción de por ejemplo el radical hidroxilo, hace casi improbable la reacción con un eliminador débil como el alopurinol. Esta es la razón por la que un antioxidante potente como el manitol debe darse a muy altas concentraciones para que sea efectivo”.

Por tanto, lo más probable es que en nuestro modelo experimental el efecto del alopurinol sea debido a la inactivación de la xantina oxidasa, más que a la captación directa de oxidantes derivados de ella como el radical superóxido o el radical hidroxilo. Sin embargo, por lo expuesto anteriormente no se puede descartar que en nuestro modelo además de inhibir a la xantina oxidasa con este tratamiento se capte el ácido hipocloroso derivado de los neutrófilos activados.

Se ha sugerido que el efecto beneficioso del alopurinol, además de inhibir la xantina oxidasa, puede implicar la preservación de la integridad mitocondrial tras administrarlo a altas dosis, aunque el mecanismo exacto de esta protección no está aclarado⁵⁶⁴.

También se ha demostrado que el alopurinol actúa como un agente transportador de electrones, sugiriendo que el efecto beneficioso en modelos de isquemia/reperfusión puede ser debido al posibilitar el transporte electrónico durante la reperfusión⁵⁶⁰. Sin embargo, su efectividad depende también de la concentración, y la mínima que se requiere es de 1 mM³⁸⁷.

Basándose en que durante la isquemia/reperfusión tisular la disponibilidad de metales catalíticamente activos, como el ion férrico, se incrementa por movilización desde sus ubicaciones celulares, lo cual amplificará el daño tisular al generarse más especies reactivas del oxígeno. Ko y Godin⁵⁶⁵ llevan a cabo un estudio en el que sugieren que en la protección ejercida por el alopurinol y el oxipurinol es relevante su acción como quelante de los metales de transición, aunque ellos mismos reconocen que esta acción es efectiva a concentraciones muy superiores a las utilizadas normalmente como tratamiento preventivo en la isquemia/reperfusión.

También se ha postulado en algunos trabajos que el tratamiento con alopurinol protegía de la lesión isquémica por preservar el *pool* de nucleótidos, atenuando la reducción de los niveles de ATP que normalmente se observa en los tejidos en estas condiciones (la transformación de hipoxantina a xantina, que es inhibida por el alopurinol, es el primer paso irreversible en su degradación). O sea, una explicación alternativa de los efectos beneficiosos de este tratamiento, era la conservación de la energía rica en fosfatos. Sin embargo, el mantenimiento de esta energía por medio de la infusión continua de inosina,

no tiene un efecto protector de la lesión por reperfusión³¹⁰. Además, Morris y cols.³⁸⁶ muestran en un modelo de isquemia/reperfusión en intestino *in vitro*, que la administración de alopurinol poco antes de la reperfusión es efectivo como tratamiento preventivo contra este tipo de lesión, lo cual es una prueba muy sólida en contra de que actúe sólo preservando las purinas durante el periodo isquémico. Por tanto, es poco probable que preservar las purinas por medio del alopurinol sea trascendental en prevenir el desarrollo de lesiones postisquémicas, y se refuerza el concepto de que la generación de especies reactivas del oxígeno por parte de la xantina oxidasa es un importante mediador de la lesión postisquémica ya que la inhibición competitiva de la xantina oxidasa por parte del alopurinol disminuye la generación de especies reactivas del oxígeno.

La xantina oxidoreductasa tiene la capacidad de catalizar la reducción de los nitratos y nitritos a óxido nítrico en presencia de NADH bajo condiciones de hipoxia. Esto, junto con la localización vascular del enzima, sugiere que la xantina oxidoreductasa puede contribuir como fuente de óxido nítrico a partir de nitratos y nitritos endógenos en condiciones isquémicas, situaciones en las que la NO sintasa no es efectiva⁴¹⁶. El hecho de que los grupos pretratados con alopurinol en ambos modelos experimentales (gráficas 5 y 7, páginas 125 y 129; y tablas 6 y 7 del anexo I, páginas 230 y 231) presenten unos niveles mayores de LDH durante la fase isquemia, respecto a los grupos tratados con superóxido dismutasa, podría deberse al menos en parte a este hecho, teniendo en cuenta que en nuestro modelo experimental la actividad del óxido nítrico ha mostrado ser beneficiosa (ver más adelante la discusión sobre la administración de L-arginina).

Granger y cols.³⁸⁵ proporcionan un respaldo adicional a la participación de la xantina oxidasa en la isquemia/reperfusión al utilizar un inhibidor diferente de la misma como es el pterin aldehído.

El alopurinol, además de prevenir la lesión mediada por las especies reactivas del oxígeno derivadas de la xantina oxidasa tras la isquemia/reperfusión intestinal, previene la liberación de endotelina, aunque no está claro que el mecanismo sea de manera directa o secundaria a la inhibición de las especies reactivas del oxígeno⁴⁹².

También se ha sugerido que puede tener un efecto indirecto incrementando las concentraciones de adenosina, la cual es un potente vasodilatador³⁹¹.

Análisis de los resultados del tratamiento con alopurinol

Nuestros resultados muestran que la inhibición de la xantina oxidasa por el alopurinol es menos efectiva que la superóxido dismutasa en prevenir la lesión tisular (valorado por

los niveles de LDH en el líquido de perfusión) durante la isquemia, tanto en el modelo de *I/R física* como *I/R farmacológica* (gráficas 5 y 7, páginas 125 y 129; tablas 17, 19, 27 y 29 en anexo IV). Lo cual podría deberse a que, además del superóxido derivado de la xantina oxidasa, pueden haber otras fuentes del mismo implicadas en la lesión tisular durante el periodo isquémico, como el derivado de la NADPH oxidasa endotelial, o el derivado de la cadena de transporte electrónico mitocondrial^{24-27,51}. Sin embargo, el alopurinol es algo más efectivo en evitar una mayor magnitud en el aclaramiento de azul de Evans (gráficas 6 y 8, páginas 127 y 131; tablas 18, 20, 28 y 30 en anexo IV), aunque esto durante la fase isquémica es poco relevante, o como mínimo difícil de interpretar, si se entiende por aclaramiento como un incremento de la permeabilidad vascular y/o mucosa, ya que durante la fase isquémica, en ambos modelos experimentales, la irrigación vascular se encuentra detenida.

Los resultados del presente trabajo muestran que el tratamiento con alopurinol proporciona una protección significativa de la lesión por reperfusión en los modelos de *I/R física* e *I/R farmacológica*, valorándolo tanto como una menor permeabilidad de la mucosa intestinal al azul de Evans, como una menor liberación de LDH intracelular (lesión tisular) (gráficas 5 a 8, páginas 125 a 131; tablas 17, 18, 27 y 28 en anexo IV).

La inhibición de la xantina oxidasa por el alopurinol es casi tan efectiva como la superóxido dismutasa en prevenir el daño tisular (valorado por la LDH) tras la reperfusión del intestino isquémico. Sin embargo, es más efectivo en evitar una mayor magnitud en el incremento de permeabilidad de la mucosa intestinal (valorado por el aclaramiento de azul de Evans), lo cual corrobora el papel de la xantina oxidasa y las especies reactivas del oxígeno derivadas de ella en este proceso^{46,276,385}.

El tratamiento con alopurinol (50 mg/kg cada 12 horas los dos días anteriores y 100 mg/kg el mismo día de la experiencia 2 horas antes de la misma) en los modelos experimentales de *I/R física* e *I/R farmacológica*, no proporcionan una completa protección contra la lesión (gráficas 5 a 8, páginas 125 a 131; tablas 17, 18, 27 y 28 en anexo IV). La xantina oxidoreductasa también posee una actividad NADH oxidasa que no se inhibe con alopurinol, y de la cual derivan especies reactivas del oxígeno. Esto puede explicar que no se alcance una protección completa, al no inhibir todas las actividades de la xantina oxidoreductasa⁴²³. La lesión, además, puede estar mediada por: factores diferentes a las especies reactivas del oxígeno derivadas de la xantina oxidasa; y/o que la pauta de administración y la dosis no esté lo suficientemente ajustada, y no se alcancen concentraciones suficientes en el lugar requerido; y que parte de la lesión observada durante la reperfusión se debe considerar corresponde al periodo de isquemia.

Lo que sí podemos concluir basándonos en nuestros datos es que el alopurinol, al inhibir la xantina oxidasa, localizada en la mucosa del intestino delgado, en el endotelio vascular y/o circulando en el torrente sanguíneo, protege en la misma proporción en los dos modelos de isquemia/reperfusión utilizados en éste trabajo (gráficas 13 y 14, página 139).

Una faceta no estudiada la plantea Saugstad³⁹¹ haciéndose la siguiente pregunta: ¿es el alopurinol un fármaco inocuo? Debe recordarse que reduce drásticamente las concentraciones de ácido úrico, y dado que éste es un antioxidante importante en el medio extracelular^{92,124}, surge la duda de si puede ser pernicioso. Más si cabe, al haber sido directamente implicado en la protección contra la lesión por reperfusión inducida por los granulocitos activados, y preservando las funciones del endotelio ante la lesión oxidativa¹²⁶. Nuestro protocolo experimental no puede responder a esta pregunta, pero si el tratamiento que se lleva a cabo con alopurinol fuese perjudicial en este aspecto, por someter a isquemia/reperfusión a un grupo de ratas presuntamente con las defensas antioxidantes extracelulares disminuidas, desde luego queda compensado por el beneficio que promueve: una menor lesión en el momento de la reperfusión. Además, creemos que es una cuestión relevante sobre todo en humanos y no en nuestro modelo experimental en rata, ya que el nivel en sangre de ácido úrico en humanos está alrededor de los 5 mg/100 ml como media, cerca del nivel de solubilidad, mientras que la mayoría de mamíferos, incluida la rata, tienen niveles inferiores a 0,5 mg/100 ml¹²⁴.

Por último, un aspecto no estudiado en el presente trabajo es el tratamiento tras la isquemia/reperfusión, el cual posiblemente tenga un mecanismo de acción diferente al tratamiento preventivo empleado aquí³⁵⁵.

Tratamientos con superóxido dismutasa (Ontosein®: orgoteina) y catalasa

El radical superóxido está implicado en la disfunción microvascular y lesión de las células parenquimatosas que se observa tras la reperfusión de los tejidos isquémicos, incluyendo el intestino delgado^{46,65,265,275,278}.

En condiciones normales la superóxido dismutasa elimina al radical superóxido. Sin embargo, si los niveles del enzima se encuentran disminuidos debido a la lesión isquémica, o no pueden hacer frente a una mayor producción durante la reperfusión, el radical superóxido puede alcanzar niveles tóxicos. Algo parecido sucede con el peróxido de hidrógeno derivado directamente de la xantina oxidasa y de la reducción del superóxido durante la reperfusión.

Ya que la superóxido dismutasa y la catalasa endógenas, aparentemente son insuficientes para proteger contra la producción masiva de especies reactivas del oxígeno tras la reoxigenación de los tejidos (gráficas 3 y 4, páginas 121 y 122; tabla 4, del anexo I; y tablas 13 a 16 en anexo III), se pueden emplear superóxido dismutasa y/o catalasa exógenas para combatir su efecto nocivo, administrándolas por vía intravenosa. Estas no tan sólo protegerían el espacio extracelular, sino también el espacio intersticial, y como sugiere Chudej y cols. el espacio intracelular⁵⁶⁶, al cual accederían por endocitosis⁵⁶⁷.

En 1971 los diferentes preparados que contenían Cu,Zn-SOD fueron clasificados genéricamente con el nombre de orgoteina (Ontosein[®]), un efectivo antiinflamatorio sin propiedades analgésicas ni antipiréticas, pero capaz de neutralizar el radical superóxido^{568,569}. Esta sustancia fue identificada y subsiguientemente investigada toxicológica y farmacológicamente por Huber y cols., años antes que McCord y Fridovich publicaran el hallazgo de una función enzimática para la eritrocupreína que resultaba esencial para el metabolismo intracelular del oxígeno, a la cual denominaron superóxido dismutasa^{104,570}. Al comparar ambos compuestos se demostró que eran idénticos.

La superóxido dismutasa ha mostrado su utilidad, desde hace más de 25 años, como agente terapéutico al limitar la lesión por reperfusión (reoxigenación) tras la isquemia (anoxia o hipoxia) en una amplia variedad de tejidos tanto *in vivo* (corazón^{116,301,566,571}, estómago³²⁶⁻³²⁸, hígado^{143,335,336,567,572}, intestino^{46,142,275,278,316,362,458}, músculo esquelético^{332,334}, sistema nervioso^{354,356-358}, pulmón^{329,330}, etc.), como *in vitro*^{117,367,384,393,458}, aunque su eficacia se ha puesto en duda en diferentes modelos experimentales^{273,274,279,344,368}. Modelos experimentales en animales con una deficiencia genética de Cu,Zn-SOD o EC-SOD, que les hace más susceptibles a la lesión por isquemia/reperfusión. Todo lo contrario ocurre con la utilización de animales transgénicos (mutantes) que en condiciones normales poseen una mayor cantidad de superóxido dismutasa, los cuales están mejor protegidos contra la mencionada lesión^{378,395,396}. Asimismo, la catalasa también ha sido empleada ampliamente como agente protector contra la lesión por reperfusión en muchos tipos de experimentos (referencias 116, 117, 273, 287, 301, 326, 327, 330, 332, 344, 359, 367, 373, 384, 392, 459, 465), y lo mismo que con la superóxido dismutasa, en algunos modelos se ha observado una protección significativa, mientras que en otros no ha tenido efecto^{368,273}. Esta gran variabilidad se debe al empleo de una gran diversidad de marcadores de la isquemia (liberación de productos bioquímicos de lesión celular, preservación o no de la función fisiológica, histología, producción de productos derivados de la oxidación, ...), diferentes especies, órganos, modelos experimentales (*in vitro*, *in vivo*, ...), diferentes tipos de isquemia (método, duración, severidad), pautas de administración, etc.

Consideraciones sobre la pauta de administración de la superóxido dismutasa y catalasa

Las pautas de administración de superóxido dismutasa y catalasa utilizadas (ver capítulo Metodología, página 110), lo fueron tras un proceso de selección entre un amplio grupo de ellas (datos no presentados).

Mientras los niveles plasmáticos de superóxido dismutasa y catalasa proporcionan una estimación significativa de la concentración de estos enzimas en las proximidades del endotelio vascular cuando se administran por vía intravenosa, estas mediciones sobreestiman su actividad en el líquido intersticial que baña las células parenquimatosas debido a las propiedades de filtro de la pared vascular. Así, estas macromoléculas deben atravesar la pared capilar, la membrana basal y el líquido intersticial, para alcanzar el parénquima. En condiciones normales, los capilares restringen el movimiento de las macromoléculas en función de su tamaño, – superóxido dismutasa 25 Å (2.5 nm) y catalasa 48 Å (4.8 nm) ⁻⁵⁷³, y de su carga – las moléculas cargadas positivamente se equilibran mucho más rápido que las cargadas negativamente ⁻⁵⁷¹, requiriendo por tanto, un determinado periodo de tiempo para conseguir concentraciones efectivas en el líquido intersticial que baña las células parenquimatosas.

Se ha observado que una hora de isquemia no aumenta la capacidad de la Cu,Zn-SOD para atravesar la barrera endotelial, no alterando en esencia su cinética⁵⁷¹, ya sea porque la isquemia no afecta el tamaño de los poros pequeños en el intestino delgado, y/o porque la superóxido dismutasa protege los capilares, y puede prevenir una mayor permeabilidad a las macromoléculas durante la reperfusión, incluyendo ella misma.

Dado que las especies del oxígeno son muy reactivas, tienen una distancia de difusión muy corta. Por ello, las sustancias protectoras deben encontrarse en lugares cercanos a los de su producción. Hay una correlación positiva entre el efecto protector de la superóxido dismutasa y la concentración en el intersticio⁵⁷¹.

Estas consideraciones cuestionan las administraciones hechas sólo minutos antes de valorar la eficacia de éstos agentes en la modulación de la función de la célula del parénquima presuntamente alterada. En nuestro modelo equivaldría a administrarlas instantes antes de la reperfusión. De hecho, las pruebas previas realizadas con pautas de administración en las que la superóxido dismutasa se suministró inmediatamente antes y durante los primeros momentos de la reperfusión, son menos efectivas que aquellas en las que la administración se inició antes, y dentro de estas últimas, se obtuvo un mejor resultado cuanto antes se hizo (datos no mostrados).

Otro aspecto a tener en cuenta a la hora de decidir el tipo de administración es la vida media tan corta de la superóxido dismutasa (6-8 minutos), la cual se elimina rápidamente por el riñón, y de la catalasa (20-23 minutos), tras la administración intravenosa de ambas^{568,569,574}. Esto ha motivado que se hayan utilizado diferentes estrategias para alargarla⁵⁷⁵, tales como ligar los pedículos renales para evitar su eliminación^{46,142,275,312,316,573}; incrementar su peso molecular uniéndolas a moléculas como el polietilenglicol^{356,576}, a la albúmina^{143,577}, etc. (lo que adicionalmente las hace más eficientes por diversas consideraciones discutidas por Beckman y cols.⁵⁷⁶, y Wong y cols.⁵⁷⁷); administrarla en liposomas^{354,572,574,578,579}, lo que en éste último caso además facilitará el acceso al interior de las células⁵⁸⁰, pero tiene el inconveniente de que el inicio de su acción es lento⁵⁷⁹.

Por todo ello y, además, propiciar la llegada de ambas enzimas al espacio intersticial^{571,573} e intracelular^{566,567} y evitar el inconveniente de sus vidas media plasmática tan cortas, se decidió finalmente administrarlas en perfusión continua por vía intravenosa 60 minutos antes de la isquemia (o lo que es lo mismo 120 minutos antes de la reperfusión) hasta el minuto 5 de la reperfusión. Como se ha comentado previamente, las pautas de administración utilizadas en las que se perfunde superóxido dismutasa o catalasa durante un mayor periodo de tiempo antes de la reperfusión (está en consonancia con el trabajo de Omar y McCord⁵⁷¹), fueron las más efectivas por haber dado a los fármacos la posibilidad de alcanzar una concentración terapéutica en el líquido intersticial, y quizás en el espacio intracelular, lo cual también está en sintonía con las observaciones de Horie y cols.³⁹⁵, que indican que una elevada actividad superóxido dismutasa intracelular (unas tres veces mayor) es más efectiva, protegiendo de los efectos perniciosos de la isquemia/reperfusión, que un incremento agudo de dicha actividad en el espacio extracelular.

En modelos de anoxia/reoxigenación *in vitro* también hay datos contradictorios, Lum y cols.¹¹⁷ observan mayor efectividad cuando ambas enzimas se administran durante todo el periodo anóxico, mientras que Ratych y cols.³⁸⁴ indican que encuentran la misma efectividad cuando administran ambas enzimas en combinación durante todo el periodo anóxico, o justo antes de la reoxigenación.

Muchos estudios que han aparecido en la literatura utilizan protocolos de administración con una única dosis, que además suele ser muy alta. Como se ha comentado, en el presente trabajo se probaron diversas pautas y dosis (resultados no mostrados), indicando que el efecto de la superóxido dismutasa en la lesión por reperfusión es variable, y depende de la dosis y de la pauta de administración. Esto también ha sido observado por Bernier y cols.¹¹⁶. Estamos de acuerdo con He y cols.³⁵⁶ y Nelson y cols.⁶⁷, que el rango de la dosis efectiva de la superóxido dismutasa es bastante estrecho

y que además la curva dosis respuesta muestra una forma de campana. Este efecto también ha sido comprobado *in vitro* por Lum y cols.¹¹⁷.

Una explicación sobre los efectos potencialmente nocivos de la excesiva cantidad de superóxido dismutasa fue supuesta por Omar y cols.⁶⁸ y confirmada por Nelson y cols.⁶⁷. El radical superóxido puede actuar tanto como iniciador de la peroxidación lipídica (indirectamente, por la liberación y/o reducción de hierro¹³³⁻¹³⁵), como finalizador de la misma, de manera que la captación excesiva de esta especie reactiva del oxígeno por altas concentraciones de superóxido dismutasa, puede incrementarla. McCord recuerda en un trabajo de revisión⁸¹, además de lo anterior, que el radical superóxido parece tener tareas importantes en otros aspectos del metabolismo celular normal como participar en la comunicación como transmisor de señales, y como una molécula que puede afectar la concentración de óxido nítrico, otro radical libre con un importante papel regulador en el mantenimiento de la homeostasis.

Por tanto, la excesiva producción de radical superóxido es mala, pero la completa eliminación puede ser peor. Esto subraya la importancia del equilibrio entre oxidantes y antioxidantes.

Otro efecto potencialmente nocivo que también se ha implicado como causa de los efectos perniciosos de la excesiva cantidad de superóxido dismutasa, es una mayor producción de peróxido de hidrógeno (reacción 25, página 28). El cual por un lado puede inhibir la Cu,Zn-SOD reduciendo el Cu^{++} a Cu^+ (ref. 119); y por otro ser precursor del muy tóxico radical hidroxilo (reacción 7, página 8)³²⁻³⁴. Si hay grandes cantidades de Fe^{2+} se puede producir mayor cantidad de radical hidroxilo. La hidroxilación podría inhibirse eliminando el peróxido de hidrógeno. Sin embargo, la superóxido dismutasa no la inhibiría, ya que ésta al catalizar la dismutación del radical superóxido principalmente incrementa el suministro de peróxido de hidrógeno, necesario para la reacción de Fenton. No obstante, los resultados de Omar y McCord⁵⁸¹ muestran que es improbable que el peróxido de hidrógeno sea la causa de la exacerbación de la lesión observada tras administrar altas dosis de superóxido dismutasa.

A diferencia de la Mn-SOD, la Cu,Zn-SOD puede generar radical hidroxilo¹¹⁵ desde peróxido de hidrógeno, a pesar de la baja afinidad del enzima por éste a pH fisiológico, lo cual podría explicar, al menos en parte, el daño biológico asociado con una actividad elevada de éste enzima.

Además, se ha descrito una débil e inespecífica actividad peroxidasa de la Cu,Zn-SOD¹¹³, que puede tener efectos perniciosos para las células por catalizar la formación de radicales libres usando eliminadores aniónicos y peróxido de hidrógeno como

substratos¹¹⁴. Omar y McCord⁵⁸¹ muestran que la pérdida de protección a altas dosis de Cu,Zn-SOD es improbable que sólo sea debida a la actividad peroxidasa del enzima.

La curva dosis respuesta de la superóxido dismutasa en forma de campana argumenta que para unas determinadas condiciones hay una única concentración protectora óptima de superóxido dismutasa. Todas estas consideraciones permiten hacer hincapié en la mencionada variabilidad de los resultados de la multitud de tratamientos llevados a cabo con superóxido dismutasa en numerosos trabajos. Los modelos experimentales utilizados, al ser en muchos casos diferentes, con la consiguiente producción de radical superóxido también distinta (velocidad, cantidad), difícilmente pueden justificar, como se ha hecho en múltiples estudios publicados, una única dosis estándar de superóxido dismutasa, generalmente bastante grande.

Otro factor a tener en cuenta para interpretar los diferentes efectos de la superóxido dismutasa dentro de la literatura, pueden ser las distintas preparaciones de la misma, con purezas, actividades enzimáticas y propiedades químicas variables⁵⁷⁹.

