



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

**Estudio de la acción del inhibidor
de la peroxidación lipídica U74389G sobre la barrera
intestinal en un modelo de isotrasplante heterotópico
de intestino delgado en la rata**

Josep Vallet Fernàndez



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – SenseObraDerivada 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – SinObraDerivada 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 4.0. Spain License.**

Universitat de Barcelona

Facultat de Medicina

Departament de Medicina

ESTUDIO DE LA ACCION DEL INHIBIDOR DE LA
PEROXIDACION LIPIDICA U74389G SOBRE LA BARRERA
INTESTINAL EN UN MODELO DE ISOTRASPLANTE
HETEROTOPICO DE INTESTINO DELGADO EN LA RATA

Tesis que presenta el Llicenciat **Josep Vallet Fernández**
per a optar al grau de Doctor en Medicina y Cirugía. Aquest treball
ha estat dirigit pel Dr **Javier de Oca Burguete**

Barcelona, abril de 1997





UNIVERSITAT DE BARCELONA Divisió de Ciències de la Salut

Campus de Bellvitge
C/ Feixa Llarga, s/n.
08907 L'Hospitalet de Llobregat
(Barcelona)
Tel. (93) 402 42 60
Fax (93) 402 42 03

Facultat de Medicina

 Institut Català de la Salut
Ciutat Sanitària
de Bellvitge

Javier de Oca Burguete, Profesor Asociado de Cirugía de la Facultad de Medicina de la Universidad de Barcelona

CERTIFICA

que el trabajo titulado *Estudio de la acción del inhibidor de la peroxidación lipídica U74389G sobre la barrera intestinal en un modelo de isotrasplante heterotópico de intestino delgado en la rata*, del que es autor el Ldo. José Vallet Fernández, ha sido realizado bajo mi dirección y reúne los requisitos necesarios para ser leída ante el Tribunal correspondiente, a fin de optar al grado de doctor.

Y para que así conste, se emite la presente certificación en Barcelona, a uno de abril de mil novecientos noventa y siete.


Dr. J. de Oca Burguete

A mi padre, aunque ya no está aquí para verlo,
a mi madre, ellos lo han sido todo.
A Pepi, mi mujer, solo su paciencia es comparable a su amor.

Agradecimientos:

Al Dr **Javier de Oca**, director de este trabajo. Por confiar en mí, por brindarme una verdadera amistad y por ser al mismo tiempo, una fuente inagotable de ilusión y pasión por la investigación. Sin su ayuda y orientación este trabajo no habría sido posible.

Al Prof. **Eduardo Jaurrieta**, en cuyo Servicio me formé como Cirujano y como persona. Su sencillez, afabilidad y accesibilidad, aún a pesar de su enorme prestigio, le engrandecen.

Al Dr **Miguel Nieto**, mi primer maestro en el arte de la Cirugía, mi primer amigo en mi etapa como residente y una de las pocas personas a las que ha preocupado mi futuro en el difícil y poco gratificante mundo de la Cirugía Catalana. Los políticos que rigen nuestros destinos "miran a otro lado".

A todos aquellos miembros del Servicio de Cirugía del Hospital de Bellvitge, que a lo largo de mi formación como Residente intentaron enseñarme las bases del arte de la Cirugía, en especial a los Dres **Joan Martí Ragué, Joan Figueras Felip** y sus equipos.

Al Dr **Javier Serra**. Aprecia y sabe transmitir la Ciencia de la Estadística como si de un buen Blues de E.C. se tratara. Su desinteresada colaboración ha sido indispensable en el presente trabajo.

A las Dras **Susana Cuadrado y Carla Bettonica**. Estuvimos en el mismo barco del trasplante intestinal.

A mis amigos del Hospital de Sant Boi, Dres **Lopez Negre, Lorente y Urgelles**. Ellos guiaron mis primeros pasos en la Cirugía y me orientaron hacia la vía correcta de formación como Cirujano.

Al Dr **Leandre Farràn** amigo incondicional donde los haya.

A mis amigos y compañeros del Hospital de Viladecans, Dres **Pi, Calabuig, Sueiras y M^aJ Galera**, siempre dispuestos a aconsejarme y ayudarme en todo. Son, después de mi mujer, quienes más de cerca han vivido la recta final de este trabajo, y a pesar de ello no huían al verme.

A mis compañeros de Residencia del Hospital de Bellvitge, que compartieron conmigo largas horas diurnas y nocturnas convirtiéndose en mi segunda familia.

A mis amigos y compañeros del Hospital de Igualada.

A **Albert Castells** y a la Dra **Concha Fiol** que realizaron todas las determinaciones bioquímicas. Sin ellos este trabajo no hubiera llegado a buen puerto.

A las Dras **Carmen Ardanuy** y **Amparo García** cuya colaboración en el estudio microbiológico fue indispensable.

A todo el personal de la URE, en especial a **Rosa Perez, Charo Gonzalez y Neus Gomez**.

A los Laboratorios **Pharmacia-Upjohn** por el aporte científico y económico prestados de manera desinteresada para la realización de este estudio.

ABREVIATURAS UTILIZADAS

| | |
|-------------------------------|---|
| 21-A | 21 aminosteroides |
| ADN | Acido desoxirribonucleico |
| ATP | Adenosin trifosfato |
| C5A | Factor 5 del complemento |
| e ⁻ | Electrón |
| EIFH | Enfermedad del injerto frente al huesped |
| GLM | Ganglios linfáticos mesentericos |
| GSH | Glutation reducido |
| GSSG | Glutation oxidado |
| H ₂ O ₂ | Peróxido de hidrógeno |
| LPO | Lipoperoxidación o peroxidación lipídica |
| LOO [•] | Radical peroxilo |
| LO [•] | Radical alcoxi |
| LT | Leucotrieno |
| L [•] | Radical lípido |
| MDA pl. | Malondialdehido plasmático |
| MDA t. | Malondialdehido tisular |
| NAD ⁺ | Nicotinamidadeninucleótido oxidado |
| NADH | Nicotinamidadeninucleótido reducido |
| NADP ⁺ | Nicotinamidadeninucleótido fosfato oxidado |
| NADPH | Nicotinamidadeninucleótido fosfato reducido |
| NO | Oxido nítrico |
| NPT | Nutrición parenteral total |
| O ₂ ⁻ | Radical superóxido |
| OH [•] | Radical hidroxilo |
| PAF | Factor de agregación plaquetar |
| PMN | Leucocitos polimorfonucleares |
| Pm | Peso molecular |
| RL | Solución de Ringer lactato |
| RLO | Radicales libres de oxígeno |
| SIR | Síndrome de isquemia reperfusión |
| SNC | Sistema nervioso central |
| SOD | Superóxido dismutasa |
| TB | Translocación bacteriana |
| TID | Trasplante de intestino delgado |
| UW | Solución de la Universidad de Wisconsin |
| XD | Xantin deshidrogenasa |
| XO | Xantin oxidasa |

ÍNDICE

1 FUNDAMENTOS

| | |
|--|----|
| 1.1.- Introducción | 1 |
| 1.2.- Especies de radicales libres de oxígeno (RLO) | 15 |
| 1.3.- Mecanismos de producción de los RLO | 23 |
| 1.4.- Acción tóxica de los RLO y sus mecanismos: | 35 |
| Estructura y función de las membranas. | |
| Peroxidación lipídica. | |
| Mecanismos de protección frente a los RLO. | |
| Acción de los leucocitos polimorfonucleares (PMN). | |
| 1.5.- Lesiones asociadas al síndrome de isquemia-reperfusión y sus particularidades a nivel intestinal. | 53 |
| 1.6.- Translocación bacteriana. Concepto y mecanismos | 63 |

| | |
|---|-----|
| 1.7.- Preservación intestinal. Opciones terapéuticas: | 69 |
| Efectos del enfriamiento tisular. | |
| Bioquímica de la hipotermia. | |
| Soluciones de preservación. | |
| Posibilidades terapéuticas. | |
| 21-Aminosteroides o lazaroides. | |
| | |
| 2.- HIPOTESIS DE TRABAJO y FUNDAMENTOS | 89 |
| | |
| 3.- OBJETIVOS | 95 |
| | |
| 4.- MATERIAL Y METODOS | 99 |
| | |
| 5.- RESULTADOS | 123 |
| | |
| 6.- DISCUSION | 159 |
| | |
| 7.- CONCLUSIONES | 183 |
| | |
| 8.- CITAS BIBLIOGRÁFICAS | 189 |

1. FUNDAMENTOS.

La evolución del **trasplante intestinal** en humanos no ha discurrido pareja con la de otros órganos debido entre otras razones a su complejidad inmunológica, a su dependencia como reservorio de gérmenes y a su extremada susceptibilidad a los insultos metabólicos. Uno de los motivos de este retraso evolutivo, aparte de las dificultades inherentes al órgano, se debe a la existencia de una opción terapéutica bien establecida como es la nutrición parenteral total (NPT), que permite una supervivencia relativamente exenta de riesgos al paciente, pero que en modo alguno es excluyente de un futuro trasplante intestinal.

La NPT utilizada como terapéutica a largo plazo implica, no obstante, una clara incomodidad para el paciente y la potencial aparición de importantes problemas médicos que a grandes rasgos, podríamos resumir en hepatotoxicidad y en sepsis de catéter.

Las indicaciones de NPT prolongada y de trasplante intestinal se encuentran fundamentalmente en el síndrome de intestino corto, las malformaciones intestinales congénitas y en el Síndrome de pseudoobstrucción intestinal crónica. Las únicas alternativas terapéuticas hasta la fecha han sido las distintas opciones quirúrgicas para enlentecer el tránsito intestinal o aumentar la superficie absorptiva¹ del intestino remanente para el caso del intestino corto, pero estas técnicas tienen la limitación de que se precisa un mínimo de superficie mucosa sobre la que poder trabajar, que no siempre estará disponible.

La historia del trasplante intestinal, se remonta al año 1959 en que Lillehei realizó el primer injerto experimental en el perro ² y a 1963, en que el mismo autor practicó el primer trasplante intestinal en humanos³. Sus primeras experiencias fueron con autoinjertos en perros, demostrando que era posible la extracción y posterior injerto de un segmento intestinal. Cuando intentó el primer aloinjerto, Lillehei comprobó que ninguno sobrevivía y que los únicos agentes inmunosupresores en uso en aquel tiempo no conseguían controlar los fenómenos inmunológicos de rechazo bidireccional que caracterizan a los injertos de intestino ^{4,5}. En la década de los 80, los grupos de Kiel y París en Europa y London (Ontario) en Canadá destacan, por poner en marcha sus programas de trasplante intestinal aunque con poco éxito hasta el momento^{6,7,8,9}. Un momento importante, lo marcó Craddock en 1983 al utilizar la ciclosporina como droga inmunosupresora en perros, multiplicando por 10 el tiempo de supervivencia conseguido hasta el momento ¹⁰. En 1988 Grant, en Canadá, consiguió similares resultados en cerdos ¹¹.

La investigación en el campo del trasplante intestinal reúne diversos ámbitos, como son la **preservación del órgano, los cuidados postoperatorios y el manejo de la inmunosupresión** del paciente. Dadas las peculiaridades del intestino, dichos ámbitos constituyen campos de la investigación apasionantes y desalentadores al mismo tiempo. En 1971, Monchik y Russell ¹² describieron por vez primera la técnica del trasplante intestinal en ratas. Hasta ese momento, Lillehei² había trasplantado distintas longitudes de injerto en perro, pero tratándose de un mamífero superior con su gran complejidad

inmunológica, permitía pocos estudios. A grandes rasgos la técnica de Monchik y Russell consiste en la extracción del injerto de intestino delgado, cuyos pedículos vasculares están constituidos por un segmento aórtico del que nace la arteria mesentérica superior y el drenaje venoso, formado por la vena porta aislada, tras obliterar todas sus tributarias, El implante se efectúa mediante anastomosis arterial aorto-aórtica y venosa portocava, finalmente el injerto es exteriorizado mediante la creación de dos estomas quedando en posición heterotópica y dejando el intestino nativo.

El intestino, cuando es trasplantado, no sólo es rechazado por el huésped, sino que a su vez el injerto por su gran riqueza linfoide también reacciona contra el huésped. Ello es conocido por enfermedad del injerto frente al huésped y dicha entidad fue caracterizada gracias a la innovación introducida por Monchik y Russell ¹². Estos autores consiguieron ratas híbridas a base de cruzar cepas isogénicas de la misma especie. De acuerdo con los principios mendelianos, los híbridos poseen todos los genes de histocompatibilidad presentes en cada una de las cepas progenitoras. De esta manera el animal híbrido no reconoce como extraños los tejidos de sus progenitores cuando le son injertados y es posible el estudio de los fenómenos inmunológicos en un solo sentido en forma de **enfermedad del injerto frente al huésped (EIFH)**. Análogamente, si se implanta un intestino híbrido a un animal de cepa progenitora, los fenómenos inmunes van en el sentido del **rechazo puro** sin interferencias en sentido inverso, puesto que el injerto intestinal, reconoce como propios los tejidos del huésped.

Se trata por consiguiente de **modelos semialogénicos o unidireccionales**, en contraposición a los **modelos bidireccionales a alogénicos completos** en los que se superponen los fenómenos de rechazo a los de la EIFH. La consecución de los animales híbridos también ha permitido la práctica de injertos isogénicos sin fenómenos de rechazo que permiten estudios funcionales sin la interferencia de factores inmunitarios.

Tras la descripción del modelo semialogénico de Monchik y Russell, han aparecido multitud de trabajos estudiando los diversos aspectos asociados al trasplante de intestino, como son la preservación del órgano, la técnica del implante y sus variantes en cuanto a posición del injerto (orto/heterotópico) y su drenaje venoso a la porta o a la cava, los problemas asociados a la denervación y obstrucción linfática del injerto, función endocrina tras el implante y, tal vez los aspectos más ampliamente estudiados referentes a los fenómenos inmunológicos.

Desde antiguo, se sabe que el frío tiene la propiedad de alargar el periodo de conservación de la materia orgánica, y ello se ha utilizado en algo tan cotidiano como la conservación de alimentos. Análogamente, la **hipotermia** constituye la **base física de la preservación de órganos**. Tan pronto como un tejido u órgano deviene isquémico, su aporte de metabolitos cesa, los productos del metabolismo se acumulan y se produce una lesión. El proceso de deterioro que se asocia a la isquemia se debe a reacciones químicas catalizadas por enzimas. La capacidad de catálisis de las enzimas es un rasgo fundamental que distingue a los organismos vivos de la materia inorgánica. La catálisis biológica, igual que la catálisis no biológica, tiene como misión aumentar la velocidad

de reacción mediante el descenso de la energía de activación. Todas las reacciones químicas tanto si son exotérmicas (con liberación de energía), como si son endotérmicas (con consumo de energía), se producen sólo si los reactivos se hallan en un estado de suficiente "actividad". Dicha energía se conoce con el nombre de energía de activación y se puede obtener mediante el calentamiento de los reactivos. La presencia de un catalizador hace que la energía de activación de la reacción sea menor.

Las enzimas reducen la energía de activación hasta el punto de que todas las reacciones ocurren a temperaturas por debajo de los 40 grados centígrados (t° corporal). La magnitud en que las enzimas reducen la energía de activación se puede ilustrar con el ejemplo de el agua oxigenada (H_2O_2), que para descomponerse espontáneamente requiere una energía de 76 kJ/mol; en presencia de platino coloidal, como catalizador, dicha energía es de 49kJ/mol y en presencia de la enzima catalasa esta energía se reduce a menos de 8 kJ/mol ¹³.

De las breves pinceladas sobre el concepto de enzima se deduce la importancia de reducir la temperatura del tejido que se pretende preservar antes de ser trasplantado. No obstante, el empleo del frío en la prevención de las lesiones por interrupción del flujo sanguíneo tiene sus limitaciones, que se imbrican con los fenómenos asociados a la isquemia en si misma.

La isquemia normotérmica produce una interrupción del flujo de oxígeno a las células. Como consecuencia del mismo, se detienen las vías normales del metabolismo energético, es decir, se detiene la fosforilación oxidativa a nivel mitocondrial. Ello se

asocia a un aumento de **NADH** y la deplección de **NAD⁺** en el interior de la mitocondria por la detención de las enzimas encargadas de transportarlos a través de la membrana mitocondrial. Por tanto, se **acumula NADH** y se **consume el ATP**. La **glucólisis anaerobia** que se inicia y que sólo es capaz de aprovechar un 5% del potencial energético de la glucosa, origina la **acumulación de iones lactato e hidrogeniones (H⁺)**. Este acúmulo descende el pH celular con la rotura de membranas, liberación de enzimas lisosomales y muerte celular ¹⁴.

Otro rasgo característico de la isquemia es el **edema celular**. En la base de dicho edema se sitúa la detención de la bomba de sodio-potasio (**Na⁺-K⁺ ATPasa**). Esta enzima se detiene tanto por la falta de **ATP**, como por la hipotermia que se utiliza en la preservación. Al detenerse la bomba, se altera la composición del medio intracelular con mayor presión osmótica que el medio extracelular. Se produce la entrada de sodio y agua al interior de la célula y la pérdida de potasio hacia el exterior con la consiguiente balonización ("swelling") y pérdida de arquitectura celular ¹⁴. El papel del edema en el conjunto de la lesión es tema de debate actual; en un modelo de edema celular renal mediante perfusión con un líquido hipotónico, en el que se consigue un edema equivalente, Jamart y Lambotte ¹⁵ encuentran que el edema causado por perfusión hipotónica es menos lesivo que el asociado a la lesión isquémica, es decir, en la isquemia existen otras vías lesionales al margen del edema asociado a los trastornos electrolíticos.

Todas las células del tejido isquémico se afectan en mayor o menor grado por el edema. A nivel de las células endoteliales de la microcirculación dicho edema origina defectos de llenado del lecho vascular del órgano en el momento de la reperfusión sanguínea. Dicho fenómeno se conoce con el nombre de falta de reperfusión o "**no reflow**". Cuando el órgano no ha sido correctamente lavado y quedan hematíes en su interior, estos también sufren el proceso de edematización y contribuyen a empeorar los defectos de perfusión ^{14, 16}.

Por todo lo dicho, cuando la isquemia es suficientemente prolongada, es en sí misma causa de muerte celular. Sin embargo, en isquemias cortas seguidas de reperfusión con sangre oxigenada se constatan una serie de lesiones características que constituyen el llamado **síndrome de isquemia-reperfusión (SIR)**. Existen numerosos trabajos experimentales que apoyan su existencia, como los trabajos de Parks y cols., los cuales demuestran que la lesión que se produce en un modelo de isquemia intestinal en el gato, es mucho mayor cuando el intestino es sometido a tres horas de isquemia y una hora de reperfusión, que si se le somete a cuatro horas de isquemia simple ¹⁷. Otra evidencia clara se halla en los trabajos de Korthuis y cols., que demuestra que la reperfusión tras isquemia de un tejido como el músculo esquelético con sangre oxigenada, es causante de una lesión mucho mayor que la causada tras la reperfusión con sangre anóxica ^{17, 18, 19}.

Así pues, aunque parece evidente que la única manera de evitar la muerte de un tejido anóxico es la restitución del oxígeno, se da la paradoja de que la reintroducción

del mismo es causante de lesión. Dicha lesión corre a cargo de especies químicas altamente reactivas (gran poder oxidante) surgidas de la reducción parcial del oxígeno y que se conocen como **radicales libres de oxígeno (RLO)**.

Los primeros seres vivos, sintetizaron glucosa a través de la fotosíntesis utilizando la energía luminica y desprendiendo oxígeno molecular (O_2) como producto derivado, creciendo de esta manera su concentración en el medio. La glucolisis en los albores de las formas de vida pluricelular, discurría por vías anaerobias. El O_2 es una especie altamente reactiva, principalmente en presencia de carbono, nitrógeno e hidrógeno a los que convierte en dióxido de carbono (CO_2), óxido nitroso (N_2O) y agua (H_2O).

El potencial oxidante del oxígeno y su creciente concentración en el medio, obligó a las células a desarrollar sistemas de defensa para su detoxificación intracelular. Muchas células de los organismos vivos actuales utilizan el potencial oxidante del oxígeno en el sistema del citocromo de manera muy ventajosa, acoplado la reducción tetravalente y conversión en agua del mismo a la generación de adenosintrifosfato (ATP). Este eficiente proceso es conocido como glucolisis aerobia y existen autores que han especulado si el sistema del citocromo no fue en épocas pretéritas un sistema defensivo, que posteriormente se adaptó como sistema generador de energía ²⁰

La responsabilidad de los RLO en las lesiones propias del SIR, queda patente en varios trabajos, como los de Parks y cols., los cuales demuestran que al introducir un

sistema generador de RLO en un intestino no sometido a isquemia se consigue reproducir las lesiones (aumento de permeabilidad vascular del órgano y lesiones de la mucosa) característicos en un modelo de isquemia reperfusión ²¹. En realidad los RLO han sido implicados como causantes de lesión, no solo a nivel intestinal, sino también en modelos de isquemia reperfusión hepática ²², cardíaca ²³ e incluso en patologías en las que al menos inicialmente no subyace una isquemia como la enfermedad inflamatoria intestinal ^{24,25}, la lesión hepática por endotoxina ²⁶, en pancreatitis experimental ²⁷ y en otras muchas entidades ²⁰, incluso el envejecimiento celular ²⁸.

De lo expuesto anteriormente, se deducen las líneas maestras a seguir en la preservación de órganos. Para ser apropiada, una solución de preservación debe tener una composición tal que: 1) **Minimice el edema intracelular** inducido por la hipotermia; 2) **Prevenga la acidosis intracelular**; 3) **Prevenga la expansión del espacio extracelular** durante el lavado del órgano; 4) **Prevenga las lesiones** causadas por los radicales libres de oxígeno (**RLO**) y 5) **Proporcione a la célula de sustrato para regenerar el ATP perdido** durante la isquemia fría, en el momento de la reperfusión^{29,16}.

1.2. Especies de radicales libres de oxígeno (RLO).

La mayoría de los elementos que se hallan en estado natural en nuestro planeta, y que están perfectamente identificados en la tabla periódica de los elementos son poco reactivos de manera espontánea. Ello se debe a que los átomos que los componen se hallan combinados entre sí o con otros átomos formando el elemento en estado molecular (dos o más átomos del mismo elemento enlazados) o formando compuestos. Los átomos, constituidos por partículas de cargas opuestas, necesitan equilibrar las fuerzas de atracción repulsión que surgen de la naturaleza intrínseca de las mismas. La arquitectura atómica está pues constituida por un núcleo central en el que se hallan las partículas positivas (o protones), junto a otras de carácter neutro (neutrones) y unas órbitas en las que se hallan las partículas negativas (electrones). Dentro de dichas órbitas, los electrones (e^-) se disponen en parejas con la característica de tener un sentido de giro sobre sí mismos, conocido como spin, opuesto en cada uno de ellos. Conforme los átomos son más grandes, van llenando sus orbitales con e^- de dentro a fuera.

La escasa reactividad, o estabilidad de los elementos en estado natural, se debe a la tendencia de los átomos a emparejar los electrones de sus capas más externas (o electrones de valencia) y compartirlos con los de otros átomos para formar enlaces, equilibrando las fuerzas de atracción-repulsión que origina la existencia de electrones desapareados en las capas más alejadas del núcleo del átomo. Existen una serie de elementos denominados gases nobles o inertes como el helio, el neón o el argón, que se caracterizan por ser monoatómicos y no formar compuestos. Esta característica es

debida a la distribución de sus electrones, que les confiere una alta estabilidad. A diferencia de ellos el oxígeno en su estado natural precisa hallarse en forma biatómica o molecular, por que al compartir los electrones, entre ambos átomos logran la formación de una molécula relativamente estable, y por tanto con escasa reactividad.

El oxígeno, no obstante, posee la particularidad de que dos de sus electrones de valencia se hallan en órbitas distintas (desapareados) con spin paralelo, es decir, más que por una auténtica molécula, el oxígeno está constituido por un birradical, lo cual le hace moderadamente reactivo aunque con poca capacidad de combinación a temperaturas fisiológicas.

El término radical libre se utiliza para designar aquellos átomos o moléculas, que contienen uno o más electrones desapareados, ya sea por pérdida o por ganancia de los mismos. Por convenio se suelen representar por el símbolo $R\cdot$. La presencia del mencionado electrón desapareado confiere a estas especies químicas una alta inestabilidad y por tanto una elevada reactividad química. En la mayoría de reacciones fisiológicas de los seres vivos no se generan especies de radicales libres. Sin embargo en ciertas circunstancias patológicas (multitud de procesos inflamatorios, agentes tóxicos, síndrome de isquemia reperusión)^{20, 22 23 25 26 30} e incluso fisiológicas (fagocitosis por neutrófilos)²⁰, se ven implicados los radicales libres.

Muchos de los procesos bioquímicos del metabolismo intermediario de los seres vivos consisten en reacciones de transferencias electrónicas en las que existe un dador inicial, varios aceptores/dadores intermediarios y un aceptor final. El oxígeno

molecular, es un aceptor terminal de electrones ideal para organismos cuyas fuentes energéticas, derivan de procesos de oxidación controlados de compuestos de carbono. Termodinámicamente, el oxígeno es ávido para aceptar electrones proveyéndose del necesario impulso para encadenar reacciones tales como la producción de ATP, dirigidas a almacenar energía para su consumo posterior. Como ya se mencionó, la molécula de oxígeno posee dos electrones desapareados, uno de los cuales debe sufrir una inversión de su spin para que una oxidación di o tetravalente pueda suceder. Esta particular distribución de electrones, le hace "reactivo" a participar en procesos de oxido-reducción de manera espontánea, pero facilita los procesos de reducción en el caso de catálisis enzimática. En condiciones fisiológicas de normoxia, la reducción tetravalente del oxígeno corre a cargo, en un 98%, de una enzima mitocondrial: la citocromooxidasa, siendo en este caso indetectable la liberación de formas intermediarias parcialmente reducidas (tabla 2.1), y produciéndose como único producto final, el agua (H_2O), que es totalmente inocua³¹.

Las reducciones uni, di o trivalentes del oxígeno molecular ocasionan la formación de superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo (OH^-) respectivamente (Figura 2.1). Estas formas intermedias de reducción del oxígeno, puesto que poseen un electrón desapareado en su capa más externa, son inestables y tiende a reaccionar rápidamente con otras moléculas, cediendo (oxidación) o aceptando (reducción) electrones, para estabilizar sus propias

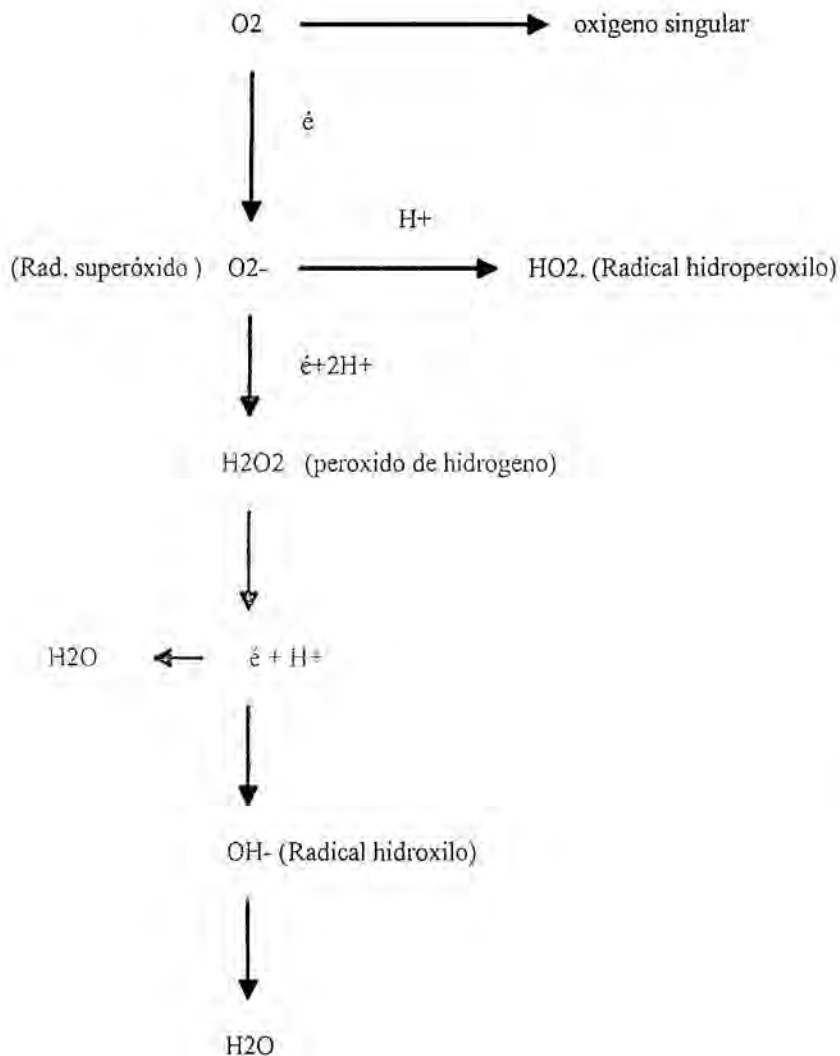


Figura 2.1. Reducciones univalentes del oxígeno molecular para formar RLO. Mediante transferencias de electrones (e^-), el oxígeno molecular es reducido primero a radical superóxido (O_2^-), y a partir de éste y con la adición de dos electrones a peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el cual a su vez es reducido de forma univalente con la adición de otro protón, a radical hidroxilo (OH^-) y agua (H_2O). Una última reducción univalente y la adición de otro protón convierten el radical hidroxilo en agua.

1.2. Especies de radicales libres de oxígeno

| n° de e ⁻ | no protonados | protonados |
|----------------------|------------------------------|-------------------------------------|
| 0 | O ₂ | O ₂ |
| 1 | O ₂ ^{•-} | HO ₂ [•] |
| 2 | O ₂ ⁼ | H ₂ O ₂ |
| 3 | O ⁻ + O= | OH [•] + H ₂ O |
| 4 | O= + O= | H ₂ O + H ₂ O |

Tabla 2. 1. Estados de reducción del oxígeno molecular

configuraciones electrónicas. Cuando reaccionan, se suelen generar nuevos radicales produciéndose reacciones en cadena que se autoamplifican. El peróxido de hidrógeno (H₂O₂) es citotóxico en virtud de su moderado poder oxidante, y es comúnmente utilizado como antiséptico. Es bastante estable y puede ser almacenado durante largos periodos. El radical hidroxilo en cambio es un poderoso oxidante, muy inestable y por tanto de vida media muy corta, y altamente reactivo, con gran capacidad de lesión en organismos vivos. El superóxido es un buen agente reductor y es moderadamente oxidante. Surge de la reducción univalente del oxígeno y como veremos tiene un papel de gran relevancia en las lesiones en las que se implican los RLO.

La reactividad de los RLO en los tejidos biológicos se manifiesta a varios niveles³², como la lesión de los lípidos de membrana o peroxidación lipídica, inactivación de enzimas y receptores, oxidación de grupos sulfhidrilo, degradación de proteínas, inactivación de hemoproteínas y citocromos, modificación de bases y roturas catenarias de los ácidos nucleicos³³, lesión estructural en la matriz extracelular con degradación del ácido hialurónico y colágena e inducción de la formación y liberación de mediadores de la respuesta inflamatoria, como el leucotrieno B4 (LTB4), el factor de agregación plaquetar (PAF), y factores del complemento como el C5a.^{19,20}

Dada la amplia distribución de las membranas celulares y de la matriz extracelular, como componentes de importancia universal en la arquitectura y fisiología de los seres vivos, no es de extrañar que las lesiones mediadas por RLO se hallen en un amplio rango de enfermedades²⁰.

1.3. Mecanismos de producción de RLO.

Los radicales libres se generan en los organismos vivos en varias circunstancias tanto fisiológicas como patológicas como la acción bactericida leucocitaria, la mutagénesis por la radiación ionizante, las oncogénesis, la lesión pulmonar en el distress respiratorio del adulto, la lesión renal de la necrosis tubular aguda y tras la reperfusión de un tejido isquémico.

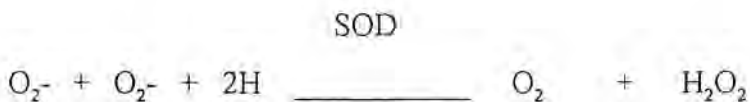
Bajo condiciones fisiológicas, se generan pequeñas cantidades de radicales libres en casi todas las células de metabolismo aerobio. El anión superóxido, por ejemplo, surge como subproducto del metabolismo del ácido araquidónico y por la autooxidación de pequeños compuestos solubles como las flavinas reducidas, tioles y catecolaminas³². El sistema de la citocromooxidasa, que es responsable del procesamiento de casi todos los sustratos energéticos celulares a través de la fosforilación oxidativa, puede también producir pequeñas cantidades de RLO. Ordinariamente la transferencia electrónica mitocondrial, implica la reducción tetravalente del oxígeno a agua sin la producción de intermediarios reactivos. Sin embargo, la oxidación de componentes reducidos de la cadena de transporte mitocondrial, como la ubiquinona, puede producir superóxido a través de la reducción univalente del oxígeno. La transferencia de un segundo electrón produce H_2O_2 que, si bien no es un radical libre en un sentido estricto, es un sustrato esencial para la producción del altamente reactivo, radical superóxido (OH^-). Dichas especies oxidativas producidas en estos "agujeros" metabólicos, inevitables en el transcurso de la actividad metabólica normal, son neutralizadas de manera efectiva por barrenderos o

"scavengers" endógenos, como la superóxido dismutasa que cataliza la dismutación del superóxido a H_2O_2 y la glutatión peroxidasa, que transforma H_2O_2 en agua. Otros antioxidantes endógenos naturales son la ceruloplasmina, quelante de O_2^- , o α -tocoferol o vitamina E, que actúa a nivel de la membrana celular para inhibir directamente las reacciones encadenadas de la peroxidación lipídica, que es la lesión más característica de los RLO.

Tras la isquemia, la reintroducción de sangre oxigenada en los tejidos induce el inicio de una cascada de reacciones incontrolada, que genera radicales libres en una magnitud que supera la capacidad de detoxificación endógena. Existen hoy día numerosas evidencias, que demuestran que estos intermediarios reactivos del oxígeno, son en gran medida responsables de la lesión inducida por isquemia reperusión a nivel de múltiples órganos como el miocardio ³⁵, el páncreas ²⁷, intestino ^{36, 21, 37, 38, 17, 39}, hígado ⁴⁰, músculo esquelético, ¹⁸, riñón ⁴¹, y piel ⁴¹. Numerosos estudios, van más allá y demuestran como la **reperusión anóxica**, esto es, con sangre no oxigenada ¹⁷, o mediante la adición de barredores de RLO, como la superóxido dismutasa (SOD) ^{21, 36}, consigue reducir las lesiones propias de la reperusión.

