

DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA

EFEECTO DEL TRATAMIENTO CON PENTOXIFILINA EN
LA ISQUEMIA – REPERFUSIÓN INTESTINAL

MERCEDES CHANZA AVIÑÓ

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2005

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 24 de Maig de 1996 davant un tribunal format per:

- D. Eduardo García Granero Ximénez
- D. Antonio Berjón San Juan
- D. Benjamín Sarriá Chust
- D^a. Teresa Fraile Fariñas
- D. Alejandro Espí Maciá

Va ser dirigida per:
D. José Miguel Lloris Carsi

©Copyright: Servei de Publicacions
Mercedes Chanza Aviñó

Depòsit legal:
I.S.B.N.:84-370-6225-X

Edita: Universitat de València
Servei de Publicacions
C/ Artes Gráficas, 13 bajo
46010 València
Spain
Telèfon: 963864115

DEPARTAMENTO DE CIRUGIA
UNIVERSIDAD DE VALENCIA

**EFEECTO DEL TRATAMIENTO CON
PENTOXIFILINA EN LA
ISQUEMIA-REPERFUSION
INTESTINAL**

Mercedes Chanzá Aviñó
Valencia, 1996

MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

POR

MERCEDES CHANZA AVIÑO

DIRIGIDA POR

Prof. Dr. José Miguel Lloris Carsí.

Dra. Dolores Cejalvo Lapeña.

Prof. Dr. José Miguel Lloris Carsí.

Profesor titular del Departamento de Cirugía de la Facultad de Medicina de Valencia.

Dra. Dolores Cejalvo Lapeña.

Doctora en Biología. Universidad de Valencia.

Certifican:

Que el trabajo titulado

**EFFECTO DEL TRATAMIENTO CON PENTOXIFILINA EN LA ISQUEMIA-
REPERFUSION INTESTINAL**, presentado por Mercedes Chanzá Aviñó para obtener el
grado de Doctor en Medicina, ha sido realizado bajo nuestra dirección y reúne todos los
requisitos necesarios para su presentación, lectura y defensa.

Y para que así conste, firmo el presente en Valencia a 29 de Marzo de 1996.

Fdo: Prof. Dr. José Miguel Lloris Carsí.

Fdo: Dra. Dolores Cejalvo Lapeña.

AGRADECIMIENTOS.

En este momento, una vez terminado el trabajo, al que en ocasiones no veía el fin, deseo expresar mi agradecimiento más sincero a aquellas personas que han hecho posible su elaboración.

En primer lugar quisiera dar las gracias a la Dra. Dolores Cejalvo Lapeña y al Dr. Jose Miguel Lloris Carsí por su paciente dirección y seguimiento del estudio realizado, así como por haberme dado a conocer el sentido de las líneas de investigación, tan importantes en el desarrollo de los proyectos experimentales.

También quiero agradecer a mis compañeros el Dr. Jose Luis Ramos Martí y el Dr. Luis Estal Andrés, que me han enseñado lo agradable que puede ser un trabajo, en ocasiones duro, si se realiza en equipo. Les quiero agradecer también su gran optimismo, que conseguía minimizar cualquier contratiempo.

Muchas gracias a todo el personal del Centro de Investigación del hospital General de Valencia, que siempre se han comportado solícitamente, ayudándome en aquellas situaciones que me parecían insalvables y que su gran experiencia resolvía fácilmente.

Deseo dar las gracias a las doctoras M^a Teresa Fraile Fariñas y Rosario LLucian Rambla, que me han apoyado en todo momento, sabiendo que me acompañan en la satisfacción del trabajo realizado.

Quiero expresar mi mayor agradecimiento a mi marido que con su comprensión ha sabido esperar y darme, día a día, el ánimo y cariño necesarios para seguir el presente estudio. También he de nombrar a mis hijos, con los que no he podido compartir todo el tiempo que ellos habrían deseado y sin cuya presencia nada habría sido lo mismo.

INDICE

<u>I. INTRODUCCION</u>	1
1. OBJETIVOS	2
2. ANATOMIA Y FISIOLOGIA INTESTINAL	3
2.1. ANATOMIA.....	3
2.2. FISIOLOGIA.....	7
2.2.1. Funciones Mecánicas.....	7
2.2.2. Funciones Químicas.....	8
2.3. PRUEBAS FUNCIONALES.....	12
3. TRASPLANTE DE ORGANOS	15
3.1. SITUACION ACTUAL.....	15
3.2. TRASPLANTE DE INTESTINO DELGADO.....	15
3.2.1. Inmunosupresión y trasplante.....	18
3.2.2. Enfermedad Injerto-contra-huésped.....	22
3.2.3. Fisiología del injerto.....	24
3.2.4. Rechazo del injerto.....	27
3.3. PRESERVACION DE ORGANOS.....	31
3.3.1. Técnicas de Preservación.....	32
3.3.2. Alteraciones fisiopatológicas durante la preservación.....	34
3.3.3. Soluciones de preservación.....	40
3.3.4. Fármacos utilizados en preservación.....	47
3.3.5. Preservación Intestinal.....	56
4. FISIOPATOLOGIA DE LA LESION POR ISQUEMIA / REPERFUSION	62
4.1. ISQUEMIA.....	62

4.1.1. Lesión de la membrana celular.....	63
4.2. REPERFUSION.....	65
4.3. RADICALES LIBRES DE OXIGENO.....	65
4.3.1. Concepto.....	65
4.3.2. Formación.....	66
4.3.3. Efectos.....	68
4.3.4. Inactivación.....	69
4.4. PEROXIDACION LIPIDICA.....	70
4.5. ACCION DE LOS POLIMORFONUCLEARES.....	73
4.6. LESION ISQUEMIA-REPERFUSION INTESTINAL.....	77

II. MATERIAL Y METODOS...... 79

1. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	80
2. ANIMAL DE EXPERIMENTACION.....	84
3. GRUPOS EXPERIMENTALES.....	86
4. FARMACO EXPERIMENTAL: PENTOXIFILINA.....	89
4.1. INTRODUCCION.....	89
4.2. FARMACOCINETICA.....	89
4.2.1. Absorción. Concentraciones plasmáticas.....	90
4.2.2. Distribución.....	91
4.2.3. Metabolismo y Eliminación.....	92
4.2.4. Vida Media.....	92
4.3. FARMACODINAMIA.....	93
4.4. PENTOXIFILINA EN EL PROYECTO EXPERIMENTAL.....	97

4.4.1. Dosificación.....	97
4.4.2. Administración.....	98
5. TECNICA QUIRURGICA.....	99
6. OBTENCION DE PIEZAS.....	104
7. PRUEBAS ANALITICAS.....	107
7.1. PRUEBAS BIOQUIMICAS.....	107
7.1. PRUEBAS DE PEROXIDACION LIPIDICA.....	108
7.3. PRUEBAS DE ACTIVIDAD NEUTROFILICA.....	110
8. LASER-DOPPLER.....	112
8.1. CARACTERISTICAS DEL FLUJOMETRO.....	112
8.2. MANTENIMIENTO Y CALIBRACION.....	113
8.3. ADAPTACION A INTESTINO DELGADO.....	114
9. HISTOLOGIA.....	116
10. TRATAMIENTO ESTADISTICO.....	118
<u>III. RESULTADOS.....</u>	120
1. ESTUDIOS DE SUPERVIVENCIA.....	121
2. PRUEBAS BIOQUIMICAS.....	122
2.1. Urea.....	122
2.2. Creatinina.....	124
2.3. Sodio.....	126
2.4. Potasio.....	128
2.5. Calcio.....	130
2.6. Cloro.....	133

2.7. Fósforo.....	135
2.8. LDH.....	137
3. PRUEBAS DE PEROXIDACION LIPIDICA.....	139
4. PRUEBAS DE ACTIVIDAD NEUTROFILICA.....	142
5. ESTUDIOS LASER- DOPPLER.....	145
6. ESTUDIOS HISTOLOGICOS.....	154
<u>IV. DISCUSION.....</u>	158
1.SUPERVIVENCIA.....	161
2. PRUEBAS BIOQUIMICAS:.....	166
2.1. Urea.....	166
2.2. Creatinina.....	168
2.3. Sodio. Potasio. Cloro.....	170
2.4. Calcio. Fósforo.....	172
2.5. Enzima lactato deshidrogenasa.....	174
3. PRUEBAS DE PEROXIDACION LIPIDICA.....	176
4. PRUEBAS DE ACTIVIDAD NEUTROFILICA.....	179
5. LASER- DOPPLER.....	185
6. HISTOLOGIA.....	188
<u>V. CONCLUSIONES.....</u>	193
<u>VI BIBLIOGRAFIA.....</u>	195

INTRODUCCION

1. OBJETIVOS

En la actualidad el trasplante de órganos está considerado como una técnica quirúrgica de gran importancia, ya que en muchas patologías es la única terapia viable y definitiva. De ahí el interés no sólo en depurar dicha técnica, si no también en minimizar aquellas lesiones que se producen tanto por la isquemia consecuente a la interrupción del flujo sanguíneo, como a las debidas a la reoxigenación siguiente al momento de la reperfusión.

En el presente estudio se observarán los cambios metabólicos y estructurales que se producen en el intestino delgado de ratas Wistar, tras la isquemia por oclusión de la arteria mesentérica superior, con reperfusión al cumplirse dos horas de la misma.

Con la intención de disminuir las alteraciones fisiopatológicas que se producen en el órgano, se han utilizado diversas sustancias farmacológicas, como el alopurinol (26, 142, 203, 204), las ciclosporinas (106, 167), FK506 (71, 81) etc. El objetivo del presente trabajo es el ensayo de la Pentoxifilina, como droga hemorreológica, con la intención de observar su nivel de utilidad en mejorar y disminuir las lesiones producidas tras la isquemia/reperfusión intestinal.

2. ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA INTESTINAL

2.1. ANATOMÍA

El intestino comprende dos grandes porciones morfológica y funcionalmente muy diferentes: el **intestino delgado** y el intestino grueso o **colon**. El primero da comienzo en el duodeno, a continuación del píloro, señalando externamente el límite entre ambos la vena pilórica transversal. Acaba a nivel de la **válvula ileocecal**, en donde el colon lo continúa hasta el esfínter anal que constituye el final del tubo digestivo.

Intestino Delgado.

Es un tubo cilíndrico formado por multitud de flexuosidades, denominadas **asas intestinales**.

La primera es el **duodeno** en la cual se distinguen cuatro porciones: la primera o bulbo duodenal, la segunda, donde desembocan el colédoco y el conducto de Wirsung, que conducen a la luz intestinal respectivamente, la bilis y el jugo pancreático, la tercera horizontal, que cruza transversalmente la cava y la aorta, mientras la cuarta, vertical u oblicua, acaba en el llamado ángulo de Treitz o duodenoyeyunal.

A partir del ángulo de Treitz se suceden las **asas yeyunales**, de disposición horizontal, continuadas luego por las **asas ileales**. El íleon acaba en la válvula de Bauhin.

En conjunto la longitud total de yeyun-íleon es, aproximadamente, de 5'30 metros y su situación es intraperitoneal.

Histología

El intestino delgado como el resto del tubo digestivo consta de cuatro capas que, de fuera a dentro, son la serosa peritoneal, la capa muscular, la submucosa y la mucosa.

La **serosa** le confiere un aspecto rosado, uniforme y liso, permitiendo amplios y suaves desplazamientos de las asas.

La **muscular** está formada por fibras longitudinales externas y circulares internas, ambas lisas; entre los dos planos se dispone el plexo nervioso de Auerbach.

La **submucosa** rica en vasos y formaciones linfáticas, contiene también el plexo nervioso de Meissner.

La **mucosa** comprende el corion y epitelio absorbente. El corion es una trama conjuntiva rica en linfocitos. El epitelio está constituido por una sola capa de células cilíndricas con un polo libre dotado del llamado borde en cepillo. Entre ellas se hallan dispersas las células caliciformes.

Las **células epiteliales** se encargan de la absorción de los alimentos. Con este fin, es necesario conseguir la máxima superficie posible, lo cual se logra mediante los tres dispositivos estructurales siguientes: a) las válvulas conniventes, b) las vellosidades y c) las microvellosidades.

a) **Las válvulas conniventes o de Kerkring**, son repliegues permanentes de la mucosa.

b) **Las vellosidades intestinales** son prominencias alargadas de la mucosa, digitiformes y continuas siempre a una cripta o glándula de Lieberkún.

c) **Las microvellosidades**, que integran el llamado borde estriado o ribete en cepillo del polo luminal de las células absorbentes (Figura1)

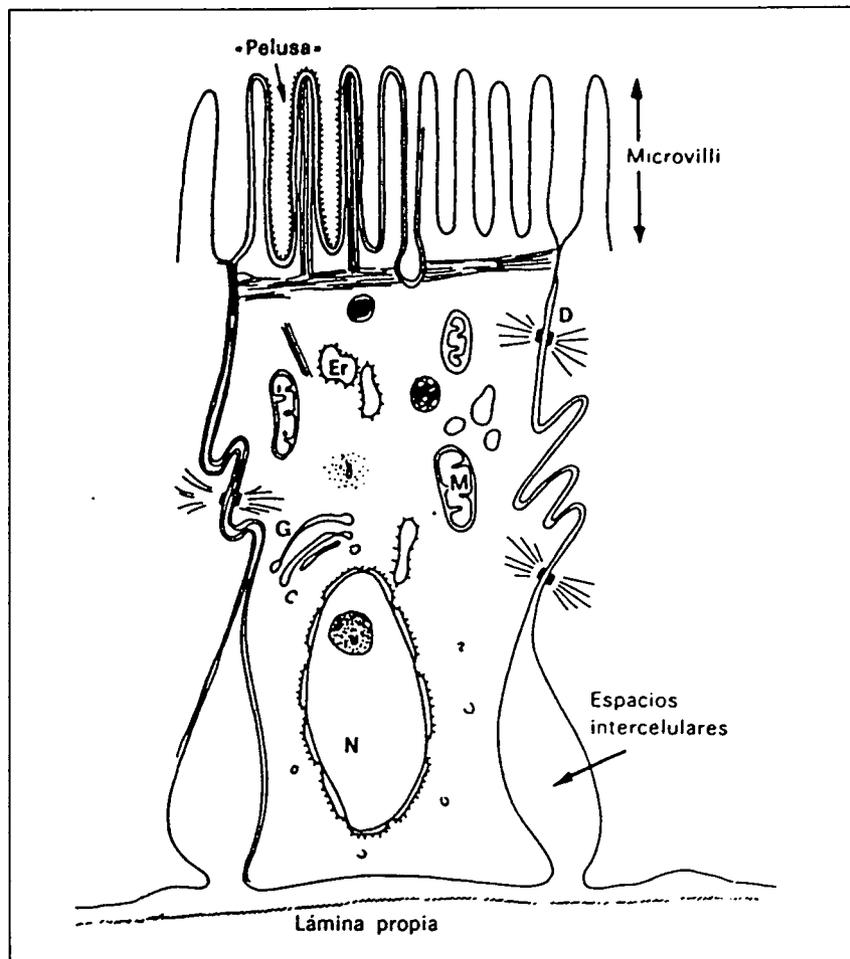


Figura 1. Célula epitelial absorbente.

Irrigación Arterial

La irrigación del intestino delgado corre a cargo del **tronco celíaco** y de la **arteria mesentérica superior**. Las porciones descendente y horizontal duodenales son irrigadas por la arteria pancreaticoduodenal superior (procedente de la a. hepática del tronco celíaco) y la parte final del duodeno por la a. pancreaticoduodenal inferior, rama de la a. mesentérica superior. De esta última nacen después las a. yeyunoileales que discurren entre las dos hojas del mesenterio, constituyendo entre sí arcos anastomóticos, de los cuales parten los vasos rectos que alcanzan el borde mesentérico del intestino.

A. mesentérica superior.

Es una arteria impar que nace inmediatamente debajo del tronco celíaco, del que está separado por la vena esplénica. Situada en el lado izquierdo de la vena mesentérica superior, se dirige hacia abajo, pasando por detrás de la cabeza del páncreas. Se desliza por delante de la tercera porción del duodeno, penetrando entre las dos hojas del mesenterio, cuya extensión recorre, siguiendo un trayecto arciforme hasta llegar al extremo distal del intestino delgado.

Ramas de la a. mesentérica superior :

1. A. pancreático duodenal. Irriga duodeno y páncreas.
2. As. intestinales. Forman numerosos arcos anastomóticos que irrigan las asas yeyunales e ileales.
3. A. iliocólica. Se dirige a la porción terminal del intestino delgado y comienzo del grueso.
4. A. cólica derecha. Irriga colon ascendente.
5. A. cólica media. Se dirige a colon transversal.

Retorno Venoso

Las venas afluyen a la **vena porta** a través de la **vena mesentérica superior**.

Vena Porta. Afluentes:

- 1- V. mesentérica superior
- 2- V. mesentérica inferior
- 3- V. esplénica
- 4- V. coronario estomacal

La vena porta recoge la sangre procedente de la totalidad del tubo digestivo, del páncreas, de la vesícula biliar y del bazo.

Sus raíces siguen en general la ramificación de las arterias homónimas.

Los linfáticos van a parar a los ganglios mesentéricos y luego a los paraaórticos.

La **inervación** corre a cargo del simpático, por medio de los nervios esplácnicos, y del neumogástrico, a través del plexo solar.

2.2 FISILOGIA

2.2.1. Funciones Mécanicas

a) Tono

b) Motilidad

2.2.2. Funciones Químicas

a) Digestión de alimentos

b) Absorción

c) Formación de heces

2.2.1 Funciones mecánicas,

Representadas por el **tono** y la **motilidad intestinal**.

Están presididas por el plexo nervioso de Auerbach cuya acción obedece a los impulsos del vago, el cual estimula el tono y la motilidad, y del simpático, que se conduce en sentido contrario.

Los estímulos fisiológicos que desencadenan los movimientos intestinales son de carácter primordialmente mecánico, en especial, la distensión parietal que desencadena el reflejo gastrocólico. La propia pared intestinal produce una hormona, la colina, que estimula el peristaltismo. Las hormonas neurohipofisarias (oxitocina) y las tiroideas estimulan la motilidad intestinal.

a) **El tono** es común al intestino delgado y al grueso, encargándose de adaptar adecuadamente las paredes intestinales al contenido del mismo.

b) **La motilidad**, en cambio, es más compleja y varía del delgado al grueso.

En el **I.delgado** se distinguen tres formas de motilidad:

- Movimientos segmentarios, para el amasamiento del contenido.
- Movimientos pendulares, de balanceo, para mejor mezcla del contenido intestinal.
- Movimientos peristálticos, que por contracción y relajación sucesivas de las fibras musculares, originan ondas impulsoras que arrastran el contenido del delgado hacia la válvula ileocecal.

En el **colon** los movimientos segmentarios son poco manifiestos, mientras que los peristálticos destacan por dos características: son muy enérgicos, arrastrando rápidamente el contenido intestinal distalmente, y aparecen muy espaciados en el tiempo, en número de dos o tres trenes de ondas al día.

2.2.2 Funciones químicas.

a) **Digestión de los alimentos.** Tiene por objeto, descomponer los alimentos de la ingesta en principios inmediatos solubles y de pequeño peso molecular, capaces de ser absorbidos ulteriormente por la mucosa intestinal.

La digestión se inicia en la boca, prosigue en el estómago, pero donde alcanza su culminación es en el intestino delgado, gracias a la intervención de :

- Jugo pancreático.
- Jugo intestinal .
- Secreción biliar.

- Hormonas intestinales.

- Jugo pancreático, cuyos fermentos son: carboxipeptidasas; tripsina, quimotripsina, que actúan desdoblado las proteínas y peptonas en polipéptidos y dipéptidos; amilasas, que desdoblan el almidón en dextrinas y disacáridos; y lipasas, que disocian las grasas neutras en ácidos grasos y glicerina.

- Jugo intestinal. Sus enzimas son: peptidasas, que desdoblan los polipéptidos y liberan aminoácidos absorbibles; maltasa, invertasa y lactasa, que desdoblan, respectivamente, a la maltosa, sacarosa y lactosa.

- Secreción biliar, que llega al intestino gracias a la colecistoquinina. Los ácidos grasos actúan sobre las grasas, convirtiendo estas sustancias liposolubles en hidrosolubles, facilitando su absorción.

- Hormonas intestinales. En la mucosa intestinal existen unas células pertenecientes al sistema APUD. El nombre proviene de las iniciales de las palabras inglesas Amine, Precursor, Uptake, Decarboxilase, que aluden a sus propiedades más importantes:

- Contienen aminas fluorogénicas (catecolaminas, 5-hidroxi- triptamina)

- Captan precursores de aminas (dopa).

- Decarboxilan los aminoácidos.

Estas células segregan varios polipéptidos de acción hormonal activos sobre el proceso digestivo como son: gastrina, entero-glucagón, secretina, colecistoquinina-pancreozimina, polipéptido inhibidor gástrico y polipéptido intestinal vasoactivo.

b) Absorción intestinal de agua , electrolitos , principios inmediatos, vitaminas y de algunos oligoelementos.

Cabe considerar tres tipos de absorción:

- Absorción pasiva o difusión, a favor de un gradiente de concentración y que no consume energía.

- Absorción activa, en contra del gradiente de concentración y con consumo de energía procedente de la glucólisis aerobia.

- Absorción por difusión facilitada que no requiere energía y utiliza un transportador.

Agua y electrolitos. La absorción de ambos está íntimamente relacionada entre sí. Se sabe que el transporte de electrolitos (en particular del Na^+) es un proceso activo, que exige energía. Existe la llamada "bomba de sodio" dispuesta en la célula intestinal, la cual captaría el ion Na^+ , intercambiándolo con iones H^+ , con independencia de su concentración en la luz intestinal. En cuanto al agua, se difundiría pasivamente, en función de la diferencia de presión osmótica local, entre la superficie sanguínea de la célula intestinal y la luminal .

Hidratos de Carbono. Se absorben en forma de los monosacáridos glucosa, fructosa y galactosa. La Glucosa, dentro de la célula intestinal, se combina con ATP en presencia de hexoquinasa, resultando glucosa-6-fosfato y ADP. Queda establecido un gradiente de glucosa intra y extracelular, que determina el tránsito de la hexosa al interior de la célula intestinal. En la porción hemática de la célula y bajo la acción de la enzima glucosa-6-fosfatasa, se convertirá en glucosa libre pasando a la circulación .

Proteínas. Se absorben en forma de aminoácidos, por medio de mecanismos poco conocidos, pero probablemente, semejantes a los de los azúcares.

Grasas. La grasa de la dieta está formada, fundamentalmente, por triglicéridos. En el yeyuno, gracias a la acción de la lipasa del jugo pancreático, se produce una hidrólisis parcial de las mismas. Seguidamente intervienen las sales biliares, que se disponen alrededor de los ácidos grasos ofreciéndoles sus polos liposolubles, mientras que exponen al exterior (luz del

tubo digestivo) los hidrosolubles, quedando constituidas micelas hidrosolubles que permitirán su absorción (Figura 2).

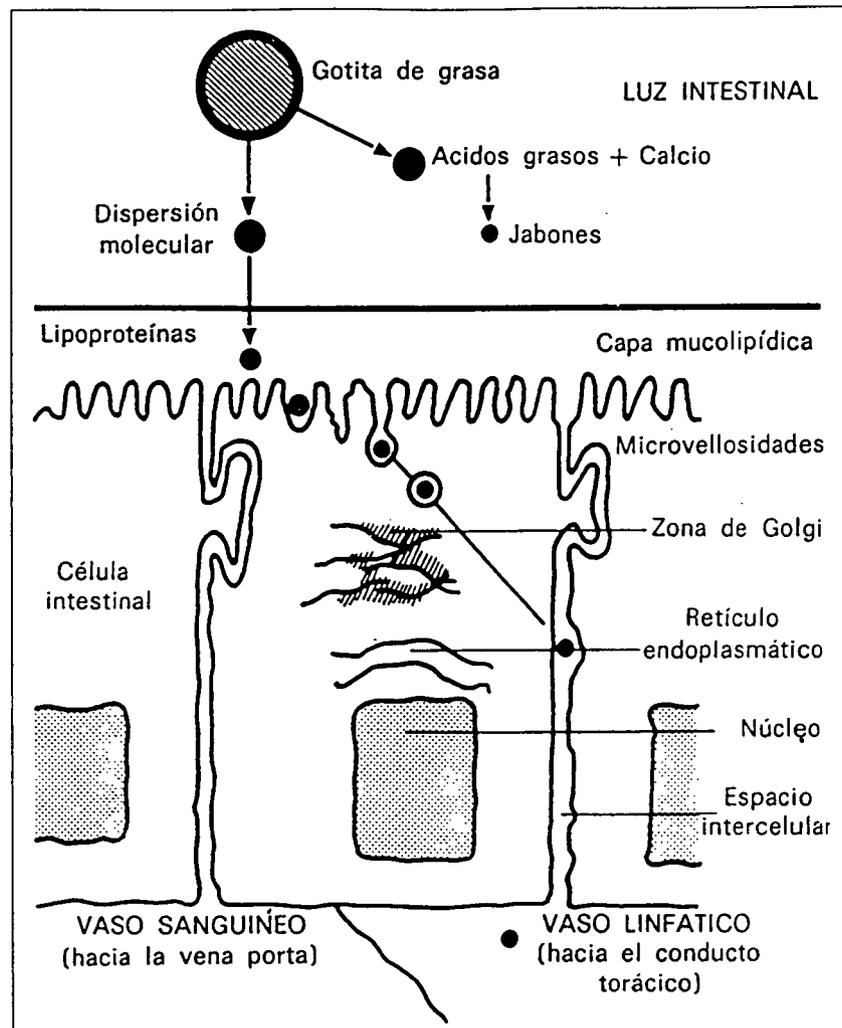


Figura 2. Absorción de las grasas por pinocitosis.

- Vitaminas.

Su absorción dependerá de que sean hidro o liposolubles. Las primeras atraviesan la mucosa intestinal sin dificultad, las liposolubles se absorben junto con las grasas.

c) Formación de las heces.

Las heces están formadas por dos componentes principales: escorias y materia fecal propiamente dicha. Las escorias están constituidas por restos de los alimentos indigeribles, no

digeridos o no absorbidos. La materia fecal la forman las secreciones entéricas (sales, mucina pigmentos y fermentos), los productos de descamación de las paredes del tubo digestivo, y sobre todo, por las bacterias de la flora intestinal.

2.3. PRUEBAS FUNCIONALES

Las técnicas clásicas de estudio de la capacidad de absorción de la mucosa intestinal son :

- Prueba de la D-xilosa.

Muestra el poder de absorción del intestino para los azúcares. Esta aldopentosa se reabsorbe pasivamente o por absorción facilitada, a diferencia de lo que ocurre con la glucosa, que lo hace por absorción activa. La xilosa no se metaboliza en el organismo, por lo que su eliminación urinaria está en directa proporción a la cantidad administrada y absorbida (200). Su administración es oral y su determinación en orina recogida a las 5 horas. Explora duodeno e intestino delgado proximal.

- Prueba de la sobrecarga de azúcares.

Realizable en mono y disacáridos. Suele efectuarse con lactosa, la cual en presencia de la enzima intestinal lactasa, es desdoblada en glucosa y galactosa, determinándose la primera a lo largo de 2 horas, con intervalos de 30 minutos.

- Prueba de tolerancia a la glucosa.

La curva de glucemia con sobrecarga oral de glucosa, sirve también para enjuiciar la absorción intestinal. En los procesos de malabsorción se observa una curva plana (8, 200).

- Prueba de absorción de la vitamina B₁₂.

Identifica malabsorción de origen ileal. Consiste en la administración de un preparado de vitamina B₁₂ marcado con un isótopo del cobalto, y determinación subsiguiente de la

radiactividad en plasma, orina o heces. El método más utilizado es el **Test de Schilling**, con doble isótopo. Se realizará el contaje en la orina emitida durante 24 horas, tras la inyección de las moléculas marcadas con Co^{57} y Co^{58} . Explora el intestino delgado distal (8).

- **Prueba de tolerancia a la Vitamina A.**

Se practica administrando dicha vitamina, pasando luego a la determinación del nivel plasmático de la misma y de los carotenos. Estos niveles apenas se elevan en los pacientes con malabsorción (8).

- **Prueba de absorción de Ac.Fólico.**

Se determina por radioinmunoanálisis.

- **Test de manitol-celobiosín.**

Proporciona información sobre la permeabilidad del epitelio intestinal. Se administra una solución con estas sustancias, en ayunas, y se determina su eliminación en la orina de las 5 horas siguientes (37).

- **Técnica de Polietilenglicol 400.**

Detecta cambios patológicos en la permeabilidad del intestino delgado proximal (28,29).

- Para determinar la acción de la Superóxidodismutasa y la Xantinoxidasa sobre la lesión del intestino, producida tras la isquemia reperusión, se utiliza el **método del nitroazul de tetrazoilo** (168) para la primera, y la **formación de ac. úrico** como expresión de la segunda. Estas determinaciones se realizan sobre el tejido lesionado (185).

- Medición de la **actividad de la Na-K-ATPasa** en las microvellosidades intestinales, para seguimiento del efecto de la isquemia sobre el órgano. **Método de Chudry** (194).

- **Aclaramiento de albúmina** como índice de integridad mucosa ,y **aclaramiento de células de la serie roja** , si la inflamación intestinal es un componente significativo de la lesión

mucosa. El método del aclaramiento plasmático, para el estudio "in vivo" de la integridad de la barrera epitelial, refleja aquel volumen de plasma depurado de la sustancia en un tiempo dado (40, 59).

$$\text{Aclaramiento} = \frac{\text{Concentración luminal. Perfusión luminal}}{\text{Concentración plasmática. Peso tisular.}}$$

- Evaluación del **transporte iónico de la mucosa y la utilización de glutamina**. El transporte iónico representado por la diferencia de potencial transmembrana, y la respuesta a la glutamina, están disminuidos en los injertos rechazados (112).

- Determinación de **fosfatos de alta energía**, mediante cromatografía líquida de alta resolución. El contenido de estos fosfatos en un órgano, tras el período de almacenamiento del mismo, está directamente relacionado con la función del injerto trasplantado (21,192).

- Test de permeabilidad intestinal mediante **Lactulosa-L-ramnosa**. Modificación del ya descrito test de sobrecarga de azúcares.

- **Test de absorción de la Maltosa**. Resulta útil para valorar la función enzimática del borde en cepillo, de las vellosidades intestinales (68).

- **Aclaramiento de Cr⁵¹ EDTA**, de plasma a lumen. Ofrece información sobre el estado de permeabilidad de la mucosa intestinal (95, 107, 108).

3. TRASPLANTE DE ÓRGANOS.

3.1. SITUACIÓN ACTUAL.

En el momento presente las líneas de investigación abiertas, dirigidas a conseguir la viabilidad de los trasplantes de órganos y tejidos son:

- Estudio pormenorizado de la lesión producida por la isquemia / reperfusión, con el fin de alcanzar un mejor conocimiento de la misma y poder modificar aquellos procesos que contribuyen a la extensión de la lesión.

- Estudio de métodos de preservación de órganos, para lograr aquella solución que resulte óptima para cada órgano.

- Tratamiento farmacológico o físico (radioterapia) del donante y/o receptor del órgano, con la intención de minimizar las reacciones inmunológicas que provocan el rechazo.

3.2. TRASPLANTE DE INTESTINO DELGADO

En 1959 Lillehei et al (114) describieron , por primera vez, la técnica del trasplante ortotópico de intestino delgado en el perro. Con ésto demostraron que esta modalidad de trasplante era posible, pero el entusiasmo inicial fue decayendo al observarse una supervivencia muy corta debido, fundamentalmente, al rechazo del injerto y a la muerte por sepsis.

El trasplante de intestino delgado (ID) presenta unas dificultades y características propias, que le diferencian del de otros órganos, posiblemente debido a la gran riqueza de tejido linfoide que existe entre sus estructuras: ganglios linfáticos mesentéricos, placas de Peyer y lámina propia (225).

Esta particular constitución condiciona la aparición de una patología que puede surgir tras el trasplante, ésta es la **enfermedad injerto contra huésped**, en la que se produce una invasión de células linfoides desde el órgano injertado hacia las células del huésped, dando lugar a una competitividad inmunológica difícil de ser controlada (86). Esta patología es diferenciable histológicamente del rechazo, pero también puede llevar al fracaso del injerto.

El éxito final del trasplante, sólo es posible, si se llega a una simbiosis armónica entre las células del injerto y las del huésped, apreciándose que esto es lo que ocurre en aquellos trasplantes que alcanzan larga duración (90).

Los modelos experimentales utilizados han sido muchos, cada uno con unas ventajas y unos inconvenientes. Lillehei RC (114) utilizó para el trasplante de intestino delgado a perros, a los cuales se les extraía el órgano para ser posteriormente autotrasplantado. Se han practicado diferentes modelos de emplazamiento orto y heterotópico del ID, con distintos drenajes, portal o sistémico para estudios funcionales e inmunológicos.

Monchik GJ y Russell PS (132) practicaron en 1971, el trasplante experimental de ID a grupos de ratas, en los que unas eran las progenitoras y otras sus descendientes, observando que si el trasplante era de padres a hijos sólo se producía la enfermedad injerto contra huésped (posteriormente detallada), mientras que si era de hijos a padres lo que acontecía era el rechazo.

Zhong R et al (231) desarrollaron en 1993 un modelo de trasplante intestinal en ratón, estableciendo dos anastómosis, una entre aorta del donante y aorta del receptor, y otra entre vena porta del donante y vena cava superior del receptor. La mortalidad inicial, tan alta, la atribuyen al shock, trombosis arterial y sepsis postoperatoria. Establecen una serie de puntos, o consejos, a tener en cuenta para disminuir estas complicaciones:

- Refinamiento de la técnica quirúrgica.

- Minimizar las lesiones isquémicas del injerto, tanto en el donante como en el receptor.

- Usar parche aórtico y aortotomía elíptica para la anastómosis.

- Administrar grandes volúmenes de cristaloides, para mantener una presión sanguínea normal, durante las intervenciones del donante y del receptor.

- Usar antibióticos de amplio espectro en la profilaxis postoperatoria.

Por otra parte, los esfuerzos encaminados a encontrar fármacos, que intervinieran selectivamente en el sistema inmunológico, tuvieron su fruto con el aislamiento de la Ciclosporina por Borel en 1976, cuyo efecto se centra sobre los linfocitos T. Esta droga permitió tomar con un nuevo interés el trasplante de intestino (55).

Posteriormente se han ido ensayando otras sustancias activas sobre el proceso inmunológico, como pueden ser la FK506 (20, 42, 71, 171, 176, 210,213) o la Rapamicina (32).

En este sentido de la investigación, los avances en biología molecular ofrecen una prometedora vía de actuación, ya que los anticuerpos monoclonales van a permitir una actividad cada vez más específica y selectiva sobre las diversas líneas celulares (35, 81, 94).

Otro problema a resolver es el de la difícil preservación de éste órgano, lo que limita el tiempo, y por tanto, las posibilidades de hallar un donante compatible con el receptor.

Son pues varias e importantes las cuestiones a solucionar para lograr el éxito en este proceso quirúrgico, que sigue siendo la única posibilidad terapéutica definitiva en los casos de isquemia intestinal, así como en la atrofia congénita de microvellosidades intestinales, que acaece en algunos lactantes, y que siempre resulta mortal.

Existe constancia de trasplante de ID en niños, realizado con éxito, como describen Oliva MM et al (148) en un caso infantil de la enfermedad de inclusiones en los micrivilli, que es una rara enfermedad congénita, que aparece ya en el recién nacido y lleva a una

dependencia crónica de la nutrición parenteral, con alta mortalidad. Este caso fue tratado con un trasplante de ID, alcanzando el éxito y posibilitando la normal alimentación enteral del niño. Hay otros autores como Tzakis AG et al (210), que realizaron trasplantes demostrando que es factible en los pacientes pediátricos; con un tratamiento previo inmunosupresor consistente en FK506 y combinando el trasplante de ID y de hígado, en el caso de que éste presentara fallo con hipertensión portal.

3.2.1 Inmunosupresión y Trasplante de Intestino Delgado

El mayor avance en este campo lo supuso el aislamiento de la **ciclosporina (CyA)**, pero antes de que ésta estuviera disponible, se utilizaron otros agentes inmunosupresores.

Taylor RMR et al (197) utilizaron **azatioprina** en el trasplante experimental con perros, logrando sólo un ligero aumento en la supervivencia de los mismos.

En 1966 Preston FW et al (159) añadieron **prednisona** a la azatioprina, consiguiendo un aumento en la supervivencia de 9 a 27 días.

Hardy MA en 1970 (69) utilizó, además de estas drogas, **suero antilinfocítico**, alcanzando una supervivencia de 38 días.

Ciclosporina A.

Con la aparición de la **Ciclosporina (CyA)** mejoraron las perspectivas, así Reznick RK et al (165) en un trabajo de 1982, reporta una supervivencia de 90 días, tras la administración de este fármaco por vía intramuscular; aunque muchos de los perros a los que se les practicó el trasplante murieron de neumonía, quizás agravada por la malnutrición o por las altas dosis de CyA utilizadas.

En 1988 Schraut WH (176) constata la alta efectividad de esta droga, incrementando la supervivencia de los injertos realizados en modelos allogénicos de ratas.

Según las experiencias de Grant D en 1990 (53), sobre trasplantes de ID realizados en cerdos, la mayor rentabilidad de la CyA se consigue al administrarla por vía intravenosa durante los primeros 7-10 días, pasando luego a la vía oral durante 3 ó 4 meses más; sin embargo, la CyA tiene el inconveniente de su nefrotoxicidad, pudiendo incluso inducir a la malignización del órgano.

Parece que el tratamiento endovenoso con CyA, está justificado durante el primer período postrasplante, quedando todavía por valorar el beneficio de la continuidad del mismo por vía oral, así como sus efectos secundarios, entre los que se incluyen la acción citotóxica directa sobre las células endoteliales, que provocan un aumento en la resistencia vascular renal; también se le atribuye una acción vasoconstrictora de la arteriola aferente principal que determinarían los cambios glomerulares e intersticiales asociados a la nefrotoxicidad de la CyA.

FK506. Rapamicina.

Hay otras sustancias de más reciente síntesis, como FK506 y Rapamicina, ambas son macrólidos producidos por una bacteria, el *Streptomyces* spp., con una potente actividad inmunosupresora. Tanto CyA como FK506 contrarrestan la estimulación mitógena y antigénica ocurrida en la fase temprana de la activación de los linfocitos T, mientras que la Rapamicina interviene en la síntesis de DNA. Las tres drogas ejercen su acción sobre unas proteínas de unión denominadas inmunofilinas, las cuales poseen una actividad cis-trans peptidil prolil isomerasa.

Hay evidencias de que FK506 y Rapamicina se sitúan en el mismo lugar de unión, mientras que CyA se une a una ciclofilina similar, pero no idéntica. Es probable, que ésta sea la razón por la que la Rapamicina se muestra antagonista de la inhibición inducida por FK506

sobre la proliferación de células T, y a su vez, la FK506 actúa como antagonista de la acción de la Rapamicina.

Combinaciones de CyA y FK506 o CyA y Rapamicina, llevan a una mejor inhibición de la respuesta mitógena y antigénica inducida por las células T.

FK506.

Hoffmann et al (81) realizaron en 1990, un amplio estudio sobre el uso de esta sustancia, en el trasplante de ID de ratas. Demostraron que a largo plazo, la FK506 resultaba más efectiva que la CyA, en la prevención del rechazo agudo, así como de la enfermedad injerto contra huésped, en modelos semialogénicos. La dosis que utilizaron en dichas experiencias fue de 2 mg/Kg/día durante los días 0 a 6 postrasplante. Para obtener las mismas cifras de supervivencia necesitaban dosis de CyA 20 veces mayores. Otro hecho observado fue la capacidad de FK506 de hacer reversible un proceso de rechazo ya en curso.

Hay otros muchos autores que han experimentado con ella, como Hatazawa C et al (71), que en 1992, lograron prolongar la supervivencia, administrándola a razón de 1 mg/kg/día durante 8 semanas.

Lee KKW et al (111) consiguieron hacer reversible el rechazo, establecido tras trasplante de ID en rata, mediante FK506. Realizaron aloinjertos de intestino de ratas Lewis (receptores) y Brown-Norway (donantes). Se les administró 5 días CyA , pero desarrollaron signos de rechazo; entonces, se les trató con FK506 consiguiendo hacer reversible éste y logrando una mayor supervivencia que en aquellos animales no sometidos a este tratamiento.

Rapamicina.

Strepkowski SM et al, en 1991 (190), lograron con sus experiencias en trasplantes de riñón y de intestino delgado practicados en ratas, un aumento significativo de la supervivencia,

administrando dosis de Rapamicina de 0'80 mg/Kg/día por vía intravenosa, durante los 14 días siguientes al trasplante.

Se ha visto que hay una acción sinérgica entre Rapamicina y CyA (32). La Rapamicina suprime un mayor espectro de la vía de activación de las células T, que FK506 o CyA. Tanto FK506 como Rapamicina se han mostrado más potentes y menos tóxicas, como agentes inmunosupresores, que CyA en el trasplante experimental de intestino delgado (190), pero son drogas que todavía deben ser más ensayadas clínicamente.

Dentro del campo de la inmunosupresión, los **anticuerpos monoclonales** tienen un gran futuro gracias a su alta especificidad. Estas inmunoglobulinas están siendo todavía hoy ensayadas. Yanataka T et al en 1993 (227), utilizaron con éxito el tratamiento con Ac.monoclonales anti-ICAM-1 en el trasplante de ID de ratas, administrándolo por vía intraperitoneal, los 5 días siguientes a la intervención; observando que con este tratamiento se retrasa la aparición de un rechazo.

Inmunomodulación.

Hay numerosos estudios que apoyan el acondicionamiento del receptor con transfusiones de sangre del donante específico, lo cual puede mejorar la supervivencia. Otro pretratamiento utilizado consiste en la administración de suero antilinfocítico (69).

Se ha trabajado también combinando este pretratamiento con la administración de CyA o con FK506 consiguiendo de esta forma una acción sinérgica (69).

Otra práctica, en este sentido, es la irradiación con rayos ultravioleta B de las células transfundidas, intensificando los efectos de la transfusión con células del donante (35)

Se ha observado que las transfusiones de leucocitos irradiados combinadas con la administración de bajas dosis de CyA, durante un período corto de tiempo, es significativamente beneficioso en prolongar la supervivencia del injerto de ID (230).

3.2.2. Enfermedad Injerto-contra-Huésped (EICH)

Los primeros autores en observar que el trasplante experimental de intestino delgado (ID) puede producir esta patología fueron Monchik y Russel en 1971.(132)

Esta enfermedad presenta similitudes histológicas con la producida tras un trasplante de médula ósea, y está causada por los linfocitos T originados en el tejido intestinal trasplantado y sus nódulos linfáticos mesentéricos, los cuales invaden los tejidos proximales del receptor. Clínicamente los signos observados en un animal con este proceso son: dermatitis alopecia, postura encorvada y eventualmente, muerte del mismo.

La relación entre EICH y rechazo es incierta, y varía según los modelos experimentales. En los injertos alogénicos de ID completos, parece que se da con mayor frecuencia rechazo que EICH (132).

Hay otros autores como Cohen Z et al (38), que mantienen la teoría de que el desarrollo de una EICH subclínica, conlleva una mayor supervivencia del injerto, de forma que, el injerto que vence esta enfermedad es un injerto resistente, con altas posibilidades de supervivencia. Podemos encontrar referencias, ya en los años 60, de que la EICH deprime la reactividad inmunológica del huésped (84). Este hecho se observa claramente con la reducción de células T en el trasplante de médula ósea. Por un lado esta deplección celular disminuye la posibilidad de una EICH aguda, y por otro esto puede aumentar la posibilidad de rechazo. La EICH sólo se produce en el trasplante de órganos con gran riqueza linfocítica, como son, bazo, médula ósea e ID.

Histopatológicamente, la EICH se caracteriza por una pérdida de la arquitectura normal del bazo, nódulos linfáticos y timo. Esto lleva a una profunda inmunosupresión, con empeoramiento de la respuesta humoral y celular (54). Esta depresión inmunológica justifica, probablemente, el balance observado "in vivo" entre rechazo y EICH.

Hay unos trabajos realizados por Gundlach M et al en 1992 (62), en los que se refiere la linfadenectomía mesentérica, como un método útil para eliminar la posibilidad de una EICH, pero que no influye en el curso de un rechazo agudo en los receptores sometidos a una inmunodepresión. Un hecho observado por Pirenne J et al en 1990 (156), es que la administración de CyA no es efectiva para prevenir el rechazo en el trasplante de ID, si se le combina con una linfadenectomía mesentérica.

Para tratar de controlar tanto la EICH como el rechazo se ha de actuar sobre la inmunogenicidad disminuyendo el volumen de leucocitos en el injerto. Por otra parte, los tratamientos inmunosupresores aplicados sobre el receptor, para prevenir el rechazo, pueden tener distintos efectos sobre la EICH, así algunos la previenen aunque con menor efectividad que el rechazo, como es el caso de CyA, y otros pueden incluso incrementarla como ocurre con la FK506 (19,20).

Se han probado muchos métodos para disminuir la EICH en los trasplantes de ID, podemos citar:

- La irradiación del cuerpo entero del donante, antes de proceder al trasplante.
- La linfadenectomía mesentérica.
- La reducción del tamaño del injerto.

Otra consideración sobre la EICH es su relación con el Factor de Necrosis Tumoral (α -TNF). Se ha comprobado que bloqueando la actividad del α -TNF, se reduce la mortalidad por EICH en los trasplantes de médula ósea, y previene las lesiones dermatológicas e intestinales que acompañan a dicha patología (155). Esto sugiere que la terapia con anticuerpos anti- α TNF puede ayudar a reducir la severidad o letalidad de la EICH. Hay otras citoquinas que podrían participar en la patogénesis de la EICH, siendo importantes también en el rechazo del

injerto (137). La terapia con anti-citoquinas podría, por tanto, ser evaluada junto con otras modalidades inmunosupresivas.

Chowdhurg NC et al (35), en un estudio de 1993, sugieren el pretratamiento de las células medulares del donante con rayos UV-B, para mejorar la tolerancia del trasplante de ID en ratas y evitar la EICH. Langrehr JM et al (109), realizaron en 1994 estudios de trasplante de ID en ratas Brown Norway y Lewis, en los que se producía la EICH. Comprobaron mediante histología, que en la mayoría de los rechazos se detectaban antígenos de histocompatibilidad clase 1 en los donantes; por lo que aconsejan detectar la presencia de estos antígenos antes de realizar el trasplante, para evitar la presencia de una EICH, ya que se correlacionan.

3.2.3. Fisiología del Injerto.

Al realizarse un trasplante de intestino delgado (ID), éste va a sufrir ciertas modificaciones en sus funciones nutritiva, motora, hormonal e inmunológica, esto es debido a diversas razones como son la isquemia, la alteración linfática y la denervación, causada por los procedimientos quirúrgicos, así como las alteraciones inmunológicas originadas por la administración de drogas inmunosupresoras.

El objetivo del trasplante de ID debe ser el solucionar los síntomas del llamado Síndrome de Intestino Delgado. Este tratamiento debe prevenir, a largo plazo, la malnutrición, derivada de la única alimentación parenteral a la que están atados estos pacientes, tanto en el individuo adulto, como en el pediátrico, permitiendo a éste un crecimiento normal.

Función Nutritiva.

La mejor prueba para saber si un trasplante funciona bien, es comprobar si es capaz de llevar a un crecimiento y desarrollo normal, de forma que el receptor, en caso positivo, presentará un aumento de peso. La recuperación de esta función será lenta, ya que al principio, se

verá alterada debido a las interrupciones estructurales, linfática y neural ocurridas con la cirugía.

Los animales sometidos a trasplante de ID experimental presentan, comúnmente, esteatorrea y alteraciones en la absorción de la D-xilosa, incluso un año después del trasplante (199).

Son necesarios, todavía, muchos estudios para determinar que el funcionamiento, a largo plazo, de un trasplante de ID es factible tanto en el receptor joven como adulto, y de esta forma lograr obviar la nutrición parenteral total y comprobar que este cometido es restaurado por un buen funcionalismo intestinal.

Función Inmune.

La mucosa intestinal es una barrera fundamental frente a los antígenos alimenticios y microbianos, por lo que su respuesta ante los mismos debe ser apropiada; para esto la integridad de la mucosa, tan vulnerable, debe mantenerse y así evitar la posible diseminación de infecciones, que se verían facilitadas por la gran carga bacteriana del contenido intestinal (206).

