

# UNIVERSIDAD DE SALAMANCA



## FACULTAD DE MEDICINA DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA

### TESIS DOCTORAL

**“RESPUESTA INFLAMATORIA Y CIRUGÍA PROTÉSICA.  
SU CONTROL CON DONADORES DE ÓXIDO NÍTRICO”**

**DOCTORANDA**

**Dña. Mónica 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 **“RESPUESTA INFLAMATORIA Y CIRUGÍA PROTÉSICA. SU CONTROL CON DONADORES DE ÓXIDO NÍTRICO”**, ha sido realizada por Dña. Mónica 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 **“RESPUESTA INFLAMATORIA Y CIRUGÍA PROTÉSICA. SU CONTROL CON DONADORES DE ÓXIDO NÍTRICO”**, presentada por Dña. Mónica 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 la memoria de mi padre**

# ÍNDICE:

<b>I. ESTADO ACTUAL DEL PROBLEMA</b>	<b>1</b>
1.- Introducción	2
2.- Prótesis y biomateriales	5
2.1.- Prótesis, biomateriales y respuesta inflamatoria	5
2.2.- Sustitutivos vasculares	8
2.2.1 Transplantes autoplásticos	9
2.2.2 Transplantes homoplásticos	11
2.2.3 Transplantes heteroplásticos	12
2.3.- Endoprótesis vasculares	14
2.4.- Importancia de la composición y fabricación del injerto	15
2.5.- Implante de materiales protésicos intraabdominales	17
3.- Inflamación	20
3.1.- Concepto y generalidades	20
3.2.- Interacción leucocito-endotelio	22
3.3.-Mediadores químicos de la inflamación	24
3.4.- Papel del óxido nítrico	40
4.- Síndrome inflamatorio postperfusión	46
4.1.- Lesión por isquemia	46
4.2.- Lesión por reperfusión	50

<b>II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	<b>56</b>
1.- Hipótesis	57
2.- Objetivos	57
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>58</b>
1.- Materiales	59
1.1.- Instalaciones	59
1.2.- Instrumental y equipo	59
1.3.- Análisis y presentación de los resultados	61
2.- Métodos	63
2.1.- Animal de experimentación	63
2.2.- Técnica anestésica	64
2.3.- Técnica quirúrgica	66
2.4.- Grupos experimentales de trabajo	66
2.5.- Variables estudiadas y técnicas de determinación	67
2.6.- Tiempo de muestras	75
2.7.- Estudios estadísticos	75

<b>IV. RESULTADOS</b>	<b>76</b>
1.- Supervivencia y función renal	77
2.- Citocinas proinflamatorias en plasma	79
3.- Citocinas antiinflamatorias en plasma	84
4.- Infiltración neutrofílica a nivel renal	87
5.- Nitritos séricos	89
6.- Radicales libres de oxígeno	90
7.- Sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS) renal	93
8.- Expresión de ICAM-1 , VCAM-1 y PECAM-1 en Riñón	94
9.-Expresión de NFκB	97
<b>V. DISCUSIÓN</b>	<b>98</b>
1.- Introducción	99
2.- Discusión del modelo y diseño experimental	102
2.1.- Animal de experimentación	102
2.2.- Tipo de agresión	102
2.3.- Obtención de muestras	102
2.4.- Variables estudiadas	103
3.- Discusión de los resultados	105
<b>VI. CONCLUSIONES</b>	<b>115</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>117</b>

## **I. ESTADO ACTUAL DEL PROBLEMA**

# 1. INTRODUCCION

Las prótesis y biomateriales utilizadas en cualquier tipo de cirugía reconstructiva provocan una respuesta inflamatoria crónica <sup>(311, 298, 5)</sup>. La regulación de la respuesta inflamatoria podría ser una estrategia para disminuir ó limitar el daño tisular en los pacientes quirúrgicos que precisan la colocación de una prótesis <sup>(9, 276, 186, 108, 39, 175, 220, 121, 186, 160, 248, 120)</sup>, siendo especialmente relevante el control de la respuesta inflamatoria en la cirugía aórtica.

En los últimos años se ha producido un gran desarrollo de la bioingeniería y los progresos en la fabricación y diseño de nuevos biomateriales han permitido grandes avances en la restauración de órganos o partes corporales ausentes. Pero a la vez numerosas publicaciones demuestran que en este tipo de cirugía pueden surgir complicaciones biológicas derivadas en ocasiones de la falta de control de la respuesta inflamatoria del organismo a la prótesis.

Las prótesis deben asemejarse lo más posible al órgano o parte corporal a la que van a sustituir y es imprescindible exigir a los fabricantes información exhaustiva y certificada por organismos independientes, de las características morfológicas y de composición de los biomateriales que se ofertan, así como de los controles de calidad a los que han sido sometidos.

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 <sup>(266)</sup>. En el papiro de Ebers (2000 a.c.) hay descripciones que podrían corresponder a

aneurismas traumáticos de las arterias periféricas <sup>(253)</sup>. En Occidente, Galeno fue el primero que describió los aneurismas y los definió: “Cuando las arterias se agrandan, esta enfermedad se denomina aneurisma” <sup>(90)</sup>.

Los aneurismas de aorta abdominal (AAA) constituyen una afección vascular muy común <sup>(234,171)</sup>, cuya incidencia está aumentando, y de especial gravedad dado que su evolución natural es hacia un crecimiento progresivo que termina invariablemente en la rotura aneurismática. De ahí, la gran importancia de su detección, diagnóstico y tratamiento precoz, para evitar el trágico final al que están abocados estos enfermos <sup>(61,178,36,181)</sup>.

Así mismo, las reparaciones del AAA representan un desafío para el cirujano vascular por las complicaciones derivadas de los clampajes y desclampajes de la aorta, con fases de isquemia seguidas de periodos de reperfusión que van a originar profundas agresiones fisiológicas en casi todos los sistemas orgánicos, desencadenando una respuesta inflamatoria sistémica <sup>(8)</sup>. Se ha investigado mucho sobre el papel que podría jugar el óxido nítrico (NO) en el proceso inflamatorio, y en concreto en los procesos secundarios a isquemia-reperfusión, otorgándole últimamente un efecto protector <sup>(186)</sup>. El óxido nítrico es un mediador importante de la respuesta inflamatoria, y un aumento de sus niveles puede proteger de la lesión renal causada por el clampaje aórtico durante la reparación del aneurisma aórtico <sup>(258, 188, 98, 248, 173, 39, 220, 228, 186, 187, 121, 175, 108, 160)</sup>. En modelos de isquemia-reperfusión renal<sup>(74)</sup> se ha comprobado como el NO juega un papel muy importante en la regulación del flujo renal, así como en la excreción de sodio y agua en condiciones fisiológicas y durante el fallo renal agudo secundario a isquemia-reperfusión.

El desarrollo de la bacteriología ha permitido un mayor control de las infecciones quirúrgicas, no obstante, las complicaciones infecciosas continúan siendo una causa importante de morbi-mortalidad en los pacientes quirúrgicos. Después de una reconstrucción arterial, la infección del campo operatorio es una complicación rara pero desastrosa, y si la prótesis se ve afectada, la infección persistirá y asentará a nivel de la línea de sutura provocando una hemorragia <sup>(301)</sup>.

Las fuentes de contaminación bacteriana pueden ser diversas (piel y periné, vía linfática etc.) y algunas mal conocidas.

Con la aparición del fenómeno de la “Translocación Bacteriana” (TB) surge una nueva fuente de contaminación. Este fenómeno consiste en el paso de bacterias desde la luz intestinal hacia otros sectores del organismo (vísceras, sangre, ganglios linfáticos etc.) sin que exista solución de continuidad en la pared intestinal ni en la barrera mucosa de la misma.

Cualquier germen es causa potencial de infección de prótesis e injertos, y en patología vascular los microorganismos responsables de las infecciones son variados, siendo los más frecuentes el *Staphylococcus aureus* coagulasa positivo y el *Escherichia Coli*, cuyo hábitat es fundamentalmente el aparato gastrointestinal del paciente.

Se ha comprobado que el implante de materiales protésicos y biomateriales inducen TB existiendo relación entre el tamaño de éstos y el grado de TB inducida.

Cuando existen circunstancias productoras ó predisponentes el fenómeno de la TB puede verse incrementado <sup>(67)</sup>, lo cual es de gran trascendencia dada la gravedad que conlleva la infección de materiales protésicos en cirugía vascular (hemorragia postoperatoria, isquemia, pérdida de extremidad, mortalidad...).

La respuesta inflamatoria juega un importante papel en la patogénesis de los AAA, por lo que su regulación podría contribuir a prevenir la ruptura del aneurisma<sup>(291,274)</sup>. Por otra parte, tanto la reparación del AAA endovascular como la convencional provocan respuestas inflamatorias significativas por lo que el control de la respuesta inflamatoria podría contribuir a prevenir el daño que por extensión puede producirse en los tejidos cercanos <sup>(276, 108, 39, 175, 220, 121, 160, 248)</sup>.

## 2. PRÓTESIS Y BIOMATERIALES

La pérdida total o parcial de tejido, como también la pérdida de función de un órgano, es uno de los problemas de salud más graves y costosos. En la actualidad la cirugía reconstructiva e implantológica es el arma fundamental para la atención de estos pacientes.

Pero la utilización de órganos ó tejidos para trasplantes se ve limitada por la baja cantidad de donantes y plantea el problema de la necesidad de una terapéutica inmunosupresora <sup>(118, 255)</sup>. Esta creciente necesidad ha llevado a los investigadores a utilizar células vivientes autólogas para la reconstrucción de órganos y tejidos, cuya ventaja es permitir evitar la reacción inmunológica y por tanto la terapéutica inmunosupresora <sup>(210)</sup>. La naturaleza es el modelo que se debe seguir en la restauración de órganos o partes corporales ausentes, y con los trasplantes autólogos se puede alcanzar el mayor grado de simulación ya que reproducen más fielmente los tejidos ausentes.

### 2.1. Prótesis, biomateriales y respuesta inflamatoria

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. Son numerosas las indicaciones para la utilización de prótesis vasculares (ateroesclerosis avanzada, aneurismas, traumatismos etc.) y aunque se admite de forma generalizada que el sustitutivo ideal en el momento actual no existe, no obstante, se sigue trabajando para aproximarse al material de reemplazo ideal, cuyo comportamiento se asemeje lo más posible al material que va a ser sustituido.

La colocación de una prótesis sustitutoria no debe provocar reacciones fisiológicas superiores a la capacidad de recuperación del receptor, permitiendo así su incorporación al organismo con tolerancia desde el punto de vista inmunológico. Así el material sustitutivo debe ser biocompatible, de manera que pueda ponerse en contacto con tejidos vivos sin producir daño.

Los antecedentes documentales sobre la utilización de materiales en Medicina se remontan al uso de ciertos metales y otros productos naturales en el antiguo Egipto. En Europa, en el siglo XVI, el oro y la plata se emplearon en reparaciones dentales y, posteriormente, el hierro para la inmovilización de fracturas óseas. La investigación sistemática sobre los materiales tolerables por el organismo se impulsó después de la segunda guerra mundial, por la necesidad de rehabilitar a los inválidos de guerra.

Desde entonces, el desarrollo de nuevos materiales utilizados en Medicina ha sido vertiginoso, siendo necesaria la integración de numerosas disciplinas para comprender el sistema biológico y su respuesta, así como las propiedades físico-químicas y/o mecánicas de los materiales. 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 <sup>(80)</sup>.

Se denomina biomaterial a aquel producto empleado para reproducir la función de tejidos vivos en los sistemas biológicos, que es temporal o permanentemente implantado en el cuerpo, que trata de restaurar el defecto existente, y en algún caso, conseguir la regeneración tisular.

Los usos quirúrgicos de los biomateriales son múltiples (cirugía ortopédica, oftalmológica, cardiovascular, odontológica, maxilofacial, urológica, etc.), debiendo cumplir unos requisitos generales que se engloban dentro del concepto de biocompatibilidad: interacción con el organismo no tóxico, controlado y predecible, de tal manera que exista tolerancia, evitándose así los riesgos potenciales de infección o rechazo. El éxito de un biomaterial depende de tres factores principales: biocompatibilidad del biomaterial, condiciones de salud del receptor, y habilidad del cirujano que realiza el implante.

La respuesta natural de un sistema biológico a la presencia de un cuerpo extraño es el rechazo, el sistema responde con una serie de reacciones celulares, en las que influyen el tamaño, la forma, y la naturaleza de la superficie del implante <sup>(38, 189)</sup>. Así, las prótesis y biomateriales provocan una respuesta inflamatoria crónica <sup>(311, 298, 5)</sup> caracterizada por la presencia de macrófagos activados, células gigantes de cuerpo extraño, y formación de cápsulas <sup>(298)</sup>, por lo que algunos de estos materiales van recubiertos de polímeros capaces de liberar fármacos antiinflamatorios con el fin de limitar la

reacción inflamatoria <sup>(136)</sup>. Así mismo en el caso de los implantes óseos se sabe que la neovascularización es indispensable para el desarrollo de una inflamación crónica y que un estado proangiogénico en el tejido adyacente a la prótesis podría aumentar la respuesta inflamatoria, por lo que modificar la angiogénesis en el tejido que rodea la prótesis podría constituir un objetivo terapéutico potencial para reducir la inflamación <sup>(143)</sup>.

La estabilidad de los implantes a lo largo del tiempo depende en muchos casos de la morfología y composición de la superficie. La composición de la aleación, tiene importancia desde dos puntos de vista: el químico y el físico. En cuanto a su composición química, la importancia radica en el fenómeno de lixiviación; esto es, el paso al medio de elementos que forman parte de la misma. Este fenómeno, cuyas repercusiones han sido demostradas en el caso de implantes dentales, está así mismo descrito en el caso de placas de osteosíntesis. Esta fuga de iones al medio podría ocasionar fenómenos adversos a nivel local, tales como reacciones inflamatorias locales <sup>(151)</sup>. Así en la literatura médica traumatológica está descrito como en algunas prótesis ortopédicas, como en el caso del Polietileno de peso molecular ultra alto, la oxidación que se produce en su superficie después de su esterilización con rayos gamma puede favorecer el desgaste de la prótesis y las partículas de deshecho liberadas provocan una reacción inflamatoria que puede conducir al fracaso del implante <sup>(243, 250)</sup>.

Desde el punto de vista físico, en el caso de los implantes dentales se sabe que cuanto más finas sean las partículas que componen el implante, la cantidad de material del implante que se pierde es menor <sup>(191)</sup>.

En el caso de las prótesis vasculares, la implantación protésica vascular está asociada con la inflamación prolongada subsiguiente a la cirugía de aorta, y la secreción prolongada de IL-8 indica una reacción del huésped a la prótesis sintética <sup>(264)</sup>.

La cirugía del AAA, incluso cuando es electiva, provoca una respuesta inflamatoria sistémica (SIR) principalmente a causa de la necesidad de realizar un clampaje para la introducción de un cuerpo extraño (prótesis), y en las situaciones de shock hemorrágico (ruptura de aneurisma) aumenta la SIR <sup>(280)</sup>. La falta de control de la SIR puede conducir a problemas de coagulación o fracaso multiorgánico <sup>(28)</sup>.

