

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA



**FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA**

TESIS DOCTORAL

**CIRUGÍA DEL ANEURISMA AORTICO.
REGULACIÓN DEL DAÑO POSTPERFUSIÓN**

DOCTORANDA

Montserrat Cano Rosás

DIRECTORES

Prof. Francisco Javier García Criado

Prof. Pablo Benito Duque

Prof. Joaquín F. López Marcos

2008

Prof. Dr. D. Clemente Muriel Villoria. Director del Departamento de Cirugía. Facultad de Medicina. Universidad de Salamanca

CERTIFICA:

Que la presente Tesis Doctoral, titulada **“Cirugía del aneurisma aortico, regulación del daño postperfusión”**, ha sido realizada por Dña. Montserrat Cano Rosás, en el Departamento de Cirugía de la Universidad de Salamanca, cumpliendo todos los requisitos necesarios para su presentación y defensa ante el Tribunal Calificador.

Y para que así conste y obre los efectos oportunos, expido el presente certificado en, Salamanca a diez y nueve de mayo de dos mil ocho.

Fdo. Prof. Dr. D. Clemente Muriel Villoria
Director del Departamento de Cirugía

Prof. Dr. D. Francisco Javier García Criado. Profesor Titular de Cirugía. Facultad de Medicina. Universidad de Salamanca.

Prof. Dr. D. Pablo Benito Duque. Profesor Asociado de Cirugía. Facultad de Medicina. Universidad de Salamanca.

Prof. Dr. D. Joaquín F. López Marcos. Profesor Asociado de Estomatología. Facultad de Medicina. Universidad de Salamanca.

CERTIFICAN:

Que la presente Tesis Doctoral, titulada **“Cirugía del aneurisma aortico, regulación del daño postperfusión”**, presentada por Dña. Montserrat Cano Rosás, para optar al Grado de Doctor en Medicina y Cirugía, ha sido realizada bajo nuestra dirección en el Departamento de Cirugía de la Facultad de Medicina de la Universidad de Salamanca, cumpliendo todos los requisitos necesarios para su presentación y defensa ante un Tribunal.

Y para que así conste y obre los efectos oportunos, expedimos el presente certificado en Salamanca a diez y nueve de mayo de dos mil ocho.

Prof. F.J. García Criado

Prof. P. Benito Duque

Prof. J.F. López Marcos

AGRADECIMIENTOS

Deseo dejar constancia de mi agradecimiento a todas las personas que han hecho posible este trabajo.

A los Profesores D. Francisco Javier García Criado D. Pablo Benito Duque y D. Joaquín F. López Marcos, directores de esta Tesis Doctoral, por su absoluta disponibilidad, y permanente consejo científico en el desarrollo del presente trabajo.

Al equipo de trabajo que colaboró en este proyecto de investigación formado por Dña. María Begoña García Cenador, D. Felipe Parreño Manchado, D. Luis Miguel González Fernández, D. Juan María Gómez Gómez, D. José Luís Revilla Hernández, D. Carlos Cascajo Castro, D. Álvaro Parreño Manchado, D. Joaquín José Valdunciel García y D. José María Rodríguez López.

Al Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca por la ayuda prestada en el mantenimiento y control de los animales de experimentación.

Debo manifestar también mi gratitud a los Laboratorios de Cirugía y del Centro Biosanitario de Investigación Experimental, Facultad de Medicina, Universidad de Salamanca, ya que nos han proporcionado toda la infraestructura necesaria para la realización del modelo experimental

desarrollado en este proyecto, y muy especialmente a D. Francisco Martín Rodríguez, técnico responsable del Centro de Investigaciones Biológicas de la C/ Espejo por su inestimable ayuda en el manejo y mantenimiento de los animales de experimentación empleados en este trabajo.

Estoy asimismo muy agradecida a los Laboratorios de Bioquímica del Hospital Universitario de Salamanca, donde se realizaron algunas de las determinaciones presentadas en este estudio.

A

Mi familia

ÍNDICE

I. ESTADO ACTUAL DEL PROBLEMA	1
1.- Introducción	2
2.- Inflamación	5
2.1.- Concepto y Generalidades	5
2.2.- Mediadores Químicos de la Inflamación	7
2.3.- Interacción Leucocito Endotelio	20
2.4.- Moléculas de Adhesión Celular	21
2.5.- Factor Transcripcional NFκB	31
3.- Síndrome Inflamatorio Postperfusión	34
3.1.- Lesión por Isquemia	35
3.2.- Lesión por Reperfusión	41
4.- Prótesis Vasculares	47
4.1.- Endoprótesis vasculares	50

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	51
1.- Hipótesis	52
2.- Objetivos	52
III. MATERIALES Y MÉTODOS	54
1.- Materiales	55
1.1.- Instalaciones	55
1.2.- Instrumental y equipo	55
1.3.- Análisis y presentación de los resultados	59
2.- Métodos	61
2.1.- Animal de Experimentación	61
2.2.- Técnica Anestésica	63
2.3.- Técnica Quirúrgica	65
2.4.- Grupos Experimentales de Trabajo	67
2.5.- Variables Estudiadas y Técnicas de Determinación	68
2.6.- Tiempo de Muestras	80
2.7.- Estudios Estadísticos	81

IV. RESULTADOS	82
1.- Estudio de la función renal	83
2.- Infiltración neutrofílica del plasma	86
3.- Radicales libres de oxígeno	88
3.1.- Superóxido Dismutasa	88
3.2.- Anión Superóxido	90
4.- Estudio del Óxido Nítrico	92
4.1.- Nitritos en suero	92
4.2.- iNOS renal	93
5.- Citocinas en suero	95
5.1.- Factor de Necrosis tumoral	95
5.2.- Interleucina IL-1 β	96
5.3.- Interferón Gamma INF- γ	97
5.4.- Interleucina 6 (IL-6)	99
5.5.- Interleucina 10 (IL-10)	100
6.- Moléculas de adhesión celular	102
6.1.- ICAM-1 en tejido renal	102
6.2.- VCAM-1 en tejido renal	103
6.3.- PECAM-1 en tejido renal	104
6.4.- sICAM-1 en suero	105
6.5.- sVCAM-1 en suero	106
7.- El Factor transcripcional NF κ B	108

V. DISCUSIÓN	109
1.- Introducción	110
2.- Discusión del Modelo y Diseño Experimental	112
2.1.- Animal de Experimentación	112
2.2.- Tipo de Agresión	112
2.3.- Tiempo de las Muestras	113
2.4.- Variables Estudiadas	114
3.- Discusión de los Resultados	117
VI. CONCLUSIONES	128
VII. BIBLIOGRAFÍA	130

I. ESTADO ACTUAL DEL PROBLEMA

1.- INTRODUCCIÓN

El gran aumento de la esperanza de vida en las últimas décadas ha hecho que las enfermedades degenerativas ocupen los primeros puestos en los índices de mortalidad, y dentro de ellas las derivadas de la degeneración aneurismática de las arterias tienen una gran relevancia clínica, social y económica, constituyendo una causa importante de mortalidad en personas ancianas.

Etimológicamente, la palabra aneurisma procede del griego y ya en los escritos Hipocráticos se encuentra este término refiriéndose a la dilatación de los vasos.

Los médicos egipcios conocían los aneurismas y los trataban ^(48, 158). En el papiro de Ebers (2000 a.c) hay descripciones que podrían corresponder a aneurismas traumáticos de las arterias periféricas.

En Occidente, Galeno fue el primero que describió los aneurismas y los definió: "Cuando las arterias se agrandan, esta enfermedad se denomina aneurisma".

En 1973 Tilney y cols ⁽¹⁵⁶⁾ describen por primera vez un síndrome clínico caracterizado por el fallo progresivo y secuencial de múltiples

órganos, que se producía en el periodo postoperatorio de pacientes operados de un Aneurisma de Aorta Abdominal roto. La secuencia se originaba generalmente con un fallo circulatorio, seguido precozmente de fallo ventilatorio, y más tardíamente por fallo hepático, gastrointestinal y metabólico.

Dos años más tarde, Arthur Baue ⁽²³¹⁾ al analizar autopsias de pacientes sometidos a periodos de reanimación prolongada en Unidades de Cuidados Intensivos, establece la existencia de elementos anatómopatológicos comunes en aquellos que cursaron con fallo de múltiples órganos (FMO).

En 1985, Goris et al ⁽⁴⁸⁾, establece la existencia de cuadros de fallo multiorgánico en pacientes cuya patología inicial era tanto de origen infeccioso, como no infeccioso. La similitud en la incidencia, severidad y secuencia de aparición del Fallo Multiorgánico en ambos grupos, le hace concluir que la infección no es una condición indispensable para el desarrollo de FMO. Se comenzó a comprender que el shock, la infección y otros tipos de agresión, podían desencadenar una reacción que conduce a una lesión endotelial, edema secundario a un aumento de la permeabilidad vascular y alteración de la disponibilidad de oxígeno. Estas alteraciones se producen por un fallo en la capacidad de control de los mecanismos de la inflamación, que da lugar al Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica (SIRS) ^(107, 131). La importancia del SIRS viene dada por su capacidad para producir una disfunción orgánica, la cual puede progresar hasta un fallo simple o multiorgánico.

En la actualidad el Aneurisma de Aorta Abdominal (AAA) continúa constituyendo un grave problema por la gran mortalidad que su ruptura provoca ^(13, 97, 153). A pesar de que en el momento actual hay un aumento de la cirugía electiva, y haber mejorado el manejo de estos pacientes en las unidades de cuidados intensivos tras las rupturas, la mortalidad por esta causa no ha sufrido variaciones ^(131, 13, 48).

La lesión por isquemia reperfusión secundaria al clampaje en la cirugía del AAA suprarrenal, es probablemente la responsable de la aparición del SIRS, y por tanto del fallo multiorgánico causante de la mayor parte de los fallecimientos del postoperatorio ^(87, 131, 134). Tanto la cirugía electiva de AAA, como la urgente, puede desencadenar SIRS, pero es más frecuente y severo en el grupo de los aneurismas rotos ^(95,131, 151).

La lesión por isquemia-reperfusión provoca amplios cambios en la microcirculación y las vías implicadas son similares a las descritas para la inflamación ^(87, 131, 162).

La relación entre el fallo orgánico postoperatorio y la respuesta inflamatoria se hace más evidente con los nuevos conocimientos aportados por la biología molecular y celular durante la última década, que han llevado a una mayor comprensión de la fisiopatología del fallo orgánico ^(147, 162).

Hoy día sabemos que toda patología quirúrgica y su tratamiento conducen al desencadenamiento de la respuesta inflamatoria.

2.- INFLAMACIÓN

2.1. CONCEPTO Y GENERALIDADES

La inflamación se puede definir como la reacción del tejido vivo vascularizado a una agresión local. La inflamación va a poner en marcha una serie de procesos con el fin de destruir o aislar el agente lesivo y reparar el tejido lesionado. Durante la inflamación se van a producir cambios del flujo y del calibre vascular (Figura 1).

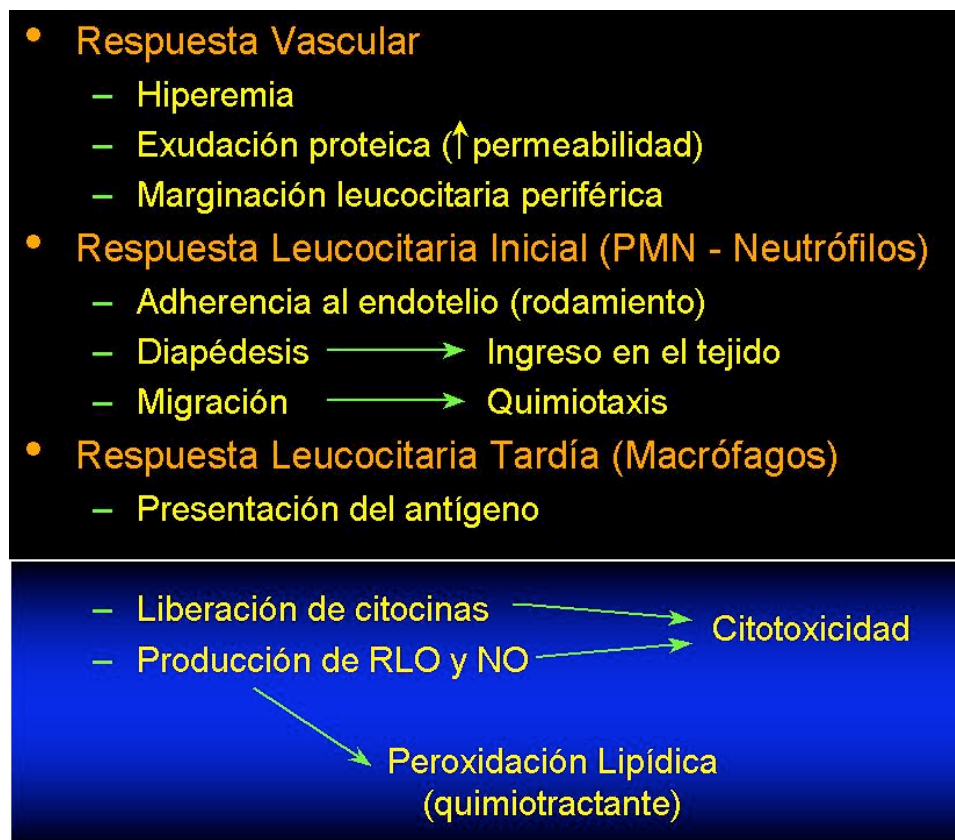


Figura 1.- Respuestas ante la inflamación

Las células que van a participar en el proceso inflamatorio son principalmente leucocitos ⁽⁴⁶⁾, (neutrófilos y monocitos), contribuyendo sus enzimas lisosómicas en la respuesta defensiva.

Sin embargo debemos tener en cuenta que los leucocitos a su vez, pueden prolongar la inflamación y aumentar el daño tisular por la liberación de mediadores químicos, enzimas y radicales tóxicos (Figura 2).

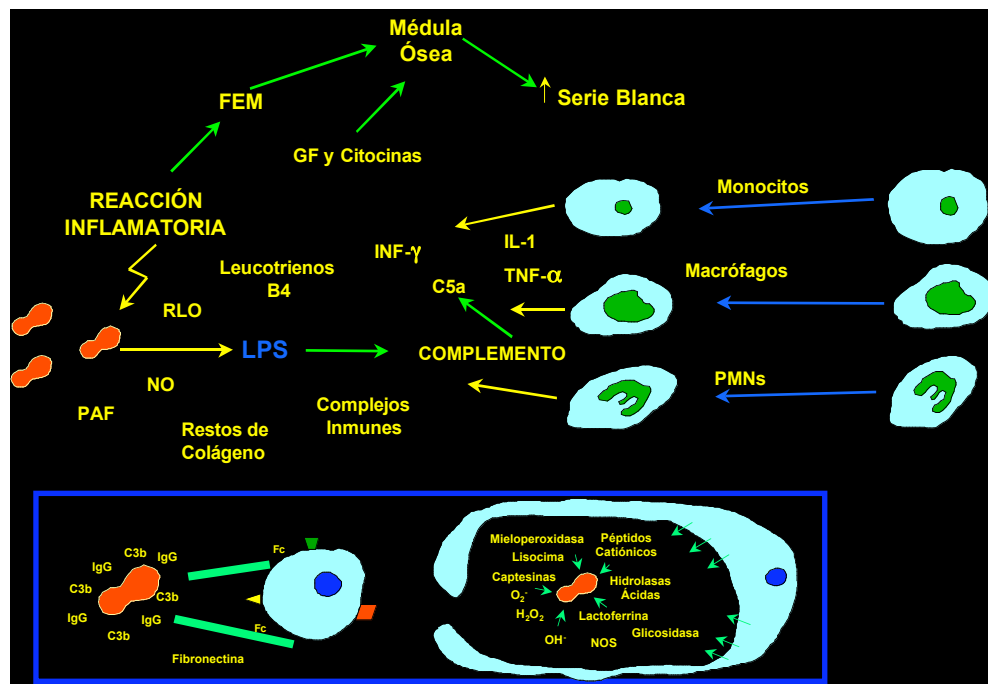


Figura 2.- Esquema de la respuesta inflamatoria ante la infección.

2.2. MEDIADORES QUÍMICOS DE LA INFLAMACIÓN

2.2.1. Aminas vasoactivas

a) Histamina o sustancia H: Está siempre presente en las fases iniciales de la inflamación⁽¹⁶⁹⁾. Se encuentra almacenada, en los gránulos de las células cebadas, leucocitos, basófilos, eosinófilos y plaquetas. La histamina induce dilatación de las vénulas y capilares, con aumento de la permeabilidad y contracción del músculo liso. Es el principal mediador de la primera fase de la inflamación. Tiene una acción muy fugaz, inactivándose a los 15 minutos.

b) Serotonina (5-hidroxitriptamina): Fue identificada en las células cromafines intestinales⁽¹⁶⁹⁾. Se encuentra en los gránulos de las células cebadas, plaquetas, intestino, bazo y tejido nervioso.

2.2.2. Mediadores químicos del plasma

Por la presencia de proteasas, una serie de proteínas presentes en el plasma, se van a romper creando un conjunto de mediadores que intervienen en la reacción inflamatoria⁽¹⁶⁹⁾.

a) Sistema de las cininas: Las cininas son pequeños polipéptidos, con una potente acción vasodilatadora prolongada⁽¹⁶⁹⁾. Aumentan la permeabilidad capilar y tienen efecto hipotensor. Son las responsables del

dolor en el foco inflamatorio. La formación de las cininas se inicia por la activación del factor de Hageman (factor XII).

b) Sistema del complemento: Son un conjunto de proteínas séricas que una vez activadas forman parte de un sistema de amplificación en cascada muy complejo, con un papel muy importante en las defensas del individuo^(32, 169). La activación del sistema del complemento puede iniciarse por dos vías clásica y alternativa (Figura 3).

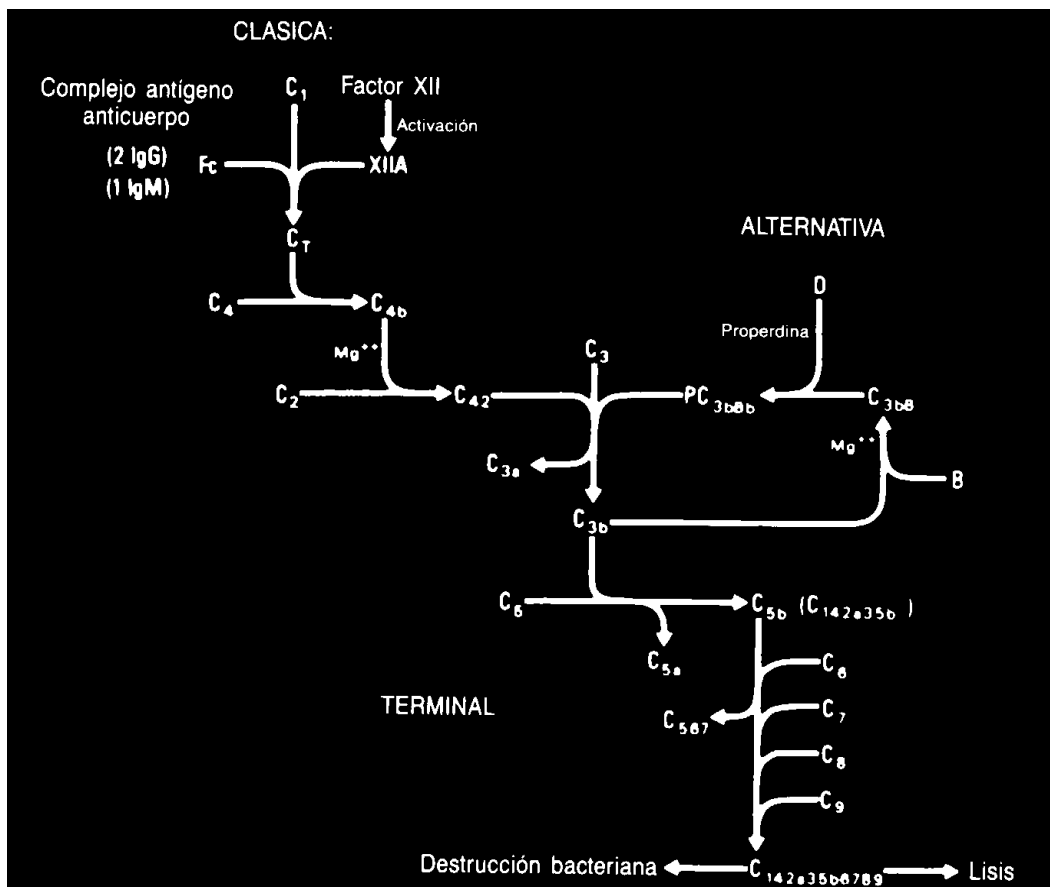


Figura 3.- Vías de activación del complemento.

c) Sistema de la coagulación: El grupo de proteínas plasmáticas que forman este sistema, pueden ser activadas por el factor XII. El punto final es la transformación del fibrinógeno en fibrina, con liberación de fibrinopéptidos que producen aumento de la permeabilidad vascular y quimiotaxis de los leucocitos⁽¹⁶⁹⁾.

2.2.3. Derivados del ácido araquidónico

El ácido araquidónico es un ácido graso insaturado que procede de la dieta o del metabolismo del ácido linoleico⁽¹⁶⁹⁾. Una vez liberado, puede seguir dos vías metabólicas⁽¹⁸⁾:

a) Vía de la ciclooxigenasa dando lugar a prostaglandinas, que en el foco inflamatorio actúan como mediadores y reguladores de la inflamación, a veces con acciones antagónicas. Las principales son:

- PGI₂ o prostaciclina, inhibe la agregación plaquetaria y posee acción vasodilatadora.
- Tromboxano A₂, de acción muy corta y con un efecto antagónico a la anterior.
- PGE₂, PGD₂ y PGF₂. Producen vasodilatación y están implicadas en la aparición de la fiebre (PGE₂) y el dolor.

b) Vía de la lipooxigenasa que origina los leucotrienos. Alguno de los leucotrienos (LTB₄, LTD₄, LTE₄) producen broncoespasmo, vasoconstricción y aumento de la permeabilidad. Actúan sobre los leucocitos promoviendo su adherencia al endotelio y su extravasación al espacio tisular.

2.2.4. Factor activador de las plaquetas (PAF)

Mediador derivado de los fosfolípidos que ejerce una acción mucho más potente que la histamina sobre la permeabilidad vascular y, a concentraciones bajas, produce vasodilatación^(18, 168).

Produce agregación plaquetaria, aumento de la permeabilidad vascular, contracción del músculo liso, activación de neutrófilos y además aumento de la adherencia leucocitaria al endotelio, quimiotaxis, liberación de enzimas lisosomiales y broncoespasmo.

2.2.5. Citocinas

Son un grupo de polipéptidos producidos por varios tipos de células, especialmente por monocitos, macrófagos linfocitos y células endoteliales. Se han descrito más de 20, detallaremos las más importantes relacionadas con el proceso inflamatorio en la reperfusión^(132, 135).

- Interleucina-1 (IL-1): Entre sus funciones destacan las siguientes:
 - Forma parte de los mecanismos de autoactivación macrofágica.
 - Aumenta la producción de prostaglandinas.
 - Estimula la producción de la serie blanca.
 - Sobre el hipotálamo incrementa la producción de la prostaglandina PGE₂, apareciendo así fiebre y dolor.
 - Provoca el aumento de la expresión de diferentes moléculas de adhesión celular.
 - Activa la ciclooxigenasa.
 - Activa la sintetasa inducible del óxido nítrico (iNOS).
 - Estimula la activación de linfocitos T y B.

- Interleucina-6 (IL-6): Disminuye la producción de citocinas como IL-1 y TNF- α . Es una de las citocinas más importantes en la regulación negativa del fenómeno inflamatorio. También posee una relevante función reguladora sobre los linfocitos B y T⁽¹⁶⁹⁾.

- Interleucina-10 (IL-10): Es capaz de activar o inhibir los macrófagos dependiendo de su concentración. Junto con la IL-6 modula el fenómeno inflamatorio. Parece que también ejerce su acción estimulando la proliferación de células B y T, tanto maduras como inmaduras⁽¹⁶⁹⁾.

- Factor de necrosis tumoral (TNF): Dentro del fenómeno inflamatorio destacamos las siguientes funciones⁽⁹⁶⁾:

- Activa los macrófagos, siendo también producida por ellos.
- Incrementa la producción de la serie blanca por la médula ósea.
- Sobre el hipotálamo incrementa la producción de la prostaglandina PGE₂, apareciendo así fiebre y dolor.
- Induce la expresión de diferentes moléculas de adhesión celular.
- Activa la ciclooxigenasa.
- Activa de la sintasa inducible del óxido nítrico (iNOS) .
- Incrementa la producción de radicales libres del oxígeno.
- Estimulador de la síntesis del PAF.

Representa una citocina clave en el desarrollo del shock séptico y otras respuestas sistémicas (SIRS, FMO, etc.).

- Interferón (INF): Dentro de sus acciones en la inflamación destacamos el aumento de la producción de macrófagos y su activación y el incremento de la expresión de diferentes moléculas de adhesión celular. Regula la función de diferentes células del sistema inmunitario como los linfocitos T y B, las células NK y los macrófagos.

2.2.6. Productos lisosómicos de los leucocitos

La liberación de los productos lisosómicos contribuye al mantenimiento de la respuesta inflamatoria y a la destrucción tisular que aparece después de la reperfusión.

Estos enzimas son inhibidos por antiproteasas dentro como la alfa-1 antitripsina que es el principal inhibidor de la elastasa de los neutrófilos⁽¹⁶⁹⁾.

2.2.7. Radicales libres del oxígeno (RLO):

El oxígeno molecular se puede reducir en pasos univalentes para generar tres especies oxidantes^(33, 102):

- La reducción univalente produce el anión superóxido O_2^- . Su toxicidad suele atribuirse a su función como precursor de especies más reactivas del oxígeno.
- El peróxido de hidrógeno, H_2O_2 , se produce como resultado de la reducción bivalente o dismutación del O_2^- .
- La tercera especie de radical que se deriva del oxígeno molecular es el radical hidroxilo, $\bullet OH$, que se forma por interacción del O_2^- y el H_2O_2 , y es un agente oxidante muy potente.

Los RLO son producidos, por diversos enzimas^(49, 76, 148): Xantinoxidasa, NADPH oxidasa y mieloperoxidasa. La formación de los RLO es perjudicial para una serie completa de biomoléculas y están implicados en:

- Inactivación de proteasas como la alfa-1 antitripsina, que puede dar lugar a un aumento en la destrucción de los componentes estructurales tisulares, como la elastina.
- Producen oxidación los grupos sulfhidrilos de las proteínas, formando puentes -SS- que alteran su estructura. con pérdida de la actividad biológica.
- Lesionan las células endoteliales aumentando la permeabilidad vascular.
- Lesión sobre el DNA produciendo peroxidación y modificación química de sus bases nitrogenadas.
- Sobre los lípidos inducen la formación de peróxidos lipídicos, que son potentes inhibidores enzimáticos.

2.2.8. Óxido nítrico (NO)

El enzima implicado en la síntesis del óxido nítrico (NO) es la NO-sintasa, quien convierte el grupo guanidina terminal de la L-arginina en NO. Requiere oxígeno y 4 cofactores (grupo hemo, FAD, FMN y

tretrahidrobiopterina), así como la presencia de calmodulina (Figura 4)^(135, 152, 168).

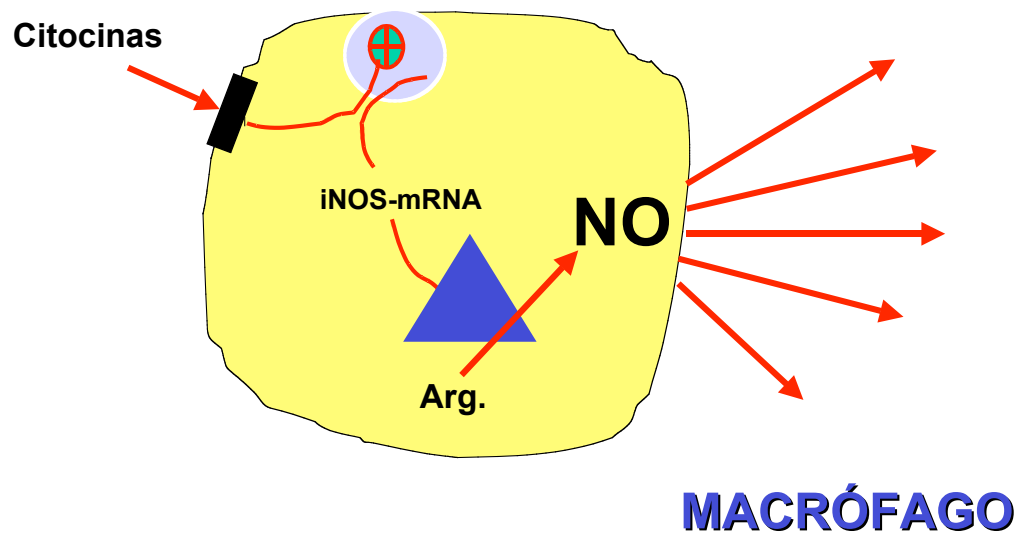


Figura 4.- Ruta de síntesis del NO en el macrófago

Se describen 3 genes responsables de las síntesis de otras tantas formas del enzima productor del NO: dos de ellas expresadas constitutivamente (cNOS) y otra inducible por estímulos inmunológicos (iNOS).