La mucosa también debe proteger al organismo de las reacciones adversas, que se pueden producir frente a antígenos de origen no patógeno. Se han observado reacciones inmunológicas hacia antígenos inocuos, a la que se ha denominado como "tolerancia oral" (206). Los mecanismos de regulación inmunológica en el intestino, no han sido todavía bien definidos.

La estrategia de mayor efectividad de la inmunidad mucosa, parece ser la secreción de inmunoglobulinas, producidas por los linfocitos B en ella contenidos. Esta liberación de inmunoglobulinas es, sobre todo, de clase IgA, que es transportada a la luz intestinal, a través de las células epiteliales de las criptas de Lieberkün.

En el epitelio intestinal se encuentran localizados numerosos linfocitos T. En contraste con los de la lámina propia, estos linfocitos están en contacto directo con las macromoléculas

en tránsito a través del epitelio. Su función es todavía oscura, pero parecen intervenir en reacciones citotóxicas e inmunosupresivas.

Además de estos linfocitos de disposición aislada, el intestino contiene nódulos linfáticos independientes y en agregados linfáticos constituyendo las placas de Peyer. Este es, probablemente, el lugar de mayor síntesis de IgA del tejido linfático intestinal. La IgA producida puede migrar a otras localizaciones del sistema linfático como el pulmón, glándulas mamarias, glándulas salivares y glándulas lagrimales (206). La función inmune en los trasplantes de intestino es todavía mal conocida, habiéndose encontrado tanto en humanos como en animales de experimentación, que los linfocitos del injerto son reemplazados por células del receptor, sin que ésto suponga un rechazo (90).

Función Motora.

La motilidad del tracto superior del intestino normal está bien caracterizada. El estómago y el ID desarrollan distintos patrones de motilidad según la situación de ayuno o de alimentación.

Durante el ayuno, o período interdigestivo, el tracto superior del intestino muestra un patrón de motilidad espontáneo, recurrente y cíclico, llamado "complejo motor migratorio" (CMM) o "complejo mioeléctrico interdigestivo" (CMI). La comida interrumpe este patrón e induce un patrón menos definido, no cíclico, intermitente, compuesto por contracciones de baja amplitud que persisten durante un período variable de tiempo, dependiendo del tipo y cantidad de alimento. Estos patrones son fisiológicamente muy importantes para permitir la alimentación oral.

Durante el ayuno, el CMM arrastra los alimentos no digeribles desde el estómago e ID, ejerciendo una función de "mantenimiento intestinal".

El cambio en el patrón motor, provocado por la comida, está encaminado a aumentar la mezcla y facilitar su absorción. El hecho de que la presencia de la comida sea capaz de estimular un patrón de contracciones, implica que el sistema nervioso intrínseco del intestino, es capaz de generar este patrón motor sin la información procedente del SNC.

En trasplantes de segmentos intestinales en ratas, no se observa un restablecimiento del patrón motor basal normal, hasta después de transcurridas 3 semanas de la intervención (215). La recuperación de esta motilidad y de su función de mantenimiento, son necesarias para la alimentación, pero también para evitar las disbacteriosis.

3.2.4. Rechazo del Injerto. Monitorización.

Los marcadores serológicos del rechazo de un injerto intestinal son, hoy por hoy, todavía inespecíficos. La histología sigue siendo el patrón estándar para diagnosticar el rechazo, pero ésta implica ciertos inconvenientes como son la agresividad de la técnica, junto con el peligro de perforación intestinal. Son necesarias biopsias seriadas para controlar la evolución del posible rechazo, lo que incrementa su peligrosidad.

La evaluación endoscópica e histológica del rechazo en el trasplante de ID de ratas, puede ser clasificada en unos estadios progresivos, según Toyama N (207) establece en un estudio de 1993; éstos grados son:

- *Estadio I.* Al 3^{er} día del postoperatorio. La mucosa del injerto intestinal muestra palidez desigual y pérdida del fino patrón de la red capilar, acompañándose de microerosiones.

- *Estadio II.* Entre el 4^o y 5^o día. El daño se extiende progresivamente por toda la mucosa.

- *Estadio III.* Entre el 6^o y 7^o día. El epitelio, necrótico, se encuentra separado, suelto, mostrando múltiples úlceras que provocan enteritis hemorrágica.

- *Estadio IV*. Durante los días 10 a 14. El rechazo del tejido es completo, con necrosis total y formación de un tejido cicatricial blanco.

Dentro del método histológico se han buscado, y se buscan actualmente, signos celulares que den una información precoz del rechazo, así Oberhuber G et al (143) observaron un aumento significativo de los linfocitos intraepiteliales, durante la fase temprana del rechazo (5º día del postoperatorio).

Otro método de diagnóstico de rechazo en el trasplante de ID en ratas, lo constituye, según Grover R et al (60), la presencia de células huésped en el compartimento intraepitelial, al que considera un signo específico. También afirman que la identificación de células huésped en la lámina propia, no es necesariamente signo de rechazo.

Otra forma de detección histológica del rechazo de ID , puede ser el análisis de la distribución "in situ" de linfocitos en fase S, según estudios realizados por Okamoto M et al en 1994, en ratas (144).

En la misma línea, se encuentran las experiencias de Uff CR et al en 1994 (212), los cuales sugieren para detectar el rechazo en el trasplante de ID de ratas, la medición de linfocitos CD4 en los enterocitos.

Jhonson C et al (92), utilizan la determinación de hialuronidasa en la lámina propia del tejido trasplantado, para determinar si existe rechazo; observando que este componente del tejido conectivo presenta aumentos significativos, 15 veces el valor normal, entre el 2º y 6º día del rechazo.

La necesidad de hallar un método de monitorización menos cruento, ha llevado a investigar distintos marcadores serológicos para esta situación.

Las pruebas funcionales y de absorción, junto a los posibles marcadores serológicos del rechazo, están siendo ensayados con el propósito de constituir una alternativa válida a la histología.

Entre estas pruebas se puede señalar la de la absorción de la Maltosa, la cual para ser absorbida debe ser desdoblada en glucosa, por acción de una enzima, la maltasa, que se encuentra en el borde en cepillo. La glucosa resultante, una vez absorbida, producirá un aumento en su nivel sanguíneo, bioquímicamente detectable (17).

Otra prueba es el test de tolerancia a la glucosa. Billiar TR et al (17) sugieren esta determinación como un método reproducible, sencillo y sensible para monitorizar el rechazo.

También han sido propuestas para su medición la absorción del agua, sodio y alanina como marcadores. Todas estas sustancias precisan de un transporte activo a través de la mucosa, encontrándose descensos significativos en su absorción, cuando se presentaban los primeros cambios histológicos de rechazo.

Existe otra prueba, la permeabilidad al Cr⁵¹EDTA, que es un marcador isotópico que aumenta durante el rechazo. Se han detectado incrementos en 2 veces su valor, cuando los signos histológicos de rechazo son aún mínimos. La determinación de Cr⁵¹EDTA en la orina es una medida de la permeabilidad intestinal, que puede permitir la detección y tratamiento de un episodio de rechazo (54).

La medición de la actividad procoagulante de los monocitos y macrófagos, es índice de la activación inmune de las células mononucleares. Han sido observadas elevaciones en los niveles de células mononucleares en sangre periférica, antes de que se detectaran los cambios histológicos correspondientes al rechazo del injerto. (96).

Otro posible marcador es el ácido N-acetil hexosaminidasa (NAH) contenido en los lisosomas, que se muestra elevado en suero cuando se produce una situación de isquemia

intestinal, de forma que, esta determinación sencilla y rápida puede ser introducida para detectar el rechazo del injerto; sin embargo, Meijssen MAC et al (127) en sus investigaciones realizadas con perros, comprobaron que cuando este aumento era significativo, ya se habían producido los cambios histológicos.

Han sido estudiadas las diferencias de potencial transepitelial, para establecer su valor como herramienta diagnóstica en la detección temprana del rechazo. La diferencia de potencial sería expresión del transporte activo basal, resultante de la absorción electrogénica del sodio y la liberación de cloruros.

La naturaleza invasiva de este método, hace que su uso sea mínimo en la práctica clínica.

Meijssen MAC et al (128) modificaron este método para que no fuera tan invasivo, utilizaron un catéter de doble balón, insertándolo en una enterostomía, y aislando un lazo de intestino en el que se realizan las mediciones electrofisiológicas. Apreciaron una reducción en la diferencia de potencial, en el caso de rechazo, que precedía a los cambios degenerativos de la mucosa del injerto. Otra observación, obtenida por seguimiento de injertos intestinales en perros, fue la correlación existente entre los parámetros electrofisiológicos y las alteraciones ocurridas durante un rechazo agudo.

Otra vía a seguir, en la búsqueda de marcadores del rechazo, será la de los Ac.monoclonales, que suponen una expectativa con futuro en el campo del diagnóstico serológico precoz y específico.

3.3. PRESERVACIÓN DE ÓRGANOS

La conservación de cualquier tejido u órgano es un punto fundamental, para llevar a buen término cualquier intervención de trasplante.

El almacenaje o mantenimiento de este órgano ha debido ir mejorando ya que las técnicas quirúrgicas así lo hacían, precisando el apoyo de una mejor preservación. El fin último de este proceso es conservar la funcionalidad y viabilidad de este órgano "ex vivo", es decir, fuera del donante, durante un período de tiempo suficiente, que permita lograr los siguientes objetivos:

- Localizar al receptor compatible.
- Transportar el órgano al centro donde se va a realizar el trasplante.
- Conseguir una buena funcionalidad del mismo, una vez trasplantado (185).

La práctica del trasplante fue iniciada con el riñón, que al ser un órgano doble, permite que uno de ellos supla la función del otro. Esto llevó a un conocimiento más profundo de dicho órgano. A finales de 1960, dos estudios demostraron que la preservación de los riñones era un hecho factible, por un lado las investigaciones de Collins GH et al en 1969 (39), que consiguieron la conservación durante 30 horas por almacenamiento en frío, y por otro las de Belzer y Southard en 1967 (13), los cuales lograron el mantenimiento durante 72 horas, bajo perfusión continua.

Estos dos trabajos cambiaron el concepto del trasplante de riñón, paso de ser una situación de alta emergencia a la posibilidad de un procedimiento semiprogramado.

Con los años se han ido mejorando las condiciones de almacenaje, experimentándose con distintas soluciones de preservación, pero continúan los estudios, ya que sigue presentándose un cierto déficit funcional, como consecuencia de la isquemia/reperfusión sufrida por el órgano.

3.3.1. Técnicas de Preservación.

A lo largo de los años han ido desarrollándose distintas técnicas de preservación, todas ellas encaminadas a mantener la integridad de la víscera a trasplantar.

Podemos distinguir dos tendencias :

- La perfusión continua normotérmica, que consiste en restaurar las condiciones fisiológicas del órgano resecado, tan pronto como sea posible.

- La utilización de bajas temperaturas, con el fin de minimizar en lo posible la lesión del órgano, disminuyendo su metabolismo. En este principio se basan: la perfusión continua hipotérmica pulsátil o no pulsátil y la perfusión simple con almacenamiento hipotérmico.

Perfusión Continua Normotérmica.

Tiene como propósito el mantener al órgano en condiciones, lo más fisiológicas posibles. A priori, constituye un método idóneo, pero tiene la desventaja de la mala tolerancia de un órgano frente a la isquemia cuando la temperatura es alta, acelerándose su lesión. La isquemia caliente tiene peores consecuencias sobre un tejido que la isquemia fría.

Un órgano cuando se extrae sufre una disminución de temperatura, a razón de 1°C por minuto, estabilizándose cuando alcanza los 22°C. Este enfriamiento se acompaña de un descenso en el funcionalismo del órgano, y tras una hora aproximadamente de isquemia caliente los daños son ya irreversibles (185). Estas circunstancias llevan a considerar necesaria la hipotermia en la conservación de órganos.

Perfusión Continua Hipotérmica.

La ventaja de esta técnica reside en que al disponer de un oxigenador, permite prolongar el tiempo de conservación. Tiene como inconvenientes el ser de difícil manejo y suponer un aumento en el riesgo de contaminación, al ser la manipulación mayor; también pueden producirse lesiones endoteliales como consecuencia del bombeo mecánico.

Otra desventaja, es la de precisar ir renovando el líquido de perfusión, aumentando la manipulación (133).

Almacenamiento Hipotérmico tras Perfusión inicial Simple.

Éste es el método de mayor sencillez y menores complicaciones.

La hipotermia produce una disminución de las necesidades energéticas del órgano, del consumo de oxígeno y de su metabolismo, lo que lleva a un menor acúmulo de sustancias tóxicas en el mismo. Aunque esta técnica conlleva una disminución del metabolismo basal del órgano, no dejan de producirse ciertas alteraciones en el funcionamiento del mismo, así, la disminución de energía conduce a un mal estado de la bomba Na^+/K^+ , con una defectuosa distribución de los iones y del agua en los espacios intra y extracelular (120), produciéndose ciertas variaciones en su fisiopatología, como son:

- Aumento del Ca^{++} intracelular, lo cual conduce a una activación de las fosfolipasas A y C de la membrana celular, con el consiguiente desdoblamiento de fosfolípidos. Se altera la permeabilidad celular con liberación de ácidos grasos, produciéndose una serie de reacciones bioquímicas, que conducirán a la formación de sustancias vasoactivas que trastornan la dinámica capilar y su permeabilidad (179).

- Producción de radicales libres de oxígeno, durante la reperfusión del órgano, que resultan gravemente nocivos para el mismo (140,185).

- Activación de la vía anaerobia para consumo de la glucosa, con la consiguiente acidosis derivada del acúmulo de ácido láctico, inestabilidad lisosomal y alteraciones mitocondriales (76).

- Edema celular, aunque este hecho parece depender más del tiempo de almacenaje que de la hipotermia en sí.

Dentro de la utilización de bajas temperaturas, se podría tomar en consideración la congelación como técnica de larga conservación, junto con una perfusión aeróbica continua (14), pero con este método no se han podido evitar todavía los daños producidos en el endotelio vascular, que hacen al órgano funcionalmente irrecuperable.

Existen dos métodos de aplicación clínica para la preservación de órganos en hipotermia:

1- Simple almacenamiento en frío, con soluciones de preservación.

2- Perfusión continua, con fluidos a una temperatura de entre 6 y 10°C.

La elección de una técnica u otra por un centro de trasplantes dependerá de ciertos factores como: la sencillez de la técnica, la preparación de su personal, el coste económico, el número de trasplantes que se realicen, el tiempo de preservación precisado para la práctica de los mismos y el tipo de órgano comprometido.

3.3.2. Alteraciones fisiopatológicas producidas en el órgano durante la preservación.

Isquemia caliente.

La isquemia caliente se refiere a la interrupción del flujo sanguíneo de un tejido u órgano en condiciones fisiológicas, sin ser sometido a la acción del frío. El daño producido en el órgano durante la isquemia caliente, se inicia con la pérdida de ATP, consecuencia de la falta de oxígeno. Al recurrir el metabolismo celular a la glucólisis anaerobia se produce un acúmulo de ácido láctico y de otros metabolitos con carácter ácido (Figura 3). Esta situación acarrea una disminución del pH intracelular, que va a estimular la actividad lisosomal, con liberación de enzimas que van a dañar a la célula, por digestión de ciertas estructuras, dificultando de esa forma su viabilidad.

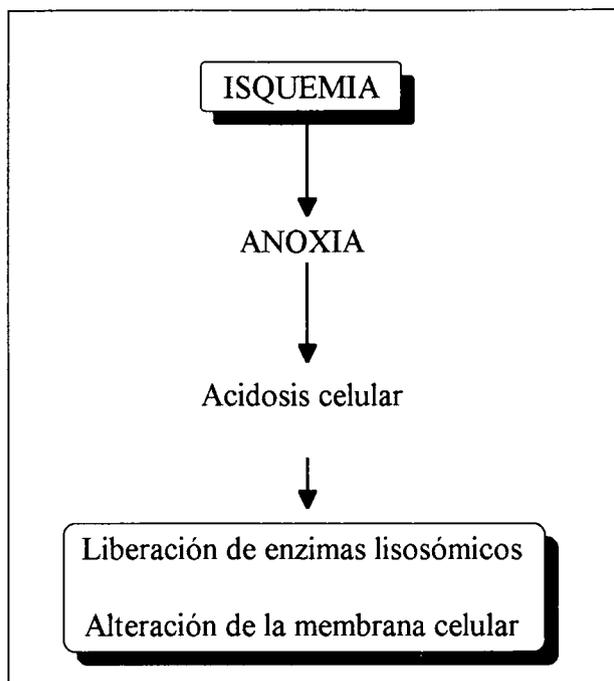


Fig.3: Alteraciones celulares debidas a la glucólisis anaerobia

La célula va a sufrir alteraciones en su potencial de membrana, con aumento de su permeabilidad. Esto provoca una entrada de Na^+ , H_2O y Ca^{++} al interior de la célula, con salida de K^+ . También hay una liberación de Ca^{++} desde las mitocondrias y retículo endoplásmico al citosol, aumentando la alteración de la homeostasis iónica celular. La isquemia caliente lleva consigo una pérdida acelerada de la actividad mitocondrial (Fig.4).

Las modificaciones en la microcirculación presentan características especiales; se produce un colapso parcial de la circulación, sólo se obliteran pequeñas arterias y arteriolas, cuando la presión interna es inferior a la presión crítica de cierre, permaneciendo la sangre en capilares y sistema venoso.

Los hematíes se vuelven más rígidos al disminuir su deformabilidad.

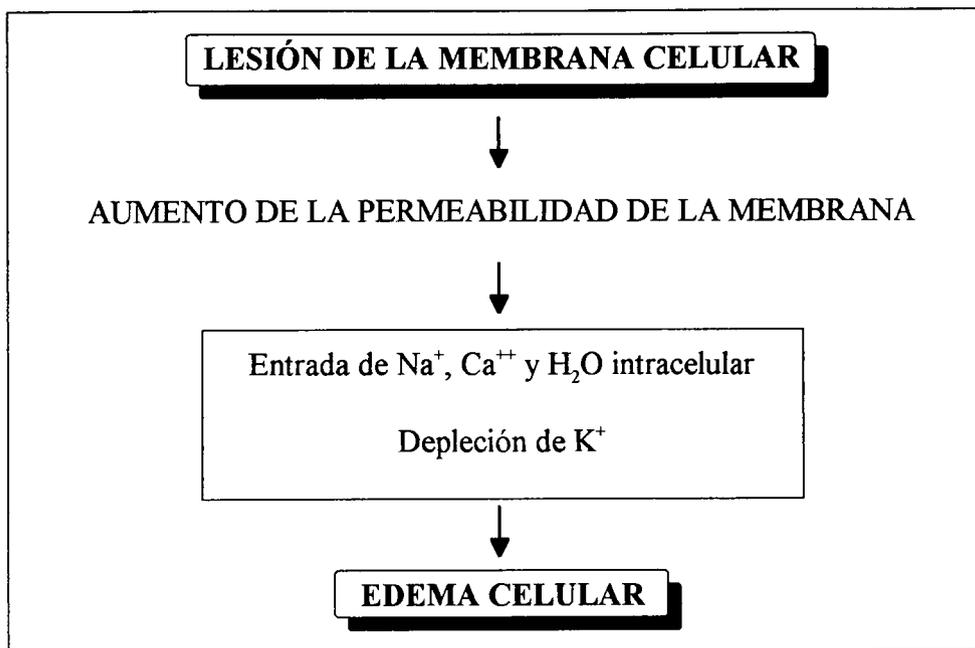


Fig. 4: Producción de edema celular por alteración de la membrana.

Todos estos factores unidos hacen que la revascularización del órgano sea más difícil a medida que aumenta la duración de la isquemia, constituyendo el denominado "fenómeno de no reflujo" (76). Otro hecho que tiene lugar, es una respuesta neuroendocrina a la agresión, con incremento de los niveles plasmáticos de catecolaminas y alteración del efecto de la insulina, glucagón y corticoides (31). Durante el proceso de la isquemia reperfusión se producen alteraciones mitocondriales que conllevan graves disturbios iónicos (Fig.5).

Isquemia Fría.

La isquemia fría se refiere a la extracción y conservación de un tejido u órgano, mediante soluciones de perfusión o preservación a bajas temperaturas.

Durante esta isquemia también se produce depleción de ATP y acidosis intracelular, sin embargo, aquí tienen una acción relativamente protectora.

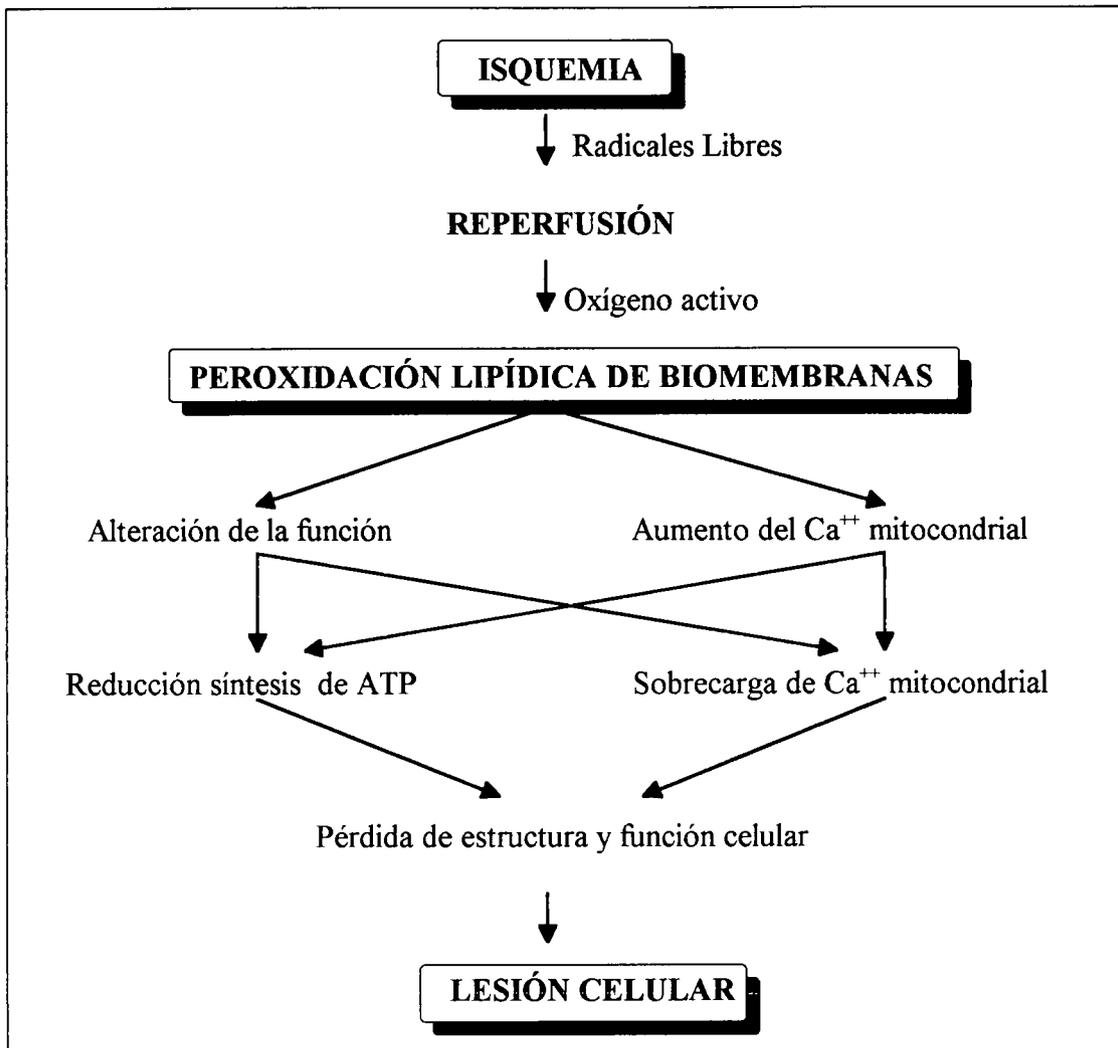


Fig.5: Alteraciones mitocondriales e iónicas tras la I/R de un órgano.

La isquemia fría evita ciertas reacciones, que se producen en el transcurso de la isquemia caliente, las cuales son causa del efecto nocivo de la isquemia caliente sobre el órgano, al que hace perder viabilidad.

Con la hipotermia disminuye el metabolismo orgánico y, por consiguiente, sus necesidades energéticas, pero siguen produciéndose alteraciones celulares. Se producen trastornos a nivel mitocondrial, comprometiendo su función respiratoria. Parece ser que esto es debido a

la lipoxidación que sufre la membrana, lo cual provoca una sobrecarga en el contenido mitocondrial de Ca^{++} .

Durante la hipotermia se produce una alteración en el metabolismo energético celular, ya que actúa sobre la mitocondria modificando su ritmo normal de síntesis de adenosin trifosfato (ATP), al interferir el intercambio de adenosin difosfato (ADP) intracelular con el ATP extracelular. Esta acción se ejerce al disminuir, durante el enfriamiento, el ritmo catalizante del enzima encargado de esta traslocación, con esto desciende la fosforilización oxidativa y por tanto la producción de ATP.

Al ser insuficiente la síntesis de ATP, se produce un acúmulo de ADP. La célula responde convirtiendo 2 moléculas de ADP en una de ATP y una de AMP.

El incremento de AMP estimula ciertas reacciones catabólicas que llevan a la transformación del AMP en purinas (adenosina, inosina e hipoxantina), las cuales al estar la permeabilidad alterada, saldrán al exterior de la célula, por lo que ésta quedará pobre en estos componentes necesarios para la formación de fosfatos de alta energía, durante la reperfusión.

- Disminución de ATP.
- Aumento de ADP.
- Producción de AMP. Degradación en Purinas.
- Escasez de precursores de ATP durante reperfusión.

Otro hecho producido durante la hipotermia es la alteración del normal funcionamiento de la bomba Na^+/K^+ celular:

- *1ª Fase.* Entrada de Na^+ al interior de la célula con salida de K^+ . Permanece conservada la osmolaridad celular.

- 2ª Fase. Entrada de Cl⁻ al citoplasma, acompañado de Na⁺. Esta situación lleva a un aumento de la osmolaridad celular, produciendo un gradiente que favorece la entrada de agua y por tanto el edema celular.

La isquemia, incluso en frío, favorece la glucólisis y glucogenólisis, lo que supone un incremento en la concentración de ácido láctico y de hidrogeniones, provocando una situación de acidosis celular. En este proceso participan las elevadas cifras de Ca⁺⁺ intracelular, procedente tanto del exterior, por la pérdida del potencial de membrana, como del interior, debido a la producción mitocondrial.

El aumento en la concentración de Ca⁺⁺ activa las fosfolipasas AyC, que transforman los componentes fosfolipídicos de la membrana en ácidos grasos libres, aumentando la concentración de hidrogeniones.

La acidosis celular tiene características diferentes según el órgano referido, así la capacidad de producción de hidrogeniones es mayor en el hígado que en el riñón. Para su conocimiento, ha de tenerse en cuenta la acción de los enzimas que intervienen en la degradación anaeróbica de la glucosa, en cada órgano. Se puede resaltar el papel de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH), la cual a nivel renal, cesará su acción cuando se alcance un pH bajo o una concentración elevada de ácido láctico, esta inhibición no se produce a nivel hepático, de forma que seguirá actuando y produciendo ácido láctico aunque siga la acidosis (14).

Otro fenómeno que tiene lugar durante la preservación, es la producción de radicales libres de oxígeno, como en cualquier caso de isquemia, aunque no se sabe con certeza el efecto que la propia preservación ejerce sobre la formación de los radicales y su potencial nocivo, que depende del órgano preservado. McCord JM (126) observó que en pulmón e intestino, el daño producido por los radicales es notable, mientras que en el caso de hígado y riñón su

papel es menor, por la elevada actividad, en estos últimos, de la enzima superóxido dismutasa (185).

En el transcurso de la isquemia fría, se van a producir también alteraciones a nivel endotelial, con aumento de la permeabilidad vascular y adelgazamiento de la membrana basal, que inducen a procesos trombogénicos.

El aumento de la permeabilidad endotelial produce expansión del espacio intersticial, favoreciendo el colapso de la microvasculatura.

La isquemia estimula la agregación plaquetaria y la formación de microtrombos, que pueden conducir al desencadenamiento de una "coagulación intravascular diseminada", con grave peligro para el trasplante.

3.3.3. Soluciones de Preservación

Son muchas las soluciones de preservación que han venido utilizándose con la intención de conservar al máximo la funcionalidad de los órganos, minimizando en lo posible los daños causados por las alteraciones iónicas que se producen a nivel celular.

El primer investigador en desarrollar una solución de preservación, fue Collins GH en 1969 (39), con una composición iónica que imitaba la del medio intracelular; ésta se caracteriza por su elevada concentración en K^+ y Mg^{++} y su escasez de Na^+ .

A pesar del propósito fisiológico de esta solución, no logra evitar completamente el edema celular.

Posteriormente surgen las soluciones hiperosmolares, que muestran en su contenido glucosa a elevadas concentraciones, para proporcionar una sobrealimentación a la célula, también contienen manitol y citrato con la intención de rebajar el edema celular .

Los objetivos de cualquier solución de preservación son:

- Impedir los trastornos iónicos intracelulares y, por tanto, el edema celular. Para ello deben presentar una composición electrolítica semejante al medio intracelular (sol. de Collins, fracción proteica del plasma, sol. de Wisconsin) o bien soluciones hiperosmolares, con elevado contenido de azúcares como glucosa, sacarosa, citrato, manitol (sol. de Sacks).

- Evitar las consecuencias de la acidosis metabólica que provoca la anoxia. Con esta finalidad surgen las soluciones con pH alcalino, como la sol. de Wisconsin, que sustituye la glucosa por un trisacárido de alto peso molecular, la rafinosa, para no utilizar la vía de la glucólisis anaerobia.

Existe un gran interés en desarrollar una solución de preservación universal, útil para todo tipo de órganos, y que sirva tanto para ser utilizada "in situ" al enfriar el órgano en el donante, como para el almacenamiento en frío, cuando el órgano ya ha sido extraído.

Para el diseño de esta solución se han de integrar los principios de la isquemia anaeróbica hipotérmica, con los principios del metabolismo específico de cada órgano.

Principios de la Isquemia Anaeróbica Hipotérmica:

El enfriamiento y la perfusión aeróbica continua son, teóricamente, los únicos medios para obtener una preservación a largo plazo.

El almacenamiento simple en frío, ofrece un tiempo límite, a partir del cual, un órgano ya no es viable.

La hipotermia, clave esencial para una buena preservación, disminuye la velocidad a la que los enzimas intracelulares degradan los componentes esenciales para la supervivencia del órgano. El procedimiento hipotérmico no detiene el metabolismo, sino que lo ralentiza.

La mayoría de los órganos toleran una isquemia caliente durante 30-60 minutos, sin pérdida completa de su función. El enfriamiento de un órgano de 37°C a 0°C puede alargar la preservación a 12-13 horas.

Calne RY et al (22) demostraron en 1963, que el simple enfriamiento de riñones isquémicos, preservados en sangre fría, consigue conservar el funcionamiento hasta 12 horas.

Collins GH et al (39) en 1969, consiguieron multiplicar este tiempo de preservación hasta 30 horas, al perfundir estos riñones con una solución apropiada. El fallo de esta solución radica en que no funciona tan bien con otros órganos como páncreas, hígado o corazón, posiblemente debido a las diferencias metabólicas específicas de cada órgano.

La composición de una solución de preservación, como ya se ha apuntado, debe cumplir una serie de requisitos:

- Minimizar el edema celular inducido por la hipotermia.
- Prevenir la acidosis celular.
- Prevenir la expansión del espacio intersticial, durante el período de reperfusión.
- Prevenir la lesión ocasionada por los radicales libres de oxígeno, especialmente durante la reperfusión.
- Proporcionar los sustratos necesarios para la regeneración de los fosfatos de alta energía, al reinstaurarse la circulación.

El mecanismo del edema celular, inducido por la hipotermia ha sido documentado por autores como MacKnight ADC en 1972 (118).

En condiciones normales, las células están bañadas por una solución extracelular rica en Na⁺ y pobre en K⁺. Esta relación es mantenida por la bomba Na/K, la cual consume mucha energía (adenosin trifosfato), derivada de la fosforilización oxidativa.

La bomba Na / K es la encargada de mantener el equilibrio osmótico entre el interior y el exterior de la célula, contrarrestando la presión osmótica coloidal, derivada de las proteínas intracelulares y de otros aniones impermeables, mediante la salida de Na^+ al exterior.

La preservación anaeróbica hipotérmica dificulta la actividad de esta bomba y disminuye el potencial de membrana plasmática, como consecuencia, penetran en la célula Na^+ y Cl^- , por un gradiente de concentración, provocando un edema celular por acúmulo de agua (Fig.6)

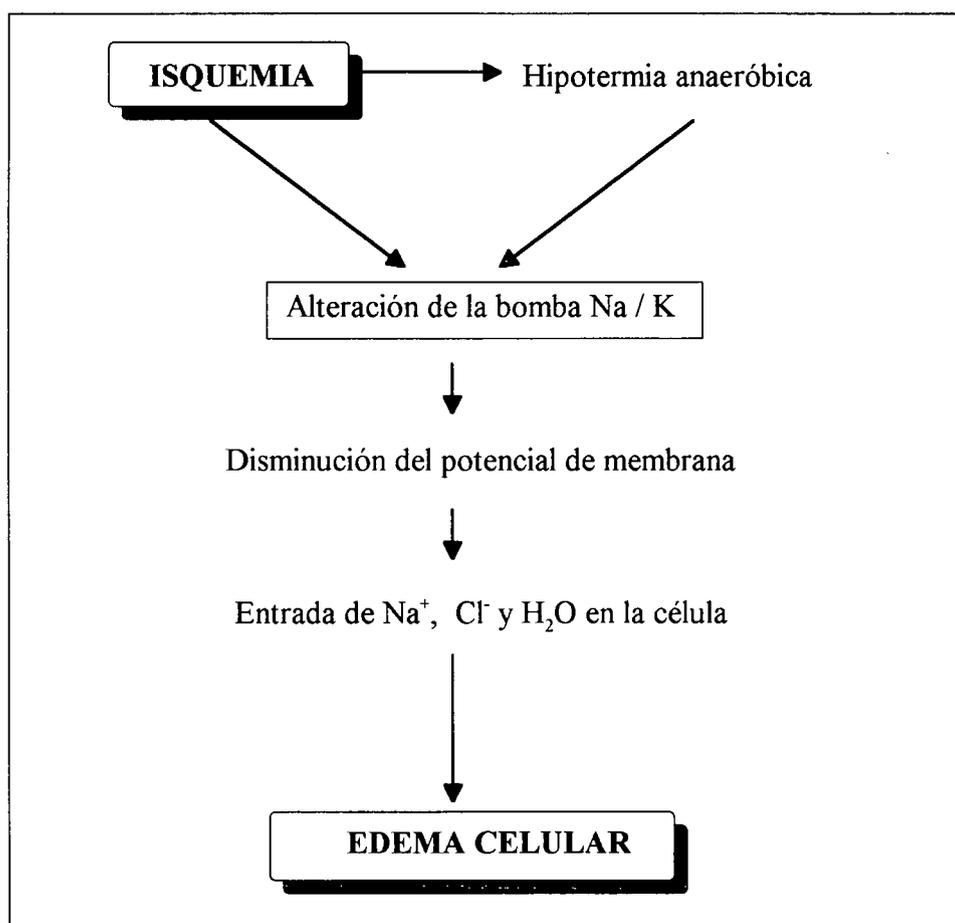


Fig.6: Alteraciones celulares producidas durante el proceso de hipotermia anaeróbica.

Con la intención de contrarrestar este edema, las soluciones de preservación contienen sustancias que actúan como impermeabilizantes, tal es el caso de la glucosa en la solución de Collins.

Otra consideración importante para conseguir una buena preservación en frío, es la prevención de la acidosis intracelular. La isquemia, incluso en frío, estimula la glucólisis y glucogenólisis. Esta situación lleva a un incremento en la producción de ácido láctico y en la concentración de hidrogeniones. La acidosis puede dañar a la célula, e inducir una inestabilidad lisosomal, activando los enzimas lisosomiales y alterando las mitocondrias (Fig. 7).

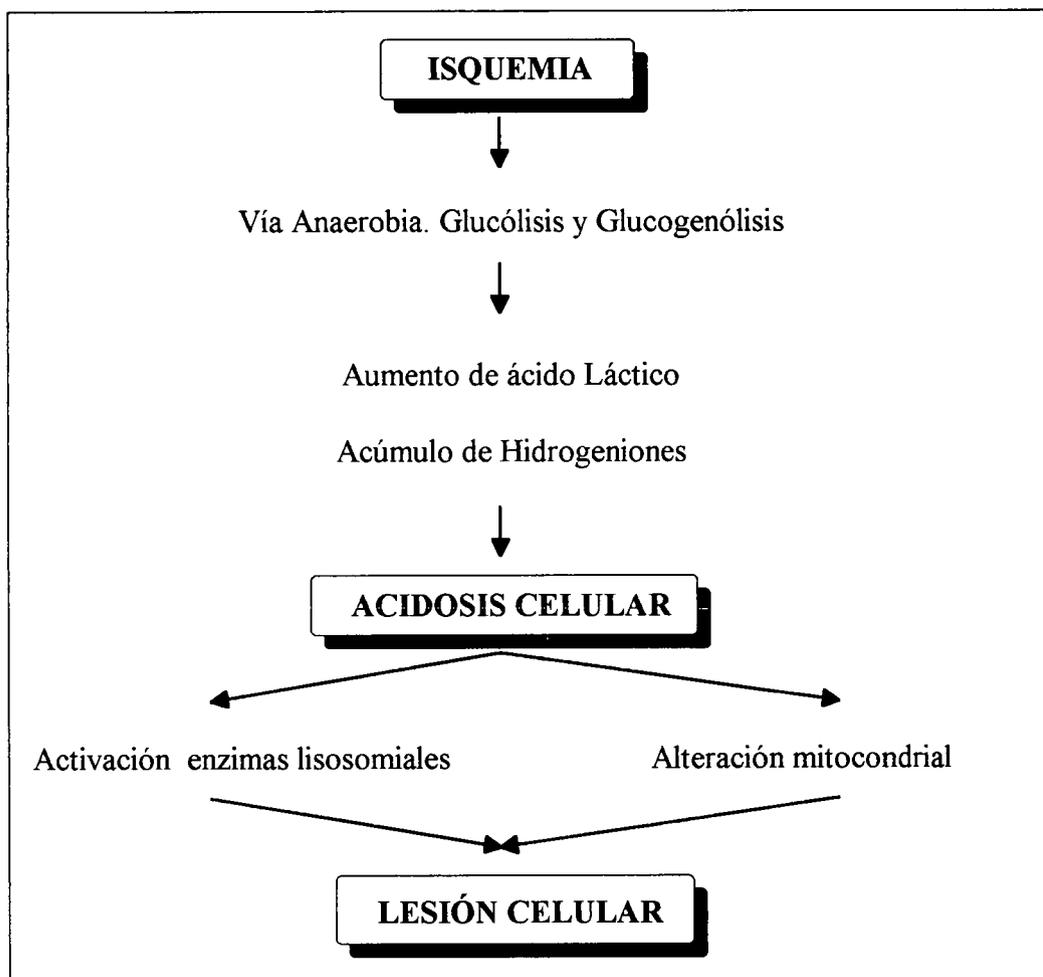


Fig. 7: Proceso de producción de la lesión celular, consecuencia de la acidosis anaeróbica.

El evitar la acidosis celular es pues, un importante requisito para una buena preservación. Hay trabajos de investigación que muestran la efectividad de la utilización de soluciones de preservación o de perfusión, con un pH alcalino, lo que les confiere una acción tampón (113).

Una solución de preservación efectiva también debe prevenir la expansión del espacio intersticial, que tiene lugar durante la perfusión del órgano en el donante y tras la extracción del mismo. Esta expansión puede comprimir los capilares y llevar a una mala distribución de la solución de preservación por los tejidos.

La solución de preservación y de perfusión ideales deberían contener sustancias que crearan una presión osmótica suficiente, permitiendo el libre intercambio de los componentes esenciales de la solución de perfusión, sin expandir el espacio intersticial.

Otra consideración importante, para la efectividad de la solución de preservación, es la de impedir la formación de los radicales libres de oxígeno durante la reperfusión. Southard JH et al (185), en un trabajo publicado en 1987, sugieren que el papel de estos radicales varía según el órgano referido, así en el hígado y riñón humanos sería de poca importancia, debido a que la xantina oxidasa endógena es de baja actividad, si se la compara con la alta actividad de la superóxido dismutasa endógena, la cual actúa como aceptora de aniones superóxido.

Por el contrario, la lesión producida por estos radicales en pulmón e intestino puede ser extremadamente importante (126).

Otro punto a tener presente es el funcionamiento del metabolismo energético. La célula obtiene la energía para su metabolismo de los fosfatos de alta energía como el adenosín trifosfato (ATP), el cual se degrada rápidamente durante el almacenamiento hipotérmico; de su degradación resultan metabolitos finales como adenosina, inosina e hipoxantina; con este proceso se van consumiendo pues estos fosfatos, de manera que, en el momento de la reperfusión, en el que es necesaria la rápida regeneración de la bomba Na/K, para cuyo funcionamiento se precisa tanta energía, ocurre que la célula no ha podido reponerse y no posee suficientes precursores para la formación de estos fosfatos. Esto lleva a sugerir la necesidad de que una buena solución de preservación contenga en su composición precursores de este ATP,

Metabolismo órgano-específico.

Al diseñar o utilizar una solución de preservación se ha de tener en cuenta el órgano al que se va a aplicar, ya que existen notables diferencias en el metabolismo de los distintos órganos, como riñón, hígado y páncreas. Estas diferencias van a influir en la preservación de los mismos.

Un ejemplo de estas diferencias metabólicas, la tenemos en la acción impermeabilizante de determinadas sustancias, presentes en algunas soluciones de preservación.

Para impedir el edema celular, se necesita un impermeabilizante efectivo, que proteja a la membrana. La glucosa, que es el impermeabilizante presente en mayor cantidad en la solución de Collins, no es útil para el hígado o el páncreas, penetrando rápidamente en sus células, sin embargo es eficaz en la preservación renal (217).

Otra sustancia utilizada como impermeabilizante es el manitol, que tampoco resulta útil en la preservación hepática, por lo tanto, aquellas soluciones que se apoyan en la glucosa o en el manitol para ofrecer una acción impermeabilizante, no son válidas para la conservación del hígado o páncreas.

La acidosis celular, resultante de la glucólisis, difiere según el órgano del que se trate. El hígado es capaz de producir mayor cantidad de hidrogeniones que el riñón, debido a la gran cantidad de glucógeno que contiene almacenado y a la gran permeabilidad de su membrana plasmática frente a la glucosa, la cual se metaboliza rápidamente pasando a lactato con acúmulo de hidrogeniones.

Esta es la razón de que las soluciones de preservación que contienen glucosa (sol. Collins), no son convenientes para el hígado, ya que por un lado no actúa como impermeabilizante y por otro puede incrementar la acidosis.

Clasificación de las soluciones de preservación según su osmolaridad:

1- Soluciones Isotónicas:

- Sol. de Sucrosa fosfato tamponada (PBS).
- Sol. de Hartman.
- Sol. de Collins.
 - Sol. Eurocollins.
 - Sol. Collins 1.
 - Sol. Collins 2.
- Sol. de Fracción proteica del plasma (PPF).
- Sol. de Universidad de Wisconsin (UW).

2- Soluciones Hipertónicas:

- Sol. de Ross-Marshall citrato hipertónica.
- Sol. de Sacks.
 - Sacks I
 - Sacks II.
- Sol. de Toledo-Pereyra.
 - Toledo-Pereyra I
 - Toledo-Pereyra II.
- Prostaciclina.

3.3.4. Fármacos destinados a la conservación y preservación de órganos.

Con el propósito de prolongar el tiempo de preservación y de mejorar el

mantenimiento de los órganos, minimizando en lo posible las lesiones celulares, se ha ido variando la composición de estas soluciones, la proporción de sus componentes, añadiendo o sustituyendo algunos de ellos, o incluso sumándoles diversos agentes farmacológicos, que por su actividad pueden de alguna forma disminuir los efectos nocivos de la isquemia sobre el órgano.

Estos fármacos utilizados pueden ser añadidos a las soluciones de preservación, o bien, ser administrados como pretratamiento.

La finalidad de estas nuevas aportaciones será:

- Disminuir el catabolismo del ATP o aportar precursores del AMP, para inducir la regeneración del ATP.

- Adenosina
- Inosina
- ATP-MgCl₂

Cronstein BN et al (41) demostraron que la **Adenosina** y sus análogos inhiben el O₂ generado por los neutrófilos. Estos agentes interfieren la acción de los linfocitos por interacción con una adenosina A₂, que es un receptor de superficie.

Este mismo equipo de trabajo comprobó que la 2-cloroadenosina es un potente receptor agonista de la adenosina, que inhibe la liberación de H₂O₂ por los neutrófilos.

Hay diversos estudios que demuestran la acción beneficiosa del **ATP-MgCl₂**, entre ellos podemos citar los siguientes:

Hirasawa H et al (80) en sus investigaciones expusieron las ventajas de administrarlo, para mejorar la permeabilidad de la membrana celular, disminuyendo de esta forma el edema.

Chaudry IH et al (30) demostraron, que ejercía una acción beneficiosa, al mejorar la circulación y también al preservar la función mitocondrial.

Wang P et al (218) realizaron isquemias experimentales en ratas a las que administraron este fármaco, consiguiendo una mejor restauración del flujo sanguíneo hepático y renal. También observaron con este tratamiento una disminución de los niveles del factor de necrosis tumoral (TNF) y de interleukina-6 (IL-6) circulantes. Tanto el TNF como la IL-6 son citoquinas de carácter inflamatorio, que se encuentran aumentadas significativamente en los casos de cirugía orgánica, procesos inflamatorios agudos, sepsis y shock.

Estas citoquinas reducen el flujo sanguíneo, pudiendo provocar shock por depresión hemodinámica severa y disfunciones a nivel celular. En este punto se puede incluir el efecto de la Pentoxifilina, que suprime la síntesis de TNF, facilitando la restauración del flujo sanguíneo, al disminuir la liberación de éste y otras citoquinas, que colaboran en la depresión hemodinámica del órgano sometido a cirugía (218).

- Estimular la función respiratoria mitocondrial.

- Insulina

- Coenzima Q10 (CoQ10)

Durante la isquemia normotérmica y la caliente, las mitocondrias hepáticas se deterioran rápidamente, perdiendo capacidad respiratoria y produciéndose una liberación de enzimas intracitoplásmicos desde la mitocondria y aparato de Golgi (26).

Las experiencias de Marubayashi S et al (122) utilizando **CoQ10** en isquemia hepática practicada en ratas, demostró que esta sustancia les producía una mejoría en la función respiratoria mitocondrial. Este agente actúa durante la reperfusión, evitando el proceso de peroxidación lipídica, al proceder como aceptor de los radicales libres de oxígeno.

La CoQ10 es un constituyente de la mitocondria, siendo indispensable para la producción de ATP, por esta organela.

Matsusaka C et al (125) reflejaron en sus estudios cómo la administración de CoQ10 estimula la regeneración del ATP durante la reperfusión, siguiente a la isquemia hepática y renal en ratas; también demostraron su acción beneficiosa en la regeneración energética y en la supervivencia de ratas sometidas a trasplante de intestino delgado.

- Estabilizar la membrana lisosómica limitando la liberación de enzimas hidrolíticas.

- Clorpromacina
- Prostaciclina
- Fenoxibenzamina
- Glucocorticoides

Wattiaux R et al (219) comprobaron el efecto beneficioso de la **clorpromacina**, al prevenir la liberación de los enzimas lisosomiales, que conlleva la isquemia.

Los investigadores Monden M y Fortner JG (133) constataron la preservación de hígados caninos, durante 24 y 48 horas, sólo mediante hipotermia y la adición de **prostaglandinas**.

Suzuki S et al (192) comprobaron el efecto beneficioso de la prostaglandina I₂, en el pretratamiento de la isquemia caliente, practicada en hígado de ratas. Los resultados mostraron en el grupo que recibió el tratamiento, una disminución significativa en los niveles de aspartato aminotransferasa en suero y de malonildialdehído en tejido, con respecto al grupo control.