En pacientes sometidos a aneurismectomía aórtica, una tasa alta de citoquinas inflamatorias en el 7º día después de la intervención podría indicar la infección del injerto vascular <sup>(264)</sup>. Ciertas prótesis utilizadas en cirugía vascular son capaces de inducir translocación bacteriana, fuente de bacterias que a su vez se comporta como contaminante de dichas prótesis <sup>(54)</sup>. Aunque la respuesta inflamatoria a la infección en un principio es beneficiosa para limitar su propagación, la actividad de mediadores endógenos cuya síntesis es inducida en diversos sistemas (principalmente en el endotelio vascular y en el sistema mononuclear fagocítico) puede conducir a la aparición de fallo multiorgánico y shock séptico.

## **2.2. Sustitutivos vasculares**

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 experiencia acumulada así como el desarrollo de la propia Medicina ha permitido la utilización de materiales biológicos junto con otros sintéticos frutos del progreso tecnológico, especialmente el desarrollo del material plástico y derivados del petróleo ha sido decisivo para la obtención de prótesis vasculares sintéticas.

En el momento actual las prótesis de Teflón y Dacron, más las de PTE (politetrafluoroetileno expandido) junto con las bioprótesis o sustitutivos biológicos, constituyen el arsenal del que dispone el cirujano vascular.

En cirugía es muy común el uso de material protésico, que a su vez induce una respuesta inflamatoria que el profesional debe tratar de controlar.

El principal problema que se plantea es el rechazo. Algunos estudios <sup>(7)</sup> han demostrado que las partículas de biomaterial protésico pueden inducir la activación directa de los mastocitos y la liberación de IL 4, citosina que interviene en la regulación de la función macrofágica y que también ha sido implicada en respuestas inmunes proinflamatorias con la inducción de la fusión

de los macrófagos y la formación de células gigantes de cuerpo extraño (reacción granulomatosa de rechazo). El biomaterial protésico puede desencadenar el desarrollo de una respuesta inflamatoria crónica mediante el reclutamiento de células que juegan un papel fundamental en la respuesta inflamatoria a los biomateriales, tales como macrófagos, células T y mastocitos<sup>(10)</sup>.

Podemos describir distintos tipos de Trasplantes vasculares:

2-2-1) AUTOPLÁSTICOS: en ellos se trasplanta o injerta un vaso u órgano del propio paciente. Según el material empleado podrán ser:

-venosos

-arteriales

-tejidos "no vasculares": pericardio, uréter, fascia, etc.

2-2-2) HOMOPLÁSTICOS: en ellos se trasplanta material vascular de un individuo a otro. Pueden ser los siguientes:

-arterias

-venas

-cordón umbilical

2-2-3) HETEROPLÁSTICOS: pueden ser de varias procedencias:

-origen animal: carótida bovina preparada

-plásticos: prótesis arteriales artificiales

-mixtos: prótesis híbridas, en las que existe material heteroplástico, pero con una reacción autoplástica tubular empleable como injerto (Mandril de Sparks). En el momento actual está en desuso.

### **2-2-1) TRASPLANTES AUTOPLÁSTICOS:**

Los podemos dividir en:

2-2-1A ) Trasplante venoso autólogo

2-2-1B ) Trasplante arterial autólogo

2-2-1C ) Trasplante con tejidos no vasculares autólogos

2-2-1A ) Trasplante venoso autólogo:

En 1898, GLUCK<sup>(106)</sup> sustituye una carótida por un injerto venoso tomado del propio paciente, iniciando el empleo de vena autóloga como sustitutivo

arterial. En 1906, Goyanes extirpa un aneurisma poplíteo y lo sustituye con la propia vena satélite “in situ” <sup>(114)</sup>.

La vena es empleada en numerosos casos de obliteraciones arteriales, siendo todavía hoy el material de elección en arterias de pequeño y mediano calibre, siendo comúnmente empleadas las venas sáfenas. Se requiere en su empleo a nivel arterial la inversión del injerto, con objeto de salvar el obstáculo valvular, aunque también hay autores que preconizan la destrucción valvular (HALL Y CONOLLY) <sup>(52)</sup> si el injerto se mantiene en su lugar en posición “in situ”.

Este tipo de injerto tiene una validez biológica óptima (VOLLMAR) <sup>(302)</sup>, ya que permite mantener flujos arteriales muy reducidos, mientras que las prótesis son fácilmente trombosables en cuanto el flujo se reduce <sup>(116, 122, 50, 51, 169)</sup>. La tolerancia es muy buena ya que durante el tiempo que la vena permanece injertada se producen cambios en su pared conocidos como “arterializaciones” que constituyen una adaptación al cambio de presiones que la vena soportará en adelante.

#### 2-2-1B ) Trasplante arterial autólogo:

Consiste en la implantación de arterias tomadas del propio enfermo en otros territorios. Se inició con JABOULAY y BRIAU <sup>(302)</sup> en 1869, a título experimental.

Pese a constituir el tipo ideal de sustitución arterial, la principal limitación para su uso es técnica, ya que no existen arterias disponibles que puedan ser extirpadas sin que ello ocasione grandes problemas.

La sustitución arterial de tipo autólogo no crea problemas de tipo inmunológico, y además la pared ya está preparada para sufrir presiones altas por lo que no se altera histológicamente.

#### 2-2-1C ) Trasplante con tejidos no vasculares autólogos:

Han sido muchos y muy variados los materiales utilizados para sustitución vascular: fascia lata, músculo diafragma, pericardio, piel, intestino delgado...., pero, por desgracia, han proporcionado pocos resultados.

## **2-2-2 TRASPLANTES HOMOPLÁSTICOS:**

Los podemos dividir en:

2-2-2A ) arterias humanas conservadas

2-2-2B ) venas humanas conservadas

2-2-2C ) cordón umbilical conservado

2-2-2A ) arterias humanas conservadas:

La aplicación al hombre de un vaso arterial procedente de otro hombre fue realizada en 1910 por PIROVANO <sup>(236)</sup>, y desde entonces se han ideado distintos métodos de conservación de arterias, pero en todos ellos el injerto sufre alteraciones, de tal modo que no logra “vivir” en el organismo receptor. En los años 50, un estudio de SZILAGYI <sup>(281)</sup> demostraba que a largo plazo estos homoinjertos se degradaban por una reacción inmune del receptor.

Parece más idóneo el material conservado por congelación que el fresco.

La implantación de una prótesis en un terreno infectado aumenta el riesgo de sobreinfectar dicha prótesis <sup>(42)</sup>. En pacientes inmunodeprimidos y en pacientes con aneurismas aórticos micóticos o infectados existe un alto riesgo de infección protésica <sup>(168)</sup>, por lo que en estos el tratamiento estándar mediante prótesis está contraindicado. En estos casos el uso de homoinjertos arteriales criopreservados es una alternativa terapéutica <sup>(33, 168)</sup>. En la actualidad está bien fundamentado que los materiales biológicos tienen más alta resistencia a la infección que las prótesis sintéticas <sup>(231, 70, 33, 10)</sup>.

2-2-2B ) venas humanas conservadas:

Las venas de extirpación por síndrome varicoso se han utilizado como injertos para la construcción de accesos para hemodiálisis, pontajes femoro-poplíteos o pontajes aorto-coronarios con resultados aleatorios. En el momento actual, existe la posibilidad de obtención de las venas procedentes de cadáver que posteriormente pasarían a sistemas de conservación que utilizan el frío.

2-2-2C ) Cordón umbilical conservado:

En 1975, MINDICH y cols <sup>(200)</sup> emplean la vena de cordón umbilical tratada como medio de sustitución arterial.

Las respuestas antigénicas son intensas cuando el injerto se implanta sin tratamiento previo (MINDICH) <sup>(200)</sup>. Sin embargo si se elimina el poder antigénico tratando el injerto previamente con etanol y dialdehído o glutaraldehído no existe respuesta alguna demostrable histológica o clínicamente.

### **2-2-3 TRASPLANTES HETEROPLÁSTICOS:**

De ellos destacamos los siguientes:

2-2-3A Trasplantes de origen animal

2-2-3B Material sintético: prótesis aloplásticas.

2-2-3A Trasplantes de origen animal:

La eliminación del componente antigénico constituye la principal exigencia de este tipo de prótesis, por lo que se han utilizado métodos de digestión proteica para intentar resolver el problema. Así surgen los trabajos de ROSEMBERG <sup>(251)</sup> de 1963, empleando ficina al 1% sobre injerto de carótida bovina, resultando al final de la digestión proteica un tubo desprovisto de todo poder antigénico, pero constituido por una matriz colágena lo suficientemente resistente <sup>(141)</sup>.

2-2-3B Material sintético:

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 que los materiales eran rechazados como cuerpos extraños <sup>(35, 133, 294)</sup>.

Los productos hoy universalmente empleados son el Teflón y el Dacron, 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.

La tolerancia de una prótesis arterial por parte del enfermo depende de tres etapas:

1-Fabricación de la prótesis

2-Maniobras del cirujano: Precoagulación

3-Curación de la prótesis: reacción de los tejidos ante la presencia de material extraño.

#### FABRICACIÓN DE LA PRÓTESIS:

Desde el punto de vista estructural existen dos modalidades de tejidos: los confeccionados a modo de malla (Knitted) y los trenzados (Woven). Se tiene en cuenta la porosidad o permeabilidad al agua de la prótesis.

La elevada porosidad hace que la prótesis precise de un proceso previo de coagulación antes de su implantación, con el fin de evitar hemorragias. Las prótesis de malla son más porosas, por lo que la pared del injerto es fácilmente penetrable por los mamelones conjuntivos del organismo, con lo que su tolerancia biológica es muy superior. Las prótesis trenzadas son menos porosas, más duras, no suelen requerir Precoagulación, lo que supone menor sangrado y mayor resistencia a la presión, sin embargo se integran mal en el tejido receptor y no se endotelizan.

#### PRECOAGULACIÓN DE LA PRÓTESIS:

La tolerancia e integración biológica de un injerto sintético depende de que no se produzcan hematomas a su alrededor.

Al proceso en el que la prótesis debe ser correctamente impregnada de sangre hasta que se haga impermeable se le denomina "Precoagulación". Con ello, además de la impermeabilidad de la prótesis se pretende que el material tenga baja tendencia trombogénica.

#### CURACIÓN DE LA PRÓTESIS:

Las prótesis sintéticas se comportan como materiales biológicamente extraños<sup>(103)</sup> y el huésped tiende a encapsularlos completamente, verificándose esta encapsulación tanto en el exterior del tubo (cápsula externa) como en el interior (cápsula interna).

Se produce una invasión de tejido de granulación y los fibroblastos se unen al material formando un tejido alrededor (humanización del material, aceptación).

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 <sup>(260)</sup>, siendo casi completa en sujetos jóvenes y faltando de modo sistemático en los arterioesclerosos.

Actualmente se investiga la búsqueda de nuevas configuraciones protésicas que conduzcan a la formación de un endotelio lo más perfecto posible (prótesis curada).

### **2.3. Endoprótesis vasculares**

En 1953 Seldinger describió un nuevo método de abordaje de las arterias para el diagnóstico, iniciándose así poco después la endocirugía o tratamiento mínimamente invasivo <sup>(262)</sup>.

En los últimos años las posibilidades de tratamiento se han ampliado con el uso de endoprótesis metálicas, son cilindros contruidos con una malla metálica, que son transportados sobre un catéter, son introducidos mediante abordaje percutáneo y avanzados a través de la luz vascular hasta el segmento a tratar <sup>(195)</sup>.

Una de las principales causas de fracaso de las endoprótesis vasculares es la reestenosis producida por la hiperplasia de la íntima arterial. Para tratar de evitar esta complicación se ha descrito la utilización de endoprótesis cubiertas con Dacron cuya misión es aislar el segmento arterial tratado y evitar así la hiperplasia intimal causante de la reestenosis <sup>(56)</sup>.

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 <sup>(115, 45)</sup>. Pero también una de las complicaciones más importantes del procedimiento es la microembolización, que conlleva una alta tasa de morbi-mortalidad, por lo que la manipulación de guías y catéteres se ha de hacer de forma cuidadosa para evitar el desplazamiento de trombos de la luz del aneurisma <sup>(232)</sup>.

Al principio se creía que como las técnicas endovasculares no requerían el clampaje aórtico tradicional, la lesión debida a isquemia/reperfusión sería minimizada, en comparación con la cirugía abierta tradicional <sup>(286)</sup>. Sin embargo, estudios recientes <sup>(91, 213, 163)</sup> han demostrado que la reparación endovascular causa también un grado notable de SIR. Swartbol y otros <sup>(280)</sup> concluyeron que ambas técnicas provocan SIR, aunque el grado es mayor en la cirugía abierta.

#### **2.4. Importancia de la composición y fabricación del injerto**

En el campo de la odontología, la estabilidad de los implantes dentales a lo largo del tiempo depende en muchos casos de la fabricación, morfología y composición de los mismos, y las superficies de los implantes dentales se están modificando continuamente debido a razones clínicas, científicas y comerciales. Diversos aspectos de la bioingeniería y su repercusión en la biología ósea periimplantaria van a influir en el resultado de los estudios clínicos y experimentales. Así, las actuales superficies de los implantes dentales están facilitando la realización de procedimientos de carga inmediata y tratamientos implantológicos en situaciones de atrofia grave con unas tasas de supervivencia adecuadas. La tendencia en el desarrollo de superficies es utilizar titanio puro con una morfología y espesor controlados para evitar el desprendimiento de partículas y permitir una unión biocompatible y sin interfase fibrosa <sup>(273)</sup>.

En el campo de la cirugía vascular, la infección del injerto vascular protésico constituye un gran reto quirúrgico, y la composición y construcción del injerto es un factor a considerar en la patogénesis de la infección vascular protésica. La prevención de los factores de riesgo y la terapia con antibióticos puede reducirla, pero no erradicarla.

El reconocimiento clínico de la infección vascular protésica se asocia comúnmente con el pseudoaneurisma anastomótico y la formación de la fístula graft-entérica. Aunque son diversos los factores que pueden conducir a la formación del aneurisma anastomótico, la infección podría ser uno de ellos, ya que se encuentran cultivos positivos en el 90% de los pseudoaneurismas anastomóticos<sup>(42)</sup>. El desarrollo de una fístula aortoentérica con hemorragia gastrointestinal asociada es una complicación tardía de los procedimientos

vasculares aórticos y poco frecuente, pero devastadora y se asocia a menudo con la infección del injerto.

A pesar de la administración de antibióticos y del tratamiento quirúrgico, las tasas de mortalidad y de amputación asociadas con infecciones de la prótesis vascular permanecen altas.

La adhesión de bacterias a las superficies biomateriales y la formación de microcolonias causan la activación de la defensa del huésped y una respuesta inflamatoria crónica que implica al tejido que rodea al injerto y a la anastomosis. A lo largo del tiempo este proceso causa autólisis del tejido que rodea al injerto y complicaciones en la curación del injerto asociadas con una infección del injerto que aparece tardíamente.

La patogénesis de la infección del injerto vascular es probable que sea multifactorial, influyendo en el riesgo de infección del injerto factores tales como el tipo de material de injerto <sup>(10)</sup>, el método de fabricación del injerto <sup>(243)</sup>, el lugar del implante, el tiempo de duración de la operación, el uso de profilaxis antibiótica, defensas y estado nutricional del paciente, presencia de infección remota y patogenicidad de organismos contaminantes <sup>(134, 33, 241)</sup>.

La adhesión de las bacterias a la superficie de los implantes protésicos se reconoce como un importante paso inicial en un proceso infeccioso y se ha demostrado que depende de muchos factores, tales como las propiedades físicas y la composición química del material, la duración de la exposición, y las características de la biocapa de proteínas que se forma en todas las superficies protésicas después de la implantación de un injerto <sup>(42)</sup>.