Lo mismo que con la superóxido dismutasa, una gran cantidad de estudios utilizan un protocolo de administración de catalasa que generalmente es una administración única. En el presente trabajo se probaron diferentes pautas de administración y dosis (resultados no mostrados). Apuntar que, al igual que Bernier y cols.¹¹⁶, también observamos que la administración de catalasa presenta un efecto dosis dependiente, una dosis/respuesta relativamente lineal.

Nuestros resultados indican que el efecto de la catalasa en la lesión por reperfusión es variable, y aunque es poco efectiva, depende de la dosis y de la pauta de administración.

El efecto de la superóxido dismutasa y la catalasa también se controló mediante un grupo de animales a los que se le somete a isquemia/reperfusión, y se les administra suero salino 0,9 % desde 60 minutos antes de la isquemia hasta el minuto 5 de la reperfusión. No se produce una mejora respecto al grupo de referencia de isquemia/reperfusión (resultados no mostrados).

Análisis de los resultados del tratamiento con SOD

Los resultados del presente trabajo muestran que el tratamiento con superóxido dismutasa proporciona una protección significativa de la lesión por reperfusión en los modelos de *I/R física* e *I/R farmacológica*, valorándolo tanto como una menor permeabilidad de la mucosa intestinal al azul de Evans, como una menor liberación de LDH intracelular (lesión tisular) (gráficas 5 a 8, páginas 125 a 131; tablas 19, 20, 29 y 30 en anexo IV).

El tratamiento con superóxido dismutasa, en ambos modelos experimentales, reduce de manera muy significativa los niveles de LDH (lesión celular) en toda la reperfusión. La permeabilidad vascular y mucosa al azul de Evans se reduce significativamente hasta el minuto 12 de la reperfusión, lo que implica al radical superóxido como mediador de la lesión en los primeros minutos de la reperfusión, lo cual está en sintonía con que las especies reactivas del oxígeno son un factor principal en los cambios de permeabilidad vascular y mucosa asociados con la isquemia intestinal^{46,48,117}.

El tratamiento con superóxido dismutasa (perfusión por vía intravenosa continua de $1.000 \text{ U} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{hora}^{-1}$, desde 60 minutos antes de provocar la isquemia hasta el minuto 5 de la reperfusión) en los modelos experimentales de *I/R física* e *I/R farmacológica*, no proporcionan una completa protección contra la lesión (gráficas 5 a 8, tablas 19, 20, 29 y 30). Además, ésta puede estar mediada por otras especies reactivas del oxígeno diferentes al radical superóxido, otros factores; y/o que la pauta de administración y la dosis no se haya ajustado lo suficiente, y no se alcancen concentraciones suficientes en el lugar requerido; y que parte de la lesión observada durante la reperfusión se debe considerar corresponde al periodo de isquemia.

Basándonos en nuestros resultados, se puede concluir que la superóxido dismutasa al eliminar el radical superóxido generado durante la isquemia y fundamentalmente durante la reperfusión, protege en la misma proporción en los dos modelos de isquemia/reperfusión utilizados en este trabajo (gráficas 15 y 16, página 140).

Adicionales efectos beneficiosos de la superóxido dismutasa son: al eliminar el exceso de radical superóxido evita el que éste pueda movilizar el hierro almacenado en la ferritina^{133,134}; otro puede deberse a la capacidad para estabilizar las membranas celulares incluida la de los leucocitos⁵⁶⁹.

Otro aspecto beneficioso a considerar es el sinergismo entre la superóxido dismutasa y el óxido nítrico. En situaciones en las que se produce excesiva cantidad de radical superóxido, la reacción entre ambos da como resultado la formación de anión peroxinitrito^{37,69,213,214} y especies reactivas derivadas del mismo^{37,69,70,228}. Durante la reperfusión del intestino isquémico la superóxido dismutasa elimina el exceso de superóxido, ocasionando que el óxido nítrico pueda predominar sobre aquel. Cuando hay 2 o 3 veces más óxido nítrico que radical superóxido, el primero actúa como un mecanismo de defensa antioxidante aboliendo las acciones del peroxinitrito y de las especies reactivas derivadas del mismo²²⁶. El radical superóxido, además de producir peroxinitrito al interactuar con el óxido nítrico, provocará alteraciones derivadas de la destrucción de este último.

Apuntar además que, la Cu,Zn-SOD prolonga los efectos del óxido nítrico, principalmente por catalizar la dismutación del radical superóxido, aunque se la ha implicado en un segundo mecanismo independiente del anterior. La administración de superóxido dismutasa aparentemente mejora la generación de óxido nítrico desde la L-arginina sin afectar la producción de L-citrulina, por lo que incrementaría la generación de óxido nítrico promoviendo la oxidación de una especie intermedia como el nitroxilo^{178,215,216}.

Análisis de los resultados del tratamiento con catalasa

Aunque se advierte que el tratamiento con catalasa en el modelo de *I/R física* tiende a producir protección de la lesión por reperfusión al valorar los niveles de LDH, ésta sólo es significativa en diferentes momentos de este periodo. Igualmente, al evaluar la permeabilidad vascular y mucosa, medida por la densidad óptica de azul de Evans en el líquido de perfusión intestinal, ésta sólo disminuye de manera significativa durante los primeros 4 minutos de la reperfusión respecto al grupo de referencia *I/R física*. Esto indica que la catalasa, la cual actúa sobre todo cuando las concentraciones de peróxido de hidrógeno son altas²⁸, prevendría en mayor o menor medida la toxicidad mediada por éste, y la formación de radical hidroxilo⁴³⁵. Y de manera indirecta, ya que el peróxido de hidrógeno producido por la xantina oxidasa, a su vez puede promover la reacción de Fenton al liberar hierro de la hemoglobina⁵⁵⁹.

Con todo, igual que ocurre con el grupo *I/R farmacológica tratado con catalasa*, el grupo *I/R física tratado con catalasa* globalmente no muestran diferencias estadísticamente significativas respecto a sus grupos de referencia, en ninguno de los parámetros estudiados.

El que la catalasa no haya producido una disminución en los niveles de LDH y azul de Evans, como lo ha hecho el alopurinol o la superóxido dismutasa, puede deberse a que por un lado el peróxido de hidrógeno es poco reactivo y oxida lentamente, y por otro, cuando se empieza a producir, el radical superóxido, que es la primera especie reactiva del oxígeno que se origina, ya ha tenido tiempo de efectuar su acción dañina. También es lógico pensar que al contrario de lo que pueda suceder *in vitro*, donde casi todo el radical superóxido puede dismutar a peróxido de hidrógeno con pocas o ninguna “interferencia”, en un modelo *in vivo* el radical superóxido que haya reaccionado con otros componentes no podrá dismutar a peróxido de hidrógeno. De lo expuesto se podría deducir que la contribución de éste último en la lesión por isquemia/reperfusión no es tan relevante como la de otros factores en modelos *in vivo*, lo cual está de acuerdo con Parks y cols.⁴³⁷, quienes sugieren que el radical superóxido, u otro radical secundario a éste, y no el H₂O₂, es el responsable del incremento de la permeabilidad vascular

asociada con la isquemia intestinal. No obstante, en el modelo *in vitro* de Lum y cols.¹¹⁷ proponen que el peróxido de hidrógeno y/o los oxidantes derivados del mismo están implicados en las alteraciones provocadas por la anoxia/reoxigenación porque la catalasa a altas concentraciones actúan protegiendo al endotelio.

Otro factor posible, aunque en nuestro caso es poco probable dado que se ha utilizado una dosis “máxima” de catalasa, es el apuntado por Kono y Fridovich¹¹⁸, que muestran como el radical superóxido puede inhibir la acción de la catalasa al transformarla a formas relativamente inactivas.

El tratamiento con catalasa (perfusión por vía intravenosa continua de 200.000 U·kg⁻¹·hora⁻¹, desde 60 minutos antes de provocar la isquemia hasta el minuto 5 de la reperusión) en los modelos experimentales de *I/R física* e *I/R farmacológica*, globalmente no proporcionan protección contra la lesión (gráficas 5 a 8, páginas 125 a 131 tablas 21, 22, 31 y 32 en anexo IV). Como se ha comentado, la catalasa actúa sobre todo cuando la concentración de peróxido de hidrógeno es alta, situación que es más probable se de en el modelo de *I/R física* (de ahí que las diferencias cuantitativamente hablando sean más relevantes en este modelo) por provocar una isquemia más severa. Y que este peróxido de hidrógeno derive directamente de la xantina oxidasa⁴³⁵ más que de la dismutación del radical superóxido el cual, lo más probable, antes de dismutar reaccione con las dianas biológicas provocando la lesión. Apoya esta posibilidad el hecho que el tratamiento con superóxido dismutasa sea muy efectivo (gráficas 5 a 8, tablas 19, 20, 29 y 30 en anexo IV).

Basándonos en nuestros resultados podemos decir que el tratamiento con catalasa no muestra diferencias estadísticamente significativas en los dos modelos utilizados en el presente trabajo (gráficas 17 y 18, página 141).

Por ello, todo y que la contribución del peróxido de hidrógeno directamente en la lesión por reperusión no sea muy relevante, justificaría un tratamiento con catalasa de cara a disminuir el daño que se produce en los primeros minutos de la reperusión, mediado por él mismo o por el radical hidroxilo que se pudiera formar. Aunque basándonos en los razonamientos expuestos anteriormente, a este tratamiento se le debería añadir superóxido dismutasa, evitando de ese modo la lesión atribuida al radical superóxido, que se producirá necesariamente si la catalasa se administra sola.

El hecho de observar que los tratamientos con alopurinol, superóxido dismutasa o catalasa, son proporcionalmente más efectivos durante los primeros minutos de la reperusión, en ambos modelos experimentales, está de acuerdo con que las especies reactivas del oxígeno se producen de manera masiva en esos momentos.

Tratamientos con N^G-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) y L-arginina

La cuantificación del óxido nítrico formado *in vivo* es difícil, ya que se forma en pequeñas cantidades (en plasma normalmente, 3 nM²⁵²) y se destruye rápidamente por su interacción con el oxígeno o especies reactivas derivadas del mismo, entre otros. Aunque sí puede medirse de una manera directa en el tejido intestinal mediante resonancia paramagnética electrónica³²¹, lo habitual es que se determine indirectamente mediante quimioluminiscencia, valoración de metabolitos estables como el nitrato y el nitrito, etc.^{370,582-585}. También se ha utilizado frecuentemente la inhibición de la NO sintasa, como método indirecto para implicar al óxido nítrico en un determinado proceso^{149,165,170,195}.

La estrategia más usada para inhibir la síntesis de óxido nítrico es el empleo de análogos estructurales de la L-arginina, que actúan como inhibidores competitivos de la NO sintasa, los cuales han sido esenciales para evaluar la contribución de este autacoide en los procesos fisiológicos y patológicos. Griffith y Stuehr¹⁸⁰, sin embargo, advierten del riesgo de malas interpretaciones con el uso del L-NAME y demás análogos estructurales de la L-arginina debido a que la extensión de la inhibición es difícil de establecer en sistemas complejos. Ninguno de los inhibidores de la NO sintasa probablemente sea un inhibidor completamente específico o resistente al metabolismo de otros productos biológicamente activos (el L-NAME y otros ésteres de la L-arginina además son antagonistas del receptor muscarínico).

Las NO sintasas constitutivas (fundamentalmente la eNOS³²⁴) producen una liberación continua de óxido nítrico en las células endoteliales, músculo liso y nervios entéricos. El L-NAME tiene una gran capacidad para inhibirlas, y aunque notable, es algo menor en el caso de la NO sintasa inducible.

Se sabe que durante los procesos inflamatorios agudos la estimulación del enzima iNOS producirá grandes cantidades de óxido nítrico. En tal caso, en la reperfusión junto con la producción de radical superóxido derivado de la xantina oxidasa, puede dar lugar a peroxinitrito y demás oxidantes derivados del mismo con el consiguiente efecto deletéreo^{69,224,380}, aunque el peroxinitrito a concentraciones nanomolares no es capaz de dañar la célula endotelial, y sí tener un efecto protector en la lesión por reperfusión al inhibir la expresión de P-selectina y la consiguiente interacción leucocito – célula endotelial²³⁶. Sin embargo, lo más probable es que en los modelos experimentales de *I/R física* e *I/R farmacológica* que aquí se presentan (donde se valoran sólo los 30 primeros minutos de reperfusión) la iNOS no tenga una función relevante, ya que necesita 2 o 4 horas para ser inducida^{186,188}, y porque en modelos experimentales semejantes los glucocorticoides, que inhiben la forma inducible pero no la constitutiva de NO

sintasa^{151,170,186}, no alteran el incremento en la permeabilidad capilar que se observa en los 30 primeros minutos de reperfusión del intestino isquémico⁴⁶. Takada y cols.²²⁵ en su modelo de isquemia/reperfusión *in vivo* implican al óxido nítrico producido por la iNOS en la lesión por reperfusión, pero observan que el incremento en la producción empiezan a partir de los 30 minutos de reperfusión. Sin embargo, Cuzzocrea y cols.¹⁹⁰ muestran la presencia de peroxinitrito a los 60 minutos de reperfusión del intestino aun con una menor expresión de las NOS constitutivas y una ausencia total de iNOS.

La administración de L-NAME al inhibir de manera competitiva la NO sintasa endotelial¹⁹⁵ y de la mucosa intestinal¹⁸⁹, promueve la adherencia y emigración de los leucocitos en las vénulas postcapilares²⁰²⁻²⁰⁴, e incrementa la permeabilidad microvascular^{203,204,206,207} y de la mucosa intestinal^{205,208}. Sucesos que se observan en la isquemia/reperfusión y se agravan con la inhibición de la NO sintasa, tanto en el primer²⁴⁸, como en el segundo^{248,484} y tercer^{484,485} evento. Sin embargo, con el D-NAME no se observa ningún efecto^{202,206,208,209}. Las fuentes exógenas de óxido nítrico, a su vez, tienen un efecto beneficioso en el periodo inicial de la reperfusión que sigue a la isquemia^{248,322,483-487}.

Por tanto, una menor cantidad de óxido nítrico durante la isquemia/reperfusión³²¹ está de acuerdo con la acción protectora del mismo durante este proceso.

Todo ello está en sintonía con nuestros resultados. En el presente trabajo, la inhibición de la NO sintasa por el L-NAME provoca una exacerbación del aclaramiento de azul de Evans, y un agravamiento de la lesión epitelial medido por la LDH en la reperfusión (gráficas 9 a 12, páginas 132 a 136; tablas 23, 24, 33 y 34 en anexo IV). La administración de L-arginina tiende al efecto contrario sobre la lesión por reperfusión, actuando como citoprotector (gráficas 9 a 12; tablas 25, 26, 35 y 36 en anexo IV).

Consideraciones sobre la pauta de administración del L-NAME y L-arginina

Tras una pocas pruebas el L-NAME se administró por vía intravenosa en perfusión continua de $15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{hora}^{-1}$, desde el minuto 45 de isquemia hasta el minuto 30 de la reperfusión (total 45 minutos).

Kubes^{205,208} demuestra que el efecto del L-NAME en el aclaramiento de moléculas desde la sangre a la luz intestinal depende del tiempo de infusión intravenosa. Los valores de aclaramiento incrementan significativamente tras 10-20 minutos de infusión. En el presente trabajo se administra 15 minutos antes de la reperfusión, lo cual ya está de acuerdo con estos trabajos, si lo que se pretende es el observar el efecto al inicio de la reperfusión.

Igualmente, tras una pocas pruebas la L-arginina se administró por vía intravenosa en perfusión continua de $300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{hora}^{-1}$, desde el minuto 45 de isquemia hasta el minuto 30 de la reperfusión (total 45 minutos).

La dosis de L-arginina es 20 veces mayor que la de L-NAME. Se ha probado que 5 veces es necesaria para revertir los efectos del L-NAME^{147,202,206,208}. En el modelo de isquemia/reperfusión de Kubes⁴⁸⁴ donde dan ambas sustancias a la vez a los 60 minutos de reperfusión, también emplean la misma proporción. Aunque en el presente estudio la L-arginina no se administra junto con el L-NAME, posiblemente hubiera sido suficiente una dosis menor. O no, ya que se valora su efecto en los 30 primeros minutos de la reperfusión, y es precisamente en los primeros minutos cuando la producción de óxido nítrico es menor. En cualquier caso, a pesar de que se ha sugerido que la sobreproducción de óxido nítrico en el intestino delgado es citotóxica ya por sí misma, ya en presencia de oxidantes como el radical superóxido por la capacidad de generarse peroxinitrito, se ha observado que el óxido nítrico a altas concentraciones, por sí mismo no lesiona el tejido intestinal, al no incrementar la permeabilidad microvascular, ni alterar la integridad de la barrera mucosa (permeabilidad mucosa), ni deteriorar la funcionalidad del intestino delgado (absorción)⁵⁸⁶. MacAllister y cols⁵²⁸ en su estudio más clínico en humanos indican que la arginina, administrada en cantidades suficientes para elevar su concentración plasmática alrededor de 20 veces, no altera el tono vascular basal o las respuestas locales a los agonistas que dependen del endotelio en sujetos sanos, pacientes con hipertensión esencial o pacientes con diabetes insulina dependientes, y no baja la presión arterial. En otros trabajos se han utilizado proporciones aun mayores¹⁶⁶. Además, Daiber y cols.²²⁶ informan que, a medida que aumenta la concentración de óxido nítrico, la magnitud de la oxidación disminuye. Cuando se genera 2 o 3 veces más óxido nítrico que radical superóxido, el óxido nítrico actúa como un mecanismo de defensa antioxidante aboliendo las acciones perniciosas del peroxinitrito. Esto sugiere que el peroxinitrito formado derivado del óxido nítrico y el radical superóxido en el momento de la reperfusión¹⁹⁰, está limitado por la relación $\text{NO}^{\bullet}/\text{O}_2^{\bullet-}$, cuanto mayor es, menor es la capacidad del peroxinitrito para oxidar sustancias biológicas *in vivo*²¹⁸.

Análisis de los resultados de L-NAME

Los resultados del presente trabajo muestran que el tratamiento con L-NAME administrado por vía intravenosa desde 15 minutos antes de la reperfusión, produce un deterioro significativo de la lesión y disfunción intestinal asociada con la isquemia/reperfusión en los modelos de *I/R física* e *I/R farmacológica*, valorándolo tanto como una mayor permeabilidad de la mucosa intestinal al azul de Evans, como una mayor liberación de LDH intracelular (lesión tisular) (gráficas 9 a 12, páginas 132 a 136; tablas 23, 24, 33 y 34 en anexo IV).

El tratamiento con L-NAME aumenta de manera significativa, en ambos modelos experimentales, los niveles de LDH (lesión celular) en casi toda la reperfusión. A partir de los 4 minutos en el grupo de *I/R física tratado con L-NAME*, y de los 6 minutos en el de *I/R farmacológica tratado con L-NAME*. Este retraso en observar unos incrementos significativos en los niveles de LDH, puede fundamentarse, en mayor o menor medida, en varios factores. El administrar L-NAME por vía sistémica en los últimos momentos de isquemia, desde luego es un inconveniente para que el segmento intestinal objeto de estudio haya sido impregnado por el fármaco. Sin embargo, no debe ser muy importante cuando en el modelo de *I/R física*, al valorar la permeabilidad al azul de Evans, como veremos a continuación, hay un incremento significativo de colorante en el líquido de perfusión desde el primer momento; y los incrementos de LDH, aunque no sean estadísticamente significativos respecto al grupo de referencia *I/R física*, estos ya se producen desde el primer momento. El hecho que en el modelo de *I/R farmacológica* estos incrementos se observen con cierto retraso es esperable, dadas las características del modelo discutidas en las páginas 159 a 162, esta particularidad, la necesidad de conseguir una reperfusión brusca, se ve perjudicada por el hecho de que el L-NAME sea un fármaco vasoconstrictor, aunque Das y Kumar¹⁶⁶ informan que éste no afecta la hiperemia reactiva que se produce tras la oclusión arterial, también hay que mencionar que ellos provocan una oclusión de tan solo 60 segundos. Por ello, en cierto modo es coherente que no se observen incrementos de LDH, y azul de Evans (como veremos después), sino decrementos durante unos pocos minutos tras la reperfusión, debido a la mayor dificultad en producirse la vasodilatación. Otro factor que puede contribuir al hecho de no apreciarse un incremento significativo de los dos parámetros que valoramos en los primeros momentos de la reperfusión, puede ser que la lesión observada para cada uno de los modelos ya sea muy importante (casi la máxima), y por lo tanto difícil de superar. Otro factor a tener en cuenta es la poca contribución, sobre la magnitud de la lesión, que pueda tener el óxido nítrico en estos primeros momentos, debido tanto a una menor producción, como a la destrucción sufrida por el mismo dada la gran cantidad de especies reactivas del oxígeno que se producen en estos primeros minutos de la reperfusión. Pero en la tendencia a la mejora que se observa en los grupos de referencia a partir de esos momentos, sí contribuye de manera significativa el óxido nítrico, como demuestra el hecho de la inhibición de su síntesis.

Todo ello indica que en los picos de LDH observados en los primeros minutos de la reperfusión, en los grupos de referencia *I/R física* e *I/R farmacológica*, la contribución del óxido nítrico no es tan relevante como la que tienen las especies reactivas del oxígeno, y que en la tendencia a la mejora que se observa en los grupos de referencia a partir de esos momentos sí contribuye de manera significativa el óxido nítrico, como demuestra el hecho de la inhibición de su síntesis.

La permeabilidad vascular y mucosa aumenta significativamente en la reperfusión en ambos modelos experimentales (en el grupo *I/R farmacológica tratado con L-NAME* a partir del minuto 6), lo que implica al óxido nítrico como mediador del mantenimiento de la homeostasis durante la reperfusión, lo que está en sintonía con que el óxido nítrico es un factor principal en los cambios de permeabilidad vascular y mucosa asociados con la isquemia intestinal^{248,484,485}.

Basándonos en nuestros resultados, se puede concluir que la inhibición de la síntesis de óxido nítrico durante la reperfusión agrava en la misma proporción la lesión, si valoramos los niveles de LDH, en los dos modelos de isquemia/reperfusión utilizados en este trabajo (gráfica 19, página 142). Sin embargo, la inhibición de la síntesis de óxido nítrico durante este periodo, aunque la aumenta, produce un comportamiento diferente en la permeabilidad de la mucosa intestinal al azul de Evans, entre los modelos de *I/R física* e *I/R farmacológica* (gráfica 20, página 142). Dado que el incremento de la permeabilidad de la mucosa ocasionada por la inhibición de la síntesis de óxido nítrico no está relacionado con lesión tisular previa²⁰⁸ (lo que no excluye como muestran nuestros resultados, que en caso de isquemia/reperfusión ésta sea más relevante), la diferencia entre ambos modelos experimentales durante los primeros minutos de reperfusión, posiblemente sea debido a las condiciones experimentales. Se ha hecho referencia a ellas en las páginas 159 a 162 al hablar de las características del modelo de *I/R farmacológica*.

Kubes⁴⁸⁴ observa una mayor permeabilidad microvascular y mucosa, una lesión exacerbada evidenciada por denudación de la vellosidad intestinal, marcada reducción en la altura de la misma y alguna hemorragia. Esto sugiere que el óxido nítrico que se pueda producir durante los primeros minutos de la reperfusión es esencial para intentar preservar la integridad de la mucosa intestinal.

Observamos que el D-NAME, el enantiómero biológicamente inactivo, no incrementa la disfunción intestinal con respecto al grupo de isquemia/reperfusión sin tratamiento (resultados no mostrados).