La prostaglandina I₂ presenta unas actividades biológicas muy interesantes, incluyendo prevención de agregación plaquetaria, vasodilatación, estabilización de la membrana lisosomal, incremento del flujo sanguíneo en el área esplácnica, e inhibición de la liberación de tromboxanos por las plaquetas.

El modo de acción de los **corticoides** en la lesión por I/R, no está bien definido, pero se piensa que estabilizan la membrana subcelular y celular (76). También se les atribuye la capacidad de disminuir la resistencia periférica y de incrementar la tensión de oxígeno, lo que supone una mejoría de la microcirculación y la aceptación de los radicales libres (25).

- Proteger las membranas intracelulares del proceso de peroxidación lipídica.

- Coenzima Q10

- Prevenir las lesiones celulares inducidas por la liberación de enzimas lisosómicos.

- Inhibidores de proteasas.

- Disminuir la permeabilidad de la membrana celular, frente a los iones de Na⁺ en isquemia fría.

- Isoproterenol

El **isoproterenol** es un estimulador β-adrenérgico, con una acción primaria sobre corazón y músculo liso. Su actividad protectora durante la isquemia hepática, puede ser atribuida a la dilatación postsinusoidal y a la prevención del fenómeno de no reflujo producido tras la I/R (161).

Toledo-Pereyra LH et al (203) utilizaron la combinación de dosis masivas de heparina, alopurinol e isoproterenol, inmediatamente antes de someter a los animales de

experimentación a una isquemia hepática. Con este tratamiento combinado lograron largos períodos de supervivencia, aunque la necrosis hepática y la oclusión vascular tardía causaron la muerte.

- Impedir la entrada incontrolada de Calcio en la célula, estabilizar el calcio intracelular e inhibir sus efectos nocivos (generación de radicales libres de O₂, catabolismo de fosfolípidos de membrana y reducción de la fosforilización oxidativa mitocondrial)

- Clorpromacina

- Trifluoperazina

- Bloqueantes de los canales lentos del calcio:

Verapamil

Nicardipina

Nifedipina

Diltiazem

- Coenzima Q10

La **trifluoperazina** es un inhibidor de la calmodulina y muestra efectos beneficiosos sobre la microcirculación de los riñones conservados en frío.

Con esta premisa Anaise D et al (3) en 1990 ensayaron la preservación de hígados de perros, a los que conservaba en frío con solución Euro-Collins (EC), solución Universidad de Wisconsin (UW), o con solución UW + trifluoperacina. Posteriormente dichos hígados fueron trasplantados. Se monitorizaron la presión de la arteria hepática y de la vena portal, el consumo y la extracción de O₂.

Los resultados obtenidos demostraron que en el tercer grupo la recuperación del flujo hepático postrasplante era significativamente mayor. La restauración de la actividad

metabólica, expresada por el consumo y extracción de O_2 , también fue mucho mayor en este grupo.

De esta forma, la trifluoperazina muestra una excelente acción protectora de la microcirculación hepática.

- Evitar la formación de radicales libres de oxígeno y favorecer su degradación.

- Alopurinol: inhibe la enzima xantino-oxidasa, impidiendo la síntesis de O_2^- .
- Superóxido dismutasa: interviene en la dismutación de O_2^- a H_2O_2 .
- Catalasa: participa en la reducción de H_2O_2 .
- Antioxidantes: glutatión, ácido ascórbico, α -tocoferol. Impiden la peroxidación y la formación de radicales libres de oxígeno.
- Naloxona: acepta radicales libres producidos por los neutrófilos.
- Metilurea: es aceptor de radicales libres e inhibidor de la xantino-oxidasa.

Se ha observado que el **alopurinol** actúa principalmente aceptando radicales hidroxilo (75). Esto llevó a practicar su uso para bloquear la reacción neutrófilo-oxígeno (204,205).

El alopurinol actúa como inhibidor de la enzima xantino-oxidasa, bloqueando así la formación de xantina, O_2^- , H_2O_2 y OH^- .

Se ha observado un efecto protector del alopurinol en el shock hipovolémico, disminuyendo la traslocación bacteriana, reduciendo la vasoconstricción compensatoria, sobre todo la del lecho esplácnico y los riñones, después de la reperfusión. La acción protectora de este fármaco se ha demostrado a nivel de intestino delgado y páncreas (204).

A nivel de pulmón la acción se ha mostrado mínima (72).

Toledo-Pereyra et al fueron los primeros investigadores en incluir alopurinol como protector del hígado durante la preservación (203).

Tanto el alopurinol como la superóxido dismutasa evitan la infiltración neutrofílica, inducida por la lesión de I/R (75).

Atalla SL et al (7) estudiaron el papel de dos captadores de radicales libres, **catalasa** y **superóxido dismutasa**, en modelos de isquemia hepática en perros. Concluyeron que estos dos agentes pueden ejercer una acción protectora contra los radicales libres, acumulados durante la lesión de la I/R.

Marubayashi S et al (123) constataron por parte de catalasa y superóxido dismutasa, un efecto de inhibición de la xantino-oxidasa con un carácter limitado a nivel de la disfunción hepática producida durante la lesión de I/R, observándose buenos resultados cuando se combina con soluciones hiperosmolares.

El **α -tocoferol** es un buen antioxidante, soluble en lípidos de la sangre humana, siendo su efecto bien visto a nivel de la membrana eritrocitaria. Esta droga rompe la cadena de lípidos, para reaccionar con los radicales libres durante la isquemia. (205).

La función protectora del α -tocoferol ha sido probada por autores como Marubayashi S et al (123), que lo utilizaron como pretratamiento en isquemia hepática practicada en ratas, administrándolo por vía intraperitoneal, un día antes de realizar la isquemia. Observaron que las ratas tratadas presentaban una mejor recuperación tras la reperfusión: se aceleraba la síntesis del ATP, no descendía el glutatión total y se suprimía la formación de peróxidos lipídicos. Estas observaciones refuerzan la teoría de que los captadores de radicales libres y antioxidantes, como el α -tocoferol, son efectivos en la lesión celular hepática por isquemia.

La **naloxona** ha sido utilizado por Toledo-Pereyra et al (205) en riñones sometidos a isquemia y posterior trasplante, observando un efecto protector. Esta sustancia parece actuar como aceptor de oxígeno intracelularmente en los neutrófilos.

El tratamiento con naloxona también produce mejoría del flujo regional en la isquemia mesentérica aguda y protege de los efectos nocivos de la isquemia intestinal severa, sobre todo, si se administra antes de realizar la isquemia (64). Durante el shock hemorrágico su acción lleva a aumento de la presión sanguínea, elevación de la resistencia periférica y un mayor rendimiento de la contracción ventricular. A nivel renal tiene un efecto vasodilatador, protege la bomba iónica de sus células y mejora el potencial transmembrana, disminuyendo la permeabilidad de la misma.

La **metilurea** ha sido utilizada, a nivel experimental en ratas, para prevenir el daño posterior a la reperfusión. Tiene la capacidad de disminuir la presión arterial, durante la reperfusión "in vitro" del pulmón, efecto éste relacionado con la disminución de la peroxidación lipídica y de la permeabilidad endotelial (117).

- *Evitar la activación de las fosfolipasas A y C de la membrana y la liberación de ac. araquidónico y sus derivados* (tromboxanos y leucotrienos), potentes vasoconstrictores y agregantes plaquetarios.

- Clorpromacina
- Prostaciclina

- *Impedir la coagulación intravascular diseminada (CID)*, secundaria a la formación de microtrombos y a la agregación plaquetaria.

- Heparina
- Uroquinasa
- Ác. acetil salicílico
- Dipyridamol

Toledo-Pereyra LH et al (203) utilizaron la combinación de isoproterenol, alopurinol y heparina, durante la I/R hepática, no presentando su efecto protector cuando fueron administradas individualmente.

3.3.5. Preservación Intestinal.

La solución óptima para la preservación del intestino todavía no ha sido hallada, son diversos los trabajos de investigación encaminados en este sentido, pero ninguna de las soluciones parece ser lo suficientemente adecuada.

Entre las experiencias realizadas podemos señalar las de Park PO et al (152) en 1991, en las que se practicó isquemia fría en ratas, utilizando las soluciones de Sacks y la de la Universidad de Wisconsin (UW), tanto para almacenamiento como para perfusión, pasando posteriormente al trasplante singénico de ID a los vasos renales. Estos autores hacen una valoración microscópica del daño tisular, estableciendo una escala que va del 0 al 8, de menor a mayor grado de lesión.

Las conclusiones reseñadas en este estudio son:

- No encuentran diferencias entre los grupos tratados con solución de Sacks o de UW.
- La perfusión no permite el éstasis venoso.
- Es evidente que los leucocitos polinucleares son un factor importante, sólo o en unión con las células endoteliales, en la formación de la lesión durante la fase de reperfusión.

Otro estudio que evalúa soluciones de preservación para intestino delgado, es el practicado por Fabian MA et al (48) en 1991. Estos autores investigan los efectos de 24 horas de almacenamiento a 4°C, en tres soluciones: sol. salina (SA), sol. Eurocollins (EC) y sol. universidad de Wisconsin (UW).

Comprobaron el contenido en nucleótidos, adenina, adenin-nicotamida e inosina, como marcadores de la posterior recuperación funcional del trasplante, así como de la capacidad de estos tejidos en utilizar el oxígeno.

El contenido en nucleótidos, a las 24 horas de almacenamiento, fue significativamente mayor en los segmentos conservados con solución UW. Los segmentos preservados en UW mostraron una mayor capacidad en utilizar el oxígeno, que los almacenados con solución SA.

Consideran la solución UW como la mejor, seguida por la sol. EC.

Hamamoto I et al (68) en 1992, realizaron un estudio de valoración de soluciones de preservación, no coincidiendo sus conclusiones con las del trabajo mencionado anteriormente.

Sus investigaciones consistieron en la conservación de segmentos de intestino durante 24 horas, utilizando la solución UW, la solución EC y Ringer lactato (RL).

Las determinaciones practicadas sobre el tejido preservado fueron:

- Maltasa. Expresión de la actividad enzimática de las células intestinales.
- Malonildialdehido (MDA). Referencia de la peroxidación lipídica.
- Hipoxantina. Sustrato de xantino-oxidasa.
- Mieloperoxidasa. Índice de infiltración neutrofílica.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

- La maltasa disminuyó moderadamente en todos los grupos durante las 24 horas de preservación.

- La conservación en frío, teóricamente, no favorece la peroxidación, pero el MDA se encontró aumentado en todos los grupos tras la reperusión, sobre todo en los que utilizaron solución UW o solución RL.

- Los niveles de hipoxantina fueron semejantes, antes y después de la reperfusión, en todos los grupos, excepto el de la sol. UW que mostró unas determinaciones muy elevadas a las 24 horas de la preservación.

- La MPO fue indetectable antes del trasplante en todos los grupos, pero con la reperfusión mostró un aumento significativo, especialmente los grupos preservados con UW y RL.

Conclusiones:

- Todos los grupos mostraron deterioro bioquímico tras la reperfusión, sin embargo, el grado del mismo fue distinto según la solución empleada.

.La maltasa se encontró reducida por igual en todos los grupos.

.La peroxidación lipídica (MDA) y la infiltración neutrofílica (MPO), fue mayor en los grupos conservados en UW o RL.

.Los niveles de hipoxantina se mostraron muy elevados en el grupo UW, a las 24 horas de la preservación.

Estos resultados les llevan a sugerir la solución de Euro-Collins como la más apropiada para la preservación intestinal.

Otro trabajo experimental, fue el realizado por Burgmann H et al (21) en 1992, en el que se compararon distintas soluciones para la conservación hipotérmica de ID, valorando cual de ellas mantenía mejor los niveles de fosfatos de alta energía en el ileon de rata, durante el proceso de almacenamiento. En este estudio se extrajeron segmentos intestinales que se almacenaron a 4°C, durante 1, 7 y 21 horas. Las soluciones utilizadas fueron: Euro-Collins (EC), Bretschneiders-HTK (BHTK) y la solución de Wisconsin modificada (UWm), sin adenosina. Las mediciones de fosfatos se expresan en micromoles de nucleótido por gramo de tejido intestinal.

Las determinaciones practicadas fueron las siguientes:

- . Adenosín monofosfato AMP
- . Adenosín difosfato ADP
- . Adenosín trifosfato ATP
- . Lactato
- . Carga energética. Calculada según la formula de Atkinson:

$$(ATP + 0,5 ADP) / (AMP + ADP + ATP)$$

Los resultados observados fueron:

- La solución EC fue la que mejor mantuvo al ID durante las 21 horas de almacenamiento.

- La concentración de nucleótidos disminuyó en todos los grupos durante el proceso, pero tras 21 horas del mismo, los valores hallados en los tejidos intestinales conservados con solución EC, eran significativamente mayores que los de otros grupos, lo que implica una mejor protección por parte de esta solución.

- La solución UWm , sin adenosina, no ofreció buenos resultados.

Estos autores sugieren continuar el estudio con las soluciones de UW y la de BHTK, añadiendo un sustrato como la glucosa.

Los investigadores Kojudo Y et al (100) presentaron un trabajo en 1994, cuyo objetivo era, como en los estudios anteriores, la búsqueda de la solución ideal para la preservación intestinal. Establecieron la comparación entre la solución UW, la solución EC y el Ringer lactato. El almacenamiento de los injertos fue a 4°C, durante 6, 12 y 18 horas, en cada una de las soluciones, para su posterior trasplante.

Los parámetros estudiados fueron:

-La supervivencia animal, tras el trasplante.

-Estudios electrofisiológicos para conocer:

.La función de los enterocitos (estimulación con glucosa)

-La función de las células crípticas (estimulación con teofilina)

-Análisis histológicos al final del período de preservación y 1 hora tras la reperfusión.

Los resultados obtenidos fueron:

a) A las 0, 6 y 12 horas de preservación no se hallaron diferencias significativas entre los grupos tratados con las distintas soluciones.

b) Tras 12 horas de preservación:

-La supervivencia fue inferior en el grupo UW.

-La respuesta a la estimulación de las células crípticas fue menor en el grupo UW.

-Histológicamente no hubieron diferencias notables.

Conclusiones:

-Para estos autores, contrariamente a lo que ocurre en la preservación de hígado, del riñón y del páncreas, la solución UW no se muestra como la mejor solución de preservación intestinal.

-Las funciones de los enterocitos se deterioraron rápidamente con cualquiera de las soluciones ensayadas.

-La función de las células crípticas se conservó mejor con Ringer lactato y Euro-Collins, que con la sol. U.Wisconsin.

Itasaka H et al (88) en un trabajo publicado en 1994, propusieron la adición a las soluciones de preservación de intestino delgado, de moléculas de alto peso molecular como el propilenglicol (PEG), para evitar el rechazo.

En este estudio se utilizaron diversas soluciones:

- Ringer lactato
- Solución U. Wisconsin (UW)
- Sol. UW sin hidroxietil almidón
- Sol. UW con PEG 20M----Alto peso molecular
- Sol. UW con PEG 20L---- Alto peso molecular
- Sol. UW con PEG 8000.

Los resultados de supervivencia en el trasplante ortotópico de ID en ratas demostraron que ésta era significativamente mayor en los grupos que utilizaron soluciones con PEG de alto peso molecular. El mecanismo de esta acción protectora no está claro, pero parece ser que este componente reduce la inmunogenicidad de los injertos intestinales. Como se ha podido comprobar, la solución de preservación óptima para el intestino sigue sin determinarse, por lo que esta línea de investigación permanece abierta, con la intención de solventar este problema y así mejorar las perspectivas del trasplante intestinal.

4. FISIOPATOLOGÍA DE LA LESIÓN POR ISQUEMIA/ REPERFUSIÓN

En la actualidad está reconocido el hecho de que el daño tisular producido por la isquemia y posterior reperfusión, es el principal factor en la patogénesis de muchas enfermedades de base isquémica.

Son numerosos los estudios que confirman la importancia de dos situaciones o períodos en la producción de la lesión por isquemia/reperfusión (**I/R**). Estos son: por un lado el déficit circulatorio y por otro la oxigenación siguiente al restablecimiento del flujo sanguíneo, que conlleva la formación de los llamados radicales libres de oxígeno, los cuales poseen un alto poder citotóxico (152,205).

4.1. ISQUEMIA.

La interrupción de la circulación, si no es compensada por la circulación colateral, va a producir tras un cierto tiempo, que en intestino se considera muy breve, un daño irreversible.

Un pequeño descenso del flujo sanguíneo puede iniciar lesiones isquémicas con hipoxia en el borde de las vellosidades intestinales, las cuales son especialmente sensibles, debido a que, existe en ellas un pequeño circuito extravascular de oxígeno.

La lesión isquémica del intestino comienza pues en la mucosa (223).

Como consecuencia de la afectación mucosa, son liberadas al torrente circulatorio sustancias tóxicas, como enzimas proteolíticos, bacterias y endotoxinas de la luz intestinal. También se produce la liberación de citoquinas inflamatorias, como consecuencia de la agresión (218). Estos hechos afectan la función hepática, cardíaca y respiratoria, intensificando la hipotensión, estableciéndose un círculo vicioso, que conduce al progresivo deterioro de la

circulación intestinal (158). De esta forma avanzaría el déficit irrigatorio de la capa mucosa al resto de las capas histológicas intestinales, provocando el infarto (138).

4.1.1 Lesión de la membrana celular.

A este nivel se van a producir importantes cambios:

- El aumento de la permeabilidad celular, perdiendo su capacidad de barrera.
- La disminución de su potencial de acción, con alteración de la bomba Na^+/K^+ .

Esta situación lleva a la célula intestinal a una pérdida de su homeostasis, de forma que, habrá salida del K^+ intracelular y entrada de Na^+ , lo que conducirá a un edema de la célula.

La isquemia provoca hipoxia celular, lo que paraliza la producción de adenosintrifosfato (**ATP**), que es su fuente de energía, aunque el consumo de este fosfato continúa. Consecuentemente, la célula recurre a los fosfatos ricos en energía que posee, degradándolos a adenosindifosfato (**ADP**) y de aquí a adenosinmonofosfato (**AMP**), convirtiéndose en **Adenosina** o inosina monofosfato (**IMP**).

Posteriormente estas sustancias difunden al espacio extracelular, donde son degradadas de nuevo a **hipoxantina**, por la vía de la **Inosina**.

El metabolismo del **ácido úrico** es oxígeno dependiente, por tanto, no tiene lugar durante el período de hipoxia, de manera que, la hipoxantina se acumula en los tejidos isquémicos.

El metabolismo normal de la hipoxantina a ácido úrico es catalizado por la enzima **xantino deshidrogenasa**. Durante la hipoxia, la xantino deshidrogenasa pasa a **xantino oxidasa** por hidrólisis (232).

Con la isquemia, se produce un rompimiento de los factores de alta energía, lo que lleva a una disminución de ATP y de ADP, es decir, hay un desorden en la fosforilización oxidativa, situación que continúa hasta la revascularización (76).

Esta utilización del ATP, durante la isquemia, da lugar a la generación de purinas como la hipoxantina y xantina, que intervendrán en el momento de la reperfusión, contribuyendo en la formación de radicales libres de oxígeno (67) (Figura 8).

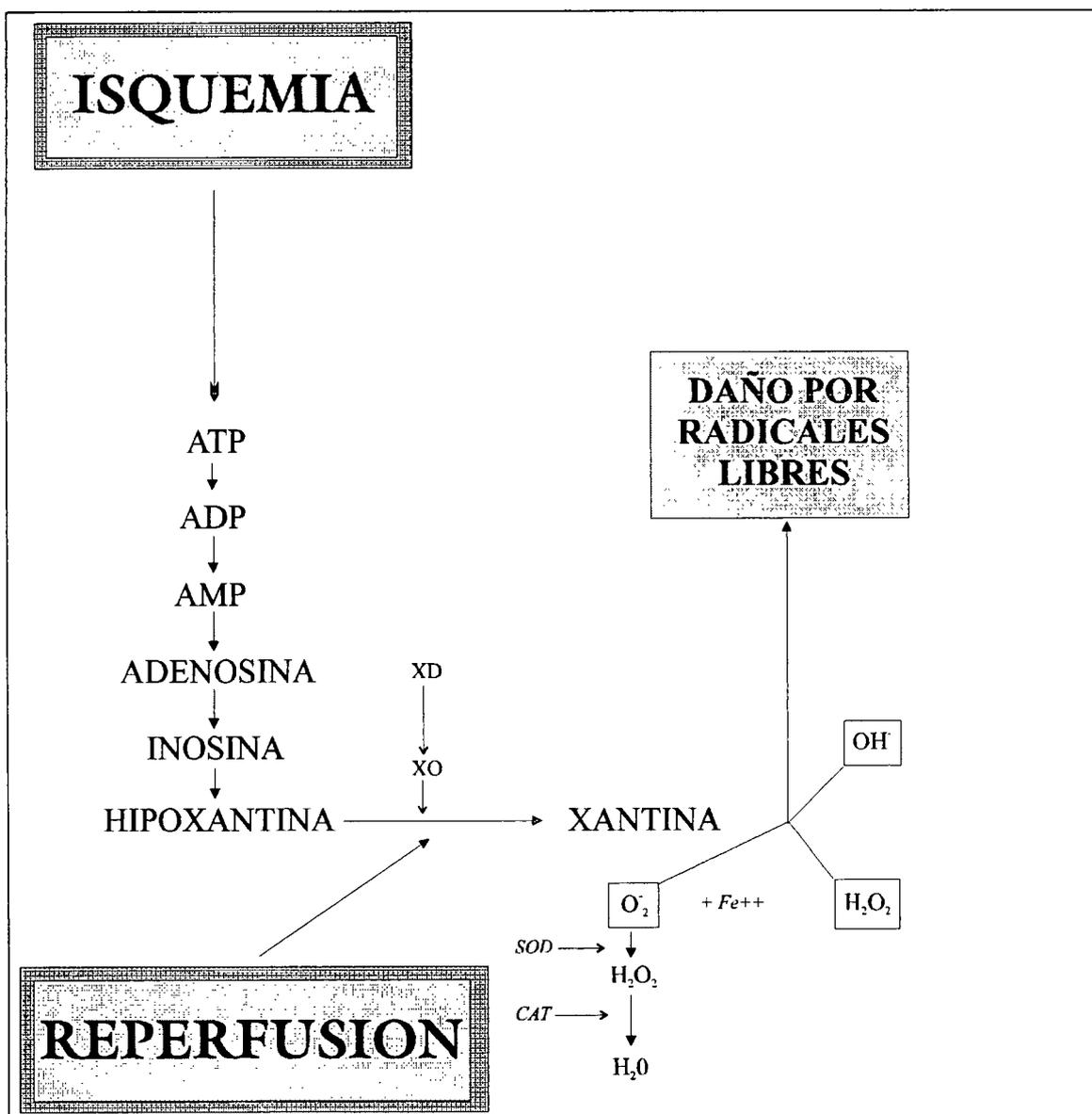


Figura 8.- Mecanismo de producción de los radicales libres.

La disminución de la energía impide la salida normal de **calcio** del interior de la célula, provocando su acúmulo, lo que lleva a la activación de las **proteinasas calcio-dependientes**, que son las que catalizan el paso de xantina deshidrogenasa a xantino oxidasa (180).

Con la falta de oxígeno también se va a producir un consumo anaerobio de la glucosa, hecho que provoca una retención tisular de **lactatos** (73).

4.2. REPERFUSION

En la actualidad se admite el hecho de que tras un período de isquemia temporal, las lesiones tisulares, no sólo van a ser producidas por la falta de riego, sino también por una serie de procesos, enlazados entre sí, que acaecen con la oxigenación que acompaña al restablecimiento del flujo durante la reperfusión (76,79,205).

En este período se van a producir ciertas reacciones, que van a incrementar gravemente el daño celular, éstas son:

- La formación de radicales libres de oxígeno.
- La peroxidación lipídica de la membrana celular.
- El acúmulo de leucocitos polimorfonucleares en el endotelio vascular.

4.3. RADICALES LIBRES DE OXÍGENO

4.3.1. Concepto

Un radical libre es una molécula o fragmento molecular, que contiene un electrón no apareado en su valencia, pudiendo participar en la formación de enlaces químicos. El radical libre puede presentar carga positiva, negativa o neutra (82). Esta valencia libre hace que la molécula sea químicamente muy reactiva.

4.3.2. Formación

Después de la hipoxia y reperfusión del intestino, el sistema hipoxantina, xantino oxidasa, parece ser el mecanismo inicial de la producción de radicales libres (131).

Se ha observado que el intestino de muchas especies, es un órgano muy rico en xantino oxidasa y xantino deshidrogenasa, produciéndose un aumento en la concentración de éstas, siguiendo la dirección desde la base hasta el borde de las microvellosidades. Esto explicaría la mayor susceptibilidad de esta región al daño postisquémico (52).

Al producirse la reoxigenación, la hipoxantina, acumulada durante el período isquémico en el tejido intestinal, es convertida en ácido úrico, por acción de la enzima xantino oxidasa.

La xantino oxidasa transfiere los electrones al oxígeno molecular, aportado por la reperfusión, reduciendo dicho oxígeno a radicales libres:

- anión superóxido (O_2^-)
- peróxido de hidrógeno (H_2O_2)
- radicales hidroxilo (HO^{\cdot}).

En el intestino la conversión de xantino deshidrogenasa en xantino oxidasa es extremadamente rápida.

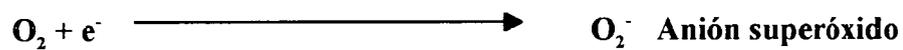
La teoría de que la xantino oxidasa es la mayor fuente de radicales libres de oxígeno, se encuentra reforzada por el hecho de que la utilización de alopurinol, que ejerce una inhibición competitiva al ser un aceptor de radicales, es tan efectiva como la superóxido dismutasa, en la prevención del incremento de la permeabilidad vascular y el agravamiento de los daños de la mucosa, observados tras la reperfusión. Así lo confirman las experiencias de Nordstrom G et al (142) y de Toledo-Pereyra et al (204).

La inhibición competitiva del alopurinol sobre la xantina oxidasa, no sólo disminuye la liberación de radicales de oxígeno, sino que también preserva el pool de nucleótidos (205).

Hay otros estudios que apoyan esta teoría como el de Parks DA et al (154) en 1986, que utilizaron ratas alimentadas con una dieta deficiente en molibdeno y suplementada con tungsteno. Estas variaciones dietéticas iban encaminadas a atenuar el aumento de la permeabilidad vascular, al incorporarse el tungsteno en la molécula de la xantina oxidasa, en vez del molibdeno, reduciendo de este modo su actividad en la mucosa intestinal, en un 75%.

La formación del radical superóxido O_2^- se produce por reducción univalente del oxígeno. Este radical es una forma inestable y citotóxica del oxígeno molecular (O_2), por lo que, espontáneamente se desdobra en H_2O_2 y O_2 . Ambas moléculas son oxidantes lentos y aparentemente, no son los causantes del daño tisular.

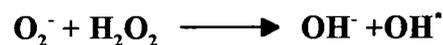
Reducción de oxígeno molecular:



Dismutación de O_2^- :

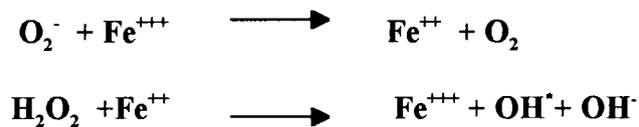


El radical O_2^- ejerce su acción lesiva de forma directa, atacando a nivel molecular, o mediante radicales hidroxilos HO^* generados secundariamente, según la reacción de Haber Weiss:



Pero esta reacción es de corta producción, por lo que se ha sugerido otra vía que justificaría el tamaño de la lesión; habría una participación de metales de transición, sobre todo, del hierro, que es muy abundante en el organismo, donde se encuentra bajo diversas formas como son la transferrina, ferritina, lactoferrina, hemoglobina y ADP-Fe (67).

El O_2^- reduce al hierro de su forma férrica a ferrosa y éste a su vez reduce al H_2O_2 en OH^- y OH^\bullet . Reacción de Fenton:



El O_2^- posee gran capacidad para reducir al hierro, preparándole para la formación de radicales hidroxilos OH^\bullet , altamente tóxicos (40).

4.3.3. Efectos de los radicales libres de oxígeno.

Los radicales generados durante el metabolismo del ácido araquidónico (vía cicloxigenasa y lipoxigenasa) son capaces de reaccionar con diferentes componentes celulares, como el citosol, la membrana e incluso contra estructuras extracelulares, dependiendo de su capacidad de difusión. Estos radicales actúan sobre los ácidos grasos poliinsaturados, presentes en la membrana y sobre las proteínas, que contienen aminoácidos susceptibles de oxidación (232).

El resultado será una alteración global del metabolismo celular.

- El OH^\bullet presenta una elevada e indiscriminada reactividad, por lo que ejercerá pronto su acción, no difundiendo lejos de su lugar de producción.

- El O_2^- es menos reactivo, llegando más lejos, pero sus efectos se encuentran limitados por la enzima superóxido dismutasa (209).

- El H_2O_2 es el menos reactivo de los tres y su concentración está controlada por las acciones de las enzimas catalasa y glutatión peroxidasa intracelulares. El peróxido de hidrógeno difunde bien a través de las membranas plasmáticas, la membrana de los peroxisomas y las mitocondriales, causando efectos a distancia (146).

Los radicales libres de oxígeno van a ejercer pues, una acción citotóxica directa, pero también van a participar en el acúmulo leucocitario que se produce en el tejido isquémico y que a su vez va a ser fuente de nuevos radicales libres de oxígeno (58).

4.3.4. Inactivación de Radicales.

La inactivación de estos radicales es necesaria para la supervivencia celular, llevándose a cabo por diversos mecanismos:

- Por acción de **antioxidantes endógenos y exógenos** como son:

. Vitamina E. Reduce los radicales O_2^- , OH^- y peróxidos lipídicos.

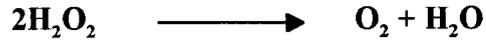
. Ascorbato. Presenta propiedades semejantes a la anterior, contribuyendo también a mantener activa la vitamina E.

. Glutatión reducido. Es capaz de reducir H_2O_2 , peróxidos lipídicos, disulfidos y otros radicales libres, al poseer en su molécula un grupo tiol libre (-SH), que le hace altamente activo.

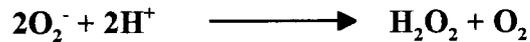
. Beta-carotenos. Inhiben la peroxidación lipídica.

- Por acción de **depuradores enzimáticos**:

. Catalasa y peroxidasas. Desdoblan H_2O_2 , que aunque no es un radical, es precursor de potentes radicales. El potencial citotóxico del H_2O_2 estará limitado por las actividades catalasa y peroxidasa celulares (7,146).



. Superóxido dismutasa. Es una metaloproteína cúprica que actúa en la conversión del O_2^- en H_2O_2 , consiguiendo su inactivación (7).



4.4.- PEROXIDACION LIPIDICA

Este fenómeno está provocado por la aparición de los radicales libres de oxígeno, siendo pues una consecuencia de éstos, que agravará el daño tisular.

La peroxidación lipídica es el resultado del movimiento de un protón de los ácidos grasos insaturados, para formar intermediarios de radicales libres, que reaccionan con el oxígeno para formar peroxiradicales y por último peróxidos lipídicos (123).

Los radicales libres, antes de alcanzar el medio intracelular, reaccionan con la membrana, donde ejercen sus acciones tóxicas sobre los ácidos grasos poliinsaturados presentes en ella, que van a sufrir un proceso de peroxidación.

El fenómeno de la peroxidación lipídica comienza cuando algún radical libre actúa convirtiendo un lípido insaturado (**LH**) en un radical lipídico (**L-**), es entonces, cuando si existe oxígeno y más lípidos insaturados, se produce una reacción de propagación autocatalítica (**LOO-**), que en condiciones normales, es concluida por el α -tocoferol, encargándose éste de transformar el **LOO-** en hidroxiperóxido (**LOOH**).

Durante este proceso se formará ácido malonildialdehído (**MDA**), que es un metabolito derivado del ácido araquidónico (126).

El MDA es detectable por métodos analíticos, y por tanto su cuantificación es un índice, que permite conocer el grado de peroxidación e indirectamente el grado de lesión tisular.

El metabolismo del ácido araquidónico conducirá a un aumento en las concentraciones de:

- Prostaglandinas (vasodilatadores e inhibidores de la agregación plaquetaria).
- Tromboxanos (vasoconstrictores e inductores de la agregación plaquetaria).
- Leucotrienos (vasoconstrictores).

Estos productos van a contribuir a la alteración de la permeabilidad y también participarán en las disfunciones micro y macrocirculatorias (232).

Existen estudios sobre isquemia/reperfusión intestinal, en los que se han medido las prostaglandinas y tromboxanos durante la isquemia, no apreciándose cambios, determinándose también durante la reperfusión, en la que los metabolitos de las prostaglandinas se vieron incrementados significativamente (179).

El incremento de prostaglandinas contribuye, probablemente, a la cardiodepresión observada comúnmente tras la reperfusión.

Todas las reacciones desencadenadas en la peroxidación van a sumarse para alterar la estructura y funciones de la membrana, tales como, la deformabilidad, transporte de iones y actividad enzimática.

Se produce una degradación de la capa de fosfolípidos de la membrana, lo que conlleva una alteración de su permeabilidad con entrada de iones calcio al interior de la célula y salida de iones potasio, por inhibición de la bomba de Na^+/k^+ . Esto provocará edema celular (Figura 9).

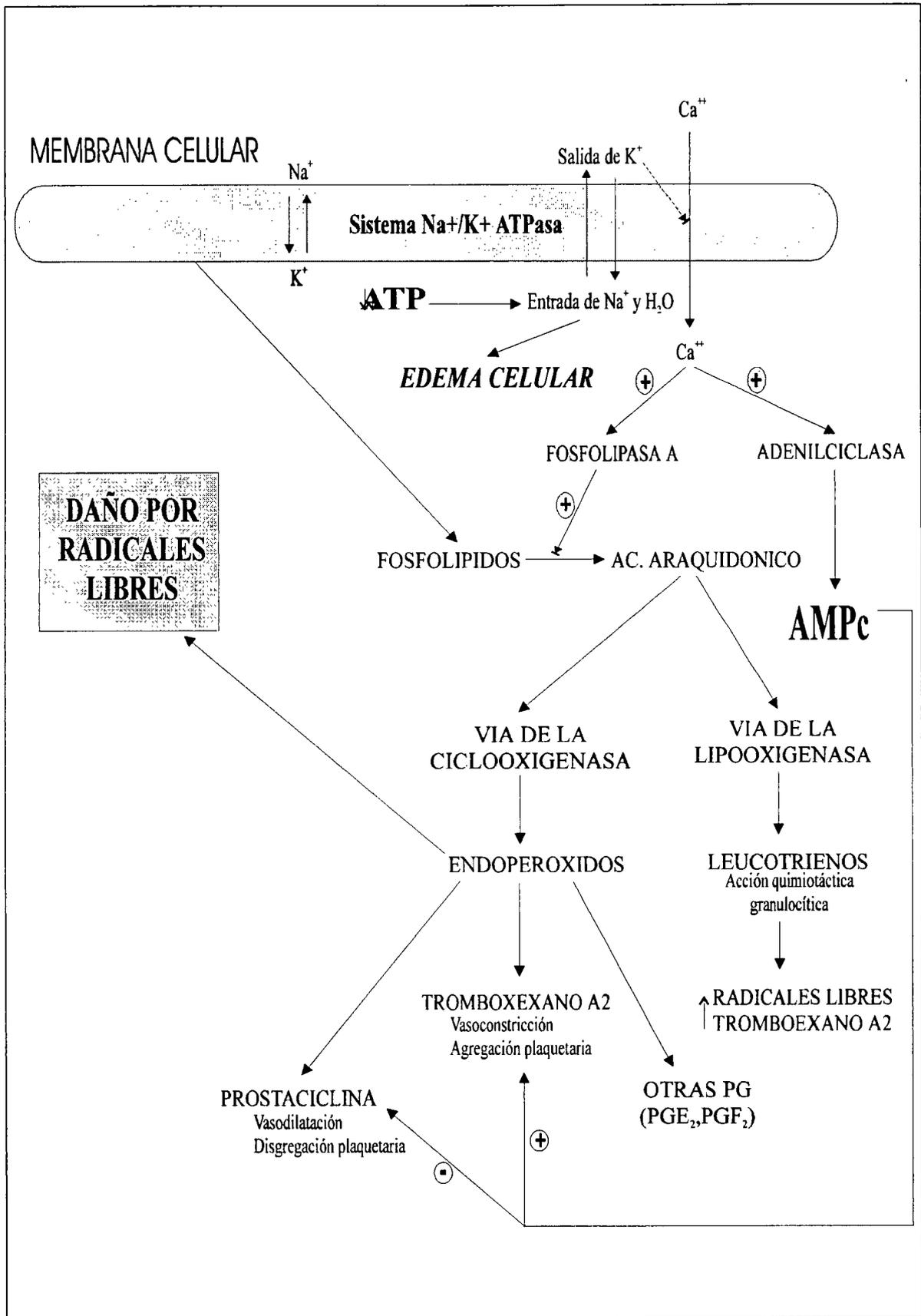


Figura 9: Fisiopatología de la lesión por Isquemia/Reperusión.

4.5. ACCIÓN DE LOS LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES.

La isquemia/reperusión de un órgano va a llevar consigo un secuestro y participación en la lesión de los leucocitos polimorfonucleares (PMN), los cuales van a ser activados por:

- Mediadores quimiotácticos, como son los leucotrienos, liberados por el metabolismo del ácido araquidónico, es decir, que van a ser estimulados indirectamente por la producción de los radicales libres de oxígeno.

- Estos PMN también son activados, como respuesta a una noxa inflamatoria, por complejos antígeno-anticuerpo.

Los PMN ejercen su acción nociva por varios mecanismos:

1- Acción mecánica.

-Se adhieren al endotelio vascular, donde se acumulan, pudiendo llegar a obstruir la luz de la microvasculatura, agravando de este modo la isquemia.

-Provocan con su infiltración la separación de las células endoteliales, alcanzando por diapédesis los tejidos circundantes.

- Participan en el "fenómeno de no reflujo", que acontece durante la reperusión (161).

2- Acción citotóxica.

-Al ser activados, liberan por degranulación enzimas hidrolíticas y proteolíticas, capaces de lesionar directamente a las células.

-Sintetizan radicales libres de oxígeno, que actuarán lesionando tanto al endotelio vascular como al parénquima (205).

La producción por los PMN de radicales libres de oxígeno se va a realizar por:

- la vía de la mieloperoxidasa, formándose ácido hipocloroso:



- La vía de la xantino oxidasa (ya expuesta en el apartado anterior), con producción de O_2^- , H_2O_2 y OH^- .

El secuestro de PMN en un órgano llevará consigo la liberación de gran cantidad de agentes vasoactivos y citotóxicos. Esto va a producir cambios en la permeabilidad capilar, alteraciones histopatológicas del órgano y disminución de la resistencia vascular del mismo (205).

Son muchos los autores que han estudiado el papel de los PMN en el desarrollo de la lesión por isquemia reperfusión, así Zimmerman BJ et al (232) desarrollaron una hipótesis sobre la interacción entre xantino oxidasa y PMN en la isquemia-reperfusión de intestino delgado. Los neutrófilos serían activados por la liberación de sustancias intracelulares, que salen al exterior, por acción de los radicales libres, que han producido la peroxidación de los fosfolípidos de la membrana.

Estas sustancias atraen y promueven la adherencia de los PMN al endotelio vascular donde provocan, a su vez, la liberación de radicales libres y de proteasas.

Estas afirmaciones fueron apoyadas por autores como Carden DL et al (24), que investigaron los mecanismos de la disfunción muscular, como consecuencia de isquemia circulatoria.

Inauen W et al (85) desarrollaron un modelo de lesión por I/R, que consistía en cultivos por confluencia de células endoteliales venosas, marcadas isotópicamente y expuestas a anoxia. Demostraron la activación de los neutrófilos, que se adherían al endotelio vascular, contribuyendo a la extensión de la lesión, por producción de agentes oxidantes y toxinas.

Belkin M et al (12) en 1989 realizaron unos estudios sobre el papel de los leucocitos en la lesión muscular por isquemia; demostrando el efecto protector de la neutropenia, como pretratamiento en la I/R de músculo esquelético.

Rubin B et al (167) evidenciaron con sus investigaciones la activación de la vía alternativa del complemento, como respuesta a la I/R en músculo. Esta activación lleva a la generación de péptidos quimiotácticos para los neutrófilos y a la formación de complejos moleculares que lesionan la membrana celular.

Iwai A et al (89) sugieren que el factor de agregación plaquetaria PAF, generado durante la hipoxia, puede estimular la producción de radicales libres por los PMN.

Hay autores que discrepan en la importancia del papel jugado por los neutrófilos, así Yoshikawa T et al (229) utilizaron comparativamente dos tratamientos 1º alopurinol (aceptor de radicales) y 2º deplección de PMN en isquemia de la mucosa gástrica; concluyendo que la acción de éstos en la lesión por I/R, comparada con el sistema xantino oxidasa es mínimo.

Vedder NB et al (216) administraron anticuerpos monoclonales (MAb 60.3), para reducir la adherencia de los PMN al endotelio y así disminuir la lesión vascular que se produce tras shock hipovolémico. Con este tratamiento obtuvieron una mejoría significativa en la supervivencia, demostrando la importante participación de los PMN.

Otros autores que utilizaron anticuerpos monoclonales fuerom Jaesche H et al (91). Con este ensayo comprobaron que estos productos antileucocitarios, producían una neutropenia protectora en la isquemia hepática.

Con el mismo fin, Horgan MJ et al (83) en 1990, emplearon ac.monoclonales contra la fracción CD18 de los linfocitos, que es una glicoproteína de membrana que participa en la adhesividad leucocitaria. Practicaron I/R, por oclusión de la arteria pulmonar en conejos;

obteniendo mejoría en la lesión pulmonar y un menor secuestro de PMN, en el grupo de animales que recibió el tratamiento.

En esta misma línea de investigación se encuentran las experiencias de Utsonomiya H et al (213) en 1992, los cuales utilizaron como inmunosupresor la droga FK506; concluyendo que este fármaco, a pequeñas dosis, prolongaba la supervivencia en el trasplante ortotópico intestinal en ratas.

Hay otros investigadores que han demostrado con sus estudios la efectividad de la FK506 como Hatazawa C et al (71), Date K et al (42), Santiago SF et al (172), los cuales, la utilizaron como tratamiento previo en el trasplante de intestino delgado en ratas.

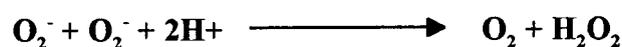
Hay otras drogas, dentro del grupo de los anticuerpos monoclonales con efecto inmunosupresor, que han sido empleadas en el trasplante experimental, así ocurre con el OKT4A, utilizada por Wee SL et al (220) en primates receptores de trasplante renal. En este ensayo se observó que dicho fármaco producía un aumento significativo en la supervivencia, que se acompañaba de una ausencia de infiltrado celular en el injerto y un bloqueo en la sensibilización de las células T del receptor.

Reacciones involucradas en la producción de metabolitos de oxígeno reactivos, producidos por células fagocíticas.

- Reducción de oxígeno molecular



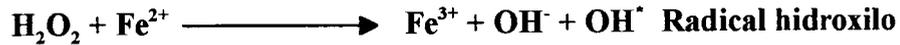
- Dismutación de O_2^- :



- Reacción de Haber-Weiss:



-Reacción de Fenton (hierro catalizado):



- Reacción de Mieloperoxidasa:



4.6. LESIÓN POR ISQUEMIA/REPERFUSIÓN EN INTESTINO

La insuficiencia de la circulación intestinal afecta, preferentemente, al territorio de la **arteria mesentérica superior**, que como es sabido, irriga todo el intestino delgado, el ciego, el colon ascendente y el transversal.

Los déficits circulatorios obedecen a dos mecanismos principales:

- Episodios embólicos o trombosis de instauración súbita sobre placas de ateroma .
- Trombosis ocliterantes que se fraguan lentamente e isqueman el intestino. Se ha descrito algún caso de trombosis por anovulatorios (200).

La *embolia mesentérica* acontece, sobre todo, en pacientes afectados de estenosis mitral o cardiopatía miocardioclerótica con fibrilación auricular. También las dilataciones por aneurismas de la aorta o los infartos de miocardio, con trombos endoteliales, pueden ser la causa.

La *obliteración trombótica* ocurre, casi exclusivamente, en sujetos arterioclerosos. A veces, las operaciones encaminadas a mejorar en tales pacientes la circulación de las piernas, rompen el equilibrio inestable existente y desencadenan la isquemia intestinal.

Los cuadros clínicos que pueden presentarse son varios y dependen de la brusquedad de instauración de déficit circulatorio (isquemia intestinal aguda o crónica) , y de la topografía de la región isquemiada.

a) Isquemia intestinal crónica.

Resulta de la instauración paulatina de la misma, produciéndose un cuadro de "angor intestinal". Como consecuencia de este proceso el paciente aqueja un cuadro suboclusivo.

b) Isquemia intestinal aguda.

Depende más a menudo de una embolia que de una trombosis y da lugar a un cuadro de infarto intestinal, de pronóstico muy grave. En el cuadro clínico predominan las enterorragias y los signos de íleo paralítico.

Las lesiones derivadas del proceso de I/R en intestino, van a ser semejantes a las acontecidas en otros órganos, con la particularidad de que el intestino soporta muy poco tiempo la situación de isquemia, en comparación con otros órganos (19). Los cambios estructurales y alteraciones fisiopatológicas han sido detalladas en el capítulo correspondiente al trasplante intestinal.

MATERIAL Y METODOS

1. DISEÑO EXPERIMENTAL

El objetivo del presente estudio es la valoración experimental del agente hemorreológico **Pentoxifilina** en la isquemia-reperfusión intestinal, realizada en ratas macho cepa Wistar. Con este fin se han seguido una serie de pasos contenidos en el diseño experimental, que se muestran sintetizados en la figura 10.

El primer punto a considerar, para el buen funcionamiento del proyecto, fue la adquisición de la **habilidad quirúrgica** necesaria, para que la intervención tomara un carácter uniforme, de manera que no constituyera, por sí misma, una variable influyente en los resultados.

La misma finalidad fue aplicada a la práctica de la punción en la vena dorsal del pene de los animales, para la administración del fármaco.

El proceso, en esta fase, incluyó:

- Anestesia intramuscular.
- Laparotomía media.
- Inyección de 0'4 ml de suero fisiológico en la v.dorsal del pene.
- Isquemia intestinal, por clampaje de la arteria mesentérica superior.
- Reperfusión inmediata, por retirada del clamp.
- Cierre de la incisión mediante sutura.

Para el cumplimiento de este paso, se utilizaron 40 ratas, logrando una supervivencia total, al 7º día, del 100%.

El **tiempo de isquemia** adecuado para practicar el estudio, se determinó variando el mismo, hasta conseguir una supervivencia inferior al 50%, al 7º día de la intervención.

Se partió de un tiempo de isquemia de 90 minutos, practicándose la misma en 30 ratas. La supervivencia conseguida fue del 85%.