La composición y la construcción de los injertos vasculares puede influir en la adherencia bacteriana, así las características de la superficie de las fibras del injerto, el relativo grado de hidrofobia del material y la presencia de carga aniónica contra catiónica en la superficie afectan a la adherencia bacteriana inicial. Se ha demostrado que los injertos vasculares de Dacron tienen una mayor propensión a la adherencia bacteriana que los injertos de politetrafluoretileno expandido <sup>(29)</sup>.

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

estudios experimentales en animales han demostrado que la proliferación bacteriana creciente en el surco periimplantario induce pérdida ósea <sup>(290)</sup>.

En el campo de la cirugía vascular, las prótesis de tejido poroso desarrollan una fina capa de fibrina luminal que es gradualmente reemplazada por colágeno maduro que se convierte en una superficie luminal estable, relativamente no-trombogénica y con una mayor resistencia a infecciones hematógenas tardías, por lo que su tolerancia biológica es muy superior.

Las prótesis vasculares son cada vez menos susceptibles a la colonización bacteriana a medida que con el tiempo se endotelizan (desarrollo de pseudoíntima), pero se ha documentado vulnerabilidad a la infección por bacteriemia (extracciones dentales, manipulaciones del tracto urinario, procedimientos endovasculares invasivos) un año después de la implantación <sup>(13)</sup>.

Existe un considerable interés en el desarrollo de un injerto vascular protésico que sea resistente a la infección, por lo que se han valorado diversos métodos que incorporan antibióticos en los injertos <sup>(43, 48)</sup> e incluso la incorporación de plata como agente antimicrobiano. La plata tiene una larga historia de utilización en la medicina y teniendo en cuenta su baja toxicidad y la mínima respuesta del tejido local, se considera que es altamente compatible y adecuada para la incorporación en aparatos médicos implantables <sup>(241, 107)</sup>.

En el caso de los implantes dentales se ha demostrado que el biofilm que se forma en su superficie puede causar inflamación en los tejidos periimplantarios, que a su vez puede poner en peligro el éxito de la osteointegración <sup>(127)</sup>.

Los remedios futuros implicarán la utilización de nuevos diseños de biomaterial en combinación con la aplicación de agentes antimicrobianos altamente potentes capaces de penetrar en los biofilms y erradicar a los microorganismos <sup>(26, 110)</sup>.

## **2.5. Implante de materiales protésicos intraabdominales**

Experimentalmente, se ha comprobado que los materiales protésicos intraperitoneales provocan TB <sup>(19)</sup>.

Es conocido como un 20% de las infecciones de los injertos y prótesis vasculares intraabdominales están asociados a bacterias intestinales: E. Colli

(13-35%), pseudomona aeruginosa, proteus spp (10%), Streptococcus spp (8%), Klesiella pneumoniae (5%).

Producirían una reacción estéril intraperitoneal que puede inducir TB.

El mecanismo propuesto sería la atracción quimiotáctica de células que han fagocitado partículas y bacterias en la pared intestinal a focos vecinos de inflamación, habiéndose observado <sup>(19)</sup>:

-Que los diferentes biomateriales utilizados (Dacron, Velour, Woven y algodón como material control) en posición intraabdominal favorecen la aparición del fenómeno de TB.

-Las bacterias aisladas fueron típicas de la flora intestinal del animal de experimentación empleado.

-La cavidad peritoneal sólo se contaminaba si lo estaba el biomaterial.

-No se aprecian alteraciones histológicas en la mucosa intestinal.

-Los materiales implantados subcutáneamente permanecieron siempre estériles

Los biomateriales en posición intraabdominal favorecen la aparición de TB al alterar la fisiología normal del huésped y no se observan alteraciones histológicas en la mucosa ileal.

Se produce un aumento del consumo de oxígeno por parte de la mucosa intestinal, de lo que se deduce que este es susceptible a la estimulación inflamatoria inducida por la prótesis <sup>(96)</sup>.

Los autores de estos estudios concluyen que la implantación de prótesis intraperitoneales favorece la aparición del fenómeno de TB, siendo uno de sus mecanismos la fagocitosis de partículas y bacterias por parte de la pared intestinal y la posterior atracción quimiotáctica al foco de inflamación generado por la prótesis <sup>(96, 19, 183)</sup>.

La causa exacta de una infección que se presenta después de una intervención revascularizadora puede ser difícil de determinar, pues hay diferentes causas predisponentes, existiendo además factores generales que aumentan el riesgo de infecciones como es una disección poco cuidadosa con abundante tracción de tejidos, prolongación del tiempo de la intervención, pérdidas hemáticas importantes con la consiguiente hipoproteinemia etc <sup>(301, 134)</sup>.

El proceso de TB a través de la pared intestinal representa una causa adicional de infección de injerto aórtico protético <sup>(187, 185, 183)</sup>, y aunque la mayoría de las infecciones ocurren como consecuencia de la contaminación directa del injerto en el momento de la cirugía <sup>(109)</sup>, también existe la posibilidad de que bacterias traslocadas sean capaces de colonizar el injerto en el momento de su inserción o poco después, con la consiguiente infección <sup>(308)</sup>. Se ha descrito que la reducción del flujo sanguíneo esplácnico en pacientes que se someten a reparación de AAA es un factor que puede predisponer a la TB <sup>(308)</sup>.

## 3. INFLAMACIÓN

### 3.1. Concepto y generalidades

La inflamación se puede definir como la reacción del tejido vivo vascularizado a una agresión local. La respuesta inflamatoria está íntimamente ligada al proceso de reparación. 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. Debemos tener en cuenta, que sin la inflamación las infecciones no serían autocontroladas, pero también es verdad, que en ocasiones la inflamación y la reparación pueden ser potencialmente perjudiciales.

Los agentes causales que pueden dar lugar a la inflamación comprenden además de las infecciones microbianas, agentes físicos (radiaciones, traumatismos, quemaduras), agentes químicos (toxinas, diversas sustancias), tejidos necróticos y todo tipo de reacción inmunológica.

Hoy día sabemos que toda patología quirúrgica y su tratamiento conducen al desencadenamiento de la respuesta inflamatoria. Si la respuesta inflamatoria local escapa a sus mecanismos de control, puede surgir la inflamación sistémica, la cual está caracterizada por el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS).

Existen diversos estudios en los que se han evaluado posibles factores asociados a éxito o fracaso de las prótesis y biomateriales, siendo la inflamación una de las variables que hay que controlar si se quiere minimizar las complicaciones <sup>(230, 41, 22)</sup>.

Tanto la cirugía electiva de AAA, como la urgente, pueden desencadenar SIRS, pero es más frecuente y severo en el grupo de los aneurismas rotos <sup>(258)</sup>.

Por consiguiente, ambas cirugías, electiva y de AAA roto desarrollan SIRS y esta respuesta es causada por lesión de isquemia-reperfusión. 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.

Es decir, una parte muy importante de la mortalidad en el AAA, se produce por un fallo en la respuesta inflamatoria, provocado por la isquemia-reperusión propia del acto quirúrgico. El fallo de los mecanismos de control en la respuesta inflamatoria está por tanto en el origen del fallo multiorgánico causante de la mayor parte de los fallecimientos en el postoperatorio <sup>(28)</sup>.

Por estas razones consideramos interesante la descripción de los conocimientos que en el momento actual tenemos tanto del AAA, como de los mecanismos fisiopatológicos de la inflamación.

La inflamación es un factor que contribuye enormemente a la aparición de muchas afecciones vasculares, como el desarrollo y rotura de la placa aterosclerótica y la formación del aneurisma de aorta, pudiendo la cascada inflamatoria dañar por extensión a los tejidos cercanos. Así mismo, el tratamiento quirúrgico del AAA conduce al desencadenamiento de la respuesta inflamatoria, teniendo gran importancia el tipo de abordaje. La respuesta inflamatoria asociada a la reparación convencional de los aneurismas se evita ampliamente gracias a las técnicas endovasculares, la reparación endovascular del AAA atenúa las respuestas inflamatorias y renales asociadas con la cirugía convencional <sup>(274, 292, 89, 194)</sup>, lo que podría traducirse potencialmente en una menor incidencia de fallo multiorgánico subsiguiente a la cirugía endovascular <sup>(30)</sup>.

La inflamación se puede dividir en aguda y crónica. La inflamación aguda tiene una duración que puede oscilar desde unos minutos a varias horas e incluso uno o dos días. Sus características van a ser la exudación de líquido y proteínas plasmáticas (edema) y la emigración leucocitaria, predominantemente de neutrófilos. La inflamación crónica tiene mayor duración y se va a asociar histológicamente a la presencia de linfocitos y macrófagos y a la proliferación de vasos sanguíneos y tejido conjuntivo.

Durante la inflamación se van a producir cambios del flujo y del calibre vascular (Figura 1).

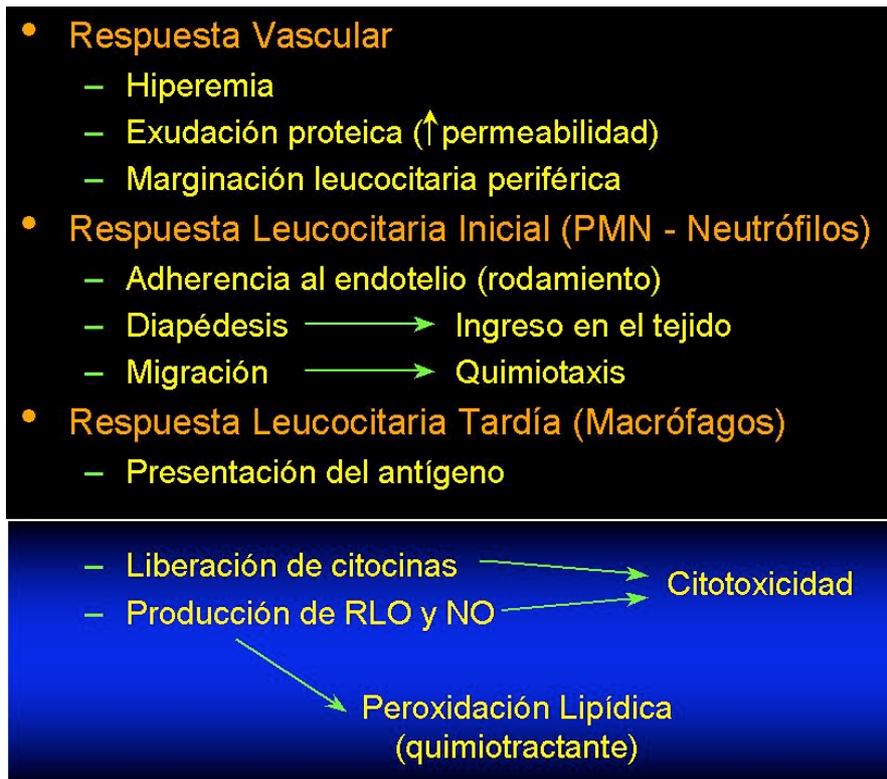


Figura 1.- Respuestas ante la inflamación

### 3.2. interacción leucocito-endotelio

Inicialmente se va a producir una vasoconstricción transitoria de las arteriolas que se sigue de una vasodilatación, por lo que se incrementa el flujo vascular (hecho fundamental de los cambios hemodinámicos precoces en la inflamación aguda). Esto se sigue de una disminución en la velocidad de la circulación, que determina que los leucocitos, principalmente los neutrófilos, se desplacen hacia el endotelio vascular. Estos leucocitos se adhieren al endotelio, inicialmente de forma transitoria y luego más fuertemente, emigrando a través de la pared vascular. Además se van a producir cambios en la permeabilidad de la pared vascular que se van a manifestar clínicamente como edema.

Las células que van a participar en el proceso inflamatorio son principalmente leucocitos (neutrófilos y monocitos). Los leucocitos van a englobar y degradar las bacterias, inmunocomplejos y restos celulares necróticos 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. La secuencia de este proceso va a ser la siguiente:

**a) Marginación:** Al producirse una pérdida de velocidad y estancamiento del flujo, los leucocitos van a entrar en contacto con el endotelio.

**b) Adherencia:** Los leucocitos se adhieren al endotelio vascular debido a la activación de una serie de moléculas de adhesión presentes en el leucocito y el endotelio vascular. La expresión de estas moléculas es inducida, aumentada o alterada por los agentes inflamatorios y mediadores químicos.

**c) Migración y quimiotaxis:** Los leucocitos se desplazan por la superficie endotelial y finalmente atraviesan la membrana basal pasando al espacio extravascular. Una vez fuera, responden a estímulos quimiotácticos, siendo los más significativos para los neutrófilos: productos bacterianos, componentes del sistema del complemento, principalmente C5a y productos de la vía de la lipooxigenasa del metabolismo del ácido araquidónico, especialmente el leucotrieno B.

**d) Fagocitosis y degranulación:** Inicialmente la partícula que va a ser ingerida se adhiere a la superficie del leucocito, después es englobada y finalmente es destruida o degradada. A continuación pasamos a describir de manera somera estas fases.

- **Reconocimiento y adherencia:** La mayoría de los microorganismos no son reconocidos sino están revestidos de factores séricos denominados opsoninas. Las dos principales son, la IgG (subtipos 1 y 3) y el C3b, generado por la activación del complemento por mecanismos inmunológicos o no.

- **Englobamiento:** Cuando el fagocito reconoce a las partículas como extrañas, la partícula queda incluida en el citoplasma de la célula dentro de un fagosoma o vacuola fagocítica. La membrana de esta vacuola se fusiona con la de un gránulo lisosomal y este vierte enzimas hidrolíticas y sustancias

bactericidas dentro de la vacuola fagocítica. Durante este proceso, puede haber salida de enzimas hidrolíticas y productos metabólicos (radicales del oxígeno) desde la célula al espacio intersticial pudiendo dar lugar a lesiones tisulares.

- Destrucción o degradación: Es el último paso en la fagocitosis. Son conocidos dos tipos de mecanismos bactericidas:

- Dependiente del oxígeno.
- Independiente del oxígeno.

### **3.3. Mediadores químicos de la inflamación**

Dentro de los mediadores químicos de la inflamación vamos a destacar los siguientes:

#### **3.3.1. Aminas vasoactivas**

a) Histamina: La histamina o sustancia H está siempre presente en las fases iniciales de la inflamación. Se encuentra almacenada, de forma inactiva, en los gránulos de las células cebadas, leucocitos, basófilos, eosinófilos y plaquetas. En menor cantidad se halla en diversos tejidos como piel, mucosa intestinal y pulmones.

El papel de la histamina y su directa relación con las células cebadas y la degranulación de estas, en las fases iniciales de la inflamación, y la supresión de la respuesta vascular por los antihistamínicos están suficientemente demostrados.

La histamina produce dilatación de las vénulas y capilares, aumento de la permeabilidad de las vénulas y contracción del músculo liso. Es el principal mediador de la primera fase de la inflamación <sup>(271)</sup>; aunque tiene una acción muy fugaz, inactivándose a los 15 minutos.

La degranulación de las células cebadas es un proceso muy complejo, que puede ser desencadenado por una gran variedad de causas: agentes físicos, inmunocomplejos, factores del complemento, toxinas bacterianas y fracciones lisosómicas de las células inflamatorias. Su liberación está regulada por el nivel intracelular de 3'-5'adenosin monofosfato ciclico (AMPc). La histamina es un mediador importante en la fase inicial de la inflamación y en las reacciones de hipersensibilidad mediadas por la Ig E.