Las formas constitutivas, se encargan de la producción en condiciones fisiológicas, siendo su liberación pulsátil y a niveles bajos.

La enzima iNOS, en cambio, produce un flujo continuo y de gran cantidad de NO desde el momento en que es activada (inducida).

Los principales estímulos para la activación de la iNOS son: Productos derivados de las bacterias (LPS, restos de la pared, etc.), $\text{INF-}\gamma$, IL-1, el $\text{TNF-}\alpha$, los RLO, el factor nuclear κB , y el factor inhibidor de la migración de los macrófagos (MIF) (Figura 6). En cuanto a su inhibición, otra serie de citocinas parecen inhibir su producción (IL-4 e IL-10), causando el mismo efecto inhibitorio el factor de crecimiento de los macrófagos ($\text{TGF-}\beta$) (Figura 5).

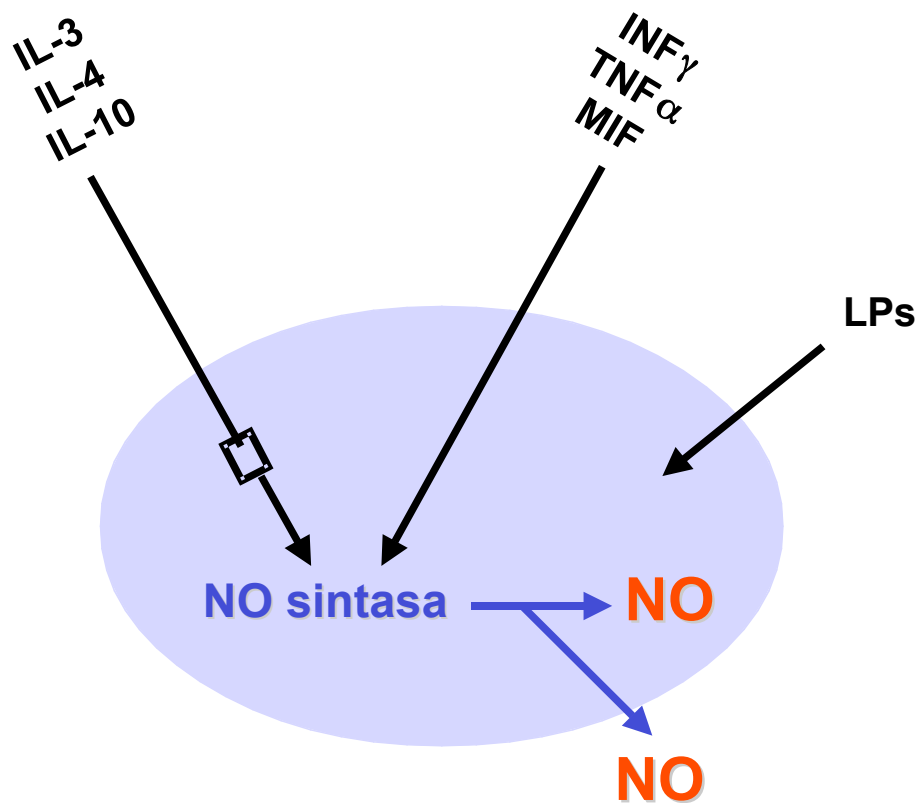


Figura 5.- Síntesis de NO en los macrófagos

El papel del NO en el fenómeno inflamatorio es controvertido^(20, 23, 26, 56, 69, 70, 87, 109, 113, 114, 131). Entre los efectos beneficiosos parecen demostrados los siguientes^(88, 119, 131) (Tabla I):

- Es un inhibidor de la adhesión y agregación plaquetaria mediante el incremento de los niveles intracelulares de GMPc evitando así la trombosis del vaso.
- Disminución de la concentración de calcio intracelular [Ca^{2+}] ^(30, 66, 71, 224)
- Bloquea la adherencia y posible migración de los monocitos.
- Es un inhibidor de la activación neutrofílica que conduce a la adhesión celular al endotelio^(74, 83); así como a la generación de radicales libres del oxígeno^(26, 40, 69).
- Bloquea la liberación de productos con acciones multiplicadoras de la reacción inflamatoria^(139, 154).
- Algunos trabajos le otorgan también un efecto directo sobre los fenómenos más íntimos de la adhesión celular⁽⁸³⁾.
- Protege la mucosa intestinal, favoreciendo su función de barrera.
- Es un potente vasodilatador⁽⁵⁸⁾.
- Inhibe la activación del NfKappaB ⁽⁵²⁾.

Tabla I.- Algunas de las acciones del óxido nítrico

DIANA	RESPUESTA
Guanilato-ciclasa.	Elevación del GMPc.
Plaquetas.	Inhibición de la agregación y adhesión.
Células musculares lisas.	Relajación.
Leucocitos.	Inhibición de la NADPH-oxidasa y activación de la prostaglandin-sintetasa.
Radicales libres.	“Barrendero” formando peroxinitritos.
Metaloproteínas.	A altas concentraciones, inhibición directa de la citocromo-C-oxidasa y otros enzimas que las contienen.
Lípidos.	Formación de peróxidos lipídicos, a través de su descomposición, para formar productos lipídicos vaso-activos.

La modulación de la producción endógena de NO, mediante la administración de su precursor, la L-arginina, puede conducir a una disminución del daño en los tejidos isquémicos que son reperfundidos^(71, 89, 94, 166). En otras líneas experimentales, en cambio, los resultados son inversos. Los efectos contrarios podrían deberse a un exceso de

producción secundaria a la estimulación de la producción de la iNOS ⁽¹²³⁾ que bloquearía la transcripción de la vía constitutiva. El efecto predominantemente beneficioso durante la reperfusión, proviene del NO producido por cNOS ⁽¹²³⁾.

Basado en algunos trabajos de la literatura ^(41, 45, 166), se piensa que el NO es el paso final que eventualmente ejerce una retroalimentación negativa en la producción/liberación de las citocinas ^(41, 62, 70, 98) y/o la expresión/activación de las moléculas de adhesión celular ^(41, 141); muy posiblemente todo ello, mediado por la regulación del factor transcripcional NF κ B (Figura 6).

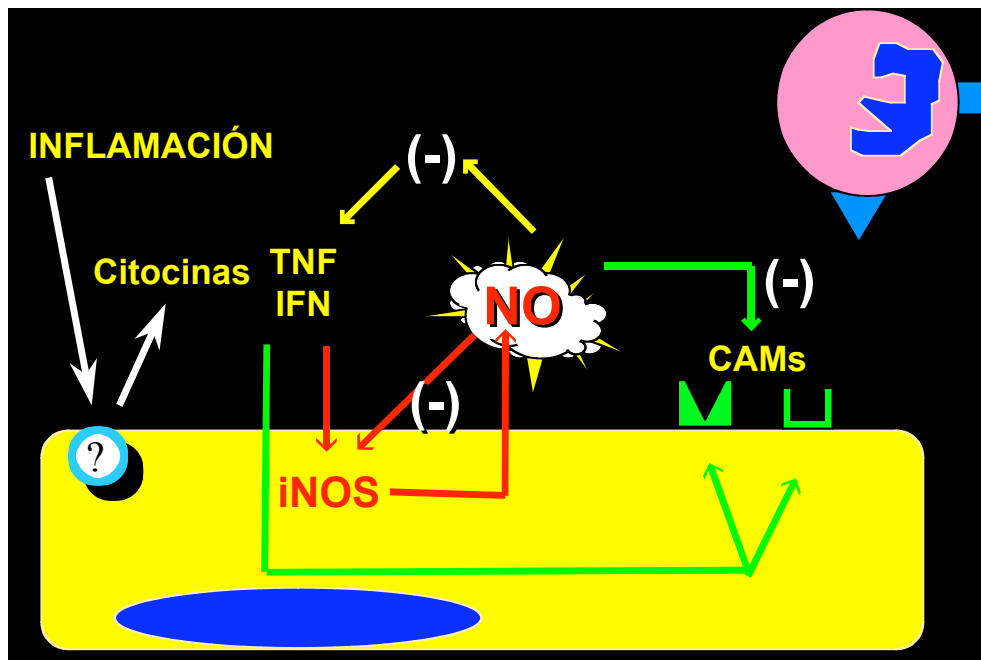


Figura 6.- Posible mecanismo de acción del NO en la inflamación

2.3. INTERACCIÓN LEUCOCITO-ENDOTELIO

Las interacciones entre los leucocitos y el endotelio son cruciales en el mecanismo de lesión en la inflamación y su conocimiento será determinante para el tratamiento del fenómeno inflamatorio en general^(3,46, 103, 166, 167). Han sido descritos dos mecanismos :

A.- Adhesión dependiente del neutrófilo

Este proceso es rápido con el punto más alto de adhesividad para los neutrófilos alrededor de 10 minutos y decayendo en un periodo aproximado de 45 minutos⁽⁶³⁾.

B.- Adhesión dependiente del endotelio

Este proceso implica dos pasos en la respuesta inflamatoria: la adhesión temprana y la tardía dependientes de la célula endotelial⁽⁷⁷⁾.

- Adhesión temprana: Las sustancias implicadas son RLO, leucotrienos, tromboxanos, PAF y componentes de la cascada del complemento. Esta respuesta tiene su punto más alto de actividad a los 5-10 minutos y decae hacia los 30-45 minutos.

- Adhesión tardía: En contraste, los efectos del periodo de respuesta tardía tienen su punto más alto a las 4-6 horas que siguen al estímulo y persisten hasta 48 horas. Esto incluye la estimulación del endotelio por las citocinas y la síntesis y expresión de las moléculas de adhesión.

2.4. MOLÉCULAS DE ADHESIÓN CELULAR

En el momento de la respuesta inflamatoria, tanto el endotelio como los leucocitos, expresan en la superficie de sus membranas celulares las moléculas de adhesión celular (CAMs), las cuales inducen infiltración neutrofílica y lesión tisular ^(3, 103, 140, 166, 167).

Numerosos estudios han aportado evidencias significativas de la adhesión, como un paso esencial en la progresión de la lesión inflamatoria ^(19, 46, 47, 57, 101).

2.4.1. Interacción leucocito-endotelio: Etapas de la inflamación

Se ha demostrado una masiva infiltración de leucocitos en el tejido postisquémico paralela a su lesión ^(19, 45, 46, 57, 144). Esta interacción se divide en cuatro etapas específicas ^(46, 104, 129, 145), que exponemos a continuación (Figura 7):

A. Rodamiento: Los leucocitos disminuyen sensiblemente su velocidad y quedan marginados en la periferia rodando sobre el endotelio vascular y siendo expuestos a los mediadores de la inflamación liberados por el endotelio.

B. Activación: Expresión/activación de las moléculas de adhesión celular tanto en ellos como en el endotelio.

C. Adhesión: Entre los leucocitos y las células endoteliales a través de las moléculas de adhesión celular.

D. Migración: migran a través de la matriz subendotelial al tejido extravascular.

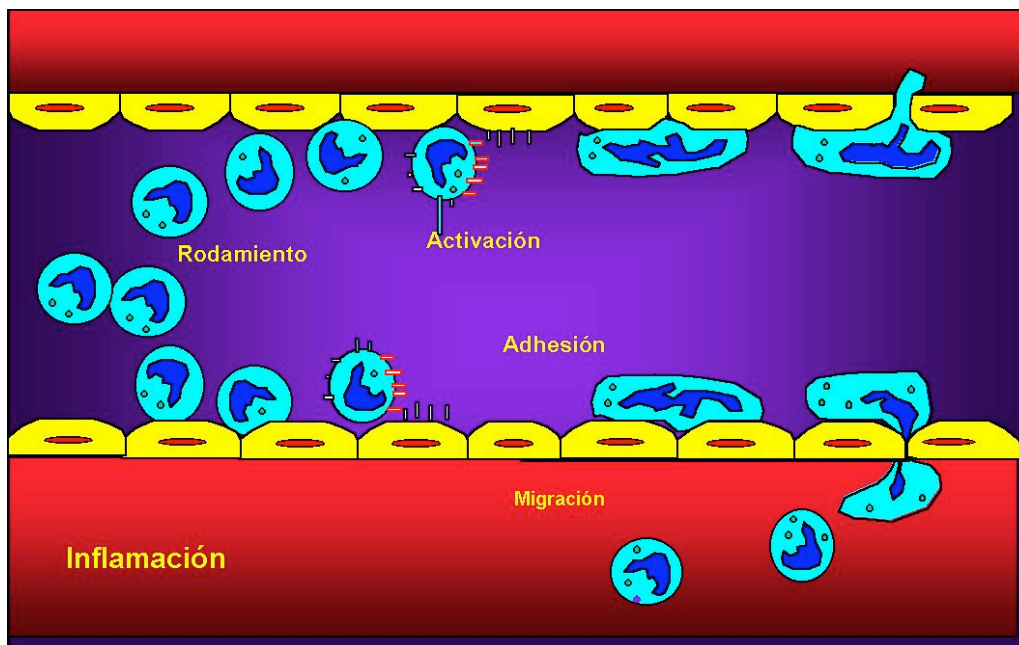


Figura 7.- Interacción leucocito-endotelio en la inflamación

Las moléculas de adhesión celular más importantes, asociadas con el fenómeno inflamatorio, han sido clasificadas en tres familias^(46, 104, 129, 145). Inmunoglobulinas, Integrinas y Selectinas (Figuras 8 y 9).

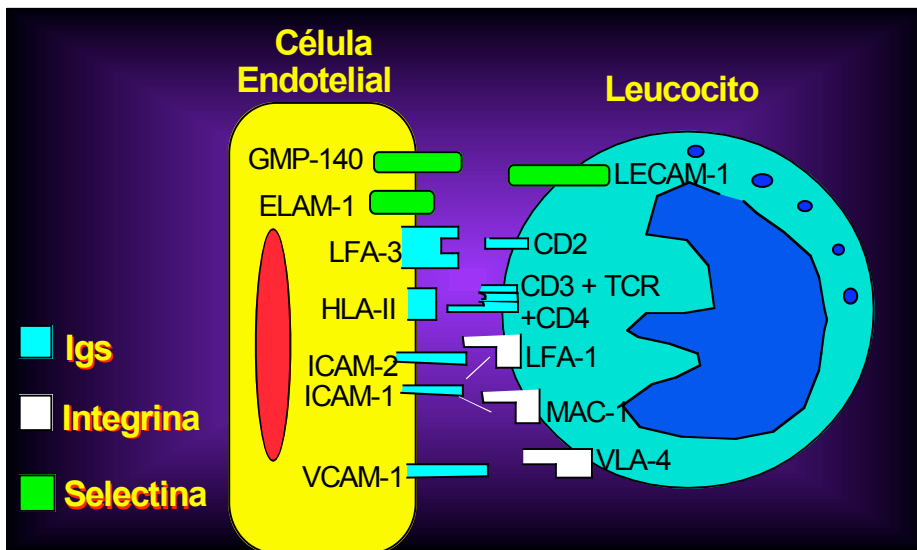


Figura 8.- Familias de CAMs y células que las expresan I

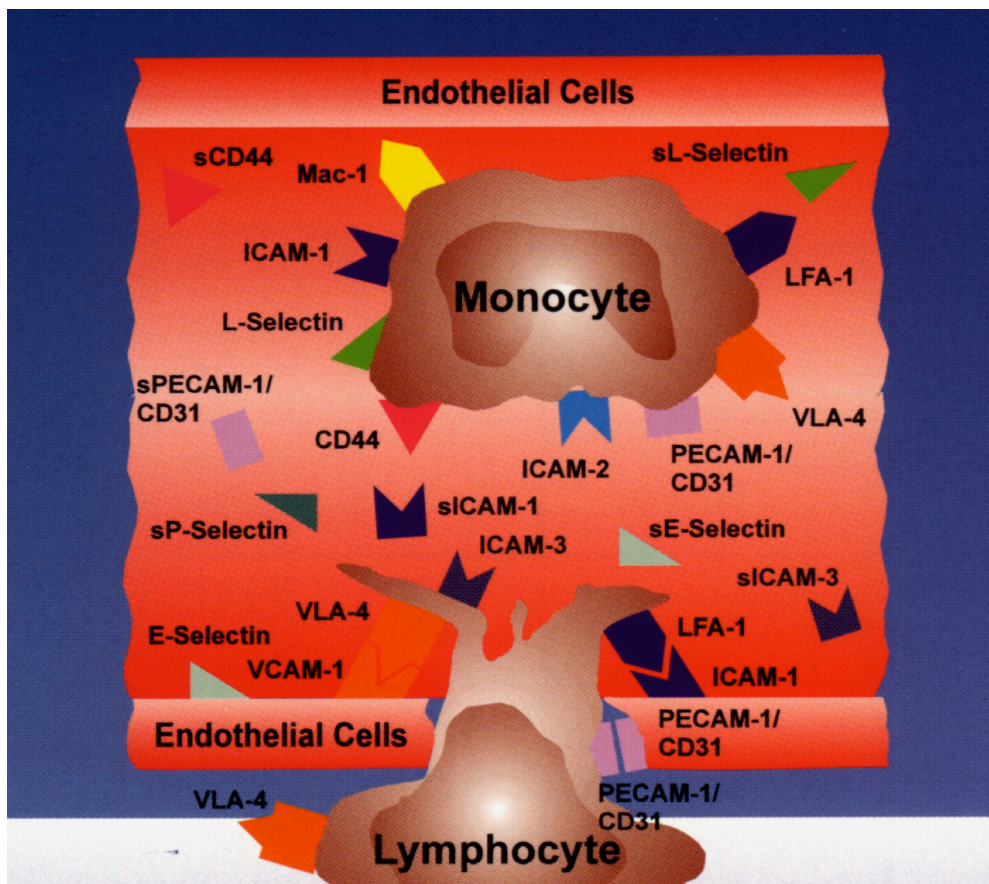


Figura 9.- Familias de CAMs y células que las expresan II

A.- Superfamilia de las inmunoglobulinas

Estas moléculas participan en el reconocimiento antigénico y en la activación linfocitaria como los anticuerpos, el receptor T, los antígenos de clases I y II del sistema mayor de histocompatibilidad y sus contrarreceptores CD8 y CD4.

Entre sus componentes, teniendo en cuenta su importancia en el fenómeno inflamatorio, destacamos las siguientes^(46, 141) (Tabla II):

- Molécula de adhesión intracelular-1 (ICAM-1, CD54).
- Molécula de adhesión intracelular-2 (ICAM-2).
- Molécula de adhesión celular vascular-1 (VCAM-1, INCAM-110).
- Molécula de adhesión celular plaquetaria-endotelial-1 (PECAM-1).

Tabla II.- Superfamilia de las inmunoglobulinas

CAMs	Célula en la que se expresa	Ligando	Célula en la que se expresa el ligando
ICAM-1*	Endotelial, Monocito, Linfocito T y B, Dendrítica	Mac-1	Leucocitos Monocitos
ICAM-2**	Endotelial, Monocito, Dendrítica	LFA-1	Leucocitos
VCAM-1*	Endotelial	VLA-4	Linfocitos, Monocitos
PECAM-1*	Endotelio, Monocitos, Linfocitos	CD31	Endotelio, Plaquetas

* Inducible por citocinas; ** Constitutiva

B.- Familia de las integrinas

Consolidan las interacciones iniciadas por otras moléculas de adhesión celular, principalmente las selectinas, y al unirse a sus contrarreceptores producen importantes cambios funcionales en los leucocitos. Su conexión con el citoesqueleto celular les confiere también un importante papel en el proceso de migración.

Nos centraremos, a continuación, en las más importantes relacionadas con el fenómeno inflamatorio^(27, 46) (Tabla III):

Tabla III.- Familia de las integrinas

CAMs	Célula en la que se expresa	Ligando	Célula en la que se expresa el ligando
LFA-1*	Leucocito	ICAM-1	Endotelial
		ICAM-2	
Mac-1**	Monocito, Neutrófilo	ICAM-1	Endotelial

* Inducible por citocinas; ** Constitutiva

C.- Familia de las selectinas

Son las responsables del inicio de las interacciones leucocito-endotelio en la respuesta inflamatoria. Hasta el momento se conocen tres selectinas^(29, 59, 92) (Tabla IV):

Tabla IV.- Familia de las selectinas

CAMs	Célula en la que se expresa	Ligando	Célula en la que se expresa el ligando
L-selectina*	Linfocito	Mucine	Endotelial
E-selectina**	Endotelial	Moléculas fucosiladas ó sialiladas	Neutrófilo Monocito
P-selectina***	Plaquetas Endotelial	Moléculas fucosiladas ó sialiladas	Plaqueta Neutrófilo Monocito

* Disminuida por citocinas; ** Inducida por citocinas; *** Liberada por citocinas

2.4.2. Modulación de las CAMs

Uno de los principales mecanismos de control de las moléculas de adhesión celular, es la afinidad del receptor por su ligando.

Una característica interesante es que se induce la adhesión sin un aparente incremento en la expresión de los receptores ⁽⁷⁹⁾. Esto ha sugerido que la afinidad del receptor por su ligando, o cambios en la organización de los receptores en la superficie celular, son los que causan el incremento de la adhesión.

2.4.3. Expresión de las CAMs en los leucocitos

Los fenómenos precisos, intracelulares, que regulan la adhesión celular mediada por integrinas aún no son bien conocidos. Algunas observaciones ⁽⁴⁶⁾ sugieren que la vía LFA-1/ICAM-1 es una vía común de adhesión que pueden seguir los leucocitos bajo diferentes condiciones fisiopatológicas (inflamación, reperfusión, infección, rechazo, etc.).

2.4..4. Expresión de CAMs en el endotelio

Es bien conocido que la producción de citocinas incrementa localmente la expresión de integrinas como la ICAM-1 en las células endoteliales^(46, 122), de aquí que faciliten la adhesión celular en general.

La inmunoneutralización de ICAM-1 atenúa la adherencia neutrofílica en isquemia-reperfusión mesentérica y reduce el secuestro neutrofílico y el edema en la postisquemia pulmonar.

Las selectinas son un caso especial, por ejemplo, la P-selectina después de la activación endotelial se transloca rápidamente a la superficie en aproximadamente 5 minutos⁽⁵⁷⁾. La E-selectina sin embargo tiene su pico de expresión máximo a las 4-6 horas después de la estimulación con citocinas^(12, 21, 33, 74).

2.4..5. Citocinas, endotelio y CAMs

Como mencionamos anteriormente, las citocinas más importantes implicadas en la modulación de las CAMs son el TNF- α , la IL-1 y el IFN- γ .

Después de la adición de citocinas al endotelio (TNF- α , IL-1):

- La expresión de ICAM-1 se incrementa, llegando a un pico máximo a las 24 h., y manteniendo su expresión al menos 72⁽¹⁵⁹⁾.

- La VCAM-1 alcanza su máxima expresión alrededor de las 6 horas y declina a las 48h ⁽¹⁶¹⁾.
- La E-selectina causa un pico de expresión en la superficie celular entre las 4-6 h., retornando a niveles basales a las 24 h.

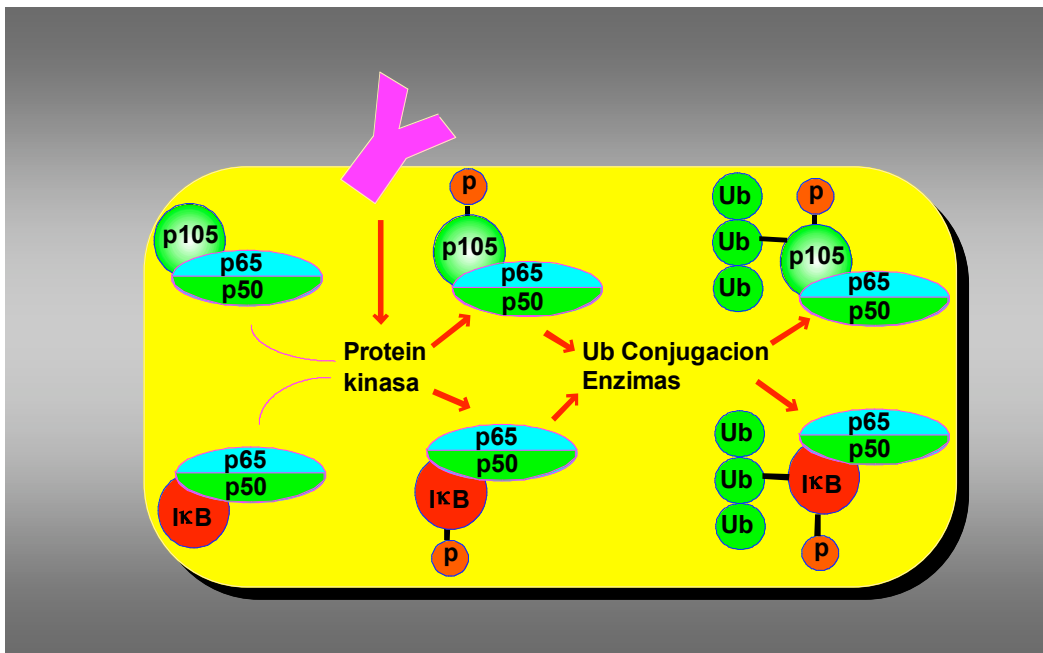
2.4.6. Citocinas, leucocitos y CAMs

El TNF- α es la citocina más potente que estimula a los neutrófilos para incrementar temporalmente su adhesividad. Este incremento dura de 30 a 60 minutos ⁽¹⁰⁶⁾ y parece inducir una disminución en los niveles de AMP cíclico ⁽⁷²⁾.

2.5. EL FACTOR TRANSCRIPCIONAL NF κ B

Es una proteína activadora transcripcional que pertenece a la familia Rel de factores transcripcionales⁽⁵¹⁾. Los mecanismos de activación citoplasmática de NF κ B se han dividido en 4 fases⁽¹⁵⁴⁾: fosforilación, ubiquitinización, degradación o procesamiento proteico y transporte (Figuras 10 y 11).

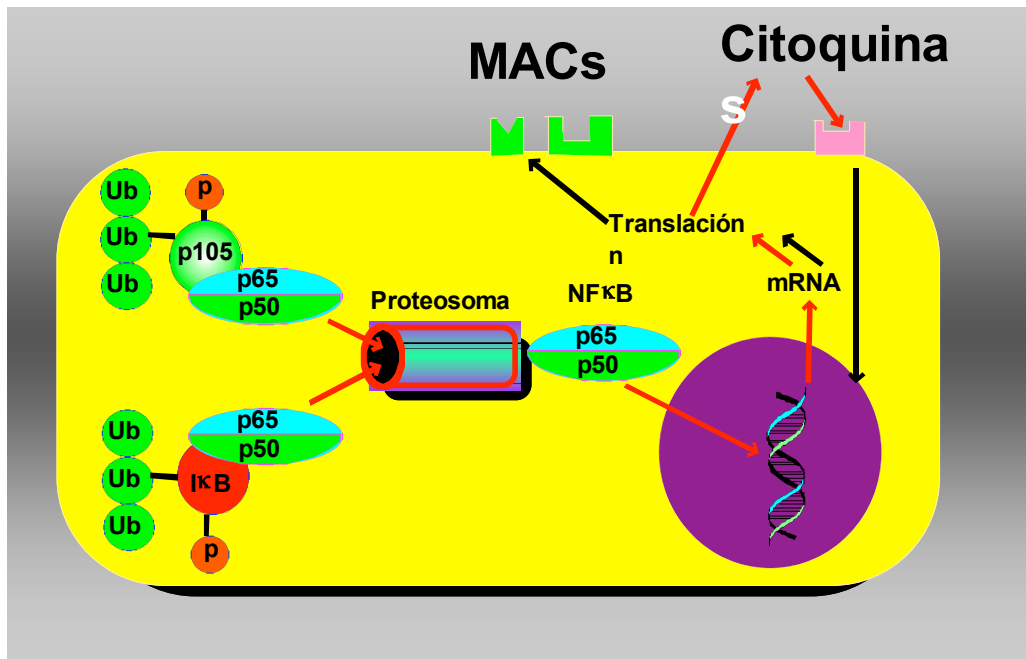
Figura 10



El NF κ B (p65-p50) se encuentra atrapado en el citoplasma en condiciones normales formando un complejo, inactivo, con la subunidad Inhibitoria I κ B. Después de su activación, I κ B es primero fosforilada y posteriormente ubiquitinizada.

Las subunidades κB y p105 son procesadas por lisis o sólo liberados. $NF\kappa B$ es entonces capaz de ser transportado dentro de la membrana nuclear donde activa la transcripción de diferentes genes incluyendo $TNF-\alpha$, $INF-\gamma$ y otras proteínas como CAMs (Figura 11).