ADQUISICION DE HABITO QUIRURGICO:
40 ratas. Isquemia Intestinal. 100% SUPERVIVENCIA

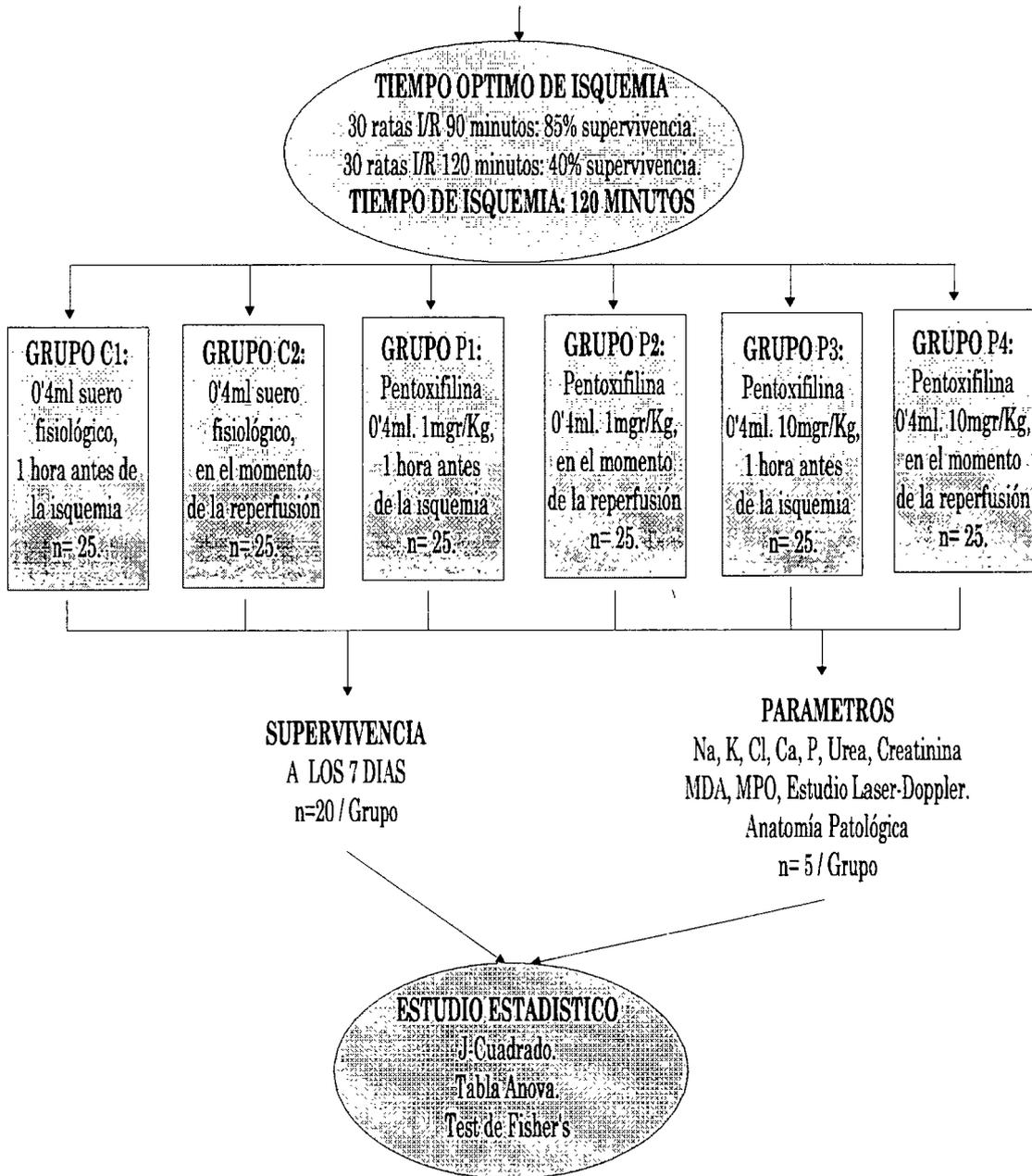


Figura 10: Esquema del diseño experimental.

Se aumentó el tiempo de isquemia a 120 minutos, aplicándola a otro grupo de 30 animales. La supervivencia total, al 7º día, fue del 40%, lo que llevó a considerar este tiempo de isquemia como el apropiado para el proyecto.

La siguiente fase fue la de establecer los **grupos experimentales**, entre los que se distribuyeron 150 ratas, a razón de 25 animales por cada uno de los 6 grupos :

- **Grupos Control C1 y C2.** A los animales que constituyeron estos grupos se les administró 0'4 ml de suero fisiológico, una hora antes de la isquemia (C1), o en el momento de la reperfusión (C2).

- **Grupo P1.** Les fue administrada una dosis de 0'4 ml de Pentoxifilina a razón de 1 mg/kg de peso, 1 hora antes de la isquemia.

- **Grupo P2.** Se les inyectó la misma dosis de Pentoxifilina que al grupo P1, pero en el momento de la reperfusión.

- **Grupo P3.** La dosis de Pentoxifilina empleada fue de 0'4 ml a una concentración de 10 mg/kg de peso, aplicada 1 hora antes de la isquemia.

- **Grupo P4.** Recibió la misma dosis de Pentoxifilina que en el grupo P3, pero en el momento de la reperfusión.

A todos los animales se les practicó la isquemia intestinal durante 120 minutos, aplicando en cada caso el tratamiento farmacológico correspondiente.

La distribución de las ratas en los grupos experimentales se realizó de forma aleatoria.

Los **estudios y determinaciones**, practicados en las ratas de los diferentes grupos, fueron los siguientes:

- **Estudio de supervivencia** desde la intervención hasta el 7º día. Se realizó en 20 ratas de cada grupo.

- **Estudio Láser-Doppler** en el órgano comprometido antes de la isquemia, durante la misma y tras la reperfusión.

- **Pruebas bioquímicas** en suero: Sodio, Potasio, Urea, Creatinina, Calcio, Cloro, Fósforo y enzima Lactato deshidrogenasa.

- Determinaciones en el tejido isquémico intestinal:

- *Malonildialdehido (MDA)*, como marcador del grado de peroxidación lipídica.

- *Mieloperoxidasa (MPO)*, expresión de la actividad y secuestro polimorfonuclear.

- **Estudio anatómico-patológico** del tejido intestinal afectado, obteniendo las muestras tras 1 hora de reperfusión.

Los estudios de Láser Doppler, bioquímica, MDA, MPO e histología se realizaron en 5 ratas de cada grupo.

2. ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN

El animal seleccionado para el presente estudio fue la rata macho albina de la cepa Wistar, con un peso comprendido entre los 250 y 300 gramos .

Los criterios de selección considerados fueron los siguientes:

- Animal manejable por una sola persona.
- Control sanitario de procedencia conocido.
- Bajo coste.
- Mantenimiento poco exigente.
- Tamaño pequeño, lo que facilita su almacenamiento en el estabulario, pero suficiente para la discriminación de sus órganos.
- Haber sido utilizado frecuentemente en trabajos experimentales anteriores, cuyas referencias suponen un valioso punto de apoyo .
- Elevada resistencia a las infecciones y rápida recuperación de las intervenciones quirúrgicas.

Al elegir el animal de experimentación se tuvo en cuenta el sexo, optándose por las ratas macho, ya que las hembras presentan fluctuaciones hormonales, que pueden suponer variables de influencia no controlable en los resultados.

Las condiciones mantenidas en el estabulario fueron, una temperatura entre 22° y 24°C, y una humedad relativa del 60-70%. Los animales se distribuyeron en jaulas, de forma que no se almacenaran más de 5 en cada una de ellas.

La alimentación de los animales consistió en pienso y agua, hasta las 24 horas previas a la intervención, momento en el se les retiraba el alimento, estableciendo el ayuno preoperatorio, durante el cual se les mantuvo el agua para su consumo libre "ad libitum".

El total de animales utilizadas fue de 250, distribuidos de la siguiente forma:

- 40 unidades para práctica quirúrgica.
- 60 unidades para establecer el tiempo de isquemia óptimo.
- 150 unidades para el desarrollo del proyecto, a razón de 25 por cada uno de los 6 grupos establecidos.

3. GRUPOS EXPERIMENTALES

Los grupos de experimentación establecidos fueron 6, formados cada uno de ellos por 25 ratas Wistar. La distribución de estos animales en cada grupo se hizo de forma aleatoria.

Los 25 animales de cada grupo fueron sometidos a una isquemia intestinal de 120 minutos, según el protocolo. De estos animales, una vez realizada la intervención, 20 pasaron a estudios de supervivencia y 5 fueron utilizados para los estudios de láser-Doppler y posteriormente, para las determinaciones analíticas bioquímicas e histológicas.

Los grupos establecidos fueron los siguientes:

- **Grupo C1.** Grupo Control 1, constituido por 25 animales a los que se inyectó 0'4 ml de suero fisiológico (SF) por vía intravenosa, 1 hora antes de la isquemia intestinal.

Transcurrido este tiempo, se les practicó la isquemia durante 120 minutos, pasando al concluir este período a retirárseles el microclamp.

De las 25 ratas, 20 fueron devueltas al estabulario, donde eran controladas diariamente hasta el 7º día, para establecer el grado de supervivencia. Al concluir el séptimo día, estos 20 animales fueron sacrificados mediante una sobredosis anestésica.

A los otros 5 animales se les incluyó en el estudio de láser-Doppler y al cabo de 1 hora de la reperfusión, fueron sacrificados y destinados a las pruebas analíticas e histológicas.

- **Grupo C2.** Grupo Control 2, formado por 25 animales a los que se les realizó la isquemia intestinal, inyectándoles 0'4 ml de SF en el momento de la reperfusión.

El resto del protocolo fue superponible al del grupo anterior, destinándose 20 ratas al estudio de supervivencia y las 5 restantes a las pruebas reseñadas.

- **Grupo P1.** Incluye 25 animales a los que se administró, a través de la v. dorsal del pene, 0'4 ml de pentoxifilina a una concentración de 1 mg/kg de peso, una hora antes de iniciar

la isquemia intestinal. Al terminar los 120 minutos de interrupción del flujo arterial, se inició la reperfusión.

De estos animales, 20 fueron conservados para control de la supervivencia y los otros 5 para la medición de flujo, mediante el láser-Doppler, siendo posteriormente empleadas para las determinaciones analíticas e histológicas.

- **Grupo P2.** Formado por un total de 25 ratas, cepa Wistar, a las que se les practicó la isquemia intestinal de 120 minutos de duración, administrándoles una dosis de 0'4 ml de pentoxifilina con una concentración de 1 mg/kg de peso, como en el grupo P1, con la diferencia de ser inyectada en el momento de la reperfusión.

El destino de los animales fue semejante al indicado en los otros grupos.

- **Grupo P3.** Consta de 25 animales a los que se realizó la isquemia-reperfusión intestinal por clampaje de la arteria mesentérica superior, durando este proceso 120 minutos. Se les administró como tratamiento 0'4 ml de pentoxifilina a una concentración de 10 mg/kg de peso, una hora antes de iniciar la isquemia.

Al igual que en los otros grupos, de las 25 ratas, 20 se volvieron al estabulario para estudio de supervivencia, hasta el 7º día en que fueron sacrificadas, y a las 5 restantes se les practicaron las determinaciones y estudios programados.

- **Grupo P4.** Formado por 25 animales a los que se realizó la isquemia-reperfusión según el protocolo general, variando la administración de la pentoxifilina que se inyectó a una concentración de 10 mg/kg de peso como en el grupo P3, pero el momento de la inyección fue al iniciar la reperfusión.

El estudio posterior de los animales siguió la misma distribución que en todos los grupos ya mencionados (Fig.11).

Grupo C1. 0´4 ml Suero fisiológico / 1 hora preischemia.

Grupo C2. 0´4 ml Suero Fisiológico / Reperusión

Grupo P1. 0´4 ml Pentoxifilina (1 mg/kg) / 1 hora preischemia.

Grupo P2. 0´4 ml Pentoxifilina (1 mg/kg) / Reperusión.

Grupo P3. 0´4 ml Pentoxifilina (10 mg/kg) / 1 hora preischemia.

Grupo P4. 0´4 ml Pentoxifilina (10 mg/kg) / Reperusión.

Fig. 11. Tratamiento según los grupos experimentales.

4. FÁRMACO EXPERIMENTAL: PENTOXIFILINA (PTX)

4.1. INTRODUCCIÓN

La selección de este fármaco para la realización del presente trabajo, se basó en las propiedades hemorreológicas del mismo, con la intención de ser valoradas en el caso concreto de la isquemia/reperfusión del intestino delgado.

Las acciones hemorreológicas son la base de su utilización en el tratamiento de vasculopatías periféricas, enfermedad cerebrovascular y una serie de enfermedades en las que existe una deficiente microcirculación regional. Entre las propiedades de la pentoxifilina podemos señalar su capacidad para aumentar la deformabilidad eritrocitaria, reduciendo la viscosidad sanguínea y disminuyendo la agregación plaquetaria, así como, la formación de trombos.

4.2. FARMACOCINÉTICA

La pentoxifilina (PTX) pertenece a la familia de las metilxantinas (Figura 12).

Su absorción es rápida, siendo ampliamente metabolizada.

En su eliminación participan distintas vías metabólicas, encontrando que más del 90% de una dosis de pentoxifilina se elimina por vía renal en forma de metabolitos.

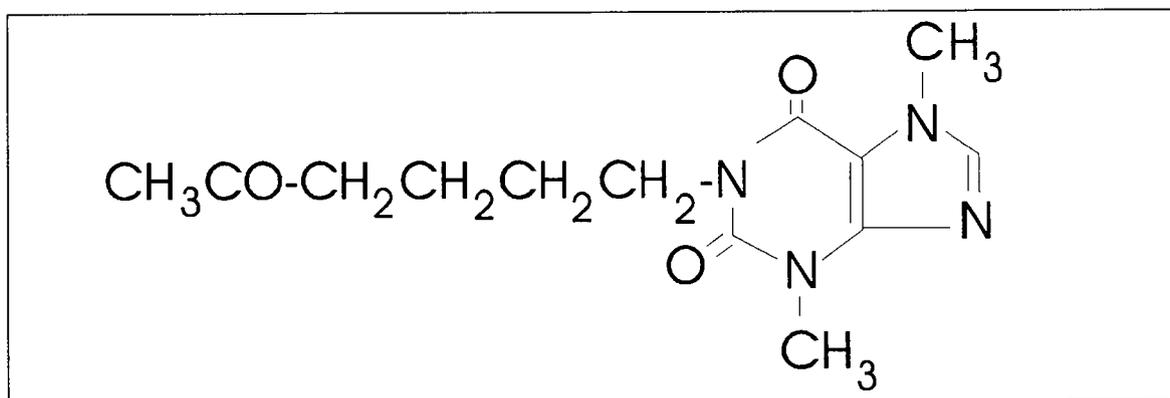


Figura 12: Fórmula química de la Pentoxifilina.

4.2.1. Absorción y concentraciones plasmáticas.

La pentoxifilina se absorbe, rápida y extensamente, a partir del tracto gastrointestinal, tanto en animales como en humanos. También se metaboliza con rapidez a nivel sistémico, alcanzándose las concentraciones plasmáticas máximas de PTX (aproximadamente 1100 µg/L) y uno de sus metabolitos (aproximadamente 2000 µg/L) a las 1.05 y 1.8 horas, respectivamente, después de la administración de una dosis de 400 mg en cápsula.

Según los trabajos realizados por Beermann B et al (11) en 1985, la administración de dosis orales únicas en cápsulas de 400 mg , daba lugar a una concentración plasmática media de 1102 µg/L, a las 1:05 horas. Si la dosificación era con tabletas de liberación retardada, la concentración detectada era de 299 µg/L a las 3:32 horas. Con esta formulación retardada se obtuvo una pico plasmático entre la 2 y 3 horas de la administración oral. El nivel de concentración posterior se mostró proporcional a la dosis y al tiempo transcurrido, aunque sin indicios de acumulación (79).

En el estudio realizado por Beermann et al (11) se observó que con los dos tipos de formulación, las concentraciones plasmáticas del metabolito 1, eran de 1937 µg/L y 343 µg/L a las 1.8 y 3.15 horas respectivamente. Utilizando una solución acuosa de PTX, las concentraciones plasmáticas máximas medias de la PTX y de sus metabolitos 1, 4 y 5, aumentaron proporcionalmente a la dosis, aunque sólo pudo demostrarse una estricta proporcionalidad para el metabolito 5.

Las concentraciones relativas del fármaco y sus metabolitos halladas fueron las siguientes:

metabolito 5 > metabolito 1 > pentoxifilina > metabolito 4

Coincidiendo con estos resultados los trabajos realizados por Smith RV et al (183) en 1986.

Para poder realizar un **estudio de biodisponibilidad** apropiado para las preparaciones de liberación retardada, Beermann B et al (11) diseñaron un protocolo con dosis repetidas; se administraron 400 mg de PTX, 3 veces al día durante 7 días. En este ensayo no se produjeron variaciones significativas en las concentraciones plasmáticas máximas para la PTX o sus metabolitos, en comparación con los valores alcanzados después de dosis únicas; sin embargo, las diferencias relativas entre las dos formulaciones se mantuvieron. La biodisponibilidad absoluta se calculó en 30'7% y 19'4% para la cápsula y la tableta de liberación retardada, respectivamente.

La comparación de la recuperación de los metabolitos después de la administración oral e intravenosa de PTX, indica que se produce una completa absorción de las dosis orales. Cuando se compararon con los valores de biodisponibilidad absoluta, los resultados obtenidos sugirieron una amplia recirculación enterohepática (11).

Otra consideración sobre las dosificaciones orales, es que su administración junto con alimentos reduce las concentraciones plasmáticas máximas de la pentoxifilina y del metabolito 1, así como el tiempo necesario para alcanzar estos niveles (224).

4.2.2. Distribución

La distribución de la pentoxifilina se produce rápidamente, no fijándose de forma significativa a las proteínas plasmáticas, por lo que la distribución es relativamente uniforme en todos los tejidos corporales.

No se ha observado acumulación del fármaco tras la administración de dosis repetidas.

Existen trabajos experimentales, en ratas y perros, que demuestran que las concentraciones de PTX son similares en cerebro, corazón, hígado, pulmón, riñón y músculo esquelético. Los niveles en todos los puntos mostraron un tiempo de distribución y de eliminación similares a los del plasma, lo que indica el escaso potencial de acumulación hística (36,51,169)

La pentoxifilina en su distribución incluye la leche materna, pasando a ésta con rapidez, siendo detectables el fármaco y sus metabolitos 2 horas después de la administración (224). Aunque se cree improbable que las cantidades transmitidas tengan importancia clínica.

4.2.3. Metabolismo y Excreción.

El metabolismo de este fármaco tiene lugar principalmente, por reducción, para formar el metabolito 1 y por oxidación, para formar los metabolitos 4 y 5. Se han detectado otros metabolitos, pero todavía están por determinar las vías metabólicas exactas (78,79).

La excreción en orina se produce mayoritariamente en forma del metabolito 5 y en menor cantidad como metabolito 4. La recuperación urinaria de estos metabolitos alcanza aproximadamente el 45 y 5% de la dosis, respectivamente. En la orina no se detectan cantidades significativas de pentoxifilina ni de metabolito 1.

Las recuperaciones urinarias de los metabolitos 4 y 5 tras administración intravenosa coinciden con las obtenidas tras administración oral (11).

Los pacientes con insuficiencia renal muestran una disminución del aclaramiento de la PTX. Para evitar la acumulación del fármaco en estos pacientes, debe ajustarse la dosis (188).

4.2.4. Vida Media.

Partiendo de la utilización en individuos sanos, la vida media de eliminación de la pentoxifilina, después de la administración de dosis orales de 400 mg, fue de 0.89 horas (cápsulas)

y 0.84 horas (fármaco en solución). Para los metabolitos 1, 4 y 5 se registraron valores casi idénticos de vida media de eliminación (11,183).

La vida media de la pentoxifilina tras la administración intravenosa (200 mg) ha sido calculada en 1 a 1.6 horas (1,78). Estos valores son mayores que los obtenidos tras la administración de la formulación en cápsulas.

Con las tabletas de liberación retardada, la vida media de eliminación de la PTX fue de 3.43 horas y la del metabolito 1 de 3.39 horas (11).

4.3. FARMACODINAMIA

Los efectos farmacodinámicos primarios de la pentoxifilina, se deben al aumento de la deformabilidad eritrocitaria y a la disminución de la viscosidad sanguínea. Aunque éstas sean las acciones más significativas podemos enumerar otras, algunas de ellas consecuencia de las ya señaladas.

a) Efectos directos sobre la composición sanguínea:

- Aumento de la deformabilidad eritrocitaria.
- Disminución de la viscosidad sanguínea y plasmática.
- Disminución de los niveles de fibrinógeno, con aumento de la capacidad de fibrinólisis.
- Inhibición de la agregación plaquetaria, espontánea e inducida.
- Estimula la síntesis y liberación de prostaciclina y reduce la síntesis del tromboxano.
- Reduce el número de trombos, potenciando la trombolisis.
- Actúa sobre la deformabilidad leucocitaria.

b) Efectos circulatorios:

- Circulación periférica. Mejora el flujo sanguíneo y aumenta la presión sanguínea.

-Circulación cerebral. Produce aumento de la microcirculación nutritiva cerebral. Incrementa la captación de oxígeno y el metabolismo de la glucosa a nivel central.

Los efectos nombrados han sido documentados por diversos trabajos, que nos ayudan a comprender la naturaleza de este fármaco y sus características.

Deformabilidad eritrocitaria.

La deformabilidad intrínseca del eritrocito está determinada por las propiedades viscoelásticas de la membrana, la viscosidad del fluido intracelular y la forma de la célula (34).

La elasticidad de la membrana depende a su vez, de las concentraciones de adenosin trifosfato (ATP) intracelular y de los iones calcio, de manera que, la depleción de ATP y el acúmulo de Ca^{++} intraeritrocitario provocan una disminución de la deformabilidad (221). La deformabilidad eritrocitaria está también influida por otros factores: las variaciones de la osmolaridad normal del plasma y el pH ácido, que causan rigidez de la membrana eritrocitaria (119).

Existe la referencia de unos estudios "in vitro", en los que se realizó una incubación de sangre de individuos sanos con PTX, lo que conducía a un aumento significativo de la filtrabilidad eritrocitaria en condiciones de envejecimiento (2,57); en condiciones de hiperosmolaridad, con adición de citrato (105); tras exposición al ácido láctico, y tras exposición a cloruro cálcico (177).

La pentoxifilina además, aumenta notablemente la deformabilidad eritrocitaria en pacientes con enfermedad arterial oclusiva crónica (44, 124), arteropatías diabéticas (94, 214), trastornos cerebrovasculares (121 170), pacientes sometidos a cirugía vascular o cardíaca (93) y en individuos sanos (56).

Existen trabajos de investigación que documentan la capacidad de la pentoxifilina de incrementar "in vitro", proporcionalmente a la dosis, los niveles de ATP de los eritrocitos de los pacientes arterioscleróticos y, en menor medida, de los individuos sanos (74). En trabajos experimentales con ratas, la pentoxifilina administrada por vía oral, produce un aumento significativo de ATP, nucleótidos de adenina totales y de la relación ATP/ADP en los eritrocitos (63). Hallazgos similares se obtuvieron en el hombre, tras la administración del fármaco, como muestran los estudios de Hensel A (74) y de Takamutsu S et al (195).

Kobaladze et al (99) observaron que en el caso de pacientes con cardiopatía isquémica, la administración de PTX a una dosis de 600 mg/día, disminuye el consumo de ATP eritrocitario, regulando los intercambios electrolíticos alterados por despolarización de la membrana.

Según otros trabajos, la PTX reduce la fragilidad osmótica de los eritrocitos, en pacientes con trastornos vasculares cerebrales o periféricos (65,141).

La pentoxifilina ejerce un efecto bifásico dependiente de la concentración de los iones Ca^{++} del eritrocito, que a su vez, afecta la fosforilización y el enlace cruzado de las proteínas de la membrana y, por tanto, la deformabilidad celular (103).

Hay autores como Seigffe D (178) que postulan, además de un efecto de la PTX sobre la deformabilidad eritrocitaria, una acción inhibitoria sobre la agregación eritrocitaria.

Viscosidad Sanguínea y Plasmática

La viscosidad sanguínea es un factor determinante en el flujo sanguíneo, que depende de propiedades específicas del eritrocito, así como del grado de viscosidad del plasma.

En un trabajo publicado por Ohshima N y Sato M (145) en 1991, se ensayó la administración de PTX a ratas por vía arterial, apreciándose una disminución de la viscosidad sanguínea, acompañada de un aumento del flujo sanguíneo en los capilares mesentéricos.

Guerrini et al (61) observaron que la administración oral de PTX en enfermos con circulación periférica alterada, conducía a reducciones significativas de la viscosidad sanguínea; también ha sido apreciado este efecto en pacientes con alteraciones cerebrovasculares (130).

Fibrinógeno plasmático

Se sabe que aproximadamente un 60% de los pacientes con deficiencias circulatorias, a nivel periférico o central, presentan niveles plasmáticos de fibrinógeno superiores a lo normal. Con la administración oral y parenteral de pentoxifilina, en pacientes con este tipo de patología, se ha conseguido una disminución de estos niveles, ya sea por aumento de la actividad fibrinolítica (5, 189), o por reducción en la producción del fibrinógeno (195).

Este efecto colabora, también, en la disminución de la viscosidad sanguínea.

Agregación plaquetaria y formación de trombos

Estudios realizados por Stefanovich V (188), utilizando "in vitro" PTX sobre plaquetas humanas y bovinas, demostraron que este fármaco aumentaba los niveles de adenosin monofosfato cíclico (AMPC), y que inhibía la fosfodiesterasa ligada a la membrana. Estos hechos conllevan una activación de una proteinquinasa que, a su vez, cataliza la fosforilización de las proteínas de membrana por el ATP, dando lugar a una inhibición de la agregación plaquetaria.

La administración de PTX a pacientes con problemas vasculares periféricos, mejora los índices de agregación plaquetaria y de los parámetros implicados en la formación de trombos. La PTX disminuye también la adhesión y agregación plaquetaria a las paredes de los vasos (4).

Otra acción de la pentoxifilina es la de estimular la síntesis y liberación de prostaciclina, lo que supone una reducción en la formación de una sustancia promotora de la agregación, el tromboxano (157).

Ambrus CM et al (2) realizaron investigaciones experimentales con monos, que demostraron que la PTX potencia la trombolisis inducida por la uroquinasa y la prostaciclina, la liberación de los activadores del plasminógeno y la activación de la fibrinólisis.

La pentoxifilina disminuye el riesgo de la trombosis venosa profunda postoperatoria y el embolismo pulmonar, en pacientes sometidos a cirugía general (44).

Deformabilidad leucocitaria

Los leucocitos, debido a su gran tamaño y a la complejidad de su estructura, pueden contribuir de forma significativa en la resistencia del flujo capilar. El papel de los leucocitos en el éstasis vascular está menos definido que el de los eritrocitos, aunque sí ha sido documentada su participación en los éstasis de origen leucémico (174).

Investigaciones realizadas por Schmalzer EA y Chien S (174) en 1984, con suspensiones de leucocitos a los que se añadía PTX, mostraron un aumento de la filtrabilidad de monocitos y leucocitos polinucleares, pero no de linfocitos. El grado de adhesión no se vio afectado por el fármaco, lo que indica que el incremento en la filtrabilidad se debía a cambios en la deformabilidad celular.

4.4. PENTOXIFILINA EN EL PROYECTO EXPERIMENTAL

4.4.1. Dosificación.

Se utilizaron dos tipos de concentración de la pentoxifilina.

- 1 mg/kg de peso

- 10 mg/kg de peso.

Teniendo en cuenta la conveniencia de aplicar una cantidad total de líquido no superior a 0'5 mililitros, se calculó la concentración del fármaco para adoptar un volumen total de inyección de 0'4 ml.

a) Grupo de ratas con una dosificación de 1 mg/kg de peso de PTX.

- Peso medio = 300 gr. Dosis de PTX = 0'3 mgr.

(Deben haber 0'3 mgr. de PTX en 0'4 ml de suero fisiológico).

- Se mezclaron 385 ml de suero fisiológico con una ampolla de Hemovas ®, que contiene 300 mg de pentoxifilina en 15 ml de solución.

b) Grupo de ratas con una dosificación de 10 mg/kg de peso de PTX.

- Dosis de PTX por rata = 3 mgr.

Deben haber 3 mgr. de PTX por cada 0'4 ml de suero.

- Se mezclaron 25 ml de suero fisiológico con una ampolla de Hemovas®.

4.4.2. Administración.

La administración en todos los grupos fue a través de la vena dorsal del pene, realizando la inyección lentamente y con el preparado previamente atemperado.

5. TÉCNICA QUIRÚRGICA

Como preparación para la intervención, los animales se mantuvieron en ayuno, sin retirar el aporte de agua, durante las 24 horas previas a la misma; siendo colocados en jaulas con rejilla inferior para evitar la ingestión de heces.

Al día siguiente, las ratas fueron retiradas de la jaula y pesadas en una balanza, para comprobar que permanecían dentro del peso exigido (250-300 gr); pasando entonces a inyectarles la anestesia, por vía intramuscular.

Dosis y preparado anestésico.

Las ratas fueron anestesiadas mediante una mezcla formado por los siguientes preparados comerciales:

- 25 mg/kg de peso de Ketamina (Ketolar ®)
- 20 mg/kg de peso de Diazepán (Valium ®)
- 1 mg/kg de peso de Atropina (Atropina ®)

De forma que cada 5 ml de la mezcla anestésica contenía:

2'5 ml de Ketamina + 2 ml de Diazepán + 0'5 ml de Atropina

La administración de la anestesia fue por vía intramuscular, en una de las patas posteriores.

Dosis de anestesia según el peso del animal:

Peso (gr)	250	275	300
Volumen (ml)	1'35	1'50	1'75

A las ratas pertenecientes a los grupos **C1**, **P1** y **P3**, es decir aquellas que requerían pretratamiento con suero fisiológico o pentoxifilina, se les administraron estas sustancias, a través de la vena dorsal del pene, 1 hora antes de proceder a la intervención (Figura 13).

Una vez anestesiados los animales, fueron fijados a la tablilla de experimentación en decúbito supino, por medio de 5 gomas elásticas, 4 para las extremidades y una por debajo de los incisivos superiores que les sujetaba a un fijador situado en la parte superior de la tablilla.

Con las ratas ya fijadas, se procedió al rasurado del abdomen, desde el hueco xifoides hasta la región genital, limpiando después esta zona con una solución antiséptica iodada.

Posteriormente se procedió a realizar una laparotomía media, lo suficientemente amplia para proporcionar un buen campo de visión (5-6 cm), separando mediante un autoestático los bordes de la incisión, quedando así visibles las asas intestinales que son retiradas hacia el flanco derecho. Al ser visible el riñón izquierdo y la entrada del pedículo vascular, se disecciona y libera con mucho cuidado los tejidos paraaórticos de la región suprarrenal, bien con disector o con ayuda de dos gasas, buscando la raíz de la arteria mesentérica superior. Se disecan los tejidos de alrededor, quedando en disposición de ser clampada la arteria (Figura 14).

Para comprobar realmente la identidad de la a. mesentérica, buscamos la vena porta en su entrada al hilio hepático, observando que por debajo de ella emerge el tronco arterial que habíamos independizado.

En este momento se procedió al clampaje del vaso con un microclamp, (Figura 15), seguidamente se cubrió la incisión con gasas impregnadas en suero fisiológico, para evitar la deshidratación, y se enfocó hacia el animal una fuente de calor externa, para impedir el enfriamiento del mismo.

El clampaje se mantuvo durante 120 minutos, al final de los cuales era retirado el clamp, iniciándose la reperusión (Figura 16).



Figura 13: Inyección en la vena dorsal del pene.

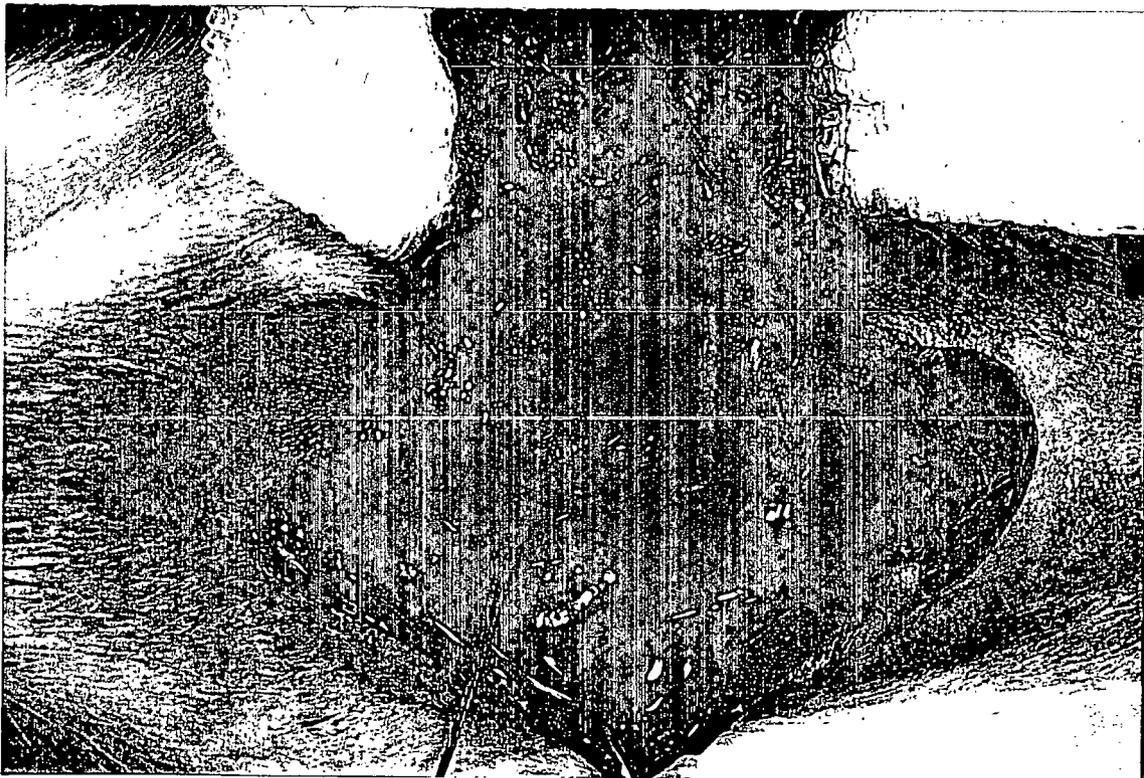


Figura 14: Liberación mediante ligadura de la arteria mesentérica superior.

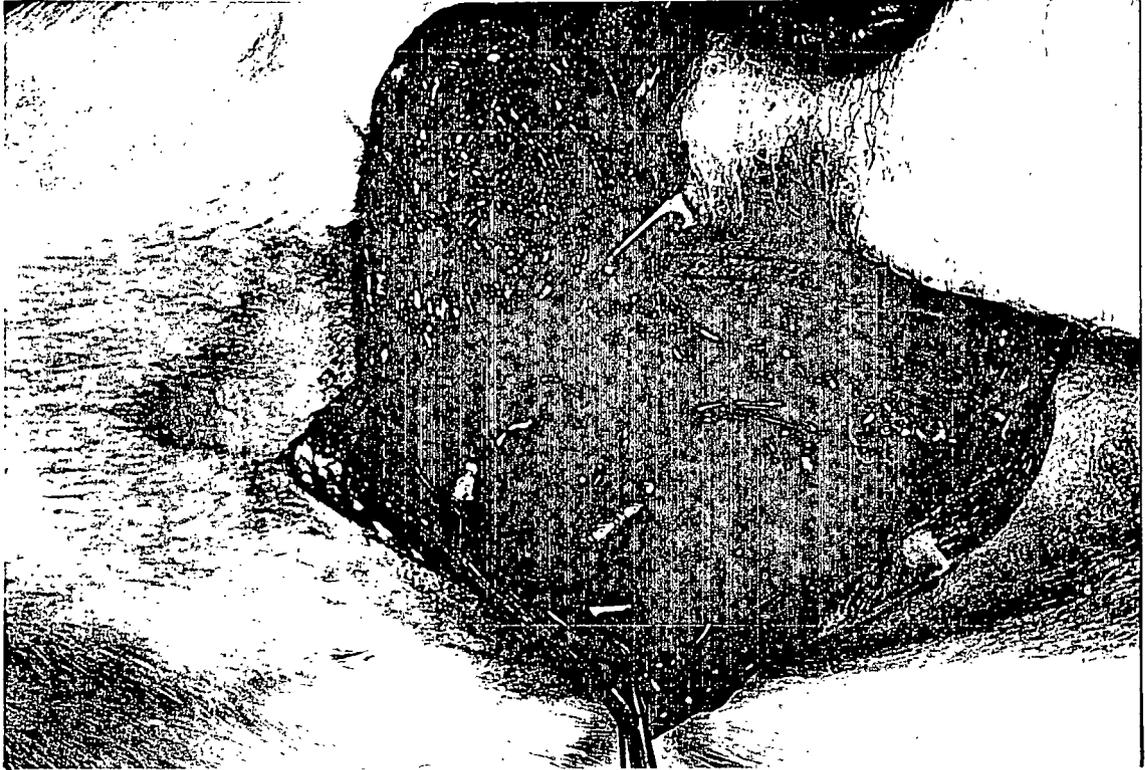


Figura 15: Clampaje de la arteria mesentérica superior.



Figura 16: Retirada del clamp tras los 120 minutos de isquemia.

En este momento, los grupos **C2**, **P2** y **P4**, recibieron el tratamiento farmacológico protocolizado, por vía intravenosa: suero fisiológico (grupo C2) o pentoxifilina (grupos P2 y P4); son los grupos que según el protocolo debían recibir el tratamiento farmacológico en el momento 0 de la reperfusión.

El cierre de la laparotomía se realizó mediante sutura.

Al terminar este proceso, se reintegraron las ratas al estabulario, para estudio de supervivencia, o bien se retuvieron para estudio de láser Doppler, pruebas bioquímicas e histológicas.

6. OBTENCIÓN DE PIEZAS Y MUESTRAS PARA ANALIZAR.

Una vez practicada la intervención, se procedió a reintegrar al estabulario las ratas destinadas al estudio de supervivencia (n=20) y las restantes (n=5), quedaron en la mesa de operaciones para realizarles distintas pruebas.

Técnica de Lavado.

Se localizó la vena cava inferior, pasando a realizar la **extracción de sangre**, por punción de la misma, mediante una jeringuilla de 5 cc, aspirando lentamente para evitar la hemólisis del suero. La sangre extraída se introduce inmediatamente en un tubo seco, para proceder a la separación del suero por centrifugado. Este suero será el utilizado para las determinaciones bioquímicas (Figura 17).

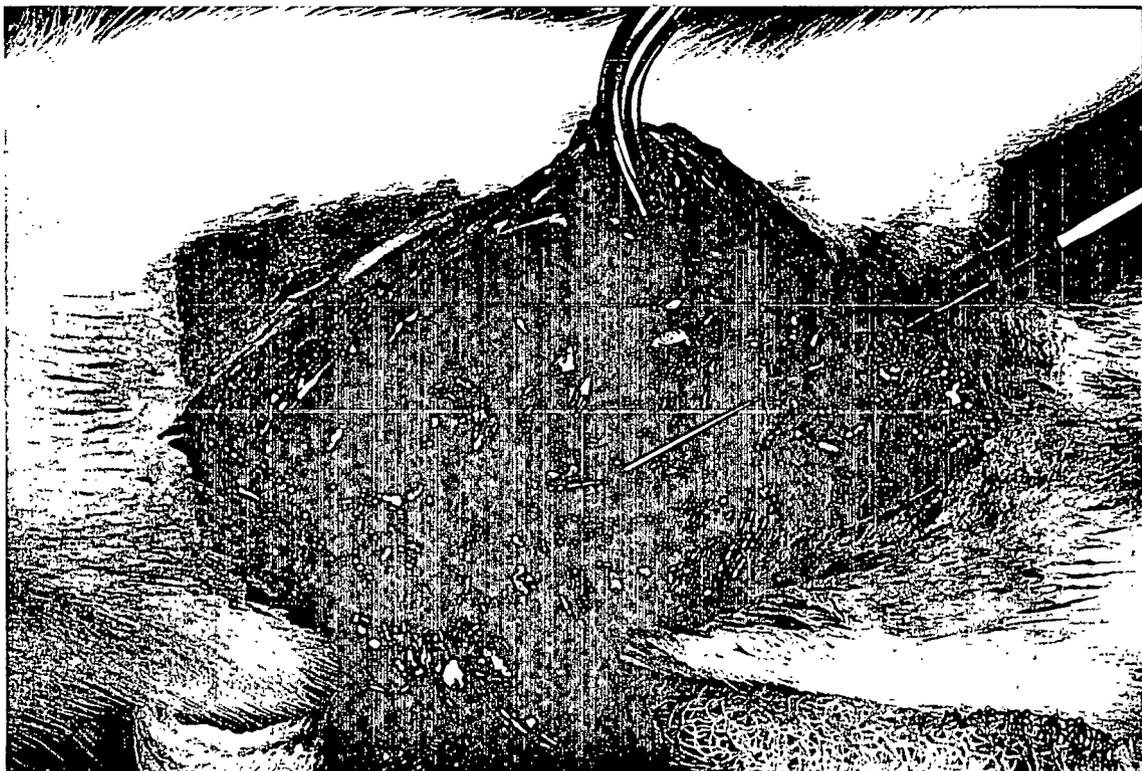


Figura 17: Extracción sanguínea.

Con el fin de eliminar todas las células que se encuentran en el espacio intravascular del intestino, se procedió al **lavado intestinal** según el procedimiento siguiente:

Tras la localización de la aorta y de la vena mesentérica inferior, se colocaron hilos de referencia en la porción yuxtadiafragmática de la aorta y la confluencia de la vena porta con la vena mesentérica.

Realizamos seguidamente una ligadura de ambas arterias renales, y aorta por debajo de la a. mesentérica superior, para dirigir el flujo solamente hacia la zona que deseamos perfundir, que es precisamente todo el territorio mesentérico.

Con el fin de evitar cualquier circulación colateral a través de las arcadas vasculares intestinales, se ligaron en masa mesenterio e intestino, en su porción más distal y más proximal, quedando totalmente identificada la zona de trabajo.

Se canalizó la aorta con un abocat, de forma ascendente, en la región comprendida desde la ligadura inferior hasta la referencia yuxtadiafragmática, quedando preparado el sistema de perfusión para el lavado intestinal.

La perfusión fue realizada con suero fisiológico frío al 0'9 %, mediante un sistema de goteo, al que se imprimió una presión equivalente a 110cc de H₂O.

Inmediatamente antes de iniciar el goteo, se procedió a la ligadura de la aorta en su extremo torácico y a la sección de la v. mesentérica, con el fin de dejar drenar los restos sanguíneos en el momento de iniciar el relleno del árbol vascular con suero fisiológico.

Se consideró suficiente un volumen de 50 cc de suero fisiológico para dejar limpio el circuito vascular aislado, observándose un cambio de coloración inmediato en todas las asas intestinales implicadas en el proceso, quedando de un color más blanquecino que el resto de los tejidos adyacentes.

Una vez finalizado este proceso, también fue lavado el interior del intestino, mediante un bolus de 25 a 30 cc de suero fisiológico frío, arrastrando así cualquier partícula de alimento o secreciones existentes en su interior (Figura 18).

La extracción de la porción intestinal a estudio, se realizó con rapidez para frenar cualquier proceso que pueda generarse a causa de la isquemia producida. Se mantuvieron los tejidos a baja temperatura mientras eran preparados para la realización de los cortes histológicos y las determinaciones de malonildialdehído y mieloperoxidasa.



Figura 18: Lavado intestinal

7.PRUEBAS ANALÍTICAS.

Dentro de estas determinaciones podemos distinguir:

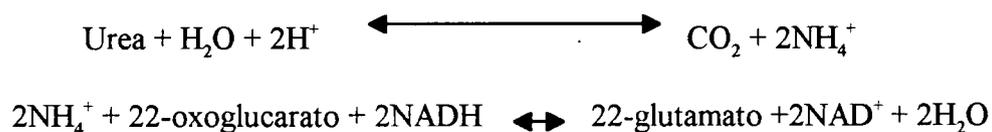
- Las realizadas en el suero de los animales (pruebas bioquímicas)
- Las practicadas en el tejido intestinal (pruebas de peroxidación lipídica y de actividad neutrofílica).

7.1. PRUEBAS BIOQUÍMICAS.

Las determinaciones que se realizaron en suero, mediante el autoanalizador de bioquímica MEGA de la casa comercial Merck®, fueron las siguientes:

- Urea.
- Creatinina.
- Sodio.
- Potasio.
- Calcio.
- Cloro.
- Fósforo.
- Lactato-deshidrogenasa.

Urea. La técnica de determinación se basa en la transformación de la urea mediante una reacción totalmente enzimática:



La disminución de la concentración de NADH, por unidad de tiempo, es proporcional a la de urea, la cual se mide por espectrofotometría.

Creatinina. Se realizó una técnica colorimétrica, basada en la capacidad de la creatinina de producir una coloración amarillo-naranja al unirse con el ácido picrico, en solución alcalina. La intensidad de esta reacción es proporcional a la concentración de creatinina.

Sodio, Potasio y Cloro. El método empleado para estas determinaciones fue el de electrodo ion selectivo.

Calcio. El calcio ionizado, Ca^{++} , reacciona con la O-cresoftaleina complexona, en medio alcalino, tomando una coloración violeta. La extinción de la coloración es proporcional a la concentración de calcio en el suero.

Lactato deshidrogenasa (LDH). Se determinó mediante una reacción fotométrica, siendo la velocidad de disminución de la concentración de NADH, directamente proporcional a la actividad de LDH en suero.

7.2. PRUEBAS DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA.

Determinación de Malonildialdehido (MDA).

El MDA es un metabolito resultante del proceso de peroxidación lipídica, que acontece durante la reperfusión del órgano sometido a isquemia, por lo que su determinación nos da información sobre la intensidad de este proceso.

Los niveles de MDA fueron determinados por reacción colorimétrica con el ácido tio-barbitúrico, como describieron Bieri JG y Anderson AA (16).

Las concentraciones de proteínas fueron determinadas según el método de Lowry OH et al (115).

Método:

1º- Preparación y conservación de la muestra.

Se lava el tejido intestinal con suero fisiológico y se separa una porción de aproximadamente 0'5 gr. Esta muestra se conserva en nitrógeno líquido hasta el momento de la homogenización.

2º- Homogenización.

Se extrae la muestra del nitrógeno y se coloca en el homogenizador Potter Sigma® junto con 4'5 ml de cloruro potásico al 1'15%, durante 15 segundos.

En un tubo pirex de cierre hermético se colocan 0'5 ml del homogenado, 3 ml de ácido fosfórico al 1% y 1 ml de ácido tiobarbitúrico al 0'6%.

Se mezcla unos segundos en un vortex y se introduce en un baño a 100°C durante 45 minutos.

Transcurrido este tiempo se enfría la muestra dentro de un batea con hielo y se le añaden 4 ml de N-butanol, agitándolo vigorosamente.

Se pasa a centrifugar la mezcla durante 15 minutos a 4000-5000 rpm.

Se separa el sobrenadante para realizar la lectura.

3º- Lectura.

Colocamos 1 ml del sobrenadante en una cubeta apropiada y pasamos a realizar dos lecturas en el espectrofotómetro, una con una longitud de onda de 535 nm y otra a 520 nm.

La diferencia entre las dos lecturas es el valor del MDA, expresado en nmol / mg de tejido.

Para el cálculo del valor proteico dividiremos este resultado por 0'04 obteniendo nmol / mg de proteína.

7.3. PRUEBAS DE ACTIVIDAD NEUTROFÍLICA.

Determinación de Mieloperoxidasa (MPO).

La MPO es una enzima presente en los gránulos primarios de los granulocitos segmentados neutrófilos. Esta enzima actúa catalizando la producción de ácido hipocloroso, a partir del ion Cl⁻ y del peróxido de hidrógeno, generado por estimulación de los neutrófilos.

El nivel de MPO nos proporciona información sobre la actividad neutrofílica en tejido intestinal, provocada por la isquemia/reperfusión que lleva a un secuestro y estimulación de estas células.

La determinación de MPO se realiza en cortes de tejido y su cuantificación se hace por métodos colorimétricos (164,168,193) o mediante isótopos por radioinmunoensayo (77).

En el presente trabajo se utilizó un método colorimétrico, basado en la técnica descrita por Renlund DG (164).

1°- Conservación de la muestra.

Se lava el intestino delgado con suero fisiológico al 0'9% y se realizan cortes de 0'5 gr. Estas fracciones de tejido se introducen inmediatamente en nitrógeno líquido, hasta la realización de la prueba.

2°- Homogenización y preparación de la muestra.

Recuperamos la muestra congelada y la introducimos en un tubo, con 2 ml de **tampón de homogenización**, el cual está formado por:

- 100 ml. de fosfato potásico 50 mM.
- 0'5 gr. de hexadecitrimetilamonio (HTAB).
- 0'146 gr. de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).

Homogenizamos 15 segundos y volvemos a añadir 2 ml del tampón anterior. Continuamos homogenizando durante 1 minuto y 45 segundos, tras los cuales volvemos a añadir 2 ml de tampón.

Pasamos a centrifugar la muestra, con un total de 6 ml de tampón, durante 30 minutos a 3000 rpm. Al terminar extraemos el sobrenadante y lo guardamos en un baño de hielo, hasta la lectura.

3°- Lectura por espectrofotometría.

En este paso utilizaremos un **tampón de ensayo** formado por:

- 25 ml fosfato potásico 100 mM
- 83'3 µl. de peróxido de hidrógeno al 0'3%
- 83'4 µl. de hidrocloreuro de O-dianisina al 1%
- Agua destilada hasta completar un volumen total de 50 ml

Para obtener el blanco patrón, colocamos 2 ml de este tampón en una cubeta de lectura.