Se han identificado varias fuentes de RLO en los sistemas biológicos sometidos a condiciones de isquemia. La fuente inicial y más importante parece que radica en el metabolismo de la xantina oxidasa (XO) ⁴². Otras fuentes son los neutrófilos activados ⁴³, la oxidación de las catecolaminas ⁴⁴, las células endoteliales ⁴⁵ y el metabolismo de las prostaglandinas ⁴⁶

En 1981, Granger y cols., demostraron la responsabilidad del anión superóxido en el aumento de permeabilidad capilar asociado a la reperfusión del intestino isquémico de gato ³⁶. La conclusión de estos autores, que ha sido ampliamente refrendada, por decenas de trabajos ³⁹, se basó en observaciones indirectas, que permitieron también postular el origen del citado O_2^- . Estos autores consiguieron frenar el incremento de permeabilidad del intestino postisquémico, mediante la utilización de inhibidores específicos de los agentes que en aquel momento se creían implicados en los mecanismos lesionales. De los inhibidores utilizados, solamente la superóxido dismutasa, se mostró efectiva. Esta enzima se halla en abundancia a nivel intracelular, pero en escasa concentración en el medio extracelular y su acción radica en catalizar de manera específica y eficiente la dismutación del anión superóxido:



El hecho de que solamente SOD se mostrara efectiva en la prevención de la lesión, aboga claramente por el papel en la génesis de la lesión, del anión superóxido. El origen del superóxido en este mecanismo se halla en la enzima xantina deshidrogenasa (XD). Esta enzima es limitante en el metabolismo final de los ácidos nucleicos y todas las purinas son oxidadas gracias a esta enzima. Su acción radica en metabolizar xantina a ácido úrico, en dos pasos, el primero de los cuales es el paso de hipoxantina a xantina. En su forma deshidrogenasa, es una enzima NAD^+

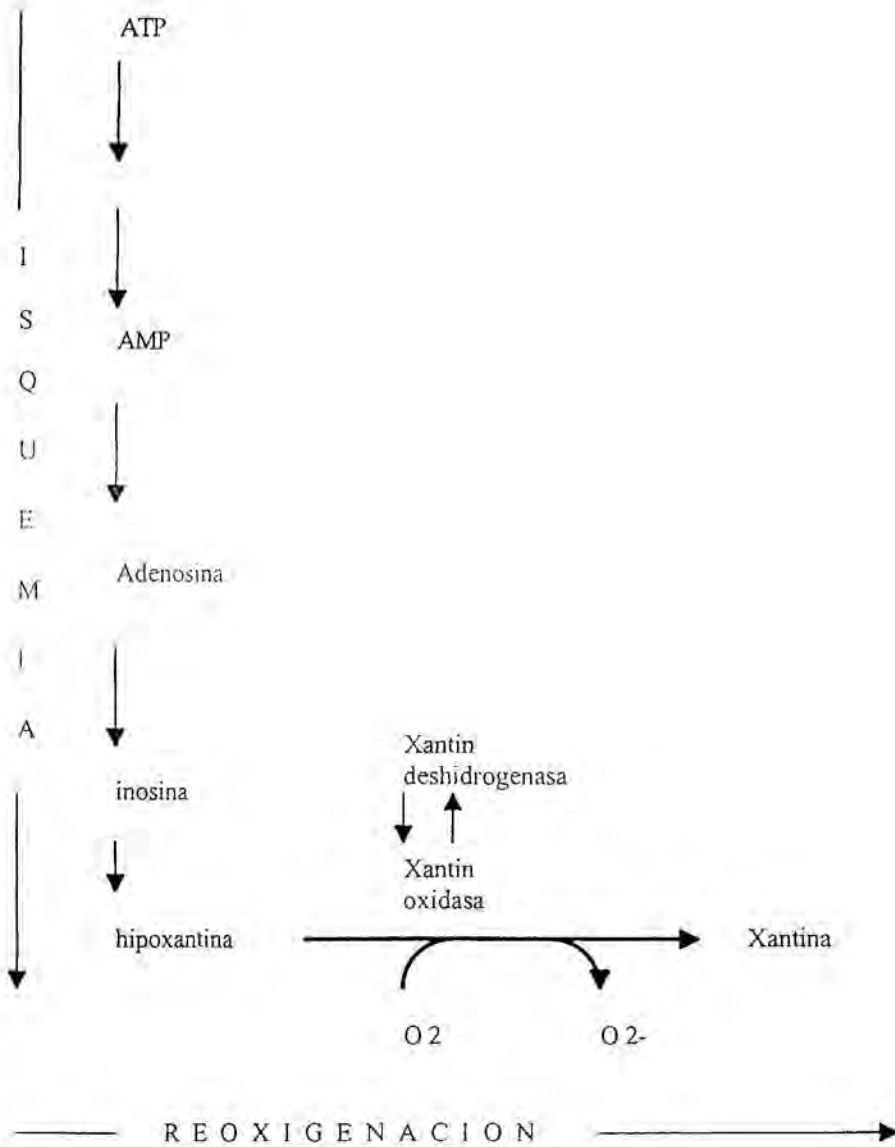


Figura 3.1 Mecanismo de acción de la xantina deshidrogenasa y xantina oxidasa en la producción de superóxido (modificado de Granger y cols. (36)).

dependiente, es decir utiliza al nicotinamidadenindinucleótido (NAD) como aceptor de electrones. Cuando sobreviene una isquemia, se degrada el ATP, y va aumentando la concentración de hipoxantina. A nivel intestinal ello ha sido documentado por los trabajos de Schoenberg⁴⁷ en los que se ha visto que tras 20 minutos de isquemia, los niveles de ATP caen a sus mínimos, y que la prolongación de la isquemia no los hacen descender más ⁴⁸. Ello está de acuerdo con el hecho de que isquemias de más de 30 minutos sean ya irreversibles ⁴⁸. Por otra parte, la isquemia favorece la conversión de la forma deshidrogenasa de la enzima en la forma oxidasa (XO) ^{42, 49}, cuya diferencia radica en la utilización del oxígeno en lugar de NAD⁺ como aceptor de electrones (fig. 3.1). La conversión de una forma enzimática en otra puede ocurrir por dos mecanismos distintos:

- 1) Por oxidación de sus grupos sulfhidrilo.
- 2) Por proteólisis limitada.

1.-La conversión de la enzima en oxidasa por **oxidación** de sus **grupos sulfhidrilo**, está bien documentada a nivel hepático. Este proceso es reversible y puede revertirse mediante la utilización de agentes reductores de grupos sulfhidrilo. ²⁴

2.- A nivel intestinal, la conversión, no es reversible por que se produce a través de una **proteólisis** que altera la estructura proteica de la enzima. ²⁴. En situación de isquemia, se interrumpe, por la falta de ATP, la función de las ATPasas de membrana,

entre las que se halla la bomba de Calcio. La detención de dicha bomba origina el influjo de calcio al interior de la célula. McCord y col.⁴², han postulado que las proteasas causantes de la proteólisis son activadas por la calmodulina, que a su vez se activa por la entrada de Ca^{2+} al interior celular.

Así pues, en condiciones de isquemia, por una parte aumenta considerablemente el sustrato de la enzima (hipoxantina) y por otra parte, la XD se transforma en oxidasa, con lo cual, la oxidación de la hipoxantina se convierte en un efectivo sistema generador de superóxido.

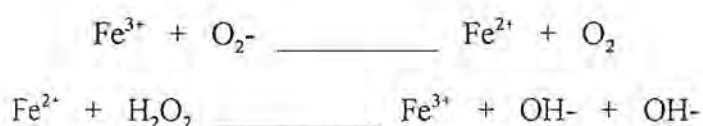
Los demás radicales libres que surgen en condiciones de isquemia, lo hacen a causa de las reacciones en las que se implica el anión superóxido. A pesar de las evidencias a favor del papel del superóxido en las lesiones por isquemia -reperfusión, hay estudios en los que parece que el papel más importante recaería en los oxidantes derivados del superóxido. La SOD, cataliza la dismutación del superóxido a H_2O_2 y oxígeno.

El peróxido de hidrógeno así generado, puede reaccionar con el superóxido para originar radical hidroxilo:



Esta reacción, es la conocida como reacción de **Haber-Weiss**⁵⁰, que no es más que un sistema REDOX (oxidación-reducción). Cuando esta reacción discurre en presencia de metales de transición, como pueden ser el hierro o el cobre., su velocidad

se acelera notablemente, y es conocida como reacción de **Fenton** ⁵⁰:



El hierro es el principal catalizador de esta reacción en los sistemas biológicos³³. Dicho metal se almacena habitualmente en los enterocitos en forma de micelas de ferritina ³⁸. Los radicales O_2^- pueden reaccionar con el hierro así almacenado tal como se muestra en la reacción de Fenton ⁵⁰. Existen trabajos que demuestran que la generación de RLO disminuye de manera notable si se utilizan quelantes del Fe ⁵¹, lo cual demuestra su importante papel. Aunque se ha apuntado el origen enterocitario del Fe implicado en la reacción de Fenton, hay trabajos que indicarían un posible origen del mismo a nivel de la célula endotelial ⁵². El papel del hierro incluso va más allá, según determinados autores para los cuales el hierro no solo se implica en la génesis de RLO sino que colabora en la toxicidad de los mismos catalizando el encadenamiento de las reacciones de peroxidación lipídica, que constituyen la forma más característica de toxicidad de estas especies ⁵³.

Otra de las fuentes de RLO se halla en los leucocitos polimorfonucleares. Una de las características de la reperfusión postisquémica de un tejido es una severa infiltración tisular por leucocitos polimorfonucleares ^{54,55}. Dichos leucocitos se hallan

activados para producir anión superóxido a través de los sistemas enzimáticos de membrana de la NADPH oxidasa ^{25, 33}.



La función fisiológica de esta producción de superóxido por parte de los PMN es en principio dirigida hacia la destrucción de microorganismos invasores, aprovechando la toxicidad del mismo, aunque en ocasiones su toxicidad incontrolada, puede ser causa de enfermedades inflamatorias. Esta enzima se halla presente también en otras células de la serie blanca ³².

El papel que los polimorfonucleares (PMN) juegan en la isquemia-reperfusión, es innegable, pues existen varias evidencias que así lo apoyan. Por un lado, la capacidad de los fármacos que reducen las lesiones por perfusión, como los inhibidores de la XO o de los quelantes del hierro (como la desferroxiamina o DFO) para atenuar también la infiltración leucocitaria ^{55, 56} y por otro lado la constatación de que la deplección neutrofílica puede atenuar las lesiones por isquemia-reperfusión ^{57, 23}.

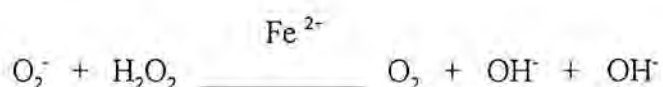
De lo expuesto anteriormente, se deduce que existe una compleja interrelación entre la producción de radicales libres (O_2^-) y la activación neutrofílica. Los mediadores más probables que vinculan ambos fenómenos (producción de RLO y activación de PMN con amplificación de la producción de RLO), son el factor

activador de las plaquetas (PAF) y el leucotrieno (LT) B₄ ⁵⁸. Se ha propuesto que el superóxido producido tras la isquemia reperusión puede : *a)* reaccionar con las células endoteliales para promover la formación de mediadores de la inflamación tales como el PAF y el LTB₄ ³⁸, *b)* inducir la expresión y la activación de las glucoproteínas de adhesión endotelial, de las moléculas de adhesión intercelular (ICAM) tipos 1 y 2 y la molécula de adhesión leucocitoendotelial (ELAM) ⁵⁹ y *c)* inactivar al óxido nítrico y otros factores protectores que el mismo endotelio produce ⁶⁰.

1.4. Acción tóxica de
los RLO y mecanismos.

Químicamente, el anión superóxido, es un buen agente reductor pero solo moderado oxidante. En realidad su moderada reactividad química, contrasta con su elevado poder tóxico en las reacciones biológicas, sin que ello sorprenda, pues es un hecho común a otros compuestos inorgánicos envueltos en el aura romántica de célebres asesinos de la historia, como el cianuro y las sales de arsénico e incluso otros más "vulgares" como el cloruro potásico.

El anión superóxido, no es el único responsable de su toxicidad. De hecho no es excesivamente reactivo pero es potencialmente tóxico. Su toxicidad es ejercida por él mismo de manera directa, causando daños a nivel molecular, o bien de manera indirecta, por los radicales secundariamente generados. Un ejemplo de ello es la reacción de Haber-Weiss, ya comentada, en la que con la catálisis de un metal de transición (habitualmente el hierro), el superóxido se transforma en otro radical más potente y más tóxico aún, el hidroxilo (OH⁻):



En la anterior reacción se requiere H₂O₂ para la producción de hidroxilo. Una de las más importantes fuentes de peróxido de hidrógeno, radica en la dismutación del superóxido catalizada por la superóxidodismutasa (SOD) ³². El peróxido de hidrógeno, no es especialmente tóxico para la célula, pero posee capacidad de atravesar la membrana celular y ello le confiere especial y doble importancia, por que es precursor

del hidroxilo, como ya se dijo, y por que el **medio extracelular es pobre en defensas antioxidantes**. Cuando hay trazas de metales de transición, es cuando se generan los radicales hidroxilo.

Debido a sus elevada reactividad, muchos RLO existen solo a muy bajas concentraciones (de 10^{-4} a 10^{-9} Molar) y no pueden "viajar" muy lejos de su lugar de origen. El radio efectivo de acción de un radical hidroxilo es aproximadamente de 30 Å (Angströms) y su vida media es de solo unos microsegundos ⁶¹. En el ejemplo precedente es fácil comprender la escasa probabilidad de que un OH- generado en la mitocondria pueda afectar directamente otras partes de la célula, como por ejemplo el DNA en el núcleo

Los RLO poseen un carácter mixto, como oxidantes o reductores y cuando reaccionan con un compuesto no radical, el producto de dicha reacción es un nuevo radical. A su vez el nuevo radical así producido, puede reaccionar con nuevos compuestos no radicales iniciándose una reacción en cadena. Ello explica que aunque, como se mencionó, un solo RLO no pueda provocar lesiones mas que a escasos Å de su lugar de generación, la reacción en cadena, de la que surgen otros radicales y productos de degradación, si que puede provocar lesiones distantes del punto de inicio de la reacción donde surgió el radical desencadenante ³². Cuando dos RLO reaccionan entre si, puede surgir como producto de la reacción, una molécula estable. Este hecho ayuda a explicar el que eventualmente se produzca el fin de una reacción en la que se hallan implicados radicales libres

La toxicidad de los RLO es ejercida a varios niveles en las células:

- Ácidos nucleicos.
- Carbohidratos.
- Proteínas.
- Lípidos.

a) **Ácidos nucleicos:** Modificaciones a nivel de los mismos, como hidroxilaciones en las bases y rupturas de las cadenas de ADN ⁶², que pueden causar directamente la muerte celular o cuando menos mutaciones tras las divisiones celulares.

b) **Carbohidratos:** Despolimerizaciones de carbohidratos estructurales como mucopolisacáridos y ácido hialurónico, así como degradación del colágeno ⁶³

c) **Proteínas:** Inactivaciones enzimáticas, principalmente por oxidaciones de grupos sulfhidrilo, lo cual, además de dañar las funciones celulares, puede alterar también la integridad de las membranas al atacar proteínas y enzimas de membrana ^{64, 32}.

d) **Lípidos:** La forma de toxicidad más característica, se conoce con el nombre de peroxidación lipídica o lipoperoxidación, que constituye la oxidación de los ácidos grasos poseedores de dobles enlaces (también llamados poliinsaturados), contenidos en los fosfolípidos de las membranas celulares. ⁶⁵

1.4.1.-ESTRUCTURA Y FUNCION DE LAS MEMBRANAS

Las membranas biológicas, tienen un ratio lípidos/proteínas, que oscila de 1:4 a 4:1. En muchas células animales, la proporción es casi de 1:1. La excepción la constituye la compleja membrana mitocondrial, que contiene, por sus elevada actividad metabólica, una proporción de proteínas de un 80%. En general, las proporción de proteínas aumenta conforme al grado de actividad de la membrana, por ello la compleja función metabólica de la mitocondria exige esta elevada proporción de proteínas. Las membranas biológicas, también contienen algunos carbohidratos.

La estructura o armazón básico la constituyen los fosfolípidos, cuyo carácter polar o anfipático determina que se organicen en una estructura bicapa, en la que los extremos más hidrófobos quedan en el interior (alejados por tanto, del medio intra y extracelular, de carácter acuoso) y sus extremos más hidrofílicos, o polares constituyen la envoltura externa e interna de dicha estructura, que se halla recubierta por una capa de glucoproteínas (figura 4.1) La estructura bicapa, tiene la función de anclaje y soporte de los variados constituyentes proteicos de la membrana celular.

Los componentes proteicos de las membranas suponen los pilares básicos de funciones tan variadas, como el transporte de moléculas, catálisis enzimáticas, actividad de receptores para agentes endocrinos, paracrininos y para neurotransmisores y también tiene actividad de transducción energética. Además las proteínas de membrana son eslabones estructurales entre el citoesqueleto y la matriz extracelular.

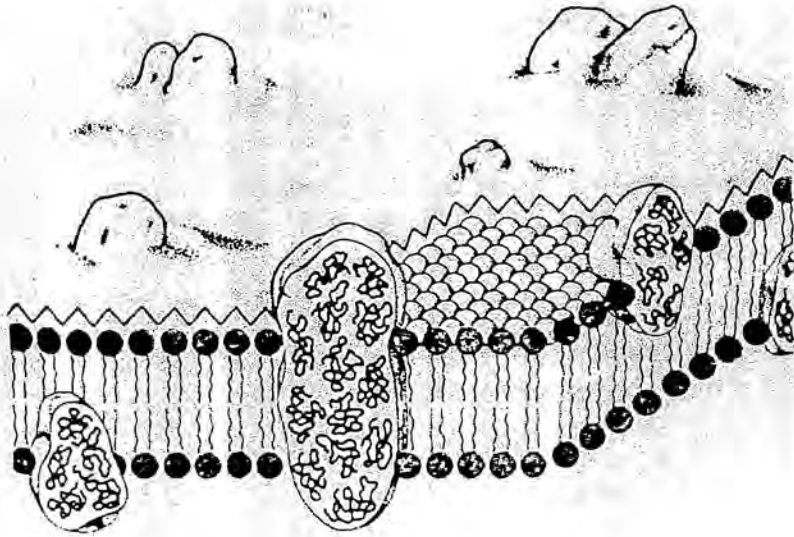


Figura 4.1. Esquema actualmente aceptado de la membrana plasmática. Se aprecia la capa de glucoproteínas que recubre la bicapa lipídica y las micelas proteicas insertadas en la membrana

En las células animales, los fosfolípidos se hallan en proporción predominante, pero en algunas membranas, particularmente la membrana de la superficie celular, o membrana plasmática, existen considerables cantidades de esfingolípidos que contienen colesterol. Las membranas son estructuras dinámicas y fluidas en las que las proteínas y los lípidos se mueven rápidamente en el seno de la bicapa lipídica.

Las cadenas de ácidos grasos que forman parte de los fosfolípidos de la membrana, pueden contener desde 12 hasta 24 átomos de carbono (figura 4.2). El ácido graso en posición 2, es habitualmente insaturado, esto es, que contiene uno o más dobles enlaces, mientras que el ácido graso en posición 3 no lo es. La presencia de dichos dobles enlaces es de gran importancia pues se halla intrínsecamente ligada a la

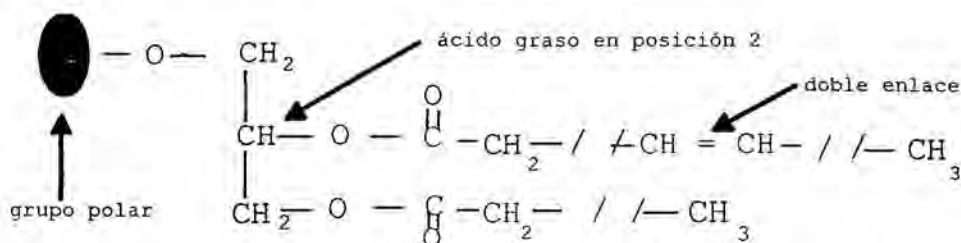


Fig 4.2 Estructura general de los fosfolípidos, que conforman la bicapa lipídica mediante la situación de sus grupos polares hacia el exterior y sus extremos hidrófobos (cadenas de ácidos grasos) hacia el interior.

fluidez de la membrana. Ello se debe a que el punto de fusión de los ácidos grasos en general, es inversamente proporcional a la longitud de su cadena y al número de dobles enlaces. La presencia de dobles enlaces en la cadena de carbonos, realza la capacidad de rotación y por tanto la flexibilidad de la misma.

La presencia de los citados dobles enlaces parece ser esencial para la función celular normal y una considerable cantidad de energía metabólica se invierte en la creación de los mismos. La célula dispone de varios mecanismos para la protección de los ácidos grasos poliinsaturados, en especial de los fenómenos de peroxidación lipídica.

1.4.2.-PEROXIDACION LIPIDICA

La peroxidación lipídica ha sido ampliamente definida como el deterioro oxidativo de los ácidos grasos poliinsaturados. Dicho proceso, a nivel de los lípidos

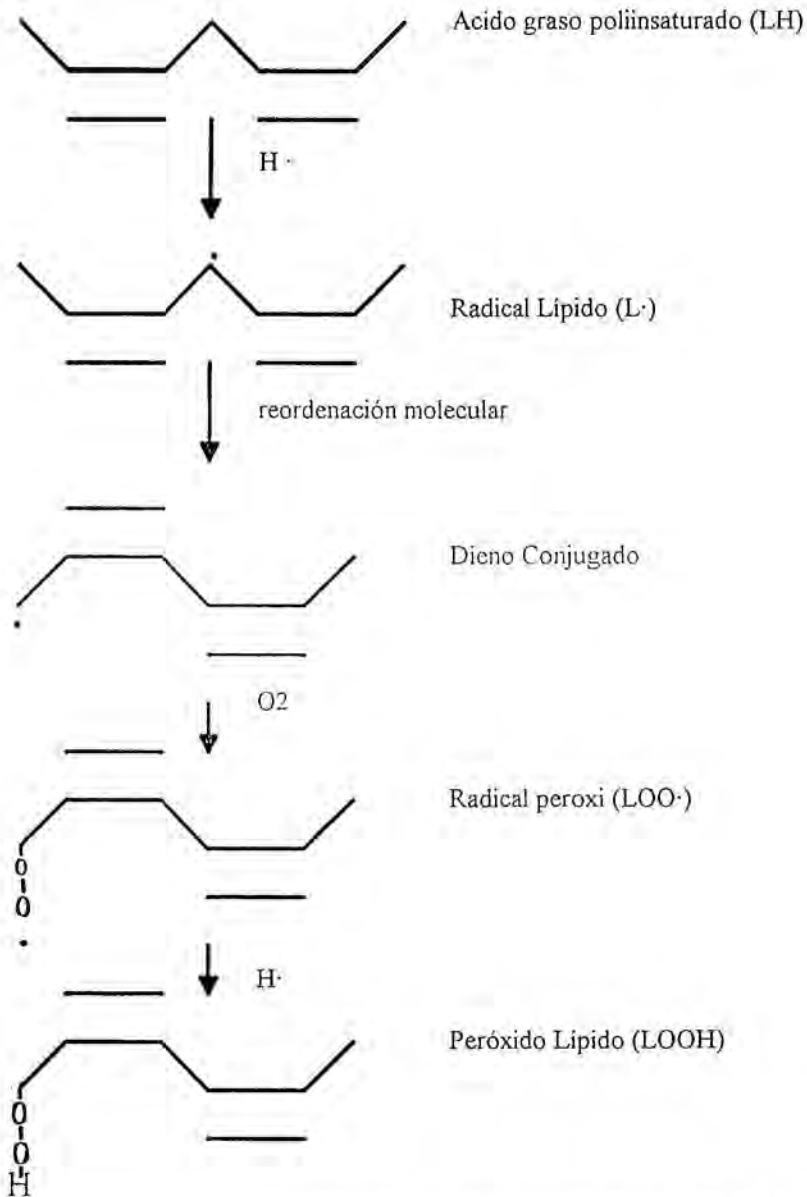


Fig 4.3 : Secuencia de la peroxidación lipídica mediada por RLO. La abstracción de un átomo de hidrógeno de la cadena de un ácido graso poliinsaturado forma un radical lipídico, centrado por un carbono. Esta molécula inestable sufre una reordenación molecular, para formar un dieno conjugado, el cual, a su vez, debe reaccionar con oxígeno molecular para producir un radical peroxi. La reacción en cadena se propaga cuando el radical peroxi ataca la cadena de un ácido graso insaturado adyacente, del que extrae un átomo de hidrógeno convirtiéndose en un peróxido lipídico estable y formando un nuevo radical lipídico (modificado de Kischner y col (33)).

de membrana se inicia cuando determinadas especies químicas, por su elevada reactividad, tienen la capacidad de extraer un átomo de hidrógeno de un eslabón metilo (-CH₂-), adyacente a un doble enlace en la cadena de carbonos (figura 4.3). El átomo de hidrógeno posee un solo electrón, en este caso compartido en la formación de un enlace y su extracción deja un electrón desapareado en el átomo de carbono. El radical alquilo resultante, sufre una reordenación molecular, de la que resulta un dieno conjugado, que se combina rápidamente con O₂ para formar un radical hidroperoxilo (R-OO·). A su vez, el radical hidroperoxilo, puede extraer otro hidrógeno de otro ácido graso para formar un hidroperóxido lipídico (R-OOH) y de esta manera se encadenan una sucesión de reacciones oxidativas, que podrían conducir a la total oxidación de los ácidos grasos constituyentes de la membrana, en caso de no existir los mecanismos de defensa celulares. Los hidroperóxidos lipídicos se descomponen mediante la catálisis de metales de transición, muchos de los cuales están presentes *in vivo*. Los productos finales del proceso de lipoperoxidación comprenden al malondialdehído, otros aldehídos, gases hidrocarbonados y dienos conjugados. Una forma comúnmente utilizada para medir el proceso de lipoperoxidación es la determinación del malondialdehído (MDA), mediante técnicas espectrofotométricas⁶⁶.

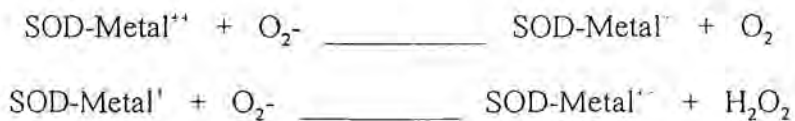
Los efectos más destacados de la peroxidación lipídica a nivel de la membrana consisten en la **disminución de los flujos y de la elasticidad de membrana**, el

aumento de permeabilidad frente a sustancias que normalmente no la atraviesan y la **inactivación de proteínas y enzimas** anclados en la membrana.

1.4.3.-MECANISMOS DE PROTECCION FRENTE A LOS RLO

Como ya se esbozó anteriormente, los RLO están formándose constantemente en mínimas cantidades durante el transcurso de procesos metabólico-energéticos de las células aerobias. Todas las células que producen RLO están dotadas de mecanismos de defensa frente a estas especies tan lesivas (tabla 4.1) . En su consumo de casi todo el oxígeno disponible celular, el sistema de la citocromooxidasa actúa como un eficaz inhibidor de la generación de RLO. Además las células están dotadas de sistemas enzimáticos, que específicamente son dedicados a la defensa contra RLO.

Las enzimas del complejo de la **superóxidodismutasa**, catalizan la dismutación del anión superóxido a una velocidad 10^4 veces superior a la velocidad de dismutación espontánea a pH fisiológico ⁶⁷. Lo hacen venciendo la fuerza de repulsión electrostática de los aniones superóxido. El catión metálico del grupo prostético de la enzima es reducido por un O_2^- y reoxidado por un $2^\circ O_2^-$:



| SISTEMA | OBSERVACIONES |
|---|--|
| NO ENZIMATICOS | |
| alfa tocoferol (vit. E) | liposoluble. Probablemente actúa sobre receptores de membrana. |
| ascorbato (vit.C) | hidrosoluble. |
| glutation reducido (GSH) | |
| flavonoides | antioxidantes vegetales |
| químicos | aditivos alimentarios como el BHT (hidroxitolueno butilado). Compuestos tiólicos (precursores de GSH). |
| β -carotenos | barrendero del oxígeno singlete |
| urato | barrendero del oxígeno singlete |
| proteínas plasmáticas | ceruloplasmina |
| ENZIMATICOS | |
| superóxido dismutasas | metaloenzimas con Cu, Zn y Mn |
| glutation (GSH) peroxidasas | enzimas con Selenio y sin él. algunas GSH S-transferasas. |
| catalasa | hemeenzima; |
| NADPH-quinona-oxido-reductasa (o diaforasa) | |
| epóxido hidrolasa | |
| enzimas de conjugación | UDP-glucuroniltransferasa sulfoniltransferasa GSH S-transferasa |
| glutation oxidado (GSSG) reductasa | |
| proveedores de NADPH | glucosa 6-P deshidrogenasa (DH) gluconato DH, isocitrato DH, |
| sistemas de transporte | exportadores de glutacion oxidado (GSSG) |

Tabla 4.1 : Defensas antioxidantes en sistemas biológicos

La elevada velocidad de esta reacción, asegura que no habrá anión superóxido disponible para formar radical hidroxilo en la R. de Haber-Weiss, aunque las células son capaces de aumentar la producción de la enzima en respuesta a un incremento del estrés oxidativo. La superóxidodismutasa existe en varias formas. Una de ellas, contiene manganeso como metal y se halla en la matriz mitocondrial. Otras formas de la enzima, que contienen cobre y zinc como metales, se hallan en el citosol celular. A nivel extracelular, en menor cantidad, existe una forma de la enzima, de elevado peso molecular, y que se halla anclada en la superficie de las células endoteliales. Esta forma de la SOD tiene gran importancia, por su ubicación, en la patogénesis de las lesiones por RLO.

Otras dos enzimas que tienen un papel en la defensa antioxidante, concretamente catalizando la reducción del peróxido de hidrógeno a agua: **la glutación peroxidasa y la glutación reductasa**. El **glutación** es un tripeptido, muy abundante en las células superiores, cuyas funciones biológicas han permanecido sin desvelar mucho tiempo. Se sabe hoy día que actúa como componente de un sistema de **transporte de aminoácidos** al interior celular, como **activador de determinadas enzimas** y activamente en la **protección de los lípidos** contra los fenómenos oxidativos ⁶⁸.

La glutación peroxidasa, transforma en agua al peróxido de hidrógeno a base de oxidar al glutación reducido (GSH). Posteriormente la glutación reductasa cataliza la regeneración del glutación oxidado (GSSG) a glutación reducido. Para ello, utiliza como agente reductor al NADPH originado en la ruta de los fosfatos de pentosa ³².

Dicha ruta de las pentosas no es más que una vía metabólica alternativa para la oxidación de la glucosa, que no es la principal en cuanto a rendimiento energético pero que se utiliza en dependencia del estado metabólico y de demandas del organismo ⁶⁹.

La glutatión peroxidasa también cataliza la reducción de peróxidos lipídicos a través del glutatión y así puede prevenir la propagación de la peroxidación lipídica.

A elevadas concentraciones de peróxido de hidrógeno, la enzima catalasa, también juega un importante papel en la detoxificación del mismo.

Los tejidos también disponen de una amplia variedad de antioxidantes no enzimáticos en la prevención del daño oxidativo. La vitamina E (nombre bajo el que se agrupan una serie de isómeros del tocoferol) es un antioxidante de carácter lipídico, que se halla en todas las membranas y que transforma el superóxido, el hidroxilo y los radicales lipídicos peróxidos en especies menos reactivas. Su mecanismo de acción radica en la donación de un ión hidrógeno al radical, limitando su efecto. Así se genera un radical estable de vitamina E ^{70, 71, 32}. Otros compuestos como la cisteína pueden eventualmente interrumpir reacciones de RLO mediante la donación de uno de sus grupos sulfhidrilo. También la vitamina C tiene reconocidas propiedades antioxidantes, así como la ceruloplasmina, que puede actuar como antioxidante extracelular.

1.4.4.-ACCION DE LOS POLIMORFONUCLEARES (PMN).

Como ya se vió anteriormente, las evidencias presentan al sistema de la xantina oxidasa como una de las principales fuentes de producción de metabolitos reactivos del oxígeno durante la reperfusión postisquémica del intestino. Otro hallazgo común en estas mismas circunstancias, es la presencia de un importante infiltrado leucocitario, en el tejido isquémico ⁵⁴. Los neutrófilos forman parte del sistema leucocitario, implicado en la defensa frente a microorganismos potencialmente invasores. Frente a una hipotética invasión, responden mediante la activación de la llamada bomba respiratoria o "respiratory burst", mediante la cual se generan gran cantidad de especies reactivas de oxígeno. La enzima encargada de la producción de los RLO es la NADPH oxidasa de la membrana neutrofilica.

Puesto que la infiltración leucocitaria postisquémica se puede reducir mediante la adición de SOD o alopurinol, Grisham y cols. han propuesto que el sistema de la xantina oxidasa es iniciador de dicha infiltración ⁵⁴. También la adición de quelantes del Fe como la desferroxiamina y de la dimetiltiourea como quelante de OH⁻, se muestra útil en la reducción de la infiltración ⁷². Los mencionados hallazgos apuntan a un papel del peróxido de hidrógeno y del hierro, que recordemos, són precursores de la producción de OH⁻, en la génesis de factores quimiotácticos para los neutrófilos.