Figura 11



La actividad de $NF\kappa B$ es inducida por mitógenos y probol éster, aun en presencia de inhibidores de la síntesis proteica⁽¹⁴¹⁾.

También se ha demostrado que factores séricos de crecimiento y citocinas proinflamatorias como $TNF-\alpha$ e $IL-1$ inducen su actividad independientemente de que la síntesis proteica esté activa o no^(229, 279) (Tabla V).

Tabla V.- Inductores de NFκB

Lista parcial de inductores de NFκB

Probol éster PMA

Lipopolisacárido (LPS)

Factores séricos Growth/derivados plaquetarios de factor Growth (PDGF)

Radicales libres del oxígeno (H₂O₂)

Factor de necrosis tumoral (TNF)

Interleucina-1

Infección viral

Proteínas virales:

Proteína X del virus de la hepatitis B

Proteína Tax del HTLV-1

Proteína latente de membrana (LMP)

La inducción por los agentes mencionados anteriormente produce una localización nuclear de la proteína, supuestamente a través de la liberación de IκB⁽¹⁰⁾. Pero no han sido aclaradas cuáles son las señales involucradas en esta liberación, ni tampoco el control de la resíntesis de NFκB, ni el restablecimiento del complejo NFκB-IκB en el citoplasma.

3.- SINDROME INFLAMATORIO POSTPERFUSIÓN SIRS

En la cirugía del AAA la necesidad del clampaje aortico suprarrenal condiciona una situación de isquemia, con salida de gran cantidad de mediadores de la inflamación.

Estos mediadores, que con la reperfusión se liberan de forma súbita al torrente circulatorio, dan lugar a una respuesta inflamatoria ^(44, 110, 151, 157, 162). Si ésta escapa a sus mecanismos de control, puede surgir el Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) ⁽¹³⁴⁾ .

El SIRS es definido clínicamente por cambios en la temperatura, frecuencia cardiaca y del nivel de leucocitos.

La importancia del SIRS viene dada por su capacidad para producir una disfunción orgánica, la cual puede progresar hasta un fallo simple o multiorgánico ⁽¹³¹⁾ (ej: edema pulmonar no cardiogénico, fallo renal agudo (FRA), depresión miocárdica y fallo de la coagulación).

3.1. LESIÓN POR ISQUEMIA

La aplicación de un clamp en aorta abdominal suprarrenal durante la intervención, provoca isquemia renal y en todo el territorio de la aorta descendente.

Definimos la Isquemia como la interrupción del suministro de sangre en un territorio con la consiguiente anulación del aporte de oxígeno y nutrientes. El primer componente de esta lesión es una interrupción del suministro de sangre que impide la distribución de oxígeno y nutrientes a los tejidos. Esta situación se caracteriza por la conversión del metabolismo celular en anaerobio, modificándolo hacia la fermentación láctica y eludiendo el ciclo de Krebs ⁽⁷¹⁾. En consecuencia la producción anaeróbica de adenosín trifosfato (ATP), molécula energética celular esencial, es sensiblemente inferior ^(16, 115, 132) (Figura 12).



Figura 12.- Cambios metabólicos en la lesión isquémica.

El déficit de oxígeno junto con el agotamiento de la energía celular, conducen a diversas alteraciones bioquímicas incluyendo la disfunción del sistema de transporte de membrana ^(71, 148) y una atípica activación de los sistemas citoplasmáticos.

Un ejemplo importante de estos cambios es el conocido aumento de la concentración de calcio intracelular $[Ca^{2+}]_i$ ^(16, 23, 71, 90), que actúa como un segundo mensajero y provoca la activación de diversos sistemas enzimáticos importantes para la producción de los mediadores de la inflamación ^(42, 71, 90, 148, 157, 90) (Figura 13).

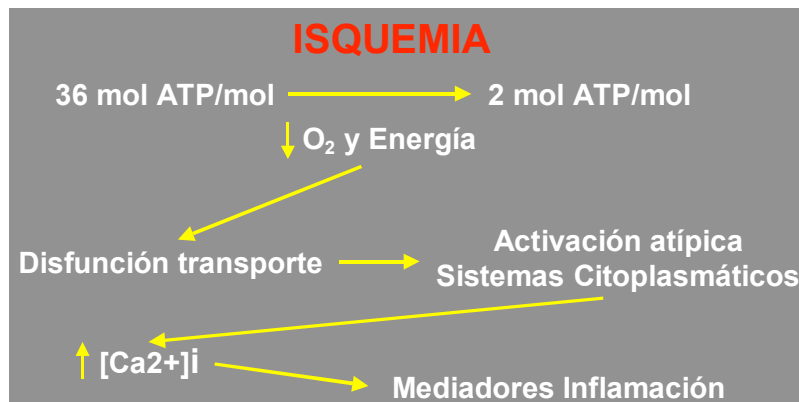


Figura 13.- Pérdida energética y sus consecuencias.

La falta de ATP produce disfunción de los sistemas de transporte de la membrana ⁽⁷¹⁾, y conduce a la acumulación de fluido dentro de la célula y tumefacción de la misma (Figura 14).

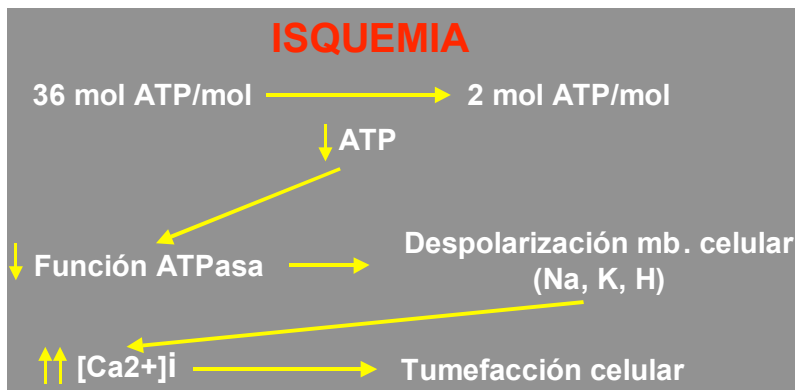


Figura 14.- Causas de la tumefacción celular en la isquemia.

El déficit energético conduce a un aumento de la glucólisis con la consiguiente disminución del glucógeno y del pH además de una disminución de la síntesis proteica; estos hechos, conllevan la liberación de enzimas lisosomales, citosólicas (rompen el esqueleto celular) y de la fosfolipasa A2 (degrada los fosfolípidos de membrana) ⁽¹⁵⁷⁾. Todas estas alteraciones conducen a la producción de cambios nucleares y autodigestión proteica (Figura 15).

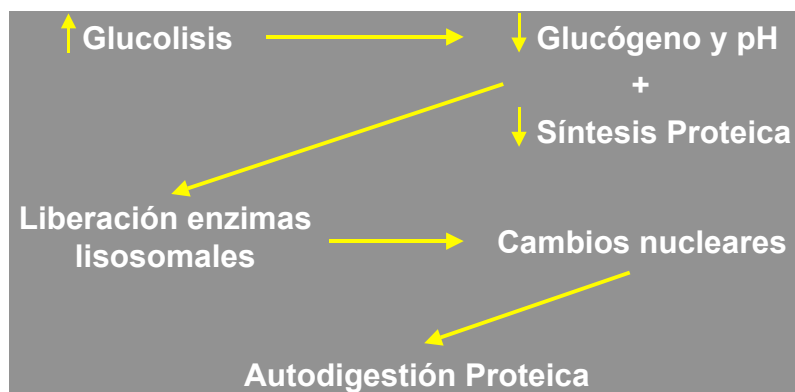


Figura 15.- Autodigestión proteica en la lesión isquémica.

Al mismo tiempo, la isquemia conduce a una pérdida de fosfolípidos de membrana, alteraciones en el citoesqueleto y a una acumulación de adenosina y sus productos de degradación, xantina e hipoxantina. Esta molécula, ya en la fase de isquemia, pero sobre todo en la fase de reperfusión, dará origen a radicales libres del oxígeno.

La ruptura de la membrana citoplasmática dañada es un factor importante en la patogénesis de la lesión isquémica irreversible. Por consiguiente, si la isquemia es lo suficientemente prolongada el daño ocasionado será irreversible (necrosis celular) ⁽⁷¹⁾, careciendo de importancia a partir de este momento la fase de repercusión (Figura 16).

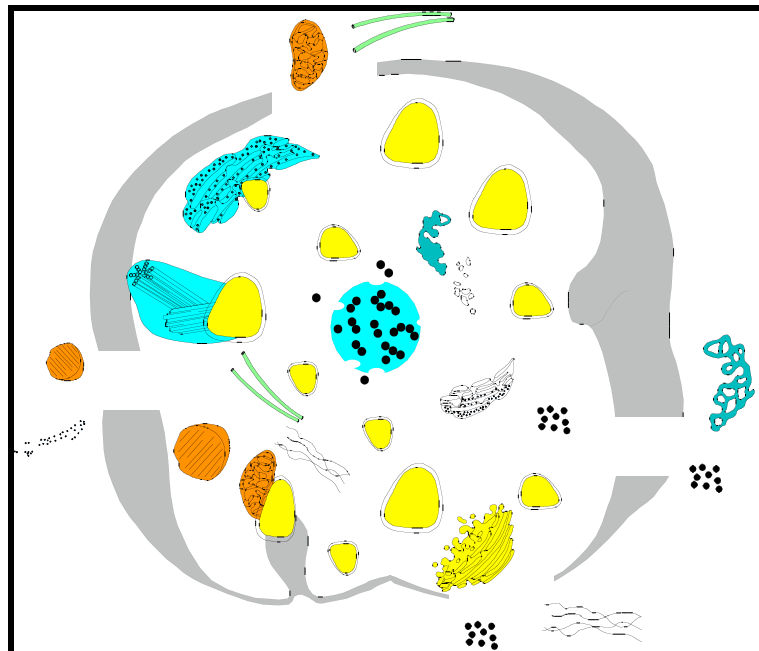


Figura 16- Necrosis celular en la isquemia.

En la isquemia inducida en el riñón durante una situación de shock, el descenso de la perfusión debida a los mecanismos de irrigación preferencial ^(89, 92, 137), conlleva una depleción de la producción intracelular de ATP ⁽¹³⁷⁾ junto a una disfunción tubular renal ^(11, 21, 137).

De manera particular, se ha comprobado en diferentes estudios sobre isquemia pura e isquemia-reperfusión renal, cómo la activación de los neutrófilos junto a las citocinas liberadas en el tejido isquémico provoca alteraciones sobre el aporte de flujo al riñón ^(20, 118, 134).

Las alteraciones ultraestructurales detectables en el riñón isquémico son observadas y recogidas por Beecherl et al., comprobando cómo muy precozmente (a los pocos minutos de iniciarse la isquemia) es posible detectar una desaparición de las microvellosidades apicales ⁽¹¹⁾. En concreto la gama de lesiones identificadas son ⁽⁴⁵⁾ :

- a) Disfunción endotelial y vasoconstricción renal sostenida.
- b) Alteraciones en el citoesqueleto de las células tubulares.
- c) Pérdida de la permeabilidad de los túmulos.

En modelos de Isquemia-Reperfusión (I/R) en miocardio y pulmón de rata ⁽¹⁴⁰⁾, se ha comprobado cómo los tejidos sometidos a periodos cortos de isquemia separados por periodos de perfusión intermitente, toleran mejor un periodo prolongado de isquemia.

Esta mejoría de la tolerancia a la isquemia se ha justificado por la liberación endógena de sustancias con efectos protectores, entre ellas la adenosina, prostaciclina, NO y bradiquinina ⁽¹⁰⁸⁾ .

Hotter et al., realizaron experiencias similares en intestino de rata comprobando ese efecto protector de la isquemia intermitente ^(42, 85). En las mismas experiencias también comprueban cómo dicho efecto desaparece cuando se trata con un inhibidor de la síntesis de NO, mientras que los inhibidores de la PGI₂, no modifican los resultados.

Estos resultados sugieren que en los periodos breves de isquemia se produce un aumento del calcio intracelular con la consiguiente activación de la NO-Sintasa-Ca-dependiente, incrementándose la generación de NO, quien podría ejercer ese efecto beneficioso ^(53, 85).

3.2. LESIÓN POR REPERFUSIÓN

El restablecimiento del flujo sanguíneo es necesario para rescatar los tejidos isquémicos, con el fin de posibilitar la regeneración de la energía celular y la eliminación de los metabolitos tóxicos derivados de la situación de anoxia. Sin embargo, la reperfusión inicia una sucesión de acontecimientos que de manera paradójica pueden prolongar la lesión tisular e incluso intensificarla.

Diferentes estudios han puesto de manifiesto que la reperfusión anóxica de los tejidos isquémicos da por resultado poca lesión ⁽¹³²⁾, pero en cambio, que las reacciones iniciadas durante la reperfusión con oxígeno, van a ocasionar alteraciones más graves que las inducidas por la propia isquemia.

Los mecanismos implicados en esta lesión no están completamente demostrados, pero los radicales libres del oxígeno (RLO) parecen ser responsables importantes ^(19, 20).

Los RLO se forman en los tejidos post-isquémicos por reducción química del oxígeno aportado en la reperfusión. Una vez producidos, los RLO condicionarían por interacción con las membranas del endotelio vascular del tejido isquémico, un aumento de concentración de Ca^{2+} , que activaría una serie de proteasas no específicas y fosfolipasas (Fosfolipasa A_2); la activación de estas proteasas conduciría a la liberación de sustancias quimioatrayentes para los leucocitos ^(20, 102) (Figura 17).

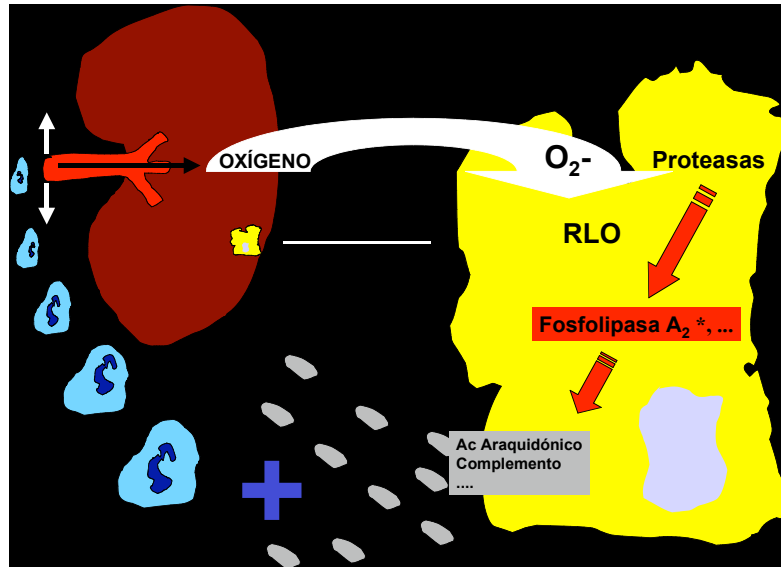


Figura 17.- Producción de RLO tras la reperusión; implicación en la producción de sustancias quimiotractivas

Por otro lado, los RLO ocasionarían una peroxidación de los lípidos de la membrana de las células ⁽⁵⁹⁾ con el consecuente aumento de la permeabilidad de la membrana celular.

Por último, los RLO son capaces de ocasionar directamente alteraciones en los sistemas enzimáticos celulares y provocar mutaciones del DNA ^(24, 25, 75, 86, 124, 152) (Figura 18).

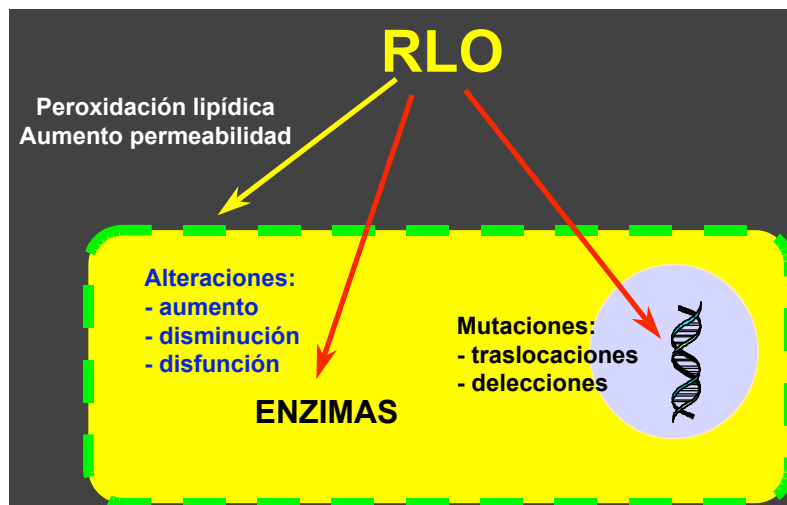


Figura 18.- Mecanismo de lesión celular de los RLO.

Todo esto contribuirá al trastorno en la función celular y a su posterior necrosis, fenómeno esencial que acompaña a la reperfusión de los tejidos isquémicos ⁽¹⁴³⁾.

En concreto, los RLO inducirán en su acción sobre el DNA, la activación de proteínas transcripcionales que incrementarán la producción de óxido nítrico y citocinas (TNF- α), las cuales a su vez, aumentarán la producción de más RLO perpetuando e incrementando así el daño ^(24, 25, 75, 86, 124, 143) (Figura 19).

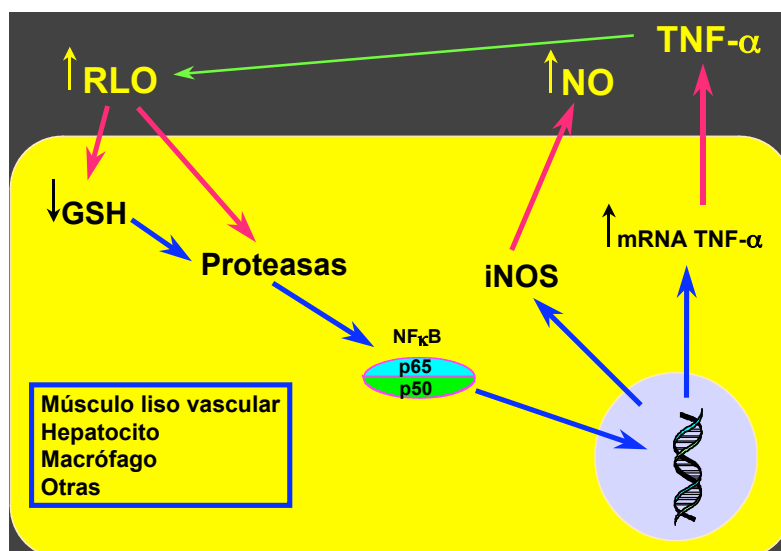


Figura 19.- Mecanismo de retroalimentación en la producción de RLO.

La activación y acumulación de los neutrófilos en el tejido postisquémico es causa de lesión, siendo ésta proporcional al grado de acumulación.

El incremento de la actividad de la mieloperoxidasa constituye un marcador sensible del daño inducido por la isquemia y reperfusión en los tejidos, en el que los neutrófilos parecen ser mediadores primarios ^(27, 29, 101, 162). Por otro lado, la masiva deplección de neutrófilos del suero ⁽⁴⁰⁾, el bloqueo en la producción de los radicales libres del oxígeno ⁽¹⁴⁹⁾, o el uso de anticuerpos monoclonales dirigidos contra la glucoproteína de membrana neutrófilica CD18 ⁽¹²⁾, responsable de la adhesión del leucocito al endotelio ^(33, 99), disminuyen la infiltración neutrófilica y con ello la lesión microvascular.

La producción de RLO parece conducir también a la fragmentación de la molécula de C5 activando el complemento sérico ^(122, 139) con la subsiguiente generación de anafilotoxinas. De hecho, la inactivación del complemento disminuye la lesión por reperfusión en los tejidos ⁽⁷³⁾ (Figura 20).

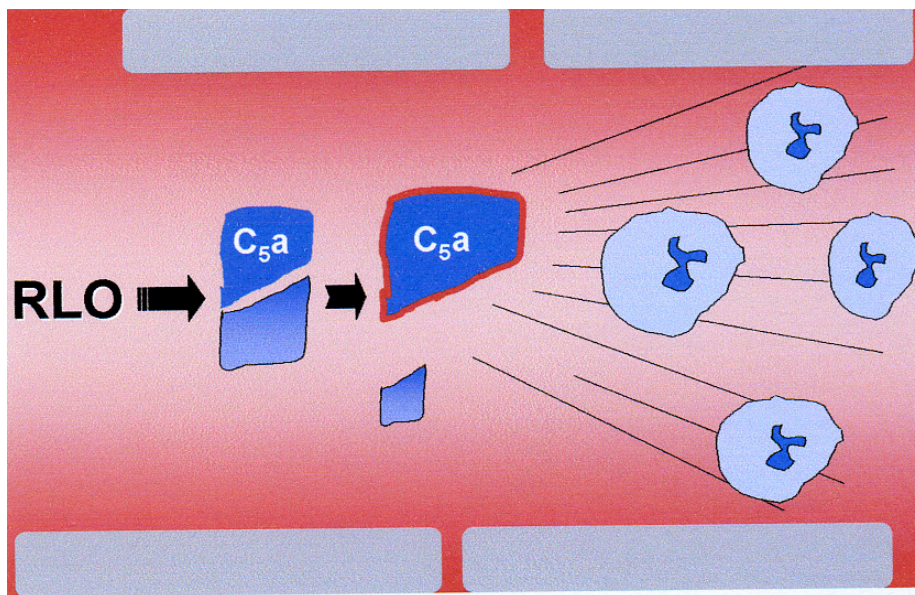


Figura 20.- Interacción RLO y sistema complemento.
Quimiotaxis leucocitaria por el complemento.

La liberación de citocinas durante la reperfusión, fundamentalmente por los leucocitos activados, especialmente factor de necrosis tumoral α (TNF- α), interleucina-1 (IL-1) e interferón- γ (IFN- γ), y la liberación del factor activador de las plaquetas (PAF), influirán en la lesión postisquémica favoreciendo la adhesión leucocito-endotelio⁽¹¹⁵⁾, y multiplicarán el fenómeno inflamatorio iniciado ^(25, 46, 144, 157, 162) (Figuras 21 y 22).

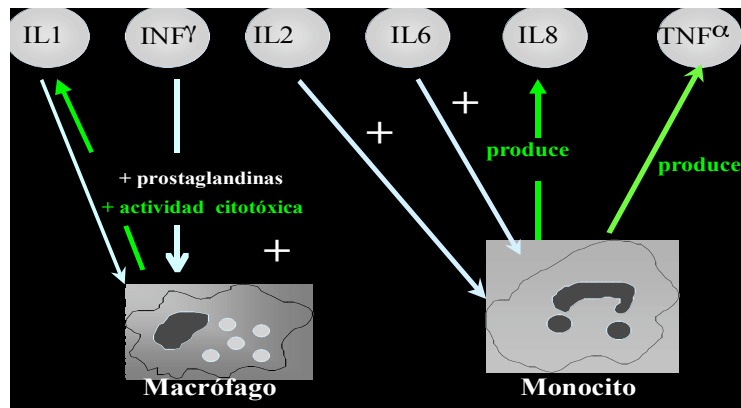


Figura 21.- Producción y efectos de las citocinas proinflamatorias I

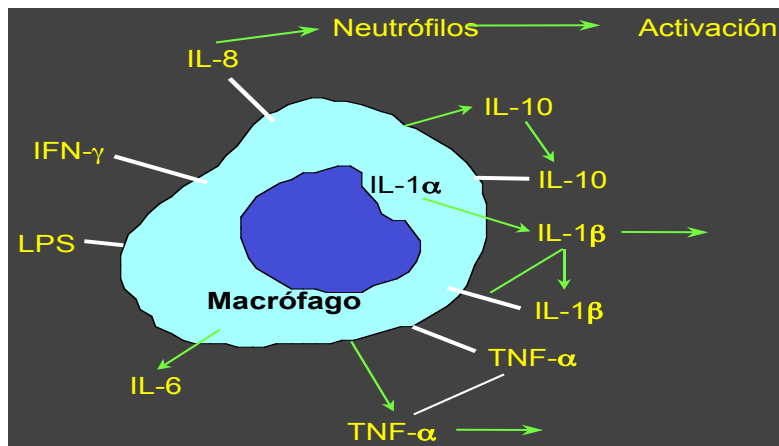


Figura 22.- Producción y efectos de las citocinas proinflamatorias II.

Para finalizar podemos decir que ambas cirugías, electiva y de AAA roto desarrollan SIRS y esta respuesta es causada por lesión debida a isquemia-reperfusión ⁽¹³¹⁾. En los pacientes con AAA roto, concurren los factores adicionales de hipotensión, acidosis, transfusión sanguínea e hipotermia (la llamada segunda agresión o second insult phenomena), esto da lugar a una ulterior extensión de las vías inflamatorias y probablemente incide en la progresión hacia el fallo multiorgánico ^(131, 162).

4.- PRÓTESIS VASCULARES

La utilización de prótesis en diversos campos de la cirugía provoca una respuesta inmunológica, ya sea de inflamación, rechazo o ambas, cuyo control concretamente en el campo de la cirugía vascular tiene gran trascendencia ⁽¹⁴⁶⁾.

El progreso de los materiales para uso médico ha permitido la obtención de biomateriales que mimetizan las estructuras tisulares y permiten la función del órgano o tejido donde se implantan ^(31, 50).

La cirugía resolutive de los aneurismas periféricos mediante resección e injertos venosos fue practicada en 1906 por primera vez por José Goyanes, quien la realiza en un aneurisma de la poplítea, sustituyendo un segmento de dicha arteria con éxito.

Desde entonces muchos y muy variados tipos de sustitutivos han sido utilizados para este fin. En la actualidad, el tratamiento de elección de un aneurisma es la resección y sustitución por un injerto o por una prótesis sintética.

La cirugía del AAA, por la necesidad de realizar un clampaje para colocar un cuerpo extraño (prótesis), y -especialmente en aquellos casos en que se acompaña de una hemorragia importante-, provoca la aparición de una importante reacción inflamatoria, capaz por si misma, de producir problemas de coagulación o fallo multiorgánico ^(37, 38, 131).

La idea de sustituir vasos sanguíneos por conductores artificiales es muy antigua. Los primeros materiales utilizados no tuvieron éxito debido a la aparición de trombosis y a la reacción de rechazo por cuerpo extraño que provocaban. Los productos hoy universalmente empleados son el Teflón y el Dacrón, que cumplen las siguientes exigencias:

- Esterilización segura.
- Estabilidad en sus características físicas y químicas.
- Indiferencia biológica en el organismo.
- Escasa actividad trombógena.
- Ausencia de poder cancerígeno.

Sin embargo, y a pesar de la notable mejoría en la biocompatibilidad de estos materiales, la reacción inflamatoria y la infección de la prótesis, siguen siendo riesgos importantes para el éxito de la cirugía ^(38, 43).

Las prótesis sintéticas se comportan como materiales biológicamente extraños ^(38, 44,50) y el huésped tiende a encapsularlos completamente. Se produce una invasión de tejido de granulación y los fibroblastos se unen al material formando un tejido alrededor ⁽²²⁾.

Con el tiempo se produce una capa pseudointimal que reduce el calibre interno del vaso. La neoformación de endotelio sobre la cápsula interna ha sido objeto de numerosas investigaciones, siendo casi completa en sujetos jóvenes y faltando de modo sistemático en los arterioesclerosis ⁽¹³³⁾.

Todos los injertos protésicos son susceptibles de infección vía contaminación directa durante la implantación (lo más frecuente) o vía bacteriemia después de la operación.

4.1. ENDOPRÓTESIS VASCULARES

El tratamiento de AAA mediante endoprótesis tiene una serie de ventajas con respecto al tratamiento clásico, ya que reduce el tiempo de hospitalización y convalecencia, y disminuye el coste global de la técnica ^(22, 50). Ha sido por tanto un avance en la cirugía del AAA no complicado.

La experiencia en los AAA rotos es menor, y basados en los estudios preliminares de series clínicas, con las limitaciones que ello conlleva, muestran una clara tendencia a la mejoría de la morbimortalidad a corto plazo en este grupo de pacientes ^(14, 35, 81, 110, 127). Las únicas contraindicaciones son: inestabilidad hemodinámica y anatomía aórtica desfavorable ^(105, 127). A pesar de que la selección de pacientes puede suponer un sesgo en los resultados –ya que deliberadamente excluimos a aquellos con inestabilidad hemodinámica- las prótesis endovasculares parecen mejorar los obtenidos con la cirugía abierta ^(35, 121).

Aunque al comienzo de su utilización se esperaba que con las prótesis endovasculares se minimizaría la lesión por isquemia/reperfusión, estudios recientes han demostrado que aunque en un grado menor que en la cirugía abierta, las prótesis endovasculares también pueden originar SIRS ^(78, 133, 146).