Para la preparación de la muestra se pipetea 1'45 ml del tampón y 50 µl del sobrenadante de la muestra, ya separado, en una cubeta de lectura. Se incuba durante 3 minutos a temperatura ambiente.

Se pasa a la lectura en un espectrofotómetro con una longitud de onda de 460 nm.

El resultado se obtiene con la siguiente fórmula:

$$(Absorbancia Muestra - Absorbancia Blanco) / 2 = Unidades de MPO$$

8. LÁSER DOPPLER.

Para la medición de flujo microcirculatorio intestinal, se realizó un estudio de flujometría por láser Doppler, utilizando el flujómetro Periflux®, aplicado al intestino delgado, antes, durante y después de su isquemia.

8.1. CARACTERÍSTICAS DEL FLUJÓMETRO PERIFLUX PF3®.

Este flujómetro posee una frecuencia de 12 Khz y un tiempo constante de 0'2 segundos, estando conectado a un ordenador IBM Personal System 12 Model 70/386®, con monitor Type 8515 S/N 55-H8371®.

El flujómetro posee una fuente láser de 2 mV He-Ne, que produce una luz monocromática de 0'8 mm de anchura, la cual es transmitida al tejido directamente a través de 3 fibras ópticas. La potencia del rayo en el cabezal de la fibra es de 1 mW.

La fibra-sonda utilizada es la PF 308® (Perimed Suecia). Es una sonda multifibra y su colocación en el órgano es superficial, detectando los registros de la superficie intestinal.

La luz emitida se dispersa a través de las estructuras estáticas y dinámicas, siendo estas últimas las que provocan los cambios en la frecuencia del haz de luz dispersado. El cambio de frecuencia es proporcional al número y velocidad de las estructuras dinámicas, fundamentalmente de los eritrocitos. Cuanto mayor sea el número de eritrocitos y su velocidad, tanto mayor será el cambio experimentado en la frecuencia del rayo incidente y a la inversa. Existe pues una proporción directa entre las variaciones de frecuencia detectadas y el volumen del flujo sanguíneo.

Hay dos fibras ópticas que captan el haz de luz dispersado, y lo conducen a dos fotodetectores, donde se produce una demodulación automática, es la "unidad de detección". El

fotodetector transforma la señal luminosa en eléctrica y la conduce a la "unidad de procesamiento".

La señal pasa primero por un filtro potenciador W (W-Weighting filter®), formado en realidad por 4 filtros, donde se selecciona la frecuencia deseada. La señal filtrada es elevada al cuadrado, y con un voltaje proporcional al poder del fotodetector, se obtiene la señal correspondiente al valor instantáneo de la densidad del poder espectral Doppler.

El flujómetro Periflux® posee un circuito linealizador, incluido dentro de la unidad de procesamiento, para evitar resultados erróneos a causa de la multidispersión. El linealizador multiplica la señal recibida por un factor de corrección, de acuerdo con la concentración de eritrocitos.

8.2. MANTENIMIENTO Y CALIBRACIÓN DEL FLUJÓMETRO.

Antes de utilizar el flujómetro debe ser controlado mediante un calibrador estándar, formado por esferas de látex. El flujómetro se conecta a un ordenador IBM PC y las señales se analizan utilizando el programa "software Perisoft®". Los valores registrados son los niveles medios del flujo computado cada 15 segundos.

Semanalmente se controla el nivel 0 y la ganancia de la sonda PF 308®, mediante un osciloscopio (Hameg Instruments HM 205-2®) y la solución estándar Periflux Motility Standard PF 100®.

El procedimiento es el siguiente:

Conectamos el flujómetro a la red y esperamos 30 minutos; a continuación se introduce la sonda en el orificio "Probe test" del flujómetro, esperando 2 minutos hasta que el valor se estabiliza entre 0 y 0'2 unidades de perfusión (UP), valor admitido como 0.

Para controlar la ganancia utilizamos la solución de partículas de látex, que previamente habremos atemperado. Colocamos la sonda en el interior del frasco que contiene las partículas; al cabo de 2 minutos procederemos a realizar la lectura en el flujómetro (250 ± 20 UP) y en el osciloscopio ($2'5$ V). Si la lectura no es correcta, se irá variando el potenciómetro de calibración, hasta regularla, momento en el que ya podemos comenzar las lecturas, lavando previamente la sonda con agua bidestilada.

8.3. ADAPTACIÓN DEL LÁSER DOPPLER EN INTESTINO DELGADO.

El estudio microcirculatorio por láser, se practicó en 5 ratas de cada uno de los grupos. Estos animales son los que posteriormente pasarán a ser utilizados para las pruebas bioquímicas e histológicas.

Procedimiento:

Primeramente se calibrará el flujómetro y la sonda, como ha sido expuesto.

Una vez realizada la laparotomía media y bien aislada la región mesentérica del intestino delgado, se opoya la sonda sobre esta zona comenzando los registros 30 minutos antes de practicar la isquemia, hasta 1 hora después de establecer la reperfusión.

Los registros se recogen de forma ininterrumpida durante todo el proceso, siendo los datos introducidos en el ordenador, que realizará la curva de lectura (Figura 19).

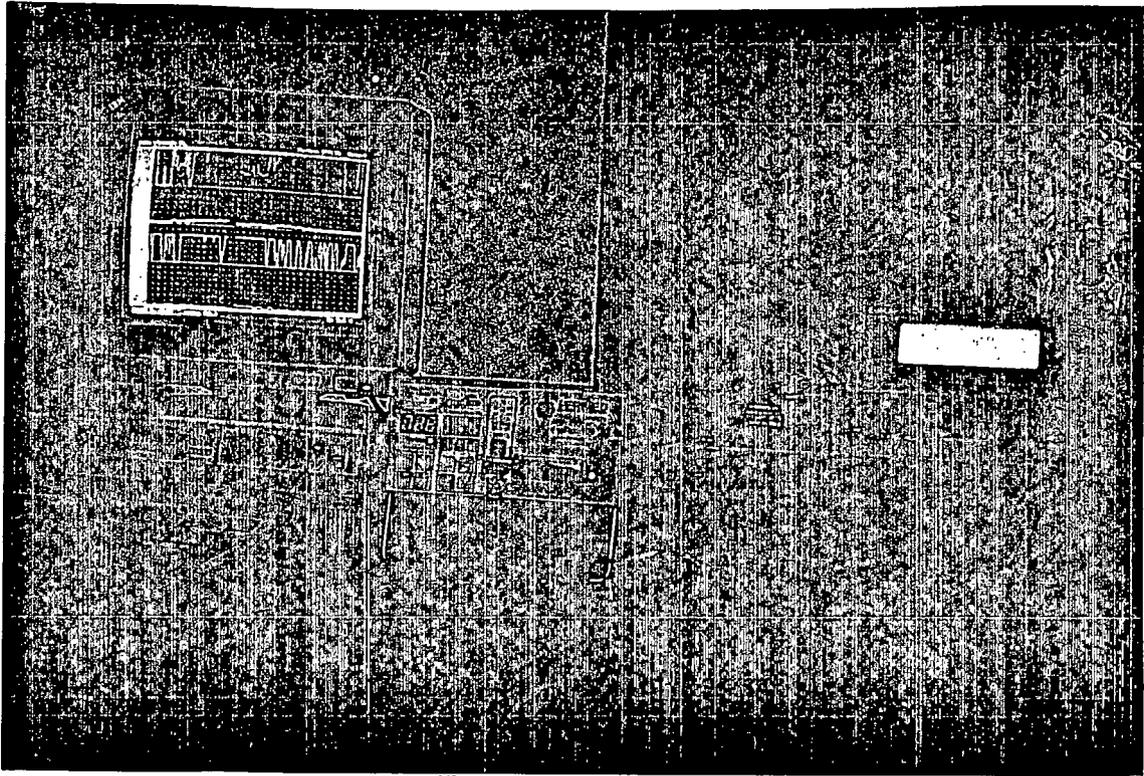


Figura 19: Instalación para el estudio Láser-Doppler.

9. HISTOLOGÍA

El estudio histológico se realizó en 5 ratas por grupo, que son las mismas que han servido para la medición del flujo sanguíneo por láser Doppler y para las pruebas bioquímicas.

Se practicó la exéresis del intestino, después de una hora de reperfusión. separando el segmento de intestino delgado que presentaba signos de isquemia,

Se introdujeron las muestras en nitrógeno líquido, para su conservación hasta el momento de procesarlas.

Procedimiento:

Primero se realizó la fijación de las muestras.

El tejido extraído es deshidratado mediante alcohol etílico a distintas concentraciones (50%, 70%, 80% y 100%). Después se pasaron por xilol al 100%.

Se le realizó el parafinado, procediendo a cortar la pieza utilizando un microtomo de 2 μ .

Para quitar la parafina se introdujeron los cortes en una estufa a 60°C, durante una hora, inmersos en un recipiente con xilol.

Se pasan por alcohol etílico al 100%, 70% y 50%, lavando posteriormente con agua.

En este momento ya puede procederse a la tinción de las preparaciones.

Tinciones:

1- Tinción de Hematoxilina-Eosina.

- 5 minutos en hematoxilina Harris. Se lava con agua.
- 5 segundos en carbonato de litio. Se lava con agua.
- 5 minutos en eosina ácida. Se lava con agua.

2- Tinción de Naftol As-D Cloroacetato.

- 3 gotas de pararrosanilina al 4%.
- 3 gotas de nitrito sódico al 4%. Se agita 60 segundos.
- Se añaden 60 ml de tampón buffer con un pH de 7'62. Se mezcla todo y se ajusta el pH a 6'3 mediante ácido clorhídrico 2N.
- Se disuelven 20 mg de naftol As-D cloroacetato en 20 ml de dimetilformamida. Se filtra.
- Se incuban las preparaciones en esta solución durante 1 hora y se lava con agua.

Esta tinción pone en evidencia los leucocitos neutrófilos contenidos en las muestras tisulares, que adquieren una coloración rosada.

Las preparaciones ya teñidas son deshidratadas nuevamente con alcohol etílico al 50, 70 y 100%. Se lavan con xilol y se les cubre con un preparado de permanencia (montaje con Entellán).

El estudio de las preparaciones se realizó a microscopía óptica, a 400 y 1000 aumentos (por inmersión), valorando el grado de la lesión isquémica, mediante la tinción de hematoxilina-eosina y el nivel de infiltración neutrofilica con la tinción de naftol.

10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS.

Para la valoración de los resultados se han utilizado los programas "Stat View" y "Graph" en un ordenador Macintosh, y los programas "Harvard Graphics" y "Power-Point" en un ordenador PC.

La comparación de los porcentajes en los estudios de supervivencia, se efectuó con la prueba de **Ji-cuadrado**, calculándose el grado de significación estadística.

En el caso de variables cuantitativas (pruebas bioquímicas, MDA y MPO) al tratarse de la comparación de más de dos grupos, se utilizó el **test ANOVA**, que nos permitió conocer la existencia de relaciones lineales de las variables. Con el fin de determinar entre qué grupos se establecían las diferencias estadísticamente significativas, se realizó un test de comparaciones múltiples, **test de Fisher**.

En todos los casos el nivel de significación se estableció para un $\alpha = 0'05$.

RESULTADOS

1. ESTUDIOS DE SUPERVIVENCIA.

Los estudios de supervivencia fueron realizados en 20 ratas de cada grupo, a las que previamente se les realizó la isquemia intestinal de 120 minutos de duración, según el protocolo. El control de estos animales fue diario durante 7 días.

La supervivencia total, por grupos fue del 45% en el C1, del 50% en el C2, del 55% en el P1, del 60% en el P2, del 60% en el P3 y del 65% en el P4 (Tabla I, Figura 20)

<i>SUPERVIVENCIA</i>					
GRUPO	Nº RATAS	1º DIA	3º DIA	5º DIA	7º DIA
C1	20	18 (90%)	15 (75%)	10 (50%)	9 (45%)
C2	20	17 (85%)	12 (60%)	10 (50%)	10 (50%)
P1	20	16 (80%)	14 (70%)	11 (55%)	11 (55%)
P2	20	18 (90%)	14 (70%)	12 (60%)	12 (60%)
P3	20	15 (75%)	14 (70%)	13 (65%)	12 (60%)
P4	20	18 (90%)	16 (80%)	14 (70%)	13 (65%)

Tabla I: Supervivencia por grupos, en los días 1º, 3º, 5º y 7º.

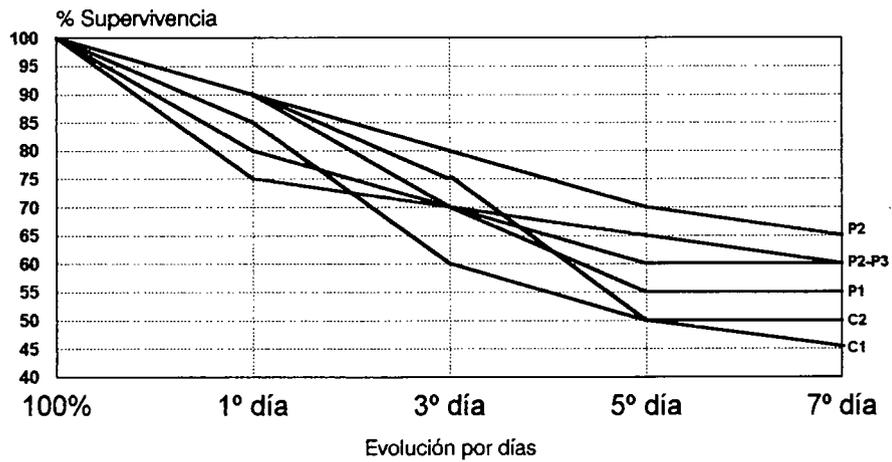


Figura 20: Porcentaje de Supervivencia por días.

Para la comparación de los porcentajes de supervivencia entre los distintos grupos se utilizó la prueba de J^2 , obteniendo los siguientes resultados:

Entre los grupos **P1** y **C1** $X^2=0'4$, $p=0'527$; entre los grupos **P4** y **C1** $X^2=1'61$ y $p=0'2056$; entre los grupos **P2** y **C2** $X^2=0'404$ y $p=0'525$; entre los grupos **P3** y **C2** $X^2=0'404$ y $p=0'525$; entre los grupos **P1** y **P2** $X^2=0'102$ y $p=0'7491$; entre los grupos **P3** y **P4** $X^2=1'07$ y $p=0'744$; entre los grupos **P1** y **P4** $X^2=0'417$ y $p=0'51$; entre los grupos **P1** y **P3** $X^2=0'102$ y $p=0'74$; entre los grupos **P2** y **P3** $X^2=0$ y $p=1$ y entre los grupos **P2** y **P4** $X^2=0'104$ y $p=0'744$.

No se hallaron diferencias significativas en la supervivencia final de los distintos grupos, tanto entre los tratados con Pentoxifilina (P1 a P4), como entre estos grupos y los controles, C1 y C2 (Figura 21).

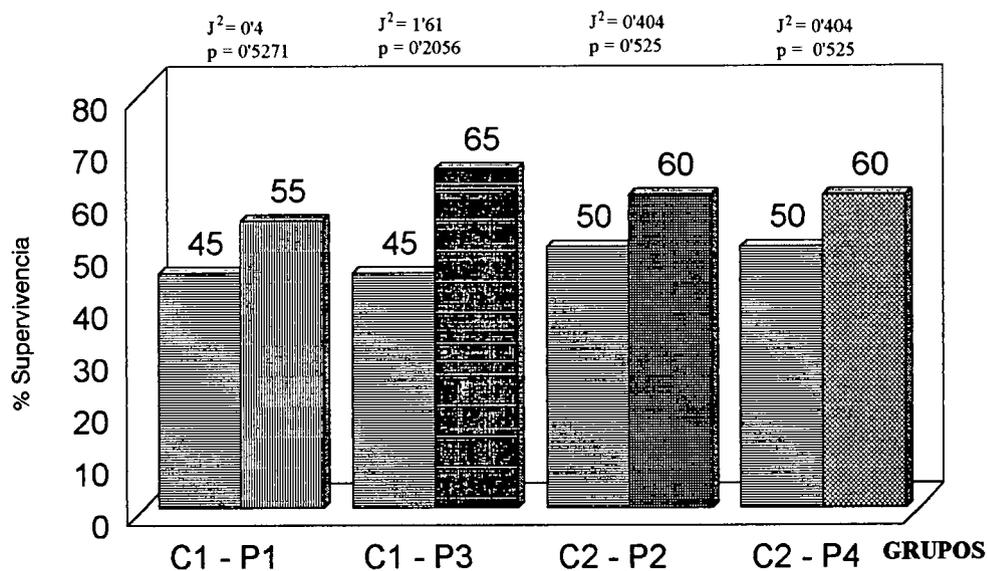


Figura 21: Supervivencia de cada grupo (P1, P2, P3 y P4) comparada con los grupos controles (C1 y C2).

2. RESULTADOS DE LAS PRUEBAS BIOQUÍMICAS.

2. 1. UREA.

Este parámetro fue determinado en el suero de 5 ratas por grupo. Las medias obtenidas en la determinación de urea, en los distintos grupos fueron las siguientes: grupo C=72'2 mg/dl; grupo P1=75'2 mg/dl; grupo P2=53'8 mg/dl; grupo P3=73'8 mg/dl; grupo P4=50'8 mg/dl. Estos datos revelan una disminución en los niveles de urea, de los grupos tratados con pentoxifilina administrada en el momento de la reperfusion (Tabla II).

UREA	MEDIA	DESV. STD.	ERR. STD.
Grupo C	72'2	14'237	6'637
Grupo P1	75'2	7'463	3'338
Grupo P2	53'8	9'365	4'188
Grupo P3	73'8	4'382	1'960
Grupo P4	50'8	4'087	1'828

Tabla II: Tabla de medias, desviación y error estándar de los niveles de Urea en los distintos grupos.

Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó el test de ANOVA. Se compararon los distintos grupos con el grupo control, para conocer el grado de significancia, observándose diferencias significativas entre los distintos grupos (Tabla III).

UREA	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	VALOR DE F	VALOR DE P
Grupos	4	3048'560	9.976	0.0001
Residual	20	1528'000		

Tabla III: Test Anova para las determinaciones de Urea.

Se aplicó un test de comparaciones múltiples, test de Fisher, para saber entre qué grupos se encontraban estas diferencias estadísticamente significativas.

Se hallaron dichas diferencias entre los grupos P2 y P4, frente al grupo control.

No se hallaron diferencias entre los grupos P2 y P4 .

Estas relaciones vienen reflejadas en la tabla IV.

UREA	DIFERENCIA DE LAS MEDIAS	VALOR DE P	DIFERENCIA SIGNIFICATIVA
Grupos C y P1	0	-	NO
Grupos C y P2	21'4	0'001	SI
Grupos C y P3	1'4	0'8027	NO
Grupos C y P4	24'4	0'0003	SI
Grupos P1 y P2	21'4	0'0010	SI
Grupos P1 y P3	1'4	0'8027	NO
Grupos P1 y P4	24'4	0'0003	SI
Grupos P2 y P3	-20	0'0017	SI
Grupos P2 y P4	3	0'5933	NO
Grupos P3 y P4	23	0'0005	SI

Tabla IV: Test de Fisher. Comparación de los resultados de Urea por grupos.

A continuación se muestra un diagrama de barras con los niveles de urea, para una observación más detallada de las diferencias encontradas entre los distintos grupos (Figura 22).

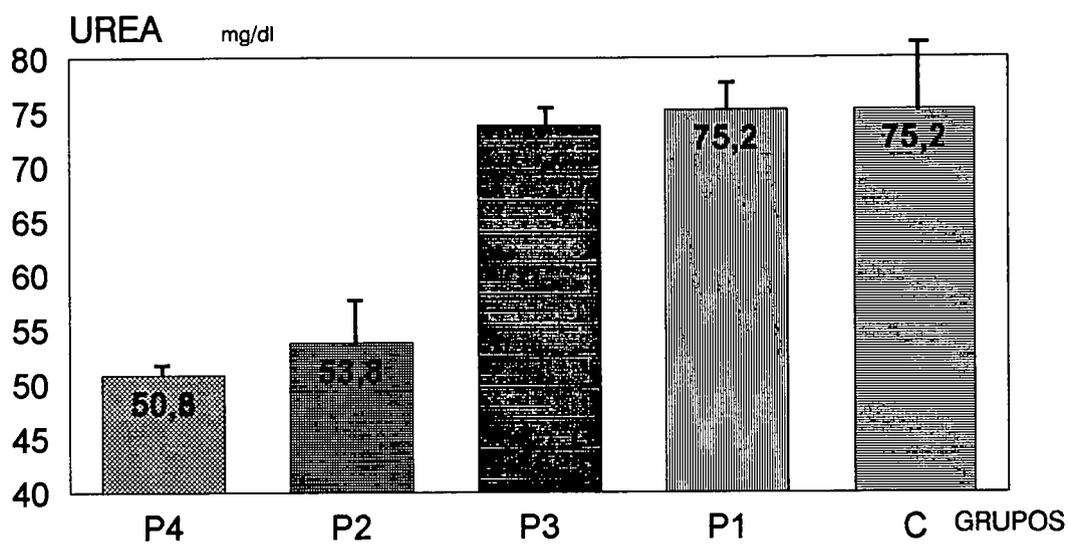


Figura 22: Representación gráfica de las medias y error estándar de los niveles de Urea, en los distintos grupos.

2.2. CREATININA.

Las medias obtenidas con la determinación serológica de la creatinina fueron las siguientes: grupo C= 1'18 mg/dl; grupo P1= 0'88 mg/dl; grupo P2= 0'72 mg/dl; grupo P3= 1'02 mg/dl; grupo P4= 0'80 mg/dl. Los resultados reflejan una disminución en el valor medio de la creatinina en los grupos tratados con pentoxifilina, con respecto al grupo control (Tabla V).

CREATININA	MEDIA	DESV. STD.	ERR. STD.
Grupo C	1'18	0'084	0'037
Grupo P1	0'88	0'110	0'049
Grupo P2	0'72	0'192	0'086
Grupo P3	1'02	0'084	0'037
Grupo P4	0'80	0'158	0'071

Tabla V: Niveles de Creatinina: medias, desviación y error estándar en los distintos grupos.

Se aplicó un test de ANOVA para analizar los datos obtenidos y observar el grado de significancia entre los grupos P1 a P4 (tratados con pentoxifilina) y el grupo control. El test demostró la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre ellos (Tabla VI).

CREATININA	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	VALOR DE F	VALOR DE P
Grupos	4	0'668	9'489	0'0002
Residual	20	0'352		

Tabla VI: Test Anova para el parámetro Creatinina.

Al realizar el test de Fisher o de comparación múltiple (Tabla VII), observamos que existen diferencias significativas entre los Grupos P1, P2y P4, frente al Grupo C.

No se encontró diferencia significativa entre el grupo P3 y el control; tampoco entre los grupos P2 y P4 (estos últimos corresponden a los que recibieron la pentoxifilina en el momento de la reperfusión).

Se hallaron diferencias entre los grupos P2 y P3, y entre P3 y P4.

CREATININA	DIFERENCIA DE LAS MEDIAS	VALOR DE P	DIFERENCIA SIGNIFICATIVA
Grupos C y P1	0'30	0'0019	SI
Grupos C y P2	0'46	<0'0001	SI
Grupos C y P3	0'16	0'0710	NO
Grupos C y P4	0'38	0'0002	SI
Grupos P1 y P2	0'16	0'0710	NO
Grupos P1 y P3	-0'14	0'1108	NO
Grupos P1 y P4	0'08	0'3517	NO
Grupos P2 y P3	-0'30	0'0019	SI
Grupos P2 y P4	-0'08	0'3517	NO
Grupos P3 y P4	0'22	0'0163	SI

Tabla VII: Test de Fisher para la Creatinina.

Para una mejor comprensión de estos resultados realizamos un diagrama de barras (Fig.23).

En éste se muestra la relación de los niveles de creatinina entre los grupos tratados con pentoxifilina y el control.

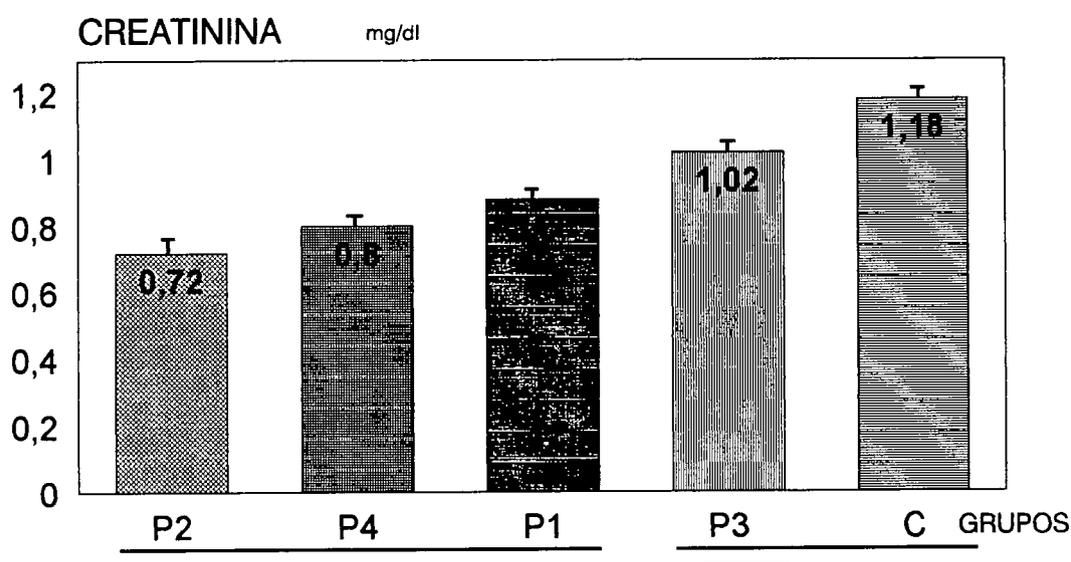


Figura 23: Representación gráfica de las medias y el error estándar de los niveles de Creatinina en los distintos grupos.

2.3. SODIO.

Las medias obtenidas en la determinación del sodio en cada grupo fueron las siguientes: grupo **control**= 141'8 mEq/l; grupo **P1**= 138'4 mEq/l; grupo **P2**= 140'2 mEq/l; grupo **P3**= 140'8 mEq/l; grupo **P4**= 142'8 mEq/l.

No se aprecian diferencias entre los grupos tratados y el grupo control (Tabla VIII).

SODIO	MEDIA	DESV. STD.	ERR. STD.
Grupo C	141'8	2'588	1'158
Grupo P1	138'4	2'302	1'030
Grupo P2	140'2	3'033	1'356
Grupo P3	140'8	3'421	1'53
Grupo P4	142'8	0'837	0'374

Tabla VIII: Tabla de medias para los valores de Sodio, desviación estándar y error estándar.

Se realizó un test ANOVA, con el fin de comparar los grupos tratados con pentoxifilina con el grupo control, y ver de esta forma si existían diferencias estadísticamente significativas entre ellos.

El estudio demostró que no había diferencia entre ellos (Tabla IX).

SODIO	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	VALOR DE F	VALOR DE P
Grupos	4	55.6	2.068	0'1232
Residual	20	134.4		

Tabla IX: Tabla ANOVA de los resultados de Sodio.

No se practicó el test de Fisher al resultar ya negativo el estudio de las diferencias, realizado mediante el test de ANOVA.

Los resultados obtenidos para el sodio los podemos visualizar en la Figura 24, donde se describen en un diagrama de barras los niveles de sodio de los grupos tratados con Pentoxifilina y el Grupo Control, sus errores estándar y las diferencias significativas entre los diferentes grupos.

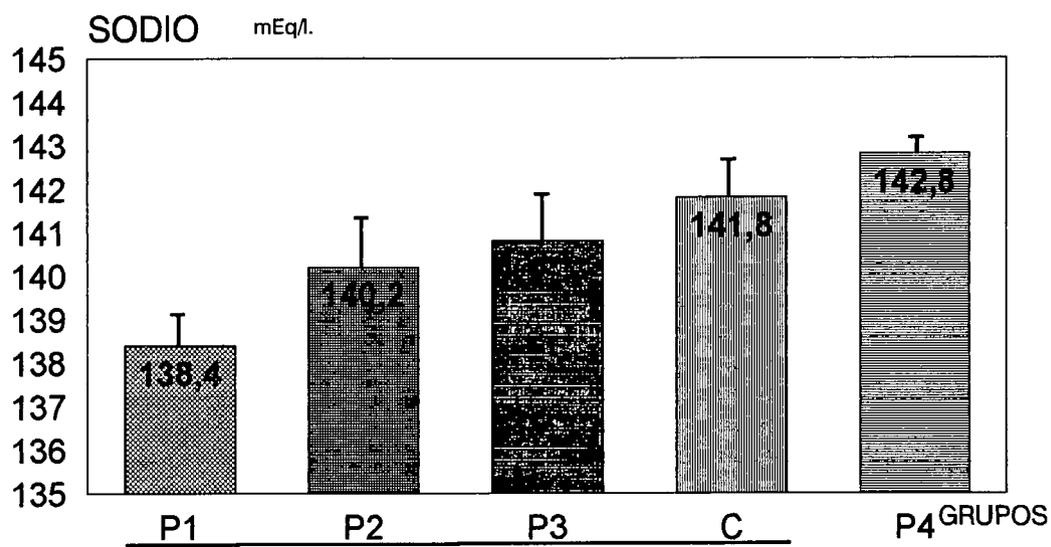


Figura 24: Representación gráfica de las medias y error estándar del Sodio.

2.4. POTASIO.

Las medias de los resultados obtenidos para la determinación de potasio en los distintos grupos, fueron las siguientes: grupo **Control**= 10'5 mEq/l; grupo **P1**= 7'9 mEq/l; grupo **P2**= 6'8 mEq/l; grupo **P3**=8'4 mEq/l; grupo **P4**= 7'4 mEq/l.

Se observa una disminución en los niveles de potasio de los grupos tratados con fármaco, respecto al grupo control (Tabla X).

POTASIO	MEDIA	DESV. STD.	ERR. STD.
Grupo C	10'5	0'579	0'259
Grupo P1	7'9	0'532	0'238
Grupo P2	6'8	0'354	0'158
Grupo P3	8'4	0'623	0'279
Grupo P4	7'4	0'746	0'334

Tabla X: Medias, desviación estándar y error estándar de los diferentes grupos para la determinación de Potasio.

A los resultados obtenidos se les aplicó un test de ANOVA, para saber si existían diferencias estadísticamente significativas entre los grupos tratados y el control. El test aplicado demostró la existencia de diferencias entre ellos (Tabla XI).

POTASIO	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	VALOR DE F	VALOR DE P
Grupos	4	39'854	29'512	<0'0001
Residual	20	6'752		

Tabla XI: Tabla ANOVA para la determinación de Potasio.

Posteriormente se realizó un test de Fisher, para saber si habían diferencias entre todos los grupos. Se encontraron diferencias significativas entre el grupo control y los 4 grupos con tratamiento; entre los grupos P1 y P2: entre P2 y P3; entre P3 y P4 (Tabla XII).

No se hallaron diferencias entre los grupos P1 y P3 (ambos con la pentoxifilina administrada 1 hora antes de la isquemia), ni tampoco entre P2 y P4 (en estos grupos la pentoxifilina se administró en el momento de la reperusión).

POTASIO	DIFERENCIA DE LAS MEDIAS	VALOR DE P	DIFERENCIA SIGNIFICATIVA
Grupos C y P1	2'54	<0'001	SI
Grupos C y P2	3'70	<0'001	SI
Grupos C y P3	2'06	<0'001	SI
Grupos C y P4	3'08	<0'001	SI
Grupos P1 y P2	1'16	0'005	SI
Grupos P1 y P3	-0'48	0'2063	NO
Grupos P1 y P4	0'54	0'1573	NO
Grupos P2 y P3	-1'64	0'0002	SI
Grupos P2 y P4	-0'62	0'1071	NO
Grupos P3 y P4	1'02	0'0117	SI

Tabla XII: Test de Fisher, para la determinación de Potasio.

Para visualizar mejor los resultados, construimos un diagrama de barras con las medias de los valores de potasio, obtenidos en los distintos grupos (Figura 25).

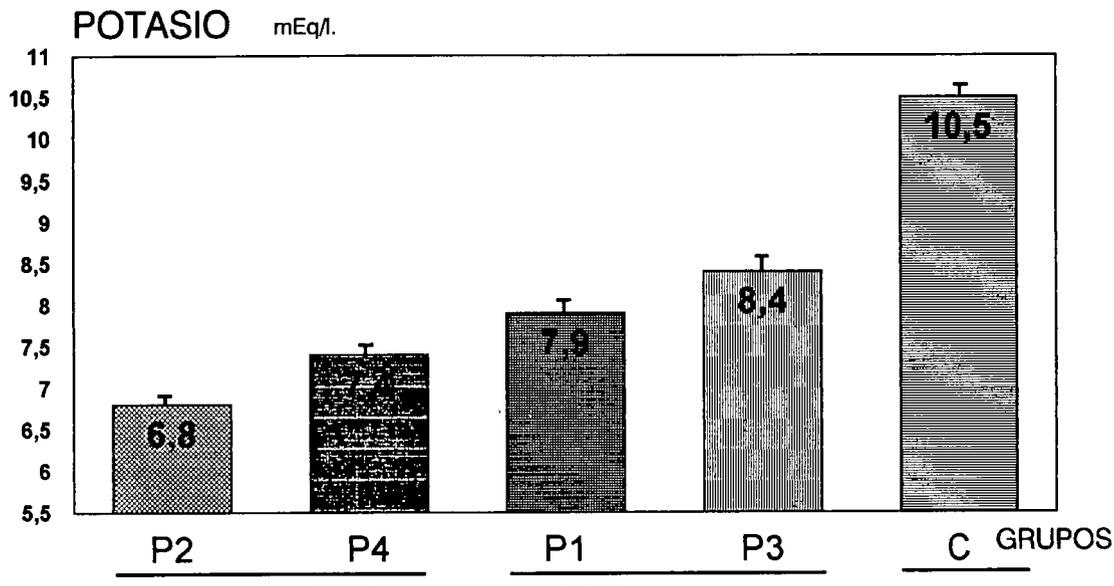


Figura 25: Representación gráfica de las medias y error estándar de los niveles de Potasio, en los distintos grupos.

2.5. CALCIO.

La media de los resultados de calcio en cada grupo fueron las siguientes: grupo C=11'1 mg/dl; grupo P1= 9,4 mg/dl; grupo P2= 8'8 mg/dl; grupo P3= 9'8 mg/dl; grupo P4=8'8 mg/dl.

Estos resultados muestran una cierta disminución de los niveles de calcio en todos los grupos tratados con Pentoxifilina, respecto al grupo control (Tabla XIII).

CALCIO	MEDIA	DESV. STD.	ERR. STD.
Grupo C	11'1	0'432	0'193
Grupo P1	9'4	0'241	0'108
Grupo P2	8'8	0'394	0'176
Grupo P3	9'8	0'179	0'08
Grupo P4	8'8	0'336	0'15

Tabla XIII: Medias, desviación estándar y error estándar de Calcio.

Se aplicó a estos resultados un test de Anova, para apreciar la existencia o no de diferencias significativas entre el grupo control y los grupos tratados con Pentoxifilina (Tabla XIV).

El test demostró que habían diferencias entre estas agrupaciones.

CALCIO	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	VALOR DE F	VALOR DE P
Grupos	4	18'78	43'073	<0'0001
Residual	20	2'18		

Tabla XIV: Test Anova para las determinaciones de Calcio.

Con el fin de conocer exactamente entre qué grupos se encuentran las diferencias estadísticamente valorables, añadimos al estudio un test de Fisher, para comparaciones múltiples (Tabla XV).

Este estudio demostró diferencias entre los grupos control y los 4 tratados con pentoxifilina; entre P1 y P2, entre P1 y P4, entre P2 y P3, entre P3 y P4.

No se hallaron diferencias entre los grupos P1 y P3 (administración de pentoxifilina a distintas dosis, pero ambas 1 hora antes de la isquemia); tampoco entre los grupos P2 y P4.

CALCIO	DIFERENCIA DE LAS MEDIAS	VALOR DE P	DIFERENCIA SIGNIFICATIVA
Grupos C y P1	1'74	<0'0001	SI
Grupos C y P2	2'38	<0'0001	SI
Grupos C y P3	1'36	<0'0001	SI
Grupos C y P4	2'32	<0'0001	SI
Grupos P1 y P2	0'64	0'0061	SI
Grupos P1 y P3	-0'38	0'0838	NO
Grupos P1 y P4	0'58	0'0116	SI
Grupos P2 y P3	-1'02	<0'0001	SI
Grupos P2 y P4	-0'06	0'7768	NO
Grupos P3 y P4	0'96	0'0002	SI

Tabla XV: Test de Fisher para las determinaciones de Calcio.

Para una mejor comprensión de estos resultados, la figura 26 muestra la relación de los mismos en los distintos grupos, mediante un diagrama de barras.

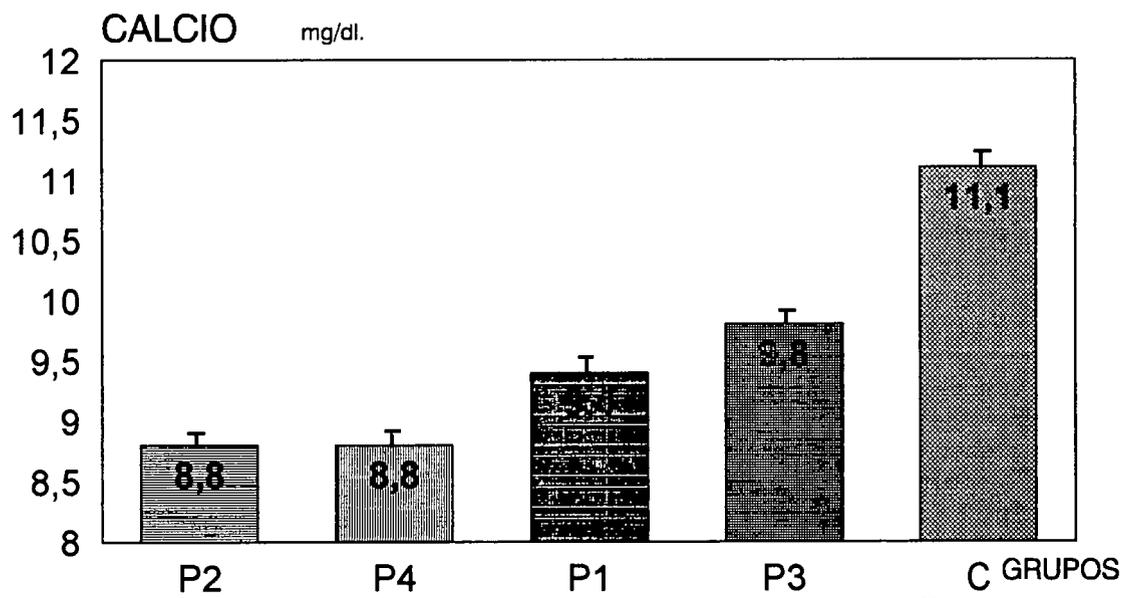


Figura 26: Representación gráfica de las medias y error estándar de los niveles de calcio, en los distintos grupos.

2.6. CLORO.

Las medias obtenidas en la determinación del cloro para los distintos grupos fueron las siguientes: grupo **Control**= 116'8 mEq/l; grupo **P1**= 101'0 mEq/l; grupo **P2**= 104'4 mEq/l; grupo **P3**= 94'6 mEq/l; grupo **P4**= 101'4 mEq/l (Tabla XVI).

CLORO	MEDIA	DESV. STD.	ERR. STD.
Grupo C	116'8	10'964	4'903
Grupo P1	101'0	2'550	1'14
Grupo P2	104'4	3'782	1'691
Grupo P3	94'6	2'302	1'030
Grupo P4	101'4	2'408	1'077

Tabla XVI: Tabla de medias, desviación y error estándar para el Cloro, en los diferentes grupos.

Seguidamente se aplicó a estos resultados un test de ANOVA, para saber si existían diferencias significativas entre el grupo control y los grupos restantes (Tabla XVII). Mediante esta prueba se apreciaron diferencias estadísticamente valorables entre estos grupos.

CLORO	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	VALOR DE F	VALOR DE P
Grupos	4	1337'36	10'991	<0'0001
Residual	20	608'4		

Tabla XVII: Test ANOVA de los resultados de Cloro.

Se realizó también un test de Fisher, de comparaciones múltiples, para saber entre qué grupos se encontraban estas diferencias; como resultado se observaron diferencias significativas entre el grupo control y los cuatro grupos con tratamiento de pentoxifilina; también se observaron diferencias entre los grupos P2 y P3 (Tabla XVIII).

CLORO	DIFERENCIA DE LAS MEDIAS	VALOR DE P	DIFERENCIA SIGNIFICATIVA
Grupos C y P1	15'8	0'0002	SI
Grupos C y P2	12'4	0'002	SI
Grupos C y P3	22'2	<0'0001	SI
Grupos C y P4	15'4	0'0003	SI
Grupos P1 y P2	-3'4	0'3414	NO
Grupos P1 y P3	6'4	0'0815	NO
Grupos P1 y P4	-0'4	0'9098	NO
Grupos P2 y P3	9'8	0'0108	SI
Grupos P2 y P4	3	0'4	NO
Grupos P3 y P4	-6'8	0'0654	NO

Tabla XVIII: Test de Fisher aplicado a las determinaciones de Cloro.

Para visualizar de una forma más clara los resultados, realizamos un diagrama de barras (Figura 27) donde se muestran los niveles de cloro, los errores estándar y las diferencias entre los grupos tratados con Pentoxifilina y el grupo control.

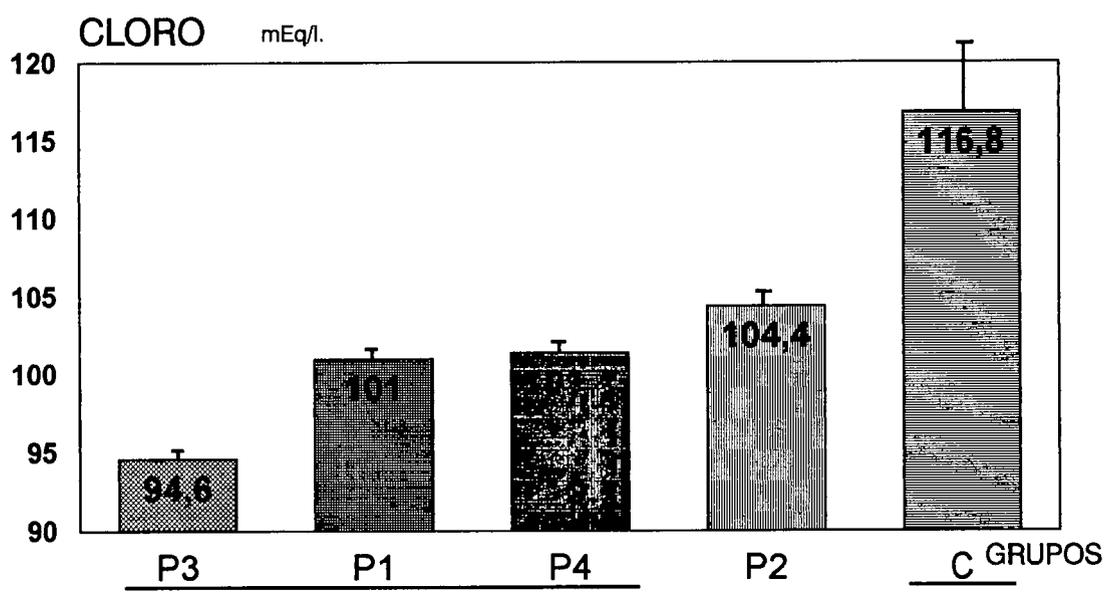


Figura 27: Medias y error estándar de los niveles de Cloro.

2.7. FÓSFORO.

Las medias de las determinaciones de fósforo en los distintos grupos fueron las siguientes: grupo **Control**= 14'0 mg/dl; grupo **P1**= 12'5 mg/dl; grupo **P2**= 10'6 mg/dl; grupo **P3**= 10'3 mg/dl; grupo **P4**= 9'5 mg/dl.

Se puede apreciar un descenso en los niveles de potasio correspondientes a los grupos tratados (Tabla XIX).

FÓSFORO	MEDIA	DESV. STD.	ERR. STD.
Grupo C	14'0	0'867	0'388
Grupo P1	12'5	1'083	0'484
Grupo P2	10'6	1'886	0'844
Grupo P3	10'3	0'114	0'051
Grupo P4	9'5	0'879	0'393

Tabla XIX: Medias, error estándar y desviación estándar de los niveles de Fósforo.

A estos resultados se les aplicó un test ANOVA, para saber si existían diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y los grupos restantes (Tabla XX).

Se confirmó la existencia de diferencias entre estos grupos.

FÓSFORO	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	VALOR DE F	VALOR DE P
Grupos	4	65'502	13'063	<0'0001
Residual	20	25'072		

Tabla XX: Test ANOVA para las determinaciones de Fósforo.

Con el fin de conocer exactamente entre qué grupos existían diferencias significativas, se realizó un test de Fisher de comparaciones múltiples. Como resultado se apreciaron diferencias significativas entre el grupo control y los cuatro grupos tratados con pentoxifilina,

también entre los grupos P1 y P2, P1 y P3, P1 y P4. No se vieron diferencias estadísticamente valorables entre los grupos P2 y P3, P2 y P4, P3 y P4 (Tabla XXI).

FÓSFORO	DIFERENCIA DE LAS MEDIAS	VALOR DE P	DIFERENCIA SIGNIFICATIVA
Grupos C y P1	1'48	0'0496	SI
Grupos C y P2	3'36	0'0001	SI
Grupos C y P3	3'66	<0'0001	SI
Grupos C y P4	4'44	<0'0001	SI
Grupos P1 y P2	1'88	0'0151	SI
Grupos P1 y P3	2'18	0'0059	SI
Grupos P1 y P4	2'96	0'0005	SI
Grupos P2 y P3	0'30	0'6763	NO
Grupos P2 y P4	1'08	0'1429	NO
Grupos P3 y P4	0'78	0'2838	NO

Tabla XXI: Tabla de Fisher para los niveles de Fósforo.

Para ver mejor estos resultados por grupos, se realizó la representación gráfica, mediante un diagrama de barras (Figura 28)

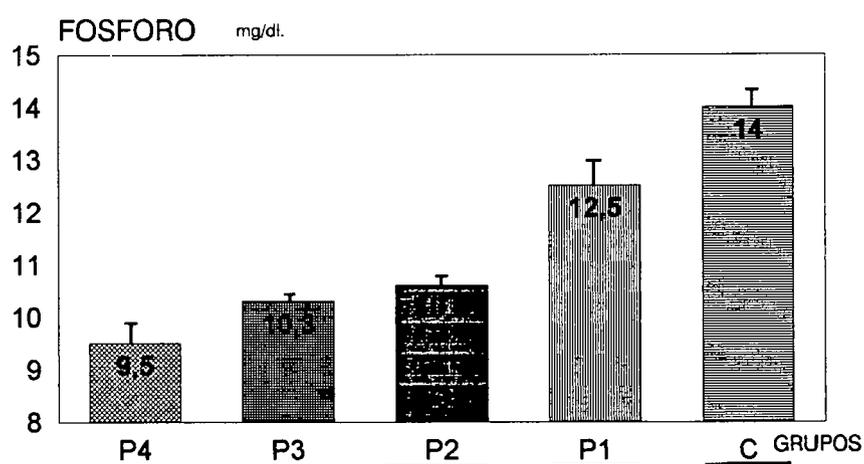


Figura 28: Representación gráfica de las medias y error estándar de los niveles de Fósforo.

2.8. ENZIMA LÁCTICO DESHIDROGENASA (LDH).

Las medias de los niveles de LDH por grupos, fueron las siguientes: grupo **Control**=3115 U/l; grupo **P1**= 2401 U/l; grupo **P2**= 2183 U/l; grupo **P3**= 2341 U/l; grupo **P4**= 2238 U/l. Se observó una disminución de los valores de LDH en todos los grupos tratados con pentoxifilina, con respecto al grupo control (Tabla XXII).

LDH	MEDIA	DESV. STD.	ERR. STD.
Grupo C	3.115	437'377	195'601
Grupo P1	2.401	558'222	249'645
Grupo P2	2.183	435'908	194'944
Grupo P3	2.341	131'969	59'018
Grupo P4	2.238	235'868	105'483

Tabla XXII: Medias, desviación y error estándar para LDH.