Ya se ha apuntado que el incremento de la permeabilidad de la mucosa ocasionada por la inhibición de la síntesis de óxido nítrico, no está relacionada con lesión tisular previa²⁰⁸, lo que no excluye como muestran nuestros resultados, que en caso de isquemia/reperfusión ésta sea más relevante; y aunque ésta inhibición incrementa la adhesión de los leucocitos al endotelio de las vénulas postcapilares^{202-204,248260}, tampoco es responsable de la permeabilidad asociada a la inhibición de la síntesis de óxido nítrico²⁰⁸, aunque en situaciones de isquemia/reperfusión sí sea relevante su función a partir de la hora de reperfusión⁴⁵⁷. Se ha involucrado a los oxidantes y las proteasas

derivadas de los leucocitos, en la disfunción microvascular asociada con diferentes modelos inflamatorios^{48,54,204,296,458}. Kubes y Granger²⁰⁶ en su estudio sobre la implicación del óxido nítrico en la permeabilidad microvascular muestran que la inhibición de su producción por el endotelio vascular produce un incremento reversible en la pérdida de proteína intravascular que está mediado por un mecanismo leucocito independiente y otro dependiente. La inhibición de la síntesis de óxido nítrico eleva los niveles de superóxido, ya que éste no es neutralizado por aquél, y este estrés oxidativo independiente de los leucocitos es un prerequisite para el ulterior rodamiento, adhesión y emigración de estos²⁶⁰. Un respaldo adicional al mecanismo independiente de los leucocitos es la observación que la adherencia de los mismos empieza más o menos a los 15-25 minutos y alcanza su pico a los 30-40 minutos de la infusión del L-NAME^{206,320}. Hayward y Lefer⁴⁶³ en su modelo de isquemia/reperfusión observan que la acumulación de los neutrófilos se produce a los 20-30 minutos de reperfusión. Por tanto, esto justificaría el hecho que en el presente trabajo no se valore la implicación de los leucocitos, al investigar sólo durante los 30 primeros minutos de reperfusión.

La salida de proteína de los vasos sanguíneos al intersticio y después a la luz intestinal debido a inhibición de la síntesis de óxido nítrico, tampoco es debida a una mayor presión hidrostática microvascular²¹⁰.

Se ha sugerido que el mecanismo por el que el óxido nítrico regula la permeabilidad microvascular en el intestino delgado se debe a la activación específica de la guanilato ciclasa citosólica que incrementa los niveles de GMPc⁵⁰¹. La reducción de GMPc puede causar contracción de la célula epitelial incrementando el tamaño de las uniones interepiteliales, produciendo una barrera mucosa más “porosa”. Esto se apoya en datos que demuestran que el aumento de la permeabilidad epitelial inducida por el L-NAME puede inhibirse con un análogo de GMPc *in vivo*.

Análisis de los resultados de L-arginina

Si en verdad el óxido nítrico es esencial para regular la homeostasis de la integridad de la barrera mucosa intestinal²¹⁰, y dado que la producción de éste se encuentra marcadamente reducida desde los primeros momentos de la reperfusión^{190,248,320,322}, entonces la alteración ocasionada por ésta podría minimizarse por la continua producción de óxido nítrico endógeno, o por la administración de sustancias productoras de óxido nítrico. Esto puede alcanzarse de varias maneras: incluyendo el uso de compuestos que donen óxido nítrico o la administración directa del mismo, con lo que se estimula a los receptores vinculados a la vía L-arginina/óxido nítrico, y se aumenta la acción del óxido nítrico endógeno, o proporcionando sustrato adicional para su síntesis¹⁷⁰.

Los donadores de óxido nítrico mejoran el flujo sanguíneo, reducen la adhesión de los neutrófilos, actúan como antioxidantes, deprimen la actividad de los mastocitos y reducen la trombosis, por todo ello estas sustancias actúan como potentes agentes antiinflamatorios²¹⁰.

La producción de óxido nítrico disminuye en la hipoxia. La reoxigenación puede estimular la síntesis del mismo al proporcionar el oxígeno necesario para producirlo, ya que el mensajero intracelular, Ca^{++} y demás substratos (L-arginina y NADPH), ya estarían disponibles durante la isquemia. Sin embargo se observa, tanto en el modelo de *I/R física* como *I/R farmacológica* sin tratamiento (gráficas 3 y 4, páginas 121 y 122; tabla 4, del anexo I; y tablas 13 a 16 en anexo III), que ésta es claramente insuficiente para que tenga un efecto protector, si se considera, como se ha argumentado previamente, que el óxido nítrico producido durante la reperfusión es esencial para intentar preservar la integridad de la mucosa intestinal.

Los resultados del presente trabajo muestran que la administración intravenosa de L-arginina desde 15 minutos antes de la reperfusión, la cual actúa incrementando la síntesis de óxido nítrico, proporciona una protección significativa de la lesión por reperfusión en los modelos de *I/R física* e *I/R farmacológica*, valorándolo como una menor liberación de LDH intracelular (lesión tisular) (gráficas 9 y 11, páginas 132 y 135; tablas 25 y 35 en anexo IV). Sin embargo la D-arginina, su enantiómero biológicamente inactivo^{173,178,180}, no protege de la lesión intestinal comparado con el grupo de isquemia/reperfusión sin tratamiento (resultados no mostrados).

Basándonos en nuestros resultados, se puede concluir que el tratamiento con L-arginina durante la reperfusión protege en la misma proporción la lesión, si valoramos los niveles de LDH, en los dos modelos de isquemia/reperfusión utilizados en este trabajo (gráficas 21, página 143).

Sin embargo, al igual que ocurría con los grupos tratados con L-NAME, el tratamiento con L-arginina, perfusión intravenosa continua de $300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{hora}^{-1}$ desde el minuto 45 de isquemia hasta el minuto 30 de la reperfusión, también actúa de manera diferente entre los grupos tratados con ésta y sus respectivos grupos de referencia sin tratamiento, respecto al aclaramiento de azul de Evans: durante el periodo de reperfusión (gráficas 10 y 12, páginas 133 y 136; tablas 26 y 36 en anexo IV).

Los resultados del trabajo muestran que el tratamiento con L-arginina en el modelo de *I/R física*, sólo durante los primeros dos minutos de reperfusión, reduce de manera significativa el aclaramiento de azul de Evans respecto al grupo de referencia *I/R física* sin tratamiento, todo y que la tendencia es ésta durante unos pocos minutos más. Al

valorarlo de manera global, el grupo *I/R física tratado con L-arginina* no proporciona una disminución significativa de la permeabilidad mucosa al azul de Evans durante la reperfusión respecto al grupo de referencia sin tratamiento.

El tratamiento con L-arginina en el modelo de *I/R farmacológica*, por el contrario, sí reduce significativamente el aclaramiento de azul de Evans durante la reperfusión.

A pesar de este comportamiento aparentemente tan diferente entre el grupo *I/R física tratado con L-arginina* e *I/R farmacológica tratado con L-arginina*, al comparar las diferencias obtenidas entre ambos grupos y sus grupos de referencia sin tratamiento, estandarizadas en tanto por ciento (gráficas 22, página 143), no podemos concluir que dicho comportamiento sea diferente.

Ya se ha comentado que, en condiciones normales, la mayor permeabilidad de la mucosa intestinal provocada por una menor concentración de óxido nítrico, no está relacionada con una lesión tisular previa. Sin embargo, cuanto mayor es la lesión isquémica previa a la reperfusión, mayor es el aclaramiento de azul de Evans en el líquido de perfusión intestinal, ante una menor presencia de óxido nítrico en el tejido (gráficas 9 a 12, páginas 132 y 136; tablas 23, 24, 33 y 34 en anexo IV). El observar que el tratamiento con L-arginina produce una disminución estadísticamente significativa de la permeabilidad mucosa en el modelo de *I/R farmacológica* y no en el de *I/R física*, muestra por un lado lo comentado anteriormente respecto a la severidad del periodo isquémico, y por consiguiente que posiblemente la pauta y dosis de L-arginina en el modelo experimental de *I/R física* sean insuficientes para generar bastante óxido nítrico que se libre de la destrucción, al interaccionar éste con la gran cantidad de especies reactivas del oxígeno y productos liberados tras la lesión tisular durante la reperfusión.

Quizás se deba considerar la pauta de administración de la L-arginina utilizada de cara a obtener una mayor protección con la administración de la misma. Ward y cols.⁵³¹ observan una menor pérdida de azul de Evans a través de la mucosa intestinal cuando la L-arginina se administra antes de la isquemia y no durante la reperfusión.

Consideraciones sobre los resultados de los tratamientos con L-NAME y L-arginina

El radical superóxido producido en grandes cantidades bajo ciertos estados inflamatorios, incluyendo la isquemia/reperfusión del intestino, inactiva al óxido nítrico. Por lo que es muy probable que, aparte de la lesión producida por la acción directa de las especies reactivas del oxígeno, en ella también contribuya por un lado la merma de óxido nítrico al reaccionar con el radical superóxido, y por otro la acción de los productos derivados de la mencionada reacción^{69,224,380}. Esta situación como se observa

en las gráficas 9 a 12, se agrava con la administración de L-NAME al disminuir aun más la cantidad de óxido nítrico en el tejido durante la reperfusión, insuficiente para llevar a cabo su función reguladora²¹⁰ y permitiendo una acumulación mayor de radical superóxido y por tanto de especies reactivas derivadas del mismo, las cuales pueden ocasionar directamente la lesión. A la inversa, de manera global se observa una menor lesión durante la reperfusión, gráficas 9 a 12, al administrar L-arginina que proporciona óxido nítrico al tejido regulando la homeostasis de la barrera intestinal²¹⁰, pudiendo actuar como antioxidante y captar el radical superóxido, evitando a su vez la lesión provocada por éste y las especies reactivas derivadas del mismo.

Gaboury y cols.²⁵⁸ muestra que la capacidad antioxidante del plasma en la rata aumentó más del doble tras la administración de donadores de óxido nítrico a concentraciones que previenen la lesión mucosa inducida por la reperfusión.

El hecho que el tratamiento con L-arginina cause, en ambos modelos experimentales (*I/R física e I/R farmacológica*), una protección de la lesión por reperfusión (valorado por los niveles de LDH) similar al tratamiento con superóxido dismutasa (tablas 19, 25, 29 y 35 en anexo IV) está de acuerdo con el concepto de que las acciones beneficiosas de la superóxido dismutasa son debidas, al menos en parte, a su capacidad para prevenir la inactivación del óxido nítrico, y a la capacidad que tiene de intensificar su producción por un mecanismo independiente del mismo¹⁷⁸. Y viceversa, el beneficio alcanzado con la L-arginina se debe a la potencial actividad antioxidante del óxido nítrico que captaría el radical superóxido¹⁵⁵.

El efecto beneficioso de la L-arginina sobre la lesión mucosa del intestino postisquémico no se debe a una mejoría en la perfusión, ya que esta no influye sobre las posibles alteraciones del flujo sanguíneo intestinal⁴⁸⁵.

Uno de los mecanismos que pueden contribuir a la acción benéfica de la L-arginina en la reperfusión es la de revertir los efectos perniciosos de una mayor concentración del inhibidor endógeno de la NO sintasa, el L-DMA (*N^G,N^{G'}*-dimetil-L-arginina)²⁰⁹. Éste es producido por el endotelio vascular y es capaz de producir una respuesta inflamatoria (adhesión y emigración de los leucocitos, agregación plaquetoleucocitaria, degranulación de los mastocitos, e incremento de la permeabilidad capilar a la albúmina).

Aparte de la producción de óxido nítrico, la L-arginina puede explicar su efecto beneficioso por ser un precursor de poliaminas, a las cuales se ha implicado en el proceso reparador tras la isquemia intestinal⁴⁸⁶.

Otro efecto beneficioso de aumentar los niveles de óxido nítrico, es que éste puede reaccionar con un grupo tiol del centro reducido molibdeno de la xantina oxidasa y xantina deshidrogenasa inactivando a ambas enzimas⁴¹⁷.

El L-NAME a altas concentraciones (mM) puede actuar como eliminador de radicales libres. Rehman y cols.⁵⁸⁷ muestran en un estudio *in vitro* como el L-NAME puede captar radical hidroxilo y lo hace más rápidamente que el manitol. Sin embargo, también observan que el D-NAME tiene el mismo comportamiento. Por otro lado, tanto la L-arginina (que además antagoniza la acción del L-NAME) como la D-arginina, también captan el radical hidroxilo con una efectividad comparable al manitol (en todos los casos utilizan concentraciones que van desde los 100 a los 1000 μM). Lass y cols.⁵⁸⁸ en un estudio en baño de órgano aislado concluyen que la acción eliminadora de especies reactivas del oxígeno no puede excluirse del efecto protector de la L-arginina (utilizan concentraciones que van desde 0,1 a lo 10000 μM), además del posible incremento en la concentración de óxido nítrico, al objetivar una evidente capacidad eliminadora concentración dependiente, pero que sólo consigue ser estadísticamente significativa a concentraciones 1000 μM . Sin embargo, Adams y cols.⁵⁸⁹ en su estudio sobre la capacidad antioxidante de la L-arginina no observan cambios en los niveles de peróxidos lipídicos tras la administración aguda del mencionado aminoácido *in vivo*, sólo observan un efecto antioxidante débil y no específico *in vitro*, sugiriendo que su principal beneficio en la cardioprotección es debido a otros mecanismos como la producción del óxido nítrico (en este estudio utilizan concentraciones de 100 μM , con las que es suficiente reducir la adhesión de los leucocitos a la célula endotelial).

Sea como fuere, en el presente trabajo se ha controlado el efecto del L-NAME con D-NAME, y el efecto de la L-arginina con D-arginina, y aunque se ha opinado que los enantiómeros D no son útiles para controlar el efecto de los L por ser igual de efectivos como eliminadores de especies reactivas del oxígeno⁵⁸⁸, en nuestro modelo no presentan tal efectividad (seguramente las concentraciones alcanzadas son muy inferiores a las de los modelos *in vitro*) por lo que se puede opinar que es muy improbable que los efectos observados sean debidos a la capacidad de estas sustancias para captar especies reactivas del oxígeno.

Haklar y cols.³⁷⁰ observan en su modelo *in vivo* de isquemia/reperfusión un efecto protector de la D-arginina, aunque no tanto como la L-arginina, y lo atribuyen a la capacidad de la primera para eliminar radical superóxido. Sin embargo, al D-NAME no le observan esta capacidad.

Los efectos de la isquemia/reperfusión en los modelos *I/R física* e *I/R farmacológica* se intensifican con la administración de L-NAME, pero no con la de D-NAME (resultados

no mostrados). Por el contrario se atenúan con la administración de L-arginina, pero no con la de D-arginina (resultados no mostrados). Estos datos, aunque indirectos, apoyan la opinión que el óxido nítrico endógeno es un importante factor en limitar la lesión tras la reperfusión del intestino delgado previamente isquémico, lo cual está sintonía con otros trabajos⁴⁸⁴.

Consideraciones finales

Con el presente modelo experimental se encuentra beneficio en la profilaxis y tratamiento a corto plazo, aunque se deberían ensayar pautas de administración a largo plazo en modelos equiparables para que pudiese decirse que son clínicamente eficaces.

Los tratamientos utilizados son evidencias indirectas de la implicación de las especies reactivas del oxígeno y del óxido nítrico en la lesión por isquemia/reperfusión del intestino delgado de rata, tanto si ésta se provoca mediante un procedimiento físico o farmacológico. El grado en que se deben considerar definitivos, es proporcional a la especificidad de los fármacos utilizados. La superóxido dismutasa y la catalasa son muy específicos en eliminar el radical superóxido y el peróxido de hidrógeno respectivamente. Por tanto, la inhibición o no de la lesión experimental por uno de estos agentes es altamente sugestiva que el proceso patológico está mediado o no, y en que grado, por la correspondiente especie reactiva del oxígeno. Asimismo, el alopurinol inhibe específicamente la xantina oxidasa (a concentraciones terapéuticas normales), lo que apoya un papel central de este enzima en el mencionado proceso. Respecto a la especificidad del L-NAME, ya es más discutible. Anteriormente se hizo referencia a la advertencia de Griffith y Stuehr¹⁸⁰ sobre el riesgo de malas interpretaciones con el uso del L-NAME y demás análogos estructurales de la L-arginina, debido a que la extensión de la inhibición es difícil de establecer en sistemas complejos; ninguno de los inhibidores de la NO sintasa probablemente sea un inhibidor completamente específico o resistente al metabolismo de otros productos biológicamente activos (el L-NAME y otros ésteres de la L-arginina además son antagonistas del receptor muscarínico).

Este modelo de isquemia/reperfusión en el intestino delgado de rata no presenta apenas dificultades técnicas dada la particular anatomía del órgano, permite la toma de múltiples muestras, y además los resultados obtenidos se pueden comparar fácilmente con una gran cantidad de resultados disponibles en la literatura científica respecto a este proceso patológico.

Nuestro modelo de isquemia/reperfusión farmacológica es válido, ya que probamos que con él se produce una significativa alteración intestinal en la reperfusión tras la

isquemia, y que en líneas generales, ésta se previene o agrava de una manera semejante y proporcional a cuando se utiliza el modelo de isquemia/reperfusión física.

El presente modelo de isquemia/reperfusión farmacológica puede ayudar a explicar el desarrollo y evolución de patologías que producen vasospasmos intermitentes, ocasionando reducciones transitorias en la perfusión vascular, que generan especies reactivas del oxígeno mediante un mecanismo de isquemia/reperfusión: infarto de miocardio, hemorragia subaracnoidea, fenómeno de Raynaud (pueden producirse vasospasmos en diferentes lugares: dedos, coronario, gastrointestinal, genitourinario, ...), insuficiencia renal aguda; diversos procesos patológicos como el choque, traumas o quemaduras, causan hipoperfusión mesentérica al desviarse la sangre a órganos vitales; consumo de cocaína y otras sustancias vasoconstrictoras; así como utilizarse en el estudio de intervenciones farmacológicas destinadas a limitar la alteración producida tras la isquemia/reperfusión.

Aunque la lesión isquémica y por reperfusión son fenómenos que se definen bien en los laboratorios de investigación, su relevancia en la práctica clínica es más difícil de definir. Esto se debe principalmente a la dificultad en diferenciar entre la lesión preexistente debida al periodo de isquemia y el daño atribuido al proceso de la reperfusión, y las dudas que pueden surgir respecto a la idoneidad y la consiguiente extrapolación de los modelos animales a la enfermedad humana.

Comentar por último la precaución que se debe tener al interpretar el alcance de las conclusiones obtenidas y más concretamente al extrapolarlas a humanos. Aunque con una alta probabilidad se alcanzarían las mismas, sólo se puede afirmar de manera categórica que esto ocurre en nuestra población de ratas Wistar.

Conclusiones

Conclusiones

1. Al igual que en el modelo de *isquemia y reperfusión (I/R) física*, la reperfusión agrava la lesión isquémica en el modelo *I/R farmacológica*.
2. La isquemia de 60 minutos es más severa en *I/R física* que en *I/R farmacológica*; y la reperfusión, en el grupo *I/R farmacológica*, además de ser menos severa, la máxima alteración tarda un poco más en producirse.
3. El alopurinol y la superóxido dismutasa previenen en la misma proporción, en los dos modelos de isquemia/reperfusión, el incremento en la permeabilidad vascular y mucosa, y el daño tisular tras la reperfusión del intestino isquémico.
4. El tratamiento con catalasa no muestra diferencias estadísticamente significativas entre los dos modelos experimentales.
5. El tratamiento con L-NAME produce un deterioro significativo de la lesión por reperfusión en los modelos de *I/R física* e *I/R farmacológica*, valorándolo tanto como una mayor liberación de LDH intracelular, proporcional en ambos modelos; como una mayor permeabilidad de la mucosa intestinal al azul de Evans, aunque con un comportamiento diferente en ambos modelos experimentales.
6. El tratamiento con L-arginina durante la reperfusión, protege en la misma proporción la lesión, valorada por los niveles de LDH, en los dos modelos de isquemia/reperfusión. En el modelo de *I/R física*, todo y que la tendencia es reducir el aclaramiento de azul de Evans respecto al grupo de referencia *I/R física* sin tratamiento, de manera global no proporciona una disminución estadísticamente significativa. En el modelo de *I/R farmacológica*, por el contrario, sí reduce significativamente el aclaramiento de azul de Evans durante la reperfusión. A pesar de estas diferencias, no podemos concluir que dicho comportamiento sea diferente.
7. **Los resultados obtenidos confirman la hipótesis formulada y demuestran que las especies reactivas derivadas del oxígeno, y el óxido nítrico, están implicados en el proceso de isquemia/reperfusión farmacológica.**

Bibliografía

1. **Fridovich I.** Oxygen: Boon and Bane. *American Scientist* 1975; 63: 54-59.
2. **Fridovich I.** The biology of oxygen radicals. The superoxide radical is an agent of oxygen toxicity; superoxide dismutases provide an important defense. *Science* 1978; 201: 875-880.
3. **Del Maestro RF.** An approach to free radicals in medicine and biology. *Acta Physiol Scand Suppl* 1980; 492: 153-168.
4. **Margulis L.** Evolución y células. En: *El origen de la célula*. Ed. Reverté, S.A. 1986. 1-18.
5. **Margulis L.** La vida con oxígeno. En: *El origen de la célula*. Ed. Reverté, S.A. 1986. 50-67.
6. **Fridovich I.** Hypoxia and oxygen toxicity. *Adv Neurol* 1979; 26: 255-259.
7. **Green MJ and Hill AO.** Chemistry of dioxygen. *Methods Enzymol* 1984; 105: 3-22.
8. **Bast A, Haenen GRMM and Doelman CJA.** Oxidants and antioxidants: State of the art. In: *Proceedings of a symposium. Oxidants and antioxidants: Pathophysiologic determinants and therapeutic agents*. Ed: Crystal R Gand Bast A. *Am J Med* 1991; 91: 2S-13S.
9. **Halliwell B.** Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry, and role in human disease. In: *Proceedings of a symposium. Oxidants and antioxidants: Pathophysiologic determinants and therapeutic agents*. Ed: Crystal R Gand Bast A. *Am J Med* 1991; 91: 14S-22S.
10. **Barquinero J.** Radicales libres: los enemigos más diminutos. En: *GSH System. Glutati6n: Eje de la defensa antioxidante*. Ed: Crystal RG y Ram6n JR. Excerpta Medica (Amsterdam). 1992; 9-15.
11. **Halliwell B, Gutteridge JMC and Cross CE.** Free radicals, antioxidants, and human disease: Where are we now? *J Lab Clin Med* 1992; 119: 598-620.
12. **Marquina EP.** Teoría de orbitales y oxígeno molecular: estructura electrónica del átomo de oxígeno y de las moléculas de oxígeno diatómicas. En: *Radicales libres y estrés oxidativo en biomedicina, importancia y utilidad de los antioxidantes en la prevención de procesos fisiopatológicos relacionados*. Sáez Tormo G and Puig-Parellada P. Ed: Fundación Valenciana de Estudios Avanzados (Valencia) . 2000; 9-24.
13. **Koppenol WH and Traynham JG.** Say NO to nitric oxide: Nomenclature for nitrogen- and oxygen-containing compounds. *Methods Enzymol* 1996; 268: 3-7.
14. **Freeman BA and Crapo JD.** Biology of disease. Free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 1982; 47: 412-426.
15. **McCord JM.** The superoxide free radical: its biochemistry and pathophysiology. *Surgery* 1983; 94: 412-414.
16. **Southorn FA and Powis G.** Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biologic reactions. *Mayo Clin Proc* 1988; 63: 381-389.
17. **Crystal RG.** Oxidants and antioxidants. Pathophysiologic determinants and therapeutic agents: Introduction. In: *Proceedings of a symposium. Oxidants and antioxidants: Pathophysiologic determinants and therapeutic agents*. Ed: Crystal R Gand Bast A. *Am J Med* 1991; 91: 1S.
18. **Halliwell B.** Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause or consequence? *Lancet* 1994; 344: 721-714.
19. **Stryer L.** Fosforilación oxidativa. En: *Bioquímica*, 4ª ed. Ed. Reverté 1995;. 529-558.
20. **Pryor WA.** Free radical reactions and their importance in biochemical systems. *Fed Proc* 1973; 32: 1862-1869.
21. **Slater TF.** Free radical mechanisms in tissue injury. *Biochem J* 1984; 222: 1-15.
22. **Siggaard-Andersen O, Ulrich A and G6thgen IH.** Classes of tissue hypoxia. *Acta Anaesthesiol Scand* 1995; 39: 137-142.
23. **Antonini E, Brunori M, Greenwood C and Malmstr6m BG.** Catalytic mechanism of cytochrome oxidase. *Nature* 1970; 228: 936-937.