Hay resultados contradictorios en cuanto al papel del superóxido. En el trabajo de Petrone ⁷³, la exposición del plasma al superóxido, hace que el plasma devenga en

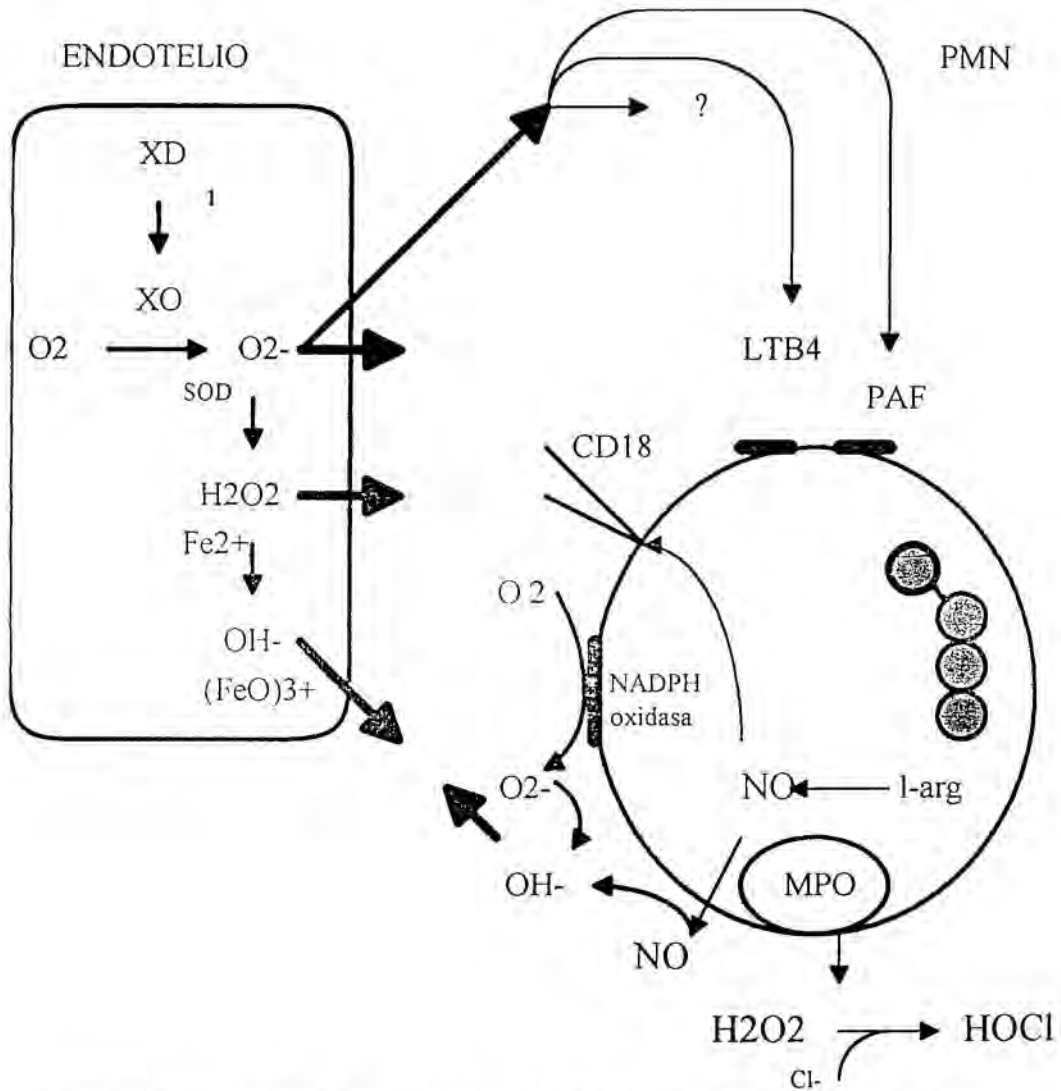


Fig 4.4: Fuentes y posibles reacciones de RLO durante la reperfusion del intestino isquémico. En el endotelio, la isquemia es responsable de la producción de aniones superóxido tras la reperfusion que a su vez pueden ser metabolizados a especies más reactivas. Los lípidos de membrana son particularmente vulnerables los metabolitos del oxígeno, y la peroxidación lipídica que se produce se ha propuesto como causante de la producción de quimiotácticos para los neutrófilos, siendo los posibles candidatos PAF y LTB4. Los neutrófilos así activados, también producen anión superóxido mediante la NADPH oxidasa de membrana, y óxido nítrico (NO), a partir de l-arginina. El NO inhibe la adhesión neutrofilica, posiblemente actuando sobre el complejo CD18 de membrana. Como el superóxido inactiva al NO, por este mecanismo incrementa la adherencia. Por último la mieloperoxidasa (MPO), de los PMN activados, genera ácido hipocloroso, más reactivo, a partir de peróxido de H (modificado de Van der Vliet y col(24))

un potente quimiotáctico, en otro sentido los trabajos de Zimmerman⁷² muestran que la adición de superóxido al fluido extracelular del gato, no causa un aumento de la quimiotaxis. En el mismo trabajo, se demuestra que el peróxido de hidrógeno en presencia de Fe catalíticamente activo añadido al plasma sí que es causante de una intensa quimiotaxis cuando se administra al gato. Estos autores llegan a la conclusión de que el peróxido de H₂ y el catión ferroso, producen un oxidante centrado por Fe, como el ion ferril ((FeO)³⁺) el cual induce la producción de algún quimiotáctico de carácter lipídico, que pudiera tratarse de un producto derivado del ácido araquidónico⁷³. Se especula que pueda ser el factor de agregación plaquetaria (PAF) o el leucotrieno (LT) B₄. Dicha especulación se basa en la observación de que se produce una elevación de la síntesis de de LTB₄ en el perro tras isquemia y reperfusión intestinal. Esta elevación puede ser atenuada mediante el uso de inhibidores de la lipooxigenasa, en cuyo caso se correlaciona con una disminución del infiltrado leucocitario⁷⁴ (fig 4.4).

1.5. Síndrome de isquemia-reperfusión:

lesiones asociadas y particularidades
a nivel intestinal.

Cuando el intestino es sometido a isquemia, se detiene el metabolismo energético y caen los niveles de ATP^{55, 75, 47}. Si dicho periodo de isquemia se prolonga suficientemente, la degradación de los orgánulos celulares y la pérdida de función de los sistemas enzimáticos impide la regeneración del ATP y la muerte celular y tisular es ya irreversible⁴⁸. Es una obviedad el afirmar que solo la reintroducción de oxígeno, antes de que el proceso sea irreversible, puede recuperar la viabilidad del órgano a nivel estructural y funcional, y sin embargo, el aporte de sangre nuevamente oxigenada, se asocia a una serie de lesiones, que constituyen el llamado **síndrome de isquemia reperfusion**. En realidad, dichas lesiones no son características de la reperfusion, sino que las mismas que se dan durante la isquemia, se ven magnificadas durante la fase de reperfusion. El único agente que podemos implicar en dichas lesiones tras la reperfusion es el oxígeno: por un lado, la reperfusion con sangre anóxica, no aumenta las lesiones que se originan durante la isquemia^{17, 18} y por otra parte, se ha demostrado, que las lesiones a nivel intestinal, en un modelo de isquemia intestinal experimental, son mayores en el caso de tres horas de isquemia y una de reperfusion, que tras cuatro horas de isquemia¹⁷. Así, con motivo de la isquemia se producen un amplio espectro de lesiones que van desde unos relativamente sutiles cambios en la permeabilidad de los capilares de la mucosa hasta un grosero infarto transmural, ello en función de la duración y severidad del insulto isquémico. Vimos previamente que existen dos eventos a los que atribuir la lesión tisular en los estados isquémicos. Por un lado la

hipoxia propiamente dicha durante el periodo en que de manera parcial o total baja el aporte de oxígeno, y por otro lado la generación de RLO durante la fase de reperfusión.

Los diferentes modelos de isquemia y reperfusión intestinal que se han utilizado así como el estudio de diferentes aspectos sobre la histomorfología y la función del órgano tras sufrir los mencionados insultos, han generado un cierto grado de confusión sobre las consecuencias reales de la isquemia-reperfusión a nivel intestinal. Si bien algunas diferencias pueden radicar en la tolerancia del órgano según las diferentes especies de animal de experimentación, los puntos de posible discrepancia surgen más en función de la severidad de la isquemia. Cuando ésta no es total, los mecanismos de autorregulación intestinal permiten que, incluso en isquemias parciales de larga duración, las lesiones sean discretas o incluso no se detecten^{76, 77}. En clarificadoras revisiones del tema por parte de Haglund, Park, Granger y cols.^{78, 79}, se ha conseguido sistematizar el grado de lesiones y la parte de responsabilidad atribuible a la hipoxia y a los RLO.

Uno de los más sensibles indicadores de la lesión moderada, es el aumento de permeabilidad capilar. En gatos sometidos a una hora de **isquemia parcial** mediante hipotensión arterial de 30-40 mmHg, seguida de una hora de reperfusión, se produce un aumento de la permeabilidad a la albúmina, sin que sea posible demostrar la presencia de una lesión histológica. En la experiencia anterior, aunque un pequeño componente de este aumento de permeabilidad, sea atribuible a la hipoxia, la mayor parte puede evitarse utilizando agentes bloqueantes de la generación de RLO, por lo que la

responsabilidad mayoritaria cabe atribuirla a los RLO ³⁶. Utilizando el mismo modelo felino de isquemia parcial, los mismos autores en otro trabajo en el que alargaron la isquemia a 2 y 3 horas, demostraron la presencia de necrosis en el extremo de las vellosidades tras la fase isquémica, pero estas lesiones fueron exacerbadas de manera importante tras una hora de reperusión ⁸⁰. En otro modelo, en este caso de **isquemia total**, con una duración de 15 minutos a 4 horas, seguido de 30 minutos de reperusión en perros, también se halla un aumento significativo de la permeabilidad a la albúmina, como en el modelo felino anterior, pero en este caso la terapia antirradical no tiene efecto sobre la alteración originada, por lo que en este caso no se puede atribuir la causa a la acción de los RLO sino a la hipoxia en sí misma ⁸¹.

En 1970 Chiu y cols. ⁸² clasificaron la lesión intestinal que sigue a un periodo de isquemia en 6 categorías. El grado 0 esta constituido por un epitelio normal. El grado 1 corresponde al levantamiento de la línea de células epiteliales originando los llamados espacios de Gruenhagen. En el grado 2, se asiste a la expansión de dichos espacios que constituyen verdaderas burbujas subepiteliales. El grado 3 se caracteriza por una denudación epitelial y aplanamiento de las vellosidades a nivel de su extremo distal previamente a la denudación total con exposición de la lámina propia que caracteriza el grado 4. Finalmente el grado 5 muestra la desintegración de la lámina propia. En 1990 el equipo de Haglund, desarrolló un modelo de estrangulación intestinal mediante la aplicación de un clip con las patas acolchadas e inflables a presión controlada, es decir desarrollaron un clip hidrostático mediante cuya aplicación

comprimían tanto la luz intestinal, como el aporte arterial y el drenaje venoso del intestino. Basándose en este modelo llegaron a la conclusión de que la fase de reperfusión se manifiesta cuando la fase isquémica no se asocia a compresión y dificultad de retorno venoso ⁷⁸. En el mencionado trabajo establecieron una gradación de lesión histológica, que actualmente es una de las más aceptadas y que se compone de ocho grados de lesión (Tabla 5.1) Los cinco primeros son idénticos a los que ya describieron Chiu y cols. en 1970 y corresponden a lesiones crecientes de las vellosidades. En el grado 6 se afectan ya las criptas, el grado 7 corresponde a necrosis total de la mucosa y el grado 8 a un infarto transmural.

| Grado | Lesión |
|-------|--|
| 0 | Mucosa normal. |
| 1 | Espacio subepitelial. |
| 2 | Espacio subepitelial agrandado. |
| 3 | Levantamiento epitelial de toda la vellosidad. |
| 4 | Denudación de la mucosa. |
| 5 | Pérdida de tejido vellositario. |
| 6 | Infarto que alcanza las criptas. |
| 7 | Infarto completo de la mucosa. |
| 8 | Infarto transmural |

Tabla 5.1 Grados de lesión histológica por isquemia según Park y cols ⁷⁸

La secuencia de las lesiones se inicia por el despegamiento de las células epiteliales de la membrana basal, particularmente a nivel de la punta de las vellosidades. Este despegamiento ocasiona los **espacios subepiteliales** que caracterizan, según su extensión los grados 1, 2 y 3 de la escala de Park (tabla 5.1). Junto a la presencia de dichos espacios encontramos a nivel de la íntima una celularidad, constituida por infiltrado leucocitario, progresivamente más rica. Conforme avanza la lesión, la vellosidad se va desnudando de su epitelio, y por ejemplo, a los 30 minutos de isquemia en la rata o 60 minutos en el perro, se pueden apreciar descamaciones que afectan ya a 2/3 de la vellosidad permaneciendo indemne el epitelio de las criptas ⁸³, correspondiendo a un estadio 4 de la escala de Park. Posteriormente se pierde la morfología vellositaria como tal (estadio 5), quedando solo rudimentos de las vellosidades. La afectación de las criptas (estadio 6), precede a la total destrucción del epitelio o fase de infarto transmucoso (estadio 7) y finalmente sobreviene el infarto transmural que alcanza la capa serosa.

En estudios posteriores a los de Park, se da un paso más en la comprensión de la lesión intestinal que acontece en la secuencia de preservación (isquemia fría) y posterior implante del órgano (fase de recalentamiento y reperusión); Mueller y cols demuestran que es lo que ocurre durante la fase propiamente isquémica en dos estudios en ratas. En el primero ⁸⁴ describen como marcadores de lesión al **ácido hialurónico** que se halla principalmente en la lámina propia (membrana basal) y en el tejido conectivo que existe en las vellosidades entre la membrana basal del epitelio y los

capilares vellositarios y a la **purina nucleósido fosforilasa**, enzima presente en el citosol de las células endoteliales de la microcirculación intestinal, pero también en las células de Kupffer hepáticas y a nivel de otros órganos. Los autores demuestran la presencia de ambos marcadores en el efluente luminal y vascular del órgano posteriormente a la etapa de isquemia fría. En el segundo estudio ⁸⁵ mediante técnicas inmunohistoquímicas, con tinciones específicas para membrana basal y para células endoteliales, demuestran la presencia de lesiones específicas de estas estructuras tras el periodo de preservación en frío, que no se ven en microscopía convencional y que son corroboradas por la presencia de los anteriormente citados marcadores. En este sentido, los autores también cuestionan la utilidad de las técnicas de histología convencional en el injerto antes de la reperusión ⁸⁶. La histología convencional pone de relieve principalmente lesiones del epitelio y no las de otras estructuras como la célula endotelial o la membrana basal, y tras periodos de preservación de 12 horas, las escasas lesiones epiteliales que se ven no se correlacionan con el fallo primario del injerto, que es del 100% en tiempos de preservación largos. El estudio histológico tras un periodo de reperusión, magnifica enormemente las lesiones de la mucosa surgiendo la correlación entre las mismas y la mortalidad. A la magnificación de las lesiones contribuye la acción de los RLO, pero también la lesión endotelial que varios autores han demostrado en intestino y otros órganos ^{87, 88, 89, 90, 91, 92, 93} y que es causante del fenómeno conocido como falta de reperusión o "no reflow" en el que la

1.5. Sd de isquemia reperusión intestinal

edematización y lesión de la célula endotelial , deja territorios capilares en situación de isquemia permanente, por oclusión de la luz vascular.

**1.6. Translocación bacteriana:
concepto y mecanismos.**

El intestino tiene una peculiaridad que le distingue de otros órganos. Se trata del íntimo contacto que mantiene con los microorganismos del medio externo. Muchos de ellos viven en condiciones de saprofitismo y no son causantes de daño alguno. La mayoría sin embargo, son potencialmente patógenos. El epitelio intestinal, además de su función absorbente, provee al organismo de una eficaz barrera física e inmunológica frente a los gérmenes y toxinas que se hallan en la luz intestinal. En estado de normalidad de los enterocitos y sus nexos de unión entre sí, constituyen la estructura sobre la que se sostiene la función de barrera física, que es reforzada por la compleja y estratificada maraña de defensas inmunes que va desde las IgA intraluminales, los linfocitos de la mucosa, las placas de Peyer y los ganglios linfáticos mesentéricos, hasta el hígado y el bazo.

Cuando se rompe este eficaz y a la vez frágil sistema de barrera se produce el **acceso al medio interno de los microorganismos entéricos**, fenómeno conocido con el nombre de **translocación bacteriana (TB)**. Son muchos los agentes que pueden propiciar el aumento de permeabilidad que altera la barrera intestinal. Así, dicho fenómeno se halla documentado, a nivel experimental en caso de irradiación intestinal^{94,95}, tras inyección de endotoxina bacteriana que pone en marcha la activación de PMN y la producción de diversos mediadores de la inflamación⁹⁶, en el choque hemorrágico^{98,99}, en el traumatismo térmico cutáneo^{100, 101, 102}, tras la inyección de interleuquina (IL) 2¹⁰³, tras inyectar zymosan, que es un lipopolisacárido activador del complemento¹⁰⁴, en el tratamiento oral con ácido ricinoleico, que causa TB en un

40% de las ratas y se asocia a lesiones microscópicas de la mucosa ¹⁰⁵ y también en el trasplante intestinal experimental ^{106, 107, 108}. En la base de todos los agentes causantes mencionados subyace la isquemia y/o la generación de RLO. También se ha demostrado TB en ratas sometidas a nutrición parenteral total, explicándose el fenómeno en base a la atrofia de la mucosa que condiciona el desuso ^{109, 110}. Se ha propuesto un posible mecanismo para la TB en el que los microorganismos penetran la barrera tras la fagocitosis por las células del sistema mononuclear fagocítico. Dicha fagocitosis no sería posteriormente completada con la lisis del germen por lo que el fagocito haría de vehículo a la penetración del mismo⁹⁷.

El fenómeno de la TB en relación a diversos insultos intestinales, ha sido correlacionado con un incremento de permeabilidad a macromoléculas por parte de la mucosa intestinal ¹⁰⁷. En 1981, en un estudio ya clásico, Granger y cols. demostraron un aumento de la permeabilidad en el intestino felino sometido a isquemia Deitch y cols. intentaron correlacionar y establecer la cronología de entre la lesión mucosa inducida por el choque, el trastorno de la permeabilidad y la TB. Para ello los autores utilizaron un modelo de choque hemorrágico en el cual llegaron a la conclusión de que la TB no es causa sino efecto de la lesión histológica. En el mencionado trabajo correlacionan la TB con la lesión y con el aumento de permeabilidad ⁹⁹. La implicación de los RLO se menciona en el anteriormente citado trabajo de Granger ¹⁰⁷, en el que el mecanismo causal del incremento de la permeabilidad es atribuido a los mismos, pues esta se disminuye al tratar con SOD a los animales ³⁶. El mismo equipo de investigadores,

confirmaron de manera más concluyente la participación de los RLO, al conseguir un incremento de 5 veces en la permeabilidad a albúmina tras la adición a un intestino no isquémico de XO e hipoxantina, como sistema generador de RLO ^{81, 21}.

La implicación de los RLO en el aumento de permeabilidad a macromoléculas y a gérmenes, queda nuevamente patente en el modelo murino de Deitch y cols., en el que inducen TB tras inyección intraperitoneal de una dosis no letal de endotoxina purificada de *E. coli*. El mecanismo que proponen es de disrupción física de la barrera intestinal. En el citado modelo, se consiguió una reducción de la lesión histológica y una disminución cuantitativa de los gérmenes translocados al añadir tratamiento con alopurinol ⁹⁵. Trabajos posteriores del mismo grupo concretan más y atribuyen una mayor importancia a los RLO originados por la acción del hierro (R. de Fenton), que a los RLO generados por los neutrófilos. Dicha conclusión se desprende de unos mejores resultados cuando se asoció tratamiento con quelantes del Fe, que con suero antineutrofílico ¹¹¹. Otro factor que se invoca como causante o al menos contribuyente a la lesión de la mucosa se halla en el propio contenido de la luz intestinal, es decir de las enzimas digestiva. En una primera fase, las proteasas digestivas destruyen las proteínas del ribete en cepillo de las células epiteliales. En condiciones de anoxia, las proteínas del ribete en cepillo no son recambiadas a un ritmo normal, al detenerse los procesos metabólicos de la célula. Esta eventualidad hace que las estructuras subyacentes queden a merced de la acción digestiva de otras enzimas, tales como tripsina y quimotripsina ¹¹².

La denudación o pérdida parcial del epitelio intestinal parece una condición indispensable para que se produzca el paso de gérmenes a través de la barrera intestinal, pero otros factores que concurren en la producción de la translocación bacteriana, hacen referencia a los propios gérmenes. Se ha demostrado translocación en caso de sobrecrecimiento bacteriano ¹¹³. El sobrecrecimiento a su vez puede estar propiciado por falta de motilidad intestinal, que dificulta el arrastre mecánico y progresión del contenido intestinal.

1.7. Preservación y posibilidades
terapéuticas.

La técnica más aceptada hoy día en preservación de órganos consta de varios pasos. En primer lugar se procede a un lavado intravascular del órgano in situ, tras la disección de pedículos y previamente a su extracción del donante. Para ello se utiliza el líquido de preservación frío. Posteriormente el órgano es sumergido en el mismo líquido de preservación a t° entre 0 y 4 °C y así se le mantiene hasta que es implantado en el receptor. Puesto que el líquido de preservación más utilizado hoy día es la solución de Wisconsin que posee un alto contenido en potasio, es necesario un 2º lavado intravascular que elimine los restos de solución preservante y potasio, y que arrastre los hipotéticos metabolitos tóxicos generados durante el periodo de preservación en frío. Todos los métodos efectivos de la preservación de órganos, pasan por la reducción de la temperatura como principal agente protector, utilización de soluciones de preservación cada día más adecuadas y uso de fármacos en la prevención-reducción del SIR.

Tan pronto como un órgano es sometido a isquemia, cesa su aprovisionamiento de nutrientes y se acumulan metabolitos procedentes de reacciones catabólicas. Esta acumulación se asocia a lesiones, reversibles al principio e irreversibles transcurrido un periodo máximo que hacen al órgano inviable. Puesto que dicha destrucción tisular también discurre a través de reacciones bioquímicas cabe en toda lógica pensar que el frío enlentecerá dicho proceso dado que la velocidad de las reacciones depende en gran medida de la temperatura a la que se desarrollan. La hipotermia tiene una

reconocida capacidad en la preservación, no obstante tiene sus limitaciones derivadas de mecanismos cada vez más conocidos.

1.7.1.-EFECTOS DEL ENFRIAMIENTO TISULAR

El enfriamiento, no solo ralentiza la velocidad a la cual se suceden los cambios estructurales que se ven a 37°C, sino que se acompaña de unas diferencias características que sugieren unos mecanismos de lesión adicionales a los existentes. La hinchazón celular ("cell swelling") propia de la isquemia, es mucho más marcada a causa del frío y afecta de una manera más uniforme a diferentes tipos celulares que cuando el mismo fenómeno se debe a la isquemia caliente. La bomba de $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ se inactiva aún disponiendo de ATP suficiente, ello ocasiona la pérdida de K^+ hacia el exterior celular y la entrada de agua que arrastra Na^+ . Este tránsito hidroelectrolítico se debe a que la mayoría de iones intracelulares no son capaces de difundir pasivamente a través de la membrana debido a su elevado peso molecular (Pm), de modo que, al detenerse el mecanismo regulador, se produce una entrada de agua desde el exterior para compensar la presión osmótica. Para contrarrestar este efecto surgieron las primeras soluciones de preservación que se aplicaron al riñón, también llamadas soluciones intracelulares. Se caracterizan por contener sustancias polímeras de elevado Pm. que no pueden difundir pasivamente a través de la membrana (impermeantes) u otras de menor Pm. que aunque difunden, lo hacen lentamente

(permeantes lentas). En ambos casos se consigue el efecto deseado: **igualar la fuerza osmótica a ambos lados de la membrana** ¹¹⁴. Estas soluciones han constituido durante largo tiempo la mejor opción en preservación renal. Su composición electrolítica remeda a la del medio intracelular, pero el factor determinante de su efectividad es la presencia de las sustancias impermeantes.

Otro de los efectos del enfriamiento celular es el incremento del calcio intracelular, particularmente en la mitocondria. La baja concentración de calcio, que en condiciones de normalidad existe a nivel intracelular, es también mantenida por una ATPasa de membrana, que se detiene igual que la bomba de sodio, ocasionando la penetración del calcio al interior de la célula. Este incremento se ve potenciado también por la liberación del catión fijado a complejos proteicos que ocurre al descender el pH. El calcio tiene gran importancia como mensajero en la regulación de numerosos procesos fisiológicos y la alteración en su homeóstasis es causante de alteraciones importantes en las funciones celulares, como la activación de la calmodulina, que a través de la activación de otros mecanismos enzimáticos favorece la vasoconstricción ¹¹⁵ y la aceleración de la conversión de XD en XO que favorece la generación de RLO⁴².

1.7.2.-BIOQUIMICA DE LA HIPOTERMIA

En condiciones de hipotermia, los tejidos siguen consumiendo glucosa, pero en su mayoría es metabolizada a lactato, es decir se metaboliza de manera anaerobia. Pegg y cols.¹⁴ intentaron estimular la glucólisis aerobia en condiciones "ex vivo" a base de incrementar la PO_2 y hallaron que incluso si se perfunde el tejido con líquido oxigenado a PO_2 elevadas se sigue consumiendo glucosa y acumulándose lactato. Este hallazgo sugiere que no se detiene la **glucólisis anaerobia** y que esta es la principal fuente energética en hipotermia. Siguiendo con el experimento hasta cifras de 650mmHg. se consiguió disminuir la producción de lactato. La posterior adición de hipoxantina como base púrica precursora de la síntesis de nucleótidos aportó adicionalmente una mejora importante en los niveles de fosfatos de alta energía. Los estudios de otros autores apuntan a que la imposibilidad de glucólisis aerobia en condiciones de hipotermia se halla en la membrana mitocondrial y sus sistemas transportadores, que por tanto serían limitantes de la síntesis de ATP en condiciones de isquemia fría. Por otra parte la pérdida celular de nucleótidos, a la que conduce el cese de aporte sanguíneo, llega en el momento en que el AMP procedente del ATP es defosforilado a adenosina por la 5'-nucleotidasa; esta pérdida es limitante para conservar la viabilidad del órgano¹⁴.

1.7.3.-SOLUCIONES DE PRESERVACION

La sustancia que se utiliza como impermeante en la **solución de Collins** ¹¹⁴ es la glucosa. Dicha solución se ha mostrado muy útil en preservación renal por ser las células renales poco permeables a la glucosa, evitándose el edema y por contribuir a mantener el pH. El primer paso de la glucólisis es el paso de glucosa a glucosa-6-fosfato (G-6P). En el riñón este paso lo realiza la hexoquinasa, que tiene la particularidad de inhibirse por su producto, es decir presenta "Feed back" negativo cuando se acumula G-6P. La detención de la enzima detiene también la glucólisis anaerobia y por tanto evita en gran medida la acidosis intracelular, manteniendo el pH. En otros órganos, el primer paso de la glucólisis lo realizan otras enzimas que no poseen esta característica, ventajosa para el riñón.

Basándose en las consideraciones anteriores Belzer y cols ²⁹. crearon una solución de preservación apropiada para otros órganos, que tomó el nombre de la Universidad en la que fue creada: la **U. de Wisconsin**. Como sustancias **impermeantes**, se utilizan la **rafinosa** y el **lactobionato**. Para impedir la expansión del líquido extracelular, que provoca una compresión de los microcapilares y por tanto una mala reperusión se añade un coloide, también impermeante, como el **hidroxiethylalmidón** que proporciona una adecuada presión oncótica.

Otra de las características de la solución de la solución de Wisconsin (UW) es su mayor capacidad para prevenir la acidosis intracelular, producida como

consecuencia de la glucólisis anaerobia, mediante el **fosfato**, que es capaz de mantener un pH estable por sus propiedades como sustancia tampón.

La solución UW consta de otros componentes, que también contribuyen a sus espectaculares resultados, como el **glutafion** que en su calidad de agente reductor tiene efecto protector sobre los lípidos e impide su oxidación ⁶⁸, la **adenosina** que es un sustrato energético precursor de nucleótidos de alta energía y el **alopurinol**, que por su acción inhibitoria de la enzima xantina oxidasa, previene la formación de RLO.

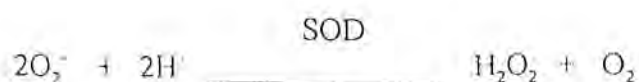
Actualmente la solución UW es la más aceptada para el trasplante de órganos como hígado, páncreas y corazón por que su uso mejora los resultados de manera significativa. Sin embargo sus resultados en intestino son algo controvertidos, y así varios investigadores ^{116, 117} hallan que, efectivamente, es la solución más apropiada, pero en otros trabajos se demuestra una efectividad superponible a la de una solución salina comercial normal ¹¹⁸ sin aditivos. Existen trabajos en los que se consiguen buenos resultados utilizando solución de Ringer lactato ¹¹⁹. Incluso hay trabajos en los que se cuestiona la idoneidad de las técnicas que se utilizan en preservación de órganos cuando se aplican al intestino. A este respecto el trabajo del grupo de Schraut ¹²⁰ aboga por el recalentamiento del órgano previamente a la reperfusión y por evitar el 2º lavado intravascular que provoca mayores lesiones de la microcirculación e impide una correcta y completa reperfusión. En el mismo trabajo los autores propugnan la solución de preservación PBS 140 (phosphate-buffered sucrose) en la que la sucrosa ejerce la acción de impermeante y el fosfato protege frente a las variaciones del pH.

También cobra un cierto interés la técnica del acondicionamiento isquémico en la que un tejido sometido a pequeños periodos de isquemia normotérmica, crea una cierta tolerancia a la misma, de manera que cuando sobreviene una isquemia más larga, esta es mejor tolerada por el tejido.

1.7.4.-POSIBILIDADES TERAPEUTICAS EN EL SINDROME DE ISQUEMIA-REPERFUSION

En condiciones de metabolismo normal, se genera una pequeña cantidad de RLO, que proceden de los llamados agujeros metabólicos, en que se producen reducciones univalentes del oxígeno. Aunque cuantitativamente es muy poco el oxígeno así reducido (aproximadamente un 2%), es suficiente para que los RLO que se producen requieran una detoxificación endógena. Para ello la célula ha desarrollado toda una serie de sistemas que se detallan en la tabla 4.1, como compuestos hidro y liposolubles (vitaminas C y E), proteínas y enzimas.

Entre las enzimas destacan las superóxidodismutasas o SOD, que son un grupo de metaloenzimas presentes todas las células de los mamíferos. Solo algunas bacterias aerobias y los organismos anaerobios carecen de las mismas puesto que su función es la de eliminar los radicales superóxido que se producen en las reacciones del metabolismo aerobio:



La acción de la SOD se complementa con la de otras dos enzimas como la catalasa y la glutatión peroxidasa, que son capaces de reducir al peróxido de hidrógeno a agua.

Se han conseguido diferentes formas de la SOD cuya efectividad en la reducción de la lesión postreperusión ha sido demostrada en reiteradas ocasiones^{21,36,121}. Además de las diferentes SOD comerciales, existen otras sustancias que se pueden utilizar para hacer frente a los RLO:

-Inhibidores de la XO. El alopurinol, utilizado en el tratamiento de la hiperuricemia por su acción inhibidora de la XD, se ha mostrado eficaz en la prevención de lesiones mediadas por los RLO generados por XO.

-Captadores de radicales libres: Para el OH- tenemos la dimetiltiourea, el manitol, dimetilsulfóxido etc. Para los radicales peroxi (R-OO) y otros tenemos la vitamina E.

-Quelantes del hierro. Puesto que la generación de RLO precisa de la presencia de cationes metálicos entre los que destaca el hierro. Entre estos quelantes destaca la desferroxiamina.

-Otros métodos utilizados en la prevención de la lesión de isquemia reperusión han sido la deplección neutrofílica con compuestos antineutrofílicos y la inhibición de la adhesión leucocito-endotelio mediante el uso de anticuerpos monoclonales.

Últimamente ha cobrado un especial interés una familia de fármacos de estructura esteroide, pero con la característica de carecer de acción mineralo o glucocorticoide. Se trata de los **21-aminosteroides o lazaroides**. Dicho grupo de fármacos de ha mostrado eficaz en la mejora de la supervivencia a nivel experimental tras la aplicación de varios modelos de choque y de traumatismo e isquemia a nivel del sistema nervioso central. Así por ejemplo Hall y cols.¹²² han demostrado un claro aumento de la supervivencia y/o reducción de las secuelas tras choque hipovolémico experimental y tras traumatismo a nivel espinal en gatos. Aoki y Lefer¹²³ han obtenido iguales resultados en choque traumático en la rata

1.7.5.- 21-AMINOSTEROIDES O LAZAROIDES

Los **21-aminosteroides (21-A)** son una familia de fármacos, que nacieron para el tratamiento de la lesión traumático- isquémica del sistema nervioso central. Fueron diseñados específicamente para inhibir los fenómenos de lipoperoxidación a nivel de las membranas dado el protagonismo que toman los RLO en las lesiones a este nivel. La isquemia, de un modo u otro, siempre subyace en la base fisiopatológica de las lesiones provocadas por traumatismos, pero en el cerebro, la isquemia postraumática toma especial protagonismo en el desarrollo de las lesiones y sus graves consecuencias dado que este parénquima se aloja en una cavidad estanca sin posibilidad de expansión.

Ello es la causa de que el más mínimo edema postraumático sea el origen de fenómenos de isquemia.

Las investigaciones realizadas en el desarrollo de los 21-A surgieron de la necesidad de mimetizar los efectos beneficiosos de las altas dosis de corticoesteroides, en el manejo del traumatismo craneoencefálico grave, restando los efectos colaterales de estos fármacos derivados de su acción mineralo y sobre todo glucocorticoide y supresora del eje hipotálamo-hipofisario

Se ha sugerido, que el efecto beneficioso de los corticoesteroides en el tratamiento de la isquemia cerebral radica, en parte, en la capacidad que tienen, a altas dosis, de inhibir la lipoperoxidación más que a su acción hormonal ¹²⁴, de ahí la necesidad de desarrollar fármacos capaces de emular esta acción. Es posible que aunque no tengan acción mineral o glucocorticoide, posean algún efecto inmunosupresor pues al comparar estos fármacos con la metilprednisolona, no se vieron diferencias en la inhibición de la generación de leucotrieno (LT) B₄ en un cultivo de polimorfonucleares humanos normales ¹²⁵.

Estructura química y mecanismo de acción de los 21-A

La estructura química se basa en el conocido anillo del ciclopentanoperhidrofenantreno. Dicho anillo consta de 19 carbonos, y las principales diferencias entre unos y otros compuestos esteroides se hallan en el carbono 17.

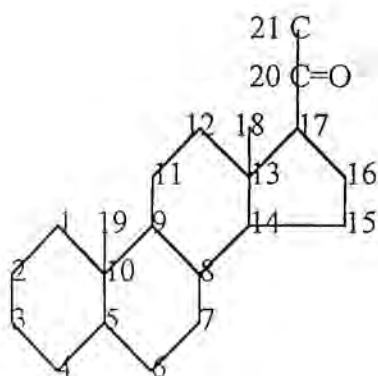
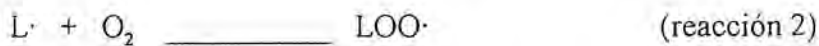
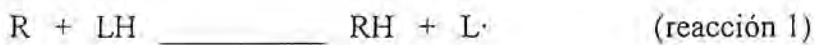


FIG 7.1: Núcleo del ciclohexanoperhidrofenantreno con los carbonos número 20 y 21, propios de las hormonas esteroideas de la corteza suprarrenal.

Cuando en C_{17} se hallan enlazados los carbonos número 20 y 21 queda caracterizada la estructura de las hormonas de la corteza suprarrenal (glucocorticoides y mineralcorticoides, fig. 7.1). La acción mineral y glucocorticoide se halla en el carbono número 11 que en dichas hormonas está unido a un grupo alcohol (-OH), y que en los 21-A ha sido sustituido por un doble enlace.¹²⁶, pero el rasgo más característico de los 21-A es la unión, como su propio nombre indica, de grupos amino, concretamente nucleótidos de piridina o pirimidina, a nivel del carbono número 21. El primer lazaroide fue sintetizado en 1985 y desde entonces se han sintetizado una gran cantidad de los mismos.

Acción in vitro

Los RLO surgen de diversas fuentes en un tejido isquémico y sobre todo tras la reperfusión. Debido al electrón desapareado en su orbital atómico externo, son de una elevada reactividad y pueden atacar diversos e importantes constituyentes celulares. Los ácidos grasos poliinsaturados comprendidos en las membranas celulares y en las de los orgánulos son particularmente susceptibles del ataque de los RLO, principalmente en el hidrógeno alílico, entre dos dobles enlaces adyacentes. Dicho átomo de hidrógeno es fácilmente arrancado de la cadena del ácido graso (reacción 1), resultando de dicha reacción un radical lípido ($L\cdot$). Este radical reacciona con el oxígeno disuelto en la membrana (reacción 2) originando un nuevo radical peroxilo ($LOO\cdot$). El peroxilo a su vez puede reaccionar (reacción 3) con otro ácido graso poliinsaturado originando un radical hidroperoxilo ($LOOH$) y un segundo radical lípido ($L\cdot$), que se encadena en



una nueva reacción. Por otra parte la generación de RLO se ve ampliada por la

participación del hierro ⁵³. El hierro no solo facilita el encadenamiento, mediante la amplificación de la producción de RLO (OH⁻ en la reacción de Fenton), sino que puede catalizar el encadenamiento de las mismas a través de la descomposición de los hidroperóxidos (LOOH) a peroxilos (LOO[·]) y alcoxilos (LO[·]) (reacciones 4 y 5).