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DEL TRABAJO

1.- HIPÓTESIS

La administración de NO exógeno modulará la respuesta inflamatoria sistémica inducida por la prótesis en un modelo experimental de cirugía abdominal aórtica.

2.- OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo ha sido valorar el efecto beneficioso de la administración de un donante de óxido nítrico sobre la función renal, a través de la modulación de la respuesta inflamatoria sistémica, en un modelo de cirugía de aorta abdominal.

Hemos utilizado un modelo experimental: clampaje aórtico suprarrenal con hemorragia, simulando cirugía aórtica urgente y electiva

Para conseguir nuestros objetivos hemos realizado la siguiente valoración:

1. Evaluar la evolución postoperatoria de diferentes moléculas y células implicadas en el SIRS.
2. Observar las diferencias en relación al tipo de agresión.
3. Determinar el punto de máximo aumento y la vuelta a la normalidad de varios parámetros.
4. Descubrir una correlación entre los diferentes parámetros.
5. Analizar impacto directo (isquemia) e indirecto (efecto sistémico del clampaje con/sin hemorragia) sobre el riñón.

III MATERIAL Y MÉTODOS

1.- MATERIALES

1.1. INSTALACIONES

El presente trabajo se ha realizado en:

- Centro Biosanitario de Investigación Experimental de la Universidad de Salamanca.
- Laboratorios del Centro Biosanitario de Investigación Experimental de la Universidad de Salamanca y en los Laboratorios del Hospital Clínico Universitario de Salamanca.

1.2. INSTRUMENTAL Y EQUIPO

1.2.1. Material para el desarrollo de la técnica anestésica y quirúrgica

A.- INVENTARIABLE:

- Estación de anestesia modelo Boyle 2000; Ohmeda AV 7700.
- Vaporizador de gases anestésicos modelo Blease[®]; Laboratorios Abbott.

- ❑ Bomba de infusión continua de fármacos intravenosos modelo Infusomat® fm; Laboratorios Braun.
- ❑ Equipo de monitorización hemodinámica modelo Dash 3000®; Laboratorios Dragër.
- ❑ Laringoscopio de pala recta.
- ❑ Pinzas de Magill.
- ❑ Porta agujas.
- ❑ Mesa quirúrgica.
- ❑ Lámparas.
- ❑ Paños estériles.
- ❑ Máquina de rasurado eléctrica.
- ❑ Tijeras de disección rectas y curvas.
- ❑ Pinzas de disección vasculares rectas.
- ❑ Mosquitos y Bengoleas.
- ❑ Clamps vasculares.
- ❑ Laparostatos.
- ❑ Batas quirúrgicas.
- ❑ Bisturí eléctrico.
- ❑ Aspiradores.
- ❑ Autoclave.

B.- FUNGIBLE :

- ❑ Bisturíes del N° 21 y N° 11.
- ❑ Jeringuillas de 5, 10 y 20 cc.

- Catéteres de punción venosa 20 G.
- Agujas de punción im.
- Gasas y compresas estériles.
- Guantes quirúrgicos estériles N° 7 y N° 7 1/2.
- Mascarillas, gorros y calzas quirúrgicas.
- Sistemas de gotero.
- Suero fisiológico, glucosado 5% y coloides (Hemocé®).
- Suturas y ligaduras (seda, ácido poliglicólico y polipropileno).
- Prótesis vascular de dacrón colágena (Hemashield, Knitted Microvel® Double Velour Vascular Graft. Meadox Medical, Inc. USA) de 6 mm. de diámetro.
- Tubo endotraqueal de baja presión nº 5; Mallinckrodt Medical.
- Catéter de Seldinger para punción arterial 20 G; Vygon.
- Equipo para catéter venoso central de poliuretano de dos lúmenes (14 y 18 G), percutáneo, heparinizado; Abbott Laboratories.

1.2.2. Medicación

- Diazepam 10 mg (Valium 10®, Roche).
- Atropina 1 mg (Atropina®, Braun).
- Clorhidrato de ketamina (Ketolar®, Parke-Davis).
- Tiopental sódico 0,5 g (Pentotal sódico®, Abbott).
- Cefazolina 1g (Kurgan®, Laboratorios Normón).

- Rifampicina 2g (Rifaldin[®], Hoechst Marion Roussel)
- Cloruro de fentanilo 0,15 mg (Fentanest[®], Kern Pharma).
- Cloruro de Mivacurio 10 mg (Mivacron[®], Wellcome Farmaceútica).
- Heparina sódica 1% (Heparina Leo 1 %, BYK Leo).
- Bicarbonato sódico 8,4% (Venofusín[®], Fresenius Kabi).
- Metamizol magnésico 2 g (Nolotil[®], Europharma).
- Povidona yodada (Betadine[®], Asta Médica).

1.2.3. Animal de experimentación

- Minicerdos macho de 16 – 22 Kg.

1.2.4. Material para el desarrollo de los estudios planteados

- Sistema de purificación de agua, pHmetro y agitador magnético con calefacción.
- Balanzas analíticas y de precisión.
- Baño termostático con agitación.
- Generador de ultrasonidos.
- Centrífuga de alta velocidad y ultracentrífuga.
- Congeladores de -40°C y -80°C.
- Microtomo.
- Triturador y homogeneizador de tejidos.

- Microscopio óptico.
- Espectrofotómetros visible/UV, doble haz.
- Lector de placas para técnica de ELISA.
- Analizador para pruebas de función renal.

1.3. ANÁLISIS Y PRESENTACIÓN DE LOS RESULTADOS

1.3.1. Ordenador

- PC Centrino, 1,8 GH; 1.024 MB RAM; 80 GB disco duro.
- PC Pentium 4, 3 GH; 1 GB RAM; 320 GB disco duro.

1.3.2. Tarjeta gráfica

- ATI RADEON 7000.
- ATI RADEON 8200.

1.3.3. Monitor

- Airis, LCD monitor 15", TFT.
- Sony,

1.3.4. Impresora

- Hp deskjet 6122.
- Minolta Magicolor 2200.

1.3.5. Escaner

- Epson Perfection 1660 Photo.

1.3.6. Internet

Búsquedas bibliográficas utilizando las bases de datos Medline[®], MLA Bibliography[®], PsyLIT Journal Articles[®] CC Search[®] All 7 CC Editions[®], U.S. National Library of Medicine[®].

1.3.8. Software

- Microsoft Office XP[®] para Windows XP[®].
- Microsoft Word[®]
- Microsoft Power Point[®].
- Microsoft Excel[®].
- Microsoft Access[®].
- Programa de estadística NCSS 2000.

2.- MÉTODOS

2.1. ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN

Se utilizaron 15 minicerdos machos de peso comprendido entre 16-22 Kg. Estos animales cumplen todos los requisitos científicos internacionales para ser utilizados en la experimentación biomédica así como el laboratorio proveedor, el de mantenimiento y donde se realizaron los experimentos.

El pedido de los animales que se preveía utilizar durante siete días consecutivos de trabajo, se realizaba dos semanas antes de su utilización, para conseguir su adaptación al nuevo medio y evitar así un estrés excesivo. Durante este tiempo (catorce días) estuvieron estabulados en el Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca que cuenta con:

- Sistema de luz con temporizador que proporciona un ritmo de 12 horas de luz – 12 horas de oscuridad.
- Temperatura constante de 21° C.
- Zonas adecuadas de estabulación con control de la ingesta de agua y alimentos.

Doce horas antes del estudio los minicerdos fueron sometidos a dieta manteniéndolos solamente con agua *ad libitum*.

Tanto el material como los métodos experimentales empleados con animales de laboratorio que se detallan a continuación, se han regido siguiendo las recomendaciones recogidas en las siguientes disposiciones legales:

- a) Directiva del Consejo de Europa 86/609/CEE relativa a la protección de los animales de laboratorio utilizados para la experimentación y otros fines científicos. Diario Oficial de las Comunidades Europeas, N° L 358/1-358/6 del 18 de Diciembre de 1986.

- b) Real Decreto 223/1988 del 14 de Marzo, sobre protección de animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. BOE n° 67, pp 8509-8512 del 18 de Marzo de 1988.

- c) Disposición general n° 25805. Instrumento de ratificación del Convenio Europeo sobre protección de los animales vertebrados utilizados con fines experimentales y otros fines científicos, hecho en Estrasburgo el 18 de Marzo de 1986. BOE 256 pp 31349-31362, del 25 de Octubre de 1990. Esta ratificación entró en vigor en España el 1 de Enero de 1991.

2.2. TÉCNICA ANESTÉSICA

Los animales fueron premedicados con una inyección intramuscular que contenía clorhidrato de ketamina a una dosis de 20 mg/Kg asociada a diazepam a una dosis de 0,5 mg/Kg y asociada a atropina a una dosis de 0,05 mg/Kg. Tras la premedicación se procedió a canalizar una vena del dorso de la oreja con un catéter venoso 20 G por el cual se realizó la inducción anestésica.

Tanto la inducción anestésica como el mantenimiento de la misma fueron realizadas en iguales condiciones que en humanos. Como agentes inductores se emplearon, según los diferentes grupos de estudio, propofol a una dosis de 1,5 mg/Kg i.v. o tiopental sódico a una dosis de 3 mg/Kg i.v.; los cuales se administraron de forma progresiva hasta alcanzar la hipnosis del animal sin llegar a provocar apnea.

Los animales fueron colocados en una mesa de fijación donde se les monitorizó el electrocardiograma y frecuencia cardíaca y se procedió a realizar una laringoscopia directa e intubación orotraqueal, con ayuda de pinzas de Magill, con un tubo orotraqueal de baja presión del número 5. Posteriormente se conectó al catéter de la oreja un suero ringer lactato de mantenimiento y se administró cloruro de mivacurio a una dosis de 0,2 mg/Kg i.v. tras lo cual se procedió a conectar a los animales a ventilación mecánica (estación de anestesia Boyle 2000) con los siguientes parámetros: volumen corriente de 10 ml/Kg, frecuencia respiratoria de 15

respiraciones/minuto, relación inspiración/expiración 1:2 y una mezcla de oxígeno/aire al 50%. Tras la inducción anestésica se administró 1 g de cefazolina i.v. Para el mantenimiento anestésico se empleó propofol a una dosis de 3-6 mg/Kg/h i.v. o sevoflurano al 1-2% de concentración inspiratoria, según los grupos de estudio; cloruro de fentanilo a una dosis de 2 µg/Kg/h i.v. y cloruro de mivacurio a una dosis de 1mg/Kg/h i.v.

A continuación se procede a canalizar, por disección cervical, la vena yugular interna con un catéter de poliuretano de dos lúmenes por el cual se administraron fluidos (suero fisiológico y/o ringer lactato 10 ml/Kg/h) así como también diferentes fármacos; y así mismo se canalizó por disección cervical la arteria carótida con un catéter arterial 20 G para la monitorización de la presión arterial cruenta y para la extracción de muestras sanguíneas. La monitorización hemodinámica consistió en electrocardiograma continuo, frecuencia cardíaca y presión arterial cruenta y la ventilatoria en volumen corriente, frecuencia respiratoria, volumen minuto, relación inspiración/expiración y presión pico de las vías aéreas. Previamente al clampaje aórtico se administró una dosis de 1 mg/Kg i.v. de heparina sódica y tras el desclampaje se infundió bicarbonato sódico 1 M a una dosis de 1 mE/Kg i.v.

La reversión de la anestesia se obtuvo suprimiendo la infusión de propofol o el aporte de sevoflurano, según los grupos, y cuando el animal recobró la respiración espontánea, fue extubado y trasladado al lugar de estabulación. Como analgesia postoperatoria se administraron 1,2g i.v. de metamizol magnésico.

2.3. TÉCNICA QUIRÚRGICA

Asepsia y antisepsia del animal de experimentación: rasurado, pincelado con povidona yodada (Betadine®) y colocación de paños estériles.

Laparotomía media. Hemostasia de la pared. Disección del retroperitoneo para exponer la aorta abdominal desde las arterias renales hasta la trifurcación aórtica. Previo al clampaje aórtico se administra heparina sódica endovenosa (1 mg/Kg). Clampaje de la aorta suprarrenal (por debajo de la arteria mesentérica superior) y aorta distal (previa a la salida de las arterias iliacas). Clampaje de la arteria mesentérica inferior y de todas las arterias lumbares. En caso de prolongarse el clampaje aórtico superior más de los 30 minutos, se modificará éste a una posición infrarrenal. El resto se mantendrá hasta finalizar la cirugía.

Se practicaron dos aortotomías de 1 cm de longitud. Anastomosis proximal latero-terminal y distal término-lateral con prolene de 5/0 de una prótesis de dacrón colágena de 6 mm de diámetro (sumergida previamente -15 minutos- en una solución de Rifampicina). Desclampaje secuencial. Hemostasia. Cierre de la laparotomía.

La técnica quirúrgica fue igual a la empleada en humanos excepto por las diferencias anatómicas.

En los grupos hemorragia tras la inducción anestésica, canalización de la vena yugular interna y arteria carótida; y previamente a la laparotomía (y clamplaje), se realiza una sangría controlada del 40% de la volemia del animal durante 15 minutos. La sangre es recolectada y mantenida a temperatura ambiente en una bolsa de autotransferencia de productos hemáticos con anticoagulante CAPD para la posterior reinfusión al final de la cirugía. Para mantener la volemia se realizó una reposición con cristaloides (suero fisiológico, en la proporción 3/1) y coloides (poligelina, en la proporción 1/1).

Durante la intervención se realizarán diferentes tomas de muestras (sangre periférica, biopsias renales) en diferentes momentos de la cirugía.

Estabulación de los animales en habitáculos específicos.

2.4. GRUPOS EXPERIMENTALES DE TRABAJO

Los animales de experimentación fueron distribuidos en 3 grupos de 5 animales por grupo:

1) Simulado (Sim): laparotomía. Disección aórtica. Antibiótico y heparina. Cierre de laparotomía.

2) Control (Control+H): Grupo simulado más: Clampaje, prótesis aorto-aortica y hemorragia controlada preclampaje. Al finalizar la sangría se realiza un reemplazamiento con cristaloides y coloides, y antes de finalizar la intervención se repone al animal su propia sangre recoleccionada.

3) No+Hem: Grupo control más Molsidomina

2.5. VARIABLES ESTUDIADAS Y TÉCNICAS DE DETERMINACIÓN

2.5.1. Citocinas en suero

Para la determinación de TNF- α , interleucinas (1 β , 6 y 10) e INF- γ se obtuvieron muestras sanguíneas en seis momentos (clampaje y postclampaje a los 15 minutos, 24, 48, 72 horas y 7° día).

Factor de necrosis tumoral (TNF- α): Para la determinación del TNF- α utilizamos un kit comercial (DuoSet ELISA Development System rat TNF- α /TNFSF1A, R&D SYSTEMS) basado en la técnica de ELISA específico para rata.

Obtención de las muestras: Se utilizaron muestras sanguíneas (N=5 por grupo) no hemolizadas. Inmediatamente después de su extracción, fueron centrifugadas extraído el suero, dividido en alícuotas y congeladas a -80°C. Y muestras renales las cuales fueron sometidas a un proceso de homogenización y sonicación y posteriormente ultracentrifugadas a 100.000 g utilizando el sobrenadante alicuotado y congelado a -80°C para su posterior análisis.

Principios del ensayo: Es un kit ELISA que emplea múltiples anticuerpos con el principio de "sándwich". En primer lugar se utilizó un plato con 96 pocillos con un anticuerpo monoclonal anti-TNF- α adherido en cada uno de ellos para capturar el TNF- α presente en las muestras y estándares que se añadieron por duplicado en cada uno de los pocillos

junto con los blancos correspondientes. Después de lavar el plato para eliminar el material no adherido se añadió una peroxidasa conjugada policlonal anti-TNF- α . A continuación el plato fue lavado de nuevo para eliminar el material no adherido y se agregó la solución sustrato que inició la catalización de la peroxidasa. El cambio de color se detuvo por acidificación.

La absorbancia fue medida a 450 nm, siendo los resultados obtenidos proporcionales a las cantidades de TNF- α de las muestras, las cuales fueron calculadas por interpolación con la curva estándar.

Interleucina-1 β (IL-1 β): Para la determinación de la IL-1 se utilizó un kit comercial (DuoSet ELISA Development System rat IL-1 β /IL-1F2, R&D SYSTEMS) basado en la técnica de ELISA específico para rata. La técnica y los medios para efectuar este estudio son los mismos que los descritos para el TNF- α .

Interferón- γ (INF- γ): Para la determinación de la INF- γ se utilizó un kit comercial (DuoSet ELISA Development System rat IFN- γ , R&D SYSTEMS) basado en la técnica de ELISA específico para rata. La técnica y los medios para efectuar este estudio son los mismos que los descritos para el TNF- α .

Interleucina-6 (IL-6): Para la determinación de la IL-6 se utilizó un kit comercial (DuoSet ELISA Development System rat IL-6, R&D SYSTEMS) basado en la técnica de ELISA específico para rata. La técnica y los medios para efectuar este estudio son los mismos que los descritos para el TNF- α .

Interleucina-10 (IL-10): Para la determinación de la IL-10 se utilizó un kit comercial (DuoSet ELISA Development System rat IL-10, R&D

SYSTEMS) basado en la técnica de ELISA específico para rata. La técnica y los medios para efectuar este estudio son los mismos que los descritos para el TNF- α .

2.5.2. Infiltración neutrofílica en el tejido renal

La presencia de mieloperoxidasa, una enzima específica de los neutrófilos utilizada como índice para valorar la infiltración neutrofílica en el riñón, fue analizada en las muestras renales (N=5 por grupo) mediante el método de Bradley modificado por Mullane. Una vez obtenidas las muestras son pesadas entre hielo y congeladas en nitrógeno líquido siendo posteriormente almacenadas a -80° C hasta su determinación. Posteriormente las muestras son homogeneizadas en una solución compuesta por un tampón de fosfato potásico 50 mM con 0,5% de hexadecyltrimethylammonium bromide y 0,146% de EDTA a un pH de 6,0 y en la proporción de un gramo de tejido por 10 ml de solución de homogeneizado. A continuación son homogeneizadas y sometidas a un proceso de sonicación entre hielo 10 veces y cinco segundos cada vez, para de esta forma romper las células, entre ellas los neutrófilos y dejar la mieloperoxidasa libre en la solución. Este homogeneizado es centrifugado durante 30 minutos a 15.000 g manteniendo la temperatura en el interior de la centrifuga entre 3 y 4° C. El sobrenadante fue decantado e incubado durante 2 horas a 50° C para eliminar otro tipo de peroxidasas y otros

compuestos que interfiriesen en la determinación de la mieloperoxidasa. Se prepara el tampón para el ensayo compuesto por tampón de fosfato potásico 50 mM con 0,167 mg/ml de O-dianisidine dihydrochloride y 0,005% de peróxido de hidrógeno a un pH de 6,0. Contra un blanco con el tampón de ensayo se realizó la curva estándar con cantidades conocidas de MPO a 460 nm de longitud de onda y a 25° C. Se define la unidad (U) de actividad de la mieloperoxidasa a la cantidad de enzima que degrada 1 μ mol de H₂O₂ / minuto a 25° C. Las muestras renales fueron obtenidas mediante biopsia directa o percutánea.

2.5.3. Radicales libres del oxígeno en tejido renal

Procesamiento de las muestras: Una vez tomadas las muestras renales (N=5 por grupo), son introducidas, para su lavado, en el tampón de homogeneizado [fosfato potásico monobásico 0,05M y EDTA 1mM, solución a la que añadimos colato sódico al 0,25% (1+19); pH 7,8], a una temperatura entre 0 y 4° C para minimizar los procesos oxidativos. Posteriormente son pesadas y homogeneizadas con el tampón anteriormente descrito, según la proporción (1/10, Peso/Volumen). El homogeneizado se centrifugó a 100.000 g durante 60 minutos, a una temperatura de 4°C en una ultracentrífuga (SORVAL-OTD-COMBI). La fracción soluble que se obtuvo se dividió en alícuotas y se congeló a -80° C hasta el momento de su estudio.

Técnica de determinación del ritmo de producción del Anión Superóxido. La técnica que es modificación de la descrita por Boveris y Forman para mitocondrias, se basa en la reducción del citocromo C por el radical O_2^- . Esta reducción del citocromo C no es, naturalmente, específica para el radical superóxido. Esta especificidad es conferida por el uso de superóxido dismutasa (SOD), para lo cual el radical superóxido es el único sustrato conocido. De acuerdo con esto, el ensayo se realiza con y sin SOD, y únicamente la reducción del citocromo C inhibida por SOD se usa para calcular la producción de ASO. Esta reducción del citocromo C se sigue espectrofotométricamente a 550 nm de λ . Precisamos los siguientes reactivos:

1. Tampón fosfato-potásico 0,1 M+0,1 mM EDTA ; pH 7,8.
2. Citocromo C 75 μ M.
3. SOD (aproximadamente 240 U).

La lectura espectrofotométrica se realizó a 550 nm de λ ; pH 7,8 y temperatura de 25° C durante 1 minuto con intervalos cada 6 seg., en cubetas de 1 ml, con un paso de luz de 1 cm. Nuestros resultados se expresaron en nmol de O_2^- / mg prot. / min. El incremento de unidades de absorbancia en la mezcla de la reacción se convierte en nmol de ASO con el coeficiente de extinción molar: $\Delta E_{550} / 21,0 \times 10^3 \text{ M-l cm}^{-1}$.

Esta conversión depende del supuesto de que el citocromo C en la cubeta de referencia está totalmente oxidado y, por tanto, de que el incremento de absorbancia observada representa únicamente la absorbancia del producto reducido (Δ absorbancia: reducido - oxidado).

Tras el establecimiento de las condiciones óptimas, exponemos a continuación el esquema de desarrollo del experimento. En la cubeta de referencia se añadieron 100 μl de citocromo C (75 μM), 20 μl de SOD (aproximadamente 264 U) y 25 μl de muestra. La diferencia de volumen hasta 1.000 μl se completó con tampón fosfato potásico + EDTA. En la cubeta de referencia se sustituyó el volumen de tejido por uno equivalente de tampón. Se registró la lectura a 550 nm de λ en 2 fases:

1°. Reducción del citocromo C inespecífica: sin SOD.

2°. Reducción del citocromo C independiente del superóxido: con SOD.

La pendiente máxima se registró en el primer minuto. La temperatura fue de 25° C y pH de 7,8. Todas ellas han sido referidas ampliamente en nuestras publicaciones previas (73,74 ,75,137,138,140,141,142).

2.5.4. Nitritos en suero

Se obtuvieron muestras sanguíneas en seis momentos. Para su determinación se utilizó un método indirecto, cuantitativo y colorimétrico basada en la reacción de Griess. Utilizando muestras de suero se separaron 500 μl de sobrenadante de cada pocillo y se mezclaron con 250 μl de reactivo de Griess (sulfametacina 1% y dihidrocloruro de naftil-etilendiamida 0.1% en ácido ortofosfórico al 2.5%) (Sigma Aldrich). Tras 15 minutos de incubación a temperatura ambiente, se midió la absorbancia en

un espectrofotómetro a 560 nm. La concentración de nitritos se calculó interpolando en una recta patrón las concentraciones crecientes de nitrato sódico.

2.5.5. Determinación de la iNOS.

Solo se determinó a las 72 h.

La muestra obtenida mediante punción percutánea se congeló instantáneamente introduciéndola en nitrógeno líquido, conservándola a continuación en el interior de tubos cerrados (-80° C).

Posteriormente, el tejido congelado se troceó y se le añadió, a una temperatura de 4° C, 3 ml de tampón de lisis por gramo de tejido (NaCl 140 mM, EDTA 15 mM, glicerol 10%, Tris base 20 mM, pH 8; a este tampón se le añadieron dos inhibidores de proteasas: PMSF 2 mM e inhibidor de tripsina 50 µg/mL).

Se homogeneizó a 4° C y los restos del lisado se recogieron en un Eppendorf, pasándolos con una jeringa a través de una aguja de 21.

Las muestras se mantuvieron entre 30-60 minutos en hielo y se centrifugaron a 4° C y 15.000 g durante 20 minutos (centrífuga Mikro 12-24, Hettich, Alemania).

El sobrenadante se conservó a -20° C en alícuotas, para la determinación de la cantidad de proteínas por el método de Bradford y para la realización del Western blot.

Fueron usados anticuerpos primarios y secundarios (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California). Tras digitalizar la autorradiografía, procedemos a la lectura de las densidades ópticas.

2.5.6. Moléculas de adhesión celular solubles (sICAM-1 y sVCAM-1) y en tejido renal (ICAM-1, VCAM-1, y PECAM-1).

Las muestras de suero o tejidos se congelaron instantáneamente introduciéndola en nitrógeno líquido, conservándola a continuación en el interior de tubos cerrados (-80° C).

Posteriormente, en caso del tejido congelado se troceó y se le añadió, a una temperatura de 4° C, 3 ml de tampón de lisis por gramo de tejido (ClNa 140 mM, EDTA 15 mM, glicerol 10%, Tris base 20 mM, pH 8; a este tampón se le añadieron dos inhibidores de proteasas: PMSF 2 mM e inhibidor de tripsina 50 µg/mL).

Se homogeneizó a 4° C y los restos del lisado se recogieron en un Eppendorf, pasándolos con una jeringa a través de una aguja de 21.

Las muestras se mantuvieron entre 30-60 minutos en hielo y se centrifugaron a 4° C y 15.000 g durante 20 minutos (centrífuga Mikro 12-24, Hettich, Alemania).

El sobrenadante se conservó a -20° C en alicuotas, para la determinación de la cantidad de proteínas por el método de Bradford y para la realización del Western blot.

Las muestras de suero fueron tratadas de forma similar.

Para la cuantificación de las proteínas tisulares, las muestras diluídas (1:100) en agua destilada se pusieron en contacto con el reactivo de Bradford (1:50) (azul de Coomassie G-250 0.1%, etanol 4.75%, ácido ortofosfórico 0.085%), y tras agitación fuerte para mezclar todos los componentes, se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos.

La lectura de la densidad óptica se efectuó a 595 nm por espectrofotometría (Espectronic 301, Milton Roy, USA).

Cada una de las medidas se realizó por triplicado.

Se elaboró previamente una curva de calibrado a partir de soluciones patrón de concentración conocida de BSA (Fraction V Sigma).

La separación de las proteínas contenidas en los lisados de tejido se llevó a cabo mediante electroforesis. El gel de 1.5 mm de espesor estaba constituido por un gel de carga al 5% de una mezcla de acrilamida (acrilamida 29.2%, bis-acrilamida 0.8%) y un gel de separación de la misma mezcla al 8%.

A cada muestra se le añadió un volumen igual de tampón de carga (2-mercapto-etanol 10%, SDS 4%, azul de bromofenol 0.05%, glicerol 20%, Tris base 125 mM, pH 6.8), y junto con el marcador (kaleidoscope prestained standards Bio-Rad), se calentaron durante 5 minutos a una temperatura de 95° C en un baño seco (Thermolyne Type 17600 Dri-Bath, Barnstead, USA).

Se cargaron las proteínas (30-100 µg/pocillo) en los pocillos, y en aquéllos en los que no había muestra, se depositó una pequeña cantidad

de tampón de carga, rellenando el espacio restante de todos los pocillos con tampón de electroforesis (glicina 192 mM, SDS 0.1%, Tris base 25 mM, pH 8.3).

La electroforesis se llevó a cabo en una cubeta (Mini-Protean® II Cell, Bio-Rad, España) con tampón de electroforesis a un voltaje constante de 100 V (fuente de alimentación: Model 1000/500 Power Supply, Bio-Rad, USA).

La transferencia se realizó en una cubeta con solución de transferencia (glicina 190 mM, Tris base 20 mM, metanol 20%, SDS 0.1%, pH 7.5), a una corriente constante de 450 mA, habiendo embebido previamente el material (papeles secantes y esponjas) y equilibrado el gel y la membrana de nitrocelulosa (Trans-Blot® Transfer Medium 0.45 µm, Bio-Rad) en tampón de transferencia durante 15 minutos.

La membrana se lavó 3 veces, durante 5 minutos cada vez, con TBS (ClNa 500 mM, Tris base 20 mM, pH 7.5) y se dejó durante 24 h a 4° C en solución de bloqueo (leche en polvo Sveltesse Nestlé 8% en TBS), para evitar las uniones no específicas.

Tras el bloqueo, se lavó 3 veces la membrana durante 5 minutos con TTBS (Tween 20, 0.1% en TBS) y se incubó durante 1 hora en agitación constante con el anticuerpo primario de la molécula de adhesión correspondiente (Santa Cruz Biotechnology), dilución 1:1000 (BSA 0.2% en TTBS).

Después de lavar 4 veces la membrana 5 minutos con TTBS, se incubó durante 30 minutos con el anticuerpo secundario (Anti-goat IgG-

HRP, mouse/human adsorbed, 200 µg/0.5 mL. Santa Cruz Biotechnology), dilución 1:2000 (BSA 0.2% en TTBS).