La tracción mesentérica del intestino delgado durante la cirugía del AAA puede causar la liberación de histamina de las células cebadas mesentéricas originando el síndrome de tracción mesentérica que se describe con taquicardia súbita, hipotensión y sofocos. Algunos autores proponen la profilaxis preoperatoria con antihistamínicos H1 y H2 en la cirugía de AAA para reducir la incidencia de liberación de histamina, así como la incidencia de arritmias y la cantidad de medidas estabilizadoras durante la tracción mesentérica <sup>(71)</sup>.

b) Serotonina (5-hidroxitriptamina): Fue identificada en las células cromafines intestinales. Aunque es uno de los mediadores químicos más importantes en algunos animales de experimentación, su papel en el fenómeno inflamatorio humano es de menor importancia. Se encuentra en los gránulos de las células cebadas, en las plaquetas y también en el intestino, bazo y tejido nervioso. Tiene menor importancia que la histamina en la respuesta inflamatoria .

### 3.3.2.- 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.

a) Sistema de las Cininas: Las cininas son pequeños polipéptidos, con una potente acción vasodilatadora prolongada. La acción de estas sustancias consiste en vasodilatación arteriolar, contracción lenta del músculo liso, aumento de la permeabilidad, sobre todo en el lecho capilar, y efecto hipotensor. También producen un efecto similar al de la histamina y serotonina

en las vénulas, con separación de las uniones intercelulares de las células endoteliales. 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) cuando se pone en contacto con superficies de carga negativa, como la membrana basal o el colágeno. Un fragmento, el factor XIIa, transforma a la precalicreína plasmática en la enzima activa calicreína. Ésta actúa sobre los cininógenos ( $\alpha_2$  globulina) y los escinde; dando como producto final la bradicinina, potente mediador químico de la inflamación, pero de acción corta, ya que es inactivado por una enzima denominada cininasa. La calicreína es además un potente activador del factor de Hageman, lo que permite la autoactivación del sistema <sup>(72)</sup>.

b) Sistema del Complemento: El sistema del complemento fue descrito como el factor auxiliar del suero que no se inactivaba por el calor y que actuaba sobre células recubiertas de anticuerpos para causar su muerte.

Se conocen más de veinte proteínas séricas que circulan de forma inactiva y que una vez activadas forman parte de un sistema de amplificación en cascada muy complejo, que juega un papel muy importante en las defensas del individuo.

Este conjunto de proteínas séricas se sintetizan fundamentalmente en el hígado, también por linfocitos, macrófagos y células del sistema linforreticular; al ser activadas, interaccionan entre sí de forma secuencial originando una serie de reacciones en cascada con la producción de diferentes fragmentos proteicos, capaces de ejercer diversos efectos biológicos entre los que destacan, la lisis de membranas celulares, el incremento de la eficacia fagocítica celular y la inducción de reacción inflamatoria .

Desempeña un papel muy importante en la respuesta inmunitaria y desde luego en el proceso inflamatorio <sup>(81)</sup>, componente inespecífico de dicha respuesta; durante el desarrollo de la inflamación se incrementa la síntesis de las proteínas del complemento, bajo la estimulación de citocinas, como la IL-1 y el INF- $\gamma$ . Pertenece al grupo de defensas inmunitarias inespecíficas del

organismo, aunque actúa muy integradamente con las defensas específicas adquiridas, como Igs, especialmente la IgG y la IgM.

La activación del sistema del complemento contribuye a la aparición de la injuria isquemia-reperfusión en los pacientes sometidos a la reparación toracoabdominal del aneurisma de aorta <sup>(81)</sup>, aumentando notablemente después de la reperfusión.

La activación del sistema del complemento puede iniciarse y desarrollarse por dos vías diferentes, la clásica y la alternativa, que terminan en una vía final común, cuyo objetivo es llegar a formar un complejo proteico con capacidad para atacar, el MAC (membrane attack complex), perforando la membrana y produciendo la lisis celular.

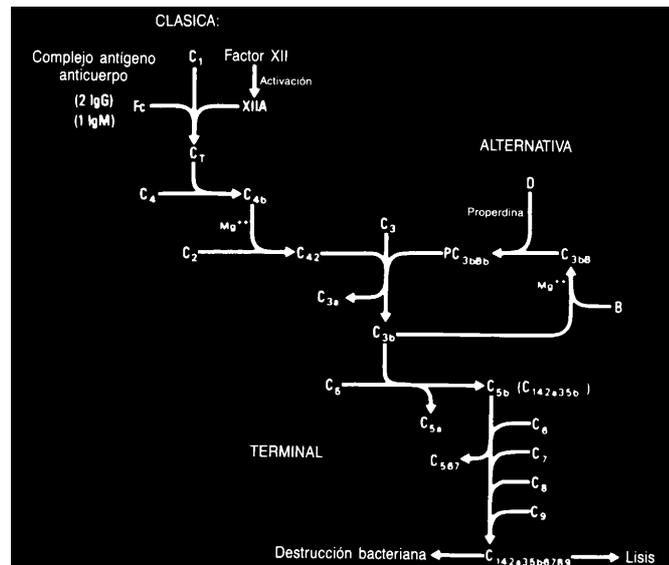


Figura 2.- Vías de activación del complemento

Además de ésta, su activación es responsable de otras acciones biológicas claves en el proceso defensivo frente a la invasión, especialmente bacteriana:

- Oponización: recubrimiento de las “partículas” extrañas por sustancias (opsoninas), haciéndolas más susceptibles a la fagocitosis (el C3a es la opsonina más importante del sistema del complemento y, en menor grado, C4b y C5b).

- Estimulación de la respuesta inflamatoria: mediante la liberación de histamina y otras sustancias vasoactivas de los mastocitos y basófilos (acción de dichos componentes [C3a, C4a, C5a], escindidos de los principales y que actúan como anafilotoxinas, y de los fenómenos de quimiotaxis de las células fagocíticas (fragmentos C5a y C3a).

c) Sistema de la Coagulación: El grupo de proteínas plasmáticas que forman este sistema, pueden ser activadas por el factor de Hageman. 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.

El sistema fibrinolítico puede participar también en el fenómeno inflamatorio, a través de su relación con el sistema de las cininas. La calicreína transforma el plasminógeno en plasmina; ésta, además de disolver el coágulo de fibrina, actúa en el foco inflamatorio al iniciar la formación de bradicinina por activar el factor de Hageman, cerrando el ciclo de activación mutua de ambos sistemas. La plasmina puede también activar el sistema del complemento por la vía alterna. Los productos de la degradación de la fibrina producen alteraciones de la permeabilidad .

### 3.3.3. Derivados del ácido araquidónico

Prostaglandinas y leucotrienos. El ácido araquidónico es un ácido graso insaturado que procede de la dieta o del metabolismo del ácido linoleico. No se encuentra libre en las células, si no formando parte de los fosfolípidos de la membrana celular. Para su utilización por la célula, debe ser liberado de los fosfolípidos mediante la activación de una fosfolipasa. Esta activación se desencadena mediante una serie de estímulos físicos, mecánicos o químicos (C5a). Una vez liberado, puede seguir dos vías metabólicas :

Vía de la ciclooxigenasa dando lugar a prostaglandinas, que se consideran hormonas de acción local, corta y rápida que poseen varias actividades farmacológicas y regulan las funciones celulares a través del sistema del AMP cíclico. En el foco inflamatorio, actúan como mediadores y reguladores de la inflamación; a veces con acciones antagónicas.

La ciclooxigenasa transforma el ácido araquidónico en un endoperóxido: la PGG<sub>2</sub>, que es transformada por oxidación enzimática en PGH<sub>2</sub>. Ambas prostaglandinas producen agregación plaquetaria y contracción del músculo liso.

La PGH se transforma en tres sustancias diversas según su localización:

- PGI<sub>2</sub> o prostaciclina, presente en la pared vascular y, más concretamente, en el endotelio. Es un potente inhibidor de la agregación plaquetaria y posee acción vasodilatadora.
- Tromboxano A<sub>2</sub>, se localiza en las plaquetas. Tiene una acción muy corta con un efecto antagónico a la anterior: favorece la agregación plaquetaria y la vasoconstricción.
- PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub> y PGF<sub>2</sub>. Son otras prostaglandinas más estables y presentes en diversos tejidos. Entre sus acciones destaca la vasodilatación. Inducen también la formación de colágeno y están implicadas en la aparición de la fiebre (PGE<sub>2</sub>) y el dolor.

Vía de la lipooxigenasa que origina los leucotrienos. El ácido araquidónico, bajo la acción de la lipooxigenasa, se transforma en una serie de productos denominados leucotrienos por haber sido aislados inicialmente en los leucocitos y por su estructura química característica.

Estas sustancias pueden originarse también en macrófagos, células cebadas y otras células del tejido conjuntivo.

Alguno de los leucotrienos (LTB<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub>) producen broncoespasmo, vasoconstricción y aumento de la permeabilidad.

Actúan sobre los leucocitos promoviendo la adherencia de los mismos al endotelio y su extravasación al espacio tisular. Además, el LTB<sub>4</sub>, es un potente quimiotáctico para neutrófilos, eosinófilos y monocitos y favorece la liberación de enzimas lisosómicas.

### 3.3.4. 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 .

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.

El PAF puede ser producido por una serie de células como los basófilos, neutrófilos, monocitos y endotelio.

### 2.3.5. Citocinas

Son un grupo de polipéptidos producidos por varios tipos de células, especialmente por monocitos, macrófagos linfocitos y células endoteliales.

Algunos autores proponen que se puede cuantificar la magnitud del estrés quirúrgico en pacientes que han soportado una cirugía de aorta midiendo las respuestas inflamatorias consiguientes a la intervención, especialmente midiendo la secreción de citocinas antes de la intervención y periódicamente durante dos semanas después de la misma. Un gran aumento de las citocinas después del día 7 puede indicar una infección del injerto vascular, y especialmente la secreción prolongada de IL-8 sugiere un rechazo a la ortopedia sintética <sup>(264)</sup> .

En la actualidad se han descrito más de 20; detallaremos a continuación las más importantes relacionadas con el proceso inflamatorio en la reperfusión (182, 259, 264, 184, 40, 132) .

#### - Interleucina-1 (IL-1):

Es un polipéptido del que se conocen dos formas moleculares,  $\alpha$  y  $\beta$ , codificadas por genes localizados en el cromosoma 2. La homología entre

ambas formas de IL-1 únicamente es del 26%, pero interactúan con el mismo receptor y comparten actividades biológicas similares.

Es producida por macrófagos, células endoteliales, células mesangiales, fibroblastos, etc. Y por otros tipos celulares relacionados con la respuesta inmune (linfocitos B, células NK, etc.).

Dentro de la respuesta inflamatoria destacamos las siguientes funciones:

- Es capaz de activar los macrófagos, siendo también producida por ellos se convierte en uno de los mecanismos de autoactivación macrofágica.
- Aumenta la producción de prostaglandinas y la actividad citotóxica del macrófago.
- Junto a otras citocinas, factores de crecimiento y el factor estimulador de la monocitosis (FEM) liberados en el foco inflamatorio, incrementan la actividad de la médula ósea para aumentar la producción de la serie blanca.
- Estimula a células endoteliales, fibroblastos, linfocitos, etc. incrementando la producción de diferentes factores de crecimiento (GM-CSF, G-CSF, M-CSF, etc.).
- Induce la proliferación de los fibroblastos.
- Actuando sobre el hipotálamo incrementa la producción de la prostaglandina PGE<sub>2</sub>, apareciendo así fiebre y dolor.
- Provoca el aumento de la expresión de diferentes moléculas de adhesión celular como veremos más adelante.
- Aumenta la producción de moléculas de Clase II del Complejo Mayor de Histocompatibilidad y provoca la activación de la ciclooxigenasa.
- Causa la activación de la sintasa inducible del óxido nítrico (iNOs) incrementando así la producción de óxido nítrico.
- Etc.

Entre otros efectos destacamos los realizados sobre las células del Sistema Inmunitario, así puede señalarse su acción reguladora de la activación linfocitaria T y de la secreción de linfocinas, y de forma determinante, de la IL-2.

También actúa sobre los linfocitos B en los que induce una señal que favorece la proliferación celular y su diferenciación hacia células secretoras de Igs.

- Interleucina-6 (IL-6):

Es una glicoproteína producida por diversos tipos celulares entre los que se incluyen macrófagos, fibroblastos, células endoteliales y linfocitos T.

Su producción en el proceso inflamatorio induce activación de los monocitos y disminución de la producción de otras citocinas como IL-1 y TNF- $\alpha$ , es una de las citocinas más importantes en la regulación negativa del fenómeno inflamatorio.

También posee una relevante función reguladora sobre la diferenciación de los linfocitos B, y parece que modula la activación de las células T.

- Interleucina-10 (IL-10):

Es una proteína que presenta una gran similitud estructural con el genoma del virus de Epstein Barr.

Es producida, entre otros, por macrófagos y células T. Entre sus funciones en la respuesta inflamatoria destacamos la capacidad de activar o inhibir los macrófagos (dependiendo de su concentración) convirtiéndose, junto con la IL-6 es otra de las citocinas moduladoras del fenómeno inflamatorio <sup>(40)</sup>.

Parece que también ejerce su acción estimulando la proliferación de células B y T, tanto maduras como inmaduras.

- Factor de Necrosis Tumoral (TNF):

Es una citocina segregada fundamentalmente por los monocitos y macrófagos, aunque también la pueden producir los linfocitos T y las células NK, cuyo gen se localiza en el cromosoma 6. Presenta dos formas la  $\alpha$  y la  $\beta$

que aunque poseen funciones similares (en la inflamación) las desarrollan con diferente intensidad.

Dentro del fenómeno inflamatorio destacamos las siguientes funciones:

- Es capaz de activar los macrófagos, siendo también producida por ellos se convierte en uno de los mecanismos de autoactivación macrofágica.
- Junto a otras citocinas, factores de crecimiento y el factor estimulador de la monocitosis (FEM) liberados en el foco inflamatorio, incrementan la actividad de la médula ósea para aumentar la producción de la serie blanca.
- Estimula a células endoteliales, fibroblastos, linfocitos, etc. incrementando la producción de diferentes factores de crecimiento (GM-CSF, G-CSF, M-CSF, etc.).
- Induce la proliferación de los fibroblastos.
- Actuando sobre el hipotálamo incrementa la producción de la prostaglandina PGE<sub>2</sub>, apareciendo así fiebre y dolor.
- Provoca el aumento de la expresión de diferentes moléculas de adhesión celular como veremos más adelante.
- Aumenta la producción de moléculas de Clase II del Complejo Mayor de Histocompatibilidad y provoca la activación de la ciclooxigenasa.
- Causa la activación de la sintasa inducible del óxido nítrico (iNOs) incrementando así la producción de óxido nítrico.
- Incrementa la producción de radicales libres del oxígeno, especialmente del anión superóxido.
- Estimulador de la síntesis del PAF.
- Etc.

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.

### 3.3.6. Productos Lisosómicos de los Leucocitos

La liberación de las sustancias contenidas en los lisosomas de las células que forman parte del exudado inflamatorio, neutrófilos y monocitos, puede contribuir al mantenimiento de la respuesta inflamatoria e inducir a la destrucción tisular que aparece después de la reperfusión.

Todas estas enzimas son inhibidas por antiproteasas dentro de las cuales tenemos a la alfa-1 antitripsina que es el principal inhibidor de la elastasa de los neutrófilos.