Los 21-A han demostrado ser unos potentes inhibidores de la lipoperoxidación *in vitro*. Usando homogeneizados de cerebro de rata o sinaptosomas de cerebro de rata purificados como fuente de lípidos, tanto U74006F como U74500A, los primeros 21-A sintetizados, inhiben la lipoperoxidación dependiente del hierro ¹²⁷. También en un medio de fosfolípidos carente de membranas y exento de hierro, se logra esta inhibición. Utilizando un sistema generador de radicales libres que inicien la lipoperoxidación en una solución de ácido linoleico disuelto en metanol, el fármaco mediante su acción quelante de hidroperóxidos lípidos (LOO[·]), inhibe los fenómenos de lipoperoxidación ^{127, 128}. Esta acción quelante de LOO[·], que reside en la porción amino de la molécula, es análoga a la de la vitamina E. El tocoferol o Vitamina E es el más potente inhibidor endógeno de la lipoperoxidación en virtud de su capacidad para quelar los radicales LOO[·] y prevenir así la reacción con otros ácidos grasos insaturados de membrana ⁷⁰. Durante la inhibición de la lipoperoxidación, el 21-A establece una competición por la misma reacción que la vitamina E, y enlentece su degradación ¹²⁸.

En realidad los 21-A caen dentro de dos clases según su mecanismo de actuación. Una de ellas, representada por U74006F, que poseen pirimidina como nucleótido constituyente del grupo amino en su molécula, son los que compiten con la vitamina E y únicamente tienen este mecanismo, mientras que los segundos, que se caracterizan por poseer un fragmento N-C=C-N en su molécula y están basados en la piridina, son antioxidantes más poderosos por que poseen la doble capacidad de interacción con el catión ferroso, es decir inhiben la lipoperoxidación Fe-dependiente¹²⁹ y el efecto vitamina E (capacidad quelante de los hidroperóxidos lípidos (LOO·)).

En general los 21-A además de su efecto barrendero de RLO e inhibidor de la lipoperoxidación, tienen efectos estabilizadores de la membrana, por ejemplo en membranas lesionadas de células de tumor pituitario de ratón son capaces de inhibir la liberación del ácido araquidónico¹³⁰. Braugher y cols han sugerido que los 21-Aminosteroides son potentes inhibidores de la lipoperoxidación inducida por el hierro y que su mecanismo de acción pasa por la inserción de la parte lipofílica de su estructura dentro de las membranas fosfolípicas¹²⁷.

Acción in vivo

La mayoría de estudios sobre la efectividad de los 21-A in vivo se han realizado en modelos de traumatismo e isquemia cerebral, si bien existen estudios en

diversidad de órganos. Como se vio antes, el impulso para el desarrollo de estos fármacos, nació de la necesidad de aprovechar de alguna manera los efectos beneficiosos de los corticoesteroides en traumatismos e isquemia cerebral sin pagar el precio de sus efectos colaterales. Un rasgo característico de los traumatismos en el SNC, es la hipoperfusión postraumática, que secundariamente, ocasiona isquemia. Braughler y cols.¹³¹, en un modelo de contusión espinal, sobre la médula expuesta a la caída de un peso libre, constatan la mencionada hipoperfusión. Tras la administración de U74006F durante los 30 minutos siguientes al traumatismo logran prevenirla. La principal evidencia *in vivo* de la inhibición de los fenómenos de lipoperoxidación se halla en la constatación del ahorro de vitamina E en un modelo de traumatismo espinal en gatos que desarrollaron Ingold y cols.⁷⁰. En el segmento traumatizado se puede medir el consumo de vitamina E, que no se produce en los segmentos sanos, pero si se administra U74006F, los niveles de tocoferol se mantienen comparables a los de otros segmentos medulares no traumatizados. El efecto beneficioso de los 21-A no solo se manifiesta a nivel bioquímico, sino también a nivel clínico, consiguiendo espectaculares resultados en cuanto a supervivencia y recuperación neurológica tanto en modelos de traumatismo e isquemia espinal y cerebral^{132, 133}, como en choque hipovolémico^{35,90}.

Otros campos de investigación sobre los 21-A han sido a nivel miocárdico, donde también han demostrado ser capaces de reducir las lesiones e inhibir la lipoperoxidación en modelos de isquemia reperusión^{35,90}, y a nivel gastrointestinal.

Son varias las evidencias del hipotético papel protector que pueden tomar los 21-A en isquemia reperusión a nivel intestinal. Es conocido que el intestino, por su riqueza en XD, es particularmente susceptible a las lesiones asociadas a los fenómenos de isquemia reperusión. También cabe recordar que existen multitud de trabajos en los que el uso de inhibidores conocidos de la generación de RLO y/o barrenderos de los mismos, han mejorado los resultados en cuanto a supervivencia y función del órgano, en modelos de isquemia y de trasplante. Por ello varios equipos de investigadores han ensayado el uso de los lazaroides en diversos modelos de isquemia intestinal, estudiando distintas manifestaciones de la lesión y el impacto que sobre ellas pudiera tener el uso de lazaroides.

Los 21-A se han utilizado con éxito en la prevención de la lesión postreperusión tras el vólvulo gástrico canino¹³⁴. Esta entidad, es frecuente en perros "salchicha" y está gravada con una elevada mortalidad, no solo por la isquemia reperusión gástrica, sino por que la propia volvulación gástrica es causante de isquemia de gran parte del tracto gastrointestinal y de compresión de la cava inferior ocasionando un severo trastorno hemodinámico. Los autores crearon un modelo experimental de vólvulo gástrico inducido quirúrgicamente a fin de comparar la mortalidad y los niveles de malondialdido, como expresión de la lipoperoxidación, en tres grupos de animales. Los resultados obtenidos mostraron una supervivencia de 5/5 en los animales tratados con U74006-F y unos niveles de MDA cercanos a los basales

frente al grupo control tratado con solución salina, cuya mortalidad fue de 4/8, y el grupo tratado con alopurinol en que la mortalidad fue de 3/8 .

Otros modelos de isquemia intestinal sin componente multisistémico como el modelo de vólvulo, también han mostrado buenos resultados con el uso de lazaroïdes. Chen y cols.¹³⁵ en un trabajo en el que estudian primero un modelo de isquemia caliente (isquemia intestinal) y en una segunda fase un modelo de isquemia fría (trasplante de intestino delgado), encuentran que al administrar tratamiento con U74389G, la permeabilidad al Cr-EDTA se mantiene significativamente baja, frente al grupo control, es decir, el aminosteroïde mantiene la función de barrera de la mucosa intestinal tras la isquemia caliente seguida de reperfusión. En la segunda parte del estudio, en el modelo de trasplante, de nuevo el aminosteroïde mantiene una permeabilidad significativamente más baja al Cr-EDTA tanto en los injertos preservados con solución de Eurocollins como en los preservados con Solución de Wisconsin. Similares resultados obtienen Katz y cols.¹³⁶ en su modelo de trasplante. Cuando al injerto preservado durante 18 h en solución de Wisconsin a 4° C se le añade U74389G antes de la extracción y en el momento de la reperfusión se consigue un mejor resultado funcional (ensayado con el test de la maltosa) y una mejor apariencia histológica, que en el grupo sin tratamiento , acercándose ambos parámetros más al grupo de trasplante inmediato.

2. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y FUNDAMENTOS.

Actualmente los resultados del trasplante intestinal distan de ser todo lo alentadores que son los de los otros órganos¹³⁷ en base a su labilidad frente a la isquemia, que obliga a tiempos cortos de preservación y a su riqueza inmunológica.

En la práctica clínica, los injertos intestinales, deben ser trasplantados a la mayor brevedad posible⁶, por que las técnicas de preservación comúnmente usadas en otros órganos parecen menos efectivas en la prevención del daño isquémico intestinal. Por ello la expansión de los programas de TID a los equipos de todo el mundo, demanda la mejora entre otros aspectos de las técnicas y de los líquidos de preservación.

Entre las soluciones disponibles hoy día no se ha encontrado la que de manera unánime ofrezca los mejores resultados en todos los aspectos o facetas de la lesión intestinal por reperfusión. La mayoría de autores está de acuerdo es la necesidad de suprimir las fuentes de generación de RLO que inexorablemente concurren cuando existen fenómenos de isquemia y reperfusión^{29, 138, 139, 136}, únicos mediadores que parecen claramente implicados en el mecanismo de lesión postreperfusión. Se ha concedido gran importancia a la riqueza intestinal en la enzima xantina deshidrogenasa (XD), cuya conversión en forma oxidada, la transforma en una fuente con gran capacidad de producción de RLO.

Para evitar los efectos de estos mediadores, se han intentado varias estrategias como inhibir la conversión de la XD en su forma oxidada (XO) mediante el mantenimiento de la homeostasis del calcio^{140, 115}. Otros enfoques han sido la adición a

los líquidos de preservación de fármacos inhibidores de la XD-XO como el alopurinol⁶⁴, fármaco presente en la solución de Wisconsin²⁹, o bien de barrenderos de los RLO como la SOD¹³⁸ y la eliminación de otras fuentes de RLO como los neutrófilos^{58, 54, 57, 121}.

Según la amplia literatura revisada sobre el tema parece de gran importancia la **reducción de los RLO**, ya sea a nivel de sus **fuentes** para que no se formen o bien mediante su **"captura" por barrenderos**.

La pérdida en el intestino de la función de barrera puede condicionar gran parte del fracaso del injerto en el postrasplante inmediato. Una de las más genuinas manifestaciones de la isquemia reperusión intestinal, es el aumento neto de la permeabilidad a macromoléculas que en condiciones normales no deben atravesar la barrera intestinal^{36, 107, 141, 41, 81}. Ello es debido a la concurrencia de dos hechos, la **lesión del endotelio**^{84, 85} de la fina red de capilares en el interior de las vellosidades de la mucosa, y a los diversos grados de **denudación epitelial** que se originan como consecuencia de las lesiones isquémicas de las células del parénquima noble intestinal: los enterocitos.

La altamente selectiva barrera intestinal cuando sufre determinados insultos, pierde parte de esta capacidad y los gérmenes son capaces de translocar, es decir reubicarse tras atravesar la barrera y alcanzar el medio interno a nivel de la circulación linfática y sanguínea mesentéricas.

Varios factores lesivos concurren en el trasplante intestinal, y facilitan la TB como que el injerto sea sometido a un periodo de isquemia seguido de reperfusión; cierto grado de denudación de la mucosa a causa de las lesiones que se producen por la isquemia misma ^{17, 78, 79, 82} y por la acción digestiva de las proteasas ¹¹⁹; una motilidad reducida a causa de la denervación del injerto ^{117, 142} que le impide el arrastre mecánico de su contenido y facilita el sobrecrecimiento de gérmenes en su interior ¹¹³. De hecho la asociación entre TB y el trasplante intestinal ya se ha demostrado ^{107, 108}.

A partir de las premisas expuestas se planteó la siguiente hipótesis:

La inhibición mediante un 21-Aminosteroide del proceso de peroxidación lipídica, responsable final del daño oxidativo tras la reperfusión intestinal, debe traducirse en una mejoría anatomofuncional del injerto evaluada a través de una menor translocación de gérmenes y una mejor preservación histológica.

Para ello, el mencionado lazaroide debe complementar la acción más beneficiosa de un líquido de preservación cuya idoneidad venga dada por la presencia en su composición de sustancias citoprotectoras, en comparación con otro líquido de preservación que carezca de ellas.

3. Objetivos.

Nuestra hipótesis de trabajo se concreta en los siguientes enunciados:

1) **Determinación de los niveles de MDA para evaluar el verdadero impacto de los fenómenos de peroxidación lipídica en el TID inmediato y tras 6 horas de preservación.**

2) **Establecer si, como efectivamente ocurre en otros órganos, la solución de UW con sus diversos aditivos preserva mejor el injerto intestinal que RL.**

3) **Evaluar el efecto de la adición de 21-A en el bloqueo de la peroxidación lipídica.**

4) **Valorar si existe vinculación entre la reducción de los fenómenos de lipoperoxidación con 21-A y una mejora real en la conservación de la función del órgano, mediante el estudio de su capacidad como barrera frente a la TB.**

5) **Estudiar el paralelismo entre la hipotética reducción de la TB y la mejor preservación de la histología del injerto.**

4. MATERIAL Y METODO.

4.1.-DISEÑO EXPERIMENTAL

La rata es el animal de experimentación más utilizado. Las diversas especies de ratas de laboratorio aúnan resistencia y facilidad en el manejo per y postoperatorio. Son de mantenimiento relativamente barato y se reproducen con gran facilidad, lo que permite obtener cepas isogénicas en periodos de tiempo razonablemente cortos. Al ser los animales más empleados por la mayoría de equipos de cirugía experimental, existe gran cantidad de información sobre su fisiología y sobre diferentes modelos experimentales. Ello permite aprovechar las investigaciones y datos obtenidos por otros de investigadores.

Un factor limitante de los modelos en ratas es su tamaño, que obliga a adquirir experiencia microquirúrgica en determinados modelos y dificulta la obtención de muestras.

Para el presente trabajo se han utilizado ratas Lewis, machos de 200 a 250 gr. de peso, de cepas isogénicas para excluir los efectos del rechazo inmunológico. Fueron suministradas por el estabulario de la URE (Unitat de Recerca Experimental), en el que son cuidadas bajo supervisión veterinaria. Siguiendo la línea marcada en la investigación por este centro, se respetaron las normas de la CEE en el "Convenio sobre protección de los animales vertebrados utilizados con fines experimentales y otros fines científicos" (Diario Oficial de las Comunidades Europeas, 18 de diciembre de 1986).

A los animales, bajo anestesia con éter etílico, se les extrajo el intestino (donante), o en su caso se realizó un trasplante intestinal heterotópico (receptor). Cada par de ratas, donante y receptor, fueron emparejadas al azar, y antes de iniciar la operación del donante se escogía para tal fin la de menor peso.

El **protocolo terapéutico** fue el siguiente, para los animales que recibieron tratamiento con el fármaco U74389G:

- Donante 6mg/k, 1/2 hora antes de finalizar la extracción y perfusión del órgano.
- Receptor 3mg /k, 5 minutos antes de la reperfusión.

A los que no recibieron fármaco, se les administró el vehículo del mismo en idéntica dosis para evitar el sesgo asociado al posible beneficio puramente hemodinámico de la administración del mismo. Los líquidos de preservación que se utilizaron fueron la solución de Ringer lactato (RL) en la mitad de los grupos y solución de Wisconsin (UW) en el resto. Los periodos de **isquemia fría** fueron de **0 y 6 horas**. Durante dichos periodos de isquemia los injertos fueron mantenidos a 4° C en la misma solución utilizada para la perfusión y lavado del injerto .

GRUPOS EXPERIMENTALES

GRUPO A: Grupos experimentales de TID inmediato (0 h) en los que se utilizó RL a 4°C como solución de perfusión y de preservación del injerto hasta preparar el receptor.

Grupo A.1: (n=7) RL + vehículo.

Grupo A.2: (n=7) RL + U74389-G a donante y receptor a las dosis indicadas.

GRUPO B: Grupos experimentales de TID inmediato en los que se utilizó la solución UW como líquido de perfusión y de preservación durante los minutos que tarda la preparación del receptor.

Grupo B.1: (n=7) UW + vehículo.

Grupo B.2: (n=7) UW + U74389-G a donante y receptor.

GRUPO C: Grupos experimentales de TID con preservación de 6 horas en los que se utilizó RL como líquido de perfusión y preservación.

Grupo C.1: (n=7) RL + vehículo.

Grupo C.2: (n=7) RL + U74389-G a donante y receptor.

GRUPO D: Grupos experimentales de TID con preservación de 6 horas en los que se utilizó UW.

Grupo D.1: (n=7) UW + vehículo.

Grupo D.2: (n=7) UW + U74389-G.

GRUPO SHAM: (n=7) . Grupo control para determinaciones **basales**, al cual se le practicó una laparotomía, que posteriormente se cerraba, tomándose muestras a los 90 minutos.

Los animales fueron sacrificados a los 90 minutos postreperfusión, para lo cual se les volvió a anestésiar con éter, con la finalidad de obtener las muestras para los estudios siguientes:

- 1) Malondialdehído (MDA) en tejido intestinal (zona media del ileon del injerto)
- 2) MDA plasmático.
- 3) Translocación bacteriana a nivel de los ganglios linfáticos mesentéricos del injerto.
- 4) Translocación bacteriana a nivel del bazo del receptor.
- 5) Translocación bacteriana a nivel del hígado del receptor.
- 6) Estudios anatomopatológicos de los injertos intestinales.

4.2.-CONSIDERACIONES TECNICAS DEL TID HETEROTOPICO EN RATAS

1)Material quirúrgico: (Figura 5.1)

-Microscopio de microcirugia; en nuestro caso dispusimos de un Leica

Wild M650

-Pinzas de Adson sin dientes.

- Pinzas de disección microquirúrgica curvas y rectas; estas últimas pueden servir también como portagujas para las microsuturas vasculares.
- Tijeras de Metzenbaum pequeñas y tijeras microquirúrgicas.
- Pinzas de oclusión vascular ("Clamps") muy poco traumáticos, adecuados a la delicada pared vascular de las ratas.
- Ligaduras de seda de 6/0 para la extracción del injerto.
- Monofilamento (Ethilon ® de 9/0) para las microsuturas vasculares.
- Gasas, jeringas, agujas.
- Recipiente para la conservación del injerto, rodeado de hielo.
- Solución de perfusión Belzer o solución de Wisconsin y suero Ringer Lactato.

2) Material anestésico (figura 5.1)

- Una jeringa de alimentación con una gasa empapada en éter en su interior.
- Una campana de cristal para anestésicar.
- Éter etílico.

La técnica anestésica es la misma en donante y receptor, a base de éter etílico que por su volatilidad, permite anestésicar al animal con gran rapidez y facilita la recuperación del animal al finalizar la operación y en caso de una eventual depresión

respiratoria. El éter es además escasamente tóxico. La duración total del tiempo operatorio en los dos animales, oscila entre los 90 y 120 minutos. El periodo de implantación del injerto, suele durar de 25 a 30 minutos.

1) Operación en el animal donante: Previo rasurado y desinfección de la piel con yodopovidona, se inicia con una gran incisión laparotómica en T invertida que nos proporciona un excelente campo para la disección de pedículos vasculares. Se envuelve el intestino con una lámina de celofán, previa irrigación del mismo con solución salina, para mantenerlo en óptimas condiciones de humedad. La operación propiamente dicha, se inicia con una colectomía total. Para ello se disecan en primer lugar los vasos cólicos medios. Esta maniobra debe precederse de la sección de una fina lámina serosa que une el ángulo de Treitz del intestino al mesocolon izquierdo. Se procede luego a despegar la primera asa yeyunal de la cara inferior del mesocolon transversal, a la que se halla íntimamente unida. Entonces queda ya libre el colon transversal, para disecar y seccionar los vasos cólicos medios. Posteriormente, se despliega todo el colon y tras separar el marco duodenal del colon ascendente, queda expuesto todo el mesenterio, con la vena mesentérica en su interior. Se hacen en este momento visibles los vasos del colon derecho, que se seccionan entre ligaduras. A continuación se secciona el íleon terminal, tras disecar y ligar su arcada marginal. El colon es retirado a un lado, no siendo precisa la identificación de los vasos del colon izquierdo, por lo alejados que surgen. Faltan unos 30 minutos para concluir la

operación del donante y es ahora cuando administramos el fármaco o en su caso, vehículo, mediante punción a nivel de la cava inferior.

Hasta ahora, se ha preparado y aislado el segmento intestinal a trasplantar y se inicia la disección de pedículos vasculares; empezamos por la disección portal para ligar sus tributarias esplénica, pilórica y vasos pancreáticos (Fig. 5.2). Las estructuras venosas en la rata son de una pared extremadamente fina y de difícil identificación cuando están exangües, por lo que la disección debe ser muy cuidadosa y en toda la longitud de la vena hasta su división en el hilio hepático. El cuidado en la disección facilitará su identificación en el momento del implante. La correcta disección de la porta requiere una maniobra parecida a la de Kocher en clínica humana, en la que se voltea el duodeno y su meso hacia la izquierda del animal. En la rata, el tejido pancreático está constituido por el mesoduodeno, y a diferencia de otros mamíferos, no es un órgano sólido. Durante la disección de la vena esplénica, debemos identificar la arteria hepática y la vía biliar, para no incluirlas en la ligadura de dicha vena, accidente que origina una importante hemorragia procedente de la arteria hepática y que habitualmente impide seguir adelante con la técnica.

Finalmente, resta la disección de la arteria mesentérica superior (AMS) y del segmento aórtico donde nace la misma. Durante esta maniobra el paso más importante es la disección y sección de la arteria renal derecha que nace al mismo nivel que la AMS pero más posterior en la circunferencia aórtica (Fig. 5.2). Tras revisar si queda alguna tributaria lumbar en el segmento aórtico y eventualmente ligarla, ya tenemos el

injerto sujeto solo por sus pedículos vasculares. El nivel de sección duodenal vendrá dado por el cambio de color (hacia la isquemia) que condiciona el déficit de irrigación causado por la ligadura pancreática.

Tras el lavado endoluminal del injerto, realizado a baja presión para evitar la distensión de la pared intestinal y la lesión del lecho microcirculatorio, procedemos ahora a la obliteración de la aorta por encima y por debajo de la AMS, sección de la porta en el hilio hepático y lavado intravascular del injerto a baja presión, mediante punción aórtica (fig. 5.3). Se concluye con la ligadura y sección aórtica por encima del nivel de la punción e inmersión del injerto en el líquido de preservación. Cuando el lavado intravascular es correcto, el injerto queda de un color tenuemente rosado y el mesenterio blanco, con las estructuras vasculares transparentes (fig 5.3).

2) Operación en el animal receptor: Tras rasurar y pintar la piel con yodopovidona, se inicia con una laparotomía media xifopúbica. Se envuelve también todo el paquete intestinal propio del animal en una lámina de plástico, para evitar la evaporación excesiva y se deja dicho paquete rechazado al lado derecho. Queda así expuesto todo el retroperitoneo donde vemos ambos riñones, la aorta y la cava. Se aborda el retroperitoneo, mediante el desgarro de la lámina serosa que lo recubre y aislamos un segmento de aorta y cava por debajo de los vasos renales (fig. 5.4). Procuramos que en dicho segmento, no haya ramitas lumbares. Procedemos a la obliteración de ambos vasos, mediante pinzas hemostáticas. Esta maniobra es muy bien tolerada por la rata.

Ya solo queda realizar las microsuturas vasculares para reperfundir el injerto. En primer lugar se procede a practicar una arteriotomía sobre la aorta y una venotomía sobre la cava de 2-3 mm. cada una (fig. 5.5). Se envuelve el injerto en una lámina de plástico y gasa humedecida con la solución conservante, para mantenerlo frío y húmedo, dejando el pedículo vascular (segmento aortomesentérico y vena porta) fuera del envoltorio, para realizar las anastomosis. Las suturas vasculares se practican de manera continua con un monofilamento (Ethilon ®) de 9 - 0 en posición aorto-aórtica terminolateral y portocava terminolateral (fig. 5.6 y 5.7). Una vez terminadas las suturas, y previamente a la reperfusión del órgano, se administra el fármaco o en su caso el vehículo (fig. 5.8).

Después de 1 o 2 minutos tras la administración del fármaco, se procede a la retirada de los clips vasculares reperfundiéndose el órgano. Normalmente, si las suturas son correctas, se produce una mínima hemorragia que se soluciona tras breves momentos de compresión hemostática. Se comprueba ahora que las suturas funcionen correctamente, y sobre todo que la sutura venosa tenga correcto drenaje. Solo queda cerrar el extremo proximal del injerto y practicar un estoma, en este caso una ileostomía, para el extremo distal, y cerrar la laparotomía.

Transcurridos 90' del inicio de la reperfusión se vuelve a anestésiar al animal para la obtención de muestras.

VALIDACION DEL MODELO TECNICO

Previamente a la iniciación de los grupos experimentales que conforman este trabajo, tuvimos que poner a punto el modelo experimental, asegurando una supervivencia del 100% , que indica la ausencia de errores técnicos. Para ello se realizaron numerosos trasplantes hasta que los animales se recuperaban sin problemas tras la intervención. Para el periodo de entrenamiento se utilizaron ratas de raza Wistar, no isogénicas, por su facilidad de crianza, reproducción y manejo que abaratan los costes.

Cuando se alcanzó el grado suficiente de destreza técnica se realizaron dos grupos de trasplante intestinal heterotópico de 7 animales cada uno, utilizando ratas de raza Lewis de cepas isogénicas. Los trasplantes fueron inmediatos en un grupo y a 6 horas de preservación en otro, utilizando como solución conservante suero Ringer lactato. Sobre estos animales no se realizaron estudios y únicamente sirvieron para comprobar la supervivencia, que en el grupo de TID inmediato fue del 100% tras 7 días de observación y en el grupo de TID diferido alrededor del 71%.

TECNICAS DE LABORATORIO

Determinación de lipoperóxidos

La cuantificación de los lipoperóxidos se realizó siguiendo el método de determinación de uno de los productos secundarios de los procesos de lipoperoxidación, el malondialdehído (MDA). En condiciones de pH bajo y temperaturas altas, el MDA reacciona con el ácido tiobarbitúrico (TBA), originando un compuesto de tono rosado, cuantificable espectrofotométricamente.

La determinación plasmática de MDA se ha basado en el método descrito por Yagi y cols (Lipid peroxides and human diseases Chemm. Phys. Lip 1987; 45 337-5), en la que la cantidad de MDA es estimado por la citada capacidad de reaccionar con el ácido tiobarbitúrico; en realidad son varias las sustancias que tienen esta capacidad y son conocidas por TBARS (Thio-Barbituric Acid Reactive Substances).

Una fracción del suero problema, se trata a 100°C durante una hora en presencia de ácido 2-tiobarbitúrico en medio ácido. La presencia del MDA forma un complejo de color rosa, que se puede estimar fluorimétricamente (excitación a 515 nm y emisión a 548 nm). El resultado se obtiene en $\mu\text{mols/L}$ de MDA.

El MDA tisular se ha determinado por el método de Svensson y cols (Scan J Lab Invest 1993; 53:83-5). Este método se basa en el mismo principio del a.

tiobarbitúrico. Tras la obtención del fragmento de tejido, se lava en solución salina al 0.9%, se pesa y se almacena hasta su procesamiento con suero salino e hidroxitolueno butilado (BHT) como antioxidante. Para el procesamiento, se debe homogeneizar en cloruro potásico (KCl) al 1.15% (2 mM) de BHT, manteniéndolo siempre en hielo. La determinación de la cantidad de MDA se realiza posteriormente igual que para el MDA plasmático.

Medición de la translocación bacteriana

Tras el sacrificio del animal, en condiciones de asepsia se tomaron muestras de ganglios linfáticos mesentéricos (del injerto), del hígado y del bazo (del receptor). Las muestras fueron almacenadas en recipientes estériles, previamente pesados, para desprejar la tara posteriormente y obtener mediante una sencilla resta, el peso del tejido extraído. Las muestras fueron homogeneizadas en 3 ml de suero salino y los 3ml resultantes, fueron cultivados en medios de **Agar-sangre** (medio enriquecido para toda clase de bacterias), **Agar-McConkey** (medio que inhibe el crecimiento de gérmenes Grampositivos favoreciendo a los Gramnegativos) y solución de **tioglicolato** (como medio líquido) con incubación a 37°C. Las lecturas de los resultados se expresaron en forma de unidades formadoras de colonias por gramo de tejido (UFC/g). La tabulación del número de colonias, precisó de una transformación logarítmica, por las altas cifras que eventualmente se manejan.

Estudios histológicos

A los 90' de reperusión, previa anestesia y antes de la extracción de las muestras para las otras determinaciones, se tomó un segmento del íleon terminal del injerto que fue sumergido de inmediato en formaldehído para su fijación. Posteriormente deshidratado y aclarado se impregna e incluye en parafina y se tiñe con hematoxilina eosina tras practicar los microcortes que posteriormente se extienden sobre un portaobjetos y se protegen con un cubreobjetos, quedando listos para su observación con el microscopio.

PRUEBAS ESTADÍSTICAS

El diseño del presente trabajo corresponde a un ensayo experimental, donde el investigador manipula la variable independiente o predictora, con aleatorización de la misma. No hay por tanto variables modificadoras ni de confusión. Sobre unos grupos de estudio homogéneos hemos aplicado un determinado tratamiento que consideramos variable independiente y extraemos unos determinados resultados, que consideramos variables dependientes. En esquemas de trabajo como el presente, son suficientes las pruebas bivariantes para extraer posibles conclusiones causales. Los resultados se expresan en forma de media y desviación estándar (DE). Para las pruebas de significación aplicadas a la comparación entre los grupos, se utilizó el paquete estadístico SPSS versión 6.0.1 del entorno windows. A las variables cuantitativas que siguieron una distribución normal (determinaciones bioquímicas de MDA t. y pl) se les aplicó una prueba paramétrica de comparación de medias (t-test de Student-Fisher).

Cuando la distribución no fue normal (valores de la translocación bacteriana), la comparación se realizó a través de una prueba no paramétrica (test de la U de Mann-Whitney). Los diversos grados de lesión (escala de Park y cols⁷⁸), tratándose de una variable categórica, fueron comparados mediante la prueba exacta de Barnard.



Figura 5.1. Detalle de la mesa de trabajo. Microscopio y parte del instrumental quirúrgico. El animal se mantiene anestesiado mediante la inhalación continuada del eter etílico, que empapa las gasas que hay en el cilindro de la jeringa.



Figura 5.2. Operación en el donante. Se aprecia en la foto el pedículo vascular del injerto casi totalmente disecado. A la izquierda de la fotografía podemos ver la vena porta con las ligaduras de sus tributarias pilórica y esplénica. Un poco mas inferiormente y a la derecha puede verse el segmento aórtico del que nace la arteria mesentérica superior.

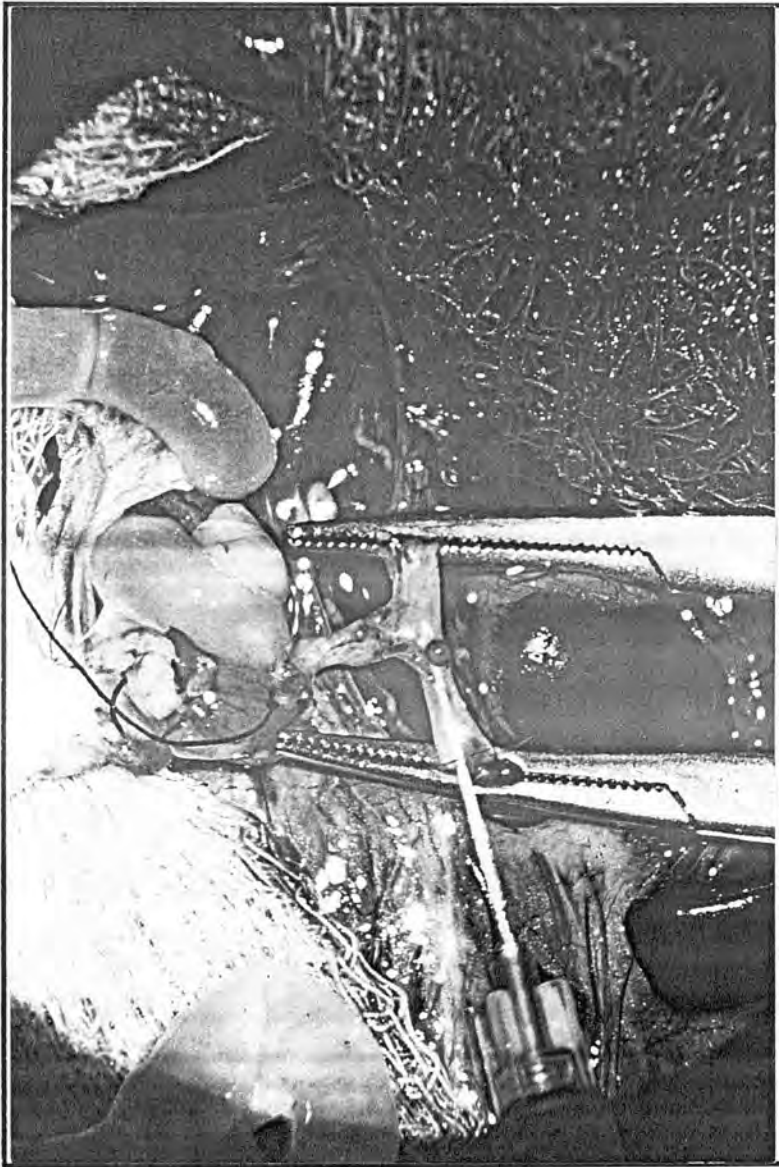


Figura 5.3. Operación en el donante. Detalle del lavado vascular del injerto. Dos pinzas hemostáticas ocluyen la aorta por encima y por debajo de la AMS. La porta ha sido seccionada. El injerto es perfundido con la solución de preservación. Obsérvese la pequeña porción de meso yeyunal con sus vasos totalmente traslúcidos a causa del lavado.



Figura 5.4. Operación en el receptor. Detalle de la disección vascular de aorta y cava a nivel infrarrenal.



Figura 5.5. Operación en el receptor. Aortotomía ya practicada, se esta finalizando la venotomía.



Figura 5.6. Operación en el receptor. Anastomosis arterial ya finalizada por su cara derecha.