A estos resultados se les aplicó un estudio estadístico, test de ANOVA, para determinar la existencia o no de diferencias significativas entre el grupo control y los grupos de ratas con tratamiento de pentoxifilina (Tabla XXIII). Este análisis nos indica que existe una diferencia estadísticamente significativa de los niveles de LDH, entre los grupos tratados y el control.

LDH	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	VALOR DE F	VALOR DE P
Grupos	4	2861804'8	4'67	0'008
Residual	20	3063903'2		

Tabla XXIII: Test ANOVA de los resultados de LDH.

Se aplicó un test de comparaciones múltiples, test de Fisher, para determinar qué grupos son estadísticamente diferentes entre sí. Esta prueba nos confirma la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y los grupos con administración de

pentoxifilina, estos últimos presentan una disminución clara en los niveles de LDH (Tabla XXIV).

LDH	DIFERENCIA DE LAS MEDIAS	VALOR DE P	DIFERENCIA SIGNIFICATIVA
Grupos C y P1	713'6	0'0092	SI
Grupos C y P2	932'0	0'0012	SI
Grupos C y P3	773'6	0'0053	SI
Grupos C y P4	876'8	0'002	SI
Grupos P1 y P2	218'4	0'3881	NO
Grupos P1 y P3	60'0	0'811	NO
Grupos P1 y P4	163'2	0'5172	NO
Grupos P2 y P3	-158'4	0'5295	NO
Grupos P2 y P4	-55'2	0'8258	NO
Grupos P3 y P4	103'2	0'6812	NO

Tabla XXIV: Test Fisher aplicado a los niveles de LDH.

Para ver más claramente la relación entre los valores de LDH de los diferentes grupos, se realizó la representación gráfica de los mismos mediante un diagrama de barras (Figura 29).

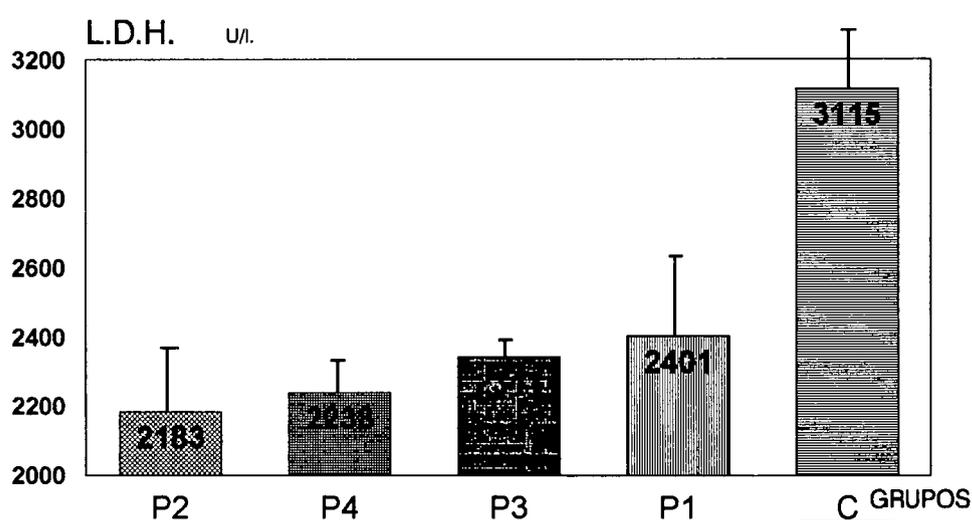


Figura 29: Diagrama con los niveles de LDH por grupos.

3. PRUEBA DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA.

DETERMINACIÓN DE MALONILDIALDEHIDO (MDA).

Las reacciones de peroxidación lipídica van a producirse durante el período de reperfusión siguiente a un proceso de isquemia, como ya ha sido comentado anteriormente. La consecuencia de esta oxidación lipídica es un aumento de la lesión isquémica, por lo que su estudio nos puede dar una idea de la extensión de la misma.

El MDA es un metabolito producido durante este proceso, de manera que su determinación en el tejido comprometido, va a ser reflejo de la intensidad del daño tisular. Existe pues una relación directa entre los valores obtenidos en la determinación de MDA y la lesión por isquemia- reperfusión.

Las medias de los niveles de MDA, por grupo, fueron las siguientes: grupo **Control**=2'25 nm/mg proteína; grupo **P1**: 1'48 nm/mg proteína; grupo **P2**= 1'37 nm/mg proteína; grupo **P3**= 1'45 nm/mg proteína; grupo **P4**= 1'32 nm/mg proteína.

Estos datos indican un descenso del MDA, detectado en los grupos tratados con pentoxifilina, con respecto al grupo control (Tabla XXV).

MDA	MEDIA	DESV. STD.	ERR. STD.
Grupo C	2'25	0'708	0'316
Grupo P1	1'48	0'562	0'251
Grupo P2	1'37	0'327	0'146
Grupo P3	1'45	0'16	0'072
Grupo P4	1'32	0'223	0'1

Tabla XXV: Medias, desviación y error estándar de los niveles de MDA en los diferentes grupos.

Con estos resultados se realizó un test de ANOVA, para evidenciar la existencia de diferencias estadísticamente valorables entre el grupo control y los diferentes grupos sometidos al tratamiento con Pentoxifilina. El test aplicado demostró la presencia de diferencias entre estas agrupaciones (Tabla XXVI).

MDA	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	VALOR DE F	VALOR DE P
Grupos	4	2'956	3'699	0'0207
Residual	20	3'995		

Tabla XXVI: Test ANOVA para los valores de MDA.

A continuación se realizó un test de Fisher, para comparar todos los grupos entre sí y saber entre cuales se producían estas diferencias. Con esta prueba se observaron diferencias claras entre el grupo control y los cuatro grupos tratados con pentoxifilina; los grupos P1, P2, P3. y P4 muestran unos niveles de MDA significativamente más bajos que el grupo control (Tabla XXVII).

MDA	DIFERENCIA DE LAS MEDIAS	VALOR DE P	DIFERENCIA SIGNIFICATIVA
Grupos C y P1	0'768	0'0133	SI
Grupos C y P2	0'884	0'0053	SI
Grupos C y P3	0'802	0'0102	SI
Grupos C y P4	0'934	0'0035	SI
Grupos P1 y P2	0'116	0'6859	NO
Grupos P1 y P3	0'034	0'9055	NO
Grupos P1 y P4	0'166	0'5636	NO
Grupos P2 y P3	-0'082	0'7747	NO
Grupos P2 y P4	0'050	0'8614	NO
Grupos P3 y P4	0'132	0'6456	NO

Tabla XXVII: Test Fisher para los valores de MDA.

Con estos resultados se realizó un diagrama de barras, para que la representación gráfica facilitara su entendimiento. En este diagrama se tuvieron en cuenta los errores estándar, así como las desviaciones estándar para los niveles de MDA de cada grupo (Figura 30).

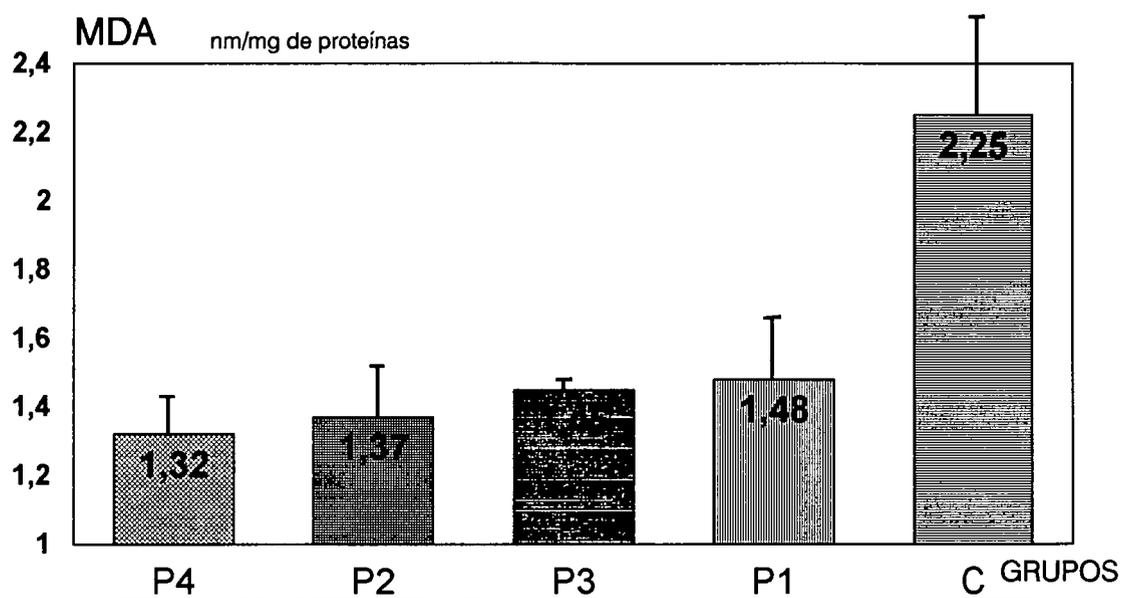


Figura 30: Medias y error estándar de los niveles de MDA, en los distintos grupos.

4. PRUEBA DE ACTIVIDAD NEUTROFÍLICA.

DETERMINACIÓN DE MIELOPEROXIDASA (MPO).

Durante el proceso de isquemia/reperfusión de un órgano se produce en éste un acúmulo de leucocitos polinucleares, que van a contribuir al daño hístico al colaborar en la producción de radicales libres de oxígeno, además de otras acciones nocivas, ya comentadas.

La mieloperoxidasa es un enzima liberado por los leucocitos, por degranulación, cuando se produce la activación de estas células; es por ésto que la determinación del nivel de MPO en el tejido intestinal isquémico, es un reflejo de la intensidad del daño tisular provocado por la isquemia -reperfusión.

La determinación de MPO se realizó en el tejido intestinal de 5 ratas por grupo, como señala el protocolo, a la hora de haber iniciado la reperfusión, tras un isquemia de 120 minutos

Las medias de los niveles de MPO por grupo, fueron las siguientes: grupo **Control**=0'32 U/l; grupo **P1**= 0'23 U/l; grupo **P2**= 0'14 U/l; grupo **P3**= 0'22 U/l; grupo **P4**=0'19 U/l,

Se observa una disminución en los valores de MPO correspondientes a los grupos tratados, con respecto al grupo control (Tabla XXVIII).

MPO	MEDIA	DESV. STD.	ERR. STD.
Grupo C	0'32	0'037	0'017
Grupo P1	0'23	0'048	0'022
Grupo P2	0'14	0'034	0'015
Grupo P3	0'22	0'021	9'487x10 ⁻³
Grupo P4	0'19	0'02	8'944x10 ⁻³

Tabla XXVIII: Medias, desviación y error estándar de MPO en los diferentes grupos.

Para determinar la existencia de diferencias significativas entre los distintos grupos, se realizó un test de ANOVA con todos los resultados.

El test aplicado confirmó la existencia de diferencias significativas entre los grupos (Tabla XXIX).

MPO	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	VALOR DE F	VALOR DE P
Grupos	4	0'087	19'141	<0'0001
Residual	20	0'023		

Tabla XXIX: Tabla ANOVA de los resultados de MPO.

Para saber entre qué grupos se encontraban estas diferencias, se desarrolló un test de comparaciones múltiples, test de Fisher. Con este análisis se determinó que habían diferencias entre el grupo control y los cuatro grupos tratados con pentoxifilina, presentando estos últimos unos niveles más bajos; también se hallaron diferencias entre los grupos P1 y P2, P1 y P4, P2 y P3, P2 y P4 (Tabla XXX).

MPO	DIFERENCIA DE LAS MEDIAS	VALOR DE P	DIFERENCIA SIGNIFICATIVA
Grupos C y P1	0'084	0'0008	SI
Grupos C y P2	0'178	<0'0001	SI
Grupos C y P3	0'102	0'0001	SI
Grupos C y P4	0'132	<0'0001	SI
Grupos P1 y P2	0'094	0'0003	SI
Grupos P1 y P3	0'018	0'4080	NO
Grupos P1 y P4	0'048	0'0356	SI
Grupos P2 y P3	-0'076	0'0019	SI
Grupos P2 y P4	-0'046	0'0431	SI
Grupos P3 y P4	0'030	0'1743	NO

Tabla XXX: Tabla de Fisher para la actividad MPO.

Con estos resultados se diseñó un diagrama de barras, incluyendo los niveles de MPO y los errores estándar de cada grupo, con el fin de ver más gráficamente estas relaciones (Figura 31).

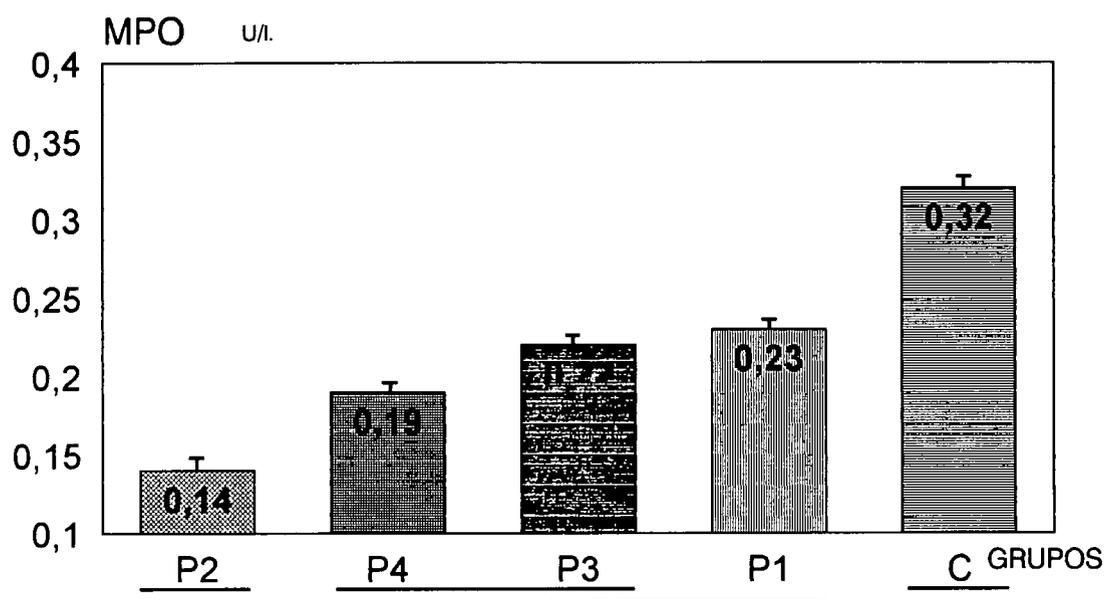


Figura 31: Representación gráfica de los niveles de MPO en los distintos grupos.

5. RESULTADOS DE LÁSER DOPPLER

La microcirculación intestinal fue medida en 5 ratas de cada uno de los grupos que componen el proyecto experimental, para lo cual se utilizó la técnica de láser Doppler, ya descrita, dando los resultados en unidades de reperfusión (UR).

Los momentos en que se contabilizaron los impulsos fueron:

- 1 hora antes de la isquemia (Basal).
- En el primer momento de la isquemia (Isquemia).
- 1 hora tras la reperfusión (Reperfusión).

Los resultados obtenidos nos muestran al grupo **P4** como el que mejor recupera la microcirculación intestinal tras la isquemia y 1 hora de reperfusión, seguido por los grupos **P2**, **C**, **P1** y **P3**. Los valores conseguidos en los grupos P4 y P2 son significativamente superiores a los obtenidos en los grupos restantes.

Las medias de los resultados de Láser Doppler en los momentos Basal, Isquemia y Reperfusión se muestran en la Tabla XXXI.

	BASAL			ISQUEMIA			REPERFUSION		
	Media	D. std.	E std.	Media	D. std.	E std.	Media	D. std.	E std.
Grupo C	180	0'021	0'008	44	0'055	0'025	70,4	0'074	0'032
Grupo P1	239	0'032	0'015	0	0'063	0'035	74	0'058	0'026
Grupo P2	184	0'041	0'022	42	0'025	0'022	124,8	0'041	0'022
Grupo P3	272	0'001	0'001	45	0'024	0'014	74,8	0'012	0'005
Grupo P4	181	0'013	0'002	40	0'011	0'001	130,6	0'032	0'014

Tabla XXXI: Medias, desviación y error estándar de los resultados del estudio Láser Doppler en los diferentes grupos.

Al calcular los valores porcentuales, con respecto a los niveles basales, en el momento de la isquemia y tras 1 hora de reperfusión, observamos que:

- En el momento de la **isquemia**, vemos que en el grupo **C** desciende hasta 24% el nivel de su microcirculación intestinal; el grupo **P1** hasta el 17'9%; el grupo **P2** hasta el 22'8%; el grupo **P3** hasta el 16'5% y el grupo **P4** hasta el 22%.

- Si observamos los valores porcentuales, **1 hora tras la reperfusión**, lograremos un "índice de la capacidad de recuperación", siendo el grupo **P4** es el que muestra la mayor recuperación de la microcirculación intestinal en este momento (72,1%), seguido por el grupo **P2** (67,6%), el grupo **C** (39,0%), el grupo **P1** (30,9%) y el grupo **P3** (24'4%).

Estos resultados reflejan que los niveles son significativamente superiores en los grupos **P4** y **P2**, es decir, aquellos grupos que recibieron el tratamiento con pentoxifilina en el momento de la reperfusión (Figura 32, Tabla XXXII).

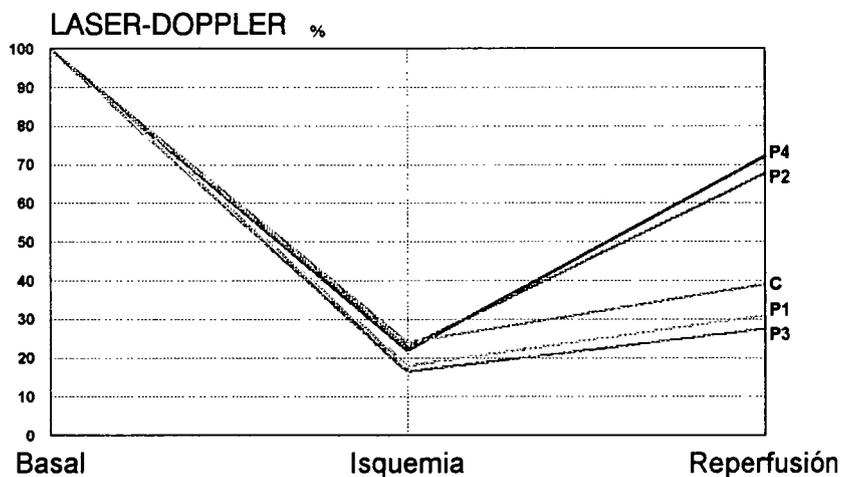


Fig.32: Gráfica de porcentajes de los resultados del estudio Láser Doppler.

Láser Doppler	MEDIA	DESV. STD.	ERR. STD.
Grupo C	39	1,99	0,89
Grupo P1	30,9	1,33	0,6
Grupo P2	67,6	1,97	0,88
Grupo P3	27,4	1,22	0,54
Grupo P4	72,1	2,67	1,19

Tabla XXXII: Tabla de medias, error y desviación estándar de los diferentes grupos en el momento de la rperfusión.

Para comprobar la posibilidad de diferencias significativas entre los diferentes grupos, construimos la tabla ANOVA (Tabla XXXIII), la cual nos confirma la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre ellos.

Láser-Doppler	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	VALOR DE F	VALOR DE P
Grupos	4	8.805,17	604,4	<0'0001
Residual	20	3,64		

Tabla XXXIII: Test ANOVA de los resultados de Láser Doppler en el momento de la rperfusión.

Posteriormente, para conocer las relaciones entre los diferentes grupos, se aplicó un test de comparaciones múltiples, test de Fisher.

Los resultados obtenidos, representados en la Tabla XXXIV, nos indican que hay diferencias significativas entre todos los grupos del proyecto experimental.

Láser-Doppler	DIFERENCIA DE LAS MEDIAS	VALOR DE P	DIFERENCIA SIGNIFICATIVA
Grupos C y P1	8,09	<0,0001	SI
Grupos C y P2	-28,59	<0,0001	SI
Grupos C y P3	11,57	<0,0001	SI
Grupos C y P4	-33,14	<0,0001	SI
Grupos P1 y P2	-36,68	<0,0001	SI
Grupos P1 y P3	3,48	0,01	SI <i>no</i>
Grupos P1 y P4	-41,23	<0,0001	SI
Grupos P2 y P3	40,16	<0,0001	SI
Grupos P2 y P4	-4,56	0	SI <i>NO</i>
Grupos P3 y P4	-44,72	<0,0001	SI

Tabla XXXIV: Test de Fisher de los resultados del Láser-Doppler en el momento de la reperfusión.

Para poder ver, de una forma más clara los resultados, pasamos a la representación gráfica de los mismos, mediante un diagrama de barras (Figura 33), en el que se reflejan los porcentajes de recuperación de la microcirculación intestinal, para cada grupo, 1 hora después de la reperfusión.

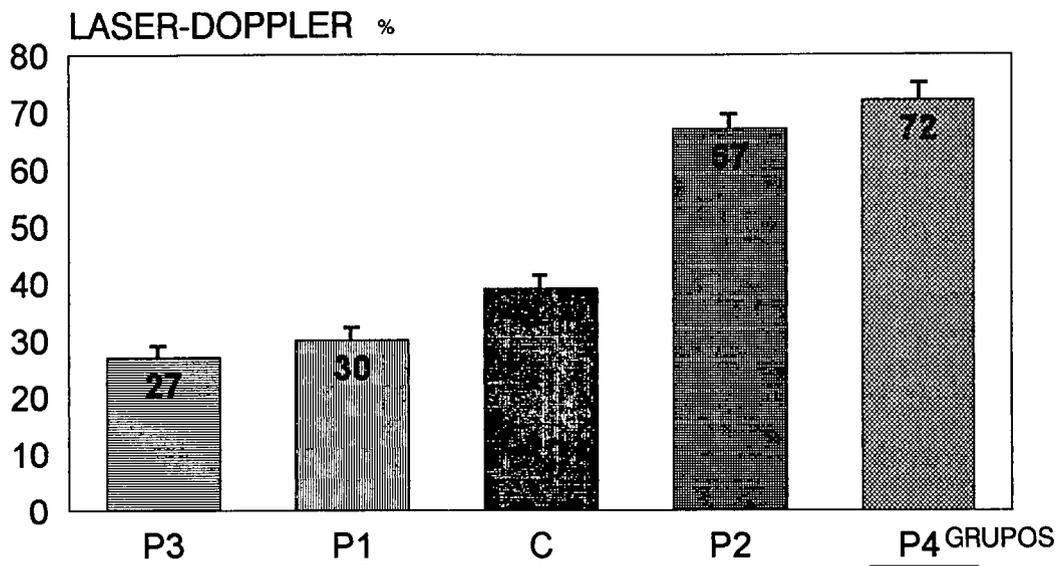


Figura 33: Gráfica de los porcentajes de flujo en la reperfusión.

Los resultados obtenidos hasta este momento, 1 hora tras la reperfusión han sido valorados conjuntamente con los hallados en el período Basal y de Isquemia.

Al analizar los resultados, así obtenidos, se pueden apreciar dos hechos:

- Los valores obtenidos en el período Basal, se han visto influidos por el pretratamiento (1 hora antes de la isquemia) con pentoxifilina, en los grupos **P1** y **P3** (239 UR y 272 UR respectivamente).

- Los datos obtenidos en el momento de la Isquemia no son de cero, como cabría esperar, sino de entre 40 y 45 UR en todos los grupos, este hecho refleja la movilidad de las células sanguíneas en el interior de los capilares, aun estando la circulación interrumpida.

Para valorar de manera más exacta los efectos de la pentoxifilina en la isquemia/reperfusión intestinal, analizaremos el porcentaje de recuperación basándonos en la diferencia entre el porcentaje del flujo en el momento de Reperfusión y el porcentaje del flujo en el momento de Isquemia, según la fórmula siguiente:

$$\% \text{ RECUPERACION} = \% \text{ FLUJO REPERFUSION} - \% \text{ FLUJO ISQUEMIA}$$

Los resultados obtenidos se ven reflejados en la tabla XXXV.

Láser-Doppler	MEDIA	DESV. STD.	ERR. STD.
Grupo C	15	2,17	0,97
Grupo P1	13	1,31	0,59
Grupo P2	44,8	2,37	1,06
Grupo P3	10.9	1,27	0,57
Grupo P4	50.1	2,64	1,18

Tabla XXXV: Porcentajes de Recuperación de los distintos grupos en la reperfusión.

Analizando los presentes resultados hallamos que el grupo **P4** es el que muestra una mayor capacidad de recuperación en su microcirculación intestinal, con una media del 50'1%, seguido por el grupo **P2**, con una media del 44'8%; estos grupos corresponden a aquellos que recibieron la pentoxifilina en el momento de la reperfusión, el P4 a una dosis de 10 mg/kg de peso y el P2 a razón de 1 mg/kg de peso.

Los grupos restantes mostraron una recuperación inferior; así el grupo **C** obtuvo una media del 15%, el grupo **P1** del 13% y el **P3** del 10'9%.

Estos resultados se ven reflejados en la Figura 34.

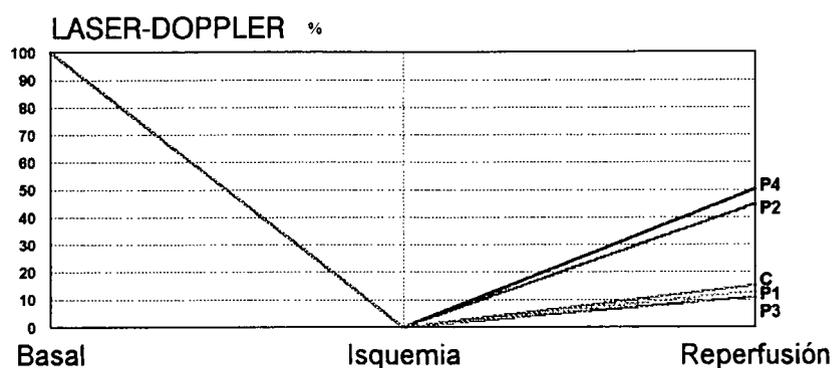


Figura 34: Gráfica de los porcentajes de recuperación en la reperfusion.

Con el fin de establecer las posibles diferencias estadísticas entre los diversos grupos, se practicó un test de ANOVA. Este análisis mostró la existencia de diferencias significativas entre los grupos, como podemos ver en la tabla XXXVI.

Láser-Doppler	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	VALOR DE F	VALOR DE P
Grupos	4	6.553,38	397,85	<0'0001
Residual	20	82,36		

Tabla XXXVI: Test ANOVA de los porcentajes de recuperación, determinados por Láser Doppler en la reperfusion.

Posteriormente se aplicó un test de comparaciones múltiples, test de Fisher, para comprobar entre qué grupos se establecían las diferencias, (Tabla XXXVII). Con este test se observó que existían diferencias significativas entre todos los grupos, excepto entre P1 y P3.

Láser Doppler	DIFERENCIA DE LAS MEDIAS	VALOR DE P	DIFERENCIA SIGNIFICATIVA
Grupos C y P1	3,96	0,01	SI
Grupos C y P2	-28,1	<0,0001	SI
Grupos C y P3	5,08	0	SI
Grupos C y P4	-31,47	<0,0001	SI
Grupos P1 y P2	-32,06	<0,0001	SI
Grupos P1 y P3	1,12	0,39	NO
Grupos P1 y P4	-35,43	<0,0001	SI
Grupos P2 y P3	33,17	<0,0001	SI
Grupos P2 y P4	-3,38	0,02	SI
Grupos P3 y P4	-36,55	<0,0001	SI

Tabla XXXVII: Test de Fisher aplicado a los porcentajes de Recuperación.

Para visualizar mejor estos resultados, construimos un diagrama de barras (Figura 35), donde se reflejan los porcentajes de recuperación de flujo de la microcirculación de cada uno de los grupos, sus errores estándar, así como la existencia de diferencias significativas entre ellos.

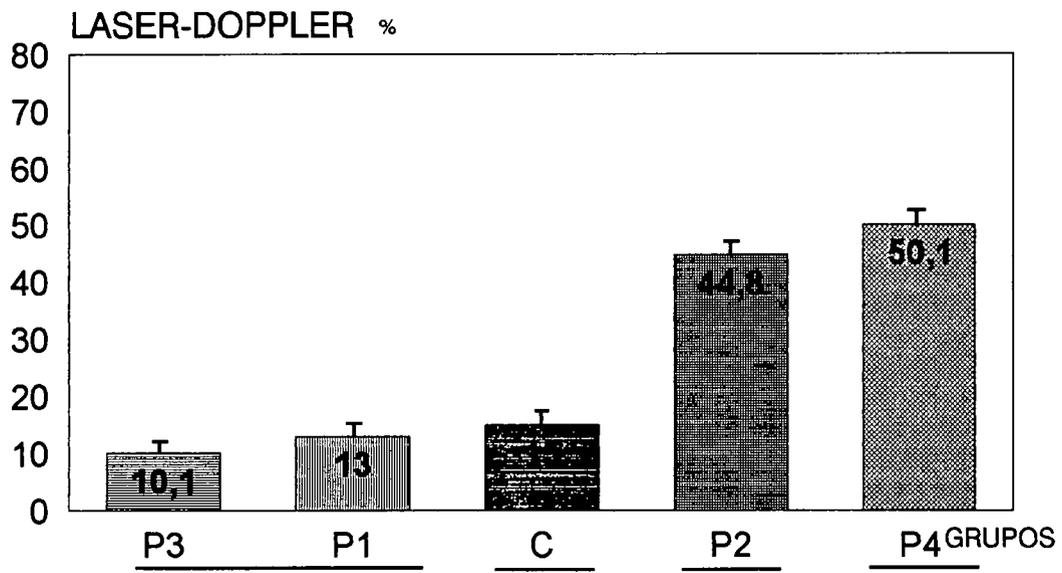


Figura 35: Gráfica de los porcentajes de recuperación en la reperfusión.

6. ESTUDIOS HISTOLÓGICOS.

Las preparaciones con los cortes de intestino delgado, fueron sometidas, como ya se expuso en el capítulo de material y métodos, a las tinciones de hematoxilina-eosina (HE) y del α -Naftol (AN).

Con la primera tinción se observó el grado de isquemia, la estructura glandular, el nivel de conservación de la mucosa y la lámina propia, así como el estado de los capilares.

La tinción de α -Naftol nos informó del grado de infiltración polimorfonuclear.

Se realizó la visión de estas preparaciones a microscopía óptica, a 400 y 1000 aumentos (por inmersión), estableciendo una graduación de la lesión, de menor a mayor daño, clasificando dicha lesión como leve, moderada o severa.

Resultados:

-Grupo Control.

Isquemia severa. Mediante la tinción de HE se apreció una marcada erosión y necrosis de la mucosa superficial, con edema y congestión de las vellosidades intestinales, así como una falta de conservación de las glándulas (Figura 36).

Utilizando la preparación con AN, se vio un importante infiltrado inflamatorio.

-Grupo P1.

Isquemia severa. La mucosa se encuentra erosionada, perdiendo los límites. Hay congestión con edema e infiltrado inflamatorio en las vellosidades.

-Grupo P2.

Isquemia moderada. Con las tinción de HE se observó una discreta congestión de los capilares de la mucosa (Figura 37). Mediante la preparación de AN se apreció el infiltrado inflamatorio a nivel de la lámina propia (Figura 38).

-Grupo P3.

Isquemia severa. Presentó las mismas características que los grupos control y P1.

-Grupo P4.

Isquemia leve. Hubo conservación de las estructuras (HE) y la tinción de AN mostró un ligero infiltrado inflamatorio en lámina propia (Figura 39).

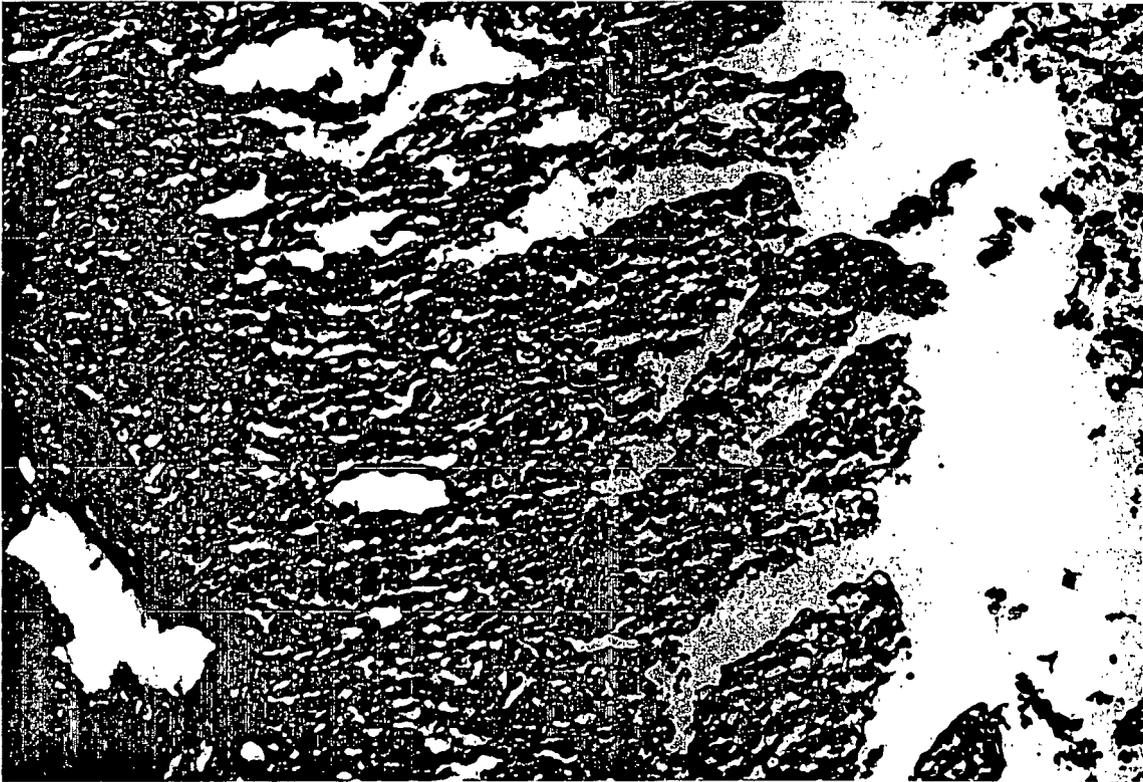


Figura 36: Isquemia severa. Tinción Hematoxilina-eosina.

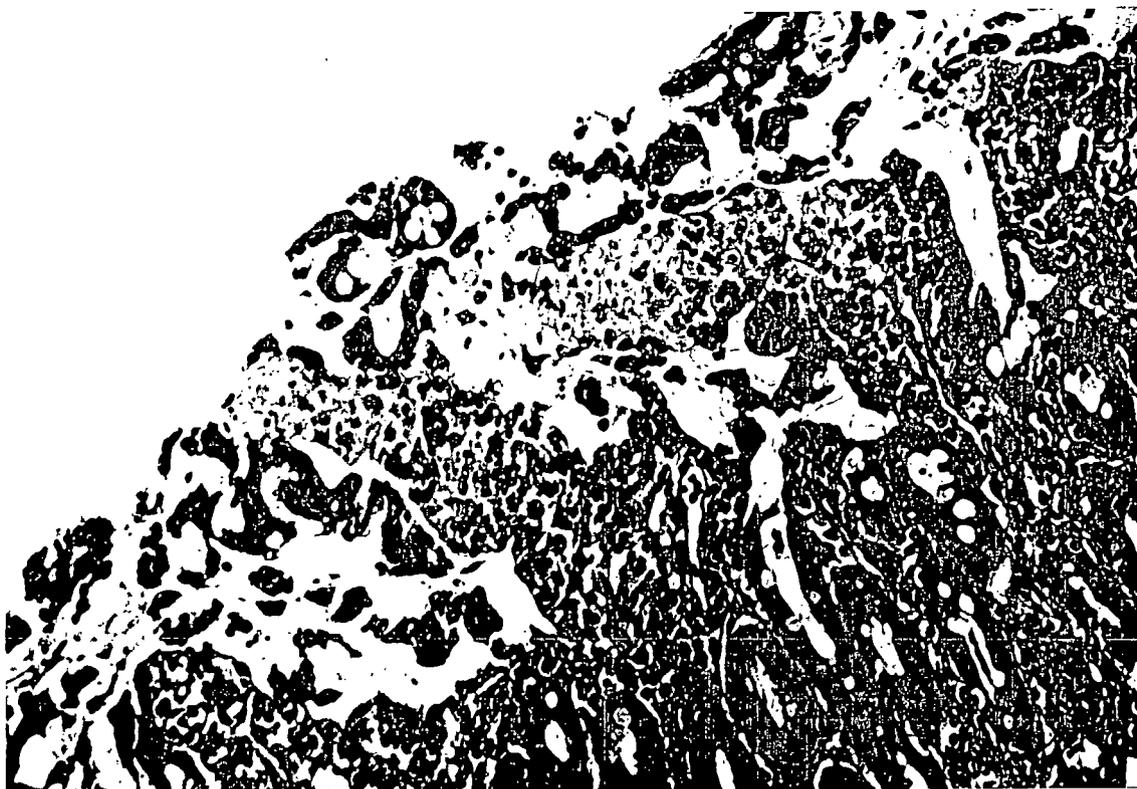


Figura 37: Isquemia moderada. Tinción Hematoxilina-eosina.

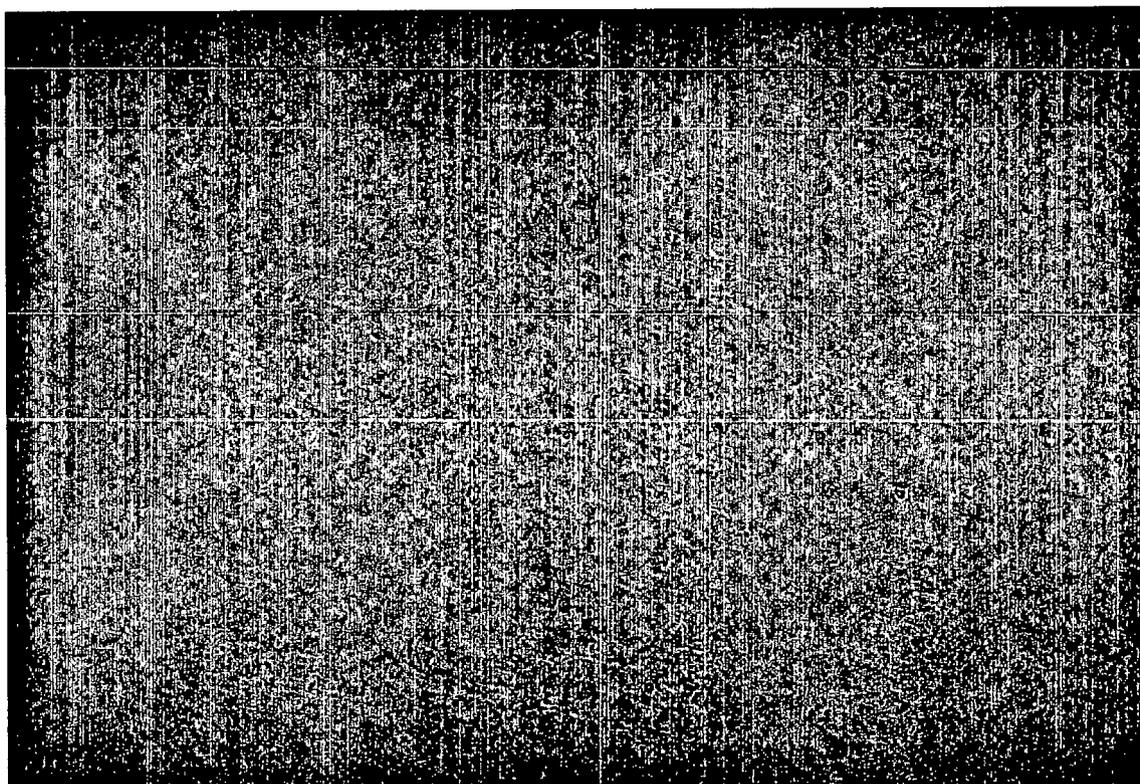


Figura 38: Isquemia moderada. Tinción Naftol As-D Cloroacetato.

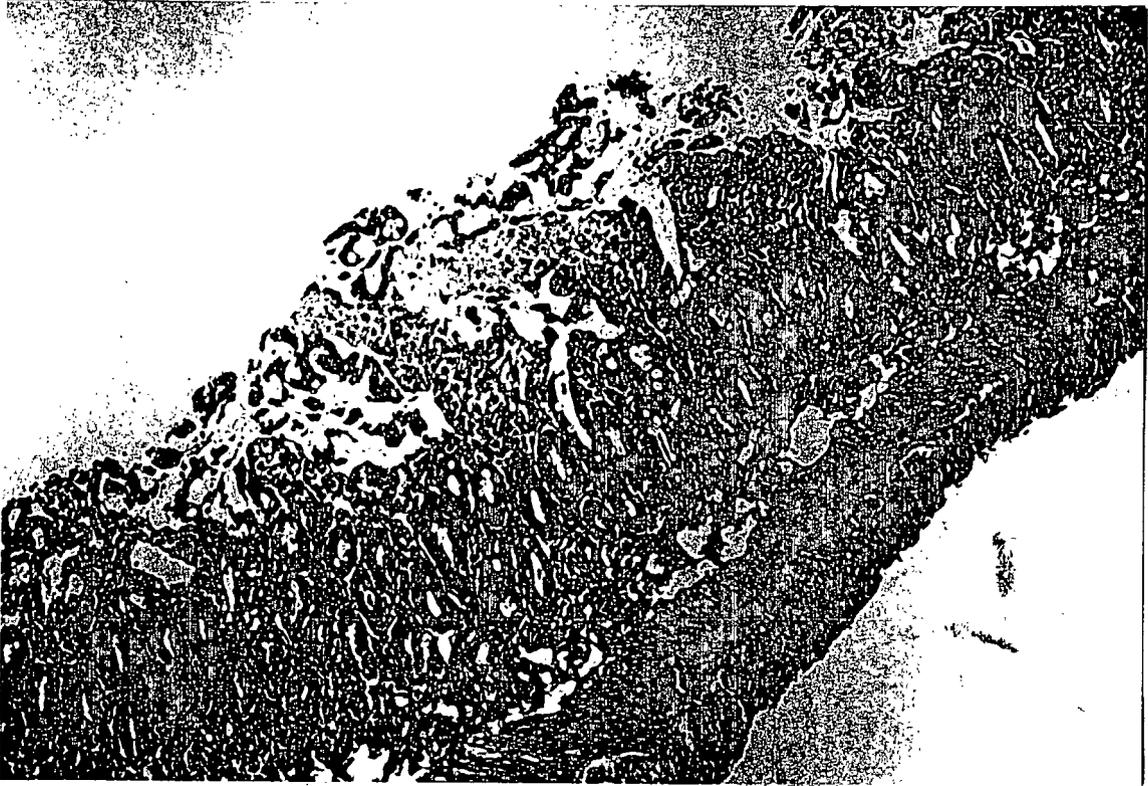


Figura 39: Isquemia leve. Tinción Hematoxilina-eosina.

DISCUSSION

Con la realización de la isquemia/reperfusión intestinal, según el protocolo experimental establecido, se van a producir una serie de alteraciones orgánicas y funcionales, que se van a reflejar en los hallazgos descritos en el apartado de resultados.

En este capítulo van a ser comparados nuestros resultados con los obtenidos por diversos autores, con la intención de poder establecer los efectos del tratamiento mediante pentoxifilina en la lesión por I/R intestinal.

Al producirse en un órgano la interrupción del flujo sanguíneo normal, van a tener lugar una serie de reacciones en cadena, ya comentadas en capítulos anteriores. En una primera fase habrá una carencia de oxígeno, adoptándose la vía anaerobia para la obtención de energía, lo que dará lugar a una acidosis metabólica, si la isquemia dura lo suficiente, y a la producción de los radicales libres de oxígeno. En una segunda fase, la de reperfusión, se reanuda el aporte de oxígeno, el cual contribuye a la peroxidación lipídica de los componentes de la membrana celular, aumentando de esta forma la extensión de la lesión a nivel de la mucosa intestinal.

Todos estos procesos van a participar en la conformación de los resultados finales, pero además hemos de tener en cuenta que tras una I/R intestinal se van a producir lesiones a distancia, en otros órganos, constituyendo en mayor o menor grado el llamado "fallo orgánico múltiple", ampliamente comprobado (50,173,208), de forma que en los resultados también pueden intervenir las alteraciones producidas en órganos como hígado, riñones y pulmones.

La Discusión del presente estudio será abordada siguiendo las diversas determinaciones y pruebas detalladas en el capítulo de Resultados:

1. Estudio de Supervivencia en el 7º día postintervención. Este dato valora de forma general el estado de los animales, en los diferentes grupos, indicándonos si este valor absoluto de supervivencia se encuentra influido por el tratamiento con pentoxifilina.

2.Pruebas Bioquímicas. El análisis de las distintas determinaciones bioquímicas nos ofrecerá información, sobre el estado funcional del órgano sometido a isquemia/reperfusión y la posible repercusión del tratamiento con pentoxifilina.

3.Pruebas de peroxidación lipídica. Determinación de malonildialdehido. Este dato nos va a proporcionar una idea de la extensión de la lesión en un órgano sometido a I/R. Este metabolito del ácido araquidónico se produce durante la fase de reperfusión, siendo reflejo del grado de alteración tisular.

4.Pruebas de actividad neutrofílica. Determinación de mieloperoxidasa, la cual nos indicará el nivel de secuestro linfocitario en el tejido intestinal y su acción nociva sobre las células, al contribuir en la producción de radicales, y por acción directa mediante la liberación de enzimas citotóxicos. Valorándose, como con el resto de las pruebas, la acción de la pentoxifilina sobre esta determinación.

5.Estudio mediante Láser-Doppler de la situación del flujo sanguíneo intestinal, en los diferentes grupos, a lo largo de todo el proceso.

6.Estudio histológico de cortes del intestino delgado sometido a I/R.

1.SUPERVIVENCIA.

En el presente trabajo, se midió la supervivencia en los distintos grupos, al 1º, 3º, 5º y 7º día, tomando la de este último día como la supervivencia final.

Ottinger LW (151) en un trabajo publicado en 1978, señaló que el pronóstico de la oclusión vascular mesentérica aguda era muy malo, mostrando una mortalidad en conjunto del 50-70%. La supervivencia de los pacientes dependerá de la etiología de esta isquemia y de la extensión del infarto, siendo la principal causa de mortalidad la complicación con una trombo-sis arterial mesentérica.

Este mismo autor consiguió un aumento significativo de la supervivencia al realizar, de forma inmediata a la trombosis, una resección en dos tiempos con embolectomía.

Grant D et al (55) refieren una mejora en la supervivencia final de un trasplante de intestino delgado, si se le combina con el trasplante de hígado.

Los investigadores **Matsusaka C** et al (125) en un estudio publicado en 1992, observaron que si la isquemia se prolongaba de 60 a 90 minutos, la supervivencia descendía del 38 al 13% (n=8). Si se administraba coenzima Q10, 1 hora antes de la isquemia, la supervivencia pasaba a ser del 75%, al estimular esta sustancia la regeneración del ATP durante la reperfusión.

Koike K et al (101) determinaron el efecto de la I/R intestinal, como causa de lesión "a distancia" en pulmón, añadiendo un segundo daño, la administración de endotoxinas, administradas a las 6 horas de la I/R. Determinaron en pulmón el aclaramiento de albúmina-I¹²⁵, la actividad MPO, la histología y la supervivencia. La isquemia realizada fue de 45 minutos; al grupo control sólo se le practicó laparotomía, o bien laparotomía más inyección de suero fisiológico. Se observó aumento de los niveles de neutrófilos ante la presencia de endotoxinas, con

o sin I/R; sin embargo sólo se vio aumentado el aclaramiento de albúmina si había I/R más endotoxinas. Histológicamente el daño se vio considerablemente aumentado en el caso de I/R más endotoxinas. La mortalidad fue del 39% en el grupo de I/R con administración de endotoxinas, significativamente superior al grupo con sólo laparotomía (0%), sólo I/R intestinal (0%), o laparotomía con endotoxinas (4%). Esto les llevó a concluir que las endotoxinas convierten una disfunción pulmonar (inducida por I/R intestinal), en un fallo orgánico avanzado.