### 3.3.7- Radicales libres de oxígeno ( RLO ):

La observación de que la reperfusión (reentrada de oxígeno) de los tejidos isquémicos incrementa la lesión de los mismos, dio origen al concepto de que la lesión por reperfusión puede encontrarse mediada, al menos en parte, por la formación de metabolitos reactivos del oxígeno o radicales libres del oxígeno (146, 297, 174).

La reperfusión de órganos isquémicos, puede agravar la lesión tisular a través de una respuesta molecular, celular y vascular. La primera, está expresada por la producción de radicales libres del oxígeno y citoquinas, las cuales promueven una activación de la respuesta inflamatoria. La segunda está caracterizada por el acúmulo de neutrófilos, con aumento de la producción de enzimas lisosomales y propagación más allá del tejido dañado. La respuesta vascular está marcada por el incremento de la permeabilidad al plasma y las macromoléculas, formación de edema y, por último, trombosis intravascular (156, 299).

Hoy en día, se está buscando la posibilidad de actuar sobre cada una de estas tres vías, para intentar reducir los efectos causados por la reperfusión.

El oxígeno molecular se puede reducir en pasos univalentes para generar tres especies oxidantes <sup>(83)</sup>:

- 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.

El resultado de la formación de los radicales del oxígeno es perjudicial para una serie completa de biomoléculas que se encuentran en los tejidos, entre ellas ácidos nucleicos, lípidos de membrana, enzimas y receptores. Los ácidos grasos poliinsaturados que se encuentran en la membrana son muy accesibles al ataque del  $\bullet OH$  en un proceso que da por resultado peroxidación de los lípidos. Ésta puede alterar la fluidez de la membrana celular y provocar la lisis.

Los radicales libres del oxígeno son producidos, por dos mecanismos:

- Xantinoxidasa: La xantinoxidasa es una enzima que tiene capacidad de generar radicales libres del oxígeno durante la oxidación de hipoxantina a xantina.
- NADPHoxidasa que reduce al oxígeno molecular hasta el anión superóxido. Y la mieloperoxidasa que cataliza la formación de ácido hipocloroso, HOCl, a partir del peróxido de hidrógeno y de iones cloruro.

Los radicales libres son producidos, entre otros, por los neutrófilos y macrófagos, pueden ser liberados tras la exposición a los agentes

quimiotácticos, inmunocomplejos o ante la fagocitosis, etc. 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.
- Lesión de las células endoteliales con aumento de la permeabilidad vascular.
- Producen oxidación los grupos sulfhidrilos de las proteínas, formando puentes -SS- que alteran su estructura. con pérdida de la actividad biológica.
- 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.

El organismo posee diferentes mecanismos protectores antioxidantes, entre los que destacamos los siguientes: la ceruloplasmina, la transferrina, la superóxido dismutasa, la catalasa, la glutatión peroxidasa, etc.

En la saliva de pacientes con periimplantitis se ha detectado la existencia de niveles más bajos de sustancias antioxidantes (ácido ascórbico) que en la saliva de sujetos sanos, por lo que algunos autores han sugerido utilizar suplementos de antioxidantes en la dieta para prevenir la aparición de periimplantitis en los pacientes sometidos a tratamiento con implantes dentales (177).

Experimentalmente, se está investigando la utilización de los “barrenderos” de radicales libres, ya que estos han sido implicados como mediadores de las lesiones que ocurren durante la reperfusión en varios órganos, incluido el sistema nervioso central. Consecuentemente el tratamiento adecuado con estos “barrenderos” puede limitar el daño tisular.

### 3.3.8. Oxido Nítrico:

La importancia suscitada en los últimos años, en el fenómeno inflamatorio, por el óxido nítrico ha incrementado exponencialmente el número de estudios que se han realizado sobre este importante mediador de la respuesta inflamatoria que parece estar involucrado incluso en la regulación genética del proceso.

El enzima implicado en la síntesis del óxido nítrico (NO) es la NO-sintasa (L-arginina-NADPH-oxidoreductasa-NO-sintasa), quien convierte el grupo guanidina terminal de la L-arginina en NO con un compuesto intermediario de  $\omega$ -hidroxil-L-arginina. Requiere oxígeno y 4 cofactores (grupo hemo, FAD, FMN y tetrahidrobiopterina), así como la presencia de calmodulina <sup>(284)</sup>.

Se describen 3 genes distintos responsables de las síntesis de otras tantas formas del enzima productor del óxido nítrico, con un 60% de similitud entre sus moléculas: dos de ellas expresadas constitutivamente (cNOS) y otra de expresión inducible por estímulos inmunológicos (iNOS).

- cNOS:
  - eNOS: Fue la primera identificada, en las células del endotelio vascular, de ahí su denominación.
  - nNOS: Inicialmente aislada en las neuronas se ha encontrado también en células beta-pancreáticas, células musculares estriadas, células epiteliales del pulmón, etc.
- iNOS:

En un primer momento identificada como inducible en los macrófagos, no está expresada inicialmente de forma constitutiva, pero seguido a la exposición a productos bacterianos y citocinas puede encontrarse en un amplio número de células, no sólo en macrófagos, sino también, en células hepáticas, células musculares lisas y células endoteliales de los vasos.

Las formas constitutivas (cNOS) se encargan de la producción de NO en condiciones fisiológicas, en las que, su liberación parece ser 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); algunos autores apuntan a la posibilidad de que en situaciones de activación, ese enzima podría sufrir un efecto de control en la producción del NO, por retroalimentación negativa ejercido por el propio NO producido.

Los diferentes estudios realizados concluyen que, entre otros, los principales estímulos para la activación de la iNOS son: Productos derivados de las bacterias (LPS, restos de la pared, etc.), interferón- $\gamma$ , interleucina-1, el factor de necrosis tumoral- $\alpha$ , los radicales libres del oxígeno, el factor de transcripción nuclear NF $\kappa$ B, y el factor inhibidor de la migración de los macrófagos (MIF).

En cuanto a su inhibición, otra serie de citocinas parecen inhibir su producción (interleucina-4 e interleucina-10), causando el mismo efecto inhibitorio el factor de crecimiento de los macrófagos (TGF- $\beta$ ) ( fig. 3).

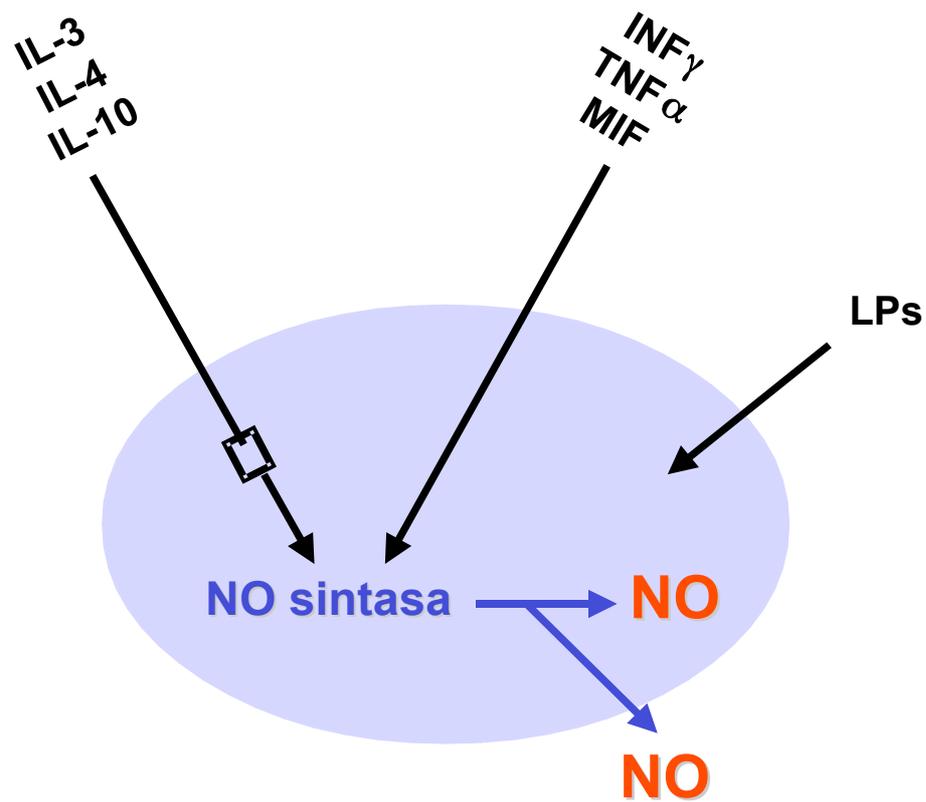


Figura 3.- Síntesis de NO en los macrófagos

### 3.4. Papel del óxido nítrico

Mucho se ha investigado sobre el papel que podría jugar el NO en el fenómeno inflamatorio y en concreto en los procesos secundarios a isquemia-reperfusión, otorgándole últimamente un efecto protector<sup>(39, 57, 121, 180, 186, 187, 188, 220, 248, 198, 117, 23, 221, 242, 293, 269, 288)</sup>, si bien, el balance final de su actividad, los diferentes caminos en los que se encuentra implicado, y los oscuros efectos que pudiese ejercer aún no están completamente dilucidados y conducen a la controversia<sup>(59, 164, 165, 289, 135, 221, 304, 226, 139)</sup>.

El óxido nítrico, una pequeña molécula radical libre gaseosa, es un importante mensajero de la función celular y biológica que demuestra un interesante perfil antiinflamatorio y una actividad vascular protectora<sup>(23)</sup>. Pero también se le ha descrito como un importante mediador del daño celular en una amplia gama de condiciones, si bien evidencias recientes indican que la mayor parte de la citotoxicidad atribuida al óxido nítrico se debe más bien al peroxinitrito, producido por la reacción de difusión controlada entre el NO y otro radical libre, el anión superóxido. Por ello, algunos autores piensan que las nuevas estrategias farmacológicas que intenten eliminar el peroxinitrito puedan constituir potentes instrumentos terapéuticos en el futuro.

Entre los efectos beneficiosos parecen demostrados los siguientes<sup>(2, 15, 39, 53, 57, 58, 60, 98, 94, 96, 121, 141, 173, 180, 186, 187, 188, 220, 245, 248, 258, 198, 117, 23, 221, 242, 293, 269, 288)</sup> (ver también 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  $[Ca^{2+}]_i$ , acumulado durante el proceso inflamatorio .

Durante la isquemia tisular falla la bomba de calcio, por lo tanto aumenta su concentración intracelular determinando la activación de las enzimas, incluyendo las lipasas, que provocan una desestabilización de la membrana y

la muerte celular. Por esto, el uso de antagonistas del calcio puede también ser útil para retrasar el daño tisular <sup>(130)</sup>.

- Bloquea la adherencia y posible migración de los monocitos, hecho demostrado “in vitro”.
- Es un inhibidor de la activación neutrofílica que conduce a la adhesión celular al endotelio <sup>(155, 157, 166, 190)</sup>; así como a la generación de radicales libres del oxígeno <sup>(92)</sup>; así como bloquea la liberación de productos con acciones vasoconstrictoras, citotóxicas y multiplicadoras de la reacción inflamatoria (leucotrienos, citocinas, prostaglandinas, etc.) y parece ejercer además un efecto citoprotector directo sobre las células endoteliales. En relación con estos aspectos, cabe destacar:
  - Algunos trabajos le otorgan también un efecto directo sobre los fenómenos más íntimos de la adhesión celular. En estos estudios, cuando la producción de NO se bloqueó, la expresión de ICAM-1, en las células endoteliales, se incrementó; y cuando se indujo la producción de NO, los niveles expresados de ICAM-1 disminuyeron <sup>(158, 166, 167, 197)</sup>.
  - Se ha demostrado como el NO puede inhibir la producción de radicales libres del oxígeno, por parte de los neutrófilos, por la inhibición directa de la NADPH-oxidasa.
  - Reacciona con los radicales libres del oxígeno, actuando como inactivador de sus efectos. En concreto reacciona con el anión superóxido generando peroxinitritos que son transformados, a su vez, en nitratos con la liberación del radical hidroxilo.
  - Modula las hemoproteínas que pueden actuar como receptores de los radicales libres del oxígeno.
- Parece actuar como un mensajero intracelular que no requiere transportadores de membrana.
- Es un protector de la mucosa intestinal, favoreciendo de este modo la función de barrera.

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 <sup>(129, 142, 180, 206, 209, 220, 222, 228, 240, 248, 256, 258, 272, 303, 306)</sup>. En experiencias consistentes en la administración de NO exógeno, se ha observado: una disminución de la actividad de la enzima neutrofílica mieloperoxidasa (marcador más sensible de la infiltración neutrofílica); un mantenimiento de los requerimientos locales de oxígeno; que no ejerce acción alguna sobre la situación hemodinámica sistémica o local en el transcurso del proceso inflamatorio, hecho este último contradicho en algunos modelos de isquemia-reperfusión intestinal donde podría, para esos autores, generar una hipotensión marcada por reducción de las resistencias vasculares periféricas con incremento del daño. También se ha comprobado una disminución de la producción de radicales libres del oxígeno y de citocinas proinflamatorias <sup>(215, 265, 285, 307)</sup>.

En otras líneas experimentales, en cambio, los resultados son inversos. Así se ha observado, en modelos de isquemia-reperfusión miocárdica, un efecto cardiodepresor y lesiones similares a las inducidas en situación de shock.

Algunos autores coinciden en la explicación de que el origen, del incremento del daño, podría ser la formación de peroxinitritos, dióxido de nitrógeno y radicales hidroxilo; que serían los responsables de estos efectos adversos <sup>(23)</sup> .

La última tendencia es considerar que esos efectos contrarios podrían deberse a un exceso de producción, a su vez, secundaria a la estimulación de la producción de la iNOS en las células endoteliales y en los macrófagos, que además dicho sobreexceso, algunos autores se atreven a decir que bloquearía la transcripción de la vía constitutiva o a que el efecto predominantemente beneficioso durante la reperfusión, proviene del NO producido por cNOS. De hecho el bloqueo de la producción de NO por un inhibidor específico del cNOS (L-NAME = NG-nitro-L-arginine methyl ester), mostró en modelos de isquemia-reperfusión intestinal un efecto adverso, morfológico y funcional, respecto al uso de bloqueantes no selectivos de ambas enzimas (L-NMMA = N-monometil-L-arginina).

En modelos de isquemia-reperfusión renal <sup>(74, 98, 94, 186, 188)</sup>, se ha comprobado como el NO, juega un papel muy importante en la regulación del flujo renal, así como en la excreción de sodio y agua en condiciones fisiológicas y durante el fallo renal agudo secundario a isquemia-reperfusión. Se ha demostrado como el tratamiento pre-reperfusión, con el precursor del NO endógeno, la L-arginina (184), o con NO exógeno, se sigue de una mejora de la función renal fundamentada en un incremento de la excreción de sodio, descenso sérico de creatinina y aumento del flujo renal arterial. Confirmado al bloquear la ruta sintética endógena del NO, con un antagonista de la L-arginina, L-NNA en uso sistémico o intra-arteria renal, respectivamente, se generaba una vasoconstricción arteriolar con el consiguiente descenso del flujo arteriolar y por tanto de la diuresis. Se comprueba también como este efecto es menor, solo incremento discreto de la diuresis, si el tratamiento se realiza una vez iniciada la reperfusión.