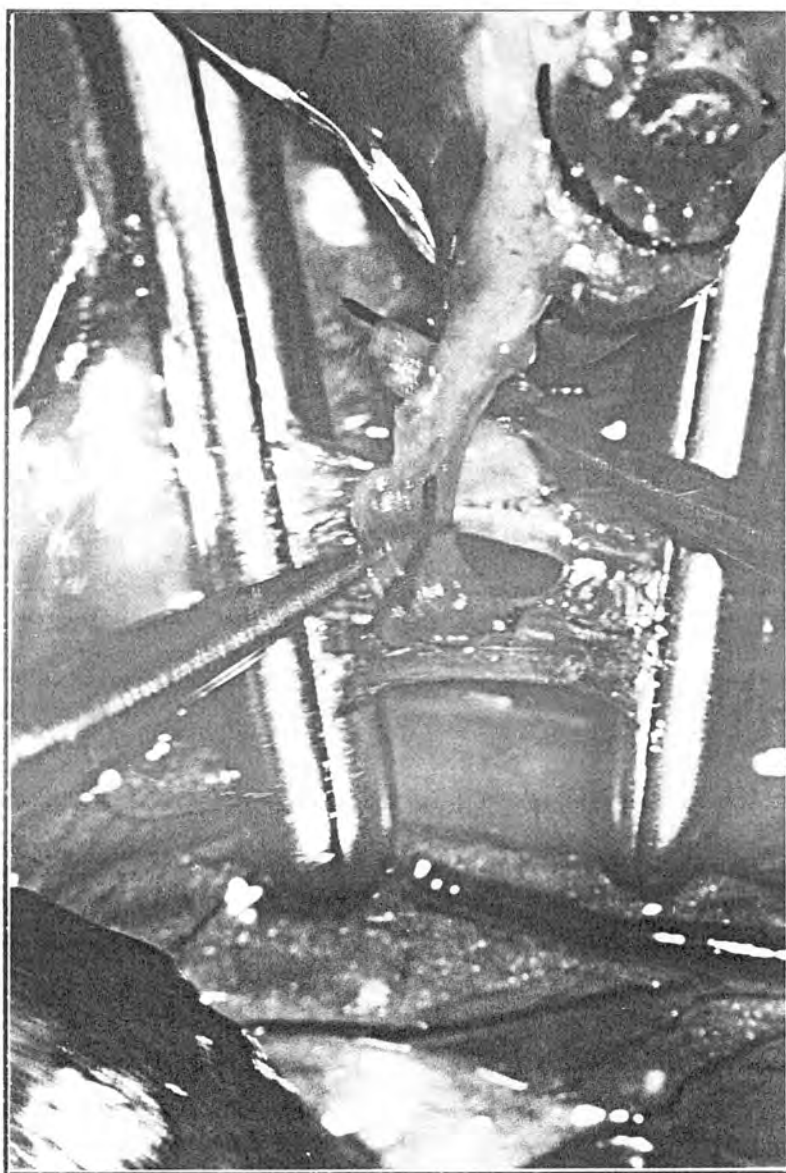


Figura 5.7. Operación en el receptor. Anastomosis venosa ya concluida.



Figura 5.8 . Anastomosis vasculares ya finalizadas. Detalle de la administración del fármaco o en su caso el vehículo, previamente a la desoclusión y reperfusión del injerto

5. Resultados

RESULTADOS.

Para las representaciones gráficas de las medias de los datos que tuvieron una distribución normal se han utilizado gráficos tipo "Box-Plot" o diagrama de cajas, por su facilidad de interpretación. En las cajas se sitúan el 50% de los valores centrales, es decir, los comprendidos entre los percentiles 25 y 75. En el interior de las cajas con un trazo grueso horizontal se representa la mediana y de los extremos superior e inferior de las cajas surgen unas líneas limitadas por otras perpendiculares que acotan los valores extremos. Hemos utilizado estos gráficos (generados por el programa SPSS de Windows) para la representación de los valores de MDA tisular y plasmático.

Los valores de translocación bacteriana que no han seguido una distribución normal, se han representado mediante diagramas de barras.

Tabla I. Grupos de estudio.

| | Control | RL | RL+U73489G | UW | UW+U74389G |
|----------------------|----------------|------------|-------------------|------------|-------------------|
| TID inmediato | grupo sham | A.1 n=7 | A.2 n=7 | B.1 n=7 | B.2 n=7 |
| TID a 6 horas | | C.1 n=7 | C.2 n=7 | D.1 n=7 | D.2 n=7 |

MDA TISULAR

Los valores del grupo Sham o de operación simulada se han utilizado como niveles basales. Del estudio de MDA t se desprende en primer lugar, que un periodo de

isquemia aumenta los niveles de MDA respecto del grupo Sham, como manifestación de los fenómenos de lipoperoxidación (tabla II, figura 5.1 y 5.2).

Los niveles de MDA t en los **trasplantes inmediatos** son más bajos en los grupos preservados con solución de RL, si bien sólo la adición de U74389G consigue mejorar el resultado de manera significativa en el grupo A2 frente al resto (A2 vs A1 y A2 vs B2 $p < 0,05$). El fármaco añadido a la solución de UW en el grupo B2 no mejora los resultados que se obtienen en B1 (tablas II y III y figura 5.1).

Las determinaciones de los **trasplantes con 6 horas de preservación** en algunos casos duplican los valores de MDA respecto de los trasplantes inmediatos (Tabla IV). Los grupos en que MDA es menor son los preservados con UW (figura 5.1). Entre ellos la cifra más baja, con diferencias estadísticamente significativas sobre los demás es D2, en el que se suman la capacidad de UW para reducir la lipoperoxidación y el gran poder antioxidante del lazaroide (D2 vs D1 y C2 $p < 0,01$. Tablas IV, V y figuras 5.6 y 5.8). En el grupo D1, el MDA es a su vez menor que en los dos grupos preservados con RL, aunque frente a C2 estas diferencias no son significativas (D1 vs C1 $p < 0,01$; D1 vs C2 n.s.; tabla V y figura 5.7), es decir, cuando RL se suplementa con U74389G el resultado obtenido es similar al de UW (tabla IV). El grupo con mayor lipoperoxidación es C1, en el que se cuadruplican los resultados en comparación con MDA basal (tablas IV y V, figuras 5.1 y 5.4).

Tabla II. Valores MDA tisular en los grupos de 0 horas.

| | sham (n=7) | A.1 (n=7) | A.2 (n=7) | B.1 (n=7) | B.2 (n=7) |
|---------|---------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| X (*) | 62.14 | 111.02 | 98.6 | 113.02 | 112.43 |
| DE (**) | ±8.91 | ±6.91 | ±5.46 | ±9.25 | ±10.87 |
| rango | 45.8-71.6 | 104.8-120.5 | 89.4-103.7 | 99.32-125.7 | 96.3-130.78 |

(*) MDA t = nmol/mg tejido intestinal seco. (**) DE= desviación estándar

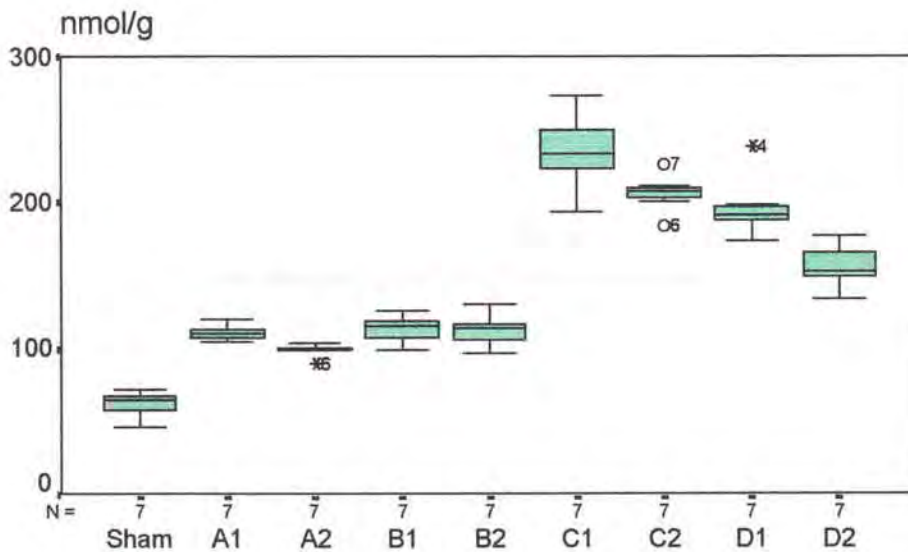


Figura 5.1 MDA t de la totalidad de grupos. Puede apreciarse como los niveles de MDA se incrementan desde el grupo Sham conforme aumenta el tiempo de isquemia, y como en los grupos con 6 horas de preservación, la suplementación con U74389G hace descender significativamente los valores en ambos líquidos.

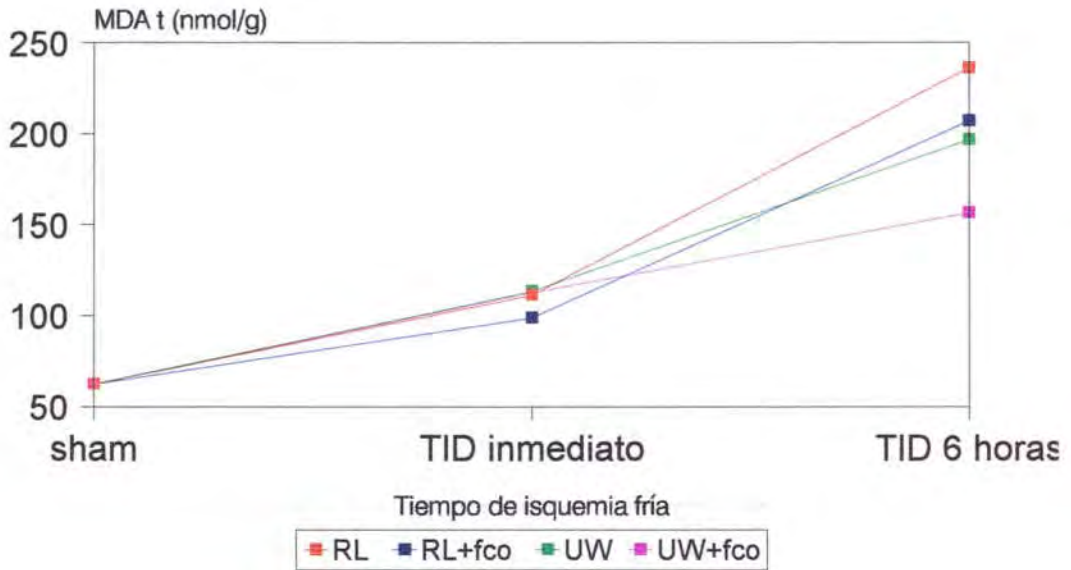


Figura 5.2 Evolución de MDA t según el líquido de preservación. Destaca como con 6 horas de preservación el grupo D2 se destaca entre los demás, en su reducción de los niveles de MDA.

Tabla III. Pruebas estadísticas para MDA t: valor de p (t de Student)

| | sham | A1 | A2 | B1 | B2 |
|------|------|-------|-------|-------|-------|
| sham | - | <0,01 | <0,01 | <0,01 | <0,01 |
| A1 | | - | <0,05 | n.s. | - |
| A2 | | | - | - | <0,05 |
| B1 | | | | - | n.s. |
| B2 | | | | | - |

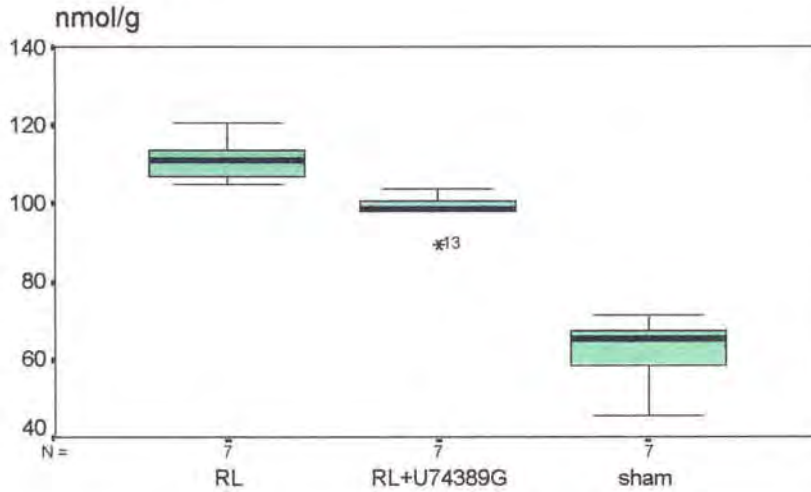


Figura 5.3 MDA tisular A1 vs A2 ($p < 0,05$). Gráfico comparativo entre RL y RL+U74389G en el TID inmediato. Se representa también el nivel basal (grupo Sham)

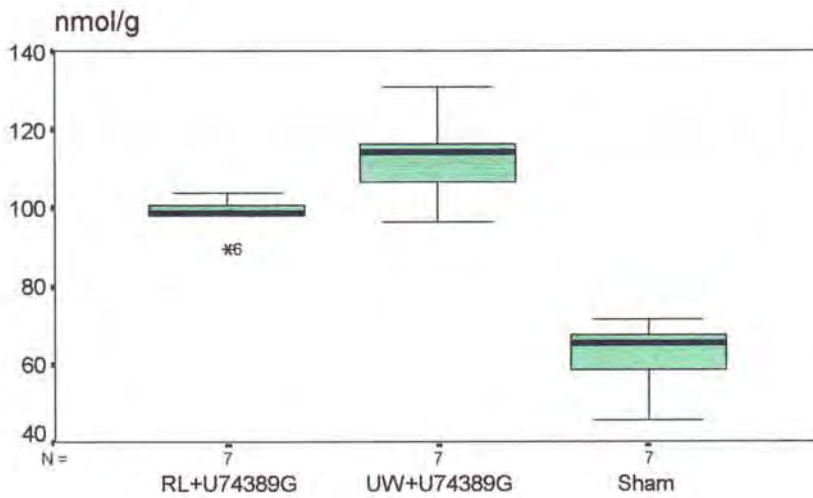


Figura 5.4 MDA tisular A2 vs B2 ($p < 0,05$) Gráfico representativo de ambos líquidos cuando son suplementados con U74389G.

Tabla IV. Valores de MDA tisular en los grupos a 6 horas.

| | sham | C.1 | C.2 | D.1 | D.2 |
|--------------|-----------|--------------|--------------|---------------|---------------|
| X | 62.14 | 235,59 | 206,54 | 196.39 | 156.39 |
| DE | 8.91 | 25,22 | 12,74 | 20,18 | 16,74 |
| rango | 45.8-71.6 | 193.97-273.4 | 184,2-226,57 | 173,88-238.17 | 134,19-177,13 |

Tabla V. pruebas estadísticas para MDA t: valor de p (t de Student)

| | sham | C1 | C2 | D1 | D2 |
|-------------|------|--------|--------|--------|--------|
| sham | - | <0,001 | <0,001 | <0,001 | <0,001 |
| C1 | | - | <0,05 | <0,01 | - |
| C2 | | | - | n.s. | <0,01 |
| D1 | | | | - | <0,01 |
| D2 | | | | | - |

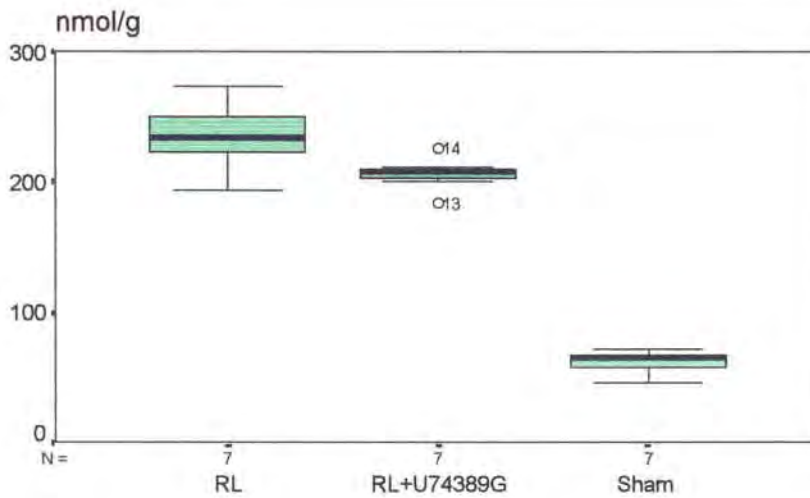


Figura 5.5 C1 vs C2 ($p < 0,05$) Gráfico comparativo RL con y sin U74389G en el TID a 6 horas. MDA tisular desciende de manera significativa en C2.

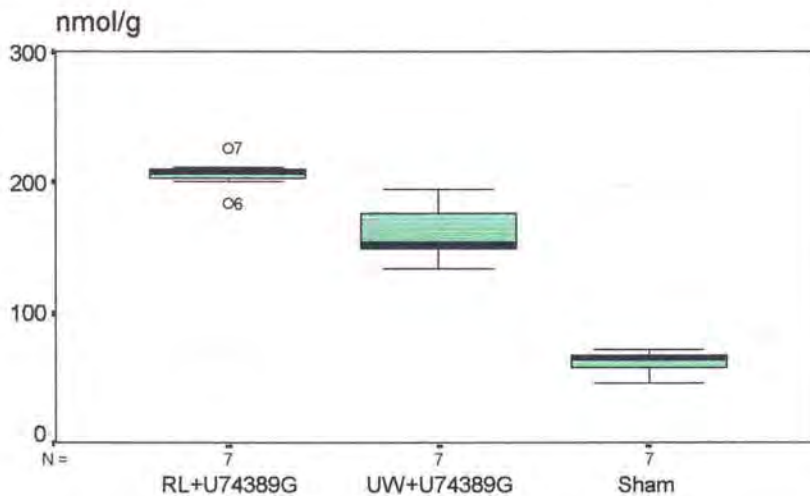


Figura 5.6 C2 vs D2 ($p < 0,01$) Al suplementar ambos líquidos el fármaco U74389G consigue una mayor eficacia cuando se suma a UW en el TID con 6 horas de preservación.

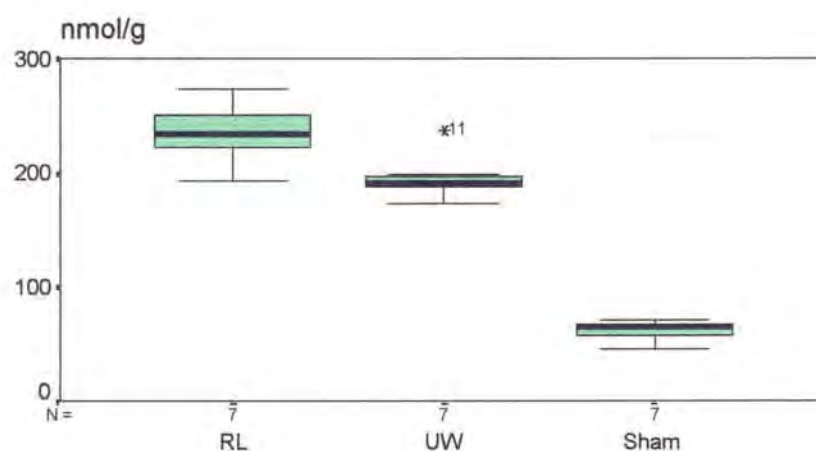


Figura 5.7 C1 vs D1 ($p < 0,01$). UW consigue descender los valores de MDA frente a RL, en el TID con 6 horas de preservación.

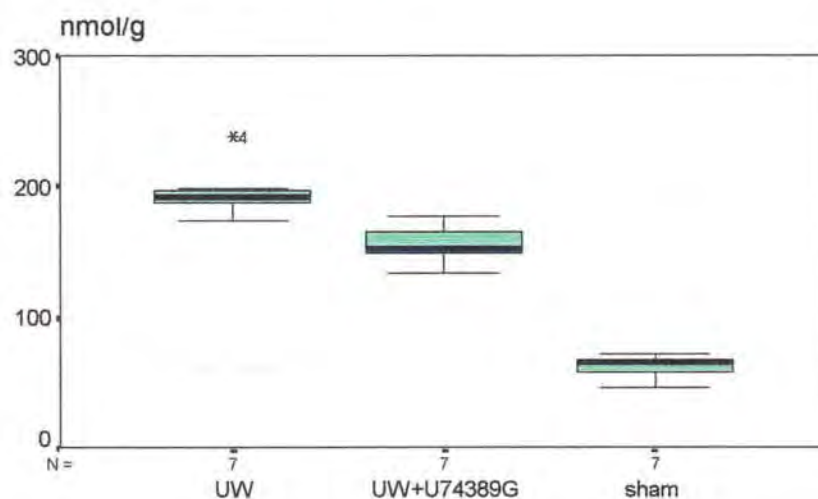


Figura 5.8 D1 vs D2 ($p < 0,01$). Se aprecia una mayor reducción de MDA tisular cuando el injerto es preservado con UW+U74389G en el TID con 6 horas de preservación.

MDA PLASMÁTICO

A nivel plasmático el MDA de todos los grupos trasplantados se incrementa de manera notable, exceptuando B2, cuando los comparamos con las determinaciones del grupo Sham en el que no hay ningún fenómeno isquémico (tabla VI, figuras 5.9 y 5.10).

Cuando el TID se ejecuta de **inmediato**, el grupo B2 logra ponerse prácticamente a niveles basales no existiendo diferencias estadísticamente significativas entre B2 y Sham al aplicar el test de la t de Student. (tabla VII y figura 5.10).

En los trasplantes inmediatos preservados con UW se detectan menores cantidades de MDA ($B1 < A1$; $p < 0,01$; figura 5.12), aunque el resultado más destacable se da en el grupo B2 ($B2 < A2$ $p < 0,05$; figura 5.13). La adición del fármaco provoca un impacto apreciable sobre la lipoperoxidación cuando suplementa ambos líquidos en el trasplante inmediato; todas las comparaciones efectuadas entre ellos tienen diferencias estadísticamente significativas (tabla VII, figuras 5.10, 5.11, 5.12, 5.13, y 5.14).

En los grupos de TID **con 6 horas de preservación** no se han detectado diferencias significativas entre ellos, aunque la adición del fármaco tiende a descender los valores de MDA pl (tabla VIII y IX, figura 5.10).

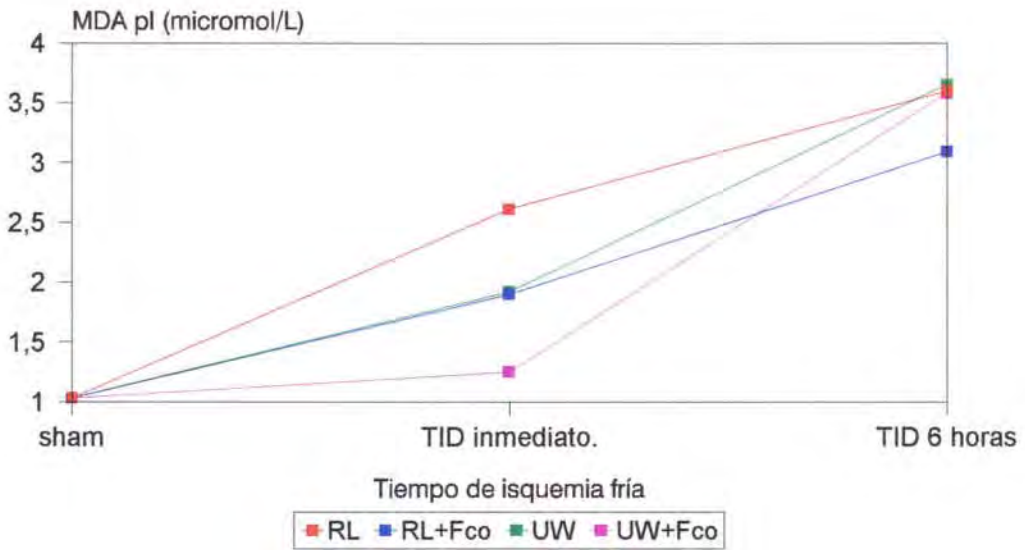


Figura 5.9 MDA plasmático. Evolución de sus valores en función del tiempo de isquemia y líquido de preservación utilizado.

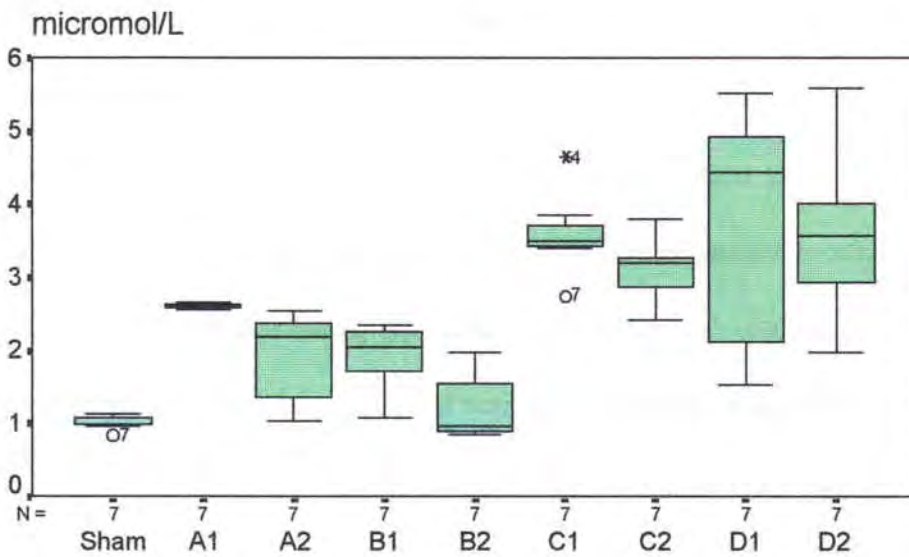


Figura 5.10 MDA pl de todos los grupos. Se aprecia como la reducción más destacada de MDA se da en el grupo B2. En el TID con 6 horas de preservación se detecta cierta tendencia a la baja en los grupos de tratamiento, si bien no fue significativa.

Tabla VI. MDA plasmático en los grupos de 0 horas

| | control | A1 | A2 | B1 | B2 |
|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| MDA pl (*) | 1.032 | 2.61 | 1.898 | 1.918 | 1.248 |
| X ± DE | 0.094 | 0.044 | 0.6 | 0.5 | 0.44 |
| rango | 0.85-1.13 | 2.56-2.67 | 1.05-2.54 | 1.08-2.35 | 0.85-1.97 |

(*) MDA pl= $\mu\text{mol/l}$

Tabla VII. Pruebas estadísticas MDA pl. TID inmediato (t de Student)

| | Sham | A1 | A2 | B1 | B2 |
|-------------|------|---------|---------|--------|--------|
| Sham | - | p<0,001 | p<0.001 | p<0.01 | p n.s. |
| A1 | | - | p<0,05 | p<0,01 | - |
| A2 | | | - | - | p<0,05 |
| B1 | | | | - | p<0,05 |
| B2 | | | | | - |

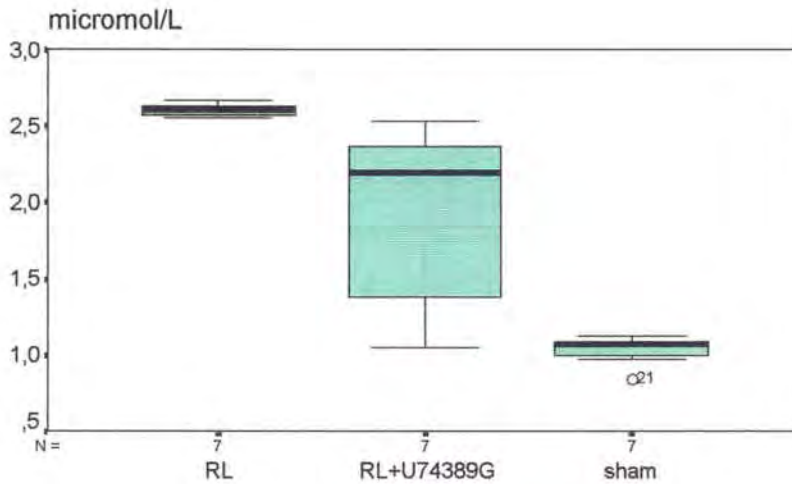


Figura 5.11 MDA pl. A1 vs A2 ($p < 0,05$). La adición del lazaroide en A2 rebaja los niveles de MDA de manera significativa en el TID inmediato.

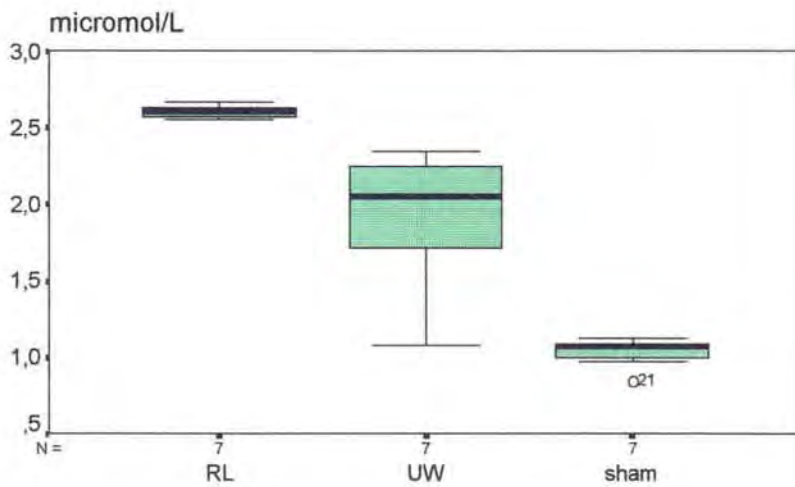


Figura 5.12 MDA pl. A1 vs B1 ($p < 0,01$). El grupo B1, preservado con UW, disminuye los niveles de MDA frente a A1 de manera significativa.

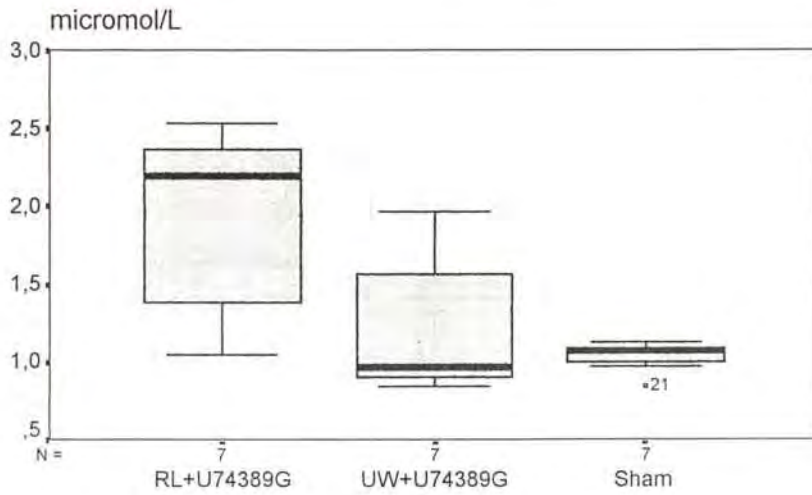


Figura 5.13 MDA pl. A2 vs B2 ($p<0,05$). Cuando U74389G suplementa a UW en el TID inmediato se consigue la reducción más importante de MDA pl.

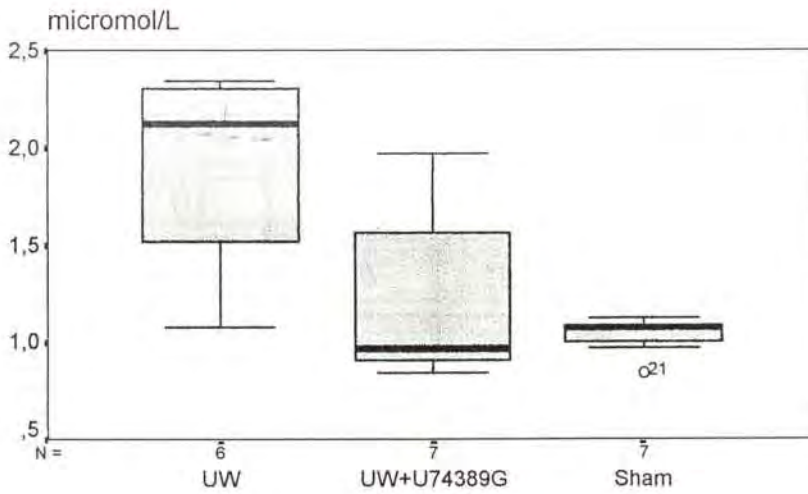


Figura 5.14 MDA pl. B1 vs B2 ($p<0,05$)

Tabla VIII. MDA pl en los grupos de 6 horas

| | control | C1 | C2 | D1 | D2 |
|----------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| MDA pl. | 1.03 | 3.60 | 3.09 | 3.65 | 3.58 |
| X ± DE | ±0.094 | ±0.56 | ±0.43 | ±1.67 | ±1.25 |
| rango | 0.85-1.13 | 2.76-4.65 | 2.43-3.80 | 1.54-5.53 | 1.97-5.58 |

Tabla IX Pruebas estadísticas: MDA pl TID 6 horas: valor de p (t de Student)

| | Sham | C1 | C2 | D1 | D2 |
|-------------|------|-------|-------|-------|-------|
| Sham | - | <0,01 | <0,01 | <0,01 | <0,01 |
| C1 | | - | n.s. | n.s. | - |
| C2 | | | - | n.s. | n.s. |
| D1 | | | | - | n.s. |
| D2 | | | | | - |

TRANSLOCACION BACTERIANA

En el estudio taxonómico para identificar las especies translocadas se han hallado fundamentalmente bacilos gramnegativos aerobios propios de la flora intestinal (Tabla X)

Tabla X Estudio taxonómico Valores medios en % de los gérmenes hallados con mayor frecuencia en los cultivos de todos los grupos.

| GLM | | Hígado | | Bazo | |
|---------------------|-----|---------------------|-----|---------------------|-----|
| <i>E. coli</i> | 35% | <i>E. coli</i> | 40% | <i>E. coli</i> | 40% |
| <i>Klebsiella</i> | 25% | <i>Klebsiella</i> | 20% | <i>Enterobacter</i> | 20% |
| <i>Enterococo</i> | 20% | <i>Enterobacter</i> | 10% | <i>Klebsiella</i> | 15% |
| <i>Enterobacter</i> | 5% | <i>Enterococo</i> | 10% | <i>Citrobacter</i> | 10% |
| <i>Serratia</i> | 5% | <i>Serratia</i> | 5% | <i>Proteus</i> | 5% |
| <i>Pasteurella</i> | 5% | <i>Proteus</i> | 5% | <i>Pasteurella</i> | 5% |
| <i>Citrobacter</i> | 5% | <i>Citrobacter</i> | 5% | <i>Enterococo</i> | 5% |
| | | <i>Pasteurella</i> | 5% | | |

1) TB EN GANGLIOS MESENERICOS

En todos los casos la adición del fármaco a los grupos de trasplante inmediato, consigue una supresión de la translocación bacteriana cuando U74389G suplementa ambos líquidos. También se aprecia una reducción cuando el fármaco se añade a ambos líquidos a las 6 horas.