24. **Boveris A, Arnaiz SL, Alvarez S, Costa LE and Valdez L.** The mitochondrial production of free radicals. In: *Free Radicals in Chemistry, Biology and Medicine*. Ed: Yoshikawa T, Toyokuni S, Yamamoto Y, and Naito Y. 2000; 256-261.
25. **Boveris A and Chance B.** The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J* 1973; 134: 707-716.
26. **Turrens JF.** Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 2003; 552: 335-344.
27. **Pearlstein DP, Ali MH, Mungai PT, Hynes KL, Gewertz BL and Schumacker PT.** Role of mitochondrial oxidant generation in endothelial cell responses to hypoxia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 566-573.
28. **Halliwell B.** Biochemical mechanisms accounting for the toxic action of oxygen on living organisms: the key role of superoxide dismutase. *Cell Biol Int Rep* 1978; 2: 113-128.
29. **Haber F and Weiss J.** The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proc R Soc Lond Ser A* 1934. 147: 332-351.
30. **Ullah Khan A and Kasha M.** Singlet molecular oxygen in the Haber-Weiss reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 12365-12367.
31. **Halliwell B, Richmond R, Wong SF and Gutteridge JMC.** The biological significance of the Haber-Weiss reaction. In: *Developments in Biochemistry. Vol. 11B: Biological and Clinical Aspects of Superoxide and superoxide dismutase*. Ed: Bannister, W. H. and Bannister, J. V. New York: Elsevier North Holland, Inc. 1980: 32-40.
32. **McCord JM and Day D Jr.** Superoxide dependent production of hydroxyl radical catalysed by iron EDTA complex. *FEBS Lett* 1978; 86: 139-142.
33. **Gutteridge JMC and Wilkins S.** Cooper salt-dependent hydroxyl radical formation damage to proteins acting as antioxidants. *Biochim Biophys Acta* 1983; 759: 38-41.
34. **Halliwell B and Gutteridge MC.** Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* 1984; 219: 1-14.
35. **Nappi AJ and Vass E.** Interactions of iron with reactive intermediates of oxygen and nitrogen. *Dev Neurosci*. 2000; 24: 134-142.
36. **Rowley DA and Halliwell B.** Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of thiol compounds. *FEBS Lett* 1982; 138: 33-36.
37. **Koppenol WH.** The basic chemistry of nitrogen monoxide and peroxynitrite. *Free Radic Biol Med* 1998; 25: 385-391.
38. **Keller GA, Warner TG, Steimer KS and Hallewell RA.** Cu,Zn superoxide dismutase is a peroxisomal enzyme in human fibroblasts and hepatoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 7381-7385.
39. **Kuehl FA and Egan RW.** Prostaglandins, arachidonic acid and inflammation. *Science* 1980; 210: 978-984.
40. **Deby C and Deby-Dupont G.** Oxygen species in prostaglandin biosynthesis in vitro and in vivo. In: *Developments in Biochemistry. Vol. 11B: Biological and Clinical Aspects of Superoxide and superoxide dismutase*. Ed: Bannister WH and Bannister J V. Elsevier North Holland, Inc. (New York). 1980; 84-97.
41. **Rowe GT, Manson NH, Caplan M and Hess ML.** Hydrogen peroxide and hydroxyl radical mediation of activated leukocyte depression of cardiac sarcoplasmic reticulum. Participation of the cyclooxygenase pathway. *Circ Res* 1983; 53: 584-591.
42. **Kukreja RC, Kontos HA, Hess ML and Ellis EF.** PGH syntase and lipoxygenase generate superoxide in the presence of NADH or NADPH. *Circ Res* 1986; 59: 612-619.
43. **Hassan MH and Fridovich I.** Superoxide dismutases: Detoxication of a free radical. In: *Enzymatic basis of detoxication*. Vol I. Academic Press Inc. (London) LTD. 1980; 311-332.

44. **McCord JM and Fridovich I.** The reduction of cytochrome C by milk xanthine oxidase. *J Biol Chem* 1968; 243: 5753-5760.
45. **Porras AG, Olson JS and Palmer G.** The reaction of reduced xanthine oxidase with oxygen. *J Biol Chem* 1981; 256: 9096-9103.
46. **Granger DN, Rutili G and McCord JM.** Superoxide radicals in feline intestinal ischemia. *Gastroenterology* 1981; 81: 22-29.
47. **Roy RS and McCord JM.** Superoxide and ischemia: conversion of xanthine deshydrogenase to xanthine oxidase. In: *Oxygen oxy radicals and their scavenger systems. Volume II: Cellular and Medical Aspects*. Ed: Greenwald A and Cohen G. Elsevier Science Publishing Co., Inc (New York). 1983; 145-153.
48. **Granger DN.** Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia reperfusion injury. *Am J Physiol* 1988; 255: H1269-H1275.
49. **Carden DL and Granger DN.** Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *J Pathol* 2000; 190: 255-266.
50. **Meneshian A and Bulkley GB.** The physiology of endothelial xanthine oxidase: from urate catabolism to reperfusion injury to inflammatory signal transduction. *Microcirculation* 2002; 9: 161-175.
51. **Li C and Jackson RM.** Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. *Am J Physiol* 2002; 282: C227-C241.
52. **Fridovich I.** Superoxide radical: An endogenous toxicant. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1983; 23: 239-257.
53. **Jewett SL, Eddy LJ and Hochstein P.** Is the autoxidation of the catecholamines involved in ischemia reperfusion injury? *Free Radic Biol Med* 1989; 6: 185-188.
54. **Weiss SJ.** Tissue destruction by neutrophils. *N Eng J Med* 1989; 320: 365-376.
55. **Rosen GM, Pou S, Ramos CL, Cohen MS and Britigan BE.** Free radicals and phagocytic cells. *FASEB J* 1995; 9: 200-209.
56. **Babior BM, Kipnes, R.S. and Curnutte, J.T.** The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *J Clin Invest* 1973; 52: 741-744.
57. **Johnston RB, Godzik CA and Cohn ZA.** Increased superoxide anion production by immunologically activated and chemically elicited macrophages. *J Exp Med* 1978; 148: 115-127.
58. **Babior BM.** Oxygen dependent microbial killing by phagocytes. (Second of two parts). *N Engl J Med* 1978; 298: 721-725.
59. **Babior BM.** Oxygen dependent microbial killing by phagocytes. (First of two parts). *N Engl J Med* 1978; 298: 659-668.
60. **Babior BM and Peters WA.** The $O_2^{\cdot -}$ -producing enzyme of human neutrophils: further properties. *J Biol Chem* 1981; 256: 2321-2323.
61. **Rossi F.** The superoxide forming NADPH oxidase of phagocytes: nature, mechanisms of activation y function. *Biochim Biophys Acta* 1986; 853: 65-89.
62. **Riesz P and Kondo T.** Free radical formation induced by ultrasound and its biological implications. *Free Radic Biol Med* 1992; 13: 247-270.
63. **Pryor WA.** Oxy-radicals and related species: Their formation, lifetimes, and reactions. *Annu Rev Physiol* 1986; 48: 657-667.
64. **Yu BP.** Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* 1994; 74: 139-162.
65. **Granger DN, Grisham MB and Kvietys PR.** Mechanisms of microvascular injury. In: *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, 3th ed. Ed: Leonard RJ. Raven Press (New York). 1994; 1693-1722.

66. **Gutteridge JMC.** Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem* 1995; 41: 1819-1828.
67. **Nelson SK, Bose SK and McCord JM.** The toxicity of high dose superoxide dismutase suggests that superoxide can both initiate and terminate lipid peroxidation in the reperfused heart. *Free Radic Biol Med* 1994; 16: 195-200.
68. **Omar BA, Gad NM, Jordan MC, Striplin SP, Russell WJ, Downey JM and McCord JM.** Cardioprotection by Cu,Zn-superoxide dismutase is lost at high doses in the reoxygenated heart. *Free Radic Biol Med* 1990; 9: 465-471.
69. **Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA and Freeman BA.** Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 1620-1624.
70. **Jourd'heuil D, Jourd'heuil FL, Kutchukian PS, Musah RA, Wink DA and Grisham MB.** Reaction of superoxide and nitric oxide with peroxynitrite. Implications for peroxynitrite-mediated oxidation reactions *in vivo*. *J Biol Chem* 2001; 276: 28799-28805.
71. **Koppenol WH.** Thermodynamics of reactions involving nitrogen-oxygen compounds. *Methods Enzymol* 1996; 268: 7-12.
72. **Ramos CL, Pou S, Britigan BE, Cohen MS and Rosen GM.** Spin trapping evidence for myeloperoxidase-dependent hydroxyl radical formation by human neutrophils and monocytes. *J Biol Chem* 1992; 267: 8307-8312.
73. **Bulkley GB.** The role of oxygen free radicals in human disease processes. *Surgery* 1983; 94: 407-411.
74. **Cadet J, Ravanat JL, Buchko GW, Yeo HC and Ames BN.** Singlet oxygen DNA damage: chromatographic and mass spectrometric analysis of damage products. *Methods Enzymol* 1994; 234: 79-88.
75. **Kellogg EW III and Fridovich I.** Superoxide, hydrogen peroxide, and singlet oxygen in lipid peroxidation by a xanthine oxidase system. *J Biol Chem* 1975; 250: 8812-8817.
76. **Auchère F and Capellère-Blandin C.** Oxidation of Cu,Zn-superoxide dismutase by the myeloperoxidase/hydrogen peroxide/chloride system: functional and structural effects. *Free Radic Res* 2001; 36: 1185-1198.
77. **Van der Berg J and Winterbourn C.** Measurement of reaction products from hypochlorous acid and unsaturated lipids. *Methods Enzymol* 1994; 233: 639-649.
78. **Jaeschke H.** Mechanisms of oxidant stress induced acute tissue injury. *Proc Soc Exp Biol Med* 1995; 209: 104-111.
79. **McCord JM.** Superoxide radical: controversies, contradictions, and paradoxes. *Proc Soc Exp Biol Med* 1995; 209: 112-117.
80. **Coffey MJ, Phare SM and Peters-Golden M.** Interaction between nitric oxide, reactive oxygen intermediates, and peroxynitrite in the regulation of 5-lipoxygenase metabolism. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1584: 81-90.
81. **McCord JM.** Superoxide dismutase in aging and disease: An overview. *Methods Enzymol* 2002; 349: 331-341.
82. **Grune T, Siems WG, Kowalewski J and Esterbauer H.** Postischemic accumulation of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal in rat small intestine. *Life Sci* 1994; 55: 693-699.
83. **Siems WG, Grune T and Esterbauer H.** 4-Hydroxynonenal formation during ischemia and reperfusion of rat small intestine. *Life Sci* 1995; 57: 785-789.
84. **Wolff SP and Dean RT.** Fragmentation of proteins by free radical and its effect on their susceptibility to enzymatic hydrolysis. *Biochem J* 1986; 234: 399-403.
85. **Davies KJA.** Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. General aspects. *J Biol Chem* 1987; 262: 9895-9901.

86. **Stadtman ER and Oliver CN.** Metal-catalyzed oxidation of proteins. Physiological consequences. *J Biol Chem* 1991; 266: 2005-2008.
87. **Grune T, Reinheckel T and Davies KJA.** Degradation of oxidized proteins in mammalian cells. *FASEB J* 1997; 11: 526-534.
88. **Abu-Zidan FM, Winterbourn CC, Bonham MJD, Simovic MO, Buss H and Windsor JA.** Small bowel ischaemia-reperfusion increases plasma concentrations of oxidised proteins in rats. *Eur J Surg* 1999; 165: 383-389.
89. **Cochrane CG.** Cellular injury by oxidants. In: *Proceedings of a symposium. Oxidants and antioxidants: Pathophysiologic determinants and therapeutic agents.* Ed: Crystal R Gand Bast A. *Am J Med* 1991; 91: 23S-30S.
90. **Wolff SP and Dean RT.** Glucose oxidation and protein modification. The potential role of 'autooxidative glycosilation' in diabetes. *Biochem J* 1987; 245: 243-250.
91. **Wiseman H and Halliwell B.** Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem J* 1996; 313: 17-29.
92. **Halliwell B and Gutteridge JMC.** The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys* 1990; 280: 1-8.
93. **Sies H.** Oxidative stress: From basic research to clinical application. In: *Proceedings of a symposium. Oxidants and antioxidants: Pathophysiologic determinants and therapeutic agents.* Ed: Crystal R Gand Bast A. *Am J Med* 1991; 91: 31S-38S.
94. **Barquinero J.** Los antioxidantes defienden la vida. En: *GSH System. Glutathión: Eje de la defensa antioxidante.* Ed: Crystal RG y Ramón JR. Excerpta Medica (Amsterdam). 1992; 22-30.
95. **Rice-Evans CA and Diplock AT.** Current status of antioxidant therapy. *Free Radic Biol Med* 1993; 15: 77-96.
96. **Das DK and Maulik N.** Antioxidant effectiveness in ischemia/reperfusion tissue injury. *Methods Enzymol* 1994; 233: 601-610.
97. **Maxwell SRJ.** Prospects for the use of antioxidant therapies. *Drugs* 1995; 49: 345-361.
98. **Cross CE, Halliwell B, Borish ET, Pryor WA, Ames BN, Saul RL, McCord JM and Harman D.** Oxygen radicals and human disease. *Ann Intern Med* 1987; 107: 526-545.
99. **Perler BA, Tohmeh AG and Bulkley GB.** Inhibition of the compartment syndrome by the ablation of free radical mediated reperfusion injury. *Surgery* 1990; 108: 40-47.
100. **Wilson SK.** Role of oxygen derived free radicals in acute angiotensin II induced hypertensive vascular disease in the rat. *Circ Res* 1990; 66: 722-734.
101. **Gutteridge JMC.** Free radicals in disease processes: a compilation of cause and consequence. *Free Rad Res Commun* 1993; 19: 141-158.
102. **Chai H and Harrison G.** Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases. The role of oxidant stress. *Circ Res* 2000; 87: 840-844.
103. **Glowinski J and Glowinski S.** Generation of reactive oxygen metabolites by the varicose vein wall. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2002; 23: 550-555.
104. **McCord JM and Fridovich I.** Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte hemocuprein. *J Biol Chem* 1969; 244: 6049-6055.
105. **Weisiger RA and Fridovich I.** Mitochondrial superoxide dismutase: Site of synthesis and intramitochondrial localization. *J Biol Chem* 1973; 248: 4793-4796.
106. **Marklund SL.** Extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in tissues from nine mammalian species. *Biochem J* 1984; 222: 649-655.
107. **Marklund SL.** Extracellular superoxide dismutase. *Methods Enzymol* 2002; 349: 74-80.

108. **Strålin P, Karlsson K, Johansson BO and Marklund SL.** The interstitium of the human arterial wall contains very large amounts of extracellular superoxide dismutase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15: 2032-3036.
109. **Karlsson K, Sandström J, Edlund A, Edlund T and Marklund SL.** Pharmacokinetics of extracellular superoxide dismutase in the vascular system. *Free Radic Biol Med* 1993; 14: 185-190.
110. **Tsan MF.** Superoxide dismutase and pulmonary oxygen toxicity. *Proc Soc Exp Biol Med* 1997; 214: 107-113.
111. **Klug D, Rabani J and Fridovich I.** A direct demonstration of the catalytic action of superoxide dismutase through the use of pulse radiolysis. *J Biol Chem* 1972; 247: 4839-4842.
112. **Cudd A and Fridovich I.** Electrostatic interactions in the reaction mechanism of bovine erythrocyte superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1982; 257: 11443-11447.
113. **Hodgson EK and Fridovich I.** The interaction of bovine erythrocyte superoxide dismutase with hydrogen peroxide: chemiluminescence and peroxidation. *Biochemistry* 1975; 14: 5299-5303.
114. **Yim MB, Chock PB and Stadtman ER.** Enzyme function of copper, zinc superoxide dismutase as a free radical generator. *J Biol Chem* 1993; 268: 4099-4105.
115. **Yim BM, Chock PB and Stadtman ER.** Copper, zinc superoxide dismutase catalyzes hydroxyl radical production from hydrogen peroxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 5006-5010.
116. **Bernier M, Manning AS and Hearse DJ.** Reperfusion arrhythmias: dose-related protection by anti-free radical interventions. *Am J Physiol* 1989; 256: H1344-H1352.
117. **Lum H, Barr DA, Shaffer JR, Gordon RJ, Ezrin AM and Malik AB.** Reoxygenation of endothelial cells increases permeability by oxidant dependent mechanisms. *Circ Res* 1992; 70: 991-998.
118. **Kono Y and Fridovich I.** Superoxide radical inhibits catalase. *J Biol Chem* 1982; 257: 5751-5754.
119. **Hodgson EK and Fridovich I.** The interaction of bovine erythrocyte superoxide dismutase with hydrogen peroxide: Inactivation of the enzyme. *Biochemistry* 1975; 14: 5294-5299.
120. **Serbinova EA and Packer L.** Antioxidant properties of α -tocopherol and α -tocotrienol. *Methods Enzymol* 1994; 234: 354-366.
121. **Schüep W and Rettenmaier R.** Analysis of vitamin E homologs in plasma and tissue: high-performance liquid chromatography. *Methods Enzymol* 1994; 234: 294-302.
122. **Packer JE, Slater TF and Willson RL.** Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C. *Nature* 1979; 278: 737-738.
123. **Sun Y and Oberley LW.** The inhibition of catalase by glutathione. *Free Radic Biol Med* 1989; 7: 595-602.
124. **Ames BN, Cathcart R, Schwiers E and Hochstein P.** Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: A hypothesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 6858-6862.
125. **Grootveld M, Halliwell B and Moorhouse CP.** Action of uric acid, allopurinol and oxypurinol on the myeloperoxidase derived oxidant hypochlorous acid. *Free Radic Res Commun* 1987; 4: 69-76.
126. **Becker BF.** Towards the physiological function of uric acid. *Free Radic Biol Med* 1993; 14: 615-631.
127. **Santus R, Patterson, LK, Filipe P, Morlière P, Hug GL, Fernandes A and Mazière JC.** Redox reactions of the urate radical/urate couple with the superoxide radical anion, the tryptophan neutral radical and selected flavonoids in neutral aqueous solutions. *Free Radic Res* 2001; 35: 129-136.
128. **Beyer RE.** The participation of coenzyme Q in free radical production and antioxidation. *Free Radic Biol Med* 1990; 8: 545-565.
129. **Kagan VE, Serbinova EA, Stoyanovsky DA, Khwaja S and Packer L.** Assay of ubiquinones and ubiquinols as antioxidants. *Methods Enzymol* 1994; 234: 343-354.

130. **Sagone AL Jr, Greenwald J, Kraut EH, Bianchine J and Singh D.** Glucose: a role as a free radical scavenger in biological systems. *J Lab Clin Med* 1983; 101: 97-104.
131. **Stocker R, Glazer AN and Ames BN.** Antioxidant activity of albumin-bound bilirubin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 5918-5922.
132. **Reif DW and Simmons RD.** Nitric oxide mediates iron release from ferritin. *Arch Biochem Biophys* 1990; 283: 537-541.
133. **Reif DW.** Ferritin as a source of iron for oxidative damage. *Free Radic Biol Med* 1992; 12: 417-427.
134. **Biemond P, Swaak AJG, Beindorff CM and Koster JF.** Superoxide-dependent and -independent mechanisms of iron mobilization from ferritin by xanthine oxidase. *Biochem J* 1986; 239: 169-173.
135. **Bolann BJ and Ulvik RJ.** On the limited ability of superoxide to release iron from ferritin. *Eur J Biochem* 1990; 193: 899-904.
136. **Allen DR, Wallis GL and McCay PB.** Catechol adrenergic agents enhance hydroxyl radical generation in xanthine oxidase systems containing ferritin: implications for ischemia/reperfusion. *Arch Biochem Biophys* 1994; 315: 235-243.
137. **Topham RW, Jackson MR, Joslin SA and Walker MC.** Studies of the ferroxidase activity of native and chemically modified xanthine oxidoreductase. *Biochem J* 1986; 235: 39-44.
138. **Topham RW, Walker M, Calisch MP and Williams RW.** Evidence for the participation of intestinal xanthine oxidase in the mucosal processing of iron. *Biochemistry* 1982; 21: 4529-4535.
139. **Topham RW, Walker M and Calisch MP.** Liver xanthine dehydrogenase and iron mobilization. *Biochem Biophys Res Commun* 1982; 109: 1240-1246.
140. **Reilly PM, Schiller HJ and Bulkley GB.** Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. *Am J Surg* 1991; 161: 488-503.
141. **Stone WL, Mukherjee S, Smith M and Das SK.** Therapeutic uses of antioxidant liposomes. In: *Methods in molecular biology. Volume 199: Liposome Methods And Protocols.* Ed: Basu SC and Basu M. Humana Press Inc. Totowa (New Jersey). 2002; 145-161.
142. **Grisham MB, Hernandez LA and Granger DN.** Xanthine oxidase and neutrophil infiltration in intestinal ischemia. *Am J Physiol* 1986; 251: G567-G574.
143. **Kawamoto S, Inoue M, Tashiro S, Morino Y and Miyauchi Y.** Inhibition of ischemia and reflow induced liver injury by an SOD derivative that circulates bound to albumin. *Arch Biochem Biophys* 1990; 277: 160-165.
144. **Gibson DD, Brackett DJ, Squires RA, Balla AK, Lerner MR, McCay PB and Pennington LR.** Evidence that the large loss of glutathione observed in ischemia reperfusion of the small intestine is not due to oxidation to glutathione disulfide. *Free Radic Biol Med* 1993; 14: 427-433.
145. **Nilsson UA, Schoenberg MH, Åneman A, Poch B, Magadum S, Beger HG and Lundgren O.** Free radicals and pathogenesis during ischemia and reperfusion of the cat small intestine. *Gastroenterology* 1994; 106: 629-636.
146. **Maxwell SRJ and Lip GYH.** Reperfusion injury: a review of the pathophysiology, clinical manifestations and therapeutic options. *Int J Cardiol* 1997; 58: 95-117.
147. **Ignarro LJ.** Biological actions and properties of endothelium-derived nitric oxide formed and released from artery and vein. *Circ Res* 1989; 65: 1-21.
148. **Moncada S and Higgs EA.** Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. *Eur J Clin Invest* 1991; 21: 361-374.
149. **Moncada S, Palmer RMJ and Higgs EA.** Nitric oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43: 109-142.
150. **Moncada S.** The L-arginine: nitric oxide pathway. *Acta Physiol Scand* 1992; 145: 201-227.