Ante toda esta confusión y contradicciones no debemos descartar dos aspectos muy importantes, el primero de ellos sería la posible activación, secundaria a la de la iNOS, de fenómenos que causen un incremento del daño en la inflamación; y el segundo sería el momento, dentro del proceso

patológico, en el que se administra el tratamiento (bloqueantes, precursores o exógeno). De todas las formas deberemos esperar nuevos resultados que aclaren todos los aspectos comentados y otros aun desconocidos.

La controversia continúa debido a que algunos datos demuestran que el NO endógeno juega un papel mínimo en isquemia-reperusión, pero el NO exógeno parece tener un claro efecto beneficioso <sup>(188,186, 201, 247, 105, 34)</sup>. Se ha comprobado una gran disminución de la producción endógena del NO, mantenida en el tiempo, en modelos de isquemia-reperusión donde se ha tratado a los animales de experimentación con NO exógeno, en estos casos no podemos descartar que la inactivación de la iNOS pueda tener algo que ver con los efectos beneficiosos encontrados <sup>(121, 31)</sup>.

Muy poco se conoce acerca de cómo se controla la liberación de citocinas, o de cómo se modulan las moléculas de adhesión celular durante la inflamación. Basado en algunos trabajos de la literatura <sup>(34)</sup>, se piensa que el NO es el paso final que eventualmente ejerce una retroalimentación negativa en la producción/liberación de las citocinas <sup>(6, 192, 23)</sup> y/o la expresión/activación de las moléculas de adhesión celular <sup>(140)</sup>; muy posiblemente, todo ello mediado por la regulación del factor transcripcional NFκB.

Un componente importante de la respuesta inflamatoria es la respuesta de óxido nítrico, y el aumento de los niveles de óxido nítrico puede proteger de la injuria renal causada por el clampaje durante la reparación del aneurisma aórtico <sup>(39, 98, 186,188)</sup>.

En pacientes sometidos a cirugía cardiaca con circulación extracorpórea el óxido nítrico administrado en forma gaseosa a baja concentración puede tener un efecto antiinflamatorio protector siendo capaz de disminuir la liberación de los indicadores de la lesión del miocardio <sup>(105)</sup>.

Los injertos arteriovenosos utilizados para la hemodiálisis desarrollan a menudo una hiperplasia intimal, que al final conduce al fallo del injerto. El óxido nítrico juega un papel clave en los mecanismos vasculares homeostáticos que modulan el tono vasomotor, inhibiendo la inflamación y ejerciendo un efecto citoprotector sobre el endotelio. Aunque el chorro turbulento de la aguja de

diálisis puede contribuir a un daño en el tabique del vaso (pérdida de integridad endotelial), también un descenso en la producción de óxido nítrico podría contribuir a la cascada de acontecimientos que conducen a la formación de hiperplasia intimal <sup>(137, 14, 24, 25, 32, 44, 62, 128, 162, 202, 240)</sup>.

En el caso de los implantes dentales se ha demostrado que cuando existe inflamación severa (peri-implantitis) se produce un aumento en los niveles de nitritos en el fluido sulcular periimplantario, por lo que algunos autores han sugerido que el NO jugaría un papel en la remodelación y adaptación del hueso situado alrededor de los implantes dentales <sup>(238, 244, 290)</sup>.

#### **4. 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 repuesta inflamatoria. Si ésta escapa a sus mecanismos de control, puede surgir el Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS).

El SIRS es definido clínicamente por cambios en la temperatura, frecuencia cardíaca 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 (ej: edema pulmonar no cardiogénico, fallo renal agudo (FRA), depresión miocárdica y fallo de la coagulación).

##### **4.1. 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. En consecuencia la producción anaeróbica de adenosín trifosfato (ATP), molécula energética celular esencial, es sensiblemente inferior <sup>(47, 203)</sup> (Figura 1).



Figura 1.- 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 y una atípica activación de los sistemas citoplasmáticos. Un ejemplo importante de estos cambios es el conocido aumento de la concentración de calcio intracelular  $[Ca^{2+}]_i$ , que actúa como un segundo mensajero y provoca la activación de diversos sistemas enzimáticos importantes para la producción de los mediadores de la inflamación <sup>(49, 93, 218)</sup> (Figura 2).

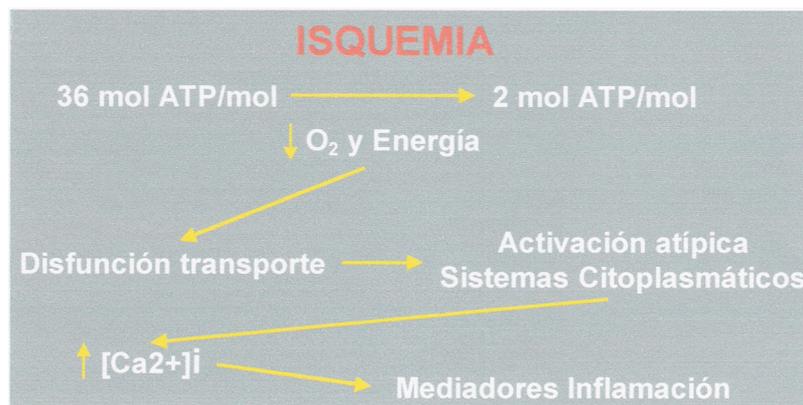


Figura 2.- Pérdida energética y sus consecuencias

La falta de ATP produce disfunción de los sistemas de transporte de la membrana y conduce a la acumulación de fluido dentro de la célula y tumefacción de la misma (Figura 3).

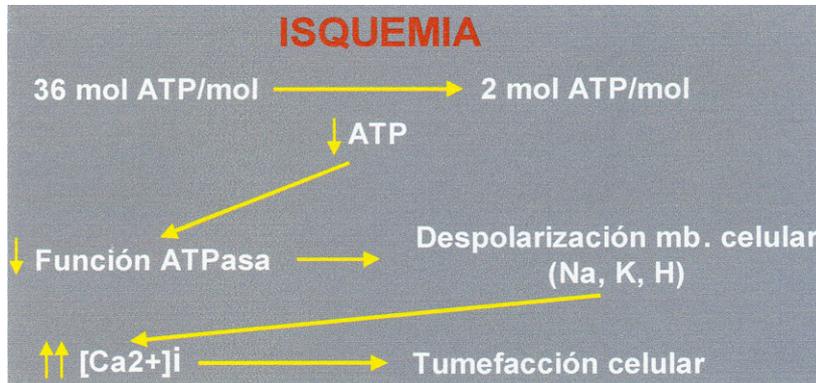


Figura 3.- Causas de la tumefacción celular en la isquemia

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). Todas estas alteraciones conducen a la producción de cambios nucleares y autodigestión proteica (Figura 4).

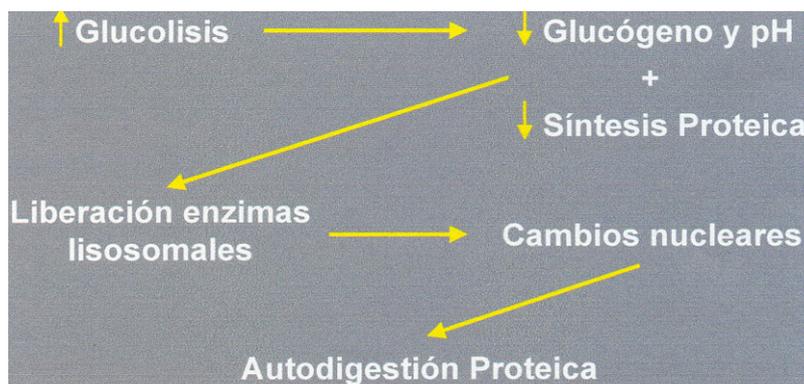


Figura 4.- Autodigestión proteica en la lesión isquémica

Al mismo tiempo, la isquemia conduce a una pérdida de fosfolípidos de membrana, alteraciones en el citoesqueleto y a una acumulación de adenosina (desciende el ATP y aumento el ADP) 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, que son lesivos para las membranas celulares.

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), careciendo de importancia a partir de este momento la fase de reperfusión (Figura 5).

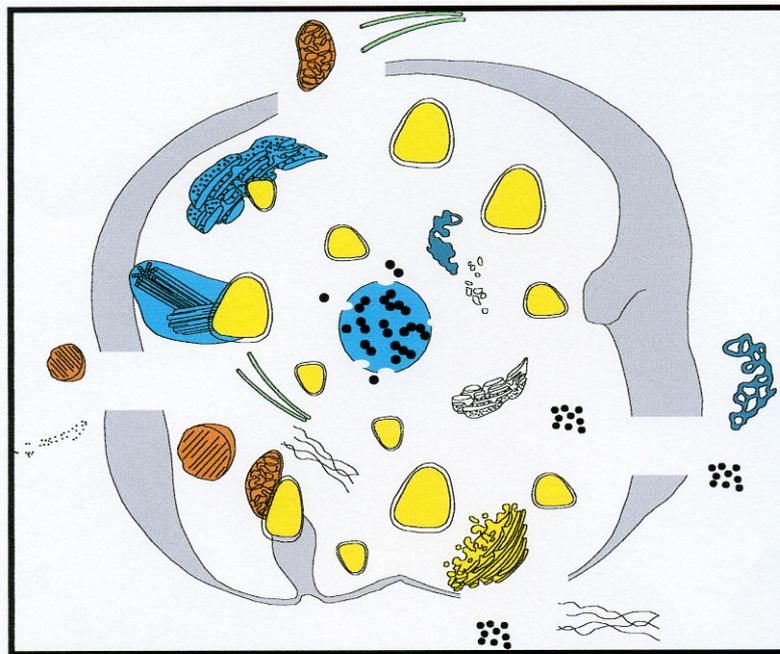


Figura 5.- Necrosis celular en la isquemia

En la isquemia inducida en el riñón durante una situación de shock, el descenso de la perfusión debida a los mecanismos de irrigación preferencial <sup>(180, 263)</sup>, conlleva una depleción de la producción intracelular de ATP <sup>(263)</sup> junto a una disfunción tubular renal. <sup>(214, 263)</sup>

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. <sup>(233)</sup>

Se producen alteraciones ultraestructurales detectables en el riñón isquémico, comprobando cómo muy precozmente (a los pocos minutos de iniciarse la isquemia) es posible detectar una desaparición de las microvellosidades apicales <sup>(19)</sup>. En concreto la gama de lesiones identificadas son <sup>(94, 97, 104)</sup>.

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

En modelos de Isquemia-Reperusión (I/R) en miocardio y pulmón de rata <sup>(217, 267)</sup> se ha comprobado cómo los tejidos sometidos a periodos cortos de isquemia separados por periodos de reperusión 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 <sup>(105)</sup>.

Hotter et al., realiza experiencias similares en intestino de rata comprobando ese efecto protector de la isquemia intermitente <sup>(93, 94)</sup>. 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 PGI<sub>2</sub>, 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 <sup>(205)</sup>.

## **4.2. Lesión por reperusión**

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.

En cambio, 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 <sup>(204, 259)</sup>, pero en cambio, que las reacciones iniciadas durante la reperfusión con oxígeno, van a ocasionar altera.

Los mecanismos implicados en esta lesión no están completamente demostrados, pero los radicales libres del oxígeno (RLO) parecen ser responsables importantes. 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<sup>2+</sup>, que activaría una serie de proteasas no específicas y fosfolipasas (Fosfolipasa A<sub>2</sub>); la activación de estas proteasas conduciría a la liberación de sustancias quimioatrayentes para los leucocitos que, entre otras, incluyen los metabolitos derivados de la cascada del ácido araquidónico como leucotrienos, tromboxanos y diferentes tipos de prostaglandinas (Figura 6).

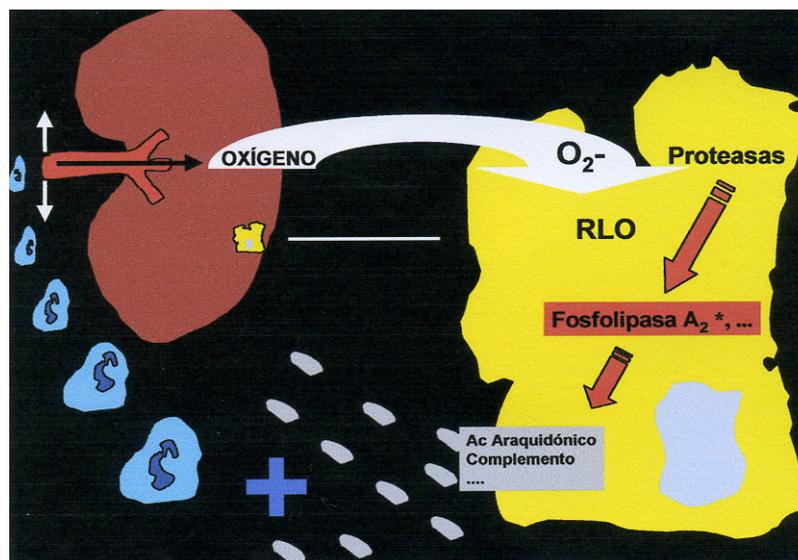


Figura 6.- Producción de RLO tras la reperfusión; implicación en la producción de sustancias quimiotractantes

Por otro lado, los RLO ocasionarían una peroxidación de los lípidos de la membrana de las células <sup>(82, 126)</sup> 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 (Figura 7) <sup>(66, 159, 179, 246, 284)</sup>. 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 <sup>(270)</sup>.

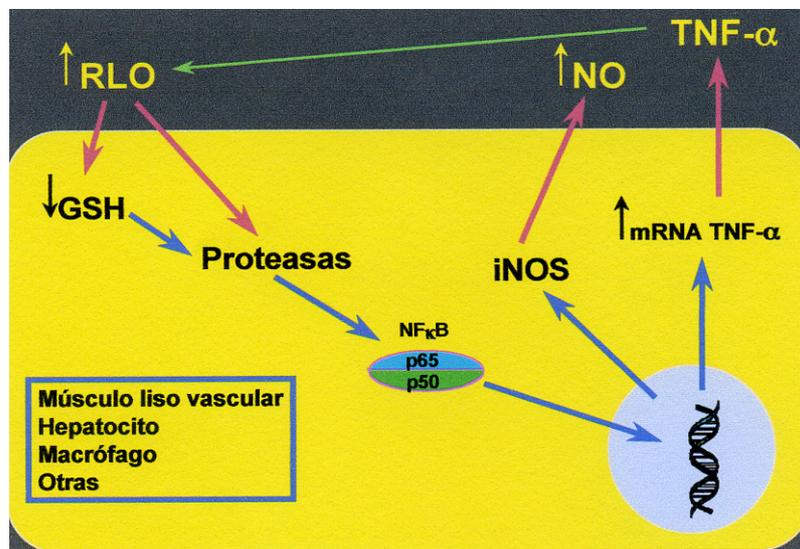


Figura 7.- Mecanismo de lesión celular de los RLO

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- $\alpha$ ) las cuales a su vez, aumentarán la producción de más RLO perpetuando e incrementando así el daño <sup>(66, 159, 179, 246, 270)</sup> (Figura 8).