En el trasplante inmediato la diferencia es estadísticamente significativa entre los grupos A1 vs A2, no existiendo TB en este último y entre B1 vs B2, en el que tampoco

existe TB. A las 6 horas las diferencias aunque existen, no son significativas. Tablas XI XII y figura 5.15)

Tabla XI. TB a nivel de ganglios linfáticos mesentéricos

| | sham | A1 | A2 | B1 | B2 |
|--------|------|------|-----|------|------|
| X (*) | 0 | 1.07 | 0 | 1.05 | 0 |
| DE(**) | - | 0.57 | - | 0.64 | - |
| | | C1 | C2 | D1 | D2 |
| X | - | 1.37 | 0.8 | 0.96 | 0.52 |
| DE | - | 0.74 | 0.7 | 1.37 | 1.1 |

(*) Log [UFC/g tejido] ; (**) Desviación standar

Tabla XII. TB GLM. Pruebas estadísticas: valor de p (U de Mann-Whitney)

| | Sham | A1 | A2 | B1 | B2 | C1 | C2 | D1 | D2 |
|------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Sham | - | <0,01 | n.s. | <0,01 | n.s. | <0,01 | <0,01 | <0,01 | <0,01 |
| A1 | | - | <0,01 | n.s. | - | | | | |
| A2 | | | - | | n.s. | | | | |
| B1 | | | | - | <0,01 | | | | |
| B2 | | | | | - | | | | |
| C1 | | | | | | - | n.s. | n.s. | - |
| C2 | | | | | | | - | - | n.s. |
| D1 | | | | | | | | - | n.s. |
| D2 | | | | | | | | | - |

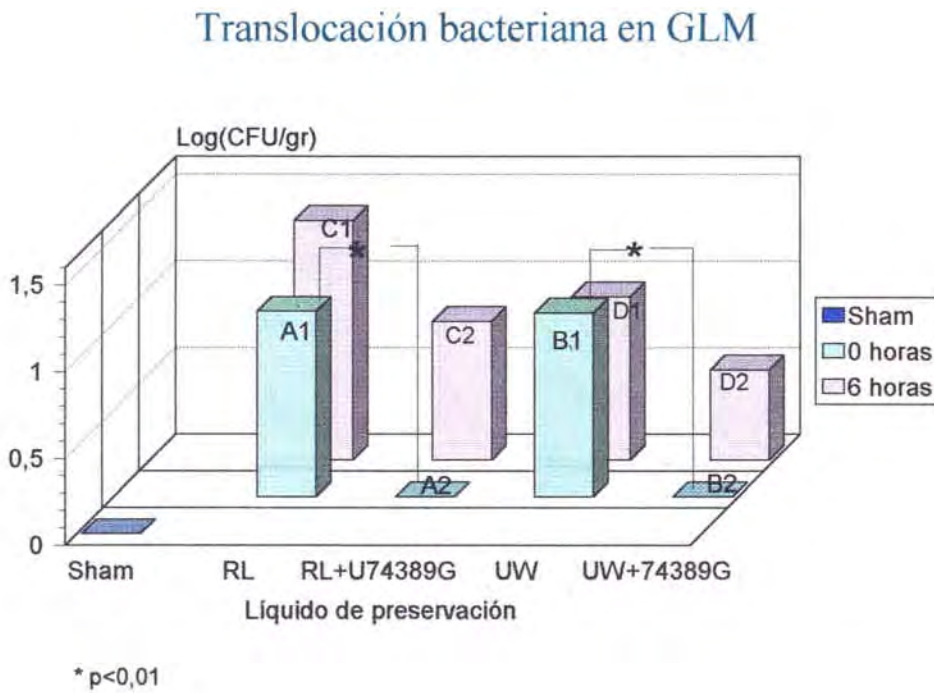


Figura 5.15 TB ganglionar. Grupos de 0 y 6 horas. En todos los grupos, la adición del fármaco a la solución de preservación reduce la TB. Ello es estadísticamente significativo en los grupos de TID inmediato (A2 vs A1 y B2 vs B1)

2) TRANSLOCACION BACTERIANA HEPATICA

El estudio de la TB a nivel hepático, muestra que la adición del fármaco hace descender el índice de translocación bacteriana en los trasplantes inmediatos. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas. En ninguno de los dos grupos de UW a las 6 horas se observó TB (Tablas XIII y XIV y figura 5.16), a diferencia de los dos grupos de RL en los que la TB fué similar.

Tabla XVI. Translocación bacteriana a nivel hepático.

| | sham | A1 | A2 | B1 | B2 |
|-----------|-------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| X | 0 | 0,81 | 0,36 | 0,61 | 0,25 |
| DE | - | ±1,39 | ±0,95 | ±1,06 | ±0,67 |
| | | C1 | C2 | D1 | D2 |
| X | - | 1,01 | 1,04 | 0 | 0 |
| DE | - | ±1,29 | ±1,7 | - | - |

Tabla XV. TB hepática. Pruebas estadísticas: valor de p (U de Mann-Whitney)

| | sham | A1 | A2 | B1 | B2 | C1 | C2 | D1 | D2 |
|------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| sham | - | <0,01 | <0,01 | <0,01 | <0,01 | <0,01 | <0,01 | n.s. | n.s. |
| A1 | | - | <0,05 | n.s. | | | | | |
| A2 | | | - | | n.s. | | | | |
| B1 | | | | - | <0,05 | | | | |
| B2 | | | | | - | | | | |
| C1 | | | | | | - | n.s. | <0,05 | |
| C2 | | | | | | | - | | <0,05 |
| D1 | | | | | | | | - | n.s. |
| D2 | | | | | | | | | - |

Translocación bacteriana en hígado

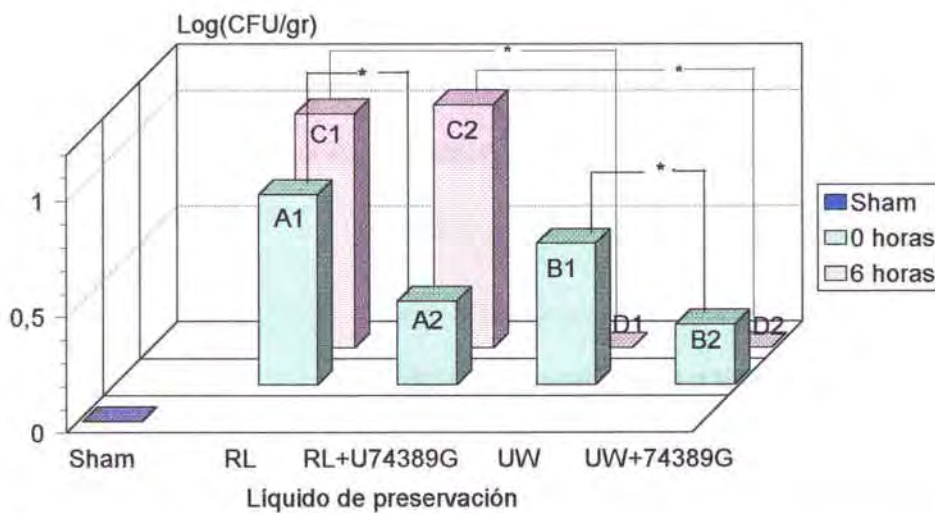
* $p < 0,05$

Figura 5.16. TB hepática . Grupos de 0 y 6 horas. Análogamente a lo que sucede a nivel ganglionar, la adición del lazaroide en los grupos de TID inmediato reduce significativamente, aunque no a cero, el índice de TB en ambos líquidos. Los grupos de RL con 6 horas de preservación, muestran una TB similar independientemente del tratamiento. Ello contrasta de manera importante con lo que sucede a nivel de los dos grupos de UW en los que no existe TB.

3) TRANSLOCACION BACTERIANA ESPLENICA

A nivel esplénico, La translocación bacteriana es menor en los grupos de 0 horas con fármaco, reduciéndose a cero en el caso de A2, con diferencia entre A1 y A2 estadísticamente significativa (A2 vs A1 $p < 0,05$. Figura 5.17 y tablas XVI y XVII). Los grupos de 6 horas con UW con y sin fármaco, presentan un índice de TB muy bajo (figura 5.17), de manera similar a lo que ocurría en el hígado (figura 5.16). De nuevo llama la atención la diferencia con los dos grupos de RL.

Tabla XVI. Translocación bacteriana a nivel del bazo

| Grupos | sham | A1 | A2 | B1 | B2 |
|---------------|-------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| X | 0 | 1,49 | 0 | 1,45 | 0,39 |
| DE | - | ±1,87 | - | ±1,82 | ±1,03 |
| | | C1 | C2 | D1 | D2 |
| X | - | 1,88 | 2,2 | 0,38 | 0 |
| DE | - | ±1,31 | ±1,68 | ±1,02 | - |

Tabla XVII Pruebas estadísticas. TB esplénica : valor de p (U de Mann-Whitney)

| | sham | A1 | A2 | B1 | B2 | C1 | C2 | D1 | D2 |
|------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| sham | - | <0,01 | n.s. | <0,01 | <0,05 | <0,01 | <0,01 | <0,05 | n.s. |
| A1 | | - | <0,05 | n.s. | | | | | |
| A2 | | | - | | n.s. | | | | |
| B1 | | | | - | <0,05 | | | | |
| B2 | | | | | - | | | | |
| C1 | | | | | | - | n.s. | <0,05 | |
| C2 | | | | | | | - | | <0,01 |
| D1 | | | | | | | | - | n.s. |
| D2 | | | | | | | | | - |

Translocación bacteriana en bazo

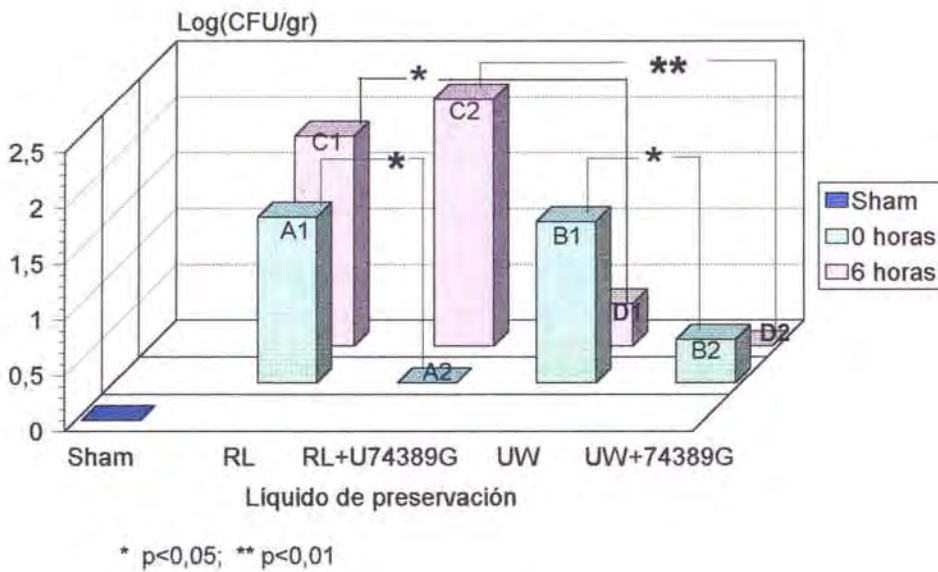


Figura 5.17 TB esplénica. A nivel del bazo el fenómeno de la TB discurre de manera muy similar a lo que sucede a nivel ganglionar. El lazaroido disminuye de manera significativa la TB cuando suplementa ambos líquidos en el TID inmediato. Los grupos de UW de 6 horas presentan escasa TB, que se reduce a cero al añadir el lazaroido. Los dos grupos de RL de 6 horas, presentan un índice de TB alto independientemente del fármaco, que contrastan con los resultados de ambos grupos de UW

ESTUDIO HISTOLOGICO

Los grupos de TID inmediato presentan un grado de lesión menor que los de 6 horas en todos los casos. El grado de lesión disminuye en todos los grupos, cuando se utiliza tratamiento con U74389G.

El estudio histológico muestra que en el TID inmediato el grupo con una mejor preservación del epitelio y una arquitectura de la mucosa intestinal de aspecto más normal es UW suplementado con U74389G, con un grado de lesión de 0 en la escala de Park (figura 5.22). En los trasplantes de 6 horas, RL suplementado con U74389G (figura 5.24) muestra un grado de conservación de la mucosa algo inferior al que se consigue con UW+U74389G (figura 5.26). Es de destacar que en el grupo C1 (figura 5.23) se observan amplias destrucciones epiteliales que corresponden a un grado 5 de la escala de Park.

Como aspectos más relevantes del estudio histológico cabe destacar que los grupos de UW en general tienen un epitelio menos lesionado y que la adición del fármaco a ambos líquidos, se traduce en cada grupo en una histología más conservada con respecto de sus homónimos sin tratamiento de la mucosa del injerto tras la reperusión de 90 minutos, tanto en TID inmediato como a las 6h (Tabla XVIII y figuras 5.18 a 5.26).

Tabla XVIII Grados de lesión histológica en el TID (*)

| | | | | | |
|---------------------|----------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | control | A1 | A2 | B1 | B2 |
| Grado lesión | 0 | 3 | 0-1 | 2 | 0 |
| | | C1 | C2 | D1 | D2 |
| Grado lesión | | 4-5 | 3 | 4 | 2-3 |

(*) clasificación de Park ⁷⁸.

El estudio estadístico realizado sobre los resultados del examen anatomopatológico, ha mostrado que las diferencias existentes a nivel microscópico no son estadísticamente significativas.

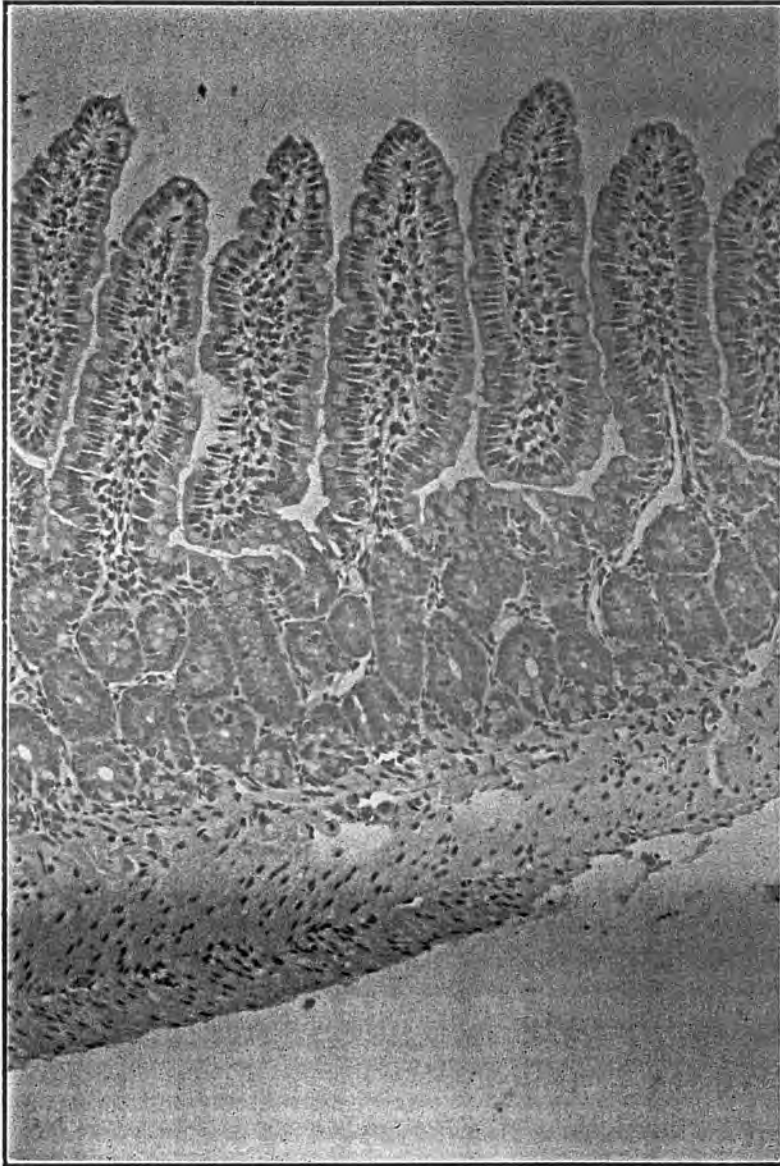


Figura 5.18.- Microfotografía (x200). Patrón histológico normal. Presencia de vellosidades alargadas, células caliciformes intercaladas entre el epitelio.

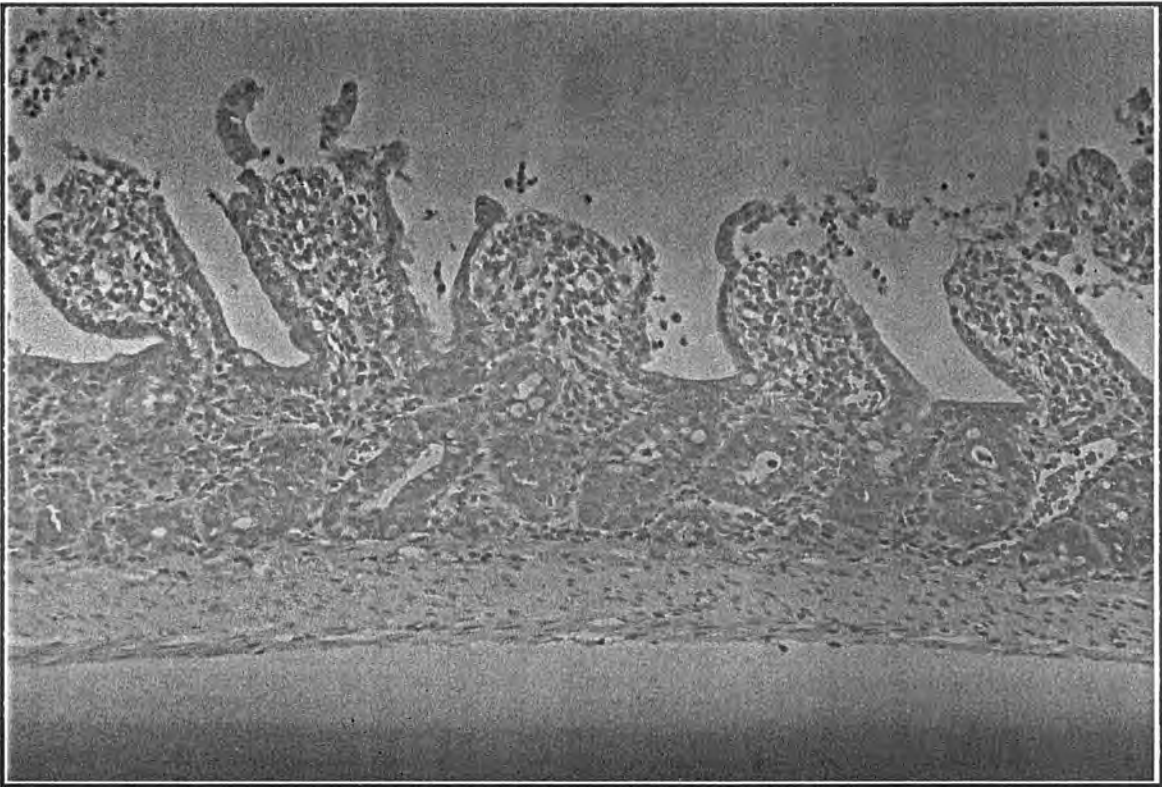


Figura 5.19.- Microfotografía Grupo A1. Lesión grado 2 de la escala de Park. Formación de espacios subepiteliales de Gruenhagen a nivel del vertice de la vellosidad que comienza a aplanarse. Epitelio de aspecto adelgazado.

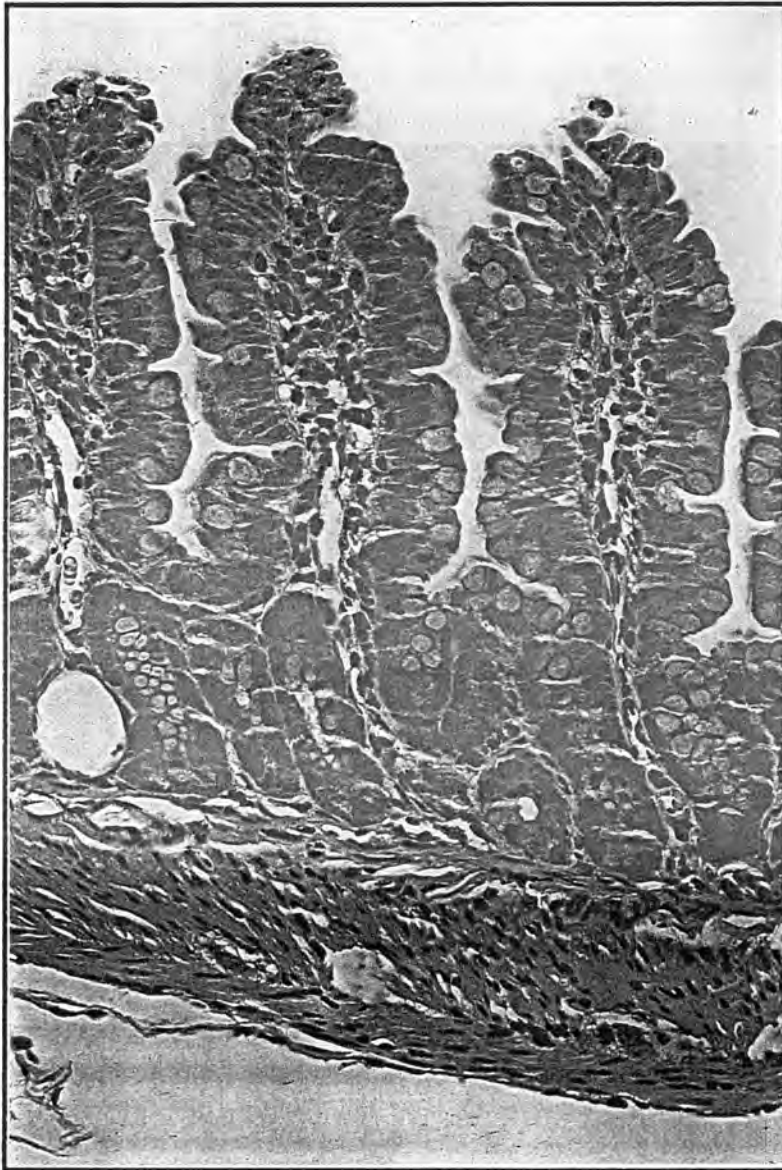


Figura 5.20.- Microfotografía grupo A2. Epitelio de aspecto conservado, con vellosidades alargadas y presencia de ribete en cepillo. Vellosidades algo engrosadas y aumento de la celularidad a nivel de la lámina propia. Lesión grado 0-1.

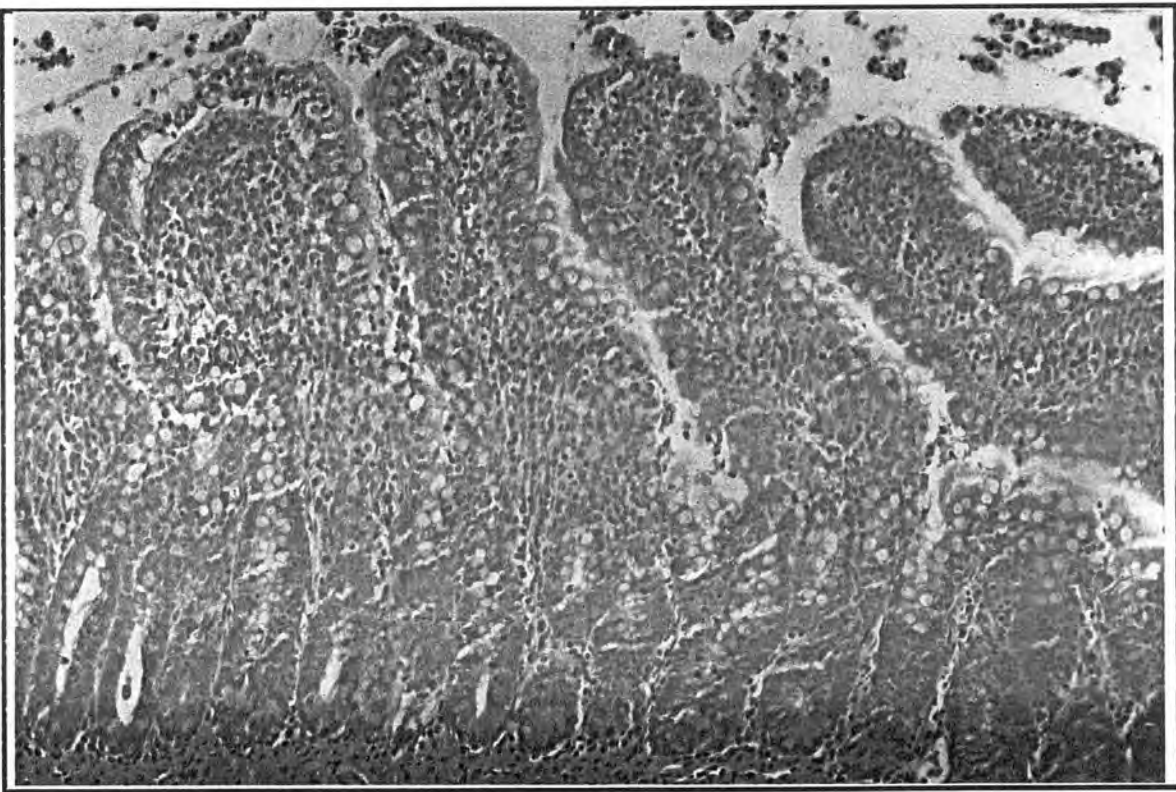


Figura 5.21.- Grupo B1. Lesión grado 2. Vellosidades alargadas, presencia de espacios subepiteliales menores de que en el grupo A1.

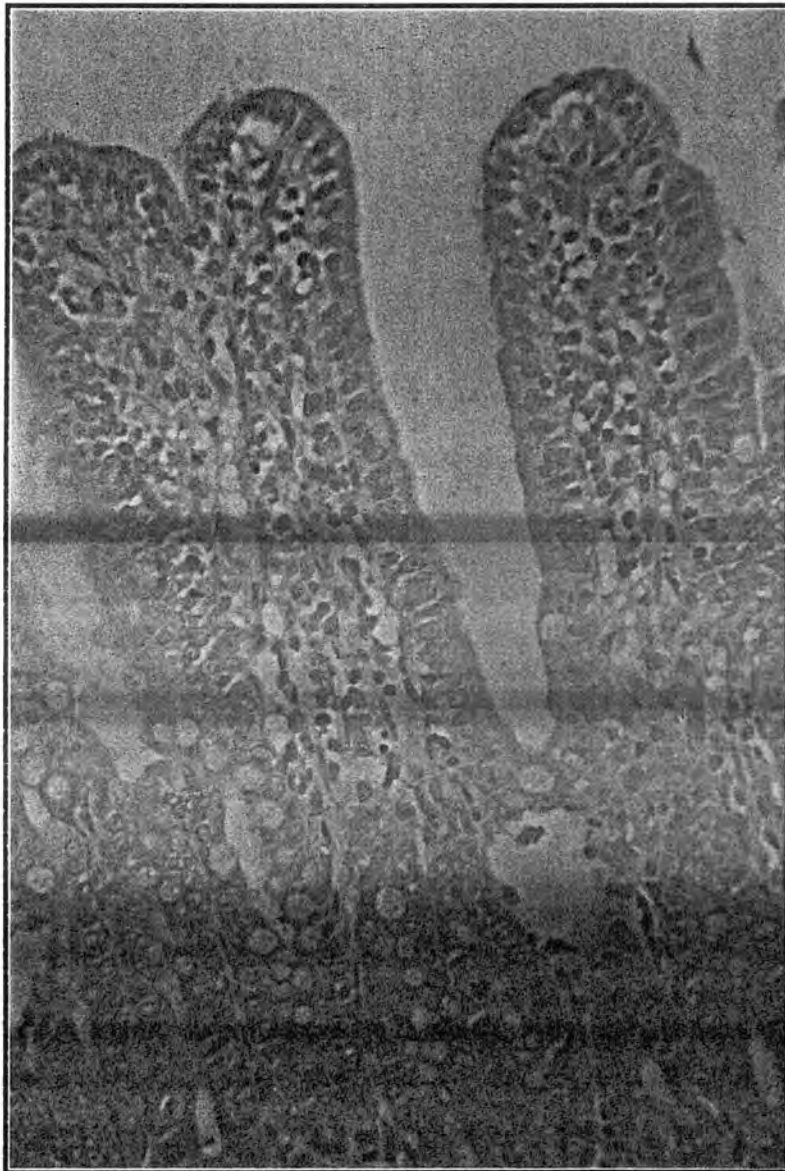


Figura 5.22.- Grupo B2 Epitelio de aspecto practicamente normal. Grado 0 en la clasificación de Park.

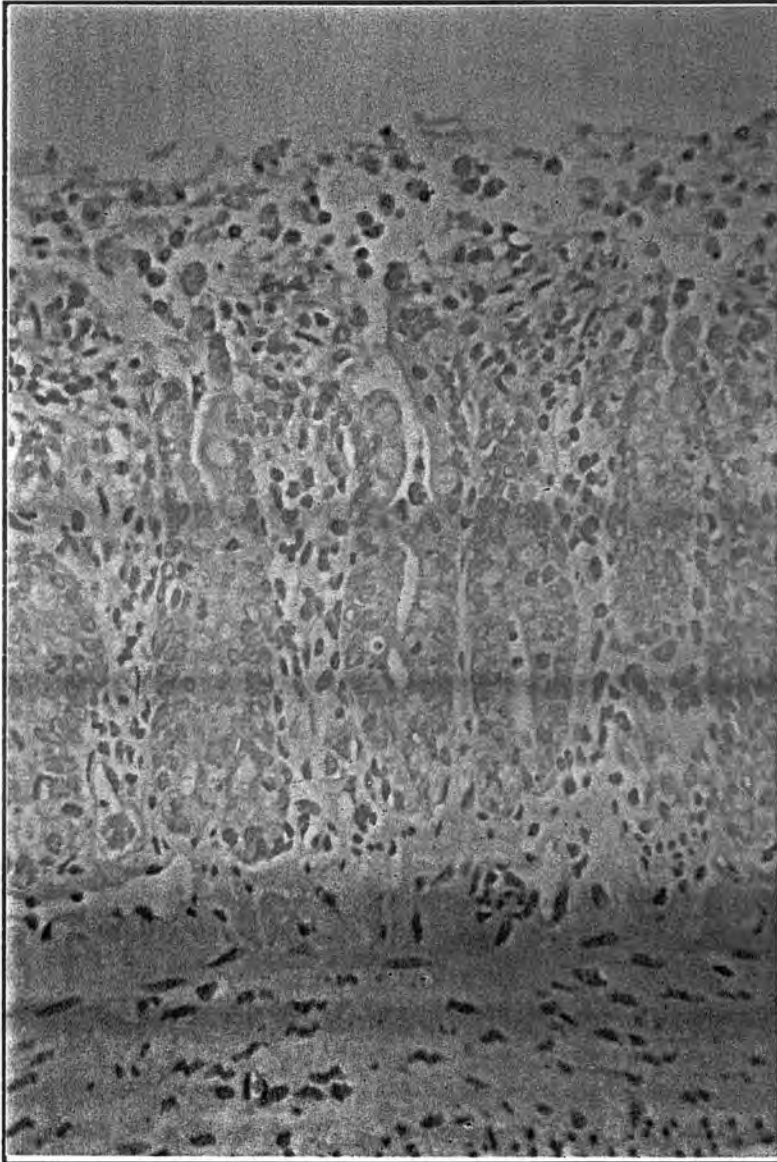


Figura 5.23.- Grupo C1. Se aprecia una atrofia casi total de las vellosidades, cuyos restos terminan casi a nivel de la línea de criptas. El epitelio se conserva a nivel de la línea de criptas.

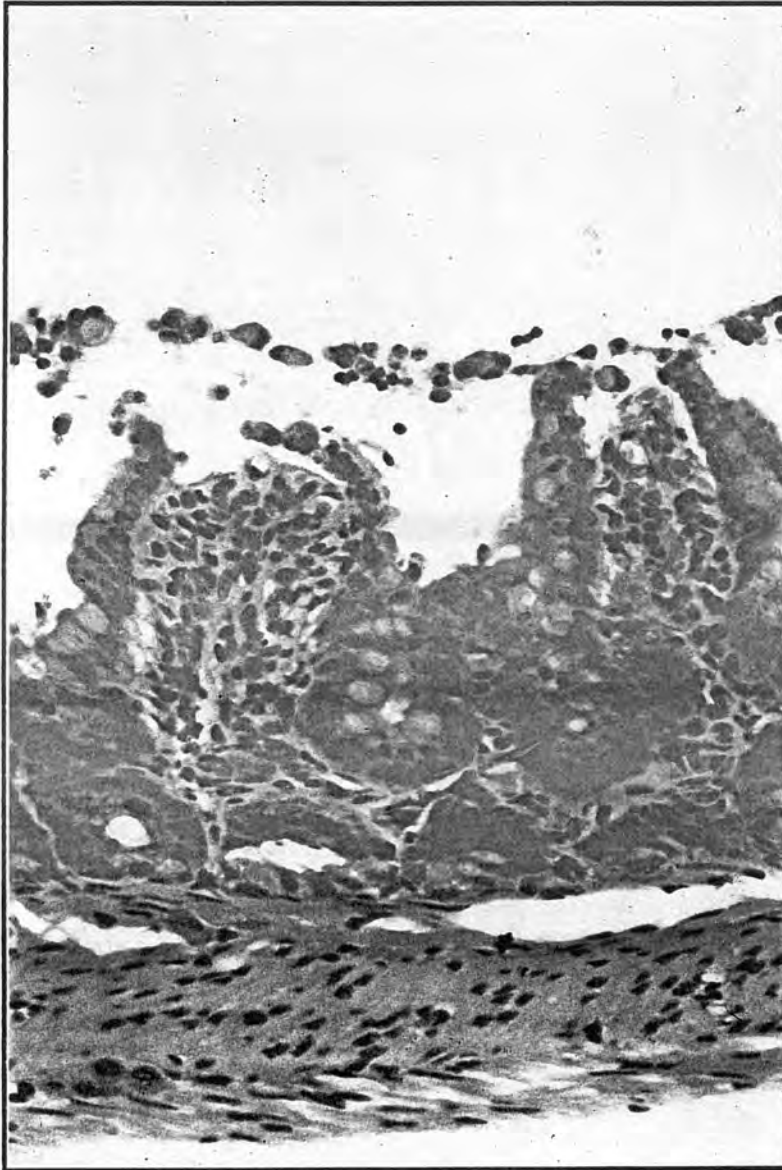


Figura 5.24.- Grupo C2. Se aprecia un grado 3 de lesión, con un epitelio desprendido en los vértices vellositarios, como consecuencia de la rotura de los espacios subepiteliales. El epitelio que queda está conservado.

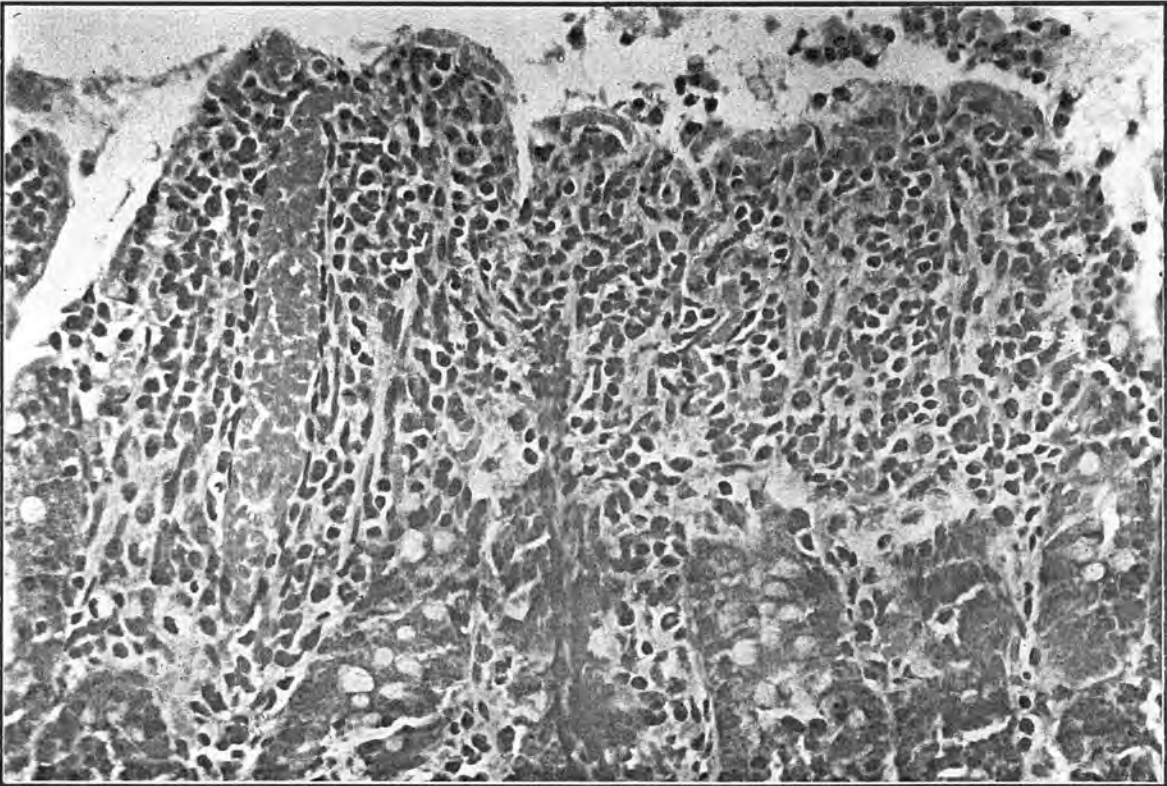


Figura 5.25.- Grupo D1 Lesión grado 4. Vellosidades aplanadas y denudadas de epitelio, apreciándose proliferación vascular.