Sakr M et al (171) realizaron un estudio sobre el efecto de la FK506, como protector en la I/R renal. Separaron dos grupos de ratas, uno control que recibió suero fisiológico y otro grupo al que se le administró FK506 24 horas antes de la isquemia, de 60 minutos de duración en ambos grupos. Los animales que recibieron el tratamiento inmunosupresor presentaron niveles de urea, creatinina, y factor de necrosis tumoral, significativamente más bajos que el grupo control. La supervivencia del grupo tratado fue del 100% a los 10 días,

Santiago SF et al (172) compararon tratamientos con FK506 y Ciclosporina A, a distintas dosis y en distintos momentos del proceso, es decir, antes o después de la isquemia. Observaron que el pretratamiento de los donantes con FK506, a razón de 2 mg/Kg/día, durante 3 días antes de la isquemia, es el que inducía una supervivencia más prolongada del aloinjerto intestinal (41 días), no consiguiendo la misma mejora con la administración de ciclosporina.

En el mismo sentido que el trabajo anterior, **Utsonomiya H et al (213)** en 1992, practicaron el trasplante intestinal entre ratas de distinta cepa, midiendo el éxito del injerto en días de supervivencia, excluyendo del conteo final aquellos animales que no sobrevivían a los 4 primeros días. Se crearon 5 grupos: 1 y 2 sin tratamiento, 3, 4 y 5 con tratamiento a distintas dosis de FK506. Observaron un aumento de la supervivencia en los grupos 4 y 5, tratados con 0'3 y 0'5 mg/kg/día de FK506, en los días 0 a 29 postrasplante, con respecto a los grupos no tratados y al que recibió una dosis baja 0'1 mg/kg/día del inmunosupresor.

Los animales que morían antes de los 10 días, lo hacían por peritonitis, debida a rechazo agudo; a los que morían después de los 10 días, se les atribuyó la muerte a una obstrucción intestinal.

Hatazawa C et al (92) realizaron un estudio experimental del efecto de FK506 en el trasplante intestinal. Hicieron dos grupos: el 1º con trasplante y sin tratamiento, el 2º con trasplante más FK506 (1mg/Kg /día) durante las 8 semanas siguientes.

Sus resultados fueron: el grupo 1 presentó síntomas de rechazo, con muerte de todos los animales antes de los 12 días siguientes al trasplante; el grupo 2 consiguió una supervivencia superior a las 8 semanas, sin presentar síntomas de rechazo.

Estal L (47) en sus estudios de I/R renal observó un aumento significativo de la supervivencia en los grupos tratados con Adenosina o Alopurinol, frente al grupo control sin tratamiento. El grupo de mayor supervivencia fue el tratado con 10 mg/Kg de adenosina iv, una hora antes de la isquemia, con un 80% de supervivencia total, frente al 20% del grupo control, que recibió suero fisiológico.

Ramos JL (162) realizó un trabajo sobre I/R renal, de 120 minutos de duración, en ratas distribuidas en 5 grupos: uno control, al que se le inyectó suero fisiológico y 4 con distintos tratamientos de pentoxifilina (1 y 10 mg/Kg), una hora antes de la isquemia o en el momento de la reperfusión. Sus resultados de supervivencia no mostraron diferencias significativas entre ninguno de los grupos que recibieron tratamiento con pentoxifilina y el grupo control, aunque sí se pudo apreciar una tendencia al aumento de esta supervivencia en los grupos tratados, especialmente en el grupo que recibió el fármaco en el momento de la reperfusión a una dosis de 10 mg/Kg de peso; la supervivencia al 7º día en este grupo fue del 70%, mientras que en el grupo control fue del 40-45%.

En el presente estudio los resultados de **Supervivencia** al 7° día fueron los siguientes: grupos controles C1 y C2 presentaron unas supervivencias finales del 45 y 50% respectivamente; los grupos P1 y P2, que recibieron pentoxifilina (PTX) a una dosis de 1 mg/kg de peso, mostraron una supervivencia del 55 y 60% respectivamente; los grupos cuya dosificación de PTX fue de 10 mg/kg de peso, presentaron una supervivencia del 60% (P3), y del 65% (P4).

No se hallaron diferencias significativas, para este dato, entre los distintos grupos y el control; ésto podría ser debido a un insuficiente muestreo por grupo, o también al intervalo de confianza escogido para el análisis estadístico.

Los resultados obtenidos concuerdan con los observados por **Ottinger LW** (151), señalando este autor que una de las complicaciones mortales de la I/R intestinal es la trombosis arterial mesentérica, por lo cual teóricamente la PTX sería un buen tratamiento preventivo al ejercer una acción antitrombótica, mejorando los índices de agregación plaquetaria y de los parámetros implicados en la formación de trombos, como indica **Angelkort B** (4).

También podemos señalar que otros autores, como **Matsusaka C** et al (125), utilizaron el tratamiento con Coenzima Q10 por su efecto regenerador del ATP, consiguiendo una mejora en la supervivencia final del grupo tratado, frente a otro grupo sin tratamiento. Teniendo en cuenta que entre las acciones de la PTX también se encuentra la de mejorar los niveles de ATP eritrocitarios (63,74), este fármaco favorecería, teóricamente, la supervivencia final de los animales expuestos a la I/R intestinal.

Aunque los resultados estadísticos no fueron valorables, se puede apreciar un aumento progresivo de la supervivencia final en los grupos tratados con PTX, concordando estos datos con los expuestos por **Ramos JL** (162) sobre los efectos de la pentoxifilina en la I/R renal, destacando este autor en sus observaciones un aumento de la supervivencia en el grupo de

ratas que recibió la PTX, a razón de 10 mg/Kg peso en el momento de la reperfusión, frente al grupo control, aunque sin obtener diferencias significativas entre ambos grupos.

2. PRUEBAS BIOQUÍMICAS.

Con estas determinaciones y las que posteriormente detallaremos, se quiere hacer una valoración del estado funcional del intestino delgado, en concreto, pero también del funcionamiento global del organismo, ya que es imposible considerar ambos conceptos por separado.

2.1. UREA.

La urea es el producto final del catabolismo proteico. Se encuentra presente en la sangre y se excreta por la orina.

El aumento de sus niveles en sangre se puede deber a:

- Causas nefropáticas, con disminución del filtrado glomerular.
- Causas extrarrenales, entre éstas podemos incluir la insuficiencia circulatoria producida por la isquemia, lo que conlleva un déficit del aporte hemático al riñón. También se incluyen aquí las hemorragias digestivas, con retención y desintegración del acúmulo de sangre en el intestino. Otra causa, es el postoperatorio de las intervenciones quirúrgicas, donde se produce una hiperuricemia pasajera.

Sakr M et al (171) utilizaron la determinación de urea para valorar el daño renal y el efecto sobre éste del pretratamiento con FK506 (0'3 mg/Kg 24 horas antes de la isquemia), al realizar la I/R renal de 60 minutos de duración en riñón derecho, con posterior nefrectomía izquierda. Observaron que los niveles de urea en el grupo tratado con el inmunosupresor, eran significativamente inferiores a los presentados por el grupo control, que no recibió pretratamiento con este fármaco. Concluyen que la FK506 mejora considerablemente la lesión renal funcional asociada a la I/R.

Davenpek KL et al (43) publicaron en 1994 un estudio de isquemia de la arteria esplácnica, utilizando anticuerpos monoclonales neutralizantes de la P-selectina, administrados en el momento de la reperusión. Observaron que el grupo tratado con estos anticuerpos presentaban, en comparación con un grupo control no tratado, una disminución considerable del acúmulo de leucocitos y de su adherencia en los capilares mesentéricos, comprobada por microscopía intravital; la actividad MPO en el tejido intestinal del grupo tratado fue inferior al control. También realizaron para la valoración del estudio, determinaciones de urea, observando que ésta se encontraba significativamente disminuida en los animales tratados, considerando este dato como índice de una menor lesión tisular.

En el presente trabajo, los niveles de Urea obtenidos fueron significativamente inferiores en los grupos de ratas que recibieron tratamiento con pentoxifilina en el momento de la reperusión, es decir, los grupos P2 y P4, con respecto al grupo control.

No se hallaron diferencias entre los grupos Control, P1 y P3.

Estos hallazgos sugieren una clara mejoría funcional, en aquellos animales que recibieron el tratamiento justo en el momento de retirar el clamp de la arteria.

Los niveles de urea han sido utilizados por otros autores (43) para valorar el daño tisular tras la I/R intestinal, considerando que el tratamiento que logra una disminución de estos niveles está logrando aminorar la lesión.

Los resultados obtenidos coinciden con los presentados por **Ramos JL** (162), el cual en su estudio sobre isquemia/reperusión renal, de 120 minutos de duración, obtiene una disminución significativa de los niveles de urea en los grupos de animales a los que administró pentoxifilina (1 ó 10 mg/kg peso) en el momento de la reperusión, con respecto al grupo control tratado sólo con suero fisiológico.

2.2. CREATININA.

La creatinina se forma a partir de la creatina y fosfocreatina localizadas en el tejido muscular. Se encuentra presente en la sangre, eliminándose por la orina.

El nivel de creatinina en sangre se mantiene muy estable, dependiendo del funcionamiento renal, concretamente del filtrado glomerular. Su aumento es índice de insuficiencia renal y suele ir parejo al aumento de la urea. Las causas de este incremento pueden ser:

- Nefropáticas.
- Insuficiencia circulatoria con déficit prerrenal de riego.

Sakr M et al (171) publicaron un trabajo en 1992, ya comentado anteriormente, en el que utilizaban la determinación de urea y creatinina para valorar el efecto del pretratamiento con el inmunosupresor FK506 en la I/R renal. En sus resultados los niveles de estas dos determinaciones fueron sensiblemente inferiores en aquellas ratas que recibieron la droga, con respecto al grupo control, que no fue tratado.

Frank RS et al (50) en 1993 realizaron un estudio comparativo entre la isquemia renal de 45 minutos de duración y la I/R renal intermitente. Determinaron los niveles de creatinina a distintos tiempos, sirviéndoles estos datos para concluir que en la I/R intermitente el daño renal era menor, al dar este grupo unos valores de creatinina significativamente inferiores, comparados con el grupo sometido a I/R continua.

Ar'Rajab A et al (6) publicaron en 1994 un estudio para determinar: 1º el efecto de las ciclosporinas A y G en el flujo sanguíneo y en la funcionalidad del riñón sujeto a 60 minutos de isquemia caliente y 2º el efecto protector del Verapamil, que es un antagonista del calcio.

En un primer ensayo realizaron isquemia del riñón derecho y nefrectomía del izquierdo, Observaron un aumento considerable en los niveles de creatinina sérica, sobre todo en los

grupos tratados con ciclosporinas, con respecto al grupo control no tratado. Comprobaron que el daño era mayor con la ciclosporina A que con la G, reflejado por una mayor tasa de creatinina en el grupo tratado con la ciclosporina A.

Kelly KJ et al (96) realizaron en 1994 un estudio del efecto protector en la lesión por I/R renal, de un anticuerpo monoclonal que actúa contra la adhesión leucocitaria (anti-ICAM-1), Este anticuerpo se administró en el momento de la isquemia bilateral y comprobaron la mejoría del grupo tratado, que presentó unos niveles de creatinina significativamente más bajos que el grupo control, sin tratamiento. Otra determinación que practicaron es la prueba de actividad mieloperoxidasa, para demostrar el acúmulo leucocitario en la lesión y su papel en la extensión de la misma; los resultados de MPO fueron significativamente inferiores en el grupo tratado. Estos autores afirman que el tratamiento con anti-ICAM-1 previene el empeoramiento funcional e histológico del fallo renal agudo.

En el presente estudio los niveles de Creatinina, se mostraron significativamente inferiores en los grupo P1, P2 y P4, con respecto a los valores observados en el grupo Control; no se hallaron diferencias entre los grupos P3 y Control, ni tampoco entre los grupos P2 y P4, siendo estos últimos los que dieron niveles más bajos de creatinina.

Los resultados obtenidos sugieren una mejoría funcional en los grupos tratados con pentoxifilina (excepto P3), sobre todo en aquellos que recibieron el tratamiento en el momento de la reperusión (P2 y P4).

Los resultados obtenidos coinciden con los de **Ramos JL** (162), autor que utilizó el tratamiento con pentoxifilina durante la I/R renal, observando niveles de creatinina significativamente inferiores en los animales tratados en comparación con el grupo control, que sólo recibió suero fisiológico.

La utilización de la determinación de creatinina sérica, junto con la de urea es requerida por diversos autores (6,43,96) para la valoración funcional de los daños por I/R, fundamentalmente en riñón, y el posible efecto beneficioso de diversos fármacos en este proceso.

2.3. SODIO. POTASIO. CLORO.

Son los iones más abundantes en el medio extracelular, siendo sus aumentos signo de alteración en la homeostasis celular.

En la insuficiencia renal se produce una hiperpotasemia, que constituye una de las alteraciones iónicas más importantes que acompañan a la uremia.

La hiperpotasemia puede tener su origen en una causa extrarrenal, conjugándose a menudo, la liberación de potasio intracelular, por excesiva proteólisis hística y por defectuosa eliminación renal, debida al colapso circulatorio. Esta situación es la hallada en el shock traumático y en el curso de un postoperatorio.

La determinación de los niveles de cloro van a proporcionarnos información sobre el estado de acidosis metabólica.

En un estudio realizado por **Lai HS et al** (106) en 1992, sobre los efectos de la ciclosporina en la isquemia renal caliente en ratas, se valoró la nefrotoxicidad de esta droga mediante la determinación de potasio sérico. Estos autores observaron que a mayor dosis de ciclosporina la nefrotoxicidad era mayor, siendo la excreción renal de potasio cada vez menor, por retención tubular del mismo.

Los investigadores **Reeves WB y Shan SV** (163) en un trabajo publicado en 1994, comprobaron que durante la isquemia renal se producía una pérdida del K^+ celular, por mecanismos poco conocidos. Examinaron los efectos del bloqueo del canal del K^+ en el desarrollo

de la lesión por hipoxia, sugiriendo que la activación de los canales del K^+ es una respuesta temprana a la hipoxia, que contribuye a la extensión de la lesión por isquemia.

Wilkins PA et al (222) en un trabajo de 1995, refieren la práctica de isquemia completa de colon descendente y trasverso en caballos, durante 2 horas, con posterior reperfusión. Se les determinaron a estos animales los niveles de gases y electrolitos en sangre, durante todo el proceso.

Los resultados fueron: la PO_2 y la saturación de O_2 se mostró menor durante la isquemia, recuperándose totalmente con la reperfusión. El nivel de potasio fue significativamente mayor en el grupo experimental, que en el control, sólo sometido a laparotomía.

Estal L (47) realizó determinaciones de sodio, potasio y cloro en el proceso de I/R renal para valorar los efectos de Alopurinol, no hallando diferencias significativas entre los grupos tratados y el grupo control, en ninguna de las tres determinaciones. El mismo estudio pero utilizando como tratamiento Adenosina, tampoco ofreció diferencias significativas para estas iones, entre los grupos con tratamiento y el control.

En el presente estudio, no se hallaron diferencias significativas entre los distintos grupos y el control, para la determinación de **Sodio**, coincidiendo con los resultados obtenidos por Estal L (47).

Respecto a los niveles de **Potasio** obtenidos, se observaron diferencias significativas entre el grupo control y los 4 grupos tratados con pentoxifilina, presentando estos últimos valores de potasemia inferiores al grupo control. Los grupos P2 y P4 (PTX administrada en el momento de la reperfusión) son los que mostraron los niveles más bajos.

La valoración de estos resultados sugiere que el tratamiento con PTX mejora el funcionamiento renal y con éste la normal excreción del potasio; otra posibilidad es que la salida del ión K^+ al nivel extracelular sea inferior con el tratamiento de PTX, reflejando una menor

alteración de la membrana celular. La determinación de potasio ha sido utilizada como determinación valorativa del daño en la I/R intestinal y sobre todo renal, por diversos autores (106,163,222), al ser considerado su aumento como expresión del daño celular.

En este estudio se apreció una disminución del nivel plasmático de **Cloro** en los 4 grupos tratados con PTX, con respecto al grupo control.

Si entendemos que el nivel del ion cloro es una medida indirecta del grado de acidosis metabólica, se puede sugerir que en los grupos tratados con PTX, ésta fue de menor grado y, por tanto, la afectación general del organismo también fue menor.

2.4 CALCIO. FÓSFORO.

Chien KR et al (33) demostraron la influencia de los iones Ca^{++} en el empeoramiento de la lesión celular en I/R hepática. Utilizaron Clorpromacina, administrada 30 minutos antes de la isquemia, observando que este tratamiento producía una disminución en el acúmulo de Ca^{++} intracelular, durante todo el proceso. Estos resultados son interpretados como un indicador de prevención de la degradación de los fosfolípidos de membrana. También señalaron que la disfunción mitocondrial era reversible, en el caso de aplicar este tratamiento.

Marubayashi S et al (123) en un estudio publicado en 1986, demostraron que durante el proceso de I/R se producía una alteración de la membrana celular y de la función mitocondrial, con un aumento de Ca^{++} citosólico y una sobrecarga de este Ca^{++} a nivel mitocondrial. Esta situación actuaría como un círculo vicioso para empeorar, aún más, el funcionamiento mitocondrial, llevando a la desestructuración celular.

Morton JW et al (136) en 1994, investigaron los daños ultraestructurales que se producen por el aumento de Ca^{++} intramitocondrial, durante el proceso de la I/R renal. Estos autores describieron las alteraciones anatomopatológicas que sufren las mitocondrias de los

túbulos proximales, siendo éstas similares a las producidas en las mitocondrias del músculo esquelético y cardíaco durante la isquemia.

Ramos JL (162) en sus investigaciones sobre la pentoxifilina en la I/R renal, encontró una disminución en los niveles de fósforo de todos los grupos tratados (salvo el grupo A1, que recibió la PTX a una dosis de 1 mg/Kg 1 hora antes de la isquemia), frente al grupo control.

Con respecto a los niveles de **Calcio**, en nuestro estudio se observó una disminución en todos los grupos tratados con pentoxifilina, frente al grupo control, mostrando diferencias estadísticamente significativas con este último

Los datos obtenidos sugieren que el tratamiento con PTX conduce a una mejor conservación de las estructuras celulares.

No se hallaron diferencias entre los grupos P1 y P3 (PTX administrada 1 hora antes de la isquemia), ni entre los grupos P2 Y P4 (PTX inyectada en el momento de la reperfusión), siendo estos dos últimos grupos los que presentaron los niveles menos elevados.

En cuanto al **Fósforo**, al comparar los resultados obtenidos se observaron diferencias significativas entre los cuatro grupos tratados y el grupo control. El grupo que obtuvo los valores de fósforo más bajos fue el P4 (tratamiento con 10 mg/Kg de PTX en el momento de la reperfusión).

Los datos resultantes sugieren que el tratamiento con PTX supone una menor retención renal de fosfatos.

2.5. ENZIMA LACTATO DESHIDROGENASA (LDH).

Esta enzima interviene en la conversión de lactato a piruvato.

El aumento en sangre de LDH es índice de lesión celular con destrucción hística, volviendo estos valores a la normalidad en el caso de que se produzca una reparación de la lesión celular.

En el trabajo realizado por **Rice MJ** (166) en 1989, sobre el efecto de Halotano, Isoflurano y Verapamil en la I/R renal, se comprobó que había un paralelismo entre el daño tubular y el aumento de LDH. Los resultados obtenidos llevaron a afirmar a este autor, que el tratamiento con los fármacos mencionados producía una mejora en la lesión tubular, así como una disminución en los valores del enzima estudiado.

Nauta RJ et al (140) en un estudio publicado en 1990, practicaron I/R hepática en ratas; para su valoración realizaron análisis histológicos así como serológicos, incluyendo en éstos el de los enzimas liberados GOT, GPT, fosfatasa alcalina y LDH. Obtuvieron un aumento en los valores de todos ellos, con un pico en el 2º día postisquemia. Al 7º día descendieron GOT y GPT, manteniéndose elevados la fosfatasa alcalina y LDH, que no regresaron a la normalidad hasta transcurridos 21 días de la intervención.

Hernandez-Baro MC et al (76), en una revisión de la fisiología y tratamiento de la I/R hepática, realizaron entre otros un estudio de enzimas. Se observó que tras 15-30 minutos de isquemia se producía una rápida liberación de los enzimas contenidos en mitocondrias y lisosomas, éstos son: fosfatasas ácidas, beta-glucoronidasa y GOT. Se pudo apreciar también una pérdida de la membrana lisosomal, siendo la célula prácticamente consumida por los enzimas digestivos. Entre el 1º y 5º días posteriores a la reperusión continuó la gran actividad de los enzimas citoplasmáticos (GOT, GPT y LDH) por lo que eran liberadas al plasma sanguíneo, aumentando sus niveles plasmáticos.

En el presente estudio las medias de los valores de **LDH** obtenidos, indican que hay diferencias significativas entre el grupo control y los cuatro grupos tratados con pentoxifilina. Se observaron niveles de LDH sensiblemente inferiores en estos cuatro grupos, con respecto al grupo control. No se hallaron diferencias estadísticamente valorables entre los cuatro grupos con tratamiento.

Los resultados obtenidos son equiparables a los de **Ramos JL** (162), autor que administró pentoxifilina en I/R renal, hallando diferencias significativas entre todos los grupos tratados y el control, que presentó valores de LDH sensiblemente superiores.

Estos resultados sugieren que el tratamiento con PTX lleva a una menor lesión en la I/R, por un efecto protector en las células, de tal forma que al haber una menor destrucción hística, se produce una menor liberación de este enzima intracelular.

3. PRUEBAS DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA:

MALONILDIHALDEÍDO (MDA)

Como ya ha sido comentado en capítulos anteriores, durante el proceso de la isquemia/reperfusión de un órgano se va a producir no sólo la falta de riego, sino también la liberación de radicales libres de oxígeno, que actúan sobre los lípidos de la membrana celular, provocándole una grave lesión por peroxidación lipídica.

El malonildialdehído (MDA) es un derivado del ácido araquidónico que se forma durante este proceso, siendo índice del grado de peroxidación, y por tanto, de la extensión de la lesión en un tejido sometido a I/R.

Suzuki S et al (192) en un trabajo de 1991, realizaron determinaciones de MDA para valorar el efecto de la prostaglandina I₂ en la I/R hepática, con distintos tiempos de isquemia, estableciendo la comparación con otro grupo al que se suministró suero fisiológico. Observaron que los valores de MDA son mayores en el grupo que sólo recibió suero fisiológico. La determinación de MDA, junto con la supervivencia, les sirvió para considerar como beneficioso el tratamiento con prostaglandina I₂.

Turnage RH et al (208), partiendo del hecho comprobado de que la isquemia intestinal lleva consigo una lesión aguda en pulmón, hígado y riñón, es decir un "fallo orgánico múltiple" a distancia, practicaron la isquemia intestinal por clampaje de la arteria mesentérica superior durante 60 y 120 minutos, con distintos periodos de reperfusión.

Una vez finalizado el proceso de I/R, extrajeron tejido hepático e investigaron el efecto de los radicales libres y de la lipoperoxidación, mediante la determinación de MDA, glutathion y glutathion oxidado. El glutathion no mostró variaciones en el tejido isquémico; el glutathion oxidado aumentó notablemente durante la reperfusión; el MDA no se incrementó,

considerando los autores que la I/R intestinal no había sido suficiente para lesionar profundamente a los hepatocitos. Estas observaciones les llevaron a considerar al glutatión oxidado, como un indicador más sensible del estrés oxidante, que los productos de la peroxidación lipídica.

En 1992 **Hamamoto I** et al (68) publicaron sus investigaciones sobre la repercusión del almacenamiento en frío del intestino delgado, mediante distintas soluciones de preservación (Universidad de Wisconsin, Euro-Collins y Ringer lactato). Determinaron MPO, MDA, hipoxantina y maltasa.

Todos los grupos mostraron aumento de MDA. Los valores de MDA y MPO fueron mayores en los grupos preservados con RL y UW, lo que sugiere una peor preservación intestinal con estas soluciones.

Mellow CG et al (129) practicaron en colgajos de piel, isquemia venosa y arteriovenosa con reperfusión posterior, determinando los valores de MDA en los mismos. Observaron que los niveles aumentaban notablemente en aquellos grupos experimentales sometidos a mayores tiempos de isquemia, sobre todo si ésta era venosa.

Soejima A et al (184) realizaron en 1994 un estudio comparativo entre el fallo renal inducido por la administración de gentamicina y la lesión por I/R renal. Para la valoración del estudio se determinaron glutatión y MDA en tejido renal. Los resultados reflejaron un aumento de MDA, tanto en el fallo renal inducido por gentamicina, como en la I/R renal, Estos autores sugirieron que la insuficiencia provocada por la gentamicina estaba causada por la liberación del contenido lisosomal en el citoplasma y la peroxidación de los lípidos de membrana.

Estal L (47) utilizó Alopurinol en I/R renal, observando que todos los grupos tratados presentaron unos valores de MDA considerablemente inferiores a los niveles del grupo

control, que sólo recibió suero fisiológico. Resultados semejantes se obtuvieron al sustituir el tratamiento por Adenosina.

Los resultados de **MDA** obtenidos en el presente estudio, evidenciaron diferencias estadísticamente valorables entre el grupo control y los cuatro grupos que recibieron tratamiento con pentoxifilina, mostrando estos últimos unos niveles de malonildihaldehído considerablemente inferiores a los del grupo control.

El análisis de estos resultados, nos llevó a considerar que el proceso de peroxidación lipídica era de menor grado en los grupos tratados con PTX, lo que indicaría una menor alteración de la membrana celular y, por tanto, una acción menos agresiva por parte de los radicales libres de oxígeno; coincidiendo con otros estudios que afirman que a mayor nivel de MDA, peor es la conservación del intestino (68).

4. PRUEBAS DE ACTIVIDAD NEUTROFÍLICA: MIELOPEROXIDASA (MPO).

El proceso de la isquemia/reperfusión de un órgano lleva consigo la liberación de sustancias quimiotácticas, como parte de una acción de respuesta inflamatoria, que van a provocar el acúmulo y activación de los leucocitos neutrófilos; estos leucocitos alteran el endotelio vascular y las membranas celulares, al participar en la producción de radicales libres, los cuales resultan altamente citotóxicos.

Basándonos en el importante papel de los leucocitos polimorfonucleares, ya descrito en el capítulo de la fisiología de la lesión por I/R, pasamos a determinar indirectamente su presencia por la actividad MPO en los tejidos sometidos a este proceso.

La Mieloperoxidasa (MPO) es una enzima liberada por los neutrófilos, de manera que, su detección es un dato que nos ayuda a valorar el grado de infiltración neutrofilica en los tejidos y, por tanto, el grado de la lesión.

Schmeling DJ et al (173) en una publicación de 1989, describieron sus investigaciones sobre el fallo orgánico múltiple, provocado por la I/R intestinal. Demostraron mediante la técnica de MPO e histología, que tras esta intervención se producía un acúmulo de polimorfonucleares en tejido pulmonar.

Otamiri T (150) investigó el daño de la mucosa intestinal, al realizar la ligadura interrumpida de íleon distal en ratas. Para su valoración determinó MPO y MDA en el tejido intestinal. Sus resultados mostraron un aumento notable en dichos niveles, haciendo evidente la importancia de los neutrófilos en la producción de la lesión por I/R.

En 1989 **Barroso J y Schmid GW (10)** publicaron un estudio sobre el efecto de la pentoxifilina, en una situación de shock endotóxico, observando que esta droga producía una

disminución del acúmulo leucocitario en endotelio, así como un aumento en la supervivencia de los animales que recibieron este tratamiento. La PTX al disminuir el secuestro leucocitario impide el avance de la lesión en la microvasculatura, disminuyendo el daño en los órganos afectados.

Zimmerman BJ et al (233) realizaron en 1990 un estudio de la infiltración granulocitaria en el intestino postisquémico del gato. Demostraron: 1°) el aumento en la producción de leucotrieno B₄ durante la I/R, siendo este leucotrieno un potente promotor de la adhesividad, activación y extravasación leucocitaria, y 2°) la disminución del acúmulo leucocitario en la mucosa postisquémica, mediante el tratamiento con inhibidores de este leucotrieno.

Para comprobar estos hechos utilizaron la determinación de MPO en el tejido intestinal isquémico, que se mostró notablemente inferior en el grupo que recibió el tratamiento con inhibidores, frente al grupo control, que no fue tratado.

Sullivan GW (191) en sus investigaciones sobre los efectos de la pentoxifilina y sus análogos sobre la función leucocitaria, determinó que estos fármacos actuaban disminuyendo la adhesividad leucocitaria y su actividad oxidativa, al inhibir la liberación de citoquinas inflamatorias, como el Factor de Necrosis Tumoral.

Shoenberg MH et al (181) publicaron en 1991 un estudio encaminado a determinar la participación de los neutrófilos en la lesión intestinal postisquémica, por oclusión de la arteria mesentérica superior en gatos, algunos de los cuales fueron tratados previamente con anticuerpos monoclonales (IB4), inhibidores de la adhesividad leucocitaria a las células endoteliales.

Observaron por determinación de MPO e histología, mejoría en el grupo tratado con los anticuerpos, el cual obtuvo unos valores inferiores de MPO y un lesión histológica más leve, con respecto a otro grupo no tratado. Con estos resultados pusieron en evidencia el importante papel de los neutrófilos en la formación de la lesión.

Hamamoto I et al (68) realizaron estudios del efecto de la lipidoperoxidación, así como de la actividad neutrofílica, sobre el borde en cepillo intestinal, cuando éste es conservado en distintas soluciones de preservación. Hicieron la valoración de las soluciones (Universidad de Wisconsin, Euro-Collins, Ringer lactato) determinando MPO y MDA, considerando el aumento de éstos como signo de una peor preservación.

Los tejidos intestinales que mostraron mayores tasas de mieloperoxidasa y de malonil-dialdehído fueron los preservados en UW y en RL.

Koike K et al (101) publicaron en 1992 un trabajo basado 1º en el hecho probado de la lesión "a distancia", como consecuencia de la I/R intestinal y 2º en la posible participación de la traslocación bacteriana, surgida durante la I/R, sobre el desarrollo del fallo orgánico múltiple.

Realizaron isquemia intestinal en ratas, por oclusión de la arteria mesentérica superior durante 45 minutos, con una reperfusión posterior de 2 horas. Al grupo control sólo se le practicó una laparotomía. Midieron el nivel de endotoxemia, no hallando diferencias entre el grupo de ensayo y el control, lo que les llevó a sugerir que la traslocación bacteriana, no era la causa desencadenante del fallo orgánico múltiple.

Midieron la MPO en tejido pulmonar, comprobando el aumento de ésta como consecuencia de la I/R intestinal, que ejerce su acción también a distancia. Los valores de MPO hallados, demuestran el nivel de secuestro leucocitario en éste órgano.

Simpson R et al (182) describieron en 1993, sus investigaciones sobre la acción de los neutrófilos en las lesiones locales y "a distancia" (pulmón e hígado), como consecuencia de la I/R intestinal. Utilizaron distintos tratamientos antileucocitarios, valorándolos mediante la prueba de MPO, que se mostró aumentada en el tejido pulmonar y hepático, siendo los valores obtenidos mayores en el grupo control, no tratado con sueros antileucocitarios. Estos

resultados les llevaron a concluir que, los leucocitos polimorfonucleares y sus productos intervienen en la formación de la lesión pulmonar y hepática.

Kanvar S y Kubes P (95) publicaron un trabajo en 1994 sobre la I/R intestinal, en el que afirman que los oxidantes, liberados durante este proceso, inducen la degranulación de los mastocitos, lo cual estimula la infiltración granulocitaria y la disfunción tisular asociada a la I/R intestinal. Las determinaciones que utilizaron fueron: el aclaramiento de Cr⁵¹EDTA y la MPO, observando aumentos significativos de ambos, al producirse la lesión.

Davenpeck KL et al (43) realizaron investigaciones sobre el efecto de la administración de anticuerpos monoclonales anti P-selectina, en el momento de la reperfusión, tras isquemia de la arteria esplácnica. Estos anticuerpos actúan disminuyendo el acúmulo de los granulocitos, hecho demostrable por la disminución de los valores de MPO en el tejido intestinal del grupo tratado, frente a un grupo control que no recibió el tratamiento.

En 1994 **Koike K et al (102)** llevaron a cabo un estudio sobre el mecanismo de producción del "fallo orgánico múltiple", consecuencia de la I/R intestinal, y su relación con la producción de endotoxinas. Determinaron la actividad neutrofílica en el pulmón por la MPO, la cual se mostró elevada. Estos autores concluyen que la I/R intestinal provoca el acúmulo de neutrófilos, los cuales inducen la lesión pulmonar, por mecanismos diferentes al de las endotoxinas.

Moore RM et al (134) en una publicación de 1994, describen sus investigaciones en el campo de la I/R intestinal, practicada en caballos. Estos autores evaluaron el grado de la lesión por histología y por la actividad MPO, evidenciando de esta forma el secuestro leucocitario en el colon, producido durante la formación de la lesión. Observaron que los neutrófilos se acumulaban en la mucosa del colon, sobre todo durante la fase de reperfusión, contribuyendo a la producción de la lesión.

Estal L (47) en su estudio sobre los efectos de Alopurinol y Adenosina en I/R renal, observó que con el primer fármaco los grupos tratados con dosis de 10 mg/Kg 1 hora antes o en el momento de la reperfusión y el grupo con 50 mg/kg en el momento de la reperfusión, presentaban valores de MPO significativamente inferiores al grupo control.

Al administrar el tratamiento de Adenosina se pudo apreciar una disminución significativa del nivel MPO en los grupos tratados con el fármaco a una dosis de 10 mg/kg 1 hora antes o en el momento de la reperfusión, frente al control.

En nuestro estudio, los resultados obtenidos con referencia a la actividad mieloperoxidasa, se mostraron significativamente más bajos en los cuatro grupos tratados con pentoxifilina, con respecto al grupo control, que no recibió el tratamiento, coincidiendo con lo observado por otros autores, que demuestran el acúmulo polimorfonuclear en las lesiones por isquemia-reperfusión (43,95,150,180,181).

El hallazgo de valores más bajos de MPO en los grupos tratados, evidencia un menor secuestro leucocitario en el tejido intestinal comprometido, y por tanto, una menor producción de radicales libres por parte de estos leucocitos, con lo que la lesión debería ser más leve.

De acuerdo con otros autores (10), la PTX reduciría el acúmulo leucocitario, protegiendo de esta forma al órgano del avance de la lesión en la microvasculatura. La pentoxifilina también ejercería su acción aumentando la deformabilidad leucocitaria (174), de forma que se reduciría la contribución de estas células al aumento de la resistencia del flujo capilar y en los trastornos del estasis vascular (174). Otra forma de protección de la PTX sería, según **Sullivan GW (191)**, el descenso de la adhesividad leucocitaria, producida indirectamente por la droga al disminuir el Factor de Necrosis Tumoral.

Dentro de los cuatro grupos tratados encontramos también diferencias significativas entre: P1 y P2, P1 y P4, P3 y P2, P3 y P4.

Los grupos con los niveles más bajos de MPO fueron el P2 y P4, que corresponden a aquellos animales que recibieron el tratamiento con pentoxifilina (1 mg/kg, 10 mg/kg, respectivamente) en el momento de la reperfusión, hecho que coincide con la duración de la vida media del fármaco (de 1 a 1'6 horas). No se hallaron diferencias significativas entre estos dos grupos.

5. ESTUDIOS LÁSER DOPPLER.

En el presente estudio se realizaron mediciones de la microcirculación intestinal, con el fin de valorar la misma durante la isquemia, así como la recuperación del flujo durante la fase de reperfusión, comparando los distintos grupos para poder apreciar el efecto de la pentoxifilina. Para este estudio se utilizó la técnica de láser Doppler, aplicándolo a 5 ratas de cada uno de los grupos referidos en el proyecto experimental.

Baumann JC (9) publicó en 1976 un estudio sobre el efecto de la pentoxifilina en pacientes con enfermedad vascular periférica, observando mejoría en los índices reográficos y oscilográficos (técnica Doppler), lo que indicaba una mejoría de la circulación.

Brevetti G et al (18) comprobaron que la administración de PTX a pacientes con arteriopatía ocliterante, aumentaba el flujo sanguíneo, tanto en reposo como durante el ejercicio, valorándolo según el índice reográfico de Jantsch.

Oshima N y Sato M (145) en 1981, administrando PTX por vía arterial a ratas, observaron, mediante microscopía intravital, disminución de la viscosidad sanguínea con aumento simultáneo del flujo sanguíneo en los capilares mesentéricos, medido por láser Doppler.

Angelkort B y Doppelfeld E (5) en un trabajo de 1983, estudiaron el efecto de la pentoxifilina en pacientes con enfermedad crónica de estenosis arterial, demostrando mediante la técnica Doppler una notable mejoría, en la presión y flujo postestnótico del tobillo.

Pupita F et al (160) realizaron investigaciones sobre fármacos con efecto hemorreológico; administraron pentoxifilina a pacientes con extremidades isquémicas y a personas sanas, observando un aumento en el flujo sanguíneo muscular de las extremidades enfermas, sin fenómeno de "robo circulatorio". En las personas sanas no se produjeron efectos.

Orlando E et al (149) publicaron en 1983, un estudio en el que utilizaron la técnica de ultrasonidos Doppler, comprobando mediante ésta, que la pentoxifilina administrada por vía intravenosa aumentaba la velocidad del flujo sanguíneo, hasta un 18%, en pacientes con estenosis valvular aórtica. En individuos con función cardíaca normal no se observó ningún efecto.

Ehrly AM (45) utilizó la inserción de un microelectrodo en el músculo isquémico, como método para objetivar la mejoría de la microcirculación de las extremidades isquémicas, tras la administración de pentoxifilina. Comprobó también que el tratamiento llevaba al músculo isquémico a presentar una mayor tensión de oxígeno, con respecto al período anterior al tratamiento.

Nauta RJ et al (140) estudiaron la I/R hepática en ratas, sometiéndolas a una isquemia de 90 minutos. Realizaron estudios histológicos, enzimáticos (GOT, GPT, LDH, fosfatasas alcalinas) y también circulatorios, mediante láser Doppler, para poder controlar el flujo de sangre portal a lo largo de todo el proceso. Apreciaron el descenso del riego durante la isquemia y su rápida recuperación durante la reperfusión.

En un estudio realizado por **Wang P et al (218)** en 1992, sobre los efectos de ATP-MgCl₂ en el trauma por hemorragia, y la contrarregulación de las citoquinas inflamatorias, afirman que la pentoxifilina suprime la síntesis del factor de necrosis tumoral (depressor hemodinámico) y restaura el flujo sanguíneo intestinal, interrumpido por un shock hemorrágico.

Ar'Rajab A et al (6) publicaron en 1994 sus investigaciones sobre el efecto de las ciclosporinas y los antagonistas de calcio en la I/R renal, utilizando para su valoración la medición del flujo renal por medio de láser Doppler. Comprobaron una mayor nefrotoxicidad, reflejada por una disminución del flujo renal, con la ciclosporina A que con la G, así como un efecto beneficioso por parte de los antagonistas.

Ramos JL (162) utilizó el láser Doppler para conocer los efectos de la pentoxifilina sobre la circulación del riñón sometido a I/R. Observó que los grupos que mostraban un mayor porcentaje de recuperación de la microcirculación renal, con respecto al grupo control, eran aquellos que recibieron el tratamiento en el momento de la reperfusión, siendo el grupo con dosis de 10 mg/kg el que obtuvo un nivel superior de recuperación, confirmado estadísticamente.

En el presente estudio, los resultados obtenidos con la técnica de **Láser Doppler**, nos permitieron realizar una valoración del porcentaje de recuperación, tras una hora de reperfusión, en la que se pudo apreciar que la recuperación de la microcirculación intestinal era significativamente superior en aquellos grupos que recibieron la dosis de pentoxifilina (1 ó 10 mg/kg) en el momento cero de la reperfusión, grupos P2 y P4, coincidiendo con los datos presentados por **Ramos JL** (148).

Los resultados aportados sugieren que el tratamiento con PTX mejora el restablecimiento del flujo sanguíneo tras una situación de isquemia, basando su efectos fundamentalmente en su capacidad hemorreológica, como es su acción sobre la deformabilidad eritrocitaria y leucocitaria, así como en su labor antitrombótica (5, 9, 18, 145, 149, 160).

El momento óptimo para la administración de la PTX, parece ser el de la reperfusión, no una hora antes de la isquemia, lo que tiene su explicación en la vida media del fármaco, de 1 a 1'6 horas (11), permitiéndole así prolongar su efecto hasta el delicado período del restablecimiento del flujo.

6. HISTOLOGÍA.

La utilización del análisis anatomopatológico para la valoración del daño producido en los tejidos u órganos, sometidos a un proceso de isquemia/reperfusión, es una práctica común utilizada por muchos autores, algunos de los cuales la llevan a cabo para la detección temprana de una posible reacción de rechazo orgánico.

Williams LF (223) en sus estudios sobre la insuficiencia circulatoria intestinal, determinó mediante estudio histológico, que el daño isquémico del intestino comienza a nivel de las vellosidades de la mucosa.

En 1978 **Lundgren O y Haglund U** (116) mediante estudios histológicos en mucosa intestinal sometida a isquemia, establecieron que la especial susceptibilidad de las crestas de las vellosidades, en una situación de reducción del flujo sanguíneo, es debida a la existencia de cortocircuitos extravasculares, en la base de estas vellosidades.

Haglund E et al (66) en sus investigaciones sobre la obstrucción intestinal en ratas, observaron que tras 1 hora de isquemia, la lesión más severa es la hallada en las vellosidades. Esta afirmación la realizaron en base a estudios anatomopatológicos.

Observaciones semejantes realizaron **Grøgaard R et al** (59), sobre los efectos de la isquemia y los radicales libres en la mucosa intestinal. Realizaron isquemia de la arteria mesentérica superior en perros, comprobando mediante histología el daño severo en las vellosidades, así como un aumento en la permeabilidad de la mucosa, mediante la prueba de aclaramiento de albúmina intestinal.

Parks DA et al (153), en sus estudios sobre isquemia orgánica, afirmaron que el efecto de la isquemia sobre el intestino es más precoz que sobre otros órganos, ya que en el intestino

isquémico, la xantino deshidrogenasa pasa a xantino-oxidasa muy rápidamente, en cuestión de minutos, mientras que otros órganos precisan de 1 hora para esta reacción.

En 1989 **Schmid T** et al (175) establecieron unos criterios histológicos de la evolución de los trasplantes intestinales en ratas, y su interés para la valoración del rechazo:

- Del 4º al 6º día postrasplante, aparecería una infiltración moderada de la lámina propia y submucosa por polinucleares, con cierta necrosis de las células epiteliales de las criptas.

- Entre el 7º y 12º día se observaría muerte de las células de las criptas, pero sin ser un hecho prominente. Se podrían apreciar trombos de fibrina en los capilares de la mucosa, durante el curso de un rechazo. Esta situación se asociaría con extensa necrosis de la mucosa al 11º y 12º día.

- Al 11º-12º día postrasplante, habría hipertrofia en el endotelio arterial, seguida de proliferación diseminada en la íntima y de trombosis.

Bennett WM et al (15) en 1992, realizaron un trabajo para investigar los efectos de la pentoxifilina en casos de nefrotoxicidad provocada por ciclosporinas, administradas durante 20 días.

En el estudio anatomopatológico posterior al tratamiento, observaron una mayor protección renal en el grupo que recibió pentoxifilina, mostrando un menor grado de atrofia y fibrosis tubular que en el grupo control, sólo tratado con la ciclosporina.

En 1993 **Simpson R** et al (182) describieron sus investigaciones acerca del papel de los leucocitos polimorfonucleares en las lesiones locales y "a distancia", tras la I/R intestinal. Administraron un tratamiento previo de anticuerpos monoclonales, para prevenir la adhesión de los leucocitos, observando mediante histología y prueba de MPO, que este pretratamiento reducía la lesión a distancia (hígado y pulmón) pero no la local.

Thaler W et al (198) realizaron estudios histológicos para valorar el efecto de dos soluciones de preservación (Euro-Collins y Universidad de Wisconsin), durante la conservación en frío de segmentos intestinales. Los resultados obtenidos les llevaron a concluir que la solución UW es la única que puede conservar injertos de intestino delgado durante más de 12 horas, al ser la única que no conducía a una necrosis severa tras este período de tiempo, en contraste con la solución EC.

Kubes P (104) publicó en 1993 un estudio sobre los efectos de la inhibición de la síntesis del óxido nítrico, sobre la función de la barrera mucosa, tras la isquemia/reperfusión intestinal producida en gatos. Para este proyecto utilizó el aclaramiento de Cr ⁵¹ y el análisis histológico. La conclusión observada fue que, la producción de óxido nítrico es un importante factor para minimizar la disfunción mucosa y la de barrera microvascular, asociada a un proceso de I/R.

En 1993 **Toyama N** et al (207), publicaron un estudio de valoración del rechazo de injertos intestinales, mediante técnicas endoscópicas e histológicas. Establecieron unos estadios histológicos (1° a 4°) de menor a mayor extensión del proceso de rechazo, de manera que en el estadio:

1° comienza a afectarse la mucosa con pérdida del patrón capilar.

2° la extensión del daño en mucosa es más extenso.

3° el epitelio necrótico muestra múltiples úlceras.

4° el rechazo del tejido es completo, con necrosis total y formación de un tejido cicatricial blanco.

Yamataka A et al (226) en sus investigaciones sobre la I/R intestinal experimental, sugieren que los cambios ultraestructurales en las microvellosidades intestinales son un buen marcador del rechazo de un injerto. Practicaron la biopsia postrasplante, sometiendo los cortes

tanto a estudio histológico, mediante microscopía óptica, como a estudio ultraestructural por medio de microscopía electrónica, observando que esta última se muestra más sensible a la hora de detectar el rechazo del injerto, ofreciendo datos más exactos de las alteraciones a nivel de las microvellosidades.

Muller AR et al (138) estudiaron los efectos de la preservación en frío de segmentos de intestino delgado, observando que la localización donde se muestran principalmente los daños, es la membrana basal y el endotelio de la hipervascularizada mucosa intestinal.

En la evaluación histológica, al final del período de preservación, encontraron separación del epitelio de las vellosidades de la lámina propia. El daño histológico se mostró mayor después de la fase de reperfusión de este trasplante, evidenciando destrucción de células epiteliales. Estos autores hallaron correlación entre la extensión de la lesión y el tiempo de preservación.

En 1994 **Udassin R et al (211)** publicaron un trabajo sobre la regeneración del intestino tras una isquemia transitoria, por oclusión de la arteria mesentérica superior, durante 30 minutos. Se realizaron estudios histológicos a distintos tiempos, observando que a los 10 minutos de isquemia ya se podía apreciar daño severo en las vellosidades, sin embargo, estas alteraciones van desapareciendo, mostrando una restauración del epitelio de las vellosidades a medida que avanza el período de reperfusión.

Muller AR et al (139) realizaron determinaciones de la actividad glutaminasa y estudios histológicos, para valorar la lesión por preservación en intestino delgado. Estos parámetros se determinaron durante la preservación en frío (mediante suero fisiológico o tampón fosfato con sucrosa PBS), tras la reperfusión y al cabo de 2 y 7 días del trasplante.

Con los datos obtenidos concluyeron que el grado de lesión histológica, observada a los 20 minutos de la reperfusión, es un buen índice del grado supervivencia del injerto,

preservado en cualquiera de las dos soluciones. La actividad glutaminasa se mostró útil para valorar los segmentos conservados en PBS, pero no para los preservados en suero fisiológico..

En el presente trabajo los **estudios histológicos** realizados reflejan que los grupos que presentaron signos de isquemia severa definida por la marcada erosión de la mucosa, edema y congestión de las vellosidades, con un infiltrado inflamatorio intenso, fueron los grupos Control, P1 y P3 (1 y 10 mg/kg peso de pentoxifilina 1 hora antes de la isquemia, respectivamente). Estos resultados concuerdan con los de otros estudios, de manera que el primer lugar afectado por la isquemia/reperfusión van a ser las vellosidades intestinales, precisamente por su riqueza en microvasculatura (59,116,138,207,223,)

En el grupo P2 la lesión correspondió a una isquemia moderada, con infiltrado inflamatorio a nivel de la lámina propia y discreta congestión de los capilares de la mucosa.

El grupo P4 presentó signos de isquemia leve, con ligero infiltrado inflamatorio en lámina propia y conservación de las estructuras.