151. **Kam PCA and Govender G.** Nitric oxide: basic science and clinical applications. *Anaesthesia* 1994; 49: 515-521.
152. **Änggård E.** Nitric oxide: mediator, murderer, and medicine. *Lancet* 1994; 343: 1199-1206.
153. **Gross SS, and Wolin MS.** Nitric oxide: pathophysiological mechanisms. *Annu Rev Physiol* 1995; 57: 737-769.
154. **Kuo PC and Schroeder RA.** The emerging multifaceted roles of nitric oxide. *Ann Surg* 1995; 221: 220-235.
155. **Beckman JS and Koppenol WH.** Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. *Am J Physiol* 1996; 271: C1424-C1437.
156. **Singh S and Evans TW.** Nitric oxide, the biological mediator of the decade: fact or fiction. *Eur Respir J* 1997; 10: 699-707.
157. **Wink DA and Mitchell JB.** Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic Biol Med* 1998; 25: 434-456.
158. **Rang HP, Dale MM, Ritter JM and Moore PK.** Nitric Oxide. In: *Pharmacology*, 5 ed. Ed: Churchill Livingstone. 2003. 208-216.
159. **Furchgott RF and Zawadzki JV.** The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288: 373-376.
160. **Palmer RMJ, Ferrige AG and Moncada S.** Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327: 524-526.
161. **Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE and Chaudhuri G.** Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 9265-9269.
162. **Moncada S, Radomski MW and Palmer RMJ.** Endothelium-derived relaxing factor: Identification as nitric oxide and role in the control of vascular tone and platelet function. *Biochem Pharmacol* 1988; 37: 2495-2501.
163. **Radomski MW, Palmer RMJ and Moncada S.** The anti-aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide. *Br J Pharmacol* 1987; 92: 639-646.
164. **Dawson TD, Dawson VL and Snyder SH.** A novel neuronal messenger molecule in brain: the free radical, nitric oxide. *Ann Neurol* 1992; 32: 297-331.
165. **Moncada S and Higgs A.** The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993; 329: 2002-2012.
166. **Das S and Kumar KN.** Nitric oxide: its identity and role in blood pressure control. *Life Sci* 1995; 57: 1547-1556.
167. **Whittle BJR.** Nitric oxide in gastrointestinal physiology and pathology. In: *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, 3th ed. Ed: Leonard RJ. Raven Press (New York). 1994; 267-294.
168. **Kubes P and Wallace JL.** Nitric oxide as a mediator of gastrointestinal mucosal injury? Say it ain't so. *Med Inflammation*. 1995; 4: 397-405.
169. **Drexler H, Zeiher AM, Meinzer K and Just H.** Correction of endothelial dysfunction in coronary microcirculation of hypercholesterolaemic patients by L-arginine. *Lancet* 1991; 338: 1546-1550.
170. **Moncada S and Higgs EA.** Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide. *FASEB J* 1995; 9: 1319-1330.
171. **Darley-Usmar V, Wiseman H and Halliwell B.** Nitric oxide and oxygen radicals: a question of balance. *FEBS Lett* 1995; 369: 131-135.
172. **Farrel AJ and Blake DR.** Nitric oxide. *Ann Rheum Dis* 1996; 55: 7-20.

173. **Palmer RMJ, Ashton DS and Moncada S.** Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 1988; 333: 664-666.
174. **Schmidt HHHW, Nau H, Wittfoht W, Gerlach J, Prescher KE, Klein MM, Niroomand F and Böhme E.** Arginine is physiological precursor of endothelium-derived nitric oxide. *Eur J Pharmacol* 1988; 154: 213-216.
175. **Palmer RMJ and Moncada S.** A novel citrulline forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 158: 348-352.
176. **McCall TB, Boughton-Smith NK, Palmer RMJ, Whittle BJR. and Moncada S.** Synthesis of nitric oxide from L-arginine by neutrophils. Release and interaction with superoxide anion. *Biochem J* 1989; 261: 293-296.
177. **Kwon NS, Nathan CF, Gilker C, Griffith OW, Matthews DE and Stuehr DJ.** L-Citrulline production from L-arginine by macrophage nitric oxide synthase. The ureido oxygen derives from dioxygen. *J Biol Chem* 1990; 265: 13442-13445. Revisar en medline
178. **Hobbs AJ, Fukuto JM and Ignarro LJ.** Formation of free nitric oxide from L-arginine by nitric oxide synthase: Direct enhancement of generation by superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 10992-10996.
179. **Leone AM, Palmer RMJ, Knowles RG, Francis PL, Ashton DS and Moncada S.** Constitutive and inducible nitric oxide synthases incorporate molecular oxygen into both nitric oxide and citrulline. *J Biol Chem* 1991; 266: 23790-23795.
180. **Griffith OW and Stuehr DJ.** Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. *Annu Rev Physiol* 1995; 57: 707-736.
181. **Hecker M, Sessa WC, Harris HJ, Änggård EE and Vane JR.** The metabolism of L-arginine and its significance for the biosynthesis of endothelium-derived relaxing factor: Cultured endothelial cells recycle L-citrulline to L-arginine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 8612-8616.
182. **Su Y and Block ER.** Hypoxia inhibits L-arginine synthesis from L-citrulline in porcine pulmonary artery endothelial cells. *Am J Physiol* 1995; 269: L581-L587.
183. **Stuehr DJ, Cho HJ, Kwon NS, Weise MF and Nathan CF.** Purification and characterization of cytokine induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 7773-7777.
184. **Ghosh DK and Stuehr DJ.** Macrophage NO synthase: characterization of isolated oxygenase and reductase domains reveals a head-to-head subunit interaction. *Biochemistry* 1995; 34: 801-807.
185. **Kilbourn R and Belloni P.** Endothelial cells produce nitrogen oxides in response to interferon- γ , tumour necrosis factor and endotoxin. In: *Nitric oxide from L-arginine: a bioregulatory system*. Ed: Moncada S and Higgs EA. Elsevier Science Publishers B.V. (Biochemical Division). 1990: 61-67.
186. **Boughton-Smith NK, Evans SM, Laszlo F, Whittle JR and Moncada S.** The induction of nitric oxide synthase and intestinal vascular permeability by endotoxin in the rat. *Br J Pharmacol* 1993; 110: 1189-1195.
187. **Rinaldo JE, Clark M, Parinello J and Shepherd VL.** Nitric oxide inactivates xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase in interferon- γ stimulated macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1994; 11: 625-630.
188. **Inagami T, Naruse M and Hoover R.** Endothelium as an endocrine organ. *Annu Rev Physiol* 1995; 57: 171-189.
189. **Dignass AU, Podolsky DK and Rachmilewitz D.** NO_x generation by cultured small intestinal epithelial cells. *Dig Dis Sci* 1995; 40: 1859-1865.
190. **Cuzzocrea S, Zingarelli B and Caputi AP.** Role of constitutive nitric oxide synthase and peroxynitrite production in a rat model of splachnic artery occlusion shock. *Life Sci* 1998; 63: 789-799.

191. **Leipert B, Becker BF and Gerlach E.** Different endothelial mechanisms involved in coronary responses to known vasodilators. *Am J Physiol* 1992; 262: H1676-H1683.
192. **Nankervis CA and Nowicki PT.** Role of nitric oxide in regulation of vascular resistance in postnatal intestine. *Am J Physiol* 1995; 268: G949-G958.
193. **Dora KA, Hinton JM, Walker SD and Garland CJ.** An indirect influence of phenylephrine on the release of endothelium derived vasodilators in rat small mesenteric artery. *Br J Pharmacol* 2000; 129: 381-387.
194. **Filippi S, Parenti A, Donnini S, Granger HJ, Fazzini A and Ledda F.** α_{1D} -Adrenoceptors cause endothelium dependent vasodilatation in the rat mesenteric vascular bed. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 296: 869-875.
195. **Ress DD, Palmer RMJ, Schulz R, Hodson HF and Moncada S.** Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol* 1990; 101: 746-752.
196. **Ghafourifar P and Richter C.** Nitric oxide synthase activity in mitochondria. *FEBS Lett* 1997; 418: 291-296.
197. **Giulivi C, Poderoso JJ and Boveris A.** Production of nitric oxide by mitochondria. *J Biol Chem* 1998; 273: 11038-11043.
198. **Elfering SL, Sarkela TM and Giulivi C.** Biochemistry of mitochondrial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 2002; 277: 38079-38086.
199. **Lacza Z, Snipes JA, Zhang J, Horváth EM, Figueroa JP, Szabó C and Busija DW.** Mitochondrial nitric oxide synthase is not eNOS, nNOS or iNOS. *Free Radic Biol Med* 2003; 35: 1217-1228.
200. **López-Figueroa MO, Caamaño C, Morano MI, Ron LC, Akil H and Watson SJ.** Direct evidence of nitric oxide presence within mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 272: 129-133.
201. **Gardnier SM, Compton AM, Bennett T, Palmer RMJ and Moncada S.** Regional haemodynamic changes during oral ingestion of N^G -monomethyl-L-arginine methyl ester in conscious brattleboro rats. *Br J Pharmacol* 1990; 101: 10-12.
202. **Kubes P, Suzuki M and Granger DN.** Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 4651-4655.
203. **Kurose I, Kubes P, Wolf R, Anderson DC, Paulson J, Miyasaka M and Granger DN.** Inhibition of nitric oxide production. Mechanisms of vascular albumin leakage. *Circ Res* 1993; 73:164-171.
204. **Kurose I, Wolf R, Grisham MB, AW TY, SPECIAN RD and Granger DN.** Microvascular responses to inhibition of nitric oxide production. Role of active oxidants. *Circ Res* 1995; 76: 30-39.
205. **Kanwar S, Wallace JL, Befus D and Kubes P.** Nitric oxide synthesis inhibition increases epithelial permeability via mast cells. *Am J Physiol* 1994; 266: G222-G229.
206. **Kubes P and Granger DN.** Nitric oxide modulates microvascular permeability. *Am J Physiol* 1992; 262: H611-H615.
207. **Filep JG and Földes-Filep E.** Modulation by nitric oxide of platelet activating factor induced albumin extravasation in the conscious rat. *Br J Pharmacol* 1993; 110: 1347-1352.
208. **Kubes P.** Nitric oxide modulates epithelial permeability in the feline small intestine. *Am J Physiol* 1992; 262: G1138-G1142.
209. **Kurose I, Wolf R, Grisham MB and Granger DN.** Effects of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis on postcapillary venules. *Am J Physiol* 1995; 268: H2224-H2231.
210. **Alican I and Kubes P.** A critical role for nitric oxide in intestinal barrier function and dysfunction. *Am J Physiol* 1996; 270: G225-G237.

211. **Radomski MW, Palmer RMJ and Moncada S.** Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet* 1987; 2: 1057-1058.
212. **Radomski MW, Palmer RMJ and Moncada S.** The role of nitric oxide in cGMP in platelet adhesion to vascular endothelium. *Biochem Biophys Res Commun* 1987; 148: 1482-1489.
213. **Huie RE and Padmaja S.** The reaction rate of nitric oxide with superoxide. *Free Radic Res Commun* 1993; 18: 195-199.
214. **Beckman JS, Chen J, Ischiropoulos H and Crow JP.** Oxidative chemistry of peroxynitrite. *Methods Enzymol* 1994; 233: 229-240.
215. **Murphy ME and Sies H.** Reversible conversion of nitroxyl anion to nitric oxide by superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 10860-10864.
216. **Klotz LO and Sies H.** Reversible conversion of nitroxyl anion to nitric oxide. *Methods Enzymol* 2002; 349: 101-106.
217. **Bonner FT.** Nitric oxide gas. *Methods Enzymol* 1996; 268: 50-57.
218. **Wink DA, Hanbauer I, Grisham MB, Laval F, Nims RW, Laval J, Cook J, Pacelli R, Liebmann J, Krishna M, Ford PC and Mitchel JB.** Chemical biology of nitric oxide: Regulation and protective and toxic mechanisms. *Curr Top Cell Regul* 1996; 34: 159-187.
219. **Wink DA, Grisham MB, Miles AM, Nims RW, Krishna MC, Pacelli R, Teague D, Poore CMB, Cook JA and Ford PC.** Determination of selectivity of reactive nitrogen oxide species for various substrates. *Methods Enzymol* 1996; 268: 120-130.
220. **Ford PC, Wink DA and Stanbury DM.** Autoxidation kinetics of aqueous nitric oxide. *FEBS Lett* 1993; 326: 1-3.
221. **Taha Z, Kiechle F and Malinski T.** Oxidation of nitric oxide by oxygen in biological system monitored by porphyrinic microsensor. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 188: 734-739.
222. **Pryor WA and Squadrito GL.** The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am J Physiol* 1995; 268: L699-L722.
223. **Espey MG, Thomas DD, Miranda KM and Wink DA.** Focusing of nitric oxide mediated nitrosation and oxidative nitrosylation as a consequence of reaction with superoxide. *PNASci* 2002; 99: 11127-11132.
224. **Beckman JS.** Ischaemic injury mediator. *Nature* 1990; 345: 27-28.
225. **Takada K, Yamashita K, Sakurai-Yamashita Y, Shigematsu K, Hamada Y, Hioki K and Taniyama K.** Participation of nitric oxide in the mucosal injury of rat intestine induced by ischemia-reperfusion. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 287: 403-407.
226. **Daiber A, Frein D, Namgaladze D and Ullrich V.** Oxidation and nitrosation in the nitrogen monoxide/superoxide system. *J Biol Chem* 2002; 277: 11882-11888.
227. **Koppenol WH, Moreno JJ, Prior WA, Ischiropoulos H and Beckman JS.** Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide. *Chem Res Toxicol* 1992; 5: 834-842.
228. **Squadrito GL and Pryor WA.** Oxidative chemistry of nitric oxide: the roles of superoxide, peroxynitrite, and carbon dioxide. *Free Radic Biol Med* 1998; 25: 392-403.
229. **Di Mascio P, Bechara EJH, Medeiros MHG, Briviba K and Sies H.** Singlet molecular oxygen production in the reaction of peroxynitrite with hydrogen peroxide. *FEBS Lett* 1994; 355: 287-289.
230. **Radi R, Beckman JS, Bush KM and Freeman BA.** Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch Biochem Biophys* 1991; 228: 481-487
231. **Radi R, Beckman JS, Bush KM and Freeman BA.** Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J Biol Chem* 1991; 266: 4244-4250
232. **Ischiropoulos H, Zhu L, Chen J, Tsai M, Martin JC, Smith CD and Beckman JS.** Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalysed by superoxide dismutase. *Arch Biochem Biophys* 1992; 298: 431-437.

233. **Alvarez B and Radi R.** Peroxynitrite reactivity with amino acids and proteins. *Amino Acids* 2003; 25: 295-311.
234. **Greenacre SAB and Ischiropoulos H.** Tyrosine nitration: Localisation, quantification, consequences for protein function and signal transduction. *Free Radic Res* 2001; 34: 541-581.
235. **Tarpey MM, Beckman JS, Ischiropoulos H, Gore JZ and Brock TA.** Peroxynitrite stimulates vascular smooth muscle cell cyclic GMP synthesis. *FEBS Lett* 1995; 364: 314-318.
236. **Lefer JL, Scalia R, Campbell B, Nossuli T, Hayward R, Salamon M, Grayson J and Lefer AM.** Peroxynitrite inhibits leukocyte-endothelial cell interactions and protects against ischemia-reperfusion injury in rats. *J Clin Invest* 1997; 99: 684-691.
237. **Lancaster JR Jr.** Diffusion of free nitric oxide. *Methods Enzymol* 1996; 268: 31-50.
238. **Wink DA, Grisham MB, Mitchell JB and Ford PC.** Direct and indirect effects of nitric oxide in chemical reactions relevant to biology. *Methods Enzymol* 1996; 268: 12-31.
239. **Hobbs AJ, Gladwin MT, Patel RP, Williams DLH and Butler AR.** Haemoglobin: NO transporter, NO inactivator or none of the above? *Trends Pharmacol Sci* 2002; 23: 406-411.
240. **Traylor TG and Sharma VS.** Why NO? *Biochemistry* 1992; 31: 2847-2849.
241. **Radi R.** Reactions of nitric oxide with metalloproteins. *Chem Res Toxicol* 1996; 9: 828-835.
242. **Radi R.** Peroxynitrite reactions and diffusion in biology. *Chem Res Toxicol* 1998; 11: 720-721.
243. **Radi R.** Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *PNAS* 2004; 101: 4003-4008.
244. **Arnold WP, Mittal CK, Katsuki S and Murad F.** Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74: 3203-3207.
245. **Waldman SA and Murad F.** Cyclic GMP synthesis and function. *Pharmacol Rev* 1987; 39: 163-196.
246. **Rapaport R, Draznin MB, Murad F.** Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation. *Nature* 1983; 306: 174-176.
247. **Bolotina VM, Najibi S, Palacino JJ, Pagano PJ and Cohen RA.** Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature* 1994; 368: 850-853.
248. **Kurose I, Wolf R, Grisham MB and Granger DN.** Modulation of ischemia reperfusion induced microvascular dysfunction by nitric oxide. *Circ Res* 1994; 74: 376-382.
249. **Eich RF, Li T, Lemon DD, Doherty DH, Curry SR, Aitken JF, Mathews AJ, Johnson KA, Smith RD, Phillips GN Jr, Olson JS.** Mechanism of NO-induced oxidation of myoglobin and hemoglobin. *Biochemistry* 1996; 35: 6976-6983.
250. **Coffey MJ, Coles B and O'Donnell B.** Interactions of nitric oxide-derived reactive nitrogen species with peroxidases and lipoxygenases. *Free Radic Res* 2001; 35: 447-464.
251. **Castro L, Rodríguez M and Radi R.** Aconitase is readily inactivated by peroxynitrite, but not its precursor, nitric oxide. *J Biol Chem* 1994; 269: 29409-29415.
252. **Stamler JS, Jaraki O, Osborne J, Simon DI, Keaney J, Vita J, Singel D, Valeri CR and Loscalzo J.** Nitric oxide circulates in mammalian plasma primarily as an S-nitroso adduct of serum albumin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 7674-7677.
253. **Houston M, Chumley P, Radi R, Rubbo H and Freeman BA.** Xanthine oxidase reaction with nitric oxide and peroxynitrite. *Arch Biochem Biophys* 1998; 355: 1-8.
254. **Swain JA, Darley-Usmar V and Gutteridge JMC.** Peroxynitrite releases copper from caeruloplasmin: implications for atherosclerosis. *FEBS Lett* 1994; 342: 49-52.
255. **Wink DA, Cook JA, Pacelli R, Liebmann J, Krishna MC and Mitchell JB.** Nitric oxide (NO) protects against cellular damage by reactive oxygen species. *Toxicol Lett* 1995; 82/83: 221-226.

256. **Krishna MC, Russo A, Mitchell JB, Gldstein S, Dafni H and Samuni A.** Do nitroxide antioxidants act as scavengers of $O_2^{\cdot -}$ or as SOD mimics? *J Biol Chem* 1996; 271: 26026-26031.
257. **Boros M, Kaszaki J and Nagy S.** Oxygen free radical induced histamine release during intestinal ischemia and reperfusion. *Eur Surg Res* 1989; 21: 297-304.
258. **Gaboury J, Woodman RC, Granger DN, Reinhardt P and Kubes P.** Nitric oxide prevents leukocyte adherence: role of superoxide. *Am J Physiol* 1993; 265: H862-H867.
259. **Grisham MB.** Interaction between nitric oxide and superoxide: role in modulating leukocyte adhesion in the postischemic microvasculature. *Transplant Proc* 1995; 27: 2842-2843
260. Physiological Society Symposium: Impaired endothelial and smooth muscle cell function in oxidative stress. **Hickey MJ and Kubes P.** Role of nitric oxide in regulation of leucocyte endothelial cell interactions. *Exp Physiol* 1997; 82: 339-348.
261. **Sussman MS and Bulkley GB.** Oxygen derived free radicals in reperfusion injury. *Methods Enzymol* 1990; 186: 711-723.
262. **Van der Vliet A and Bast A.** Role of reactive oxygen species in intestinal diseases. *Free Radic Biol Med* 1992; 12: 499-513.
263. **Lefer AM and Lefer DJ.** Pharmacology of the endothelium in ischemia reperfusion and circulatory shock. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1993; 33: 71-90.
264. **Schoenberg MH and Beger HG.** Reperfusion injury after intestinal ischemia. *Crit Care Med* 1993; 21: 1376-1386.
265. **Granger DN and Korthuis RJ.** Physiologic mechanisms of postischemic tissue injury. *Annu Rev Physiol* 1995; 57: 311-332.
266. **Grisham MB, Granger DN and Lefer DJ.** Modulation of leukocyte-endothelial interactions by reactive metabolites of oxygen and nitrogen: relevance to ischemic heart disease. *Free Radic Biol Med* 1998; 25: 404-433.
267. **Chiu CJ, McArdle AH, Brown R, Scott HJ and Gurd FN.** Intestinal mucosal lesion in low flow states. I. A morphologic, hemodynamic and metabolic reappraisal. *Arch Surg* 1970; 101: 478-483.
268. **Chiu CJ, Scott HJ and Gurd FN.** Intestinal mucosal lesion in low flow states. II. The protective effect of intraluminal glucose as energy substrate. *Arch Surg* 1970; 101: 484-488.
269. **Brown RA., Chiu CJ, Scott HJ and Gurd FN.** Ultrastructural changes in the canine ileal mucosal cell after mesenteric arterial occlusion: A sequential study. *Arch Surg* 1970; 101: 290-297.
270. **Haglund U and Lundgren O.** Intestinal ischemia and shock factors. *Fed Proc* 1978; 37: 2729-2733.
271. **Blum H, Summers JJ, Schnall MD, Barlow C, Leigh JS Jr, Chance B and Buzby GB.** Acute intestinal ischemia studies by phosphorus nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Ann Surg* 1986; 204: 83-88.
272. **Blum H, Chance B and Buzby GP.** In vivo noninvasive observation of acute mesenteric ischemia in rats. *Surg Gynecol Obstet* 1987; 164: 409-414.
273. **Gutteridge JMC and Halliwell B.** Reoxygenation injury and antioxidant protection: a tale of two paradoxes. *Arch Biochem Biophys* 1990; 283: 223-226.
274. **Parks DA, Granger DN and Bulkley GB.** Superoxide radicals and mucosal lesions of the ischemic small intestine (Abstract). *Fed Proc* 1982; 41: 1742.
275. **Parks DA, Bulkley GB, Granger DN, Hamilton SR and McCord JM.** Ischemic injury in the cat small intestine: role of superoxide radicals. *Gastroenterology* 1982; 82: 9-15.
276. **Parks DA and Granger DN.** Ischemia-induced vascular changes: Role of xanthine oxidase and hydroxyl radicals. *Am J Physiol* 1983; 245: G285-G289.
277. **Parks DA and Granger DN.** Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation. *Am J Physiol* 1986; 250: G749-G753.