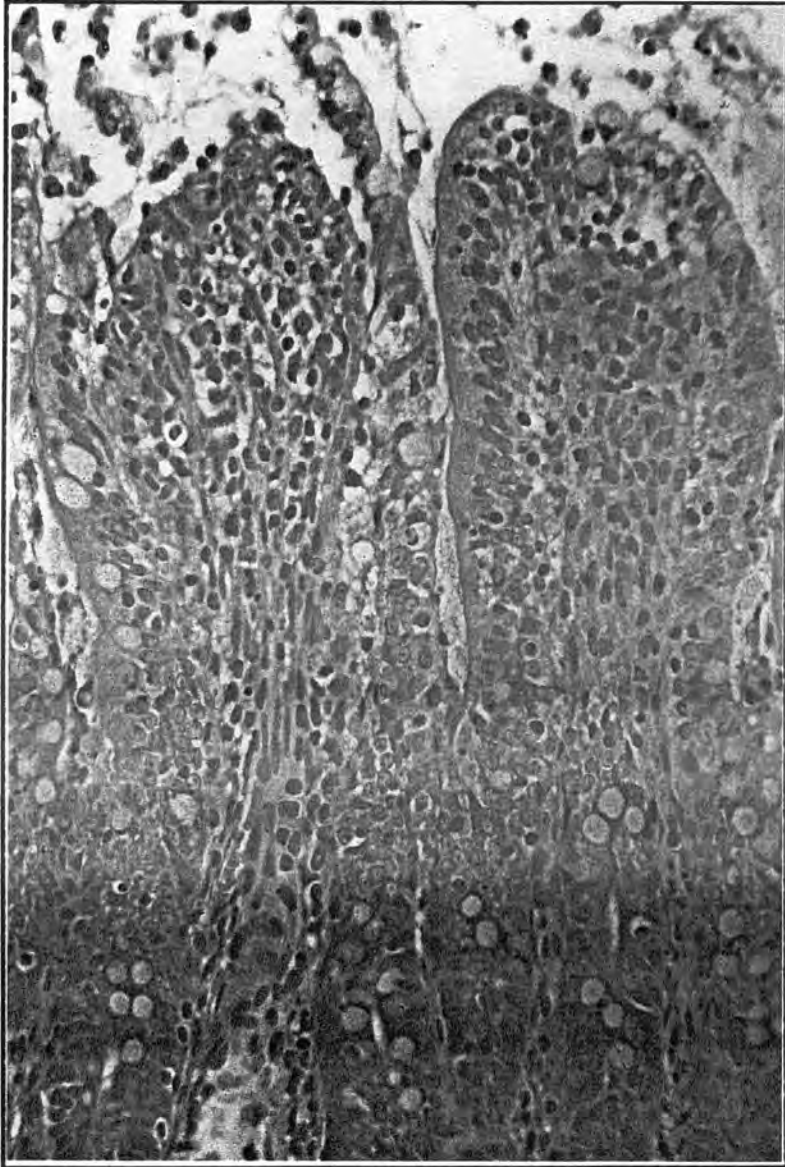


Figura 5.26.- Grupo D2. Vellosidades alargadas con epitelio más o menos conservado. Formación de espacios en algunas vellosidades. Clasificamos el grado de lesión en este grupo como un 2-3.

6. Discusión.

6.1.-MOTIVACIONES DEL ESTUDIO Y SU DISEÑO EXPERIMENTAL

La investigación básica y clínica en el campo de los trasplantes de órganos se desarrolla a pasos agigantados y sin embargo cuanto más se investiga, mas amplios e ignotos parecen los diversos aspectos bioquímicos y fisiopatológicos asociados a esta recientemente desarrollada rama de la medicina.

Entre los diversos focos de interés en el trasplante de órganos, los que más apasionan son con toda probabilidad aquellos que se relacionan con el control de los fenómenos inmunológicos; no obstante un aspecto que ha interesado desde el principio a nuestro grupo y que poco tiene que ver con la inmunología, es lo que ocurre a un órgano tan sensible como el intestino desde el momento en que es extraído del donante hasta los primeros momentos en que es irrigado de nuevo con la sangre del receptor del órgano, es decir las posibles lesiones que se deriven del insalvable periodo de isquemia y de la técnica de preservación del injerto.

El diseño del presente trabajo, surgió del mencionado interés en el estudio de la isquemia y del efecto de los radicales libres en el SIR asociado a la técnica de preservación. Para poder realizar el estudio se eligió la rata por su tamaño, resistencia y relativamente escaso costo económico. Estas cualidades hacen que sobre las ratas se puedan efectuar estudios de gran complejidad técnica y, en lo referente a la parte de técnica quirúrgica y cuidados postoperatorios, ser llevados a cabo por un solo investigador. Por otra parte, el impacto que sobre los resultados podría tener la

presencia de fenómenos de rechazo en uno y otro sentido (rechazo e injerto frente al huésped), nos hizo decidir por las ratas isogénicas de raza Lewis, desarrolladas a partir de ratas Wistar, cruzadas entre si hasta la generación nº 34 y que se caracterizan por ser genéticamente idénticas y permitir por tanto el trasplante de tejidos entre ellas sin problemas inmunológicos.

1.-Técnica quirúrgica

La **técnica quirúrgica** para el trasplante intestinal experimental ofrece diversas posibilidades, que pueden condicionar los resultados según los parámetros a estudiar. Dos son los aspectos más importantes que podemos variar en el TID experimental.

Por un lado la **situación final del injerto** puede ser en posición **ortotópica** en la que el injerto es anastomosado entre el intestino proximal y el colon del receptor, sustituyendo a la mayor parte de intestino delgado nativo, que se reseca tras la revascularización del implante. Esta posición del injerto nos permitirá efectuar estudios de funcionalismo a mas largo plazo y sobre aspectos inmunológicos de rechazo. Otra opción es el injerto situado en posición **heterotópica**, sin manipular el intestino nativo del animal receptor. En estas condiciones el intestino se deja como un asa defuncionalizada cerrada en su extremo proximal y con un estoma en su extremo distal. La elección de la posición heterotópica, se basó en el tipo de estudio pretendido, en el que el animal es sacrificado en un lapso de tiempo breve tras la intervención, y no se

persigue el estudio de la funcionalidad a medio largo plazo del injerto. Al situar el injerto en posición heterotópica, el tiempo de intervención se reduce sin que ello afecte a los resultados finales en los estudios de isquemia y reperfusión ¹⁴³.

El otro aspecto importante, desde el punto de vista técnico del TID experimental es el **drenaje venoso del injerto**. En clínica humana se drena el injerto a la circulación portal, pero en el modelo con ratas, el drenaje venoso del injerto a la porta del receptor, si bien es más anatómico, incrementa la dificultad técnica. Por ello se recurre en general al drenaje venoso portosistémico. En 1985, Schraut y cols ¹⁴⁴ llegaron a la conclusión de que el flujo portal enlentecía el rechazo en el modelo unidireccional de rechazo puro, al hacer el hígado de filtro de la carga inmunológica del injerto. El mismo grupo en 1986, estudió las consecuencias metabólicas de los drenajes venosos en trasplantes isogénicos ortotópicos y en un modelo de derivación portocava simple. Los niveles de amonio y aminoácidos aromáticos fueron mucho mayores en el derivación portocava simple asociándose a una severa atrofia hepática, en comparación a los trasplantes con drenaje portosistémico, en los que no se apreció atrofia. Aunque no hubo pérdida ponderal, los autores concluyeron que también desde el punto de vista metabólico, es preferible el drenaje más fisiológico a la porta. La ausencia de atrofia hepática la atribuyeron a algún factor hepatotrófico originario del área gastroduodenopancreática cuyo retorno venoso no se altera tras el trasplante en el receptor ¹⁴⁵.

Este último extremo está en consonancia con los trabajos de Shaffer y cols ^{146, 147} que tampoco hallan cambios en la histología hepática. Estos autores prefieren el drenaje

a la cava por que atribuyen poca importancia a los trastornos metabólicos frente al incremento en la dificultad técnica. En la misma línea Koltun y cols ¹⁴⁸, consiguen revertir los cambios metabólicos con pequeñas modificaciones de la dieta sin constatar retraso ponderal en los animales con drenaje a la cava. El mismo Koltun volvió a incidir en el tema ¹⁴⁹ al añadir suplementos de glutamina a la dieta de las ratas trasplantadas. La glutamina es un aminoácido importante por ser el principal sustrato energético del enterocito. Su metabolización en el enterocito libera aproximadamente un 60% del nitrógeno aminoacídico en forma de amonio a la circulación portal. El hígado está a su vez capacitado, para extraer dicho amonio en la vía de la ureagénesis y en la síntesis de glutamina. La suplementación de la dieta con glutamina favorece la regeneración de la mucosa a un injerto intestinal, que ha sufrido un proceso de isquemia fría y posterior revascularización con la consiguiente destrucción epitelial, sin que el animal se afecte por la sobrecarga de amonio vertida a la circulación sistémica.

Todas las consideraciones previas nos hicieron decidir por el **trasplante intestinal feterotópico con drenaje venoso sistémico**, por su mayor rapidez, facilidad de ejecución y por ser un estudio agudo.

2.- Tiempos del estudio

La elección de los **tiempos de isquemia fría de 0 y 6 horas**, la basamos en los datos conocidos acerca de isquemia en ratas. En caso de prolongar la isquemia muchas horas, se provocan amplias destrucciones de la mucosa y unos malos resultados en cuanto a supervivencia, aunque se utilicen diversas soluciones de preservación. Así Schweizer y cols. constataron una drástica caída de la supervivencia al 50% en el mejor grupo (preservado con solución de Wisconsin), cuando el tiempo de isquemia fue de 8 horas^{116, 118}.

El **tiempo de reperusión** tras el que se tomaron las muestras fue de 90 minutos. Varios estudios demuestran que el síndrome de isquemia reperusión es efímero. La actividad de los radicales libres del oxígeno se manifiesta desde los pocos minutos del inicio de la reperusión hasta aproximadamente dos horas, haciéndose posteriormente indetectables⁵⁸. Así mismo, para el estudio de la TB el tiempo de reperusión de 90 minutos es también suficiente puesto que el incremento de la permeabilidad intestinal es uno de los más precoces marcadores de lesión³⁶.

3.-Elección del fármaco

La utilización de lazaroides en nuestro estudio fue motivada por su gran capacidad como antioxidantes apoyada en sus esperanzadores resultados en trabajos sobre traumatismo e isquemia sobre el sistema nervioso central^{35, 122, 126, 128, 132, 150} y otros órganos como el miocardio³⁵. En los temas introductorios del presente trabajo (Cap.1.7)

ya analizamos la información conocida acerca del mecanismo de acción de los lazaroides, que demuestran su capacidad como antioxidantes a varios niveles tanto clínicos como bioquímicos. A nivel bioquímico, su acción remeda a la de la vitamina E que es el inhibidor endógeno mas potente de la lipoperoxidación. Ambos actúan de manera competitiva de manera que es posible demostrar un ahorro neto de vitamina E tisular, cuando a un tejido isquémico se le añade tratamiento con lazaroides ¹²⁸. Por otra parte cuando se inició este estudio aún no se habían utilizado lazaroides en ningún modelo de trasplante intestinal, si bien ya existían trabajos en los que se habían utilizado sobre modelos de isquemia gastrointestinal^{19, 134, 151}, en los que los lazaroides mostraron múltiples efectos beneficiosos.

Todas las evidencias acumuladas en los estudios sobre isquemia y traumatismo a nivel del SNC y en isquemia intestinal, nos hicieron pensar en las hipotéticas ventajas que pudieran derivarse de su uso en el trasplante intestinal.

6.2.-INTERPRETACION DE RESULTADOS

1.- Malondialdehido

Tras efectuar las anastomosis vasculares de un trasplante y permitir la reperfusión, la sangre hace de vehículo a la indispensable reoxigenación del órgano, que de otra manera, sería inviable. El oxígeno sin embargo no está exento de efectos colaterales y los estudios de diversos investigadores han caracterizado el conocido

Síndrome de Isquemia-Reperusión. Existe un periodo en el que cualquier tejido sometido a isquemia, va acumulando unas lesiones que posteriormente pueden magnificarse si dicho tejido es reoxigenado, pero que no lo hacen inviable. La magnificación de las lesiones se debe a la acción de los RLO que se generan por la llegada del oxígeno; de hecho la reperusión con sangre anóxica carece de este efecto y las lesiones no aumentan con ella ¹⁸. Por otra parte al introducir un sistema generador de RLO en un intestino no isquémico se consiguen reproducir las lesiones propias de la isquemia y reperusión (aumento de permeabilidad y lesiones de la mucosa) ²¹. Durante el citado periodo, en el que órgano es todavía viable, se puede actuar con diferentes estrategias para mejorar la función y recuperación del mismo. En ello se basan las diferentes técnicas de preservación de órganos. Uno de los aspectos sobre los que podemos influir es la acción de los radicales libres de oxígeno.

El intestino es un órgano particularmente rico en una enzima que se halla muy implicada en el desarrollo del SIR: la xantina oxidasa. Dicha implicación fue establecida por primera vez por Granger, Rutili y McCord en 1981 ³⁶, y corroborada posteriormente por innumerables trabajos. La localización de la enzima a nivel intestinal aún no está del todo clara y hay trabajos que afirman que se halla a nivel de las células diana de la isquemia, **células endoteliales y enterocitos** ¹⁵². La forma enzimática común en el intestino en condiciones de normalidad, es la forma deshidrogenasa. Esta enzima puede pasar a su forma oxidasa cuando sobreviene la isquemia. Ambas formas de la enzima ejercen la misma acción, limitante en el metabolismo final de los ácidos nucleicos

oxidando las purinas; concretamente su acción se centra en metabolizar xantina a ácido úrico mediante procesos de oxidorreducción en los que existen transferencias electrónicas. La forma deshidrogenasa utiliza a NAD^+ como aceptor de electrones y la forma oxidasa utiliza al oxígeno (fig. 3.1). En condiciones de isquemia la forma deshidrogenasa se transforma en oxidasa. Ello puede ocurrir por dos vías, una es la oxidación de los grupos sulfhidrilo de la enzima. Esta oxidación es reversible y esta documentada a nivel hepático y en otros tejidos ²⁴. A nivel intestinal la transformación en oxidasa solo ocurre mediante una **proteolisis** limitada de cadenas peptídicas de la enzima que modifican de manera **irreversible** las estructuras terciaria y cuaternaria de la proteína. Esta transformación corre a cargo de proteasas que pueden estar activadas por la calmodulina ⁴². La calmodulina se activa a su vez por la acción del calcio que difunde pasivamente al interior celular al detenerse las bombas de calcio ATP dependientes (encargadas de su "achique" al exterior celular). La detención de las bombas de calcio se da en condiciones de isquemia, como consecuencia del descenso de los niveles de ATP. Por un lado la degradación del ATP a causa de la anaerobiosis genera gran cantidad de hipoxantina, sustrato de la XD, y por otro lado, la enzima se convierte en su forma oxidasa que al utilizar como aceptor de electrones, en su proceso de metabolización de la hipoxantina, al oxígeno se convierte en una fuente generadora de anión superóxido O_2^- . Ya fue expuesto en la introducción como posteriormente la cascada de generación de RLO se autoamplifica. Así el peróxido de hidrógeno al reaccionar con el superóxido origina el radical hidroxilo, en la conocida reacción de

Haber-Weiss. Cuando la misma es catalizada por un metal de transición (habitualmente el hierro) se conoce como reacción de Fenton, mucho más rápida. El origen del hierro para esta reacción se halla en discusión, pero podría hallarse en las micelas de ferritina a nivel de los enterocitos³⁸ o a nivel de la célula endotelial⁵². De uno u otro modo el hierro actúa, no solo facilitando la iniciación de las reacciones en cadena de los radicales lípidos, sino que también cataliza su encadenamiento⁵³. Por otra parte no debemos olvidar otras fuentes de RLO como los polimorfonucleares^{54, 55, 121}, cuya activación está también vinculada a la producción de RLO mediante la acción del PAF y del LTB₄⁵⁸.

En el estudio que hemos hecho se ha intentado correlacionar el incremento de los fenómenos oxidativos con las manifestaciones propias de la lesión intestinal, en base a la extrema importancia de los RLO en las lesiones asociadas a la isquemia y reperfusión.

En nuestros resultados, los valores de MDA a nivel tisular casi se duplican en el TID inmediato cuando se comparan con los niveles basales del grupo SHAM como reflejo de la generación de RLO y de los fenómenos de LPO (tabla II). No obstante los niveles que se producen de MDA tisular tanto en el grupo preservado con RL (A1) como el de UW (B1) son similares. Una explicación podría ser que en los grupos de TID inmediato, hay poco margen de tiempo para la conversión de XD en XO, que puede ser de un 13% por hora de isquemia según los estudios de Parks y cols⁴⁹. Por otra parte la hipotermia enlentece la tasa de conversión de la enzima al ralentizar todos los procesos metabólicos¹⁵³. La importancia de esta observación radica en que la solución UW lleva alopurinol en su composición, que al ser inhibidor de la acción de la XD, haría esperar

una más efectiva reducción de los niveles de MDA en B1 al compararlo con A1 por lo que en isquemias cortas posiblemente tengan importancia otras fuentes de RLO, que no se inhibirían, al menos de manera tan efectiva, con la presencia de alopurinol. Cuando se añade el fármaco a ambos líquidos, solo en el caso de RL (grupo A2) se consigue una disminución en los niveles de MDA y aunque esta es significativa frente al grupo A1, la magnitud de esta diferencia es pequeña y no traduce una gran disminución de los niveles de lipoperoxidación. Nuestros resultados de MDA tisular en los grupos de trasplante inmediato nos hacen pensar que la generación de RLO es un fenómeno presente pero de relativamente poca repercusión, al tratarse de un periodo isquémico corto y en condiciones de hipotermia.

En los grupos de trasplante a las 6 horas se produce en todos los casos un incremento cuantitativo importante de los niveles de MDA a nivel tisular (ver figura 5.2). Tras 6 horas de isquemia, la tasa de conversión de XD a XO es más importante y ello se traduce en los resultados que obtenemos en todos los grupos (tablas III y IV). A diferencia de los grupos de trasplante inmediato, las 6 horas de isquemia aunque sea en frío, hace que los fenómenos de lipoperoxidación se manifiesten con mayor intensidad. Por el mismo motivo el fármaco U74389G reduce de manera más clara y estadísticamente significativa los niveles de MDA cuando suplementa ambos líquidos. En el grupo D2, en el que U74389G suplementa a la solución de Wisconsin, se añade la acción del alopurinol y se consiguen una disminución de MDA que se aproxima a los valores de los grupos de TID inmediato (figuras 5.1, 5.2, 5.5, 5.6, 5.7, y 5.8)

A nivel plasmático el MDA del grupo B1 (UW 0h) es significativamente menor que A1 (RL 0h). En el caso del MDA plasmático, interpretamos los resultados como una traducción de los fenómenos oxidativos sistémicos en los que la isquemia-reperfusión del injerto se suma a la que se deriva de la oclusión vascular (aorta y cava) para efectuar las anastomosis vasculares. Esta oclusión es una exigencia técnica insoslayable para efectuar el trasplante según nuestro modelo, y es causa de un periodo de isquemia normotérmica de la mitad del cuerpo del animal receptor. Por ello pensamos que puede tener mayor preponderancia el metabolismo de la XO de los tejidos del hemicuerpo inferior, puesto que, aunque más abundante a nivel intestinal, no debemos olvidar que es una enzima ubicua³⁸.

La adición de U74389G consigue en todos los casos la reducción de los niveles de MDA en el TID inmediato, ello es estadísticamente significativo a nivel plasmático, donde de nuevo UW se muestra superior a RL (Tabla IV y VI: B2 mejor que A2 $p < 0,05$). En este caso también parece que la isquemia de la mitad del tronco del animal causaría un mayor estrés oxidativo, que sería bloqueado de una manera más efectiva al sumarse el efecto del alopurinol con U74389G (figuras 5.11, 5.12, 5.13 y 5.14).

Los grupos de 6 horas presentan un incremento cuantitativo importante (figura 5.10) de los niveles de MDA plasmático. La adición del fármaco origina una tendencia a la baja de los niveles de MDA, si bien esta es poco importante y en ningún caso es

significativa. No tenemos explicación clara para estos resultados, pero se debe tener en cuenta que en los grupos de 6 horas, el MDA plasmático se ve incrementado doblemente, a causa de la isquemia normotérmica del hemicuerpo inferior y también por la masa de tejido intestinal trasplantado, en el cual, tras 6 horas de isquemia los fenómenos oxidativos tienen una mayor entidad como ilustran los resultados de MDA tisular. De lo dicho anteriormente podría deducirse la explicación, de que los fenómenos oxidativos en este caso exceden el poder inhibitor del fármaco a las dosis administradas

2.-Translocación bacteriana

Uno de los indicadores más precoces de lesión moderada lo encontramos estudiando la permeabilidad de la red capilar intestinal. Granger y cols. en 1981³⁶ ya demostraron dicho efecto que se da previamente a la aparición de las lesiones histológicas visibles al microscopio. Posiblemente ello se deba a que al lesionarse primero la célula endotelial y la membrana basal³⁶, el aumento de permeabilidad de dicho endotelio es previo a la lesión mucosa y esta lesión endotelial no es apreciable con técnicas de microscopía convencional³⁶. Un aumento de la permeabilidad intestinal supone una importante merma en una de las funciones básicas del intestino: la función de barrera.

Esta pérdida parcial de la función de barrera del epitelio intestinal sobreviene por distintos mecanismos, en ocasiones imbrincados entre ellos, y cabe suponer que el aumento de la permeabilidad no es selectiva en tanto en cuanto deriva de una lesión que afecta ampliamente todas las estructuras relacionadas con el mantenimiento de esta función. Así, en condiciones de aumento de permeabilidad, muchas macromoléculas, pero también los gérmenes presentes en la luz intestinal son capaces de rebasar el epitelio alcanzando el espacio intersticial y desde allí penetrar los capilares linfáticos y sanguíneos. Los primeros a causa de su propia función de captación de agentes ajenos al organismo como los gérmenes, y los segundos al lesionarse también la otra célula diana en la isquemia-reperfusión intestinal, la célula endotelial. Así se ha demostrado la asociación presente entre el aumento de permeabilidad a macromoléculas y la presencia de translocación bacteriana en un modelo de choque hemorrágico en ratas. El mismo estudio demostró que el grado de lesión que propicia el incremento de permeabilidad, no es responsabilidad de los gérmenes, pues estos parámetros (permeabilidad y lesión) se alteraron del mismo modo en ratas descontaminadas con antibióticos al ser sometidas al mismo modelo ⁹⁹.

La responsabilidad de los RLO en el fenómeno de la translocación bacteriana está también demostrada en diversos modelos experimentales. En 1984 Parks y cols ²¹ indujeron el mismo aumento de permeabilidad en modelos distintos : 1) mediante una hora de isquemia y perfusión y 2) infundiendo intraarterialmente una fuente de RLO a base de xantina e hipoxantina. Dicho aumento era inhibido cuando se añadía tratamiento

con superóxidodismutasa o con dimetilsulfóxido (de acción quelante de grupos hidroxilo). En esta línea se halla el trabajo de Deitch y cols.¹⁰⁴ que indujeron TB mediante la administración de un agente proinflamatorio (un lipopolisacárido de membrana fúngica), a ratones con diversos déficits inmunitarios genéticos, a una cepa normal y otra tratada con alopurinol y solo en el grupo de tratamiento se redujo la magnitud de la TB. Este trabajo demuestra, que la capacidad patógena de los gérmenes translocados no fue responsable de la TB, pues las cepas inmunodeficientes hubiesen mostrado una mayor TB, sin embargo la capacidad del alopurinol para disminuir la TB implica claramente a los RLO en el incremento de permeabilidad responsable de la translocación.

La asociación entre diversos modelos de isquemia-reperfusión y TB está bien establecida. Nuestro grupo en un estudio previo, evaluó el fenómeno de la TB en un modelo de trasplante intestinal en el que se comparaba el efecto del uso de dos soluciones de preservación distintas (RL y UW) en el trasplante inmediato. Tras 15 horas de reperfusión se tomaron muestras de ganglios mesentéricos del injerto y del hígado y bazo del receptor, hallando una alta incidencia de TB en ambos grupos sin diferencias entre ellos, llegando a la conclusión de que la TB es un hecho común en el trasplante intestinal y su prevención precisa reducir la lesión epitelial a unos mínimos que no se consigue solo con las soluciones de preservación de que disponemos¹⁰⁶.

En el presente trabajo se pensó que suplementando las soluciones de preservación con un potente inhibidor de la lipoperoxidación como el U74389G se

conseguiría reducir la translocación de gérmenes entéricos, dada la reconocida implicación de los RLO en la lesión epitelial y endotelial que permite dicha TB. Los resultados obtenidos con ello están de acuerdo con lo esperado.

Los gérmenes que se aislaron fueron básicamente gramnegativos entéricos, que constituyen la flora habitual intestinal y son por tanto los que tienen posibilidades de rabasar la barrera intestinal (Tabla X).

A nivel ganglionar no existen diferencias entre los líquidos y en ambos se produce TB tanto en el trasplante inmediato como en los de 6 horas sin que existan diferencias estadísticamente significativas entre ellos. Ello está en consonancia con nuestro anterior trabajo ¹⁰⁶. Sin embargo, cuando son suplementados con U74389G la TB se reduce a cero en los grupos de trasplante inmediato (tabla X, XI y figura 5. 15).

En los trasplantes de 6 horas es de destacar que el grupo D1, preservado con UW sin fármaco, presenta una menor translocación que el grupo C1, preservado con RL (tabla X). Por otra parte si bien se consigue una reducción de la TB al añadir el tratamiento con U74389G, esta no es tan drástica como en los grupos de trasplante inmediato. La constatación anterior es un hecho razonable en base a que las lesiones del epitelio y endotelio son sin duda mayores tras 6 horas de isquemia fría, extremo que se confirmó en el estudio histológico de los injertos.

A nivel hepático y esplénico la TB sigue en líneas generales la misma conducta. La similitud de resultados en ambos órganos se atribuye a que el injerto tiene un drenaje

sistémico y los gérmenes que alcanzan el torrente circulatorio tienen similares posibilidades de colonizar tejido hepático y esplénico.

A nivel esplénico los injertos inmediatos presentaron una supresión de la TB en los grupos que recibieron tratamiento con U74389G, de modo análogo a lo que sucedía a nivel ganglionar. En el tejido hepático, en los injertos inmediatos, se produce una importante reducción, que es estadísticamente significativa en los grupos de tratamiento A2 y B2. La explicación de que se registre un cierto grado de TB a nivel hepático en A2 y B2 siendo la TB ganglionar de cero en estos grupos, probablemente se halle en que los gérmenes pueden alcanzar la circulación sanguínea y linfática indistintamente una vez rebasan la barrera epitelial, si bien como ya hemos dicho, la magnitud de la misma es escasa en ambos grupos a causa de la acción beneficiosa del fármaco. (tablas X y XI)

En los grupos de 6 horas a nivel hepático y esplénico es muy llamativa la diferencia que existe entre ambos líquidos, independientemente del tratamiento (tablas XII y XIV y figuras 5, 16 y 5, 17). La comparación establecida entre C1 vs D1 y entre C2 vs D2 es en todos los casos significativa. La interpretación que damos a este hecho es que la preservación con UW consigue reducir el paso de gérmenes a la circulación sistémica, probablemente por que se produce una menor lesión de los endotelios. Puesto que la sola presencia de UW parece reducir la TB, por ello en este caso no se nota el impacto de la adición del fármaco.

3.- Lesión histológica

La mayoría de estudios sobre lesión histológica intestinal en la isquemia reperusión, se han realizado sobre modelos de isquemia caliente. La primera y más evidente particularidad de la isquemia hipotérmica, es que retrasa la aparición de lesiones con respecto a la isquemia caliente y es ocioso decir que precisamente por ello todas las técnicas de preservación de órganos pasan por el enfriamiento de los mismos.

El enfriamiento celular no solo enlentece la velocidad a la que se suceden los cambios estructurales que se observan en isquemia normotérmica, sino que presenta una serie de particularidades. El edema celular propio de la isquemia es mucho más marcado cuando está causado por el frío y afecta más uniformemente a diferentes tipos celulares que en isquemia caliente. Las bombas ATP- dependientes de la membrana encargadas de mantener la homeostasis iónica funcionan mientras no se agota el ATP. Estas bombas mantienen una concentración hidroelectrolítica más alta en el medio intracelular. El frío ralentiza la acción de todos los sistemas biológicos, de manera que en isquemias iniciales, la bomba de Na-K se detiene a causa del frío y la fuerza osmótica causada por la mayor concentración hidroelectrolítica intracelular origina la entrada de agua desde el espacio intersticial. Esta es la causa del edema o balonización de las células durante el frío, que a nivel endotelial es responsable de la dificultad de reperusión del órgano, fenómeno conocido como de falta de revascularización ó "no reflow"⁸⁹.

Las primeras soluciones de preservación que se aplicaron para conservar el riñón surgieron para contrarrestar este efecto. También eran conocidas como soluciones

intracelulares, por su similitud con el medio intracelular. Se caracterizaban por contener sustancias polímeras de elevado P.m. o impermeantes, a las cuales les es imposible atravesar la membrana celular. El efecto deseado con su presencia era igualar la osmolaridad a ambos lados de la membrana y reducir la presión osmótica causante de la entrada de líquido al interior celular.

Actualmente la solución más utilizada en la preservación de órganos, en los que la técnica está ya suficientemente estandarizada es UW. Dicha solución aúna varias cualidades que explican sus buenos resultados. Como sustancias impermeantes posee la **rafinosa** y el **lactobionato**. Para impedir la expansión del espacio intersticial, que a nivel microcirculatorio es causante de la compresión de los capilares y por tanto dificulta la reperfusión, lleva un coloide, el **hidroxietilalmidón** que al mismo tiempo también es impermeante. En la prevención de la acidosis intracelular que se produce como consecuencia de la glucólisis anaerobia, se incorpora en su composición el **tampón fosfato**. Finalmente es de destacar la presencia de **glutacion**, que en su calidad de agente reductor tiene efecto sobre los lípidos impidiendo la oxidación de los mismos ⁶⁸, la **adenosina** como sustrato energético, precursor de nucleótidos de alta energía y finalmente **alopurinol** que al ser inhibidor de la acción de la XD previene la más ampliamente estudiada y clásica vía de generación de RLO.

En los trasplantes intestinales está aún en discusión cual es la solución más adecuada para preservar de manera óptima el injerto. Prueba de ello está en los controvertidos resultados que ofrece la literatura referente a este tema. Así podemos

encontrar como el mismo grupo de autores mantienen posturas encontradas en distintos trabajos. El grupo de Pittsburgh en 1992 presentaron un trabajo sobre un modelo de autotrasplante en perros, tras 18 horas de preservación, en el que correlacionaron la supervivencia con diversos parámetros bioquímicos (niveles de MDA, hipoxantina y mieloperoxidasa). Llegaron a la conclusión de que la solución más adecuada por sus resultados era la de Eurocollins (EC), con una supervivencia del 67%, frente a un 33% con RL y un 17% con UW ¹⁵⁴. En otro trabajo posterior, investigadores de la misma Universidad, estudiaron las tres soluciones citadas en un modelo de TID en ratas y hallaron que la supervivencia tras 12 horas de preservación fue de 50% para RL 25% para UW y de 0% para EC ¹⁵⁵. Probablemente parte de las discordancias entre autores se origine en la utilización de grupos de parámetros distintos para evaluar el grado de preservación conseguido y parte se halle en que quizás ninguna solución es mejor con unas claras diferencias sobre las demás. Nuestro trabajo previo en que evaluamos la solución UW frente a RL estudiando el grado de TB no mostró diferencias entre una y otra, al menos, en este parámetro ¹⁰⁶.

Al comparar los grupos preservados solo con los líquidos, tanto en el TID inmediato como en los de 6 horas, es decir A1 frente a B1 y C1 frente a D1 no existieron diferencias muy marcadas, aunque si que hallamos diferencias sutiles. Así cuando se compara el aspecto que ofrece B1 frente a A1 vemos como los espacios subepiteliales son menores en B1 (figuras 5.10 y 5.12). Del mismo modo en un grado más avanzado de lesión podemos apreciar como las vellosidades del grupo D1 (fig.

5.16) han quedado totalmente denudadas, pero en comparación con C1 (fig. 5.14), donde además de la denudación total hay atrofia hasta la línea de criptas, existe un menor grado de destrucción. Estas pequeñas diferencias son las que nos hacen pensar que probablemente UW pueda ser mejor. Uno de los aspectos que influyó en el desarrollo de la solución UW fue evitar el edema endotelial que dificulta la reperfusión ("no reflow"), y ello puede explicar en parte esta tendencia, puesto que al evitarse este edema, la reperfusión y con ella la indispensable reoxigenación tisular es más uniforme.

Las diferencias entre los grupos de trasplante inmediato se acentúan cuando añadimos el lazaroide. Prueba de ello la tenemos en el aspecto histológico de B2, grupo en el que concurren la acción del lazaroide y las cualidades como preservante de UW. Este grupo presenta un epitelio de aspecto que hemos considerado normal.

El cambio cualitativo más importante se aprecia al comparar entre los grupos de 6 horas. De nuevo UW con el lazaroide consigue unos resultados mejores que los otros grupos (figura 5.17 y tabla XVI). El epitelio en este grupo D2 se encuentra en un relativamente buen estado de integridad y encontramos vellosidades en las que se halla casi íntegro, aunque coexisten con otras en las que existen amplios espacios subepiteliales.

El hecho de que ninguna de las comparaciones efectuadas muestre resultados estadísticamente significativos, lo hemos atribuido al número relativamente alto de subcategorías de la escala de Park y pensamos que probablemente con grupos mayores

de animales las diferencias que hemos encontrado alcanzarían significación estadística. En base a ello y con la cautela que corresponde les hemos atribuido un valor dado que es posible establecer una cierta correlación entre el descenso de los valores de MDA, una menor TB y al mismo tiempo un epitelio histológicamente mejor conservado.