Se hicieron 4 lavados de 5 minutos con TTBS y se procedió al revelado utilizando una solución de reactivos estándar ECL (Amersham Pharmacia Biotech) y peróxido de hidrógeno, que se pusieron en contacto con la membrana durante 1 minuto.

Inmediatamente, y bajo las condiciones adecuadas de iluminación, se impresionó la membrana en una autorradiografía (película de rayos X, Fuji Foto Film) y se introdujo en la máquina de revelado (M35 X-OMAT Processor Kodak, España). Tras digitalizar la autorradiografía, se procedió a la lectura de densidades ópticas.

2.5.7. Factor nuclear kB

Las muestras de suero o tejidos se congelaron instantáneamente introduciéndola en nitrógeno líquido, conservándola a continuación en el interior de tubos cerrados (-80° C).

Posteriormente, en caso del tejido congelado se troceó y se le añadió, a una temperatura de 4° C, 3 ml de tampón de lisis por gramo de tejido (ClNa 140 mM, EDTA 15 mM, glicerol 10%, Tris base 20 mM, pH 8; a este tampón se le añadieron dos inhibidores de proteasas: PMSF 2 mM e inhibidor de tripsina 50 µg/mL).

Se homogeneizó a 4° C y los restos del lisado se recogieron en un Eppendorf, pasándolos con una jeringa a través de una aguja de 21.

Las muestras se mantuvieron entre 30-60 minutos en hielo y se centrifugaron a 4° C y 15.000 g durante 20 minutos (centrífuga Mikro 12-24, Hettich, Alemania).

El sobrenadante se conservó a -20° C en alicuotas, para la determinación de la cantidad de proteínas por el método de Bradford y para la realización del Western blot. (Electrophoresis Mobility Shift Assay-EMSA) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California).

Se utilizaron anticuerpos primarios para la subunidad NF κ B P65.

Tras digitalizar la autorradiografía, se procedió a la lectura de densidades ópticas.

2.6. TIEMPO DE LA MUESTRAS

Para realizar las referidas determinaciones, se obtuvieron muestras sanguíneas y renales (mediante biopsias a cielo abierto o técnica percutánea) en los siguientes momentos: isquemia, a los 15 minutos de la reperusión, a las 24, 48, 72 h y al séptimo día.

Únicamente, por problemas de elevado coste, no se realizaron con esa secuencia: iNOS (72 h), las MAC investigadas (24 h, 48 h, 7º día) y NFkB (48 h).

2.7. ESTUDIOS ESTADÍSTICOS

Todos los valores de este trabajo han sido representados como $X \pm \text{SEM}$ (media \pm error estándar de la media).

Los resultados obtenidos fueron analizados con los test estadísticos de: Test exacto de Fisher, Test de Mann-Whitney U y ANOVA de una y dos vías (Test de Scheffe o Kruskal Wallis). Un valor de $p < 0.05$ se aceptó como resultado significativo.

IV RESULTADOS

1.- ESTUDIO DE LA FUNCIÓN RENAL

Para el estudio de la función renal se determinaron dos parámetros: creatinina y ácido úrico plasmáticos, según la técnica descrita en el apartado “materiales y método”. Los resultados se presentan en las siguientes tablas (Tablas VI y VII):

Tabla VI: Creatinina plasmática

	Sim	Control+H	NO+Hem
Isq	1,1 ± 0,1	3,9 ± 0,4	1,7 ± 0,3
Rep	1,1 ± 0,1	4,7 ± 0,5	1,8 ± 0,2
24 h	0,9 ± 0,1	5,3 ± 0,6	1,9 ± 0,2
48 h	1 ± 0,1	5 ± 0,4	1,3 ± 0,1
72 h	1,2 ± 0,12	3,6 ± 0,3	1 ± 0,1
7 días	0,9 ± 0,1	1,5 ± 0,3	1,1 ± 0,1

Tabla VII: Ácido Úrico plasmático

	Sim	Control+H	NO+Hem
Isq	5,1 ± 0,7	11,2 ± 3,3	5,9 ± 1,4
Rep	5,8 ± 0,7	31,4 ± 12,4	12,2 ± 2,7
24 h	5,6 ± 1	36,2 ± 13,7	12,9 ± 3
48 h	5,9 ± 0,6	32,2 ± 9,9	14,1 ± 3,6
72 h	4,8 ± 0,6	15,3 ± 6,2	8,4 ± 2,8
7 días	5,1 ± 0,4	11,2 ± 4,1	5,9 ± 1,7

Como puede apreciarse por las Tablas VI y VII, el estudio de la función renal demostró una seria alteración en el grupo Control (Control+H), en todas las muestras respecto al grupo simulado (Sim).

El grupo Molsidomina (NO+Hem) únicamente mostró cifras significativamente más altas que el grupo simulado en la muestra recogida a las 24 horas ($p < 0,05$), no encontrándose diferencias significativas en el resto.

La comparación entre los grupos Control (Control+H) y Molsidomina (NO+Hem) mostraba importantes diferencias: Los niveles de creatinina y Ac. Úrico eran significativamente más bajos ($p < 0,01$) en el grupo Molsidomina, respecto a los del grupo Control (Isquemia, a los 15 min de la repercusión, 24, 48 y 72 horas. La única excepción la constituyeron las muestras recogidas a los 7 días, en que las diferencias no fueron significativas, tal como se refleja en los gráficos I y II.

Gráfico I: Creatinina plasmática

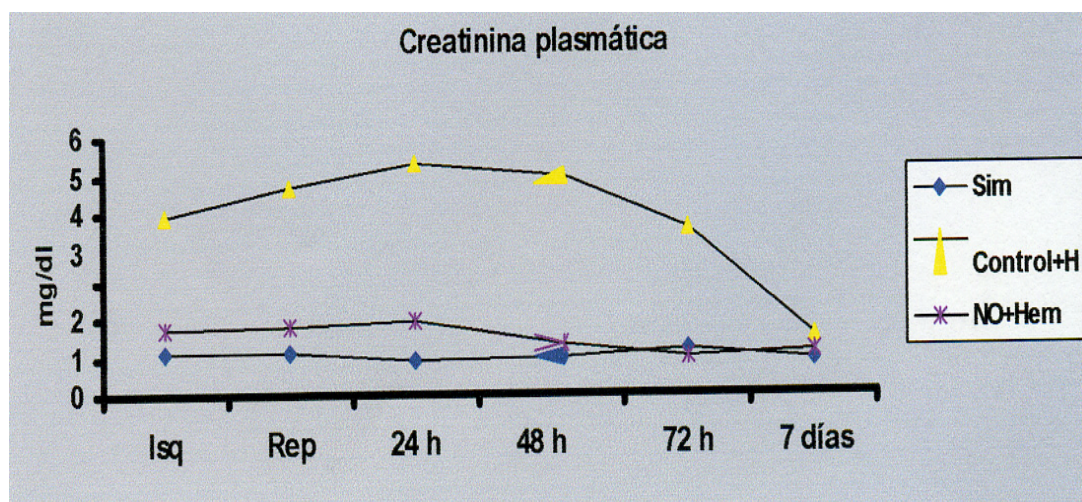
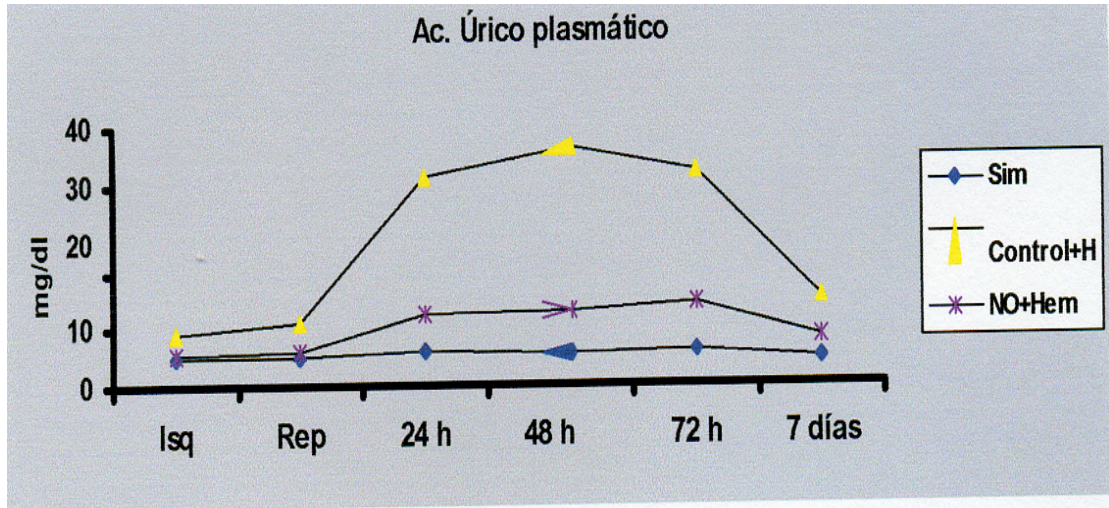


Gráfico II: Ac. Úrico plasmático



2.- ESTUDIO DE LA INFILTRACIÓN NEUTROFÍLICA: MIELOPEROXIDASA

La determinación de Mieloperoxidasa (MPO) en hígado, nos informa sobre la infiltración neutrofílica. Los resultados obtenidos se expresan en la tablas VIII, que se expone a continuación.

Tabla VIII: MPO en Riñón

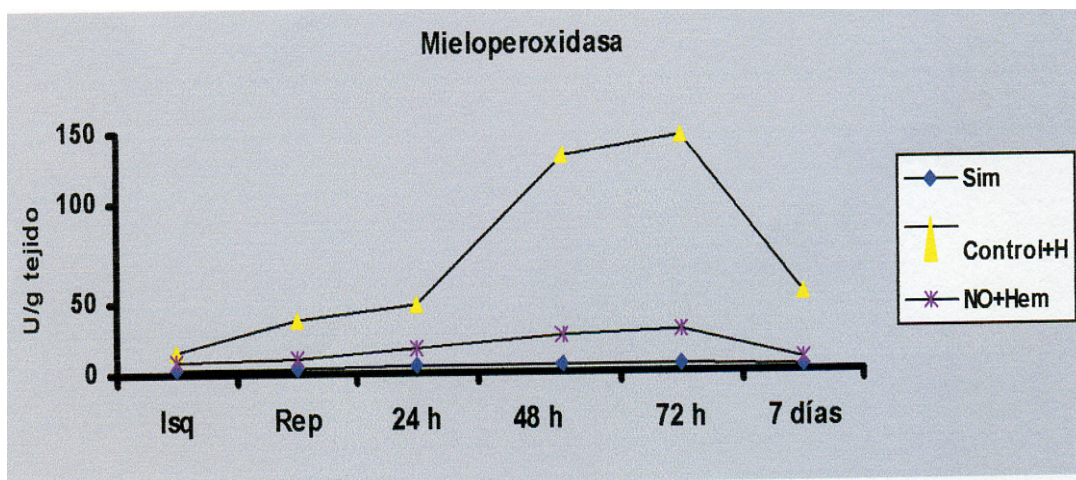
	Sim	Control+H	NO+Hem
Isq	3,5 ± 0,4	16,1 ± 2,7	8 ± 3,3
Rep	3,5 ± 0,4	37,2 ± 6,1	10,9 ± 4,7
24 h	4,8 ± 0,4	48,6 ± 10,7	17,3 ± 6,8
48 h	5,7 ± 0,5	132,2 ± 35,9	26 ± 10,2
72 h	5,5 ± 0,4	147 ± 41,3	29,8 ± 14,3
7 días	4 ± 0,3	55,6 ± 11,4	7,8 ± 5,8

Los valores de MPO del grupo Control (Control+H), son significativamente más altos que los del grupo simulado, en todas las muestras recogidas. ($p < 0,001$).

También se encuentran elevados los valores del grupo Molsidomina (NO+Hem) recogidos a las 24, 48 y 72 horas respecto del grupo simulado ($p < 0,05$), manteniéndose en valores prácticamente normales en el resto de las muestras renales.

La comparación entre los grupos Control (NO+H) y tratamiento (NO+H), muestra una reducción significativa de los valores de MPO en todas las muestras renales (Gráfico III).

Gráfico III: MPO en riñón



$p < 0,05$ a los 7 días y $p < 0,01$ en el resto de las muestras.

3.- RADICALES LIBRES DE OXIGENO

3.1. SUPERÓXIDO DISMUTASA (SOD)

Valoramos los niveles de la enzima SOD a nivel renal, y los resultados obtenidos se exponen en la Tabla IX.

Tabla IX: SOD en Riñón

	Sim	Control+H	NO+Hem
Isq	54,7 ± 12,3	117,8 ± 33,6	68,4 ± 17,6
Rep	54,7 ± 12,3	136,6 ± 41,1	76,3 ± 23,8
24 h	78,1 ± 10,9	294,3 ± 53,7	125,9 ± 28,2
48 h	75,3 ± 14,7	244,8 ± 47,3	137,2 ± 31,1
72 h	100,2 ± 28,5	190,2 ± 44,1	114,36 ± 25,6
7 días	70 ± 18,2	141,5 ± 39,3	75,8 ± 24,4

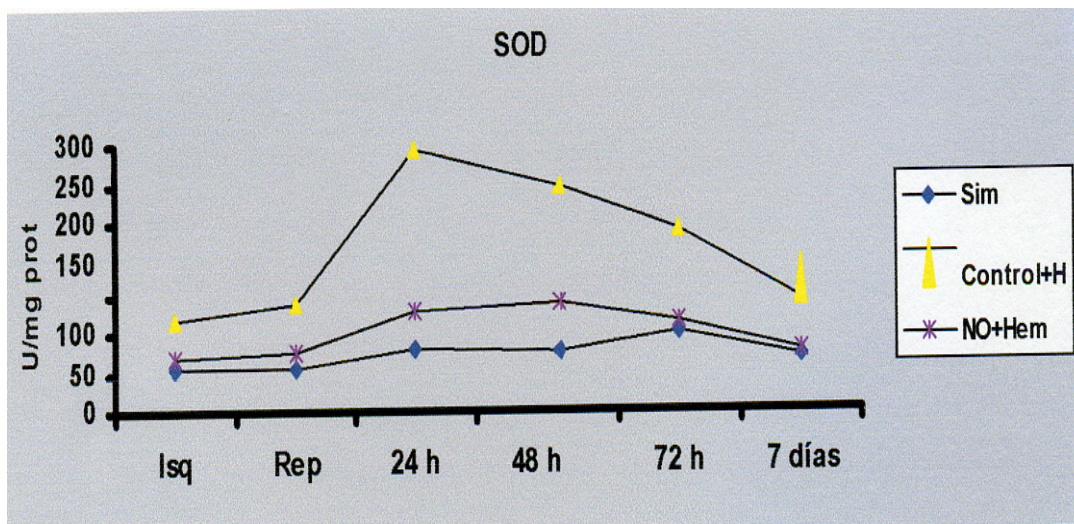
En estos resultados se aprecia un incremento significativo ($p < 0,001$), en los valores de SPD en el grupo Control (Control+H) respecto al grupo simulado en todas las muestras.

En el grupo tratamiento (NO+Hem); los valores se encuentran mucho más normalizados, no apreciándose aumentos significativos respecto al

grupo simulado (Sim), más que en dos muestras hepáticas: Las recogidas a las 24 y 48 horas ($p < 0,05$).

Comparando el grupo Control (Control+H), con el grupo Molsidomina (NO+Hem), vemos que el grupo tratado con donadores de óxido nítrico, consigue una reducción significativa de los valores en todas las muestras (Gráfico IV).

Gráfico IV: SOD en Riñón



$P < 0,01$ a los 7 días y $p < 0,001$ en el resto

3.2. ANIÓN SUPERÓXIDO (ASO)

Determinamos el Anión Superóxido ASO en tejidos renal según la técnica expuesta en el apartado “Material y Métodos”. Los resultados obtenidos se exponen en la tabla X.

En el grupo Control (Control+H), se encuentran valores mucho más elevados en todas las muestras, respecto al grupo Simulado (Sim), siendo estas diferencias estadísticamente significativas. ($p < 0,001$).

Tabla X: Anión Superóxido en Riñón

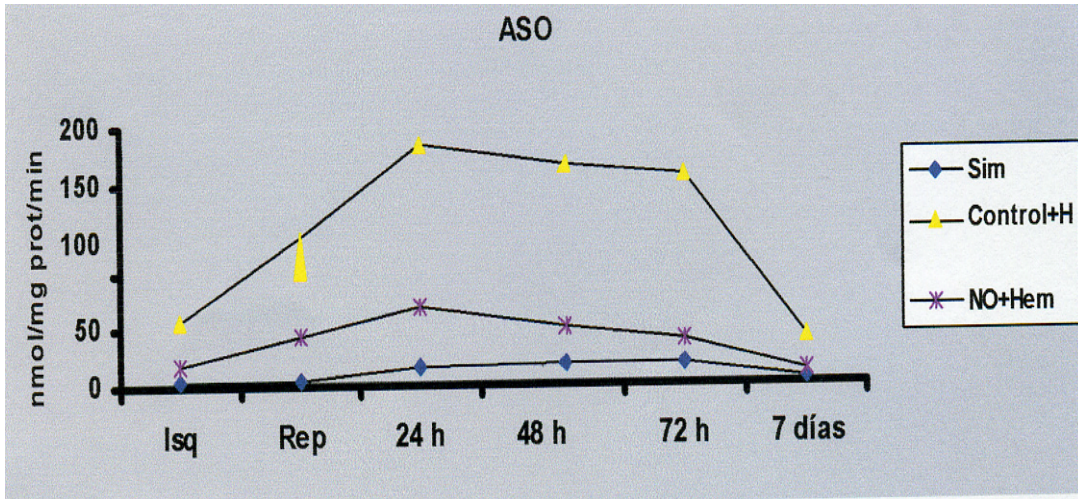
	Sim	Control+H	NO+Hem
Isq	4,9 ± 0,5	56,4 ± 8,8	17,4 ± 6,1
Rep	4,9 ± 0,5	101,8 ± 20,1	43,3 ± 9,7
24 h	16,8 ± 2	184,9 ± 34,7	68,9 ± 10,3
48 h	17,3 ± 2,9	165,2 ± 29,8	50,2 ± 7,4
72 h	19,1 ± 2,2	156,7 ± 30,5	39,6 ± 5,5
7 días	5,2 ± 0,4	42,2 ± 17,2	12 ± 3

El grupo Molsidomina (NO+Hem) también presentó cifras superiores a las del grupo simulado ($p < 0,05$).

Sin embargo si comparamos las cifras del grupo tratamiento (NO+Hem), con el grupo control (Control+H), sí podemos apreciar una disminución significativa en los valores de este radical libre. A los 7 días en la muestra renal $p < 0,01$ y en el resto de las muestras renales $p < 0,001$.

La variación en los niveles de Anión superóxido en cada grupo, se aprecia en el Gráfico V.

Gráfico V : Anión superóxido en riñón



4.- ESTUDIO DEL ÓXIDO NÍTRICO

4.1. NITRITOS EN SUERO

Los resultados obtenidos se exponen en la Tabla XI.

Tabla XI: Nitritos

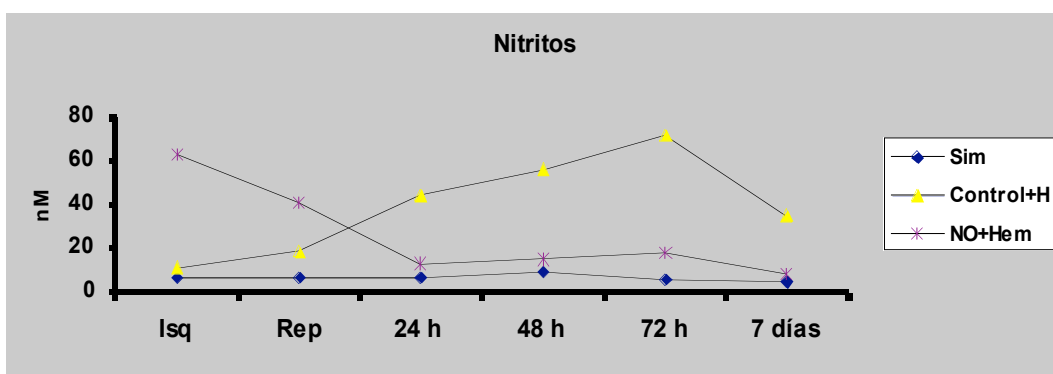
	Sim	Control+H	NO+Hem
Isq	6,6 ± 0,3	11,3 ± 2,9	62,4 ± 28,4
Rep	6,6 ± 0,3	18,4 ± 3	40,7 ± 19,5
24 h	6,7 ± 0,8	43,9 ± 8,1	12,6 ± 4,7
48 h	8,9 ± 0,9	56,2 ± 10,4	14,8 ± 3,9
72 h	5,8 ± 0,5	71,3 ± 12,6	17,7 ± 4,2
7 días	4,2 ± 0,5	35,1 ± 8,2	8,3 ± 4,1

La producción de nitritos en el grupo Control (Control+H) se encuentra significativamente más elevada que en el grupo Simulado (Sim) en todas las muestras ($p < 0,05$ en Isq, resto $p < 0,001$).

El grupo Molsidomina (NO+Hem), presenta valores significativamente más elevados de nitritos que el grupo simulado en las siguientes muestras: Isquemia ($p < 0,01$), Reperfusión ($p < 0,01$) y a las 72 horas ($p < 0,05$).

Comparando el grupo Control, con el grupo tratamiento, vemos que el tratado con Molsidomina consigue reducir significativamente los valores de nitritos respecto al grupo control, a partir del momento en que se produce la reperfusión. Las diferencias se aprecian mejor en el Gráfico VI.

Gráfico VI: Nitritos



4.2. iNOS RENAL

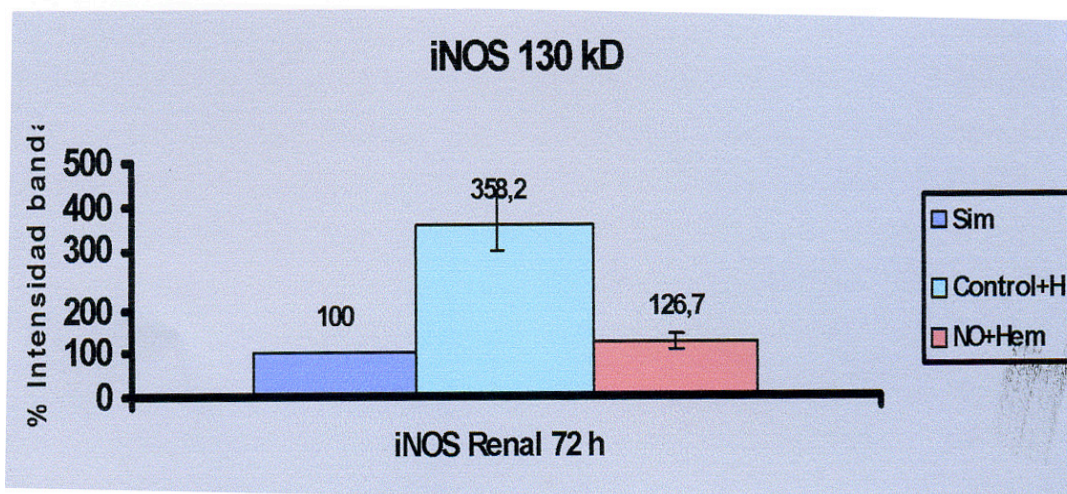
El grupo Control (Control+H) presentó niveles significativamente más elevados que el grupo Simulado (Sim) siendo la $p < 0,001$.

El grupo tratamiento (NO+Hem) presenta sin embargo niveles muy similares a los del grupo Simulado (Sim), no existiendo diferencias significativas entre ambos.

El grupo tratamiento sin embargo, si presenta valores significativamente inferiores a los del grupo control (Control+Hem): $p < 0,001$.

Estos resultados se aprecian con claridad en el Gráfico VII

Gráfico VII: iNOS-Riñón



5.- CITOCINAS EN SUERO

5.1. FACTOR DE NECROSIS TUMORAL (TNF α)

Los resultados de la determinación del TNF α en suero, se realizan según la técnica expuesta en el apartado “Materiales y Método”, y se exponen en la Tabla XII y el Gráfico VIII.

Tabla XII: TNF α en suero

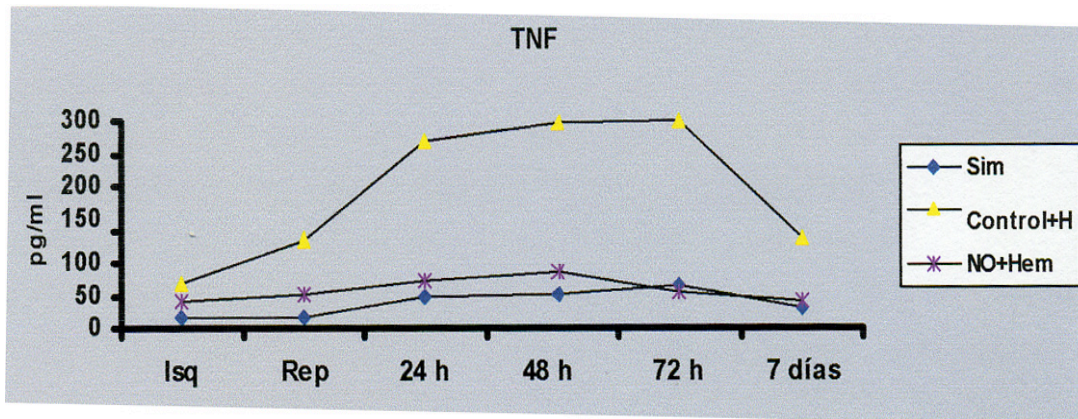
	Sim	Control+H	NO+Hem
Isq	17,3 \pm 3,8	67,4 \pm 22,5	41 \pm 7,2
Rep	17,3 \pm 3,8	132,8 \pm 37,3	52,7 \pm 6,5
24 h	47,8 \pm 4,9	267,4 \pm 74,8	73,4 \pm 8,5
48 h	52,5 \pm 6,3	294,9 \pm 80,1	85,2 \pm 9,1
72 h	66,1 \pm 5,7	300,6 \pm 76,2	53,6 \pm 7,4
7 días	29,6 \pm 4,8	139,4 \pm 26,9	42,8 \pm 5,9

Se observa un aumento significativo ($p < 0,01$ en Isq, resto $p < 0,001$) del TNF α en el grupo Control (Control+H) respecto al grupo Simulado (Sim).

El grupo Molsidomina (NO+Hem) presenta valores superiores al simulado ($p < 0,05$) en todas las muestras. Sin embargo consigue valores

significativamente más bajos que el grupo control ($p < 0,01$) a partir de la muestra recogida en reperusión.

Gráfico VIII: TNF α en suero



5.2. INTERLEUCINA IL-1 β

Se determina la IL-1 β tal como se explica en el apartado “Materiales y Método” y los resultados obtenidos se exponen en la Tabla XIII y el Gráfico IX.

Tabla XIII: IL-1 β en suero

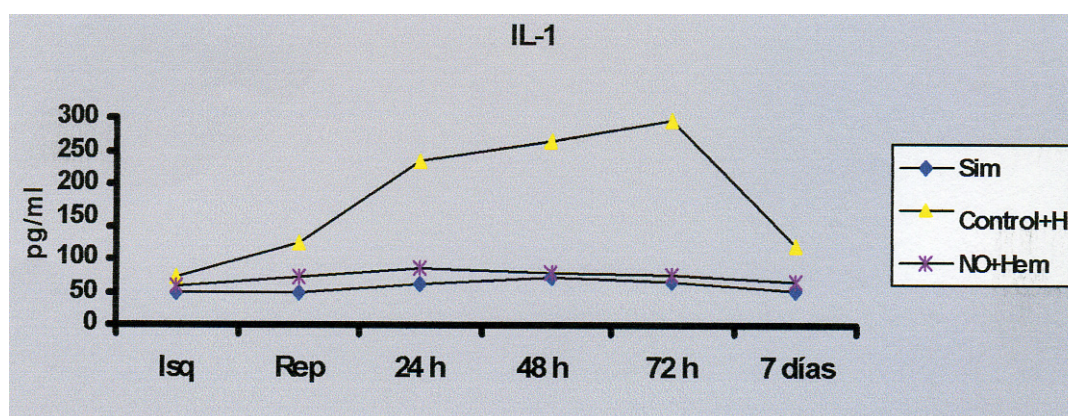
	Sim	Control+H	NO+Hem
Isq	48,3 \pm 9,5	73,8 \pm 13,4	58,5 \pm 9,6
Rep	48,3 \pm 9,5	124,5 \pm 18,6	73,2 \pm 10,2
24 h	63,2 \pm 8,3	233,1 \pm 25,9	85,1 \pm 11,7
48 h	71,8 \pm 7,7	264,8 \pm 36,1	80 \pm 9,4
72 h	64,9 \pm 6,9	297,5 \pm 31,5	77,4 \pm 8,5
7 días	53,1 \pm 5,2	121,7 \pm 16,5	64,4 \pm 7

En el grupo Control (Control+H) se produce un incremento significativo de los valores obtenidos respecto al grupo simulado, especialmente a partir del momento de la reperfusión ($p < 0,001$).