Estos estudios histológicos revelan pues, una cierta mejoría en aquellos grupos que recibieron tratamiento con pentoxifilina, en el momento de la reperfusión, sobre todo el grupo P4, al que se administró la PTX a una dosis de 10 mg/kg de peso, coincidiendo con los resultados de otros estudios (15,162). El hecho de obtener un mejor efecto del fármaco si se administra en el momento de la reperfusión, parece estar basado en la duración de su vida media, de 1 a 1'6 horas (11), alcanzando así su espectro de acción al período de restablecimiento de la circulación.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente modelo experimental, sugieren que la Pentoxifilina:

1- Influye favorablemente en la lesión por isquemia-reperfusión intestinal.

2- Ejerce un efecto protector sobre la microcirculación intestinal, basado en dos mecanismos de acción:

.Hemorreológico, disminuyendo la viscosidad sanguínea.

.Capacidad de reducir el acúmulo leucocitario a nivel del endotelio vascular.

3- Minimiza el proceso de peroxidación lipídica, durante la reperfusión.

4- El efecto protector de la Pentoxifilina se muestra dependiente del momento de administración, siendo óptimo el tiempo cero de la reperfusión.

5- Su acción no es dosis/dependiente en el rango de tratamiento utilizado, aunque en general, los resultados se mostraron más favorables con la dosis de 10 mg /Kg de peso.

BIBLIOGRAFIA

1- Alegre ML, Gastaldello K, Abramovicz D. Evidence that Pentoxifylline reduces anti-CD3 monoclonal antibody-induced cytokine release syndrome. *Transplantation*. 1991; 52(4): 674-679.

2- Ambrus CM, Ambrus JL, Gastpar H, Sharma SD, Shuhow B. The role of fibrinolysis in the therapy of peripheral vascular disease. *Angiology*. 1984;35:436-442.

3-Anaise D, Ishimaru M, Madariaga J, Irisawa A, Lane B. Protective effects of trifluoperazine on the microcirculation of cold-stored livers. *Transplantation*. 1990; 50(22): 933-939.

4-Angelkort B. Thrombozytenfunktion plasmatische. Blutgerinnung und Fibrinolyse bei chronisch arterieller Verschlusskrankheit. *Medizinische Welt*. 1979; 30: 1239-1248.

5-Angelkort B, Doppelfeld E. The treatment of chronic arterial occlusion: a clinical study with a new formulation of pentoxifylline (Trental). *Pharmatherapeutica*. 1983; 3(1): 18-29.

6-Ar'Rajab A, Davidson IJ, Harris RB, Mileski WJ, Sentementes JT. Deterious effect of cyclosporins on the ischemic kidney in the rat and the protection by the calcium antagonist verapamil. *J Am Soc Nephrol*. 1994; 51(1):93-101.

7- Atalla SI, Toledo-Pereyra LH, Mackenzie GH, Cederna JP. Influence of oxygen-derived free radical scavengers on ischemic livers. *Transplantation*. 1985; 40(6) :584-590.

- 8- Balcells A.** La clínica y el laboratorio. ISBN 84-458-0163-5. 1993.
- 9- Baumann JC.** Doppler ultrasonic blood pressure measurements in limbs with occlusive arterial disease and in normal lower extremities under treatment with pentoxifylline. IRCS Med Sci. 1976; 4: 93.
- 10- Barroso J, Schmid GW.** Pentoxifylline pretreatment decreases neutrophil activation during endotoxic shock and improves survival. Pentoxifylline and analogues: effects on leukocyte function. Ed J Hakim, Karger, Basel. 1990: 97-110.
- 11- Beermann B, Ingers, Mánsby J, Chamberlain J, McDonald A.** Kinetics of intravenous and oral pentoxifylline in healthy subjects. Clin Pharmacol Ther. 1985; 37: 25-28.
- 12- Belkin M, Lamorte WJ, Wright JG, Hobson RW.** The role of leukocytes in the pathophysiology of skeletal muscle ischemic injury. J Vasc Surg. 1989; 10(1): 14-8; discussion 18-9.
- 13- Belzer FO, Ashby BS, Dumphy JE.** 24 and 72 hours preservation of canine kidneys. Lancet. 1967; 2: 536.
- 14- Belzer FO, Southard JH.** Principles of solid-organ preservation by cold storage. Transplantation. 1988; 45(4): 673-676.

15- Bennett WM, Elzinga LW, Porter GA, Rosen S. The effects of pentoxifylline on experimental chronic Cyclosporine Nephrotoxicity. *Transplantation*. 1992; 56 (6): 1118-1119.

16- Bieri JG, Anderson AA. Peroxidation of lipids in tissue homogenates as related to vitamin E. *Arch Biochem Biophys*. 1960; 90:105-110.

17- Billiar TR, Garberoglio C, Schraut WH. Maltose absorption as an indicator of intestinal allograft rejection. *J Surg Res*. 1984;37: 75-82.

18- Brevetti G, Abate S, Lavecchia G, Ferulano G, Paudice G, Acunzo R. La pentoxifilina nel trattamento delle arteriopatie obliteranti al secondo stadio. *Progresso Medico (Rome)*. 1979; 35: 363-368.

19- Bruin RWF de, Heineman E, Marquet RL. Small bowel transplantation: an overview. *Transpl Int*. 1994; 7: 47-61.

20- Bruin RWF de, Hogenesch H, Heineman E, Jeekel J, Marquet RL. Fulminant graft-versus-host disease after FK506 treatment in fully allogeneic small bowel transplantation. *Transplant Proc*. 1991; 23: 3257- 3259.

21- Burgmann H, Reckendorfer H, Sperlich M, Spieckermann PG. Small bowel tissue high- energy phosphate alterations during hypothermic storage using different protecting solutions. *Euro Surg Res*. 1992; 24: 84-88.

22- Calne RY, Pegg DE, Pryse-Davies J, Leigh-Brown F. Renal preservation by ice-cooling. An experimental study relating to kidney transplantation from cadavers. *Br Med J.* 1963; 2: 651.

23- Calne RY, Sells RA, Pena JR. Induction of immunological tolerance by porcine liver allografts. *Nature*, 1969; 223: 472-6.

24- Carden DL, Korthuis RJ. Mechanisms of postischemic vascular dysfunction in skeletal muscle: implications for therapeutic intervention. *Microcirc Endothelium Lymphatics.* 1989; 5(3-5): 277-298.

25- Casey JP, Short BL, Rink RD. The effect of methylprednisolone on hepatic oxygen supply and plasma lactate and glucose in endotoxemia. *Circ Shock.* 1979; 6: 245.

26- Castillo M, Toledo-Pereyra LH, Prough D. Effective timing of allopurinol administration in the ischemic liver. *Transplantation*, 1989; 47 (4): 727.

27- Caty MG, Guice KS, Oldham KT, Remick DG, Kunkel SI. Evidence for tumor necrosis factor-induced pulmonary microvascular injury after intestinal ischemia-reperfusion injury. *Ann Surg.* 1990; 212(6): 694-700.

28- Chadwick VS, Phillips SF, Hofmann AF. Measurements of intestinal permeability using low molecular weight polyethyleneglycols (PEG 400). Chemical analysis and biological properties of PEG400. *Gastroenterology*, 1977; 73: 241-246.

29- Chadwick VS, Phillips SF, Hofmann AF. Measurements of intestinal permeability using low molecular weight polyethyleneglycols (PEG 400). Application to normal and abnormal permeability states in man and animals. *Gastroenterology*, 1977; 73: 251-257.

30- Chaudry IH, Ohkawa M, Clemens MG. Improved mitochondrial function following ischemia and reflow by ATP-MgCl₂. *Am J Physiol*. 1984; 246: 799-804.

31- Chaudry IH. Alterations in cell function with ischemia and shock and their correction. *Arch Surg*. 1981; 116: 1309-1317.

32- Chen H, Wu J, Xu D, Aboujaoude M, Strepkowski S, Kahan B, Daloze P. The effect of rapamycin on orthotopic small bowel transplantation in the rat. *Transplan Proc*. 1992; 24: 1157-1158.

33- Chien KR, Abrams J, Pfau RG, Farber JL. Prevention by chlorpromazine of ischemic liver cell death. *Am J Pathol*: 1977; 88: 539-558.

34- Chien S. Principles and techniques for assessing erythrocyte deformability. *Blood Cells*. 1977; 3: 71-99.

35- Chowdhury NC, Jin MX, Oluwole SF. Prevention of graft-versus-host disease in rat small bowel transplantation by recipient pretreatment with UV-B-modulated bone marrow cells. *Transplantation*. 1993; 55(6): 1229-35.

36- Christ O, Gleixner K, Kellner RM, Müller R, Rupp W. Pharmakokinetische untersuchungen nach oraler verabreichung von 3-7-dimethyl-1- (5-oxo-hexil)- xantin-¹⁴C (BL 191-¹⁴C) an ratten. Hunde un Menschen. *Arzneimittelforschung.* 1972; 2: 1933-1937.

37- Cobden I, Rothwell J, Axon ATR. Intestinal permeability and screening tests for coeliac disease. *Gut*, 1980: 512-518.

38- Cohen Z, Alasdair B, McGregor B, Moore KTH, Falk RE, Langer B, Cullen JB. Canine small bowell transplantation, a study of immunological responses. *Arch Surg.* 1976; 111: 248-253.

39- Collins GH, Bravo Shugarman MB, Trevasaki PI. Kidney preservation for transplantation. Initial perfussion and 30 hours ice storage. *Lancet.* 1969; 2: 1219.

40- Crissinger KD, Kviety PR, Granger DN. Pathophysiology of gastrointestinal mucosal permeability. *J Intestinal Med.* 1990:228, Suppl.1: 145-154 .

41- Cronstein BN, Kubersky SM, Weissmann G, Hirschhorn R. Release of superoxide anion (O₂) and hydrogen peroxide (H₂O₂) from neutrophyls by immune complexes cannot be inhibited by engagement of adenosine receptors. *Clin Res.* 1985; 33:337.

42- Date K, Okajima K, Takeda Y, Isozaki H, Tezuka K, Rio T. Effect of FK506 on graft survival in rat small intestinal allografts. *Transplant Proc.* 1992; 24 (3): 1173.

43- Davenpeck KL, Gautier TW, Albertine KH, Lefer AM. Role of P-selectin in microvascular leukocyte-endothelial interaction in splachnic ischemia-reperfusion. *Am J Physiol.* 1994; 267 (2pt2): H622-30.

44- Donaldson DR, Hall TJ, Kester RC, Ramsden CW, Wiggins PA. Does oxpentifilline (Trental) have a place in the treatment of intermitent claudication? *Current Medical Research and Opinion.* 1984; 9: 35-40.

45- Ehrly AM. Measurements of oxygen tension in muscle. In Spittell (Ed.) *Pharmacological approach to the treatment of limb ischemia.* pp. 65 - 72. College of Physicians of Philadelphia. 1983.

46- Ehrly AM, Rossbach P. The detection of changes in erythrocytes shape by a filtration method using filters. In Gerlach. Ed. *Erythrocytes, thrombocytes, leukocytes.* pp52-53. Thieme Verlan. Berlin 1979.

47- Estal L. Efecto del pretratamiento con alopurinol y adenosina en el daño producido durante la isquemia-reperfusion renal. Tesis Doctoral. 1996.

48- Fabian MA, Bollinger RR, Wyble CW, Watkins WD, Canada AT. Evaluation of solutions for small intestinal preservation. *Transplantation.* 1991; 52(5): 794-799.

49- Farreras P, Rozman C. Tratado de Medicina Interna. ISBN 84- 7102-981-2 (Vol 1).

50- Frank RS, Frank TS, Zelenock GB, D'Alecy LG. Ischaemia with intermittent re-perfusion reduces functional and morphologic damage following renal ischaemia in the rat. *Ann Vasc Surg.* 1993; 7(2): 150-155.

51- Fujimoto K, Yoshida S, Moriyama Y, Sakaguichi T. Absorption, distribution, excretion and metabolism of 1-(5-oxo-hexyl) theobromine (BL191) in rats. *Chem Pharm Bull.* 1976; 21: 1137-1145.

52- Granger DN, Hollwarth MA, Parks DA. Ischemia-reperfusion injury: role of oxygen derived free radicals. *Acta Physiol Scand.* 1986. 126 Suppl ;548: 47-63.

53- Grant D, Duff J, Zhong R, Gunn H, Garcia B, Keown P, Stiller C. Successful intestinal transplantation in pigs treated with cyclosporine. *Transplantation.* 1988; 45: 279-284.

54- Grant D, Zhong R, Gunn H, Duff J, Garcia B, Keown P, Wijsman J, Stiller C. Graft-versus-host disease associated with intestinal transplantation in the rat. *Transplantation.* 1989; 48: 545-549.

55- Grant D, Wall W, Mineault R. Successful small bowel-liver transplantation. *Lancet.* 1990; 335: 181-184.

56- Grigoleit HG, Porsche E, Stefanovich V, Jacobi G, Lahham A. The effect of pentoxifylline on red cell flexibility in healthy subjects after administration of Trental 400. *Pharmatherapeutica*. 1976; 1: 241-247.

57- Grigoleit HG, Jacobi G. Microrheological effects of the vasoactive compound 3,7-dimethyl-1-(5-oxo-exyl)-xantine (Pentoxifylline BL 191). *Vasa*. 1977; 6: 274-278.

58- Grisham MB, Hernandez LA, Granger DN. Xantine oxidase and neutrophil infiltration in intestinal ischemia. *Am J Physiol*. 1986; 251: 6-12.

59- Grögaard R, Parks DA, Granger DN, McCord JM, Forsberg JO. Effects of ischaemia and oxygen free radicals on the mucosal albumin clearance in intestine. *Am J Physiol*. 1982; 242: G448-G454.

60- Grover R, Lear PA, Ingham-Clark CL, Pockley AG, Wood RF. Method for diagnosing rejection in small bowel transplantation. *Br J Surg*. 1993; 80 (8): 1024-6.

61- Guerrini M, Pecci S, Rossi C, Cappelli H, Pieragalli D, Acciavatti A. Effect of pentoxifylline on blood hyperviscosity and peripheral haemodynamics in patients with peripheral obliterating arterial disease. *Pharmatherapeutica*. 1983; 3 (Suppl 1): 52-66.

62- Gundlach M, Schroeder P, Hansmann ML, Zwingers T, Deltz E. Graft manipulation prior to small intestinal transplantation. *Transplant Proc*. 1989; 21: 2894- 2895.

63- Guillot C, Marcel GA, Stolz J. Influence of pentoxifylline on erythrocyte filtrability and microrheology. Proc 3rd Int Congress Biorheology. La Jolla 1978.

64- Gutierrez Vega R, Toledo-Pereyra LH. Acute mesenteric small bowel ischemia in the rat. Protective effect of naloxone. Transplantation. 1990; 49(4): 830.

65- Habu k, Hara Y, Mikami Y, Honda M. Estudios on the erythrocyte osmotic fragility of patients suffering from vibration disease tested with the coil planet centrifuge. J Japan Accident Med Assoc. 1978; 26: 703-715.

66- Haglind E, Haglund U, Lundgren O, Schersten T. Graded intestinal vascular obstruction. IV. analysis of the development of refractory shock. Cir Shock. 1981; 8: 635-646.

67- Halliwell B. Oxidants and human disease: some new concepts. FASEB J. 1987; 1: 358.

68- Hamamoto I, Merhav H, Zhu Y, Suzuki M, Fujita S, Murase N, Todo S, Starzi TE. Lipid peroxidation, brush border, and neutrophil enzyme activity after small bowel preservation: a comparison of preservation solutions. Transplant Proc. 1992; 24 (3): 1095.

69- Hardy MA, Quint J, State D. Effect of antilymphocyte serum and other immunosuppressive agents on canine jejunal allografts. Ann Surg. 1970; 171: 51-60.

70- Hasselgren PO. Prevention and treatment of ischemia of the liver. *Surg Gynecol Obs.* 1987; 164: 187-196.

71- Hatazawa C, Yamaguchi M, Kato T, Koyama K. Effect of FK506 on bowel transplantation in rats. *Transplant Proc.* 1992; 24 (3): 1177.

72- Hau T, Toledo-Pereyra LH, Simmons RL, Najarian JS. The effect of adenosine and allopurinol on the tolerance of the collapsed lung to warm ischemia. *Surgery.* 1978; 83 (4): 406.

73- Hems DA, Brosnan JI. Effects of ischemia on content of metabolites in rat liver and kidney in vivo. *Biochem J.* 1970; 120: 105-111.

74- Hensel A. Effect of pentoxifylline on adenine nucleotide content of human erythrocytes. *Proc 16th Inter Congress Hematology.* 1976; 2: 31 Kyoto.

75- Hernández LA, Grisham MB, Twohig B, Arfors KE, Harlam JM, Granger DN. Role of neutrophils in I/R induced microvascular injury. *Am J Physiol.* 1987; 253: 699-703.

76- Hernandez-Baro C, Tamara JA, Toledo-Pereyra LH. Isquemia hepática. Conceptos básicos sobre su fisiopatología y tratamiento. *Cirugía y Cirujanos.* 1990; 57: 241-249.

77- Hewitt J, Reardon DM. Neutrophil mean peroxidase; a biologically interesting parameter with a potential for WBC differential quality control. Clin Lab Haematol. 1985; 7(1): 33-42.

78- Hinze HJ. The pharmacokinetics of 3,7-dimethyl-1- (5-oxo- hexyl)-xantine (BL 191) in man. Arzneimittelforschung. 1972; 22: 1492-1495.

79- Hinze HJ, Grigoleit HG, Rethy B. Bioavailability and pharmacokinetics of pentoxifylline from Trental 400 in man. Pharmatherapeutica. 1976; 1: 160-171.

80- Hirasawa H, Onkawa M, Kabayashi H, Odaka H, Sato H. Reversal ischemically induced hepatic cellular edema by administration of ATP-MgCl₂. Surg Forum. 1978; 31: 665.

81- Hoffmann AL, Makowka L, Banner B, Cai X, Cramer DV, Pascualone A, Todo S, Starzl TE. The use of FK506 for small intestine allotransplantation. Inhibition of acute rejection and prevention of fatal graft-versus-host disease. Transplantation. 1990; 49: 483-490.

82- Holmberg P. The physics and chemistry of free radicals. Med Biol. 1984; 62: 68-70.

83- Horgan MJ, Wrigth SD, Malik AB. Antibody against leukocyte integrin (CD18) prevents reperfusion-induced lung vascular injury. *Am J Physiol.* 1990; 259 (4 Pt 1): L315-9.

84- Howard GJ, Woodruff MFA. Effect of the graft-versus-host reaction on the immunological responsiveness of the mouse. *Poc R Soc Lond (Biol)* 1961; 154: 532-539.

85- Inauen W, Suzuki M, Granger DN. Mechanisms of cellular injury: potential sources of oxygen free radicals in ischemia/reperfusion. *Microcirc Endothelium Lymphatics.* 1989; 5(3-5): 143-55.

86- Ingham Clark CL, Cunningham AJ, Crane PW, Wood RFM, Lear PA. Lymphocyte infiltration patterns in rat small bowel transplants. *Transplant Proc.* 1990; 22:2460.

87- Intaglietta M. Reactivation of the microcirculatory in ischaemia. *Prog appl Micro-circ.* 1989; 13: 27-37.

88- Itasaka H, Burns W, Wiconb WN, Egawa H , Collins G, Esquivel CO. Modification of rejection by polyethyleneglycol in small bowel transplantation. *Transplantation.* 1994; 57(5): 645-648.

89- Iwai A, Itho M, Yokohama Y, Yasue N, Miyamoto T, John T, Matsusako K, Endoh K, Kawai T, Takeuchi T. Role of PAF (platelet activating factor) in I(R injury in the rat stomach. *Scand J Gastroenterol. Suppl.* 1989; 162: 63-66.

90- Iwaki Y, Starzi TE, Yagihashi A. Replacement of donor lymphoid tissue in small bowel transplants. *Lancet.* 1991; 337: 818-819.

91- Jaeschke H, Farhood A, Smith CW. Neutrophils contribute to ischemia/reperfusion injury in rat liver in vivo. *FASEB J.* 1990; 4 (15): 3355-3359.

92- Johnson C, Hallgren R, Tufveson G. Recovery of hyaluronidase during perfusion of small bowel transplantation reflects rejection. *Transplantation.* 1993 (3); 55(3): 477-9.

93- Johnson R, Harjola PT, Siltanen P. Effect of Pentoxifylline on red cell flexibility in arteriosclerotic patients with heart valve prosthesis. *Scand J Lab Invest.* 1981; 41(56): 297-300.

94- Juhan I. Deformabilité des hématies chez les diabétiques. *Nouvelle Presse Médicale.* 1978;7: 759

95- Kanvar S, Kubes P. Mast cells contribute to ischemia reperfusion-induced granulocyte infiltration and intestinal dysfunction. *Am J Physiol.* 1994; 267 (2 Pt 1): G316-21.

96- Kelly KJ, Williams WW Jr, Colvin RB, Bonventre JV. Antibody to intercellular adhesion molecule 1 protects the kidney against ischemic injury. *Proc natl Acad Sci USA.* 1994; 91 829: 812-6.

97- Khoudadi J, Rozencwaig J, Nacasch N, Schmidt B, Feuchtwanger M. Mesenteric vein thrombosis. *Arch Surg.* 1980;115:315-7.

98- Kim PCW, Levy GA, Craig M, Cullen J, Cohen Z. Immune responses during small intestinal allograft rejection: correlation between procoagulant activity and histopathology. *Transplant Proc.* 1990; 22: 2477- 2479.

99- Kobaladze SG, Schonja GS. Pentoxifylline and some physicochemical aspects of haemorheology in patients with ischaemic heart disease. *Curr Med Res Opin.* 1979; 6 (4): 5-11.

100- Kokudo Y, Furuya T, Takeyoshi I, Nakamura K, Zang S, Murase N, Todo S. Comparison of University of Wisconsin, Euro-Collins, and Lactated Ringer's solutions in rat small bowel transplantation. *Transplant Proc.* 1994; 26(3): 1492-1493.

101- Koike K, Moore FA, Moore EE, Poggetti RS, Tudor RM, Banerjee A. Endotoxin after gut ischemia/reperfusion causes irreversible lung injury. *J Surg Res.* 1992; 52: 656-662.

102- Koike K, Moore FA, Read RA, Carl VS, Banerjee A. Gut ischemia/reperfusion produces lung injury independent of endotoxin. *Crit Care Med.* 1994; 22 (9): 1438-44.

103- Kramer JJ, Swislocki NI. Effects of Pentoxifylline on membrane protein phosphorylation in rat erythrocytes. *Vasc Med.* 1983; 1: 159-173.

104- Kubes P. PIschemia-reperfusion in feline small intestine: a role for nitric oxide. *Am J Physiol.* 1993; 264 (1 Pt 1): 8143- 8149.

105- Kuzuya F. The influence of Pentoxifylline (Trental) on erythrocyte deformability. A new method for determining erythrocyte deformability. *Genday no Shirinyo.* 1978; 20: 575-578.

106- Lai HS, Chen WJ, Lee PH, Lee CS. The effect of Cyclosporine on warm ischemic kidneys rats. *Transplant Proc.* 1992;24(4):1357-1359.

107- Langer JC, Sohal SS, Munford DA. Mucosal permeability in the immature rat intestine: effects of ischemia-reperfusion, hypoxia and drugs. *J Pediatr Surg.* 1993; 28 (10): 1380-3; disc 1384-5.

108- Langer JC, Sohal SS, Riddell RH. Mucosal permeability to ⁵¹Cr EDTA following subclinical intestinal I/R injury in the weanling rat. *J Pediatr Surg.* 1993; 28 (4): 601-605.

109- Langrehr JM, Markus PM, Banner B, Lee KK, Schraut WH. Induction of graft-versus-host disease in a rat model after transplantation of sensitized small bowel allografts. *An J Surg.* 1994 (6); 167 (6): 579-85.

110- La-Porta CA, Comolli R. Biochemical and immunological characterization of calcium-dependent PKC isoenzymen in renal ischemia. *Biochem Byophys Res Commun.* 1993; 191(3): 1124-1130.

111- Lee KKW, Syangl MJ, Todo S, Langrehr JM, Starzl TE, Schraut WH. Successful orthotopic small bowel transplantation with short term FK506 immunosuppressive therapy. *Transplant Proc.* 1990; 22: 78-79.

112- Lee TK, Cardona MA, Kurkchubasche AG, Smith SD, Mueller AR, Lee KKW, Robe MI, Schraut WH. Mucosal glutamine utilization after small bowel transplantation; an electrophysiologic study. *J Surg Res,* 1992 ; 52: 605-614

113- Lie TS, Ukikusa M. Significance of alkaline preservation solutions in her transplantation. *Transplant Proc.* 1984; 16: 134.

114- Lillehei RC, Goott B, Miller FA. The physiological response of small bowel of the dog to ischaemia including prolonged in vitro preservation of the bowel with successful replacement and survival. *Ann Surg.* 1959; 150: 543-560.

115- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Zarz AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 192: 265-275.

116- Lundgren O, Haglund U. The pathophysiology of the intestinal counter-current exchanger. *Life Sci.* 1978; 23: 1411-1422.

117- Lynch MJ, Grum CM, Gallher KP. Xanthine-oxidase inhibition attenuated ischemic-reperfusion lung injury. *J Surg Res.* 1988; 44: 53

118- MacKnight ADC, Leaf A. Regulation of cellular volume. *Physiol Rev.* 1977; 57: 510.

119- Marcel GA. Red cell deformability; physiological, clinical and pharmacological aspects. *J Med.* 1979; 10: 409-416.

120- Martin DR, Scott DF, Downes GL. Primary cause of unsuccessful liver and heart preservation: Cold sensitivity of the ATPase system. *Ann of Surg.* 1972;175: 111.

121- Martin P, Vives P. Déformabilité des globules rouges et accidents vasculaires cérébraux: intérêt de la pentoxifiline. *Gazette Médicale de France.* 1979; 86: 518-522.

122- Marubayashi S, Dohi K, Ezaki H. Preservation of ischemic rat liver mitochondrial functions and liver viability with CoQ10. *Surgery.* 1982; 91: 631-637.

123- Marubayashi S, Kiyohiko D, Ochi K, Kawasaki T. Role of free radicals in ischemic rat liver cell injury. Prevention of damage by a-tocopherol administration. *Surgery*, 1986; 184.

124- Matrai A, Ernst E. Pentoxifylline improves white cell rheology in claudicants. *Clin Hemorheology*. 1985; 5: 483-491.

125- Matsusaka C, Marubayashi S, Dohi k, Kawasaki T. The protective effect of administered CoQ10 against small intestinal damage caused by ischemia reperfusion. *Transplant Proc.* 1992; 24 (3): 1090-1091.

126- McCord JM. Oxygen-derived free radicals in post ischemic tissue injury. *N Engl J Med*. 1985; 312: 158.

127- Meijssen MAC, Heineman E, Bruin RWF de, Marquet RL, Molenaar JC. The value of N-acetyl hexosaminidase in detecting canine intestinal allograft rejection. *Transplant Proc.* 1991; 23: 615-616.

128- Meijssen MAC, Heineman E, Bruin RWF de, Veeze HJ, Bijman J, Jonge HR de, Kate FJW, Marquet RL, Molenaar JC. Value of in vivo electrophysiological measurements to evaluate canine small bowel autotransplants. *Gut*. 1991; 32: 1329-1335.

129- Mellow CG, Knighth KR, Angel MF, Coe SA, McC O'Brien B. The biochemical basis of secondary ischemia. *J Surg Res.* 1992; 52: 226-232.

130- Metoki H, Kudo R, Shimanaka Y, Matsui T, Kanazawa T. A study on blood viscosity in cerebrovascular disease. *Hirosaki Med J.* 1983; 35: 1-10.

131- Mittal VK, Deman S, Amasia Y. Role of oxygen free radical scavengers in preservation of intestinal villi in the presence of ischemia. *Transplant Proc.* 1988; 20: 1045-7.

132- Monchik GJ, Russell PS. Transplantation of small bowel in the rat: technical and immunological considerations. *Surgery.* 1971; 70: 693-702.

133- Monden M, Fortner JG. Twenty-four and 48 hours canine liver preservation by simple hypothermia with prostaglandin. *Ann Surg* 1982; 196: 38.

134- Moore RM, Bertone AL, Bailey MQ, Muir WW, Beard WL. Neutrophil accumulation in the large colon of corpses during low-flow ischemia and reperfusion. *Am J Vet Res.* 1994; 55(10): 1454-1463.

135- Moore RM, Muir WW, Bertone AL, Beard WL. Characterization of the hemodynamic and metabolic alterations in the large colon of horses during low-flow ischemic and reperfusion. *Am J Vet Res.* 1994; 55(10): 1444-1453.

136- Mortom JW, McLoughlin H, Duncan CJ. Ultrastructural changes in rat kidney mitochondria in response to the oxygen-or calcium-paradox. *Comp Biochem Physiol A.* 1994; 107 (2): 369-374.

137- Mowat A Mcl. Antibodies to IFN- γ prevent immunologically mediated intestinal damage in murine graft-versus-host reaction. *Immunology* 1989; 68: 18-23.

138- Muller AR, Nalesnik MA, Langrehr JM, Rao PN; Snyder JT, Hoffman RA, Schraut WH. Evidence that small bowel preservation causes primarily basement membrane and endothelial rather than epithelial cell injury. *Transplantation.* 1993; 56 (6): 1499- 1504.

139- Muller AR, Langrehr JM, Nalesnik M, Hoffman RA, Lee TK, Lee KK, Schraut WH. Mucosal glutaminase activity and histology as parameters of small bowel preservation injury. *J Surg Res.* 1994; 56 (3): 207-215.

140- Nauta RJ, Tsimoyainnis E, Uribe M, Walsh DB, Miller D, Butterfield A. Oxigen-derived free radicals in hepatic ischemia and reperfusion injury in the rat. *Gynecol Obstet .* 1990; 171: 120-125.

141- Nishio T, Toshima Y, Matsuno Y. Effects of Pentoxifylline on cell shape. ATP content and deformability in rabbit erythrocytes under hyperosmolar conditions. *Int J Biochem.* 1982;14: 915-920.

142- Nordstrom G, Seeman T, Hasselgren PO. Beneficial effect of allopurinol in liver ischemia. *Surgery,* 1985: 676.

143- Oberhuber G, Schmid T, Thaler W, Waitz W, Luze T, Klima G, Margreiter R. Increase in intraepithelial lymphocytes as an early marker of rejection in a fully allogeneic rat small bowel transplantation model. *Euro Surg Res.* 1993; 25(5) : 310-315.

144- Okamoto M, Arakawa K, Akani T, Akioka T, Nakai I, Mitsuo M, Oka T, Fushiki S. Detection of allograft rejection in rat small bowel transplantation by analysing the in situ distribution of S-phase lymphocytes. *Transplant Proc.* 1994 (6); 26(3): 1556.

145- Ohshima N, Sato M. Effect of pentoxifylline on microvascular flow velocity. *Angiology.* 1981; 32: 752-763.

146- Oshino N, Chance B, Sies H, Bucher T. The role of H₂O₂ generation in perfused cat liver and hydrogen donors. *Arch Biochem Biophys.* 1973; 154: 117-123.

147- Okuda M, Chang Lee H, Chance B, Kumar CH. Glutathione and ischemia reperfusion injury in the perfused rat liver. *Free Radic Biol Med.* 1992; 12: 271-279.

148- Oliva MM, Perman JA, Saavedra JM, Young Ramsaran J, Schawarz KB. Successful intestinal transplantation for microvillus inclusion disease. *Gastroenterology.* 1994 ; 106(3): 771-4.

149- Orlando E, Pierangeli A, Coli G, Palareti G, Poggi M. Azione della pentossifilina sulla velocità del angue aortico nella stenosi valvolare dell'aorta. *Minerva Cardioangiologica.* 1983; 31: 529-534.

150- Otamiri T. Oxygen free radicals, lipid peroxidation, and neutrophil infiltration after small intestinal ischemia and reperfusion. *Surgery*. 1989; 105(5): 593-597.

151- Ottinger LW. The surgical management of acute occlusion of the superior mesenteric artery. *Ann Surg*. 1978; 188 (6): 721-731.

152- Park PO, Wallander G, 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.

153- Parks A, Granger DN. Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation. *Am J Physiol*. 1986; 250: G 749.

154- Parks DA, Granger N. Ischaemia-induced vascular changes; role of xantine oxidase and hydroxyl radicals. *Am J Physiol*. 1983; 245: 285-289.

155- Piguet PF, Grau GE, Allet B, Vassalli P. Tumor necrosis factor/cachectin is an effector of skin and gut lesions of the acute phase of graft-vs-host disease. *J Exp Med*. 1987; 166: 1280-1289.

156- Pirenne J, Lardinous F, D'Silva M, Fridman V, Boniver J, Mahieu P, Degiovanni G, Jaquet N. Relevance of mesenteric lymph nodes to graft-versus-host disease following small bowel transplantation. *Transplantation*. 1990; 50: 711-713.

157- Poggesi L, Scarti L, Boddi M, Masotti G, Sernerì GGN. Pentoxifylline treatment in patients with occlusive peripheral arterial disease. Circulatory changes and effects on prostaglandin synthesis. *Angiology*. 1985; 36: 628-636.

158- Poggetti RS, Moore EE, Moore FA, Koike K, Banarjee A. Gut ischemia/reperfusion- induced liver dysfunction occurs despite sustained oxygen consumption. *J Surg Res*. 1992; 52: 436-442.

159- Preston FW, Macalalad F, Wachoski TJ, Randolph DA, Apostol JV. Survival of homografts of the intestine with and without immunosuppression. *Surgery*. 1966; 60: 1203-1206.

160- Pupita F, Rotatori P, Frausini G. Clinical pharmacology of vasoactive drugs studies on pentoxifylline. *Pharmatherapeutica*. 1983; 3 suppl.1: 102-110.

161- Ramirez Schon G, Labat R. The hepatic outflow tract in dogs. *Surgery*. 1971; 69: 748.

162- Ramos JL. Efecto de la pentoxifilina en la isquemia-reperfusión renal. Tesis Doctoral. 1995.

163- Reeves WB, Shan SV. Activation of potassium channels contributes to hypoxic injury in proximal tubules. *J Clin Invest*. 1994; 94 (6):2289- 2294.

164- Renlund DG. A quantitative and sensitive method for measurement of myeloperoxidase. Clin Res. 1980; 28: 75-81.

165- Reznick RK, Craddock GN, Langer B, Gilas T, Cullen JB. Structure and function of small bowel allografts in the dog: immunosuppression with cyclosporin A. Can J Surg. 1982; 25: 51-55.

166- Rice MJ, Hjelmhaug JA, Southard JH. The effect of Halothane, Isoflurane and Verapamil on ischemic-isolated rabbit renal tubules. Anesthesiology. 1989; 71: 738-743.

167- Rubin B, Smith A, Romaschin A, Walker P. Participation of the complement system in ischemia/reperfusion injury. Microcirc Endothelium Lymphatics. 1989; 5(3-5): 207-21.

168- Ruiz A, Salmeron FS, Sanchez E, Mora RJ. Estudio de la función de los polimorfonucleares: quimiotaxis, test del nitroazul de tetrazolio y mieloperoxidasas en niños y adultos sanos. An Esp Pediatr. 1984; 20(9): 854-859.

169- Sakaguchi T, Hayashi S. Pharmacology and clinical trials of pentoxifylline. Pharmacometrics. 1978; 15:153-183.

170- Sakai T, Okada J, Hara M, Ogashiwa M, Takeuchi K. Red cell deformability in patients with cerebral vasospasm. Inter J Clin Pharmacol. Therapy and Toxicology. 1985; 23: 79-82.

171- Sakr M, Zetti G, MaClain C, Gavalier J, Nalesnik M, Toddo S, Starzl T, Van Thiel D. The protective effect of FK506 pretreatment against renal ischemia/reperfusion injury in rats. *Transplantation*. 1992; 53 (5): 987-991.

172- Santiago SF, Fukuzawa M, Azuma T, Okada A. Effect of short-term immunosuppressive therapy with FK506 or CyA on the donor in small intestine allotransplantation in rats. *Transplant Proc*. 1992; 24(3): 1189.

173- Schemeling DJ, Caty MG, Oldham KT, Guice KS, Hinshaw DB. Evidence for neutrophil-related acute lung injury after intestinal ischemia-reperfusion. *Surgery*. 1989;106 (2):195-201; discussion 201-2.

174- Schmalzer EA, Chien S. Filterability of subpopulations of leukocytes: effect of pentoxifylline. *Blood*. 1984; 64: 542- 546.

175- Schmid T, Oberhuber G, Körözi G, Klima G, Margreiter R. Histologic pattern of small bowel allograft rejection in the rat. *Gastroenterology*. 1989; 96: 1529-1532.

176- Schraut WH. Current status of small bowel transplantation. *Gastroenterology*. 1988; 94: 525-538.

177- Seigff D, Kiesewetter H. Effect of pentoxifylline on single red cell deformability. *Klinische Wochenschrift*. 1981; 59: 1271-1272.

178- Seigffe D. Effect of pentoxifylline on red cell aggregation (RCA). *IRCS Med Sci.* 1982; 8: 727.

179- Shoenberg MH, Paes E. Intestinal ischemia and reperfusion. *Prog Appl Micro-circ.* 1989; 13: 109-1

180- Shoenberg MH, Berger HG. Oxygen radicals in intestinal ischemia and reperfusion. *Chem Biol Inter.* 1990;76:141-161

181- Shoenberg MH, Poch B, Younes M, Schwarz A, Baczako K, Lundberg C, Haglund V, Beger HG. Involvement of neutrophils in postischaemic damage to the small intestine. *Gut.* 1991; 32: 905-912.

182- Simpson R, Alon R, Kobzick L, Valeri CR, Shepro D, Hechtman HB. Neutrophil and nonneutrophil-mediated injury in intestinal I-R. *Ann Surg.* 1993; 218 (4): 444-53; discussion 453-4.

183- Smith RV, Waller ES, Doluiso JT, Banzer MT, Puri SK. Pharmacokinetics of orally administered pentoxifylline in humans. *J Pharm Sci.* 1986; 5: 47-52.

184- Soejima A, Suzuki M, Ishizaka S, Fukuoka T, Nagasawa T. Lipid peroxidation and tubular disorder in experimental acute renal failure enzymochemical study in the rat kidney. *Nippon Jinzo Gakkai Shi.* 1994; 36 (7): 800-804.

185-Southard JH. Comparison of the effect of 3 and 5 days hypothermia perfusion on metabolism of tissue slices. *Criobiology*. 1987; 21: 285.

186- Southard JH, Marsh DC, McAnulty JF , Belzer FO. Oxygen- derived free radical damage in organ preservation: activity of superoxide dismutase and xanthine oxidase. *Surgery*. 1987; 101: 566.

187- Stang MJ, Gräb C, Mebert H, Fischer T, Weib M, Hammer C. FK506 and RS 61 443 for reversal of small bowel rejection. *Int Symp on Small Bowel Transp. Ontario (Canada)*. 1991: p37.

188- Stefanovich V. The biochemical mechanism of action of pentoxifylline. *Pharmatherapeutica*. 1978; 2 (Suppl. 1): 5-16.

189- Strano A, Davi G, Avellone G, Novo S, Pinto A. Double-blind crossover study of the clinical efficacy and the hemorheological effects of pentoxifylline in patients with occlusive arterial disease of the lower limbs. *Angiology*. 1984; 35: 439-446.

190- Strepkowski SM, Chen H, Daloz P, Kahan BD. Rapamycin, a potent immunosuppressive drug for vascularized heart, kidney and small bowel transplantation in the rat. *Transplantation*. 1991; 51: 22-26.

191- Sullivan GW. Lack of correlation between TNF-inhibition of PMN migration and enhanced PMN oxidative activity and adherence: implications for mechanisms of

pentoxifylline action. Pentoxifylline and analogues: effects on leukocyte function. Ed. J.Hakim, Harger, Basel. 1990: 1-8.

192- Suzuki S, Nakamura S, Koizami T, Sakaguchi S, Baba S, Muro H, Fujise Y.
The beneficial effect of a Prostaglandin I₂ analog on ischemia rat liver. *Transplantation*. 1991;
52(6): 978-983.

193- Suzuki k. Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes. *An Biochem*. 1983; 132(2): 345-352.

194- Takamori M, Yagi M, Onoda H, Yalbushita K, Ohhori I, 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 intestine ischemia. *Transplant Proc*, 1989 (2); 21 : 2903-2905.

195- Takamutsu S, Sato K, Takamutsu M, Sakuta S, Mizuno S. Changes in haematological and blood chemical parameters after treatment of aged arteriosclerotic patients with pentoxifylline. *Pharmatherapeutica*. 1979; 2: 165-172.

196- Takamutsu S, Sato K, Takamutsu M, Sakuta S, Mizuno S. Two years follow up study on blood constituents in aged arteriosclerotic patients treated with pentoxifylline. *Proc 28th Inter Congress Phidiol Sci*. Tubingen. West Germany. 1980.

197- Taylor RMR, Watson JW, Walker FC, Watson AJ. Prolongation of survival of jejunal homografts in dogs treated with azathioprine (Imuran). *Br J Surg.* 1966; 53: 134-138.

198- Thaler W, Oberhuber G, Klima G, Margreiter R, Schmid T. Preservation of small intestinal bowel grafts; a comparison with two standard solutions. *Eur Surg Res.* 1993; 25 (3): 181-186.

199- Thompson JS, Rose SG, Spanta AD, Quigly EMM. The long-term effect of jejunoileal autotransplantation on intestinal function. *Surgery.* 1992; 111: 62-68.

200- Todd-Sanford, Davidsohn I, Henry JB. Diagnóstico clínico por el laboratorio. ISBN 84-345-1405-2. 6° edición. 1982.

201- Toledo-Pereyra LH, Najarian JS. Preservation of the small intestine for allotransplantation. *Surg Gynecol Obst.* 1973; 137: 445.

202- Toledo-Pereyra LH, Northrup WF, Humphrey EW. Maintenance of lung viability for transplantation after long periods of hypothermic perfusion. *J Surg Res.* 1975; 18:99.

203- Toledo-Pereyra LH, Simmons RL, Najarian JS. Protection of the ischemic liver by donor pretreatment before transplantation. *Am J Surg,* 1975; 129: 513.

204- Toledo-Pereyra LH, Varo Perez E. Preservación de órganos para transplantes. Observaciones personales. *Cirugía Experimental*. 1989; 25(6): 882-7.

205- Toledo-Pereyra LH. Mecanismo de daños neutrófilo-oxígeno en la lesión de isquemia y reperfusión. Manipulaciones farmacológicas. *Gaceta Medica de México*. 1991; Vol.127 N°4.

206- Tomasi TB. Mechanismss of immune regulation at mucosal surfaces. *Rev Infect Dis.* 1983; 5: 784-792.

207- Toyama N, Kobayashi E, Kamada N, Doy M, Miyata M. Small bowel transplantation in rats: endoscopic and histological evaluation of graft rejection. *Gastroenterol Jpn.* 1993 (4); 28 (2): 209-17.

208- Turnage RH, Bagnasco J, Berger J, Guice KS, oldham KY, Hinshaw DB. Hepatcellular oxidant stress following intestinal Ischemia Ischemia/Reperfusion injury *J Surg Res.* 1991; 51: 467-471.

209- Tyler DD. Polographic assay and intracellular distribution of superoxide dismutase in rat liver. *J Biochem.* 1975; 147: 793-798.

210- Tzakis AG, Todo S, Reyes J, Nour B, Ebu-Elmagd K, Selby R, Casavilla A, Kocoshis S, Demetris AJ, Yonis E. Intestinal transplantation in children under FK506 immunosuppression. *J Pediatr Surg.* 1993; 28(8): 1040-3.

211- Udassin R, Vromen A, Haskel Y. The time sequence of injury and recovery following transient reversible intestinal ischemia. *J Surg Res.* 1994;56 (3): 221-225.

212- Uff CR, Reid SD, Wood RF, Pockely AG. CD4 expression on enterocytes: an indicator of rejection following rat small bowel transplantation. *Transplant Proc.* 1994 (6) ; 26 (3): 1553.

213- Utsonomiya H, Tanaka K, Uemoto S, Kato H, Nishizawa T, Yamamoto E, Ozawa K. Effect of FK506 on orthotopic small bowel transplantation in rats. *Transplant Proc.* 1992; 24(3): 1191.

214- Valentini M, Sciannamero F, Francucci M, Tockner M, Sassano L. Filtrabilità eritrocitaria, e trattamento con pentoxifilina. *Ricerca in Clinica e in laboratorio.* 1983; 13 (suppl 3): 455-458.

215- Vane DW, Grosfel JL, Moore W, Abu-Dalu K, Hurwitz A. Impaired bowel motility following intestinal transplantation. *J Sur Res.* 1989; 47: 288-291.

216- Vedder NB, Fouty BW, Winn RK, Harlan JM, Rice CL. Role of neutrophils in generalized reperfusion injury associated with resuscitation from shock. *Surgery.* 1989; 106 (3): 509-16.

217- Wahlberg JA, Southard JH, Belzer FO. Development of a cold storage solution for pancreas preservation. *Cryobiology.* 1986; 23: 477.

218- Wang P, Zheng F, Morrison MH, Ayala A, Dean R, Chaudry H. Mechanism of the beneficial effects of ATP-MgCl₂ following trauma-hemorrhage and resuscitation: Downregulation of inflammatory cytokine (TNF, IL-6) release. *J Surg Res.* 1992;52: 364-371.

219- Wattiaux R, Wattiaux-De Conink S, Dubois F. Prevention by Chlorpromazine of lysosomal enzyme release caused by a transitory ischemia. Effect of hypothermia. *Biochem Pharm.* 1982; 31: 1167-1169.

220- Wee SL, Stroka DM, Preffer FI, KOLLIFFE LK, Colvin RB, Cosimi AB. The effects of OKT4A monoclonal antibody on cellular immunity of nonhuman primate renal allograft recipients. *Transplantation.* 1992; 53: 501-507.

221- Weed RJ, La Calle PL, Merrill EW. Metabolism dependence of red cell deformability. *J Clin Invest.* 1969; 48: 795-802.

222- Wilkins PA, Ducharme NG, Lowe JE, Schwark WS, Meschter C, Erb HN. Measurements of blood flow and xantine oxidase activity during postischemic reperfusion of the large colon of ponies. *Am J Vet Res.* 1994; 55(8): 1168-77.

223- Williams Lf. Vascular insufficiency of the intestine. *Gastroenterology.* 1971; 61: 757-777.

224- Witter FR, Smith RV. The excretion of pentoxifylline and its metabolites into human breast milk. *AM J Obstet Gynecol.* 1985; 151: 1094-1097.

225- Wood RFM. Transplante de intestino delgado. *Br J Surg (Ed. esp.)* 1992; 7 (6): 193-194.

226- Yamataka A, Miyano T, Kato Y, Nozawa M, Sasaki K. Ultrastructural changes in the microvilli as a marker of small bowel transplantation. *Surgery.* 1993; 23 (11): 984-987.

227- Yanataka T, Kobayashi H, Yagita H, Okumura K, Tanatani T, Miyasaka M. The effect of anti-ICAM-1 monoclonal antibody treatment on the transplantation of the small bowel in rats. *J Pediatr Surg.* 1993; 28 (11): 1451-7.

228- Yokoyama Y, Beckman JS, Beckman TK, Wheat J, Cash G, Freeman BA, Parks DA. Circulating xanthine oxidase: potential mediator of ischemic injury. *Am J Physiol.* 1990. Apr; 258 (4Pt1): G 564-70.

229- Yoshikawa T, Ueda S, Naito Y, Takahashi S, Oyamada H, Morita Y, Yoneta T, Kondo M. Role of oxige-derived free radicals in gastric mucosal injury induced by ischemia or ischemia/reperfusion in rats. *Free Radic Res Commun.* 1989; 7(3-6): 285-91.

230- Xiao F, Foster PF, Sankary HN, Templeton AC, Kociss K, Williams JW. The role of ultraviolet B-irradiated leucocyte transfusions and cyclosporine in intestinal transplantation. *Transplantation.* 1992; 54: 32-37.

231- Zhong R, Zhang Z, Quan D, Duff J, Stiller C, Grant D. Development of a mouse intestinal transplantation model. *Microsurgery*. 1993; 14 (2): 141-5.

232- Zimmerman Bj, Grisham Mb, Granger Dn. Mechanisms of oxidant-mediated microvascular injury following reperfusion of the ischemic intestine. *Basic Life Sci*. 1988; 49: 881-6.

233- Zimmerman BJ, Guillory DJ, Grisham MB, Gaginella TS, Granger N. Role of leukotriene B₄ in granulocyte infiltration into the postischemic feline intestine. *Gastroenterology*. 1990; 99: 1358-1363.