278. **Schoenberg MH, Muhl E, Sellin S, Younes Y, Schildberg FW and Haglund U.** Posthypotensive generation of superoxide free radicals - Possible role in the pathogenesis of the intestinal mucosal damage. *Acta Chir Scand* 1984; 150: 301-309.
279. **Grogaard B, Parks DA, Granger DN, McCord JM and Forsberg JO.** Effects of ischemia and oxygen radicals on mucosal albumin clearance in intestine. *Am J Physiol* 1982; 242: G448-G454.
280. **Latham F.** The oxygen paradox. Experiments on the effects of oxygen in human anoxia. *Lancet* 1951; 1: 77-81.
281. **Hearse DJ, Humphrey RM and Chain EB.** Abrupt reoxygenation of the anoxic potassium arrested rat heart: a study of myocardial enzyme release. *J Mol Cell Cardiol* 1973; 5: 395-407.
282. **Haglund U, Bulkley GB and Granger DN.** On the pathophysiology of intestinal ischemic injury. *Acta Chir Scand* 1987; 153: 321-324.
283. **Nilsson UA, Lundgren O, Haglund E and Bylund-Fellenius AC.** Radical production during in vivo intestinal ischemia and reperfusion in the cat. *Am J Physiol* 1989; 257: G409-G414.
284. **Bulkley GB, Kvietys PR, Parks DA, Perry MA and Granger DN.** Relationship of blood flow and oxygen consumption to ischemic injury in the canine small intestine. *Gastroenterology* 1985; 89: 852-857.
285. **Crissinger KD, Kvietys PR and Granger DN.** Pathophysiology of gastrointestinal mucosal permeability. *J Intern Med* 1990; 228, Suppl. 1: 145-154.
286. **Aranow JS and Fink MP.** Determinants of intestinal barrier failure in critical illness. *Br J Anaesth* 1996; 77: 71-78.
287. **Kaminski PM and Proctor KG.** Actions of adenosine on nitro blue tetrazolium deposition and surface pH during intestinal reperfusion injury. *Circ Res* 1990; 66: 1713-1719.
288. **Lemasters JJ and Thurman RG.** The many facets of reperfusion injury. *Gastroenterology* 1995; 108: 1317-1320.
289. **Granger DN, Sennett M, McElearney P and Taylor AE.** Effect of local arterial hypotension on cat intestinal capillary permeability. *Gastroenterology* 1980; 79: 474-480.
290. **Baykal A, Kaynaroglu V, Demirpençe E, Kilinç K, Sayer I and Sanac Y.** Experimental study of the effect of adrenaline tolerance on intestinal ischemia-reperfusion. *Br J Surg* 1998; 85: 947-950.
291. **Schoenberg MH, Haglund U, Mohr A, Younes M and Oettinger W.** The involvement of oxygen free radicals and prostaglandin metabolites in the postischemic damage of the intestine (Abstract). *Eur Surg Res* 1989; 18, Suppl. 1: 25-26.
292. **Garcia-Valdecasas JC, Cugat E, Almenara R, Grande L, Angas J, Fuster J and Visa J.** Ischemia reperfusion injury in an ischemic rat liver model: relationship between oxygen derived free radicals and prostaglandins. *Transplant Proc* 1990; 22: 523-526.
293. **Mangino MJ, Murphy MK and Anderson CB.** Effects of the arachidonate 5-lipoxygenase synthesis inhibitor A-64077 in intestinal ischemia reperfusion injury. *J Pharmacol Exp Ther* 1994; 269: 75-81.
294. **Turnage RH, Kadesky KM, Bartula L and Myers SI.** Pulmonary thromboxane release following intestinal reperfusion. *J Surg Res* 1995; 58: 552-557.
295. **Parks DA, Bulkley GB and Granger DN.** Role of oxygen derived free radicals in digestive tract diseases. *Surgery* 1983; 94:415-422.
296. **Inauen W, Granger DN, Meininger CJ, Schelling ME, Granger HJ and Kvietys PR.** An in vitro model of ischemia reperfusion induced microvascular injury. *Am J Physiol* 1990; 259: G134-G139.
297. **Bounous G, Menard D and de Medicis E.** Role of pancreatic proteases in the pathogenesis of ischemic enteropathy. *Gastroenterology* 1977; 73: 102-108.
298. **Bounous G.** Acute necrosis of the intestinal mucosa. *Gastroenterology* 1982; 82: 1457-1467.

299. **Bounous G.** Pancreatic proteases and oxygen-derived free radicals in acute ischemic enteropathy. *Surgery* 1986; 90: 92-94.
300. **Cheung JY, Bonventre JV, Malis CD AND Leaf A.** Calcium and ischemic injury. *N Eng J Med* 1986; 314: 1670-1676.
301. **Opie LH.** Reperfusion injury and its pharmacologic modification. *Circulation* 1989; 80: 1049-1062.
302. **Mustafa NA, Yandi M, Turgutalp H, Ovali E, Aydemir V and Albayrak L.** Role of diltiazem in ischemia-reperfusion injury of the intestine. *Eur Surg Res* 1994; 26: 335-341.
303. **Hu Q and Ziegelstein RC.** Hypoxia/reoxygenation stimulates intracellular calcium oscillations in human aortic endothelial cells. *Circulation* 2000; 102: 2541-2547.
304. **Otamiri T, Lindahl M and Tagesson C.** Phospholipase A₂ inhibition prevents mucosal damage associated with small intestinal ischaemia in rats. *Gut* 1988; 29: 489-494.
305. **Otamiri T and Tagesson C.** Role of phospholipase A₂ and oxygenated free radicals in mucosal damage after small intestinal ischemia and reperfusion. *Am J Surg* 1989; 157: 562-565.
306. **Koike K, Moore EE, Moore FA, Carl VS, Pitman JM and Banerjee A.** Phospholipase A₂ inhibition decouples lung injury from gut ischemia reperfusion. *Surgery* 1992; 112: 173-180.
307. **Koike K, Yamamoto Y, Hori Y, and Ono T.** Group IIA phospholipase A₂ mediates lung injury in intestinal ischemia-reperfusion. *Ann Surg* 2000; 232: 90-97.
308. **Caty MG, Schmeling DJ, Friedl HP, Oldham KT, Guice KS and Till GO.** Histamine: A promoter of xanthine oxidase activity in intestinal ischemia/reperfusion. *J Pediatr Surg* 1990; 25: 218-223.
309. **McCord JM.** Oxygen derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Eng J Med* 1985; 312: 159-163.
310. **Schoenberg MH, Fredholm BB, Haglund U, Jung H, Sellin D, Younes M and Schildberg FW.** Studies on the oxygen radical mechanism involved in the small intestinal reperfusion damage. *Acta Physiol Scand.* 1985. 124: 581-589.
311. XVIIIth National Meeting of the Spanish Society of Pharmacology. Alicante, España, 2-4 Nov, 1994. **Giménez J, Sánchez J and Puig-Parellada P.** Ischemia-reperfusion syndrome induced by vasoconstriction in the rat mesenterium. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology* 1994; 16, Suppl. 1: 71.
312. **Kurose I, Argengright LW, Wolf R, Lianxi L and Granger DN.** Ischemia/reperfusion-induced microvascular dysfunction: role of oxidants and lipid mediators. *Am J Physiol* 1997; 272: H2976-H2982.
313. V Reunión del Grupo Español de Radicales Libres. Granada, España. 1998. **Giménez-Crouseilles J and Puig-Parellada P.** Síndrome de isquemia-reperusión inducido por métodos químicos.
314. 1st International Workshop on Oxidative Stress in Ischemia-Reperfusion Injury. Brno, Czech Republic. 1998. **Giménez J and Puig-Parellada P.** Ischemia-reperfusion syndrome induced by chemical techniques.
315. **Puig-Parellada P and Giménez-Crouseilles J.** Síndrome de isquemia-reperusión inducido por métodos químicos. En: *Radicales libres y estrés oxidativo en biomedicina, importancia y utilidad de los antioxidantes en la prevención de procesos fisiopatológicos relacionados*. Sáez Tormo G and Puig-Parellada P. Ed: Fundación Valenciana de Estudios Avanzados (Valencia) . 2000; 9-24.
316. **Granger DN, Benoit JN, Suzuki M and Grisham MB.** Leukocyte adherence to venular endothelium during ischemia-reperfusion. *Am J Physiol* 1989; 257: G683-G688.
317. **Hernandez LA, Grisham MB, Twohig B, Arfors KE, Harlan JM and Granger DN.** Role of neutrophils in ischemia-reperfusion-induced microvascular injury. *Am J Physiol* 1987; 253: H699-H703.

318. **Brown MF, Ross III AJ, Dasher J, Turley DL, Ziegler MM and O'Neill Jr JA.** The role of leukocytes in mediating mucosal injury of intestinal ischemia reperfusion. *J Pediatr Surg* 1990; 25: 214-217.
319. **Kubes P and Granger DN.** Role of leukocytes in reperfusion induced intestinal dysfunction. *Drug News Perspect* 1992; 5: 197-206.
320. **Lefer AM and Lefer DJ.** The role of nitric oxide and cell adhesion molecules on the microcirculation in ischaemia-reperfusion. *Cardiovasc Res* 1996; 32: 743-751.
321. **Chan KL, Zhang XH, Fung PCW, Guo WH and Tam PKH.** Role of nitric oxide in intestinal ischaemia-reperfusion injury studied using electron paramagnetic resonance. *Br J Surg* 1999; 86: 1427-1432.
322. **Lefer AM and Lefer DJ.** Nitric oxide. II. Nitric oxide protects in intestinal inflammation. *Am J Physiol* 1999; 276: G572-G575.
323. **Kubes P.** The role of adhesion molecules and nitric oxide in intestinal and hepatic ischemia reperfusion. *Hepatogastroenterol* 1999; 46: 1458-1463.
324. **Khanna A, Rossman JE, Fung HL and Caty MG.** Attenuated nitric oxide synthase activity and protein expression accompany intestinal ischemia/reperfusion injury in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 269: 160-164.
325. **Perry MA and Wadhwa SS.** Gradual reintroduction of oxygen reduces reperfusion injury in cat stomach. *Am J Physiol* 1988; 254: G366-G372.
326. **Ueda S, Yoshikawa T, Takahashi S, Ichikawa H, Yasuda M, Oyamada H, Tanigawa T, Sugino S and Kondo M.** Role of the free radicals and lipid peroxidation in gastric mucosal injury induced by ischemia-reperfusion in rats. *Scand J Gastroenterol* 1989; 24: 55-58.
327. **Yoshikawa T, Naito Y, Ueda S, Oyamada H, Takemura T, Yoshida N, Sugino S and Kondo M.** Role of oxygen-derived free radicals in the pathogenesis of gastric mucosal lesions in rats. *J Clin Gastroenterol.* 1990; 12, Suppl. 1: S65-S71.
328. **Andrews FJ, Malcontenti C and O'Brien PE.** Sequence of gastric mucosal injury following ischemia and reperfusion. *Dig Dis Sci* 1992; 37: 1356-1361.
329. **Takayama T, Auerswald A, Schäfers HJ, Dammenhayn L and Haverich A.** The protective effect of superoxide dismutase during reperfusion of the ischemic lung. *Transplant Proc* 1987; 19: 1332-1333.
330. **Kennedy TP, Rao NV, Hopkins C, Pennington L, Tolley E and Hoidal JR.** Role of reactive oxygen species in reperfusion injury of the rabbit lung. *J Clin Invest* 1989; 83: 1326-1335.
331. **Detterbeck FC, Keagy BA, Paull DE and Wilcox BR.** Oxygen free radical scavengers decrease reperfusion injury in lung transplantation. *Ann Thorac Surg* 1990; 50: 204-210.
332. **Khorthuis RJ, Granger DN, Townsley MI and Taylor AE.** The role of oxygen derived free radicals in ischemia induced increases in canine skeletal muscle vascular permeability. *Circ Res* 1985; 57: 599-609.
333. **Korthuis RJ, Smith JK and Carden DL.** Hypoxic reperfusion attenuates postischemic microvascular injury. *Am J Physiol* 1989; 256: H315-H319.
334. **Kadambi A and Skalak TC.** Role of leukocytes and tissue-derived oxidants in short-term skeletal muscle ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 278: H435-H443.
335. **Cho WH, Kim DG, Murase N, Mischinger HJ, Todo S and Starzl TE.** Comparison of superoxide dismutase, allopurinol, coenzyme Q10, and glutathione for the prevention of warm ischemic injury. *Transplantation* 1990; 50: 353-355.
336. **Komatsu H, Koo A, Ghadishah E, Zeng H, Kuhlenskamp JF, Inoue M, Guth PH and Kaplowitz N.** Neutrophil accumulation in ischemic reperfused rat liver: evidence for role for superoxide free radicals. *Am J Physiol* 1992; 262: G669-G676.

337. **Burton KP, McCord JM and Ghai G.** Myocardial alterations due to free radical generation. *Am J Physiol* 1984; 246: H776-H783.
338. **Kloner RA, Przyklenk K and Whittaker P.** Deleterious effects of oxygen radicals in ischemia reperfusion. Resolved and unresolved issues. *Circulation* 1989; 80: 1115-1127.
339. **Downey JM.** Free radicals and their involvement during long-term myocardial ischemia and reperfusion. *Annu Rev Physiol* 1990; 52: 487-504.
340. **Werns SW and Lucchesi BR.** Free radicals and ischemic tissue injury. *Trends Pharmacol Sci* 1990; 11: 161-166.
341. **Tavazzi B, Lazzarino J, Di Piero D and Giardina B.** Malondialdehyde production and ascorbate decrease are associated to the reperfusion of the isolated postischemic rat heart. *Free Radic Biol Med* 1992; 13: 75-78.
342. **Jennings RB and Yellon DM.** Reperfusion injury: Definitions and historical Background. In: *Myocardial Protection: The Pathophysiology of reperfusion and Reperfusion Injury*. Ed: Yellon DM and Jennings RB. Raven Press, Ltd., (New York). 1992; 1-11.
343. **Kloner RA.** Does reperfusion injury exist in humans? *J Am Coll Cardiol* 1993; 21: 537-545.
344. **Ashraf M and Zhai X.** Pathophysiology of myocardial reperfusion injury: Role of oxygen free radicals. *Transplant Proc* 1995; 27: 2800-2801.
345. **Ratych RE and Bulkley GB.** Free radical mediated postischemic reperfusion injury in the kidney. *Free Radic Biol Med* 1986; 2: 311-319.
346. **Hansson R, Bratell S, Burian P, Bylund-Fellenius AC, Jonsson O, Lundgren O, Lundstam S, Pettersson S and Schersten T.** Renal function during reperfusion after warm ischaemia in rabbits: an experimental study on the possible protective effects of pretreatment with oxygen radical scavengers or lidoflazine. *Acta Physiol Scand* 1990; 139: 39-46.
347. **Yin M, Wheeler MD, Connor HD, Zhong Z, Bunzendahl H, Dikalova A, Samulski RJ, Schoonhoven R, Mason, RP Swenberg JA and Thurman RG.** Cu/Zn-superoxide dismutase gene attenuates ischemia-reperfusion injury in the rat kidney. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 2691-2700.
348. **Manson PN, Anthenelli RM, Im MJ, Bulkley GB and Hoopes JE.** The role of oxygen-free radicals in ischemic tissue injury in island skin flaps. *Ann Surg* 1983; 198: 87-90.
349. **Im MJ, Manson Pn, Bulkley GB and Hoopes JE.** Effects of superoxide dismutase and alopurinol on the survival of acute island skin flaps. *Ann Surg* 1985; 201: 357-359.
350. **Suzuki S, Miyachi Y, Niwa Y and Isshiki N.** Significance of reactive oxygen species in distal flap necrosis and its salvage with liposomal SOD. *Br J Plast Surg* 1989; 42: 559-564.
351. **Suzuki S, Yoshioka N, Isshiki N Hamanaka H and Miyachi Y.** Involvement of reactive oxygen species in post-ischaemic flap necrosis and its prevention by oxidants. *Br J Plast Surg* 1991; 44: 130-134.
352. **Rees R, Smith D, Li TD, Cashmer B, Garner W, Punch J and Smith DJ.** The role of xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase in skin ischemia. *J Surg Res* 1994; 56: 162-167.
353. **Zaccaria A, Weinzweig N, Yoshitake M, Matsuda T and Cohen M.** Vitamin C reduces ischemia-reperfusion injury in a rat epigastric island skin flap model. *Ann Plast Surg* 1994; 33: 620-623.
354. **Imaizumi S, Woolworth V, Kinouchi H, Chen SF, Fishman RA and Chan PH.** Liposome entrapped superoxide dismutase ameliorates infarct volume in focal cerebral ischaemia. *Acta Neurochir* 1990; *Suppl.* 51: 236-238.
355. **Palmer C, Towfighi J, Roberts RL and Heitjan DF.** Allopurinol administered after inducing hypoxia-ischemia reduces brain injury in 7 day old rats. *Pediatr Res* 1993; 33: 405-411.
356. **He YY, Hsu, CY, Ezrin, AM and Miller MS.** Polyethylene glycol conjugated superoxide dismutase in focal cerebral ischemia reperfusion. *Am J Physiol* 1993; 265: H252-H256.

357. **Morooka M, Hirotsune N, Wani T and Ohmoto T.** Histochemical demonstration of free radicals H_2O_2 in ischemic brain edema and protective effects of human recombinant superoxide dismutase on ischemic neuronal damage. *Acta Neurochir* 1994; 60: 307-309.
358. **Sheng H, Brady TC, Pearlstein RD, Crapo JD and Warner DS.** Extracellular superoxide dismutase deficiency worsens outcome from focal cerebral ischemia in the mouse. *Neurosci Lett* 1999; 267: 13-16.
359. **Zimmerman BJ, Grisham MB and Granger DN.** Role of oxidants in ischemia reperfusion induced granulocyte infiltration. *Am J Physiol* 1990; 258: G185-G190.
360. **Boros M, Takaichi S and Hatanaka K.** Ischemic time dependent microvascular changes and reperfusion injury in the rat small intestine. *J Surg Res* 1995; 59: 311-320.
361. **Boros M, Takaichi S and Hatanaka K.** Ischemia time dependency of reperfusion injury following complete arterial occlusion of the rat small intestine. *Transplant Proc* 1995; 27: 2789-2790.
362. **Morris JB, Bulkley GB, Haglund U, Cadenas E and Sies H.** The direct, real-time demonstration of oxygen free radical generation at reperfusion following ischemia in the living, intact, rat small intestine. *Gastroenterology* 1987; 92: 1541.
363. **Zweier JL, Flaherty JT and Weisfeldt ML.** Direct measurement of free radical generation following reperfusion of ischemic myocardium. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 1404-1407.
364. **Roldán E, Pinus CR, Turrens JF and Boveris A.** Chemiluminescence of ischaemic and reperfused intestine in vivo. *Gut* 1989; 30: 184-187.
365. **Zweier JL, Kuppusamy P, Williams R, Rayburn BK, Smith D, Weisfeldt ML and Flaherty JT.** Measurement and characterization of postischemic free radical generation in the isolated perfused heart. *J Biol Chem* 1989; 264: 18890-18895.
366. **Blasig IE, Shuter S, Garlick P and Slater T.** Relative time profiles for free radical trapping, coronary flow, enzyme leakage, arrhythmias, and function during myocardial reperfusion. *Free Radic Biol Med* 1994; 16: 35-41.
367. **Zweier JL, Broderick R, Kuppusamy P, Thompson-Gorman S and Luty GA.** Determination of the mechanism of free radical generation in human aortic endothelial cells exposed to anoxia and reoxygenation. *J Biol Chem* 1994; 269: 24156-24162.
368. **Hashimoto Y, Itoh K, Nishida K, Okano T, Miyazawa Y and Okinaga K.** Rapid superoxide production by endothelial cells and their injury upon reperfusion. *J Surg Res* 1994; 57: 693-697.
369. **Xia Y and Zweier JL.** Substrate control of free radical generation from xanthine oxidase in the postischemic heart. *J Biol Chem* 1995; 270: 18797-18803.
370. **Haklar G, Ulukaya-Durakbaşı Ç, Yüksel M, Dağh and Yalçın AS.** Oxygen radicals and nitric oxide in rat mesenteric ischaemia-reperfusion: modulation by L-arginine and N^G -nitro-L-arginine methyl ester. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1998; 25: 908-912.
371. **Salaris SC and Babbs CF.** Effect of oxygen concentration on the formation of malondialdehyde like material in a model of tissue ischemia and reoxygenation. *Free Radic Biol Med* 1989; 7: 603-609.
372. **Janero DR.** Malondialdehyde and thiobarbituric acid reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic Biol Med* 1990; 9: 515-540.
373. **Lutz J, Augustin A and Friedri E.** Severity of oxygen free radical effects after ischemia and reperfusion in intestinal tissue and the influence of different drugs. *Adv Exp Med Biol* 1990; 277: 683-690.
374. **Siems W, Kowalewski J, David H, Grune T and Bimmier M.** Discrepancy between biochemical normalization and morphological recovery of jejunal mucosa during postischemic reperfusion in presence of the xanthine oxidase inhibitor oxypurinol. *Cell Mol Biol* 1991; 37: 213-226.
375. **Augustin AJ and Lutz J.** Intestinal, hepatic and renal production of thiobarbituric acid reactive substances and myeloperoxidase activity after temporary aortic occlusion and reperfusion. *Life Sci* 1991; 49: 961-968.

376. **Horton JW and White DJ.** Lipid peroxidation contributes to cardiac deficits after ischemia and reperfusion of the small bowel. *Am J Physiol* 1993; 264: H1686-H1692.
377. **Schoenberg MH, Poch B, Moch D, Marzinzig M, Marzinzig E, Mattfeldt T, Gruber H and Beger HG.** Effect of acadesine treatment on postischemic damage to small intestine. *Am J Physiol* 1995; 269: H1752-H1759.
378. **Deshmukh DR, Mirochnitchenko O, Ghole VS, Agnese D, Shah PC, Reddell M, Brolin RE and Inouye M.** Intestinal ischemia and reperfusion injury in transgenic mice overexpressing copper-zinc superoxide ismutase. *Am J Physiol* 1997; 273: C1130-C1135.
379. **Cuzzocrea S, Mazzon E, Gugo L, Caputi AP, Aston K, Riley DP and Salvemini D.** Protective effects of a new stable, highly active SOD mimetic, M40401 in splachnic artery occlusion and reperfusion. *Br J Pharmacol* 2001; 132: 19-29.
380. **Del Maestro RF, Björk J and Arfors KE.** Increase in microvascular permeability induced by enzymatically generated free radicals. I. In vivo study. *Microvasc Res* 1981; 22: 239-254.
381. **Del Maestro RF, Björk J and Arfors KE.** Increase in microvascular permeability induced by enzymatically generated free radicals. II. Role of superoxide anion radical, hydrogen peroxide, and hydroxyl radical. *Microvasc Res* 1981; 22: 255-270.
382. **Parks DA, Shah AK and Granger DN.** Oxygen radicals: effects on intestinal vascular permeability. *Am J Physiol* 1984; 247: G167-G170.
383. **Parks DA and Granger DN.** Effect of enzymatically generated hydrogen peroxide (H₂O₂) on intestinal vascular permeability (Abstract). *Fed Proc* 1986; 45: 1163.
384. **Ratych RE, Chuknyiska RS and Bulkley GB.** The primary localization of free radical generation after anoxia/reoxygenation in isolated endothelial cells. *Surgery* 1987; 102: 122-131.
385. **Granger DN, McCord JM., Parks DA and Höllwarth ME.** Xanthine oxidase inhibitors attenuate ischemia induced vascular permeability changes in the cat intestine. *Gastroenterology* 1986; 90: 80-84.
386. **Morris JB, Haglund U and Bulkley GB.** The protection fom post-ischemica injury by xanthine oxidase inhibition: Blokade of free radical generation or purine salvage? (Abstract). *Gastroenterology* 1987; 92: 1542.
387. **Zimmerman BJ, Parks DA, Grisham MB and Granger DN.** Allopurinol does not enhance antioxidant properties of extracellular fluid. *Am J Physiol* 1988; 255: H202-H206.
388. **Vaughan WG, Horton JW and Walker PB.** Allopurinol prevents intestinal permeability changes after ischemia-reperfusion injury. *J Pediatr Surg* 1992; 27: 968-973.
389. **Boros M, Karacsony G, Kaszaki J and Nagy S.** Reperfusion mucosal damage after complete intestinal ischemia in the dog: the effects of antioxidant and phospholipase A₂ inhibitor therapy. *Surgery* 1993; 113: 184-191.
390. **Klein AS, Joh JW, Rangan U, Wang D and Bulkley GB.** Allopurinol: Discrimination of antioxidant from enzyme inhibitory activities. *Free Radic Biol Med* 1996; 21: 713-717.
391. **Saugstad OD.** Role of xanthine oxidase and its inhibitor in hypoxia: reoxygenation injury. *Pediatrics* 1996; 98: 103-107.
392. **Parks DA and Granger DN.** Effects of catalase on ischemia-induced vascular permeability changes in the small intestine (Abstract). *Gastroenterology* 1984; 84: 1207.
393. **Burton KP.** Superoxide dismutase enhances recovery following myocardial ischemia. *Am J Physiol* 1985; 248: H637-H643.
394. **Hernandez LA, Grisham MB and Granger DN.** A role for iron in oxidant mediated ischemic injury to intestinal microvasculature. *Am J Physiol* 1987; 253: G49-G53.
395. **Horie Y, Wolf R, Flores SC, McCord JM, Epstein CJ and Granger DN.** Transgenic mice with increased copper/zinc-superoxide dismutase activity are resistant to hepatic leukostasis and capillary no-reflow after gut ischemia/reperfusion. *Circ Res* 1998; 83: 691-696.