El grupo Molsidomina (NO+Hem) presenta valores similares (pNS) a los del grupo simulado. Sin embargo, respecto al grupo Control los valores son significativamente más bajos ($p < 0.05$), salvo en la 1ª muestra (Isq) en que no hay variaciones significativas.

Estos resultados se aprecian en el Gráfico IX.

Gráfico IX: IL-1 β en suero



5.3. INTERFERÓN GAMMA INF- γ

Se determina el INF- γ tal como se explica en el apartado “Materiales y Método” y los resultados obtenidos se exponen en la Tabla XIV y el Gráfico X.

Se observa un aumento muy importante en los valores obtenidos en el grupo control, respecto al grupo Simulado (Sim), especialmente desde el momento de la Reperfusión $p < 0,001$ (en Isquemia $p < 0,05$).

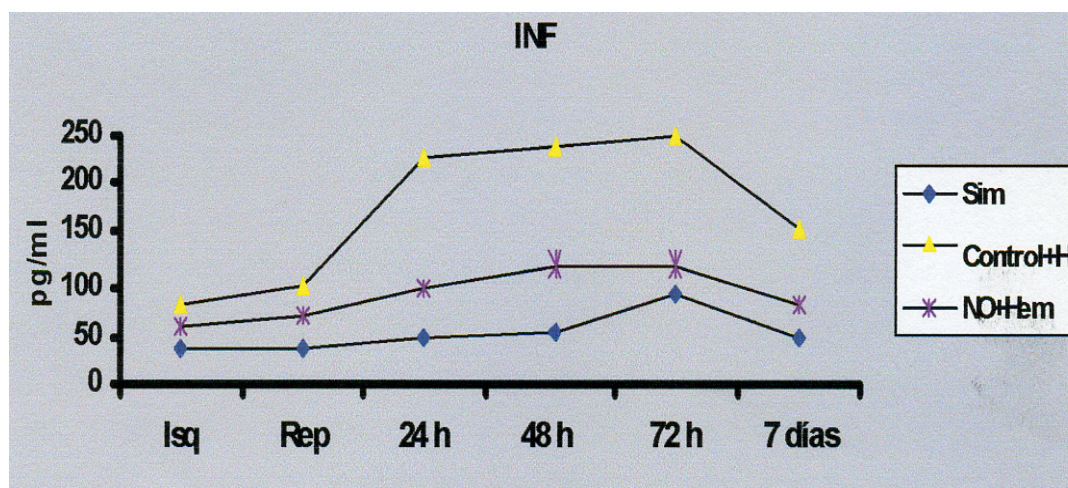
Tabla XIV: INF- γ

	Sim	Control+H	NO+Hem
Isq	38,1 \pm 5,3	84,5 \pm 10,9	59,8 \pm 8,2
Rep	38,1 \pm 5,3	103 \pm 26	71,1 \pm 10,4
24 h	49,7 \pm 7,1	225,6 \pm 35,5	99,7 \pm 10,8
48 h	53,8 \pm 6,4	237,9 \pm 47,2	120,2 \pm 21,6
72 h	96,2 \pm 9,8	249,2 \pm 40	120,8 \pm 19,5
7 días	50 \pm 4,7	153,5 \pm 24,1	83,1 \pm 9,3

El grupo tratamiento (NO+Hem) únicamente presenta valores significativamente elevados respecto al grupo simulado (Sim) en las muestras obtenidas a las 24 y 48 horas ($p < 0.05$).

Comparando el grupo Control (Control+H), con el tratado con donadores de óxido nítrico (NO+Hem), vemos una disminución significativa en el grupo tratado, de las cifras de INF γ en todas las muestras obtenidas ($p < 0,05$ en isquemia y reperfusión y $p < 0,01$ en las muestras posteriores).

Gráfico X: INF γ



5.4. INTERLEUCINA 6 (IL-6)

Se determina la IL-6 tal como se explica en el apartado “Materiales y Método” y los resultados obtenidos se exponen en la Tabla XV.

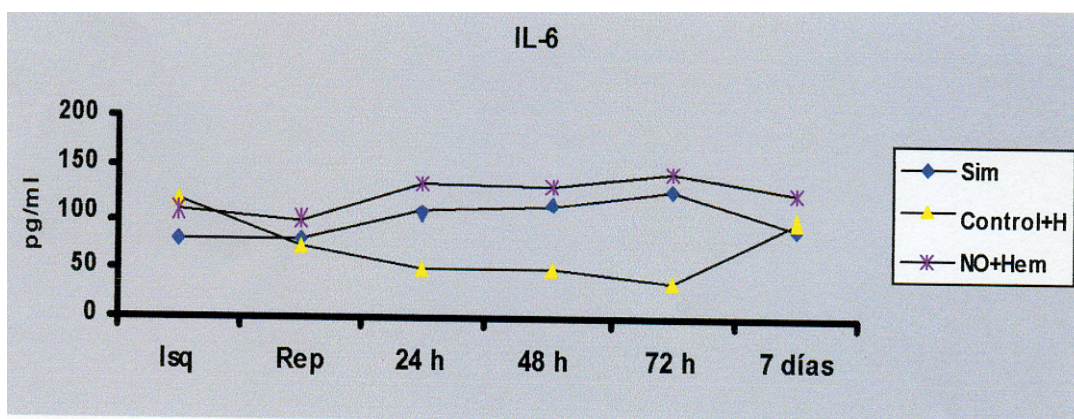
Tabla XV: IL-6 en suero

	Sim	Control+H	NO+Hem
Isq	80,2 ± 5,2	114,5 ± 19,2	106,5 ± 14,6
Rep	80,2 ± 5,2	73,7 ± 15,7	99,3 ± 12,1
24 h	103,5 ± 9,6	50,2 ± 8,4	130 ± 18,7
48 h	110,9 ± 10,5	49,7 ± 9,1	128,6 ± 20,5
72 h	124,6 ± 12,8	37,4 ± 9,7	143,1 ± 23,6
7 días	91,4 ± 7,3	100 ± 16,6	122,7 ± 19,7

El grupo Molsidomina (NO+Hem) tiene unos resultados muy semejantes a los del grupo simulado, presentando como única diferencia significativa ($p < 0,05$) un aumento de IL-6 en la muestra tomada a los siete días.

Como se aprecia claramente en el Gráfico XI, el grupo Control (Control+H) presenta valores significativamente más bajos ($p < 0,05$) de IL-6 en las muestras tomadas: A las 24, 48 y 72 horas que los grupos simulado (Sim) y tratamiento (NO+Hem).

Gráfico XI: IL-6 en suero



5.5. INTERLEUCINA 10 (IL-10)

Se determina la IL-10 tal como se explica en el apartado “Materiales y Método” y los resultados obtenidos se exponen en la Tabla XVI.

Tabla XVI: IL-10 en suero

	Sim	Control+H	NO+Hem
Isq	130 ± 12,8	138,5 ± 29,5	158,7 ± 26,2
Rep	130 ± 12,8	112,6 ± 23,6	170,1 ± 39,5
24 h	168,3 ± 17,7	64,1 ± 16,4	199,4 ± 44,1
48 h	175,8 ± 21,9	57 ± 18,7	236,3 ± 35,8
72 h	183,4 ± 23,5	50,2 ± 20	200,1 ± 27,7
7 días	149,6 ± 19,6	73,6 ± 27,1	126,3 ± 20,2

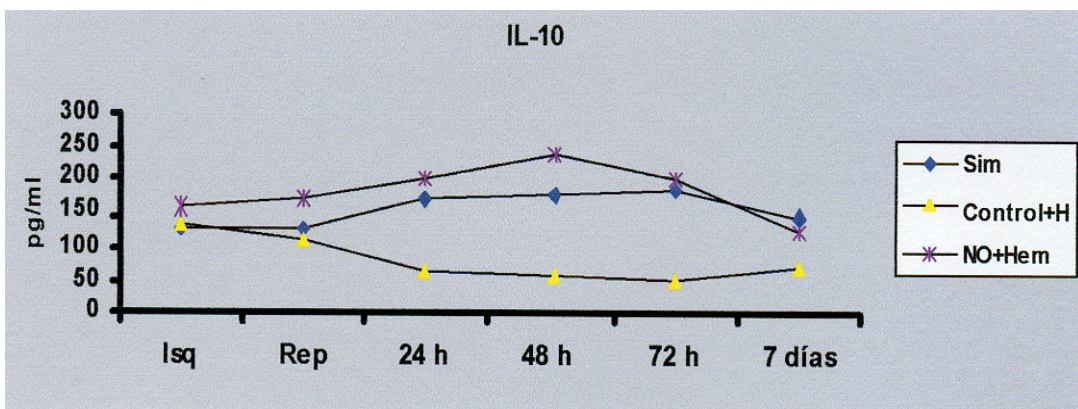
Los niveles de IL-10 del grupo Control (Control+Hem), descienden significativamente ($p < 0,05$) en relación al grupo Simulado (Sim), a partir de

las 24 horas, no encontrándose variaciones significativas en las dos primeras muestras.

El comportamiento del grupo Molsidomina (NO+Hem) es muy semejante al del grupo simulado, aunque consigue mantener algo más altas las cifras de IL-10 en las cuatro primeras muestras.

Comparando el grupo Molsidomina con el grupo control, vemos que el grupo tratado (NO+Hem), mantiene cifras de IL-10 significativamente más altas ($p < 0,05$) a partir de la muestra Rep (a los 15 minutos de la Reperfusión), como puede apreciarse en el Gráfico XII.

Gráfico XII: IL-10 en suero

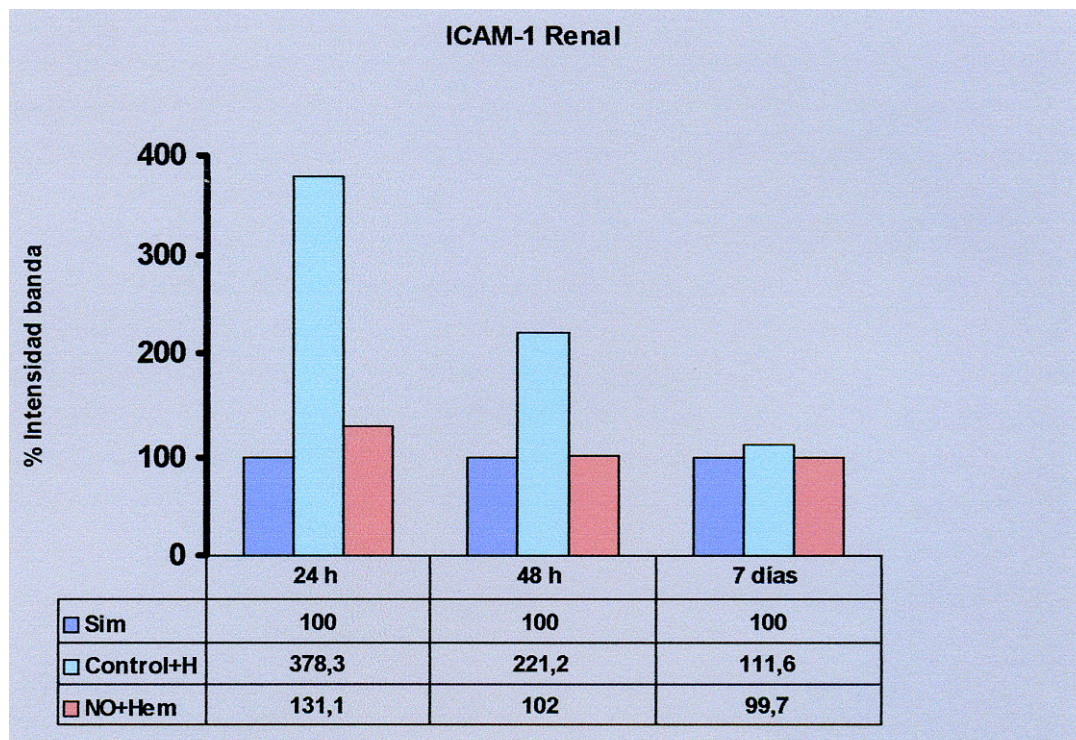


6.- MOLÉCULAS DE ADHESIÓN CELULAR

6.1. ICAM-1 EN TEJIDO RENAL

Se determina la ICAM-1 tal como se explica en el apartado “Materiales y Método” y los resultados obtenidos se exponen en el Gráfico XIII.

Gráfico XIII: ICAM-1 en Riñón



Como podemos apreciar en el Gráfico XIII, los valores de ICAM-1 en los grupos simulado (Sim) y Molsidomina (NO+Hem), tienen un comportamiento muy semejante, no encontrándose diferencias entre ambos en ninguna de las muestras obtenidas.

El grupo Control (Control+H) presenta un incremento significativo ($p < 0,01$) en las cifras de ICAM-1, en las muestras obtenidas a las 24 y 48 horas, respecto a los grupos tratado con Molsidomina y Simulado.

No se encuentran diferencias entre ninguno de los tres grupos en la muestra obtenida a los siete días.

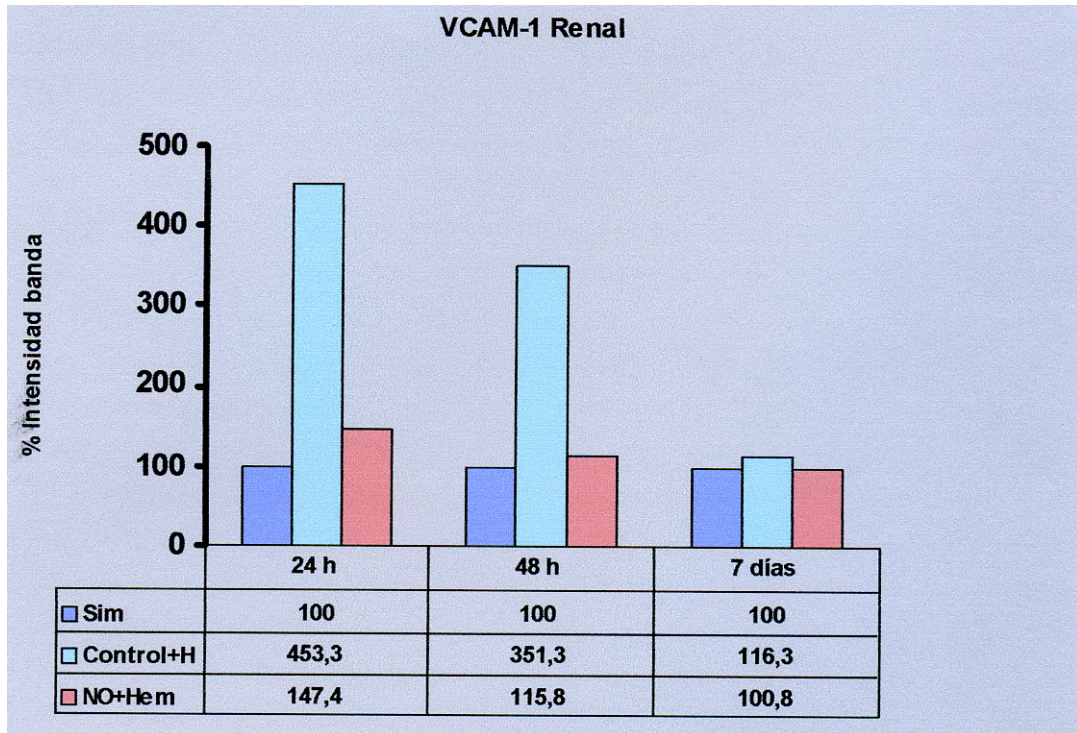
6.2. VCAM-2 EN TEJIDO RENAL

Se determina la VCAM-1 tal como se explica en el apartado “Materiales y Método” y los resultados obtenidos se exponen en el Gráfico XIV.

El comportamiento de las VCAM-2 en riñón es idéntico a al de la ICAM-1 anteriormente expuesto.

No se encuentran diferencias significativas entre los grupos simulado (Sim) y tratamiento (NO+Hem). El grupo Control muestra cifras claramente más elevadas y estadísticamente significativas ($p < 0,01$), respecto a los grupos Molsidomina (NO+Hem) y simulado (Sim).

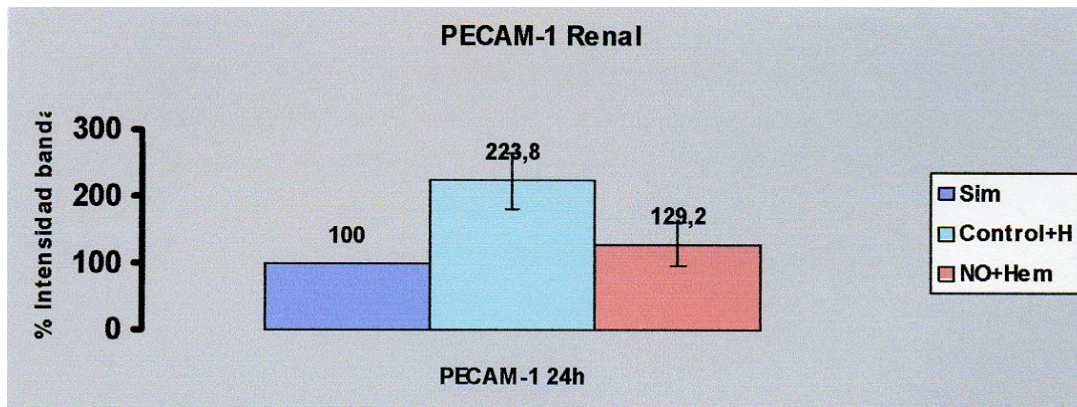
Gráfico XIV: VCAM-1 en Riñón



6.3. PECAM-1 EN TEJIDO RENAL

Se determina la PECAM-1 tal como se explica en el apartado “Materiales y Método” y los resultados obtenidos se exponen en el siguiente Gráfico XV.

Gráfico XV: PECAM-1 en Riñón

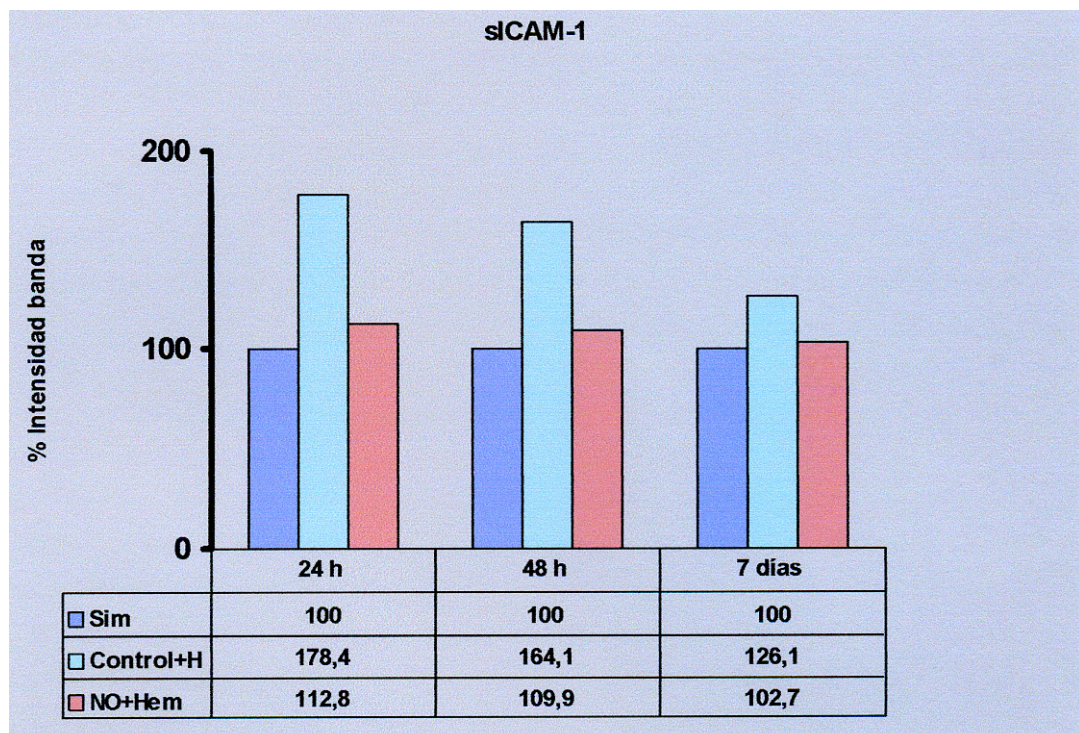


No se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre los grupos Simulado (Sim) y Molsidomina (NO+Hem). El grupo Control (Control+H), sin embargo, muestra un valor estadísticamente más elevado ($p < 0,01$) que los grupos Simulado (Sim) y Molsidomina (NO+Hem).

6.4. sICAM-1 EN SUERO

Se tomaron tres muestras de sICAM-1 a las 24 y 48 horas y a los 7 días, tal como se expone en el apartado “Materiales y Método”. Exponemos los resultados en el Gráfico XVI.

Gráfico XVI: sICAM-1 en suero



El grupo Control (Control+H), muestra un incremento significativo ($p < 0,05$) respecto a los grupos Simulado (Sim) y tratamiento (NO+Hem), en las muestras tomadas a las 24 y 48 horas, normalizando sus valores en la muestra tomada a los siete días.

El grupo tratado con donadores de óxido nítrico (NO+Hem), muestra en todas las muestras, un comportamiento semejante al grupo Simulado en los valores de sICAM-1 no encontrándose diferencias significativas en los valores de sICAM-1 entre ambos grupos.

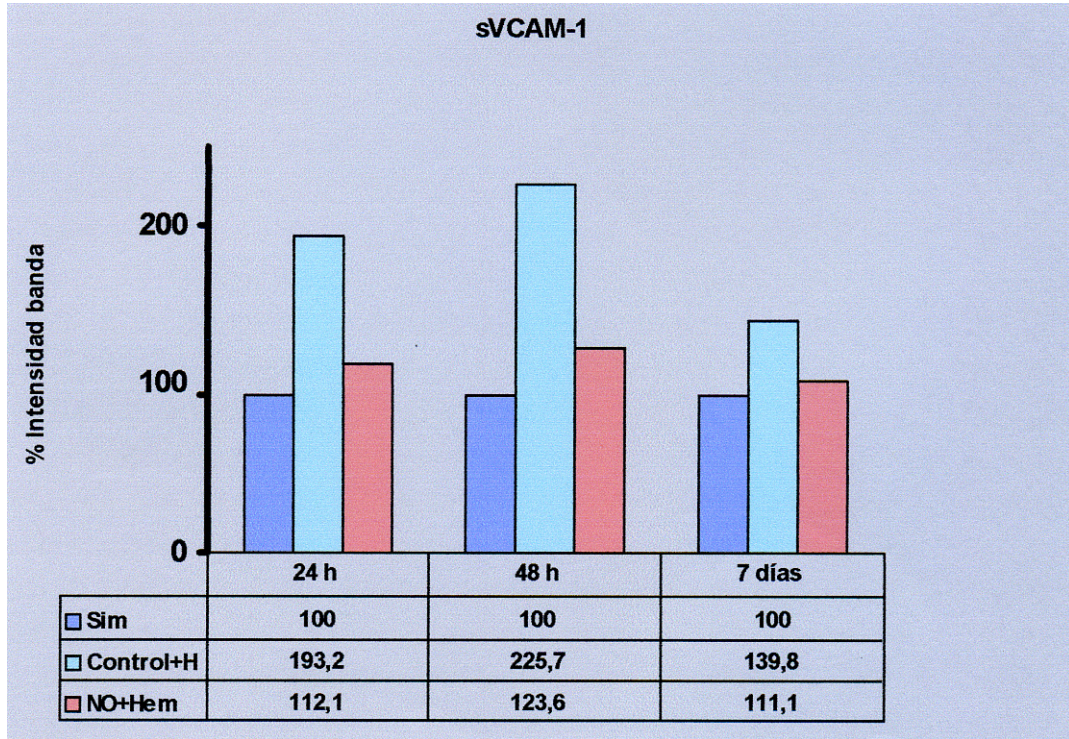
6.5. MOLÉCULA DE ADHESIÓN CELULAR VASCULAR-1 SOLUBLE sVCAM-1

Se tomaron tres muestras de sVCAM-1 en suero a las 24 y 48 horas y a los 7 días, tal como se expone en el apartado “Materiales y Método”. Exponemos los resultados en el Gráfico XVII.

Entre los grupos simulado (Sim) y el tratado con Molsidomina (NO+Hem), no se apreció ninguna diferencia significativa en el valor de sVCAM, las tres muestras tomadas.

El valor de sVCAM en el grupo control (Contro+H) sufrió un incremento significativo ($p < 0,001$), en las muestras tomadas a las 24 y 48 horas, normalizándose a los siete días.

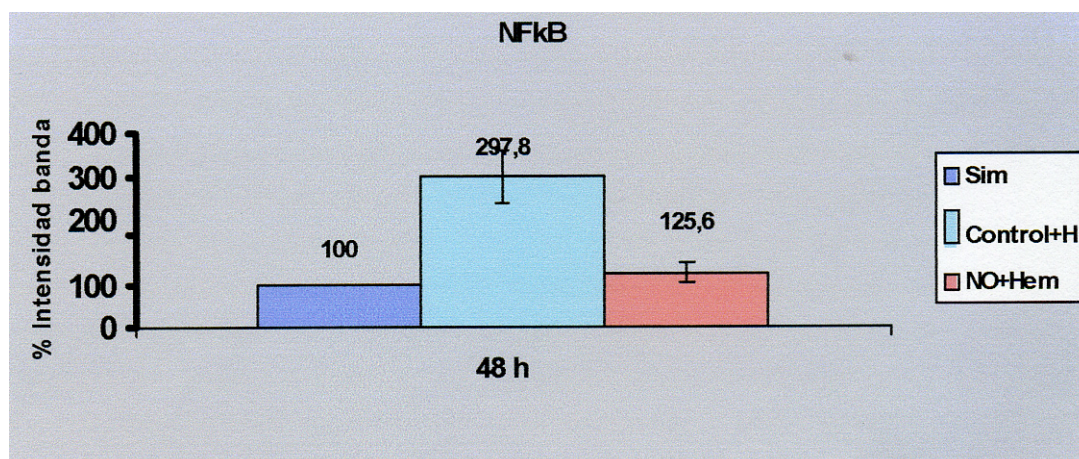
Gráfico XVII: sVCAM-1 en suero



7.- FACTOR TRANSCRIPCIONAL NFκB

Determinamos NFκB según se expone en el apartado “Materiales y Método”, y los resultados se exponen en el Gráfico XVIII.

Gráfico XVIII: NFκB



Se observa un incremento en los niveles de NFκB del grupo control (Control+H) respecto a los grupos simulado (Sim) y Molsidomina (Control+Hem), que es estadísticamente significativo ($p < 0,01$).

El grupo tratado con Molsidomina (NO+Hem), mostró un comportamiento semejante al del grupo simulado, no encontrándose variaciones significativas entre los mismos.

V. DISCUSIÓN

1.- INTRODUCCIÓN

Uno de los grandes retos de la medicina sigue siendo el control de la respuesta inflamatoria crónica que se produce al implantar prótesis o biomateriales en cualquier tipo de cirugía reconstructiva ^(131, 146, 147) .

La modulación de la respuesta inflamatoria tiene gran importancia, e intentar reducir al máximo los síntomas secundarios a cualquier intervención quirúrgica, debe ser un objetivo primordial para cualquier cirujano ⁽¹³¹⁾ .

En estudios llevados a cabo por nuestro grupo de trabajo, se ha observado como el implante de diferentes modelos protésicos utilizados en cirugía puede producir una respuesta inflamatoria sistémica cuya modulación es esencial a la hora de controlar las complicaciones de la misma.

Fundamentalmente debido a la necesidad de implantar un cuerpo extraño (injerto protésico vascular) y a la lesión por isquemia-reperfusión secundaria al clampaje suprarrenal, la cirugía de aorta abdominal genera una respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) que es fuente de morbi-mortalidad operatorias.

En el modelo experimental empleado en este proyecto de tesis doctoral hemos tratado de evaluar la evolución de la SIR simulando una cirugía electiva en la aorta abdominal.

El procedimiento aceptado universalmente para prevenir la rotura de un AAA y reducir la enorme mortalidad que ésta conlleva es la resección electiva y la interposición de una prótesis o injerto.

2.- DISCUSIÓN DEL MODELO Y DISEÑO EXPERIMENTAL

2.1. ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN

Se eligieron como sujetos de estudio minicerdos porque, a pesar de que presentaban indudablemente inconvenientes en cuanto a coste, menor disponibilidad y más dificultad para su estabulación, ofrecían ventajas como el ser omnívoro, de gran semejanza al hombre en multitud de sistemas anatómicos y enzimáticos y nos permitían practicar la técnica anestésico quirúrgica con idéntica similitud a la realizada en el ser humano.

2.2. TIPO DE AGRESIÓN

La intención del experimento era conseguir un modelo muy agresivo con una morbi-mortalidad alta, por ello y teniendo en cuenta los estudios previos realizados por nuestro grupo de trabajo, con una duración del clampaje de 30 minutos y sangría del 40% de la volemia, se ocasionaron situaciones de alta morbi-mortalidad postoperatoria.