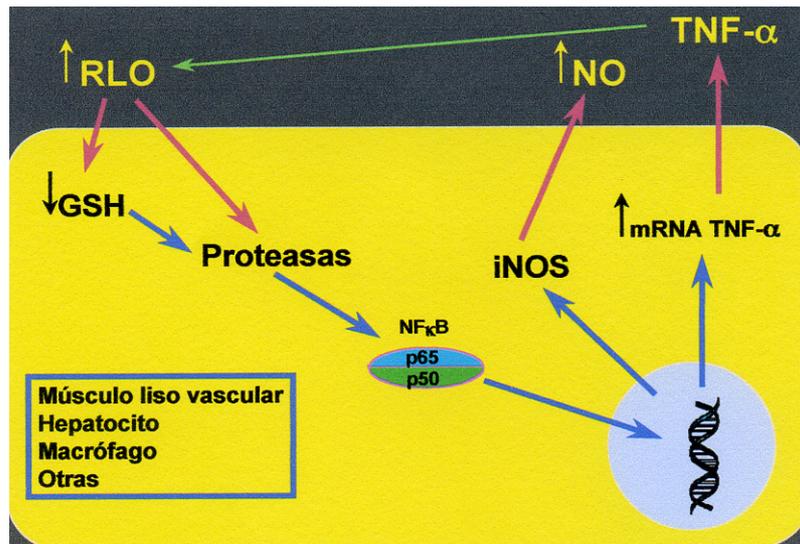


Figura 8.- Mecanismo de retroalimentación en la producción de RLO

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 <sup>(73, 75, 88, 186, 187, 188)</sup>.

Por otro lado, la masiva depleción de neutrófilos del suero <sup>(92)</sup>, el bloqueo en la producción de los radicales libres del oxígeno <sup>(261)</sup>, o el uso de anticuerpos monoclonales dirigidos contra la glucoproteína de membrana neutrófilica CD18, responsable de la adhesión del leucocito al endotelio <sup>(62, 157)</sup> 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 <sup>(265)</sup> con la subsiguiente generación de anafilotoxinas. De hecho, la inactivación del complemento disminuye la lesión por reperfusión en los tejidos <sup>(153)</sup> (Figura 9).

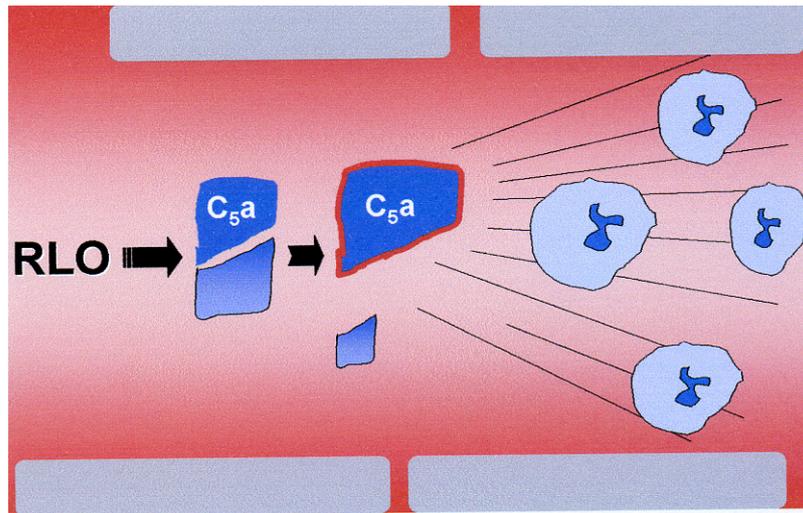


Figura 9.- Interacción RLO y sistema complemento.  
Quimiotaxis leucocitaria por el complemento

La liberación de citocinas durante la reperfusión, fundamentalmente por los leucocitos activados, especialmente factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucina-1 (IL-1) e interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), y la liberación del factor activador de las plaquetas (PAF), influirán en la lesión postisquémica favoreciendo la adhesión leucocito-endotelio <sup>(259)</sup>, y multiplicarán el fenómeno inflamatorio iniciado <sup>(66, 229, 235, 239, 261, 278)</sup> (Figuras 10 y 11).

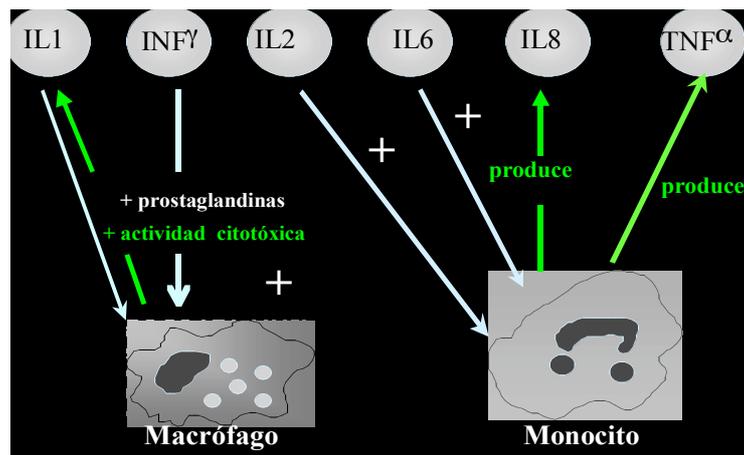


Figura 10.- Producción y efectos de las citocinas proinflamatorias I

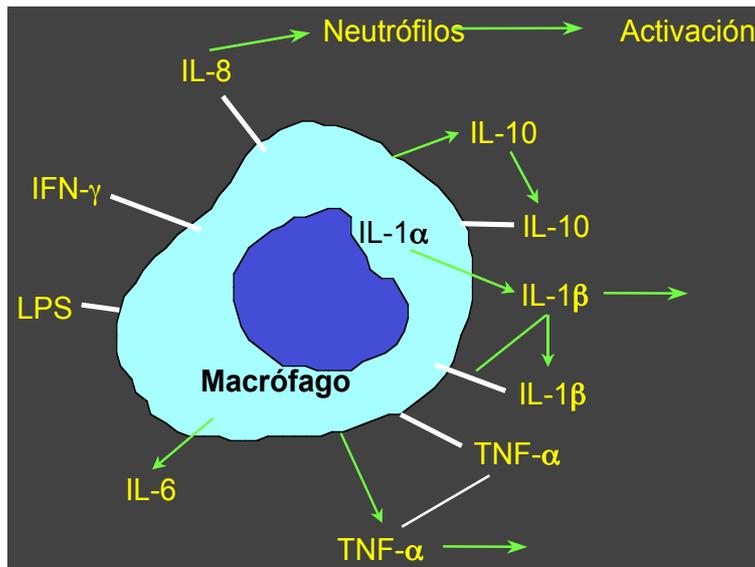


Figura 11.- Producción y efectos de las citocinas proinflamatorias II

Para finalizar podemos decir que ambas cirugías, electiva y de AAA roto desarrollan SIRS y esta respuesta es causada por lesión debida a isquemia-reperusión.

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.

## **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 ESPECÍFICOS:**

- Desarrollar un modelo experimental que simula una cirugía electiva en la aorta abdominal.
- Evaluar la evolución post-operatoria de las diferentes moléculas y células implicadas en la SIR.
- Determinar el punto de máximo incremento y la vuelta a la normalidad de los diferentes parámetros inflamatorios.
- Estudiar los posibles mecanismos de acción en el control de la respuesta inflamatoria por la Molsidomina.

### **III.- MATERIALES 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**

Durante el desarrollo de este trabajo se ha hecho uso de:

### **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. Suturas y ligaduras (seda, ácido poliglicólico y polipropileno).

Suero fisiológico, glucosado 5% y coloides (Hemocé®).

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 n° 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 (Penthotal 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, monitor 21".

### 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®.

### 1.3.7.- 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**

Utilizamos 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 provocarle 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.

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

En el grupo simulado, los animales fueron sometidos a laparotomía y disección aórtica. Se administró profilaxis antibiótica (cefalozina i.v después de la inducción anestésica).

2) Grupo Control (C): grupo simulado, más clampaje y by pass aorto-aortico.

El grupo control fue sometido a lo mismo que el grupo de simulación, pero con un clampaje aórtico suprarrenal (por debajo de la arteria mesentérica superior) y aorta distal (previa a la salida de las arterias iliacas) y colocación de una prótesis de dacrón colágena de 6 mm de diámetro (sumergida previamente -15 minutos- en una solución de Rifampicina).

3) Grupo de Estudio (NO): grupo C, más tratamiento con Molsidomina iv 30' antes de la reperfusión

El grupo de estudio fue sometido a lo mismo que el grupo control, pero además se trató a los animales con un donante de NO, la Molsidomina i.v , 30' antes de la reperfusión.

## **2.5. Variables Estudiadas y Técnicas de Determinación**

### **2.5.1. Citocinas en suero**

Para la determinación de TNF- $\alpha$ , interleucinas (1 $\beta$ , 6 y 10) e INF- $\gamma$  se obtuvieron muestras sanguíneas en seis momentos (clampaje y postclampaje a los 15 minutos, 24, 48, 72 h. y 7° d.).

#### Factor de necrosis tumoral- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ):

Para la determinación del TNF- $\alpha$  utilizamos un kit comercial (DuoSet ELISA Development System rat TNF- $\alpha$ /TNFSF1A, R&D SYSTEMS) basado en la técnica de ELISA.

Obtención de las muestras: Utilizamos muestras sanguíneas (N=5 por grupo) no hemolizadas. Inmediatamente después de su extracción, fueron centrifugadas extraído el suero, dividido en alícuotas y congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . 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  $-80^{\circ}\text{C}$  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- $\alpha$  adherido en cada uno de ellos para capturar el TNF- $\alpha$  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- $\alpha$ . 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 de longitud de onda ( $\lambda$ ) siendo los resultados obtenidos proporcionales a las cantidades de TNF- $\alpha$  de las muestras, las cuales fueron calculadas por interpolación con la curva estándar.

Interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ): Para la determinación de la IL-1 utilizamos un kit comercial (DuoSet ELISA Development System rat IL-1 $\beta$ /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- $\alpha$ .

Interferón- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ):

Para la determinación de la INF- $\gamma$  utilizamos un kit comercial (DuoSet ELISA Development System rat IFN- $\gamma$ , 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- $\alpha$ .

Interleucina-6 (IL-6):

Para la determinación de la IL-6 utilizamos 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- $\alpha$ .

#### Interleucina-10 (IL-10):

Para la determinación de la IL-10 utilizamos 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- $\alpha$ .

#### 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 centrífuga 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-dianisodinedihydrochloride 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 ( $\lambda$ ) y a 25° C. Se define la unidad (U) de actividad de la mieloperoxidasa a la

cantidad de enzima que degrada 1  $\mu\text{mol}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  / 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  $\text{O}_2^-$ . 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 longitud de onda. Precisamos los siguientes reactivos:

- 1.- Tampón fosfato-potásico 0,1 M+0,1 mM EDTA ; pH 7,8.
- 2.- Citocromo C 75  $\mu\text{M}$ .
- 3.- SOD (aproximadamente 240 U).

La lectura espectrofotométrica se realizó a 550 nm de  $\lambda$ ; 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  $\text{O}_2^-$ / 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:  $\Delta E_{550} / 21,0 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

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 ( $\Delta$  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  $\mu\text{l}$  de citocromo C (75  $\mu\text{M}$ ), 20  $\mu\text{l}$  de SOD (aproximadamente 264 U) y 25  $\mu\text{l}$  de muestra. La diferencia de volumen hasta 1.000  $\mu\text{l}$  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  $\lambda$  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 <sup>(93, 94, 95, 96, 97,98, 99, 101,102,188)</sup>.

#### 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  $\mu\text{l}$  de sobrenadante de cada pocillo y se mezclaron con 250  $\mu\text{l}$  de reactivo de Griess (sulfametacina 1% y dihidrocloruro de naftil-etilen-diamida 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 NFκB 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, 7día) y NFκB (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. SUPERVIVENCIA Y FUNCIÓN RENAL

Todos los animales sobrevivieron más de 7 días.

La agresión provocada en el grupo control, con respecto al grupo simulado provocó un incremento estadísticamente significativo ( $p < 0,01$ ) de los niveles de creatinina sérica en casi todos los momentos del estudio, alcanzándose valores normales en el día 7 en el que no se observaron diferencias significativas (pNS).

El tratamiento con Molsidomina (NO) no produjo diferencias significativas (pNS) con el grupo simulado.

Se observaron incrementos estadísticamente significativos ( $p < 0,01$ ) en los niveles de creatinina sérica en el grupo control con respecto al grupo de estudio (NO) en todos los momentos del estudio, excepto en el 7º día en el cual no hubo diferencias estadísticamente significativas (pNS).

Gráfico I.- Creatinina plasmática

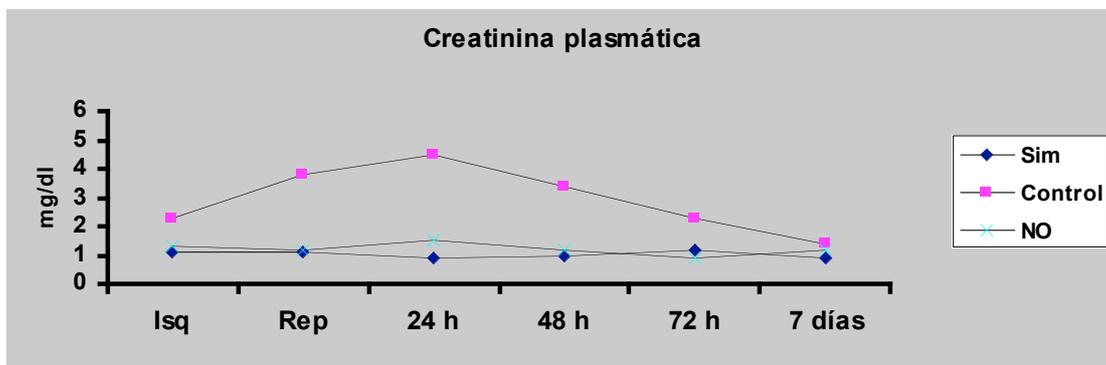


Tabla I.- Creatinina plasmática

	Sim	Control	NO
Isq	$1,1 \pm 0,1$	$2,3 \pm 0,3$	$1,3 \pm 0,2$
Rep	$1,1 \pm 0,1$	$3,8 \pm 0,4$	$1,2 \pm 0,2$
24 h	$0,9 \pm 0,1$	$4,5 \pm 0,4$	$1,5 \pm 0,2$
48 h	$1 \pm 0,1$	$3,4 \pm 0,3$	$1,2 \pm 0,2$
72 h	$1,2 \pm 0,12$	$2,3 \pm 0,3$	$0,9 \pm 0,1$
7 días	$0,9 \pm 0,1$	$1,4 \pm 0,3$	$1,2 \pm 0,2$

## 2. CITOCINAS PROINFLAMATORIAS (TNF- $\alpha$ , IL- $\beta$ , IFN- $\gamma$ )

### 2.1. Factor de Necrosis Tumoral $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ).

La agresión provocada en el grupo control provocó un incremento estadísticamente significativo ( $p < 0,001$ ) en los niveles de TNF- $\alpha$  en todos los momentos en comparación con los animales del grupo simulado, excepto en la fase de isquemia en la que no se observaron diferencias significativas (pNS).

El tratamiento con Molsidomina (NO) no produjo diferencias significativas (pNS) con el grupo simulado.