396. **Akgür FM, Brown MF, Zibari GB, McDonald JC, Epstein CJ, Ross CR and Granger DN.** Role of superoxide in hemorrhagic shock-induced P-selectin expression. *Am J Physiol* 2000; 279: H791-H797.
397. **Russell J, Epstein CJ, Grisham MB, Alexander JS, Yeh KY and Granger DN.** Regulation of E-selectin expression in postischemic intestinal microvasculature. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 278: G878-G885.
398. **Yoshida T, Maulik N, Engelman RM, Ho YS and Das DK.** Targeted disruption of the mouse Sod I gene makes the hearts vulnerable to ischemic reperfusion injury. *Circ Res* 2000; 86: 264-269.
399. **Parks DA and Granger DN.** Xanthine oxidase: biochemistry, distribution and physiology. *Acta Physiol Scand Suppl* 1986; 548: 87-99.
400. **Hille R and Nishino T.** Xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase. *FASEB J* 1995; 9: 995-1003.
401. **Bray RC, Bennett B, Burke JF, Chovnick A, Doyle WA, Howes BD, Lowe DJ, Richards RL, Turner NA, Ventom A and Whittle JRS.** Recent studies on xanthine oxidase and related enzymes. *Biochem Soc Trans* 1996; 24: 99-105.
402. **Harrison R.** Structure and function of xanthine oxidoreductasa: where are the now? *Free Radic Biol Med* 2002; 33: 774-797.
403. **Nishino T.** The conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase and the role of the enzyme in reperfusion injury. *J Biochem* 1994; 116: 1-6.
404. **Stirpe F and Della Corte E.** The regulation of rat liver xanthine oxidase. Conversion *in vitro* of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) to oxidase (type O). *J Biol Chem* 1969; 244: 3855-3863.
405. **Batelli MG, Della Corte E and Stirpe F.** Xanthine oxidase tipe D (dehydrogenase) in the intestine and other organs of the rat. *Biochem J* 1972; 126: 747-749.
406. **Parks DA, Williams TK and Beckman JS.** Conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemic rat intestine: a reevaluation. *Am J Physiol* 1988; 254: G768-G774.
407. **Yokoyama Y, Beckman JS, Beckman TK, Wheat JK, Cash TG, Freeman BA and Parks DA.** Circulating xanthine oxidase: potential mediator of ischemic injury. *Am J Physiol* 1990; 258: G564-G570.
408. **Friedl HP, Smith DJ, Till GO, Thomson PD, Louis DS and Ward PA.** Ischemia-reperfusion in humans. Appearance of xanthine oxidase activity. *Am J Pathol* 1990; 136: 491-495.
409. **Terada LS, Dormish JJ, Shanley PF, Leff JA, Anderson BO and Repine JE.** Circulating xanthine oxidase mediates lung neutrophil sequestration after intestinal ischemia reperfusion. *Am J Physiol* 1992; 263: L394-L401.
410. **Tan S, Yokoyama Y, Dickens E, Cash TG, Freeman BA and Parks DA.** Xanthine oxidase activity in the circulation of rats following hemorrhagic shock. *Free Radic Biol Med* 1993; 15: 407-414.
411. **Tubaro E, Lotti B, Santiangeli C and Cavallo G.** Xanthine oxidase: an enzyme playing a role in the killing mechanism of polymorphonuclear leukocytes. *Biochem Pharmacol* 1980; 29: 3018-3020.
412. **Grum CM, Gross TJ, Mody CH and Sitrin RG.** Expression of xanthine oxidase activity by murine leucocytes. *J Lab Clin Med* 1990; 116: 211-218.
413. **Jarasch ED, Grund C, Bruder G, Heid HW, Keenan TW and Franke WW.** Localization of xanthine oxidase in mammary-gland epithelium and capillary endothelium. *Cell* 1981; 25: 67-82.
414. **Wajner M and Harkness A.** Distribution of xanthine dehydrogenase and oxidase activities in human and rabbit tissues. *Biochim Biophys Acta* 1989; 991: 79-84.
415. **Hernandez LA, Grisham MB, Von Rrtter C and Granger DN.** Biochemical localization of xanthine oxidase in the cat small intestine (Abstract). *Gastroenterology* 1987; 92: 1433.

416. **Millar TM, Stevens CR, Bemjamin N, Eisenthal R, Harrison R and Blake DR.** Xanthine oxidoreductase catalyses the reduction of nitrates and nitrite to nitric oxide under hypoxic conditions. *FEBS Lett* 1998; 427: 225-228.
417. **Ichimori K, Fukahori M, Nakazawa H, Okamoto K and Nishino T.** Inhibition of xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase by nitric oxide. *J Biol Chem* 1999; 274: 7763-7768.
418. **Ghio AJ, Kennedy TP, Stonehuerner J, Carter JD, Skinner KA, Parks DA and Hoidal JR.** Iron regulates xanthine oxidase activity in the lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002; 283: L563-L572.
419. **Saugstad OD.** Hypoxanthine as a measurement of hypoxia. *Pediatr Res.* 1975; 9: 158-161.
420. **Saugstad OD and Aasen AO.** Plasma hypoxanthine levels as a prognostic aid of tissue hypoxia. *Eur Surg Res* 1980; 12: 123-129.
421. **Salzman A, Staffan Wollert P, Wang H, Menconi MJ, Youssef ME, Compton CC and Fink MP.** Intraluminal oxygenation ameliorates ischemia reperfusion induced gut mucosal hypermeability in pigs. *Circ Shock* 1993; 40: 37-46.
422. **Sanders SA, Harrison R and Eisenthal R.** Oxidation of NADH catalysed by human xanthine oxidase: generation of superoxide anion. *Biochem Soc Trans* 1996; 24: 13S.
423. **Sanders SA, Eisenthal R and Harrison R.** NADH oxidase activity of human xanthine oxidoreductasa. Generation of superoxide anion. *Eur J Biochem* 1997; 245: 541-548.
424. **Waud WR and Rajagopalan KV.** The mechanism of conversion of rat liver xanthine dehydrogenase from an NAD⁺-dependent (type D) to an O₂-dependent form (type O). *Arch Biochem Biophys* 1976; 172: 365-379.
425. **Waud WR and Rajagopalan KV.** Purification and properties of the NAD⁺-dependent (type D) and O₂-dependent (type O) forms of rat liver xanthine dehydrogenase. *Arch Biochem Biophys* 1976; 172: 354-364.
426. **McKelvey TG, Höllwarth ME, Granger DN, Engerson TD, Landler U and Jones HP.** Mechanisms of conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase in ischemic rat liver and kidney. *Am J Physiol* 1988; 254: G753-G760.
427. **Engerson TD, McKelvey TG, Rhyme DB, Boggio EB, Snyder SJ and Jones HP.** Conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase in ischemic rat tissues. *J Clin Invest* 1987; 79: 1564-1570.
428. **Partridge CA, Blumenstock FA and Malik AB.** Pulmonary microvascular endothelial cells constitutively release xanthine oxidase. *Arch Biochem Biophys* 1992; 294: 184-187.
429. **Hossain MA, Hamamoto I, Todo S, Maeba T and Tanaka S.** Comparison of warm and cold ischemia of the canine small intestine. *Eur Surg Res* 1995; 27: 234-240.
430. **Friedl HP, Till GO, Ryan US and Ward PA.** Mediator induced activation of xanthine oxidase in endothelial cells. *FASEB J* 1989; 3: 2512-2518.
431. **Terada LS, Guidot DM, Leff JA, Willingham IR, Hanley ME, Piermattei P and Repine JE.** Hypoxia injures endothelial cells by increasing endogenous xanthine oxidase activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 3362-3366.
432. **Kayyali US, Donaldson C, Huang H, Abdelnour R and Hassoun PM.** Phosphorylation of xanthine dehydrogenase/oxidase in hypoxia. *J Biol Chem* 2001; 276: 14359-14365.
433. **Kaminski ZW and Jezewska MM.** Involvement of a single thiol group in the conversion of the NAD⁺-dependent activity of rat liver xanthine oxidoreductasa to the O₂-dependent activity. *Biochem J* 1982; 207: 341-346.
434. **McManaman JL and Bain DL.** Structural and conformational analysis of the oxidase to dehydrogenase conversion of xanthine oxidoreductase. *J Biol Chem* 2002; 277: 21261-21268.
435. **Kuppusamy P and Zweier JL.** Characterization of free radical generation by xanthine oxidase. Evidence for hydroxyl radical generation. *J Biol Chem* 1989; 264: 9880-9884.

436. **Fridovich I.** Quantitative aspects of the production of superoxide anion radical by milk xanthine oxidase. *J Biol Chem* 1970; 245: 4053-4057.
437. **Britigan BE, Pou S, Rosen GM, Lilleg DM and Buettner GR.** Hydroxyl radical is not a product of the reaction of xanthine oxidase and xanthine. *J Biol Chem* 1990; 265: 17533-17538.
438. **Filep J, Hermán F, Braquet P and Mózes T.** Increased levels of platelet-activating factor in blood following intestinal ischemia in the dog. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 158: 353-359.
439. **Gerkin TM, Oldham KT, Guice KS, Hinshaw DB and Ryan US.** Intestinal ischemia reperfusion injury causes pulmonary endothelial cell ATP depletion. *Ann Surg* 1993; 217: 48-56.
440. **Horie Y, Wolf R, Anderson DC and Granger DN.** Nitric oxide modulates gut ischemia-reperfusion-induced P-selectin expression in murine liver. *Am J Physiol* 1998; 275: H520-H526.
441. **Goris RJA, te Boekhorst TPA, Nuytinck JKS and Gimbrere JSF.** Multiple-organ failure. Generalized autodestructive inflammation? *Arch Surg* 1985; 120: 1109-1115.
442. **Carrico CJ, Meakins JL, Marshall JC, Fry D and Maier RV.** Multiple organ failure syndrome. *Arch Surg* 1986; 121: 196-208.
443. **Petrone WF, English DK, Wong K and McCord JM.** Free radicals and inflammation: superoxide-dependent activation of a neutrophil chemotactic factor in plasma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77: 1159-1163.
444. **Meleagros L, Ghatei MA and Bloom SR.** Release of vasodilator, but not vasoconstrictor, neuropeptides and of enteroglucagon by intestinal ischaemia/reperfusion in the rat. *Gut* 1994; 35: 1701-1706.
445. **Bharadwaj LA and Prasad K.** Mechanism of hydroxyl radical-induced modulation of vascular tone. *Free Radic Biol Med* 1997; 22: 381-390.
446. **Rosenblum WI.** Effects of free radical generation on mouse pial arterioles: probable role of hydroxyl radicals. *Am J Physiol* 1983; 245: H139-H142.
447. **Lamb FS and Webb RC.** Vascular effects of free radicals generated by electrical stimulation. *Am J Physiol* 1984; 247: H709-H714.
448. **Rubanyi GM.** Vascular effects of oxygen derived free radicals. *Free Radic Biol Med* 1988; 4: 107-120.
449. **Gao H, Korthuis RJ and Benoit JN.** Effects of reactive oxygen metabolites on norhepinephrine induced vasoconstriction. *Free Radic Biol Med* 1994; 16: 839-843.
450. **Parks DA, Grøgaard B and Granger DN.** Comparison of partial and complete arterial occlusion models for studying intestinal ischemia. *Surgery* 1982; 92: 896-901.
451. **Otamiri T, Sjødahl R. and Tagesson C.** An experimental model for studying reversible intestinal ischemia. *Acta Chir Scand* 1987; 153: 51-56.
452. **Park PO, Haglund U, Bulkley GB and Fält K.** The sequence of development of intestinal tissue injury after strangulation ischemia and reperfusion. *Surgery* 1990; 107: 574-580.
453. **Kurose I, Anderson DC, Miyasaca M, Tamatani T, Paulson JC, Todd RF, Rusche JR and Granger DN.** Molecular determinants of reperfusion induced leukocyte adhesion and vascular protein leakage. *Circ Res* 1994; 74: 336-343.
454. **Haglund U and Lundgren O.** Reactions within consecutive vascular sections of the small intestine of the cat during prolonged hypotension. *Acta Physiol Scand* 1972; 84: 151-163.
455. **Harris NR.** Opposing effects of L-NAME on capillary filtration rate in the presence or absence of neutrophils. *Am J Physiol* 1997; 273: G1320-G1325.
456. **Kurtel H, Tso P and Granger DN.** Granulocyte accumulation in postischemic intestine: role of leukocyte adhesion glycoprotein CD11/CD18. *Am J Physiol* 1992; 262: G878-G882.
457. **Kubes P, Hunter J and Granger DN.** Ischemia reperfusion induced feline intestinal dysfunction: importance of granulocyte recruitment. *Gastroenterology* 1992; 103: 807-812.

458. **Suzuki M, Inauen W, Kvietys PR, Grisham B, Meininger C, Schelling ME, Granger HJ and Granger DN.** Superoxide mediates reperfusion induced leukocyte-endothelial cell interactions. *Am J Physiol* 1989; 257: H1740-H1745.
459. **Yoshida N, Granger DN, Anderson DC, Rothlein R, Lane C and Kvietys PR.** Anoxia reoxygenation induced neutrophil adherence to cultured endothelial cells. *Am J Physiol* 1992; 262: H1891-H1898.
460. **Panés J and Granger DN.** Leukocyte-endothelial cell interactions: molecular mechanisms and implications in gastrointestinal disease. *Gastroenterology* 1998; 114: 1066-1090.
461. **Kaminski PM and Proctor KG.** Attenuation of no-reflow phenomenon, neutrophil activation, and reperfusion injury in intestinal microcirculation by topical adenosine. *Circ Res* 1989; 65: 426-435.
462. **Grisham MB, Benoit JN and Granger DN.** Assessment of leukocyte involvement during ischemia and reperfusion of intestine. *Methods Enzymol* 1990; 186: 729-742.
463. **Hayward R and Lefer AM.** Time course of endothelial-neutrophil interaction in splanchnic artery ischemia-reperfusion. *Am J Physiol* 1998; 275: H2080-H2086.
464. **Perez HD, Weksler BB, Goldstein IM.** Generation of a chemotactic lipid from an arachidonic acid by exposure to a superoxide-generating system. *Inflammation* 1980; 4: 313-28.
465. **Palluy O, Morliere L, Gris JC, Bonne C and Modat G.** Hypoxia reoxygenation stimulates endothelium to promote neutrophil adhesion. *Free Radic Biol Med* 1992; 13: 21-30.
466. **Bienvenu K, Harris N and Granger DN.** Modulation of leukocyte migration in mesenteric interstitium. *Am J Physiol* 1994; 267: H1573-H1577.
467. **Clancy RM, Leszczynska-Piziak J and Abramson SB.** Nitric oxide, an endothelial cell relaxation factor, inhibits neutrophil superoxide anion production via a direct action on the NADPH oxidase. *J Clin Invest* 1992; 90: 1116-1121.
468. **Riutta A, Alanko J, Mucha I and Vapaatalo H.** Effects of Trolox C and SIN-1 on arachidonic acid metabolism and on cyclic GMP formation in leukocytes. *Eur J Pharmacol* 1994; 262: 217-222.
469. **Corbí López AL, Raab U y Bernabéu Quirante C.** Recirculación de células inmunitarias y sus mecanismos de localización en distintos lugares anatómicos. *Medicine (Madrid)* 1997; 7(50): 2216-2223.
470. **Bienvenu K, Russel J and Granger DN.** Leukotriene B₄ mediates shear rate dependent leukocyte adhesion in mesenteric venules. *Circ Res* 1992; 71: 906-911.
471. **Kubes P and Granger DN.** Leukocyte-endothelial cell interactions evoked by mast cells. *Cardiovasc Res* 1996; 32: 699-708.
472. **Vane JR, Änggård EE and Botting RM.** Regulatory functions of the vascular endothelium. *N Eng J Med* 1990; 323: 27-36.
473. **Haller H.** Endothelial function. General Considerations. *Drugs* 1997; 53: 1-10.
474. **Pinsky DJ, Yan SF, Lawson C, Naka Y, Chen JX, Connolly ES Jr and Stern DM.** Hypoxia and modification of the endothelium: implications for regulation of vascular homeostatic properties. *Semin Cell Biol* 1995; 6: 283-294.
475. **Moncada S, Gryglewski R, Bunting S and Vane JR.** An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature* 1976; 263: 663-665.
476. **Weksler B, Ley CW and Jaffe BA.** Stimulation of endothelial cell prostaglandin production by thrombin, trypsin, and the ionophore A23187. *J Clin Invest* 1978; 62: 923-930.
477. **Moncada S.** Eighth Gaddum Memorial Lecture, University of London Institute of Education, December 1980. Biological importance of prostacyclin. *Br J Pharmacol* 1982; 76: 3-31.
478. **Turnage RH, Kadesky KM, Bartula L, Guice KS, Oldham KT and Myers SI.** Splanchnic PGI₂ release and "no reflow" following intestinal reperfusion. *J Surg Res* 1995; 58: 558-564.

479. **Caplan MS, Hedlund E, Hill N and MacKendrick W.** The role of endogenous nitric oxide and platelet activating factor in hypoxia induced intestinal injury in rats. *Gastroenterology* 1994; 106: 346-352.
480. **Boulanger C and Lüscher TF.** Release of endothelin from the porcine aorta. Inhibition by endothelium-derived nitric oxide. *J Clin Invest* 1990; 85: 587-590.
481. **De Nucci G, Thomas R, D'Orleans-Juste P, Antunes E, Walder C, Warner TD and Vane JR.** Pressor effects of circulating endothelin are limited by its removal in the pulmonary circulation and by the release of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 9797-9800
482. **Miyauchi T and Masaki T.** Pathophysiology of endothelin in the cardiovascular system. *Annu Rev Physiol* 1999; 61: 391-415.
483. **Aoki N, Johnson III G and Lefer AM.** Beneficial effects of two forms of NO administration in feline splanchnic artery occlusion shock. *Am J Physiol* 1990; 258: G275-G281.
484. **Kubes P.** Ischemia reperfusion in feline small intestine: a role for nitric oxide. *Am J Physiol* 1993; 264: G143-G149.
485. **Payne D and Kubes P.** Nitric oxide donors reduce the rise in reperfusion induced intestinal mucosal permeability. *Am J Physiol* 1993; 265: G189-G195.
486. **Raul F, Galluser M, Schleiffer R, Gossé F, Hasselmann M and Seiler N.** Beneficial effects of L-arginine on intestinal epithelial restitution after ischemic damage in rats. *Digestion* 1995; 56: 400-405.
487. **Kawata K, Takeyoshi I, Iwanami K, Sunose Y, Aiba M, Ohwada S, Matsumoto K and Morishita Y.** A spontaneous nitric oxide donor ameliorates small bowel ischemia-reperfusion injury in dogs. *Dig Dis Sci* 2001; 46: 1748-1756.
488. **Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobay-Ashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K and Masaki T.** A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988; 332: 411-415.
489. **Rakugi H, Nakamaru M, Tabuchi Y, Nagano M, Mikami H, Ogihara T.** Endothelin stimulates the release of prostacyclin from rat mesenteric arteries. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 160: 924-928.
490. **Özel ŞK, Yüksel M, Haklar G, Durakbaşa ÇU, Dagli TE and Aktan AÖ.** Nitric oxide and endothelin relationship in intestinal ischemia/reperfusion injury (II). *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2001; 64: 253-257.
491. **Filep JG, Sirois MG, Rousseau A, Fournier A and Sirois P.** Effects of endothelin-1 on vascular permeability in the conscious rat: interactions with platelet activating factor. *Br J Pharmacol* 1991; 104: 797-804.
492. **Buyukgebiz O, Yegen C, Aktan AO and Yalin R.** Allopurinol inhibits endothelium release after mesenteric ischemia reperfusion injury. *Transplantat Proc* 1995; 27: 2699-2700
493. **Hamberg M, Svensson J and Samuelsson B.** Thromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. *Proc Natl Sci USA.* 1975; 72: 2994-29980.
494. **McIntyre TM, Zimmerman GA, Satoh K and Prescott SM.** Cultured endothelial cells synthesize both platelet-activating factor and prostacyclin in response to histamine, bradykinin, and adenosine triphosphate. *J Clin Invest* 1985; 76: 271-280.
495. **Kubes P, Arfors KE and Granger DN.** Platelet activating factor induced mucosal dysfunction: role of oxidants and granulocytes. *Am J Physiol* 1991; 260: G965-G971.
496. **Volk T, Ioannidis Y, Hensel M, deGroot H and Kox WJ.** Endothelial damage induced by nitric oxide: synergism with reactive oxygen species. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 213: 196-203.
497. **Takano M, Meneshian A, Sheikh E, Yamakawa Y, Bass Wilkins K, Hopkins EA and Bulkley GB.** Rapid upregulation of endothelial P-selectin expression via reactive oxygen species generation. *Am J Physiol* 2002; 283: H2054-H2061.