La elección del tiempo de clampaje aórtico suprarrenal de treinta minutos se hizo en base a la tolerancia del riñón a la isquemia en la clínica humana y debido a lo recogido en experiencias realizadas por nuestro grupo en las que tiempos más prolongados pueden ocasionar lesiones estructurales irreversibles que imposibilitarían una recuperación de la función tras la fase de la reperfusión.

La realización de una sangría controlada del 40% de la volemia en quince minutos durante la inducción anestésica, se eligió porque se consideró que dicha pérdida de volumen sanguíneo efectivo era suficiente, como modo de agresión, para desencadenar los fenómenos de respuesta inflamatoria sistémica.

Se repuso la volemia extraída con cristaloides (proporción 3/1) y coloides (proporción 1/1) para mantener la estabilidad hemodinámica del animal durante el acto quirúrgico sin interferir en los procesos implicados en la respuesta inflamatoria sistémica desencadenados con la sangría previa.

2.3. TIEMPO DE LAS MUESTRAS

La elección de los tiempos de recogida de las muestras, basal, a los 15 minutos del desclampaje aórtico o reperfusión, a las 24, 48 y 72 horas y al 7º día, se hizo teniendo en cuenta la secuenciación de los fenómenos de

la RIS que siguen al proceso de isquemia-reperfusión y de implante de una prótesis en posición aórtica.

2.4. VARIABLES ESTUDIADAS

La selección de las variables a estudiar se realizó de acuerdo con la información que cada una de ellas aportaría al estudio y teniendo en cuenta los medios de infraestructura y económicos de los que disponíamos para llevar a cabo nuestro diseño experimental.

- Citocinas: Aquellas proinflamatorias valoradas en nuestro estudio, TNF- α , IL-1 β e INF- α , desempeñan un papel esencial en la activación de macrófagos, en la expresión de moléculas de adhesión celular que son fundamentales para el proceso de la infiltración neutrofílica que ocurre durante la reperusión, en la activación de la iNOS incrementando así la producción de óxido nítrico y en el incremento de la producción de RLO, especialmente del anión superóxido ^(45, 96, 144). Por el contrario, las duales (IL-6) y aún en mayor medida las antiinflamatorias (IL-10) se relacionarán de forma inversamente proporcional al grado de agresión. Por todo ello es importante su determinación y su correlación con las otras variables estudiadas.

- Mieloperoxidasa: Se da por supuesto que hay una relación directamente proporcional entre el incremento de la infiltración neutrofílica y el aumento de la lesión orgánica post-reperfusión ^(27, 29, 77, 101, 162). El método seleccionado para valorarla fue la determinación de la actividad de la mieloperoxidasa, el cual ha demostrado ser uno de los más exactos y más ampliamente empleado en la investigación ⁽¹⁶¹⁾.

- Radicales Libres de Oxígeno y “barrenderos” en Riñón: Su participación en la lesión post-reperfusión ha sido ampliamente descrita en la literatura ^(24, 25, 59, 75, 86, 143), destacando a este respecto los trabajos realizados por nuestro grupo en modelos de isquemia-reperfusión hepática e intestinal que los hacen responsables de los daños en la fase post-reperfusión ^(41, 94, 95). Parece demostrado que el óxido nítrico reacciona con alguno de los RLO como el anión superóxido, para producir peroxinitritos, los cuales entre otras acciones van a condicionar el inicio de la peroxidación lipídica de las membranas celulares ^(26, 49, 102, 148). Los RLO se pueden medir de manera directa, determinando la producción del anión superóxido ^(26, 100) o bien de manera indirecta estudiando la actividad del enzima detoxificante superóxido-dismutasa^(26, 100).

- Nitritos : Aportan información sobre el daño y la recuperación funcional renal tras la isquemia-reperfusión.

- iNOS: El conocimiento de las fuentes de producción del óxido nítrico a nivel molecular, es decir sus isoenzimas constitutiva e inducible, y sus intervenciones en el transcurso de la inflamación durante el fenómeno de la isquemia-reperfusión, han puesto de manifiesto un comportamiento

distinto del óxido nítrico en función de la enzima productora, su cantidad y el momento de su liberación (20, 23, 26, 56, 69, 71, 87,102). La enzima iNOS desde el momento en que es activada o inducida produce una liberación continua y en gran cantidad de óxido nítrico, el cual en el momento en que es liberado –post-reperfusión– parece ser altamente perjudicial (123). En nuestro estudio la determinación de la actividad de iNOS a las 72 horas se fundamenta en que en períodos de tiempo previos no sería detectable.

- Moléculas de Adhesión Celular: Son las responsables de la interacción leucocito-endotelio y, por tanto, de la migración leucocitaria su incremento en la expresión se asocia a una mayor infiltración neutrofilica y a un mayor daño orgánico.

- Factor Transcripcional κ B: Es uno de los factores nucleares más estudiados ya que controla la replicación de DNA en RNAm en la respuesta inflamatoria. Su estudio en este diseño experimental determinará el control de los aspectos genéticos de la respuesta inflamatoria sistémica.

3.- DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

Amplias series muestran la dramática diferencia sobre mortalidad, existente entre los aneurismas de aorta intactos y rotos ^(28, 68). Pero lo grave es que esa diferencia permanece estática en los últimos años. Pues bien, una de las principales causas del fallecimiento en estos pacientes suele ser un fallo multiorgánico (FMO) secundario a una respuesta inflamatoria sistémica (RIS).

Precisamente la producción no controlada de diferentes mediadores químicos (citoquinas, RLO, NO, etc) activados durante la/s agresión/es: isquemia-revascularización (distal a la zona del clampaje) y/o hemorragia asociada, ocasionan una respuesta inflamatoria, que provoca disfunción orgánica local y a distancia (renal, respiratoria, intestinal, etc.); la secuencia final del proceso puede ser el FMO y la muerte del paciente ^(15, 131).

La RIS es una respuesta a la agresión y su falta de control se relaciona, entre otros factores, con la intensidad de la agresión. Así a mayor agresión, más RIS y sus deletéreas consecuencias. En la cirugía de los aneurismas de aorta abdominal (AAA) la intensidad de la agresión es diferente según se trate de: 1) cirugía electiva endovascular o abierta ^(112, 147); 2) cirugía electiva extraperitoneal o transperitoneal ⁽⁸⁰⁾; 3) cirugía con

clampaje infrarrenal o suprarrenal ⁽³²⁾ ; y 4) cirugía electiva o urgente por aneurisma roto ^(1, 126). En principio, las primeras situaciones, presentan una menor RIS respecto de las segundas.

Con respecto a las técnicas endovasculares, inicialmente se pensó que en estas, al no precisar un clampaje aórtico tradicional, se minimizaría la lesión por isquemia-reperusión respecto de la cirugía convencional ⁽¹⁵⁵⁾. No obstante, trabajos recientes^(39, 112) muestran cómo la reparación endovascular también induce una RIS significativa; de hecho la revisión de Swarbol ⁽¹⁴⁶⁾ sobre 17 estudios concluyó que ambas técnicas inducen RIS, aunque esta sea mayor durante la cirugía abierta. Aunque existen ya publicaciones ⁽⁸²⁾ que valoran el impacto de las técnicas endovasculares en los AAA rotos, todavía no existen datos acerca de su RIS.

La vía de abordaje también parece importante, así para Lau y cols. ⁽⁸⁰⁾ la ruta extraperitoneal, con una menor manipulación intestinal respecto de la transperitoneal.

El punto clave para la activación de la RIS, en cirugía aórtica, es el clampaje-desclampaje transversal de la aorta (duración y nivel del mismo) porque conlleva un fenómeno de isquemia-reperusión. En este sentido, la mayoría de los estudios, tanto clínicos^(7, 64) como experimentales^(117, 120), se centran en el clampaje infrarrenal, y únicamente Fiane y cols. ⁽³²⁾ evalúan el clampaje suprarrenal, demostrando una mayor RIS respecto del infrarrenal. Nosotros elegimos el clampaje suprarrenal (pero inframesentérico, para no añadir a los resultados el factor intestinal), por entender que este tipo de clampaje será practicado cada vez con mayor frecuencia relativa; pues si

se demuestra la efectividad y seguridad de la cirugía endovascular a largo plazo, posiblemente la cirugía convencional de los aneurismas de aorta abdominal prácticamente quedará para tratar aneurismas yuxta, para y suprarrenales; a ello habrá que añadir el control de ciertos aneurismas complicados, que pueden requerir inicialmente de un clampaje suprarrenal, hasta su posterior reposición en posición infrarrenal (siempre que ello sea posible).

Pero si clave es el clampaje y sus características, determinante puede ser la presencia de una hemorragia previa ⁽¹⁴²⁾. Sin embargo, pocos estudian el valor añadido de la hemorragia al clampaje aórtico ^(1, 56, 126). Esa asociación es crucial, es lo que Lindsay y cols.⁽⁸⁴⁾ acertadamente denominan “two hit ischaemia/reperfusion injury”, pues combinan dos eventos sobradamente conocidos como inductores de RIS.

Así pues, en la cirugía de los AAA se contemplan cuatro posibles agresiones inductoras de RIS: necesidad de clampaje (con isquemia/revascularización), vía de abordaje, nivel del clampaje y presencia de shock hemorrágico. Nuestro modelo experimental, no descrito en la literatura, precisamente se centra en las dos situaciones más agresivas: clampaje suprarrenal y hemorragia previa. En este sentido, es curioso observar la casi inexistencia de estudios experimentales que valoren estos dos eventos, ya que solo recientemente Harkin y cols.⁽⁵⁶⁾ ha publicado recientemente algunos resultados al respecto.

Pero ¿cómo se mide la RIS en cirugía aórtica?. Para ello debemos tratar dos aspectos diferentes pero interrelacionados: ¿qué indicadores se emplean? y ¿en qué momento se realiza su medición?.

Empezando por el segundo aspecto: ¿En qué momentos se ha realizado su medición?. A la vista de los estudios clínicos y experimentales disponibles debemos referir que existe una gran variabilidad. Se realizan mediciones basales preoperatorias, intraoperatorias y postoperatorias (precampaje, durante la isquemia y la reperfusión en diversos momentos: con una periodicidad también muy variable minutos, horas o días). Los hay que se centran preferentemente en las primeras horas de la reperfusión ^(7, 39, 147), otros por el contrario prolongan las determinaciones a 7-13 días ^(60, 116, 117, 126, 147). Este hecho indudablemente crea cierto confusiónismo pues mezcla tiempos, determinaciones y agresiones. En nuestro trabajo más que en el perioperatorio (con solo dos mediciones: isquemia y reperfusión precoz), nos centramos en el postoperatorio, donde se realizó un seguimiento programado durante una semana.

Los marcadores más empleados para medir la RIS en la cirugía aórtica, son sin lugar a ninguna duda las citocinas, fundamentalmente TNF- α e IL-6 ^(7, 32, 36, 61, 112, 117, 147, 153), seguidas de IL-1 β e IL-8 ^(32, 36, 39, 147), ambas a distancia de IL-10 ^(32, 60, 61). Algunos autores también han evaluado la actuación de los receptores solubles del TNF ^(1, 36, 61). Más recientemente se ha estudiado el comportamiento de dos quimiocinas (MCP-1 y RANTES)

(60, 64). El segundo grupo de marcadores utilizados han sido las MAC solubles, destacando las inmunoglobulinas (ICAM-1, VCAM-1), seguidas de las E y P-selectinas (8, 32, 36, 39). Un tercer grupo más disperso sería la evaluación del comportamiento de los neutrófilos: MPO (32, 56, 112, 116, 117), RLO (120, 155) y MDA (84). Finalmente también se ha evaluado la participación del NO (56, 117, 153).

En todo lo referido destacan dos aspectos: 1) falta de uniformidad, así cada publicación investiga determinadas variables, y 2) ausencia de determinaciones tisulares, al tratarse la mayoría de trabajos clínicos. Estas dos relativas carencias no se dan en nuestro estudio, dado que realizamos un exhaustivo estudio de mediadores químicos de la inflamación en plasma y tejidos (riñón).

Es sabido cómo la concentración sistémica de algunas citocinas, fundamentalmente TNF- α y varias interleuquinas se correlaciona con la extensión de la inflamación y el estado crítico de los pacientes (4), por ello se considera importante su monitorización y posible manipulación (5). También es conocido cómo el clampaje-reperfusión aórtico induce liberación de citocinas de efecto sistémico (2, 60) y cómo éstas perduran hasta una semana postoperatoriamente (60). Esos aumentos son superiores cuando el clampaje se realiza a nivel suprarenal respecto del infrarenal (32), y en los pacientes operados por aneurismas rotos respecto de los electivos (1, 36, 126). Estas situaciones se correlacionan con mayor FMO y mortalidad. Nuestros resultados son coincidentes para TNF- α e IL-1, pero no respecto a IL-6 (citocina dual, pro o antiinflamatoria) e IL-10 (antiinflamatoria), que en

lugar de aumentar disminuyen. El tipo de agresión y los diferentes momentos investigados pueden explicar esas diferencias. Curiosamente ningún trabajo ha evaluado el incremento de INF- γ , citocina proinflamatoria, importante en la regulación de ciertas CAMs.

Por otro lado, se ha constatado que las complicaciones que aparecen secundariamente a un clampaje aórtico, son neutrófilo dependientes⁽⁷⁾. Estas complicaciones están mediadas fundamentalmente por la activación de los neutrófilos residentes en el órgano afectado, más que por otros procedentes de la zona del daño ⁽¹²⁰⁾. En este sentido la comunidad científica, está de acuerdo en relacionar de forma directamente proporcional, el incremento de infiltración neutrofilica con el grado de la lesión inflamatoria. En nuestro trabajo, con la determinación de la actividad de la enzima MPO en tejido renal corroboramos la existencia de una elevada infiltración neutrofilica en las dos agresiones investigadas. Esta mayor actividad de la MPO también ha sido valorada en pacientes sometidos a cirugía de AAA ^(32, 112) y en modelos experimentales de clampaje aortico sin hemorragia ^(116, 117) y con hemorragia ⁽⁵⁶⁾.

Los neutrófilos, una vez activados, son grandes productores de RLO a través de la NADPH oxidasa, así el estudio conjunto de la MPO y de los RLO completarán la situación de activación y migración neutrofilica. Para el estudio de los radicales libres del oxígeno, hemos determinado un enzima del sistema detoxificante (SDO) y el radical libre ASO, ambos en tejido renal. Por otro lado la participación de los RLO en el proceso inflamatorio

ha sido ampliamente estudiado y plasmado en la bibliografía, pero no tanto en la situación que nos ocupa ^(84, 120, 155).

El hecho conocido del daño causado por éstos en los tejidos nos decidió a incluir su estudio en este trabajo y por eso también determinamos los niveles de MDA, el cual solo ha sido valorado por Lindsay y cols⁽⁸⁴⁾. Nuestra investigación muestra una elevación de todos estos parámetros, que alcanza el clímax a las 48-72 h, y tiende hacia la normalidad a los siete días; conjuntamente el grupo hemorragia asociada presenta una mayor agresión.

Las CAM son las responsables en última instancia de la interacción leucocito-endotelio y por tanto de la migración leucocitaria ⁽³⁾. Su regulación es compleja y posiblemente el control de la misma también aportará un interesante arsenal terapéutico. Por ello nos planteamos el estudio de dos CAM pertenecientes a la superfamilia de las inmunoglobulinas de gran importancia en la respuesta inflamatoria y en el reconocimiento antigénico (ICAM-1 y VCAM-1). Es conocido como las citocinas más importantes implicadas en la respuesta inflamatoria y en la modulación de estas CAMs son el TNF- α , IL-1 β e IFN- γ ya referidos. Con respecto a la cirugía de los AAA, existen pocos datos al respecto. Conocemos lo siguiente: 1) Como en situaciones electivas, la reperfusión induce disfunción endotelial y facilita las interacciones neutrófilo-endotelio, existiendo una mayor expresión de ICAM-1⁽⁸⁾; 2) Entre los procedimientos electivos endovasculares y convencionales se aprecian diferencias en sICAM-1, pero no para sVCAM-1, sE-selectina y sP-selectina⁽³⁹⁾; 3) El clampaje suprarrenal no

presenta diferencias respecto del infrarrenal para sICAM-1, sE-selectina y sP-selectina ⁽³²⁾; 4) Sin embargo, en los aneurismas rotos respecto de los íntegros, la concentración de sICAM-1 y sE-selectina sí están elevadas y concretamente sICAM-1 tiene un papel relevante en la predicción de complicaciones postoperatorias ⁽³⁶⁾.

Estas investigaciones al realizarse en humanos solo investigan MAC solubles. Nosotros también medimos ICAM-1 y VCAM-1 en tejido renal. Los resultados son muy interesantes, con expresiones a las 24 h, que se mantienen a las 48 h y desaparecen a los 7 d. Lo más llamativo, fue la falta de expresión de las MAC solubles durante todos los momentos investigados en el grupo clampaje, mientras sí se expresaban en el tejido renal. Esta particularidad no se mantiene cuando se asocia hemorragia previa, pues entonces se expresan todas las MAC (solubles y tisulares). Esto puede indicar una mayor afectación renal propia de nuestro modelo.

Sabemos que las citocinas son capaces a distancia, de provocar daño en diferentes órganos, entre ellos a nivel glomerular⁽¹⁵⁰⁾. Pero ese daño también se produce directamente cuando existe una situación de isquemia-reperfusión por clampaje de ambas arterias renales⁽¹⁶⁴⁾, como sucede en nuestro modelo de clampaje suprarrenal sin hemorragia.

Ante esos resultados, determinamos la expresión de factor de transcripción κB en tejido renal a las 48 h, apreciando una elevación significativa tanto en el grupo clampaje como en el de hemorragia. Es sabido como NFκB es uno de los reguladores centrales de la respuesta inflamatoria. Su importancia es evidente, al jugar un papel esencial en la

síntesis de varias citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1 β , IL-6), MAC (ICAM-1, VCAM-1, E-selectina), factores de crecimiento, iNOS (para producir NO), etc. Ciertos estímulos (citocinas, RLO, etc) presentes durante la agresión, lo liberan de su unidad inhibitoria, pudiendo así translocar del citoplasma al núcleo donde se unirá a elementos afines de ADN e iniciará la transcripción ⁽³⁴⁾.

Por último, el papel del NO en la isquemia-reperfusión no está totalmente aclarado. Existen publicaciones contradictorias sobre su efecto beneficioso o deletéreo. Los niveles basales de NO en condiciones normales, son producidos de manera constante y a baja concentración (cNOS). Durante la reperfusión se produce gran cantidad de NO, a expensas de una isoforma no fisiológica, la sintasa del óxido nítrico inducible (iNOS)⁽⁶⁷⁾. De hecho la elevación de TNF- α activa iNOS produciendo elevaciones de NO e induciendo disfunción orgánica ^(117, 153). Nosotros hemos observado este hecho que corre en paralelo junto a una mayor infiltración leucocitaria.

El papel del ON y el clampaje-revascularización aórtico, ha sido motivo de diversas investigaciones ^(56, 117, 153), todas ellas experimentales a excepción del trabajo de Harbin⁽⁵⁶⁾, que contempla esta situación asociada a hemorragia, llamando la atención del incremento de ON vía iNOS y las repercusiones a nivel pulmonar en pacientes con clampaje supramesentérico y hemorragia. Nuestra investigación también muestra como el clampaje suprarrenal pero inframesentérico y sobre todo la hemorragia añadida se acompañan de elevaciones significativas de NO,

con una máxima producción de nitritos a las 72 h., momento en que se aprecia una elevada expresión de iNOS a nivel renal.

Otro aspecto a resaltar de nuestro modelo es que induce dos tipos de respuestas inflamatorias: local (renal) y sistémica, cuyas consecuencias se potencian y dañan órganos a distancia. En efecto, el clampaje aórtico produce un síndrome de isquemia-reperfusión (variante de la RIS) que afecta simultáneamente a varios órganos y tejidos, de tolerancia diferente a la isquemia. De ello depende que las consecuencias no sean exclusivamente locales, sino que puedan afectar a varios órganos provocando fracaso multiorgánico y muerte. Nosotros hemos elegido un clampaje aórtico suprarrenal pero inframesentérico para inducir solo una isquemia total en ambos riñones y en el músculo esquelético distal al clampaje. El intestino ha sido preservado al realizarse el clampaje por debajo de la AMS, pues su inclusión incluiría el factor intestinal en la RIS y complicaría la interpretación de los resultados.

En conclusión, la existencia de 1) hipovolemia y 2) clampaje-desclampaje de la aorta suprarrenal inducen, aisladamente pero sobre todo de forma conjunta, una elevada RIS. Sus repercusiones no solo son sistémicas, sino también locales (distal al clampaje). La RIS provocada es global: elevación de los niveles de citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1 β e INF- γ), activación neutrofílica (MPO), mayor producción de RLO, MDA y NO. Conjuntamente existe una mayor expresión de ICAM-1, VCAM-1, NF κ B e iNOS. Si la cirugía aórtica de elevada RIS induce elevada FMO y

exitus, el control de todas estas variables tiene que ser de gran importancia para los resultados.

VI. CONCLUSIONES

1. El clampaje aórtico suprarrenal induce una importante Respuesta Inflamatoria Sistémica desde el inicio del desclampaje, que aumenta diariamente hasta las setenta y dos horas y que comienza a normalizarse al séptimo día.

2. La Respuesta Inflamatoria Sistémica induce una elevación de las tres citocinas proinflamatorias investigadas, desencadena de forma importante una activación neutrofilica, una producción de radicales libres de oxígeno, de mieloperoxidasa y de nitritos, así como una mayor expresión de diferentes moléculas de adhesión celular, del factor transcripcional κ B y de una mayor expresión de la sintasa del óxido nítrico inducible.

3. El clampaje suprarrenal, asociado a hemorrágica preclampaje, induce una fuerte respuesta inflamatoria a nivel renal, que hace que este órgano se dañe con gran intensidad y por dos mecanismos diferentes: respuesta inflamatoria sistémica e isquemia-reperfusión renal directa.

VII BIBLIOGRAFÍA

- 1 Adam D, Lee AJ, Bradbury AW, Ross J. Elevated levels of soluble tumor necrosis factor receptors are associated with increased mortality rates in patients who undergo operation for ruptured abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg* 2000; 31: 514-519.
- 2 Adembri C, Kastamoniti E, Bertolozzi L, Van S, Dorigo W, Coppo M, Pratesi C, De Gaudio AR, Gensini GF, Modesti PA. Pulmonary injury follows systemic inflammatory reaction in infrarenal aortic surgery. *Crit Care Med* 2004; 32: 1170- 1177.
- 3 Albelda SM, Smith CW, Ward PA. Adhesion molecules and inflammatory injury. *FASEB J* 1994, 8: 504-12.
- 4 Alkharfy KM, Kellum JA, Matzke GR. Unintended immunomodulation: Part I. Effect of common clinical conditions on cytokine biosynthesis. *Shock* 2000; 13: 333-345.
- 5 Alkharfy KM, Kellum JA, Matzke GR. Unintended immunomodulation: Part II. Effect of pharmacological agents on cytokine activity. *Shock* 2000; 13: 346-360.
- 6 Andreas Wibmer, MD; Maria Schoder, MD; Klaus et cols. Improved Survival After Abdominal Aortic Aneurysm Rupture by Offering Both Open and Endovascular Repair. *Arch Surg*. 2008; Jun. 143(6): 544-549.
- 7 Barry MC, Kelly C, Burke P, Sheehan SJ, Redmond HP, Bouchier-Hayes D. Immunological and physiological responses to aortic surgery: effect of reperfusion on neutrophil and monocyte activation and pulmonary function. *Br J Surg* 1997; 84: 513-519.
- 8 Barry MC, Wang JH, Nelly CJ, Sheehan SJ, Redmond HP, Bouchier-Hayes DJ. Plasma factors augment neutrophil and endothelial cell activation during aortic surgery. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1997; 13: 381-387.

- 9 Baue AE. Multiple, progressive or sequential systems failure. A syndrome of the 1970s. *Arch Surg* 1975; 110: 779-81.
- 10 Beg A, Ruben S, Scheinman R et al.: I κ B interacts with the nuclear localization sequences of the subunits of NF κ B; a mechanism of cytoplasmic retention. *Genes Dev* 1992, 6: 1728-1739.
- 11 Berg RD and Garlington AW: Translocation of certain indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph nodes and other organs in a gnotobiotic mouse model. *Infect Immun* 1979, 23: 403-411.
- 12 Bevilacqua MP and Pober JS: Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci* 1987, 84: 9238-9242.
- 13 Bohorquez Sierra JC, Doiz artazcoz E, Ocaña E. Proteína C Reactiva como factor pronóstico de mortalidad en los aneurismas de aorta abdominal rotos. *Angiología* 2005; 57 (3): 225-236.
- 14 Bown MJ, Fishwick G, Sayers RD, et al. Repair of ruptured abdominal aortic aneurysms by endovascular techniques. *Adv Surg*. 2007; 41: 63-80.
- 15 Bown MJ, Nicholson ML, Bell R, Sayers R. Cytokines and inflammatory pathways in the pathogenesis of multiple organ failure following abdominal aortic aneurysm repair. *Eur J Vasc Surg* 2001; 22: 485-495.
- 16 Burwell LS, Brookes PS. Mitochondria as a Target for the Cardioprotective Effects of Nitric Oxide in Ischemia-Reperfusion Injury. *Antioxid Redox Signal*. 2007 Dec ; 27 (12): 2524-2531.
- 17 Calvey CR, Toledo-Pereyra LH. Selectin inhibitors and their proposed role in ischemia and reperfusion. *J Invest Surg*. 2007 Mar-Apr; 20(2): 71-85.
- 18 Caplan MS and MacKendrick W: Inflammatory mediators and intestinal injury. *Clin Perinatol* 1994, 21: 235-246.

- 19** Chatterjee PK. Novel pharmacological approaches to the treatment of renal ischemia-reperfusion injury: a comprehensive review. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2007 Oct; 376(1-2): 1-43.
- 20** Chen H, Xing B, Liu X et al. Similarities between ozone oxidative preconditioning and ischemic preconditioning in renal ischemia/reperfusion injury. *Arch Med Res.* 2008 Feb; 39(2): 169-78.
- 21** Cheung WY: Calmodulin plays a pivotal role in cellular regulation. *Science* 1980, 207: 19-27.
- 22** Chuter TA., Howell BA.: Suprarenal stents and other advances in endovascular aneurysm repair. *Surg Clin North Am.* 2004 Oct; 84(5): 1319-35.
- 23** Crespi F. Dihydropyridines, nitric oxide and vascular protection. *Curr Vasc Pharmacol.* 2005; 3(2):195-205.
- 24** Deitch EA: Simple intestinal obstruction cause bacterial translocation in man. *Arch Surg* 1989, 124: 699-701.
- 25** Deitch EA, Specian RD, Grisham MB et al.: Zymosan-induced bacterial translocation: A study of mechanisms. *Crit Care Med* 1992, 20: 782-788.
- 26** Dezfulian C, Raat N, Shiva S. Et al. Role of the anion nitrite in ischemia-reperfusion cytoprotection and therapeutics. *Cardiovascular Research* 2007 75(2): 327-338.
- 27** Dustin M, Springer TA.: Lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) interaction with intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in one of at least three mechanisms for lymphocyte adhesion to cultured endothelial cells. *J Cell Biol* 1988, 107: 321.
- 28** Ernst CB. Abdominal aortic aneurysm. *N Engl J Med* 1993; 328: 1167-1172.
- 29** Evangelista V, Piccardoni P, White JG et al.: Cathepsin G-dependent platelet stimulation by activated polymorphonuclear leukocytes and its

- inhibition by antiproteinases: Role of P-selectin-mediated cell-cell adhesion. *Blood* 1993, 81: 2947-2957.
- 30** Fatini C, Sofi F, Sticchi E, et al. eNOS G894T polymorphism as a mild predisposing factor for abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg.* 2005 Sep; 42(3): 415-9.
- 31** Ferran C.: Protective genes in the vessel wall: modulators of graft survival and function. *Transplantation.* 2006; 82(1 suppl): S36-40.
- 32** Fiane AE, Videm V, Lingaas PS, Heggelund L, Nielsen EW, Geiran OR, Fung M, Mohines TE. Mechanism of complement activation and its role in the inflammatory response after thoracoabdominal aortic aneurysm repair. *Circulation* 2003 Aug 19; 108(7): 849-856.
- 33** Forsyth KD, Simpson AC and Levinsky RJ: CD 15 antibodies increase neutrophil adhesion to endothelium by an LFA-1 dependent mechanism. *Eur J Immunol* 1998, 19: 1331.
- 34** Foulds S, Galustian C, Mansfield AO, Schachter M. Transcription factor NF kappa B expression and postsurgical organ dysfunction. *Ann Surg* 200; 233: 70-78.
- 35** Franks S, Lloyd G, Fishwick G, et al. Endovascular treatment of ruptured and symptomatic abdominal aortic aneurysms. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2006; 31 (4): 345-50.
- 36** Froom AH, Greve JW, Van der Linden CJ, Buurman WA. Increased concentrations of cytokines and adhesion molecule patients after repair of abdominal aortic aneurysm. *Eur J Surg* 1996; 162: 287-296.
- 37** Gabriel EA, Locali RF, Romano CC et al. Analysis of the inflammatory response in endovascular treatment of aortic aneurysms. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2007 Mar; 31(3): 412-3.
- 38** Gallagher WM, Lynch I, Allen LT et al. Molecular basis of cell-biomaterial interaction: insights gained from transcriptomic and proteomic studies. *Biomaterials.* 2006 Dec; 27(35): 5871-82.