7. Conclusiones

I.- El modelo de TID heterotópico con ratas isogénicas Lewis permite estudiar los fenómenos de lipoperoxidación de membranas, TB e histología tanto con periodos de isquemia fría de escasos minutos como con periodos prolongados de 6 h.

II.- A los 90 minutos de reperusión se produce un incremento en el proceso de LPO en el injerto cuantificado a través del MDA tisular, en TID inmediatos.

III.- Si el tiempo de isquemia fría se prolonga hasta 6 horas el fenómeno de LPO en el injerto sufre un incremento paralelo.

IV.- Los fenómenos de LPO se manifiestan a nivel plasmático de forma similar a como acontece a nivel del injerto, incrementándose de forma significativa al establecer un periodo de isquemia fría de 6 horas en comparación con el trasplante inmediato.

V.- Tras la reperusión del injerto se observa el fenómeno de la TB en GLM, hígado y bazo que no se produce en el grupo de animales de cirugía simulada.

VI.- El fenómeno de TB se incrementa en los animales trasplantados cuando el periodo de isquemia fría es de 6 horas en comparación con los animales sometidos a TID inmediato.

VII.- El fenómeno de TB corre a cargo fundamentalmente de gérmenes de procedencia entérica, manteniéndose la proporción de los mismos en todos los grupos de estudio.

VIII.- La utilización de 21-aminosteroide U74389G durante la fase de isquemia y en la reperusión reduce significativamente la LPO , cuantificada mediante el MDA a nivel del injerto intestinal.

IX.- Dicho bloqueo parcial de la LPO ejercido por el 21-A se traduce en una reducción de la TB en GLM, hígado y bazo en aquellos grupos de animales sometidos a TID inmediato independientemente de líquido de preservación administrado.

X.- Con 6 horas de isquemia fría los índices de TB son significativamente inferiores en los animales con injertos intestinales preservados mediante la solución UW en comparación con aquellos preservados con RL. En el contexto de dicha comparación la utilización del fármaco es más efectiva con la solución UW que con RL.

XI.- A nivel histológico los tiempos de isquemia fría de 6 horas se manifiestan por un mayor deterioro tisular en comparación con el TID inmediato. El empleo de la solución UW se traduce en unos parámetros histológicos que reflejan una mejor conservación en comparación con RL. La utilización del lazaroide U74389G reduce de forma objetiva el daño histológico tras el TID.

XII.- La acción beneficiosa demostrada por U74389G en la preservación anatomofuncional del injerto abre las puertas a futuras investigaciones en que se combinen diferentes opciones que afectan tanto a la fase isquémica como a la reperfusión, siempre con el objetivo común de optimizar los futuros resultados clínicos.

8. Citas bibliográficas

- 1.-Thomps J.S., Ridders L.F. Surgical alternatives for the short bowel syndrome. *Am J Gastroenterol.* 1987 82 : 82-97.
- 2.- Lillehei R.C., Goot B., Miller F.A. Homografts of the small bowel. *Surgical Forum.* 1959. 10 : 197-99.
- 3.- Lillehei R.C., Goldberg S., Goot B., Longerbeam J.K. Present status of intestinal transplantation *Am J Surg.* 1963. 105 : 58.
- 4.- Holmes S.D., Yeh S.D., Winawer J. Absorption studies in canine jejunal allografts. *Ann Surg.* 1971 174 : 101-8.
- 5.- Ruiz J.O., Uchida H., Schultz LS. Problems in absorption and immunosuppression after entire intestinal allotransplantation. *Am J Surg.* 1972. 123 : 297-303.
- 6.- Revillon Y., Jan D., Goulet O., Ricour C. Small bowel transplantation in seven children: preservation technique. *Transplant Proc.* 1991. 23 (5): 2350-51.
- 7.- Grant D., Wall W., Mineault R. Successful small bowel/liver transplantation. *Lancet.* 1990 335 : 181-84
- 8.- Deltz E., Schroeder P., Gundlach M., Hansmann M.L., Leimstoll G. Successful clinical small bowel transplantation. *Transplant Proc.* 1990 22 (6): 2501-03
- 9.- Goulet O., Revillon Y., Canioni D. Two and one-half-year follow-up after isolated cadaveric small bowel transplantation in an infant. *Transplant Proc.* 1992 24 : 1224-25.
- 10.- Craddock G.N., Nordgren S.R., Reznick R.K. Small bowel transplantation in the dog using cyclosporine. *Transplantation.* 1983. 35 : 284-88.
- 11.- Grant D., Duff J., Zhong R., García B., Lipohar C., Keown P., Stiller C. Successful small bowel transplantation in pigs treated with cyclosporine. *Transplantation.* 1988. 45 (2): 279-84.
- 12.- Monchik G. J., Russell P.S. Transplantation of small bowel in the rat: Technical and immunological considerations. *Surgery.* 1971. 70 (5): 693-702.
- 13.- Pasternak C.A. Constituyentes celulares y sus funciones, en 'Bioquímica humana'. Ed Espaxs; Barcelona. 1980 pg: 27.
- 14.- Pegg D.E. Organ Preservation. *Surg Clin N Am.* 1986. 66 : 617-32.
- 15.- Jamart J., Lambotte L. Differential effect of swelling and anoxia on kidney function and its consequences on the mechanisms of action of intracellular organ preservation solutions. *Transplantation.* 1982. 34 : 176-82.
- 16.- Griño J.M. Líquidos de preservación renal. *Nefrología.* 1991. 11 : 224-28.
- 17.- Parks D.A., Granger D.N. Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation. *Am J Physiol.* 1986. 250 : 749-53.
- 18.- Korthuis R.J., Smith J.K., Carden D.L. Hypoxic reperfusion attenuates postischemic microvascular injury. *Am J Physiol.* 1989 256 : 315-19.
- 19.- Zimmerman B.J., Granger D.N. Mechanisms of reperfusion injury. *Am J Med Sci.* 1994. 307 (4): 284-92.
- 20.- Bulkley G.B. The role of oxygen free radicals in human disease processes. *Surgery.* 1983. 94 (3): 407-11.
- 21.- Parks D.A., Shah A.K., Granger D.N. Oxygen radicals: Effects on intestinal vascular permeability. *Am J Physiol.* 1984. 247 : 167-70.
- 22.- Braganza J.M., Rinderknecht H. Free radicals and acute pancreatitis. *Gastroenterology.* 1988 94 : 1111-12
- 23.- Romson J.L., Hook B.G., Kunkel S.L., Abrams G.D., Schork A., Luchessi B.R. Reduction of the extent of ischemic myocardial injury by neutrophil depletion in the dog. *Circulation.* 1983. 67 : 1016-23.

- 24.- Van der Vliet A., Bast A. Role of reactive oxygen species in intestinal diseases. *Free Radical Bio Med.* 1992. 12 : 499-513.
- 25.- Curran F.T., Allan R.N., Keighley M.R.B. Superoxide production by Crohn's disease neutrophils. *Gut.* 1991. 32 : 399-402.
- 26.- Arthur M.J.P., Bentley I.S., Tanner A.R., Saunders P.K., Millward-Sadler G.H., Wright R. Oxygen derived free radicals promote hepatic injury in the rat. *Gastroenterology.* 1985. 89 : 1114-22.
- 27.- Schoenberg M.H., Büchler M., Gaspar M., Stinner A., Younes M., Melzner I., Bültmann B., Beger H.G. Oxygen free radicals in acute pancreatitis of the rat. *Gut.* 1990 31 : 1138-43.
- 28.- Poot M. Oxidants and antioxidants in proliferative senescence. *Mutat Res.* 1991. 256 : 177-89.
- 29.- Belzer F.O., Southard J.H. Principles of solid-organ preservation by cold storage. *Transplantation.* 1988 45 (4): 673-76
- 30.- Olyae M., Sontag S., Schnell T., Mobarhan S., Eiznhamer D., Keshavarzian A. Mucosal reactive oxygen species production in oesophagitis and Barrett's oesophagus. *Gut.* 1995 37 (2): 168-73.
- 31.- McCord J.M. The superoxide free radical: Its biochemistry and pathophysiology. *Surgery.* 1983. 94 (3): 412-14.
- 32.- Southom P.A., Powis G. Free radicals in Medicine. I. Chemical nature and biologic reactions. *Mayo Clin Proc.* 1988 63 : 381-89
- 33.- Kirschner R.E., Fantini G.A. Role of iron and oxygen derived free radicals in ischemia-reperfusion injury. *J Am Coll Surgeons.* 1994. 179 : 103-12.
- 34.- Freeman B.A., Crapo J.D. Biology of disease, free radicals and tissue injury. *Lab Invest.* 1982. 47 : 412-26.
- 35.- Holzgrefe H.H., Buchanan L.V., Gibson J.K. Effects of U74006F, a novel inhibitor of lipid peroxidation, in stunned reperfused canine myocardium. *J Cardiovasc Pharm.* 1990. 15 : 239-48.
- 36.- Granger D.N., Rutili G., McCord J. Superoxide radicals in feline intestinal ischemia. *Gastroenterology.* 1981. 81 (1): 22-29.
- 37.- Parks D.A., Bulkley G.B., Granger D.N. Role of oxygen derived free radicals in digestive tract diseases. *Surgery.* 1983. 94 (3): 415-22.
- 38.- Kubes P., Granger D.N. Role of oxidants, proinflammatory agents, and granulocytes in the postischemic intestine. Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag, 1993 pag 113-26.
- 39.- Cicalese L., Caraceni P., Nalesnik M.A., Lee K.K.W., Van Thiel D.H., Schraut W.H. Oxygen free radical formation is related to mucosal injury during reperfusion after rat small bowel transplantation. *Transplant Proc.* 1994. 26 (3): 1477.
- 40.- Adkinson D., Hollwarth M.E., Benoit J.N., Parks D.A., McCord J.M., Granger D.N. Role of free radicals in ischemia-reperfusion injury to the liver. *Acta Physiol Scand.* 1986 126 : 101-08.
- 41.- Parks D.A., Bulkley G.B., Granger D.N. Role of oxygen free radicals in shock ischemia and organ preservation. *Surgery.* 1983. 94 (3): 428-32.
- 42.- McCord J.M. Oxygen derived free radicals in postischemic tissue injury *New Eng J Med.* 1985. 312 : 159-63.
- 43.- McCord J.M. Oxygen derived radicals: a link between reperfusion injury and inflammation. *Federation proceedings.* 1987. 46 : 2402-6.
- 44.- Singal P.K., Kapur N., Dhillon K.S., Beamish R.E., Dhalla N.A. Role of free radicals in catecholamine-induced cardiomyopathy. *Can J Physiol Pharmacol.* 1982. 60 : 1390-97.

- 45.- Beckman J.S., Beckman T.W., Chen J., Marshall P.A., Freeman B.A. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1990. 87 : 1620-24.
- 46.- Kukreja R.C., Kontos H.A., Hess M.L., Ellis E.F. PGH synthase and lipoxygenase generate superoxide in the presence of NADH or NADPH. *Circ Res.* 1986. 59 : 6123-29.
- 47.- Blum H., Summers J.J., Schnall M.D., Barlow C., Leigh J.S., Chance B., Buzby G.P. Acute intestinal ischemia studies by phosphorous nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Ann Surg.* 1986 204 : 83-88
- 48.- Robinson J.W.L., Mirkovitch V., Winistorfer B., Saegesser F. Response of the intestinal mucosa to ischemia. *Gut.* 1981. 22 : 512-18.
- 49.- Parks D.A., Williams T.K., Beckman J.S. Conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemic rat intestine: a reevaluation. *Am J Physiol.* 1988 254 : 768-74.
- 50.- Weiss S.J. Oxygen, ischemia and inflammation. *Acta Physiol Scand. (suppl)* 1986. 548 : 9-38.
- 51.- Hernandez L.A., Grisham M.B., Granger D.N. A role for iron in oxidant-mediated ischemic injury to intestinal microvasculature. *Am J Physiol.* 1987. 253 : 49-53.
- 52.- Gannon D.E., Varani J., Phan S.H., Ward J.H., Kaplan J., Till G.O., Simon R.H., Ryan U.S., Ward P.A. Source of iron in neutrophil-mediated killing of endothelial cells. *Lab Invest.* 1987. 57 : 37-41.
- 53.- Aust S.D., Morehouse L.A., Thomas C.E. Role of metals in oxygen radical reactions. *Free Radical Bio Med.* 1985. 1 : 3-25.
- 54.- Grisham M.B., Hernandez L.A., Granger D.N. Xanthine oxidase and neutrophil infiltration in intestinal ischemia. *Am J Physiol.* 1986. 251 : 567-74.
- 55.- Grisham M.B., Zimmerman B.J., Granger D.N. 'Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia/reperfusion injury.' in *Free radicals, lipoproteins and membrane lipids*, Plenum Press; New York, 1990. pg:81-88.
- 56.- Grisham M.B., Hernandez L.A., Granger D.N. Xanthine oxidase and neutrophil infiltration in intestinal ischemia. *Am J Physiol.* 1986. 251 : 567-74.
- 57.- Hernandez L.A., Grisham M.B., Twohig B., Arfors K.E., Harlan J.M., Granger D.N. Role of neutrophils in ischemia-reperfusion induced injury. *Am J Physiol.* 1987. 253 : 699-703.
- 58.- Grace P.A. La lesión ocasionada por la secuencia isquemia reperfusión. *Brit J Surg (Ed. esp.)*. 1994 12 2 115-25.
- 59.- Granger D.N., Kvietys P.R., Pery M.A. Leukocyte-endothelial cell adhesion induced by ischemia and reperfusion. *Can J Physiol Pharmacol.* 1993. 71 : 67-75.
- 60.- Rubanyi G.M., Vanhoutte P.M. Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol.* 1986. 250 : 822-27.
- 61.- Hutchinson F. The distance that a radical formed by ionizing radiation can diffuse in a yeast cell. *Radiat Res.* 1957 7 : 473-83.
- 62.- Ueda K., Kobayashi S., Morita J., Komano T. Site-specific DMA damage caused by lipid peroxidation products. *Biochim Biophys Acta.* 1985. 824 : 341-48.
- 63.- McCord J.M. Free radicals and inflammation: protection of synovial fluid by superoxide dismutase. *Science.* 1974. 185 : 529-31.
- 64.- Takamori M., Yagi M., Onoda H., Yabushita K., Ohhori H., Tomita H., Konishi K., Miyazaki I. An experimental study for preservation of the small intestine: Special reference to mucosal Na-K ATPase activity in small intestinal ischemia. *Transplant Proc.* 1989. 21 (1): 2903-5.
- 65.- Ytrehus K., Hegstad A-C. Lipid peroxidation and membrane damage of the heart. *Acta Physiol Scand.* 1991. 599 : 81-91.

- 66.- Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 1979. 95 : 351-58.
- 67.- Fridovich I. The biology of oxygen radicals. *Science.* 1978 201 : 875-80
- 68.- Lehninger A.L. Péptidos. En 'Bioquímica'. Ed. Omega. Barcelona. 1981 Pag: 726-27
- 69.- Lehninger A.L. Ruta del fosfogluconato. En 'Bioquímica' Ediciones Omega. Barcelona.1981 Pag: 478-472.
- 70.- Ingold K.U., Webb A.C., Witter D., Burton G.W., Metcalf T.A., Muller D.P.R. Vitamin E remains the major lipid soluble, chain-breaking antioxidant in human plasma even in individuals suffering severe vitamin E deficiency. *Arch Biochem Biophys.* 1987. 25. : 224-25.
- 71.- Richard C., Lemonnier F., Thibault M., Couturier M., Auzepy P. Vitamin E deficiency and lipoperoxidation during adult respiratory distress syndrome. *Crit Care Med.* 1990. 18 (1): 4-9.
- 72.- Zimmerman B.J., Grisham M.B., Granger D.N. Role of oxidants in ischemia/reperfusion induced granulocyte infiltration. *Am J Physiol.* 1990. 258 : 185-90.
- 73.- Petrone W.F., English D.K., Wong K., McCord J.M. Free radicals and inflammation: Superoxide-dependent activation of a neutrophil chemotactic factor in plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1990 77 : 1159-63.
- 74.- Zimmerman B.J., Guillory D.J., Grisham M.B., Gaginella T.S., Granger D.N. Role of leukotriene B4 in granulocyte infiltration into posts ischemic feline intestine. *Gastroenterology.* 1990 99 ; 1358-66.
- 75.- Schoenberg M.H., Fredholm B.B., Haglund U., Jung H., Sellin D., Younes M., Schildberg F.W. Studies on the oxygen radical mechanism involved in small intestinal reperfusion damage. *Acta Physio Scand.* 1985 125 : 581-85
- 76.- Lundgren O., Haglund U. The pathophysiology of the intestinal countercurrent exchanger. *Life Sci.* 1978. 23 : 1411-22.
- 77.- Haglund U., Bulkley G.B., Granger D.N. On the patophysiology of intestinal ischemic injury. *Acta Chir Scand.* 1987. 153 : 321-24
- 78.- Park P.O., Haglund U., Bulkley G.B., Fält K. The sequence of development of intestinal tissue injury after strangulation ischemia and reperfusion. *Surgery.* 1990. 107 (5): 574-80.
- 79.- Park P.O., Wallander J., Tufveson G., Haglund U. Cold ischemic and reperfusion injury in a model of small bowel transplantation in the rat. *Eur Surg Res.* 1991 23 : 1-8.
- 80.- Parks D.A., Granger D.N. Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation. *Am J Physiol.* 1986 250 : 749-53.
- 81.- Groggaard B., Parks D.A., Granger D.N., McCord J.M., Forsberg J.O. Effects of ischemia and oxygen radicals on mucosal albumin clearance in intestine. *Am J Phys.* 1982. 242 (5): 448-54.
- 82.- Chiu C.J., McArdle A.H., Brown R, Scott M.J., Gurd I.N. Intestinal mucosal lesions in low flow states. *Arch Surg.* 1970. 101 : 478-83.
- 83.- Robinson J.W.L., Mirkovitch V. The recovery of function and microcirculation of intestinal loops following ischemia. *Gut.* 1972 13 : 784-89.
- 84.- Mueller A.R., Rao P.N., Snyder J.T., Hoffman R.A., Schraut W.H. Hyaluronic acid and purine nucleoside phosphorilase in vascular and luminal effluents of small bowel grafts as parameters of preservation injury. *Transplantation.* 1993. 55 : 1225-30.
- 85.- Mueller A.R., Nalesnik M.A., Langrehr J.M., Rao P. N., Snyder J.T., Hoffman R.A., Schraut W.H. Evidence that small bowel preservation causes primarily basement membrane and endothelial rather than epithelial cell injury. *Transplantation.* 1993 56 (6): 1499-504.
- 86.- Mueller A.R., Platz K-P., Nalesnik M.A., Langrehr J.M., Neuhaus P., Schraut W.H. Small bowel preservation causes basement membrane and endothelial cell injury. *Transplant Proc.* 1994 26 (3): 1498-500.

- 87.- Caldwell-Kenkel J., Curin R.T., Cote A., Thurman R.G., Lemasters J.J. Reperfusion injury to endothelial cells after cold storage of rat livers: Protection by mildly acidic pH and lack of protection by antioxidants. *Transplant Int.* 1995. (8) 77-85.
- 88.- Southard J.H., Van Gulik T.M., Ametani M.S., Vreugdenhil P.K., Lindell S.L., Pienar B.L., Belzer F.O. Important components of the UW solution. *Transplantation.* 1990 49 : 251-57.
- 89.- Pegg D E., Jacobsen I.A., Walter C.A. Hypothermic perfusion of rabbit kidneys with solutions containing gelatin polypeptides. *Transplantation.* 1977. 24 : 29-38.
- 90.- Pakala R., Pakala R., Benedict C.R. Novel 21-aminosteroid compounds prevent iron-induced free radical-mediated injury to vascular endothelial cells. *J Cardiovasc Pharm.* 1995 25 (6): 871-79.
- 91.- Rijkmans B.G., Buuman W.A., Kootstra G. Six day canine kidney preservation. Hypothermic perfusion combined with isolated blood perfusion. *Transplantation.* 1984. 3 : 130-34.
- 92.- Van der Wijk., Rijkmans B.G., Kooststra G. Six day kidney preservation in a canine model. Influence of a 1-4 hour ex vivo perfusion interval. *Transplantation.* 1983 35 : 408-11.
- 93.- Till G.O., Ward P.A. Oxygen radical-mediated endothelial cell injury. in 'Host defense dysfunction in trauma, shock and sepsis'. Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag, 1993 pag : 85-94.
- 94.- Guzman-Stein G., Bonsack M., Liberty J., Delaney J.P. Abdominal radiation causes bacterial translocation. *J Surg Res.* 1989. 46 : 104-7.
- 95.- Deitch E.A., Taylor M., Grisham M., Ma L., Bridges W., Berg R. Endotoxin induces Bacterial Translocation and increases Xantin oxidase activity. *J Trauma.* 1989. 29 (12): 1679-83.
- 96.- Deitch E.A., Ma L., Wen J M., Grisham M.B., Granger D.N., Specian R.D., Berg R.D. Inhibition of endotoxin-induced Bacterial translocation in mice. *J Clin Invest.* 1989. 84 : 36-42.
- 97.- Wells C.L., Maddaus M.M., Simmons R.L. Proposed mechanisms for the translocation of the intestinal bacteria. *Rev infec dis* 1988. 10 (5):958-79
- 98.- Reed L.L., Mangano R., Martin M., Hochman M., Kocka F., Barrett J. The effect of hypertonic saline resuscitation on Bacterial translocation after hemorrhagic shock in rats. *Surgery.* 1991. 110 (4): 685-90.
- 99.- Deitch E. A., Morrison J., Berg R., Specian R.D. Effect of hemorrhagic shock on bacterial translocation, intestinal morphology and intestinal permeability in conventional and antibiotic-decontaminated rats *Crit Care Med.* 1990. 18 (5): 529-36.
- 100.- Saydjari R., Beerhuizen G.I.J.M., Townsend C.M., Hemdon D.N., Thompson J.C. Bacterial translocation and its relationship to visceral blood flow, gut mucosal ornithine decarboxylase activity and DNA in pigs. *J Trauma.* 1991. 31 (5): 639-43.
- 101.- Tokyay R., Zeigler S.T., Kramer G.C., Rogers C.S., Hegggers J.P., Traber D.L., Hemdon D.N. Effects of hypertonic saline dextran resuscitation on oxygen delivery, oxygen consumption and lipid peroxidation after burn injury. *J Trauma.* 1992. 32 (6): 704-12.
- 102.- Jones W.J., Minei J.P., Barber A.E., Rayburn J.L., Fahey III T.J., Shires III G.T., Shires G.T. Bacterial translocation and intestinal atrophy after thermal injury and burn wound sepsis. *An Surg.* 1990. 211 (4): 399-405.
- 103.- Penn R.L., Nguyen V.Q., Specian R.D., Stevens P., Berg R.D. Interleukin-2 enhances the translocation of *Escherichia coli* from the intestines to other organs. *J Infect Dis.* 1991. 164 : 1168-172.
- 104.- Deitch E.A., Specian R.D., Grisham M.B., Berg R.D. Zymosan-induced bacterial translocation: a study of mechanisms. *Crit Care Med.* 1992. 20 (6): 782-88.
- 105.- Morehouse J.L., Specian R.D., Stewart J.J., Berg R.D. Translocation of indigenous bacteria from the gastrointestinal tract of mice after oral ricinoleic acid treatment. *Gastroenterology.* 1986. 91 : 673-79.

- 106.- de Oca J., Vallet J., Bettonica C., Garcia A., Montañés T., Castells A., Cuadrado S., Mercadal M., Fiol C. Influence of liquid preservation on lipid peroxidation and bacterial permeability after small bowel transplantation. *Transplant Proc.* 1995. 27 (4): 2108-109.
- 107.- Grant D., Hurlbut D., Zhong R., Pengzhi W., Chen H., Garcia B., Behme R., Stiller C., Duff J. Intestinal permeability and bacterial translocation following small bowel transplantation in the rat. *Transplantation.* 1991. 52 (2): 921-24.
- 108.- Gianotti L., Bergamo C., Braga M., Succi C., Baraldini V., Magnani P., Mangili F., Locatelli M., Di Carlo V. In vivo evaluation of timing, degree, and distribution of bacterial translocation following experimental small bowel transplantation. *Transplantation.* 1995 60 (9): 891-96
- 109.- Spaeth G., Berg R.D., Specian R.D., Deitch E.A. Food without fiber promotes bacterial translocation from the gut. *Surgery.* 1990. 108 (2): 240-46.
- 110.- Alvredy J.C., Aoy E., Moss G.S. Total parenteral nutrition promotes bacterial translocation from the gut. *Surgery.* 1988. 104 : 185-92.
- 111.- Deitch E.A., Bridges W., Ma L., Berg R., Specian R.D., Granger D.N. Hemorrhagic shock-induced bacterial Translocation: The role of Neutrophils and Hidroxil Radicals. *J Trauma.* 1990. 30 (8): 942-51.
- 112.- Bounous G., Menard D., de Medicis E. Role of pancreatic proteases in the pathogenesis of ischemic enetropathy. *Gastroenterology.* 1977. 73 : 102-8.
- 113.- Berg R.D., Owens W.E. Inhibition of translocation of viable *E. coli* from the gastrointestinal tract of mice by bacterial antagonism. *Infect Immun.* 1979 25 : 820-27.1
- 114.- Collins G.M., Bravo-Shugarman M., Terasaki P.I. Kidney preservation for transportation. *Lancet.* 1969. 2 : 1219-22.
- 115.- Anaise D., Ishimaru M., Madariaga J., Irisawa A., Lane B., Zeidan B. Protective effects of trifluoperazine on the microcirculation of cold stored livers. *Transplantation.* 1990. 46 : 933-35.
- 116.- Schweizer E., Gassel A.M., Deltz E., Schroeder P. Morphologic and histologic alterations after small bowel transplantation. A comparison of different perfusion solutions. *Transplant Proc.* 1992. 24 (3): 1087.
- 117.- Taguchi T., Zorichta E., Guttman F.M. Evaluation of UW solution for preservation of small intestinal transplants in the rat. *Transplantation.* 1992. 53 (6): 1202-205.
- 118.- Schweizer E., Gassel A.M., Deltz E., Schroeder P. A comparison of preservation solutions for small bowel transplantation in the rat *Transplantation.* 1994 57 (9): 1406-8.
- 119.- Raju S., Fujiwara H., Lewin J.R., Grogan J.B. Twelve hour and twenty four hour preservation of small bowel allografts by simple hypothermia. *Transplantation.* 1988. 45 (2): 290-93.
- 120.- Mueller A.R., Nalesnik M., Platz K.P., Langrehr J.M., Hoffman R.A., Schraut W.H. Evaluation of preservation conditions and various solutions for small bowel preservation. *Transplantation.* 1994. 57 (5): 649-55.
- 121.- Yoshikawa T., Naito Y., Shigenobu U., Oyamada H., Takemura T., Yoshida N., Sugino S., Kondo M. Role of Oxygen derived Free radicals in the pathogenesis of gastric mucosal lesions in rats. *J Clin Gastroenterol.* 1990. 12 (1): 65-71.
- 122.- Hall E.D., Yonkers P. A. Attenuation of postischemic cerebral hypoperfusion by the 21-aminosteroid U74006F. *Stroke.* 1988. 19 : 340-44.
- 123.- Aoki N., Lefer A.M. Protective effects of a novel nonglucocorticoid 21-aminosteroid (U74006F) during traumatic shock in rats. *J Cardiovasc Pharm.* 1990. 15 (2): 205-10
- 124.- Braughler J.M., Hall E.D. Current application of 'high-dose' steroid therapy for CNS injury: A pharmacological perspective. *J Neurosurg.* 1985. 62 : 808-10.

- 125.-** Gadaleta D., Verma M., Davis J.M. Inhibition of neutrophil leucotriene generation by the 21-aminosteroid U74389F. *J Surg Res.* 1994. 57 (2): 233-37.
- 126.-** Braugher J.M., Hall E.D. Central nervous system trauma and stroke: I & II *Free Radical Bio Med.* 1989 6 : 289-313.
- 127.-** Braugher J.M., Pregenzer J.F., Chase R.L., Duncan L.A., Jacobsen E.J., McCall J.M. Novel 21-aminosteroid as potent inhibitor of iron dependent lipid peroxidation. *J Biol Chem.* 1987. 262 (22): 10438-40.
- 128.-** Braugher J.M., Burton P.S., Chase R.L., Pregenzer J.G., Jacobsen E.J., VanDoomik F.J., Tustin J.M., Aver D.E. Novel membrane localized iron chelators as inhibitors of iron-dependent lipid peroxidation. *Biochem Pharmacol.* 1988. 37 : 3853-60
- 129.-** Braugher J.M., Pregenzer J.F. The novel 21 aminosteroid inhibitors of lipid peroxidation: Reactions with lipid peroxy and phenoxy radicals. *Free Radical Bio Med.* 1989
- 130.-** Braugher J.M., Chase R.L., Neff G.L., Yonkers P.A., Day J.S., Hall E.D., Sethy V.H., Lahti R.A. A new 21 aminosteroid antioxidant lacking glucocorticoid activity stimulates adrenocorticotropin secretion and blocks arachidonic acid release from mouse pituitary tumor(AtT-20) cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 1988. 244 (2): 423-27.
- 131.-** Braugher J.M., Hall E.D., Jacobsen E.J., McCall J.M., Means E.D. The 21-aminosteroids: Potent inhibitors of lipid peroxidation for the treatment of central nervous system trauma and ischemia. *Drugs of the Future.* 1989. 14 (2): 143-51.
- 132.-** Hall E. D. Beneficial effects of the 21-aminosteroid U74006F in acute CNS trauma and hypovolemic shock. *Acta Anaesth Belg.* 1987. 38 (4): 421-421
- 133.-** Hall E.D., Pazara K.E., Braugher J.M. 21-aminosteroid lipid peroxidation inhibitor U74006F protects against cerebral ischemia in gerbils. *Stroke.* 1988. 19 (8): 997-1002.
- 134.-** Badylak S., Lantz G.C., Jeffries M. Prevention of reperfusion injury in surgically induced gastric volvulus in dogs. *Am J Vet Res.* 1990. 51 (2): 294-99.
- 135.-** Chen H., Xu D., Qi S., Aboujaoude J.S., Daloz P. 21 Aminosteroid lipid peroxidation inhibitor U74389G protects the small bowel in the rat against warm and cold ischemia damage. *Transplant Proc.* 1994. 26 (3): 1483-84.
- 136.-** Katz S.M., Sun S., Schechner R.S., Tellis V.A., Alt E.R., Greenstein S.M. Improved small intestinal preservation after Lazaroid U74389-G treatment and cold storage in University of Wisconsin solution. *Transplantation.* 1995 59 (5): 694-98.
- 137.-** Fabregat J., Rafecas A., Mañez R., Figueras J., Todod S., Jaumeta E., Starz T.E. Trasplante de intestino delgado. Antecedentes y estado actual. *Acta Chir Cataloniae.* 1994 15 : 19-23
- 138.-** Filez L., Penninckx F., Stalmans W., Kerremans R., Geboes K. Prevention of mucosal reperfusion damage after orthotopic small bowel autransplantation in cats. *Transplant Proc.* 1994. 26 (3): 1485-1488.
- 139.-** Sáenz Coromina A. Trasplante renal: acción de los fármacos bloqueadores de los radicales libres de oxígeno en el Sd de isquemia reperfusion. Tesis Doctoral. 1991. U. de Barcelona.
- 140.-** Asari H., Anaise D., Bachvaroff R.J. Preservation techniques for organ transplantation 1: Protective effects of calmodulin inhibitors in cold preserved kidneys. *Transplantation.* 1984. 37 : 113-14.
- 141.-** Horton J.W., Walker P.B. Oxygen radicals, lipid peroxidation, and permeability changes after intestinal ischemia and reperfusion. *J Appl Physiol.* 1993. 74 (4): 1515-20.
- 142.-** Vane D.W., Grosfeld J.L., Moore W., Abu-Dalu K., Hurwitz A. Impaired bowel motility following small intestinal transplantation. *J Surg Res.* 1988. 47 : 288-91.

- 143.-** Lee K.K.W., Schraut W.H. Small bowel transplantation in the rat. Graft survival with heterotopic vs orthotopic position. En Deltz E., Thiede A., Hamelmann H (eds). Small bowel transplantation. Experimental and clinical fundamentals Heidelberg, Springer-Verlag 1986 pag 7-13.
- 144.-** Schraut W.H., Abraham V.S., Lee K.K.W. Portal versus systemic venous drainage for small bowel allografts. *Surgery*. 1985. 98 (3): 579-85.
- 145.-** Schraut W.H., Abraham V.S., Lee K.K.W. Portal versus caval venous drainage of small bowel allografts: Technical and metabolic consequences. *Surgery*. 1986. 99 (2): 193-98.
- 146.-** Shaffer D., Difflo T., Love W., Clowes G.H.A., Maki T., Monaco P. Immunologic and metabolic effects of caval versus portal venous drainage in small bowel transplantation. *Surgery*. 1988. 104 (3): 518-24.
- 147.-** Shaffer D., Difflo T., Love W., Clowes G.H.H., Maki T., Monaco P. Metabolic effects of systemic versus portal venous drainage of orthotopic small bowel isografts. *Transplant Proc*. 1989. 21 (1): 2872-74.
- 148.-** Koltun W.A., Madara J.L., Smith R.J., Kirkman R.L. Metabolic aspects of small bowel transplantation in inbred rats. *J Surg Res*. 1987. 42 : 341-47.
- 149.-** Koltun W.A., Bloomer M.M., Vary T.C. Glutamine does not increase ammonia in systemically drained small bowel transplants. *J Surg Res*. 1994. 56 : 102-7.
- 150.-** Silvia R.C., Piercey M.F., Hoffman W.E., Chase R.L., Braughler J.M., Tang A.H. U74006F an inhibitor of lipid peroxidation protects against lesion development following experimental stroke in the cat: histological and metabolic analysis. *Neurosci Abst*. 1987. 13 : 1499.
- 151.-** Niederau C., Schulz H.U., Klonowski H. Lazaroids protect isolated rat pancreatic acinar cells against damage induced by free radicals. *Pancreas*. 1995. 11 (2): 107-21.
- 152.-** Parks D.A., Granger D.N. Xantine oxidase: biochemistry, distribution and physiology. *Acta Physiol Scand. (suppl)* 1986 548 : 87-99.
- 153.-** Engerson T.D., McKelvey T.G., Rhyne D.B., Boggio E.B., Snyder S.J., Jones H.P. Conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemic rat tissues. *J Clin Invest*. 1987. 79 : 1564-70.
- 154.-** Hamamoto I., Merhav H., Zhu Y., Suzuki M., Fujita S., Murase N., Todo S., Starzl T.E. Lipid peroxidation, brush border and neutrophil enzyme activity after small bowel preservation: a comparison of preservation solutions. *Transplant Proc*. 1992. 24 (3): 1095.
- 155.-** Kokudo Y., Furuya I., Takeyoshi I., Nakamura K., Zhang S., Murase N., Todo S. Comparison of UW, EC and LR solutions in rat small bowel preservation for orthotopic small bowel transplantation. *Tranplant Proc*. 1994. 26 (3): 1492-93.