498. **Menger MD.** Microcirculatory disturbances secondary to ischemia-reperfusion. *Transplantat Proc* 1995; 27: 2863-2865.
499. **Tsao PS, Ma X and Lefer AM.** Activated neutrophils aggravate endothelial dysfunction after reperfusion of the ischemic feline myocardium. *Am Heart J* 1992; 123: 1464-1471.
500. **Forslund T and Sundqvist T.** Nitric oxide reduces hydrogen peroxide production from human polymorphonuclear neutrophils. *Eur J Clin Invest* 1995; 25: 9-14.
501. **Kubes P.** Nitric oxide induced microvascular permeability alterations: a regulatory role for cGMP. *Am J Physiol* 1993; 265: H1909-H1915.
502. **Bounous G and McArdle AH.** Release of intestinal enzymes in acute mesenteric ischemia. *J Surg Res* 1969; 9: 339-346.
503. **Williams LF.** Vascular insufficiency of the intestines. *Gastroenterology* 1971; 61: 757-777.
504. **Filez L, Stalmans W, Penninckx F and Kerremans R.** Influences of ischemia and reperfusion on the feline small intestinal mucosa. *J Surg Res* 1990; 49: 157-163.
505. **Horton JW.** Alterations in intestinal permeability and blood flow in a new model of mesenteric ischemia. *Circ Shock* 1992; 36: 134-139.
506. **Amano H, Bulkley GH, Gorey T, Hamilton SR, Horn SD and Zuidema GD.** Role of microvascular patency in the recovery of small intestine from ischemic injury. *Surg Forum* 1980; 31: 157-159.
507. **Robinson JW, Mirkovitch V, Winstörfer B and Saegesser F.** Response of the intestinal mucosa to ischaemia. *Gut* 1981; 22: 512-527.
508. **Henninger DD, Granger DN and Yee T.** Enterocyte respiration rates in feline small intestine exposed to graded ischemia. *Am J Physiol* 1995; 268: G116-G120.
509. **Udassin R, Vromen A and Haskel Y.** The time sequence of injury and recovery following transient reversible intestinal ischemia. *J Surg Res* 1994; 56: 221-225.
510. **Punch J, Rees R, Cashmer B, Wilkins E, Smith D and Till GO.** Xanthine oxidase: its role in the no-reflow phenomenon. *Surgery* 1992; 111: 169-176.
511. **Kloner RA, Przyklenk K, Whittaker P and Hale S.** Preconditioning stimuli and inadvertent preconditioning. *J Mol Cell Cardiol* 1995; 27: 743-747.
512. **Riepe MW, Esclaire F, Kasischke K, Schreiber S, Nakase H, Kempinski O, Ludolph AC, Dirnagl U and Hugon J.** Increased hypoxic tolerance by chemical inhibition of oxidative phosphorylation: "Chemical preconditioning". *J Cereb Blood Flow Metab* 1997; 17: 257-264.
513. **Osborne DL, Aw TY, Cepinkas G and Kvietys PR.** Development of ischemia/reperfusion tolerance in the rat small intestine. An epithelium independent event. *J Clin Invest* 1994; 94: 1910-1918.
514. **Miner TJ, Tavaf-Motamen H, Stojadinovic A and Shea-Donohue T.** Ischemia-reperfusion protects the rat small intestine against subsequent injury. *J Surg Res* 1999; 82: 1-10.
515. Real Decreto 223/1988, de 14 de marzo, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. BOE 18 de marzo de 1988, 8509-8511.
516. Decret 214/1997, de 30 de juliol, pel qual es regula la utilització d'animals per a experimentació i per a altres finalitats científiques. DOGC Num. 2450 – 7.8.1997, 9169-9174.
517. **Thomas G.** Mechanism of ionophore A23187 induction of plasma protein leakage and of its inhibition by indomethacin. *Eur J Pharmacol* 1982; 81: 35-42.
518. **Harada M, Takeuchi M, Fukao T and Katagiri K.** A simple method for the quantitative extraction of dye extravasated into the skin. *J Pharm Pharmacol* 1971; 23: 218-219.
519. **Rogers DF, Boscheto P and Barnes PJ.** Plasma exudation. Correlation between Evans blue dye and radiolabeled albumin in guinea pig airways in vivo. *J Pharmacol Methods* 1989; 21: 309-315.

-
520. **Udaka K, Takeuchi Y and Movat HZ.** Simple Method for quantitation of enhanced vascular permeability. *Proc Soc Exp Biol Med* 1970; 133: 1384-1387.
521. **Rawson RA.** The binding of T-1824 and structurally related diazo dyes by the plasma proteins. *Am J Physiol* 138: 708-717. 1943.
522. **LeeVeen HH and Fishman WH.** Combination of Evans blue with plasma protein: Its significance in capillary permeability studies, blood dye disappearance curves, and its use as a protein tag. *Am J Physiol* 1947; 151: 26-33.
523. **Greenhouse SW and Geisser S.** On methods in the analysis of profile data. *Psychometrika* 1959; 24: 95-112.
524. **Armitage P and Berry G.** Mediciones múltiples. En: *Estadística para la investigación biomédica*. Ed: DOYMA (Barcelona). 1992; 346-416.
525. **Riba MD.** Diseños de medidas repetidas. En: *Modelo lineal de análisis de la variancia*. Ed. Herder (Barcelona). 1990; 167-213.
526. **Kurlberg G, Lundholm K and Haglund E.** Effects of hypoperfusion on small intestinal mucosal morphology and intestinal barrier function. *Scand J Gastroenterol* 1996; 31: 682-687.
527. **Boley SJ, Regan JA, Tunick PA, Everhard ME, Winslow PR and Veith FJ.** Persistent Vasoconstriction. A major factor in nonocclusive mesenteric ischemia. *Curr Top Surg Res* 1971; 3: 425-433.
528. **MacAllister RJ, Calver AL, Collier J, Edwards CMB, Herreros B, Nussey SS and Vallance P.** Vascular and hormonal responses to arginine: provision of substrate for nitric oxide or non-specific effect? *Clin Sci* 1995; 89: 183-190.
529. **Stojadinovic A, Kiang J, Smallridge R, Galloway R and Shea-Donohue T.** Induction of heat-shock protein 72 protects against ischemia/reperfusion in rat small intestine. *Gastroenterology* 1995; 109: 505-515.
530. **Cicalese L, Lee K, Schraut W, Watkins S, Borle A and Stanko R.** Pyruvate prevents ischemia-reperfusion mucosal injury of rat small intestine. *Am J Surg* 1996; 171: 97-101.
531. **Ward DT, Lawson SA, Gallagher CM, Conner WC and Shea-Donohue T.** Sustained nitric oxide production via L-arginine administration ameliorates effects of intestinal ischemia-reperfusion. *J Surg Res* 2000; 89: 13-19.
532. **Perry MA and Granger DN.** Leukocyte adhesion in local versus hemorrhage induced ischemia. *Am J Physiol* 1992; 263: H810-H815.
533. **Mueller AR, Platz KP, Langrehr JM, Hoffman RA, Nussler AK, Nalesnik M, Billiar TR and Schraut WH.** The effects of administration of nitric oxide inhibitors during small bowel preservation and reperfusion. *Transplantation* 1994; 58: 1309-1316.
534. **Jordan PH, Boulafendis D and Guinn GA.** Factors other than major vascular occlusion that contribute to intestinal infarction. *Ann Surg* 1970; 171: 189-194.
535. **Willcox MG, Howard TJ, Plaskon LA, Unthank JL and Madura JA.** Current theories of pathogenesis and treatment of nonocclusive mesenteric ischemia. *Dig Dis Sci* 1995; 40: 709-716.
536. **Madara JL.** Loosening tight junctions: lessons from the intestine. *J Clin Invest* 1989; 83: 1089-1094.
537. **Naftalin RJ and Tripathi S.** Passive water flows driven across the isolated rabbit ileum by osmotic, hydrostatic and electrical gradients. *J Physiol* 1985; 360: 27-50.
538. **Granger DN and Taylor AE.** Permeability of intestinal capillaries to endogenous macromolecules. *Am J Physiol* 1980; 238: H457-H464.
539. **Madara JL and Trier JS.** The functional morphology of the mucosa of small intestine. In: *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, 3th ed. Ed: Leonard RJ. Raven Press (New York). 1994; 1577-1622.

-
540. **Loong CC, Chiu JH, Tiao RC, Chiu YY, Wu CW, and Lui WY.** Pretreatment with magnolol attenuates ischemia-reperfusion injury in rat small intestine. *Transplant Proc* 2001; 33: 3737-3738.
541. **Mirkovitch V, Menge H and Robinson J.** Protection of the intestinal mucosa during ischaemia by intraluminal perfusion. *Res Exp Med* 1975; 166: 183-191.
542. **Robinson J and Mirkovitch V.** The roles of intraluminal oxygen and glucose in the protection of the rat intestinal mucosa from the effects of ischaemia. *Biomedicine* 1977; 27: 60-62.
543. **Day MD.** α -adrenoceptor blocking agents. In: *Autonomic Pharmacology. Experimental and Clinical Aspects*. Ed: Churchill Livingstone. 1979; 181-196.
544. **Day MD.** Adrenoceptor stimulants. In: *Autonomic Pharmacology. Experimental and Clinical Aspects*. Ed: Churchill Livingstone. 1979; 125-162.
545. **Bennett MA, Watt PA and Thurston H.** Endothelium dependent modulation of resistance vessel contraction: studies with N^G-nitro-L-arginine methyl ester and N^G-nitro-L-arginine. *Br J Pharmacol* 1992; 107: 616-621.
546. **Wolbarsht ML and Fridovich I.** Hipótesis: hyperoxia during reperfusion is a factor in reperfusion injury. *Free Radic Biol Med* 1989; 6: 61-62.
547. **Mickel HS.** Hyperoxia during reperfusion is a factor in reperfusion injury. *Free Radic Biol Med* 1990; 8: 269.
548. **Barja de Quiroga G.** Hypothesis that the acidification of a tissue which takes place during ischemia can lead to tissue hyperoxia during reperfusion due to the Bohr effect. *Free Radic Biol Med* 1990; 8: 487-489.
549. **Anup R, Aparna V, Pulimood A and Balasubramanian KA.** Surgical stress and the small intestine: Role of oxygen free radicals. *Surgery* 1999; 125: 560-569.
550. **Anup R, Susama P and Balasubramanian KA.** Role of xanthine oxidase in small bowel mucosal dysfunction after surgical stress. *Br J Surg* 2000; 87: 1094-1101.
551. **Thomas S, Ramachandran A, Patra S, Vidyasagar S and Balasubramanian KA.** Nitric oxide protects the intestine from the damage induced by laparotomy and gut manipulation. *J Surg Res* 2001; 99: 25-32.
552. **Thomas S, Karnik S and Balasubramanian KA.** Surgical manipulation of the small intestine and its effect on the lung. *J Surg Res* 2002; 106: 145-156.
553. **Sun J, Farias LA and Markov AK.** Fructose 1-6 diphosphate prevents intestinal ischemic reperfusion injury and death in rats. *Gastroenterology* 1990; 98: 117-126.
554. **Udassin R, Haskel Y and Samuni A.** Nitroxide radical attenuates ischemia/reperfusion injury to the rat small intestine. *Gut* 1998; 42: 623-627.
555. **Kuenzler KA, Pearson PY and Schwartz MZ.** IL-11 pretreatment reduces cell death after intestinal ischemia-reperfusion. *J Surg Res* 2002; 108: 268-272.
556. **Shigematsu S, Ishida S, Hara M, Takahashi N, Yoshimatsu H, Sakata T and Korthuis, J.** Resveratrol, a red wine constituent polyphenol, prevents superoxide-dependent inflammatory responses induced by ischemia/reperfusion, platelet-activating factor, or oxidants. *Free Radic Biol Med* 2003; 34: 810-817.
557. **Puig JG, Mateos FA and Diaz VD.** Inhibition of xanthine oxidase by allopurinol: a therapeutic option for ischaemia induced pathological processes? *Ann Rheum Dis* 1989; 48: 883-888.
558. **Garcia Garcia J, Martín Rollan C, Refoyo Enriquez MA, Holgado Madruga M, Mariño Hernández E, Macías Nuñez JF and Gomez Alonso A.** Improved survival in intestinal ischemia by allopurinol not related to xanthine-oxidase inhibition. *J Surg Res* 1990; 48: 144-146.
559. **Gutteridge JMC.** Iron promotes of the Fenton reaction and lipid peroxidation can be released from haemoglobin by peroxides. *FEBS Lett* 1986; 201: 291-295.

-
560. **Peterson DA, Kelly B and Gerrard JM.** Allopurinol can act as an electron transfer agent. Is this relevant during reperfusion injury? *Biochem Biophys Res Commun* 1986; 137: 76-79.
561. **Das DK, Engelman RM, Clement R, Otani H, Prasad MR and Rao PS.** Role of xanthine oxidase inhibitor as free radical scavenger: A novel mechanism of action of allopurinol and oxypurinol in myocardial salvage. *Biochem Biophys Res Commun* 1987; 148: 314-319.
562. **Moorhouse PC, Grootveld M, Halliwell B, Quinlan JG and Gutteridge JMC.** Allopurinol and oxypurinol are hydroxyl radical scavengers. *FEBS Lett* 1987; 213: 23-28.
563. **Faure M, Lissi EA and Videla LA.** Antioxidant capacity of allopurinol in biological systems. *Biochem Int* 1990; 21: 357-366.
564. **Jaeschke H.** Xanthine oxidase-induced oxidant stress during hepatic ischemia-reperfusion: Are we coming full circle after 20 years?. *Hepatology* 2002; 36: 761-763.
565. **Ko KM and Godin DV.** Inhibition of transition metal ion-catalysed ascorbate oxidation and lipid peroxidation by allopurinol and oxypurinol. *Biochem Pharmacol* 1990; 40: 803-809.
566. **Chudej LL, Koke JR and Bittar N.** Evidence for transcytosis of exogenous superoxide dismutase and catalase from coronary capillaries into dog myocytes. *Cytobios* 1990; 63: 41-53.
567. **Kyle ME, Nakae D, Sakaida Y, Miccadei S and Farber JL.** Endocytosis of superoxide dismutase is required in order for the enzyme to protect hepatocytes from the cytotoxicity of hydrogen peroxide. *J Biol Chem* 1988; 263: 3784-3789.
568. **Huber W and Saifer MGP.** Orgotein, the drug version of bovine Cu-Zn superoxide dismutase. I. A summary account for of safety and pharmacology in laboratory animals. In: *Superoxide and superoxide dismutases*. Ed: Michelson AM, McCord JM and Fridovich I. Academic Press Inc. (London) LTD. 1977; 517-549.
569. **Huber W, Saifer MGP and Williams LD.** Superoxide dismutase pharmacology and orgotein efficacy: new perspectives. In: *Developments in Biochemistry. Vol. 11B: Biological and Clinical Aspects of Superoxide and superoxide dismutase*. Ed: Bannister WH and Bannister J V. Elsevier North Holland, Inc. (New York). 1980; 395-407.
570. **Bannister WH.** From haemocuprein to copper-zinc superoxide dismutase: A history on the fiftieth anniversary of the discovery of haemocuprein and the twentieth anniversary of the discovery of superoxide dismutase. *Free Rad Res Commun* 1988; 5: 35-42.
571. **Omar BA and McCord JM.** Interstitial equilibration of superoxide dismutase correlates with its protective effect in the isolated rabbit heart. *J Mol Cell Cardiol* 1991; 23: 149-159.
572. **Senga S, Onituka A, Hirose H, Yamamoto K and Niwa K.** Protective effect of liposomal encapsulated superoxide dismutase on ischemically injured liver in the rat. *Transplant Proc* 1990; 22: 2025-2026.
573. **Korthuis RJ, Kubes P, Tso P, Perry M and Granger DN.** Transport kinetics for superoxide dismutase and catalase between plasma and interstitial fluid in the rat small intestine. *Free Radic Biol Med* 1991; 11: 293-298.
574. **Turrens JF, Crapo JD and Freeman BA.** Protection against oxygen toxicity by intravenous injection of liposome entrapped catalase and superoxide dismutase. *J Clin Invest* 1984; 73: 87-95.
575. **Greenwald RA.** Current approaches to the development of oxygen radical scavengers. *Drugs of Today* 1990; 26: 299-307.
576. **Beckman JS, Minor RL Jr, White CW, Repine JE, Rosen GM and Freeman BA.** Superoxide dismutase and catalase conjugated to polyethylene glycol increases endothelial enzyme activity and oxidant resistance. *J Biol Chem* 1988; 263: 6884-6892.
577. **Wong K, Cleland LG and Poznansky MJ.** Enhanced anti-inflammatory effect and reduced immunogenicity of bovine liver superoxide dismutase by conjugation with homologous albumin. *Agents Actions* 1980; 10: 231-239.

-
578. **Freeman BA, Young SL and Crapo JD.** Liposome mediated augmentation of superoxide dismutase in endothelial cells prevents oxygen injury. *J Biol Chem* 1983; 258: 12534-12542.
579. **Jadot G and Michelson AM.** Comparative antiinflammatory activity of different superoxide dismutases and liposomal SOD in ischemia. *Free Rad Res Commun* 1987; 3: 389-394.
580. **Jadot G, Vaile A, Maldonado J and Vanelle P.** Clinical pharmacokinetics and delivery of bovine superoxide dismutase. *Clin Pharmacokinet* 1995; 28: 17-25.
581. **Omar BA and McCord JM.** The cardioprotection effect of Mn-superoxide dismutase is lost at high doses in the postischemic isolated rabbit heart. *Free Radic Biol Med* 1990; 9: 473-478.
582. **Archer S.** Measurement of nitric oxide in biological models. *FASEB J* 1993; 7: 349-360.
583. **Christodoulou D, Kudo S, Cook JA, Krishna MC, Miles A, Grisham MB, Murugesan R, Ford PC and Wink DA.** Electrochemical methods for detection of nitric oxide. *Methods Enzymol* 1996; 268: 69-83.
584. **Brien JF, McLoughlin BE, Nakatsu K and Marks GS.** Chemiluminescence headspace-gas analysis for determination of nitric oxide formation in biological systems. *Methods Enzymol* 1996; 268: 83-92.
585. **Granger DL, Taintor RR, Boockvar KS and Hibbs JB Jr.** Measurement of nitrate and nitrite in biological samples using nitrate reductase and griess reaction. *Methods Enzymol* 1996; 268: 142-151.
586. **Kubes P, Reinhardt PH, Payne D and Woodman RC.** Excess nitric oxide does not cause cellular, vascular, or mucosal dysfunction in the cat small intestine. *Am J Physiol* 1995; 269: G34-G41.
587. **Rehman A, Whiteman M and Halliwell B.** Scavenging of hydroxyl radicals but not of peroxynitrite by inhibitors and substrates of nitric oxide synthases. *Br J Pharmacol* 1997; 122: 1702-1706.
588. **Lass A, Suessenbacher A, Wölkart G, Mayer B and Brunner F.** Functional and analytical evidence for scavenging of oxygen radicals by L-arginine. *Mol Pharmacol* 2002; 61: 1081-1088.
589. **Adams MR, Phu CV, Stocker R and Celermajer DS.** Lack of antioxidant activity of the antiatherogenic compound L-arginine. *Atherosclerosis* 1999; 146: 329-335.
590. Manual de estilo. Publicaciones biomédicas. Ed. Mosby/Doyma Libros (Barcelona). 1993.

Abreviaciones

ABREVIATURAS, SIGLAS Y SÍMBOLOS

Å	Ángstrom
α	Probabilidad del error tipo I
5-HT	5-hidroxitriptamina, serotonina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Adenosindifosfato
AMP	Adenosinmonofosfato
AMPc	Adenosinmonofosfato cíclico
ATP	Adosintrifosfato
CoQH₂	Forma reducida de la coenzima Q
COX	Ciclooxigenasa
Cr	Creatina
DE	Desviación estándar de la muestra
DHA	Deshidroascorbato
D-NAME	N ^G -nitro-D-arginina metil éster
EC-SOD	Superóxido dismutasa extracelular
eNOS	NO sintasa endotelial
ERDON	Especies reactivas derivadas del óxido nítrico
ET	Endotelina
F	Distribución F
FAD	Dinucleótido de flavina y adenina
FADH₂	Dinucleótido de flavina y adenina reducido
FMN	Flavín mononucleótido
G-6-PD	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato dehidrogenasa
GDP	Guanosindifosfato
GHK:Cu(II)	Glicil-L-histidil-L-lisina
GMPc	Guanosinmonofosfato cíclico
GTP	Guanosintrifosfato
Hb(Fe²⁺)-NO	Ferro nitrosil hemoglobina
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenoso
I/R	Isquemia/reperfusión
IC 95 %	Intervalo de confianza del 95 %
ICAM-1	Molécula de adhesión intracelular-1
ICAM-2	Molécula de adhesión intracelular-2
IMP	Inosinmonofosfato

iNOS	NO sintasa inducible
LDH	Lacticodehidrogenasa
L-DMA	$N^G, N^{G'}$ -dimetil-L-arginina
L-NAME	N^G -nitro-L-arginina metil éster
M	Abreviatura de molar
mtNOS	NO sintasa mitocondrial
NAD⁺	Nicotinamida adenindinucleótido
NADH	Nicotinamida adenindinucleótido reducido
NADH-Q	Nicotinamida adenindinucleótido reducido ubiquinona oxidoreductasa
NADPH	Nicotinamida adenindinucleótido fosfato reducido
NMDA	N-metil-D-aspartato
nNOS	NO sintasa neuronal
NOS	NO sintasa
°C	Grados centígrados
P	Probabilidad
PAF	Factor activador de las plaquetas
pCO₂	Presión parcial de dióxido de carbono
PCr	Fosfocreatina
PGH₂	Prostaglandina H ₂
PGI₂	Prostaciclina
PM	Peso molecular
pO₂	Presión parcial de oxígeno
PPi	Pirofosfato
PRPP	5-fosforibosil-1-pirofosfato
PSGL-1	Glicoproteína ligando de la P-selectina
r.p.m.	Revoluciones por minuto
SNO-Hb	S-nitrosohemoglobina
SOD	Superóxido dismutasa
t	Distribución t de Student
TNFα	Factor de necrosis tumoral alfa
TXA₂	Tromboxano A ₂
VCAM-1	Molécula vascular de adhesión celular-1

NOMENCLATURA QUÍMICA

¹O₂	Oxígeno singlete
•OH	Radical hidroxilo o monóxido de hidrógeno
Cl	Símbolo químico del cloro

CO₃^{•-}	Radical carbonato
Cu	Símbolo químico del cobre
Fe	Símbolo químico del hierro
H	Símbolo químico del hidrógeno
H₂O	Agua
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
HCO₃⁻	Bicarbonato
HNO₂	Ácido nitroso
HO₂[•]	Radical hidroperoxilo o dióxido de hidrógeno
HOCl	Ácido hipocloroso
Mg	Símbolo químico del magnesio
Mn	Símbolo químico del manganeso
NO⁻	Nitroxilo u oxonitrato(1-)
NO[•]	Óxido nítrico o monóxido de nitrógeno
NO⁺	Nitrosonio o nitrosilo
NO₂⁻	Nitrito o dioxonitrato(1-)
NO₂[•]	Dióxido de nitrógeno
NO₂⁺	Ion nitronio
NO₃⁻	Nitrato o trioxonitrato(1-)
NO_x	Especies reactivas del óxido nítrico derivadas de su oxidación por el oxígeno molecular
O₂	Oxígeno molecular
O₂^{•-}	Radical superóxido o dióxido(1-)
OH⁻	Ion hidroxilo
ONOO⁻	Peroxinitrito u oxoperoxonitrato(1-)
ONOOH	Ácido peroxinitroso
ONOCO₃⁻	Anión nitrosoperoxocarbonato
P_i	Ortofosfato, fósforo inorgánico
RNH₂	Aminas primarias
RNHCl	N-cloraminas
RO[•]	Radical alcoxilo
ROO[•]	Radical peroxilo
ROONO y RONO	Peroxinitritos orgánicos especies no radicales derivadas del nitrógeno
Zn	Símbolo químico del cinc