- 39** Galle D, De Maertelaer V, Motte S, Zhou L, Stordeur P, Delville JP, et al. Early inflammatory response after elective abdominal aortic aneurysm repair: a comparison between endovascular procedures and conventional surgery. *J Vasc Surg* 2000; 32: 234-246.
- 40** Gaobury J, Woodman RC and Granger DN: NO prevents leukocyte adherence: Role of superoxide. *Am J Physiol* 1993, 265: H 862-7.
- 41** García Criado FJ, Eleno N, Santos Benito F et al.: Protective effect of exogenous nitric oxide on the renal function and inflammatory response in a model of ischemia-reperfusion. *Transplantation* 1998, 66: 982-990.
- 42** García Criado FJ, Lozano Sánchez F, Gómez-Alonso A et al.: Possible Tacrolimus action mechanisms in its protector effects on ischemia-reperfusion injury. *Transplantation* 1998, 66: 942-943.
- 43** García Honduvilla M., Gimeno MJ, Lopez-Sanchez R, et al. Caracterización y biocompatibilidad de las prótesis vasculares de poliuretano estabilizado con polidimetilsiloxano. *Angiología* 2002; 54 (4): 270-281.
- 44** Garrigues GE., Cho DR., Rubash HE., et al.: Gene expression clustering using self-organizing maps: analysis of the macrophage response to particulate biomaterials. *Biomaterials* 2005 Jun; 26(16): 2933-45.
- 45** Gauthier TW, Davenpeck KL and Lefer AM: Nitric oxide attenuates leukocyte-endothelial interaction via P-selectin in splanchnic ischemia-reperfusion. *Am J Physiol* 1994, 267: G562-G568.
- 46** Golias C, Tsoutsi E, Matziridis A et al. Review. Leukocyte and endothelial cell adhesion molecules in inflammation focusing on inflammatory heart disease. *In Vivo*. 2007 Sep-Oct; 21(5): 757-69.
- 47** Gorbunov NV, Das DK, Goswami SK, Gurusamy N et al. Spatial coordination of cell-adhesion molecules and redox cycling of iron in the microvascular inflammatory response to pulmonary injury. *Antioxid Redox Signal*. 2007 Apr; 9(4): 483-95.

- 48** Goris RJ, Boekhorst T, Van Bebber JP. Multiple organ failure and sepsis with bacteria. *Arch. Surg.* 1983; 121: 897-901.
- 49** Granger DN: Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol* 1988, 255: H1269-H1275.
- 50** Greco F., Frigatti P., Antonello M., et al.: Suprarenal fixation of endograft in abdominal aortic aneurysm treatment: focus on renal function. *Ann Surg.* 2004 Jul; 240(1): 169-178.
- 51** Grilli M, Chiu J and Lenaro M: NFkB and Rel participants in a multiform transcriptional regulatory system. *Int Rev Cytol* 1993, 143: 1-62.
- 52** Grumbach IM, Chen W, Mertens SA et al. A negative feedback mechanism involving nitric oxide and nuclear factor kappa-B modulates endothelial nitric oxide synthase transcription. *J Mol Cell Cardiol.* 2005 Oct; 39(4): 595-603.
- 53** Guo W, Soltesz V, Dinng JW et al.: Abdominal rubber drain pieces aggravates intraabdominal sepsis in the rat. *Eur J Clin Invest* 1994, 24: 540-547.
- 54** Gutierrez Carreño R. Aneurismas de aorta. *Angiología.* 2005; 32 (4): 114-125.
- 55** Hallstrom S., Franz M., Gasser H. Et al. S-nitroso human serum albumin reduces ischaemia/reperfusion injury in the pig heart after unprotected warm ischaemia. *Cardiovasc Res*, February 1, 2008; 77(3): 506 - 514.
- 56** Harkin D W, Rubin B B, Romaschin A et als. Selective inducible nitric oxide synthase (iNOS) inhibition attenuates remote acute lung injury in a model of ruptured abdominal aortic aneurysm. *J. Surg. Res.* 2004; 120: 230-241.
- 57** Harlan J, Winn R, Vedder N et al.: In vivo models of leukocyte adherence to endothelium. En: Harlan and Liu Eds. *Adhesion: Its role in inflammatory disease.* Freeman and Company, New York 1992, 117-150.

- 58** Helewski K, Kowalczyk-Ziomek G, Konecki J. Effect of ischemia and reperfusion on liver circulation changes. *Wiad Lek.* 2004; 57: 468-72.
- 59** Hession C, Osborn L, Goff D et al.: Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: Direct expression cloning and functional interaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990, 87: 1673.
- 60** Holmberg A, Bergqvist D, Westman B, Siegbahn. Cytokine and fibrinogen response in patients undergoing open abdominal aortic aneurysm surgery. *Eur J Vasc Surg* 1999; 17: 294-300.
- 61** Holzheimer RG, Gross J, Schein M. Pro and anti-inflammatory cytokine response in abdominal aortic aneurysm repair: a clinical model of ischemia-reperfusion. *Shock* 1999; 11: 305-310.
- 62** Horton JW: Alterations in intestinal permeability and blood flow in a new model of mesenteric ischemia. *Circ Shock* 1992, 36: 134-139.
- 63** Jaeschke H, Farhood A, Bautista AP et al.: Functional inactivation of neutrophils with a Mac-1 (CD11b/CD18) monoclonal antibody protects against ischemia-reperfusion injury in rat liver. *Hepatology* 1993, 17: 915-923.
- 64** Jedynak M, Siemiatkowski A, Gacho M, Mroczko B, Borkowski J. Serum concentrations of MCP-1 and RANTES in patients due aortic surgery: the relationship with ischemia-reperfusion. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2004; 53: 201-207.
- 65** Ji JY, Jing H, Diamond SL. Hemodynamic Regulation of Inflammation at the Endothelial-Neutrophil Interface. *Ann Biomed Eng.* 2008 Apr; 36(4): 586-95
- 66** Ji Y, Ferracci G, Warley A et al. beta-Actin regulates platelet nitric oxide synthase 3 activity through interaction with heat shock protein 90. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 May 22; 104(21): 8839-44.
- 67** Kanwar S, Kubes P. Nitric oxide is antiadhesive molecule for leukocytes. *New Horiz* 1995; 3: 93-104.

- 68** Katz DJ, Stanley JC, Zelenock GB. Operative mortality rate for intact and ruptured abdominal aortic aneurisms in Michigan: an eleven year statewide experience. *J Vasc Surg* 1994; 19: 804-815.
- 69** Khanna A, Cowled PA, Fitridge RA. Nitric oxide and skeletal muscle reperfusion injury: current controversies (research review). *J Surg Res.* 2005; 128: 98-107.
- 70** Kiang JG. Inducible heat shock protein 70 kD and inducible nitric oxide synthase in hemorrhage/resuscitation-induced injury. *Cell Res.* 2004; 14: 450-9.
- 71** Kim JS, Ohshima S, Padiaditakis P, Lemasters JJ. Nitric oxide: a signaling molecule against mitochondrial permeability transition- and pH-dependent cell death after reperfusion. *Free Radic Biol Med.* 2004; 15; 37:1943-50.
- 72** Kluger M.J and Liu DY: Interleukin 1, tumor necrosis factor, and ischemic injury. In Zelenock GB, D'Alecy LG, Fantone JC Eds. *Clinical ischemic syndromes: mechanisms and consequences of tissue injury.* Philadelphia: Mosby 1990, 287-302.
- 73** Kobayashi T, Ohmori T, Yanai M et al.: The analysis of the defense mechanism against indigenous bacterial translocation in X-irradiated mice. *Microbiol Immunolog* 1991, 35: 315-324.
- 74** Koopman G, Van Kooyk Y, De Graaff M et al.: Triggering of the CD44 antigen on T lymphocytes promotes T cell adhesion through the LFA-1 pathway. *J Immunol* 1990, 145: 3589-3594.
- 75** Kubes P, Suzuki M and Granger DN: Platelet-activating factor-induced microvascular dysfunction: the role of adherent leukocytes. *Am J Physiol* 1990, 258: G158-G160.
- 76** Kuo YR, Wang FS, Jeng SF et als. Nitrosoglutathione improves blood perfusion and flap survival by suppressing iNOS expression in the flap vessels after ischemia/reperfusion injury. *Surgery* 2004; 135:437-446.

- 77** Kurose I, Anderson DC, Miyasaka M et al.: Molecular determinants of reperfusion-induced leukocyte adhesion and vascular protein leakage. *Circ Res* 1994, 74: 336-343.
- 78** Lange C., Hobo R., Leirs LJ., et al. : Results of endovascular repair of inflammatory abdominal aortic aneurysms. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2005 Apr; 29(4): 363-70.
- 79** Larsen E, Palabrica T, Sajer S et al.: PADGEM dependent adhesion of platelets to monocytes and neutrophils is mediated by a lineage-specific carbohydrate, LNF III (CD15). *Cell* 1990, 63: 467-471.
- 80** Lau LL, Halliday MI, Smye MG, Lee B, Hannon RJ, Gardiner KR, Song CV. Extraperitoneal approach reduces intestinal and renal dysfunction in elective abdominal aortic aneurysm repair. *Int Angiol* 2001; 20: 282-287.
- 81** Leblic-Ramirez Gutierrez-Nistal L, Fernández-Heredero A, et al. Experiencia en nuestro centro en el tratamiento de aneurismas de la aorta infrarrenal rotos mediante prótesis endovasculares *ANGIOLOGÍA* 2006; 58: 193-204
- 82** Lee WA, Hirneise CM, Tayyarah M, Huber TS, Seeger JM. Impact of endovascular repair on early outcomes of ruptured abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg* 2004; 40: 211-215.
- 83** Lefer DJ, Nakanishi K, Johnston WE et al.: Antineutrophil and myocardial protection actions of a novel nitric oxide donor after acute myocardial ischemia and reperfusion in dogs. *Circulation* 1993, 88: 2337-50.
- 84** Lindsay T, Lou X, Lehotay D, Rubin B, Anderson M, Walker P, Romanschin A. Ruptured abdominal aortic aneurysm, a “two-hit” ischemia/reperfusion injury: Evidence from an analysis of oxidative products. *J Vasc Surg* 1999; 30(2) :219-28.

- 85** Liu X, Chen H, Zhan B et al. Attenuation of reperfusion injury by renal ischemic postconditioning: the role of NO. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007 Aug 3; 359(3): 628-34.
- 86** Lonehampt M, Guardiola ., Sicot N et al.: Protective effect of a purified flavonoid fraction against reactive oxygen radicals. In vivo and in vitro study. *Arzeim-Forsch/ Drugnes* 1989, 39: 882-885.
- 87** López Espada C, Linares Palomino JP, Escames G et al. Relación del óxido nítrico con el síndrome de isquemia/repercusión en el pinzamiento aórtico. *Angiología* 2005; 57 (1): 19-36.
- 88** López Espada. Óxido nítrico : Puesta al día. *Angiología* 2005; 57(3): 253-258.
- 89** López Neblina F, Páez Rollys A, García Criado FJ et al.: El óxido nítrico exógeno previene el rodamiento y la adhesión leucocitaria en la isquemia mesentérica en la rata. *Cirujano General* 1995, 17: 90-93.
- 90** López-Neblina F, Toledo-Pereyra LH, Toledo AH, Walsh J. Ryanodine receptor antagonism protects the ischemic liver and modulates TNF-alpha and IL-10. *J Surg Res.* 2007 Jun 1; 140(1): 121-8.
- 91** López-Neblina F, Toledo-Pereyra LH. Phosphoregulation of signal transduction pathways in ischemia and reperfusion. *J Surg Res.* 2006 Aug; 134(2): 292-9.
- 92** Lorant DE, Topham M, Whatley RE et al.: Inflammatory roles of P-selectin. *J Clin Invest* 1993, 92: 559-570.
- 93** Lozano F S, Lopez Novoa J M, Rodriguez JM et als. Exogenous nitric oxide modulates the systemic inflammatory response and improves kidney function alter risk-situation abdominal aortic. *J Vasc. Surg.* 2005; 42: 129-39.
- 94** Lozano FS, Barros MB, Garcia Criado FJ, Gomez Alonso A. Exogenous nitric oxide can control SIRS and downregulate NFkB. *J Surg Res* 2005; 124: 52-58.

- 95** Lozano Sánchez FS, Gonzalez-Sarmiento R. Systemic inflammatory response, bacterial translocation and nitric oxide donors. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2007 Jun;6(2): 139-41.
- 96** Lukacs NW, Chensue SW, Strieter RM et al.: Inflammatory granuloma formation is mediated by TNF- α -inducible intercellular adhesion molecule-1. *J Immunol* 1994, 152: 5883-5889.
- 97** Manning MW, Cassi LA, Huang J, Szilvassy SJ, Daugherty A. Abdominal aortic aneurysms: fresh insights from a novel animal model of the disease. *Vasc Med*. 2002; 7(1): 45-54.
- 98** Marletta MA, Tayeh MA and Hevel JM: Unraveling the biological significance of nitric oxide. *Biofactors* 1990, 2: 219-223.
- 99** Marshall JC: The ecology and immunology of gastrointestinal tract in health and critical illness. *J Hosp Infect* 1991, 19: 7-17.
- 100** Martinez-Revelles S, Jimenez-Altayo F, Caracuel L et al. Endothelial dysfunction in rat mesenteric resistance artery after transient middle cerebral artery occlusion. *J Pharmacol Exp Ther*. 2008 May; 325 (2): 363-369 .
- 101** Masedunskas A, King JA, Tan F et al. Activated leukocyte cell adhesion molecule is a component of the endothelial junction involved in transendothelial monocyte migration. *FEBS Lett*. 2006 May 15; 580(11): 2637-45.
- 102** McCord JM: Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Eng J Med* 1985, 312: 159-163.
- 103** McEver RP. Leukocyte-endothelial cell interactions. *Curr Opin Cell Biol* 1992, 4: 840-849.
- 104** McEver RP: Selectins: Novel receptors that mediate leukocyte adhesion during inflammation. *thromb. Haemost* 1991, 65: 223-228.
- 105** Mertens R, Valdés F, Kramer A. Tratamiento endovascular del aneurisma de aorta. *Rev Chil Cir* 2004; 56: 3-11.

- 106** Ming WJ, Bersani L and Mantovani A: Tumor necrosis factor is chemotactic for monocytes and polymorphonuclear leukocytes. *J Immunol* 1987, 138: 1469-1473.
- 107** Misas Menendez M, Hernandez Lara A, Iraola Ferrer M. La disfunción orgánica múltiple. Un síndrome de relevancia en nuestra práctica. Aspectos etiológicos y fisiopatológicos. *Rev Electrón Biomed* 2005; 2: 23-38.
- 108** Misra HP and Fridovich Y: The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1972, 247: 3170-3175.
- 109** Nishimura M, Izumiya Y, Higuchi A et al. Adiponectin prevents cerebral ischemic injury through endothelial nitric oxide synthase dependent mechanisms. *Circulation*. 2008 Jan 15; 117(2): 216-23.
- 110** Norwood MG, Bown MJ, Sayers RD. Ischaemia-reperfusion injury and regional inflammatory responses in abdominal aortic aneurysm repair. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2004; 28: 234-45.
- 111** Norwood MG, Lloyd GM, Bown MJ. et al. Endovascular abdominal aortic aneurysm repair. *Postgrad Med J*. 2007; 83 (975): 21-7.
- 112** Odergard A, Lundbom J, Myhre HO, Hatlinghus S, Bergh K, Waage A, et al. The inflammatory response following treatment of abdominal aortic aneurysms: a comparison between open surgery and endovascular repair. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2000;1 9: 536-544.
- 113** Ozturk H, Aldemir M, Buyukbayram H et al. The effects of the nitric oxide donor molsidomine prevent in warm ischemia/reperfusion injury of the rat renal-a functional and histopathological atudy. *Int Urol Nephrol* 2001; 32:601-7.
- 114** Pacher P., Beckman JS., Liaudet L.: Nitric Oxide and Peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev*. 2007; 89: 315-424.

- 115** Pape HC, Dwenger A, Gollub F and Sturm JA: Intestinal permeability and multiple organ failure after polytrauma. Surgical Infection Society. 12 Annual Meeting. Los Angeles. California 1992.
- 116** Pararajasingam R, Weight SC, Bell PR, Nicholson ML, Sayers RD. Endogenous renal nitric oxide metabolism following experimental infrarenal aortic cross clamp induced ischemia reperfusion injury. *Br J Surg* 1999; 86: 795-799.
- 117** Pararajasingam R, Weight SC, Bell PR, Nicholson ML, Sayers RD. Pulmonary nitric oxide metabolism following infrarenal aortic cross-clamp-induced ischaemia-reperfusion injury. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2000; 19: 47-51.
- 118** Parreño Manchado F : Modulación de la interacción leucocito endotelio con GM 1998-016 en un modelo inflamatorio de translocación bacteriana inducido por Zymosan A. Tesis Doctoral 1997. Universidad de Salamanca.
- 119** Pasqui AJ, and Capechi PI: Nitroprusside in vitro inhibits platelet aggregation and intracellular calcium translocation: Effect of hemoglobin. *Thromb Res* 1994, 61: 113-122.
- 120** Paterson IS, Smith FC, Tsang GM, Hamer JD, Shearman CP. Reperfusion plasma contains a neutrophil activator. *Ann Vasc Surg* 1993; 7: 68-75.
- 121** Peppelenbosch N, Zannetti S, Barbieri B, et al. Endograft treatment in ruptured abdominal aortic aneurysms using the Talent ®AUI stent-graft system. Design of a feasibility study. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2004; 27: 366-71.
- 122** Pober JS, and Lapierre LA: Activation of cultured human endothelial cells by recombinant lymphotoxin: Comparison with tumor necrosis factor and interleukin 1 species. *J Immunol* 1987, 138: 3319-3324.

- 123** Razavi HM, Hamilton JA, Feng Q. Modulation of apoptosis by nitric oxide: implications in myocardial ischemia and heart failure. *Pharmacol Ther.* 2005; 106: 147-62.
- 124** Ridings PC, Julita MA, Fisher BJ et al.: Sepsis-induced acute lung injury is attenuated by selectin blockade following the onset of sepsis. SIS 15 Annual Meeting. Louisville, Kentucky 1995.
- 125** Rodriguez Peña A, Garcia Criado F J, Eleno N et als. Intrarenal administration of moldosimine, a molecule releasing nitric oxide reduces renal ischemia-reperfusion injury in rats. *Am J Transplant* 2004; 4: 1605-13.
- 126** Roumen RM, Hendriks T, van der Ven-Jongekrijg J, Ieuwenhuijzen GA, Sauerwein RW, van der Meer JW, Goris RJ. Cytokine patterns in patients after major vascular surgery, hemorrhagic shock and severe blunt trauma. Relation with subsequent adult respiratory distress syndrome and multiple organ failure. *Ann Surg* 1993; 218: 769-776.
- 127** Rubin B, Sanchez L, Choi E, et al.. Endoluminal repair of ruptured abdominal aortic aneurysm under local anesthesia: initial experience. *Vasc Endovasc Surg* 2004;38: 203-07.; Mertens R, Valdés F, Kramer A. Tratamiento endovascular del aneurisma de aorta. *Rev Chil Cir* 2004; 56: 3-11.
- 128** Salom MG, Cerón SN, Rodriguez F et al. Heme oxygenase-1 induction improves ischemic renal failure: role of nitric oxide and peroxynitrite. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007 Dec; 293(6): H3542-9.
- 129** Sanders WE, Wilson RW, Ballantyne CM et al.: Molecular cloning and analysis of in vivo expression of murine P-selectin. *Blood* 1992, 80: 795-800.
- 130** Sandford RM, Bown MJ, Sayers RD, Fishwick G, London NJ, Nasim A. Endovascular abdominal aortic aneurysm repair: 5-year follow-up results. *Ann Vasc Surg.* 2008 May-Jun; 22(3): 372-8

- 131** Sayers R-D. Aortic aneurysms, inflammatory pathways and nitric oxide. *Anal-of-the-Royal-College-of-Surgeons-of-England*. 2002 Jul; 84: 239-46.
- 132** Scales WE, Campbell JR, Green ME et al.: Hepatic ischemia/reperfusion injury: Importance of oxidant/tumor necrosis factor interactions. *Am J Physiol* 1994, 267: G1122-1127.
- 133** Schmiedt CW., Schwab MC., Dubielzig RR., et al.: Trophic factor supplemented UW solution reduces intimal hyperplasia in the rat aortic transplant model. *Cryobiology*. 2007; 54(2): 204-11.
- 134** Seal JB, Gewertz BL. Vascular dysfunction in ischemia-reperfusion injury. *Ann Vasc Surg*. 2005; 19: 572-84.
- 135** Seekamp A, Mulligan MS, Till GO et al.: Requirements for neutrophil products and L-arginine in ischemia-reperfusion injury. *Am J Pathol* 1993, 142: 1217-1226.
- 136** Seren M, Budak B, Turan N, Parlar AI, Akar F, Ulus AT. Collaborative therapy with nebivolol and L-NAME for spinal cord ischemia/reperfusion injury. *Ann Vasc Surg*. 2008 May-Jun; 22(3):372-8.
- 137** Sharkey J and Butcher SP:Immunophilins mediate the neuroprotective effects of FK506 in focal cerebral ischaemia.*Nature* 1994, 371: 336-339.
- 138** Shindo S, Kubota K, Kojima A, Matsumoto M. A comparison of the inflammatory response and the recovery of bowel function between trans- and extraperitoneal approaches of abdominal aortic aneurysmectomy. *Int Angiol*. 2005 Dec; 24 (4) : 355-8.
- 139** Siegfried MR, Erhardt J, Rider T et al.: Cardioprotection and attenuation of endothelial dysfunction by organic nitric oxide donors of endothelial dysfunction by organic nitric oxide donors in myocardial ischemia-reperfusion. *J Pharmacol Exp Ther* 1992, 260: 668-675.
- 140** Silver MJ, Sutton JM, Hook S et al.: Adjunctive selectin blockade successfully reduces infarct size beyond thrombolysis in the electrolytic canine coronary artery model. *Circulation* 1995, 92: 492-499.

- 141** Simmons D, Makgoba MW and Seed B: ICAM and adhesion ligand of LFA-1, is homologous to the neural cell adhesion molecule NCAM. *Nature* 1988, 331: 624-628.
- 142** Sirham M, Mochhala SM, Kerwin SY, Ng KC, Lu J. Influence of selective nitric oxide synthetase inhibitor for treatment of refractory haemorrhagic shock. *Resuscitation* 2004; 61: 221-229.
- 143** Spath G: Fiebre, an essential ingredient in enteral diets to prevent bacterial translocation to mesenteric lymph nodes in rats. *Surgical Infection Society-Europe. 6 Annual Meeting. Varese, Italy* 1993.
- 144** Suzuki S, Toledo-Pereyra LH, Rodriguez FJ et al.: Neutrophil infiltration as an important factor in liver ischemia and reperfusion injury. Modulating effects of FK506 and cyclosporine. *Transplantation* 1993, 55: 1265-1272.
- 145** Suzuki S, Toledo-Pereyra LH, Rodriguez FJ et al.: Physiopathological advantages of portosystemic shunting for studies of total hepatic ischemia and reperfusion injury in the rat. *Transplantation* 1992, 3: 96-101.
- 146** Swartbol P, Norgren L, Albrechtsson U, Cwikiel W, Jahr J, Jonung T, Parsson H, Ribbe E, Thorne J, Trudsson L, Zdanowski Z. Biological responses differ considerably between endovascular and conventional aortic aneurysms surgery. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1996; 12: 18-25.
- 147** Swartbol P, Truedsson L, Norgren L. The inflammatory response and its for the clinical outcome following aortic aneurysm repair. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2001; 21: 393-400.
- 148** Szocs K. Endothelial dysfunction and reactive oxygen species production in ischemia/reperfusion and nitrate tolerance. *Gen Physiol Biophys.* 2004; 23(3): 265-95.
- 149** Taga K and Tosato G: IL-10 inhibits human T cell proliferation and IL-2 production. *J Immunol* 1992, 148:1143-1148.

- 150** Takada M, Nadeau KC, Shaw GD, Marquette KA, Tilney NL. The cytoquine-adhesion molecule cascade in ischaemia/reperfusion injury of the rat kidney. Inhibition by soluble P-selectin ligand. *J Clin Invest* 1997; 99: 2682-2690.
- 151** Tambyraja A, Dawson R, Valenti D et al. Systemic inflammation and repair of abdominal aortic aneurysm. *World J Surg* 2007; 31 (6): 1210-14.
- 152** Tanaka S, Kamiike W, Kosaka H et al.: Detection of nitric oxide production and its role in pancreatic ischemia-reperfusion in rats. *Am J Physiol.* 1996, 271: G405-G409.
- 153** Tassiopoulos A, Carlin R, Gao Y, Pedoto A, Finck CM, Landas SK, Tice DG Marx W, Hakin TS, McGraw DJ. Role of nitric oxide and tumor necrosis factor on lung injury caused by ischemia-reperfusion of the lower extremities. *J Vasc Surg* 1997; 26: 647-656.
- 154** Thanos D and Maniatis T: NFkB: A lesson in family values. *Cell* 1995, 80: 529-532.
- 155** Thompson MM, Nasim A, Sayers RD, Thomson J, Smith G, Lunes J, Bell PRF. Oxygen free radical and cytokine generation during endovascular and conventional aneurysm repair. *Eur J Vasc Endovasc Surg.*1996; 12: 70-75.
- 156** Tilney NY, Baile GL, Morgan Ap. Secuential systems failure rupture abdominal aortic aneurysms: An unsolved problem in postoperative care. *Ann Surg.* 1973; 178: 117-122.
- 157** Toledo-Pereyra LH, Lopez-Neblina F, Toledo AH. Reactive oxygen species and molecular biology of ischemia/reperfusion. *Ann Transplant.* 2004; 9(1): 81-3.
- 158** Torres Carranza SA. Trauma Vascular de las extremidades y un poco de historia. *Trauma.* 2006; 9 (3): 83-86.

- 159** Vadas M and Gamble J: Regulation of myeloid blood cell-endothelial interaction by cytokines. in adhesion: Its role in inflammatory disease. Harlan and Liu Eds. Freeman and Company, New York 1992, 65-81.
- 160** Valdés F, Mertens R, Krämer A et al. Endovascular repair of abdominal aortic aneurysm. Results in 80 consecutive patients. Rev Med Chil. 2006 Oct;134(10): 1265-74.
- 161** Valduciel-García JJ: Valoración de la inhibición de la P-selectina con PB 1.3, CY-1503 (Slex) y gm 1998-016 en un modelo experimental de isquemia-reperfusión hepática total. Tesis Doctoral 1996. Universidad de Salamanca.
- 162** Vasdekis SN, Argentou M, Kakisis JD et al. A global assessment of the inflammatory response elicited upon open abdominal aortic aneurysm repair. Vasc Endovascular Surg. 2008 Feb-Mar; 42(1): 47-53.
- 163** Vollmar B, Menger MD, Glasz J et al.: Impact of leukocyte-endothelial cell interaction in hepatic ischemia-reperfusion injury. Am J Physiol 1994, 267: G786-793.
- 164** Weight SC, Bell PRF, Nicholson ML. Renal ischaemia-reperfusion injury. Br J Surg 1996; 83: 162-170.
- 165** Weight SC, Furness PN Nicholson ML et al. Biophasic role for nitric oxide in experimental renal warm ischaemia reperfusion injury. BR j Surg. 1999; 86: 1039-46.
- 166** Weyrich AS, MA XL and Lefer AM: The role of L-Arginine in ameliorating reperfusion injury after myocardial ischemia in the cat. Circulation 1992, 86: 279-288.
- 167** Winn RK, Sharar SR, Vedder NB et al.: Leukocyte and endothelial adhesion molecules in ischemia/reperfusion injuries. Ciba Found. Symp 1995, 189: 63-71.
- 168** Yu L, Gengaro PE, Niederberger M et al.: Nitric oxide: A mediator in rat tubular hypoxia/reoxygenation injury. Proc Natl Acad Sci USA 1994, 91: 1691-1695.

169 Zimmerman BJ and Grager. Lesión por Reperfusion. Clínica Quirúrgica
NY. 1992; 120:61-78