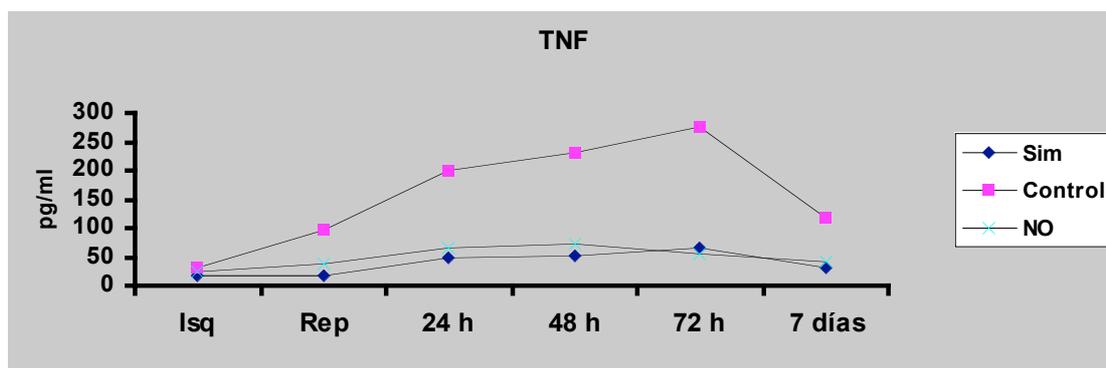
No se observaron diferencias estadísticamente significativas (pNS) en la fase de isquemia entre el grupo de estudio (NO) y el grupo control, pero el descenso en los niveles de TNF- $\alpha$  si fue estadísticamente significativo ( $p < 0.01$ ) en el resto de los momentos entre el grupo de estudio y el grupo control.

Tabla II.- Factor de Necrosis Tumoral- $\alpha$

	Sim	Control	NO
Isq	17,3 $\pm$ 3,8	29,6 $\pm$ 7,7	24,3 $\pm$ 6,7
Rep	17,3 $\pm$ 3,8	95,6 $\pm$ 18,2	39,2 $\pm$ 5,8
24 h	47,8 $\pm$ 4,9	201,4 $\pm$ 34,5	66,8 $\pm$ 9
48 h	52,5 $\pm$ 6,3	229,8 $\pm$ 46,3	73,2 $\pm$ 8,3
72 h	66,1 $\pm$ 5,7	275,6 $\pm$ 59,9	54,1 $\pm$ 5,7
7 días	29,6 $\pm$ 4,8	118,2 $\pm$ 26,1	39,8 $\pm$ 6,8

pg/ml

Gráfico II.- Factor de Necrosis Tumoral- $\alpha$



Los niveles de TNF- $\alpha$  fueron más bajos en el grupo simulado que en el grupo de estudio en todos los momentos excepto a las 72 horas después de la revascularización.

Tanto en el grupo simulado como en el grupo control, el máximo se alcanzó a las 72 horas después de la revascularización, mientras que en el grupo de estudio el máximo se alcanzó a las 48 horas.

## 2.2. Interleucina-1beta (IL-1 $\beta$ ).

La IL-1 $\beta$  se comportó como el TNF- $\alpha$  (Tabla III, Gráfico III).

Durante la fase de isquemia no se observaron diferencias estadísticamente significativas (pNS) entre el grupo simulado y el grupo control.

En el grupo control se observan niveles significativamente más altos que en el simulado tanto en la fase de reperfusión ( $p < 0,05$ ) como en el resto de los momentos ( $p < 0,001$ ) y el valor más alto se alcanzó a las 72 horas.

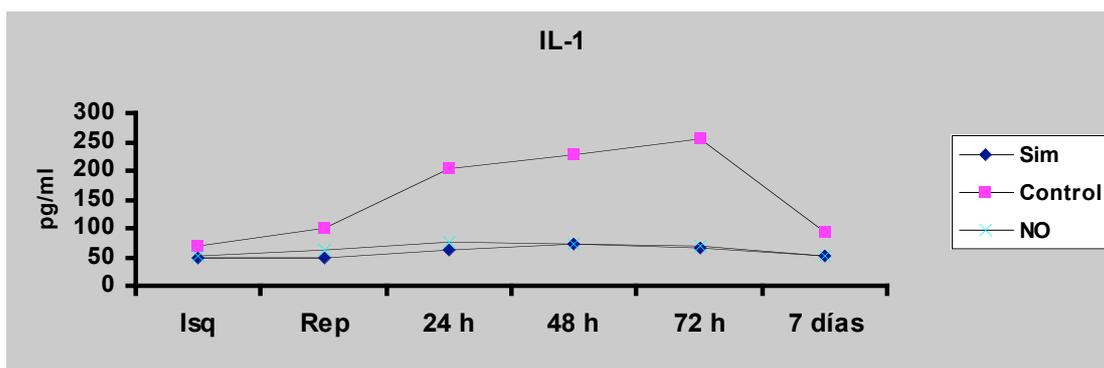
En la fase de isquemia no se observan diferencias significativas en los niveles de IL-1 $\beta$  entre el grupo de estudio (NO) y el grupo control, mientras que en el resto de los momentos en el grupo de estudio (NO) se observan niveles significativamente más bajos ( $p < 0,05$ ) que en el grupo control.

Tabla III.- Interleucina-1 $\beta$

	Sim	Control	NO
<b>Isq</b>	48,3 $\pm$ 9,5	67,4 $\pm$ 10,1	53,1 $\pm$ 8,3
<b>Rep</b>	48,3 $\pm$ 9,5	99,6 $\pm$ 14,6	62,9 $\pm$ 8,7
<b>24 h</b>	63,2 $\pm$ 8,3	203,2 $\pm$ 29,8	74,2 $\pm$ 9,4
<b>48 h</b>	71,8 $\pm$ 7,7	228,9 $\pm$ 33,8	71,4 $\pm$ 8,6
<b>72 h</b>	64,9 $\pm$ 6,9	256 $\pm$ 42,7	69,6 $\pm$ 5,5
<b>7 días</b>	53,1 $\pm$ 5,2	94,5 $\pm$ 12,2	50,2 $\pm$ 4,2

pg/ml

Gráfico III.- Interleucina-1 $\beta$



### 2.3. Interferon-gamma (INF- $\gamma$ ).

El INF- $\gamma$  se comportó como las dos citocinas anteriores (Tabla IV, Gráfico IV), pero hubo un momento significativo durante el periodo de isquemia ( $p < 0,05$ ) en el grupo control en comparación con los animales de simulación.

La agresión provocada en el grupo control induce un aumento del INF- $\gamma$  en la fase de isquemia ( $p < 0,05$ ) y en el resto de los momentos ( $p < 0,01$ ) respecto al grupo simulado.

El grupo tratado con NO no presentó diferencias estadísticamente significativas en los niveles de INF- $\gamma$  en la fase de isquemia con respecto al control, pero presentó un descenso significativo en los niveles de INF- $\gamma$  con respecto al control en la fase de reperfusión y a los 7 días ( $p < 0,05$ ) y en el resto de los momentos ( $p < 0,01$ ).

El grupo simulado sólo presentó diferencias estadísticamente significativas con el grupo de estudio (NO) en dos momentos: a las 24 y a las 48 horas después de la reperfusión ( $p < 0,05$ ).

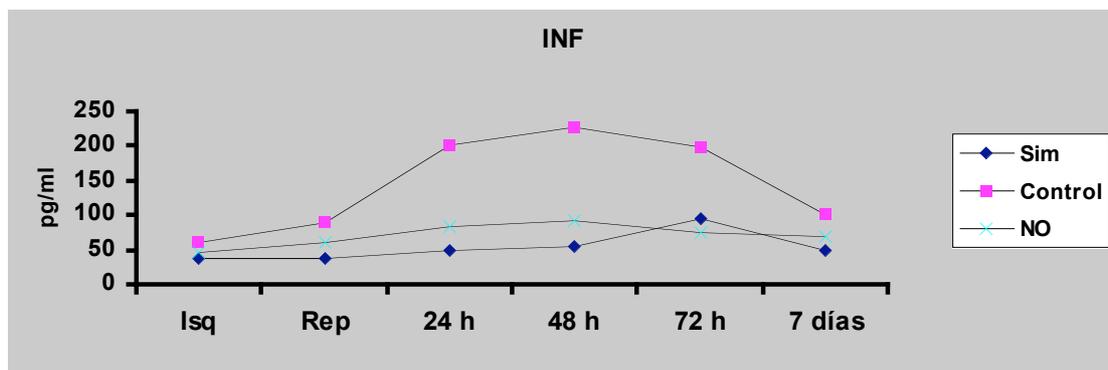
Tabla IV.-Interferon- $\gamma$

	Sim	Control	NO
Isq	38,1 $\pm$ 5,3	60,2 $\pm$ 7,2	46,1 $\pm$ 7,8
Rep	38,1 $\pm$ 5,3	87,9 $\pm$ 8,5	60,3 $\pm$ 9,3
24 h	49,7 $\pm$ 7,1	201,4 $\pm$ 22	82,9 $\pm$ 9,6
48 h	53,8 $\pm$ 6,4	228,2 $\pm$ 31,8	91 $\pm$ 12,5
72 h	96,2 $\pm$ 9,8	197,3 $\pm$ 34,6	74,6 $\pm$ 8,1
7 días	50 $\pm$ 4,7	99,4 $\pm$ 20,4	68,3 $\pm$ 5,6

pg/ml

Tanto en el grupo control como en el grupo de estudio los niveles más altos se observaron a las 48 horas.

Gráfico IV.- Inteferon- $\gamma$



### **3. CITOCINAS ANTIINFLAMATORIAS IL-6 E IL-10**

#### **3.1. Interleucina-6 (IL-6).**

La agresión que sufrió el grupo control (C) en comparación con el grupo de simulación (Sim) causó un descenso en el nivel de IL-6 solamente a las 24, 48 y 72 horas después de la reperfusión ( $p < 0,05$ ) con un incremento en el día 7 ( $p < 0,05$ ).

El valor más bajo se observó en el grupo control a las 48 horas (Tabla V, Gráfico V).

No hubo diferencias estadísticamente significativas en los niveles de IL-6 durante las fases de isquemia y reperfusión (pNS) entre el grupo simulado y el grupo control pero si se observaron en el resto de los momentos del estudio ( $p < 0,05$ ).

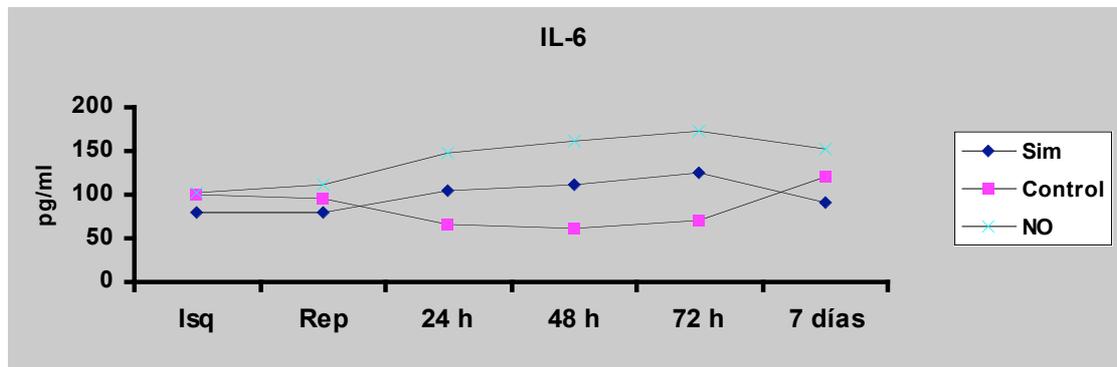
Entre el grupo simulado y el grupo de estudio (NO) sólo hubo diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) a las 72 horas después de la reperfusión y al 7º día.

En el grupo de estudio (NO) hubo un aumento significativo en los niveles de IL-6 ( $p < 0,05$ ) respecto del grupo control en tres momentos del estudio (24,48 y 72 horas después de la reperfusión), no siendo estadísticamente significativo (pNS) en el resto.

Tabla V. Interleucina-6

	Sim	Control	NO
Isq	80,2 ± 5,2	99,8 ± 11,4	102,4 ± 13,5
Rep	80,2 ± 5,2	96,4 ± 14,6	110,6 ± 13,8
24 h	103,5 ± 9,6	65,2 ± 10,1	148,3 ± 16,4
48 h	110,9 ± 10,5	60,6 ± 9	161,6 ± 18,2
72 h	124,6 ± 12,8	71,5 ± 12,3	173,1 ± 19,9
7 días	91,4 ± 7,3	120,7 ± 21,8	152,9 ± 21

Gráfico V.-Interleucina-6



### 3.2.-Interleucina-10 (IL-10).

La agresión provocada en el grupo control produjo en comparación con el grupo simulado una disminución de la IL-10 sólo a las 24, 48 y 72 horas después de la reperusión ( $p < 0,05$ ), no habiendo diferencias significativas en el resto de los momentos (pNS).

En el grupo control el nivel más bajo se produjo a las 72 horas (Tabla VI, Gráfico VI).

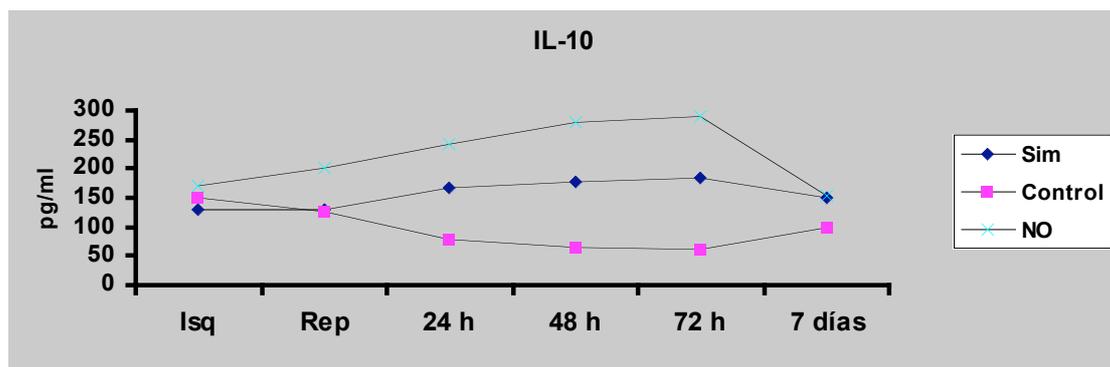
El tratamiento con NO produjo un aumento en los niveles de IL-10 estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ) en el grupo de estudio respecto del grupo simulado en todos los momentos, y también respecto del grupo control ( $p < 0,05$ ).

Tabla VI.-Interleucina-10

	Sim	Control	NO
Isq	130 ± 12,8	149,6 ± 27	171,5 ± 33,3
Rep	130 ± 12,8	126,2 ± 25,8	199,8 ± 29,8
24 h	168,3 ± 17,7	76,9 ± 22,6	243,2 ± 41,3
48 h	175,8 ± 21,9	65,7 ± 18,4	279,4 ± 46,9
72 h	183,4 ± 23,5	62,3 ± 21,7	288,6 ± 53,2
7 días	149,6 ± 19,6	100,2 ± 32,6	153,2 ± 31,1

Pg/ml

Gráfico VI.- Interleucina-10



#### 4. INFILTRACIÓN DE NEUTRÓFILOS (MIELOPEROXIDASA-MPO)

Con la determinación de la actividad de la mieloperoxidasa determinamos, en tejido renal, la infiltración neutrofílica (Tabla VII, Gráfico VII).

Se aprecia una elevación significativa de la actividad enzimática ( $p < 0,001$  en riñón) con incremento de MPO en el grupo control con respecto al simulado en todos los momentos.

Se produjo un descenso estadísticamente significativo de MPO en el tejido renal en el grupo de estudio tratado con molsidomina con respecto al grupo control en todos los momentos ( $p < 0,01$ ), existiendo un momento significativo en el 7º día ( $p < 0,05$ ).

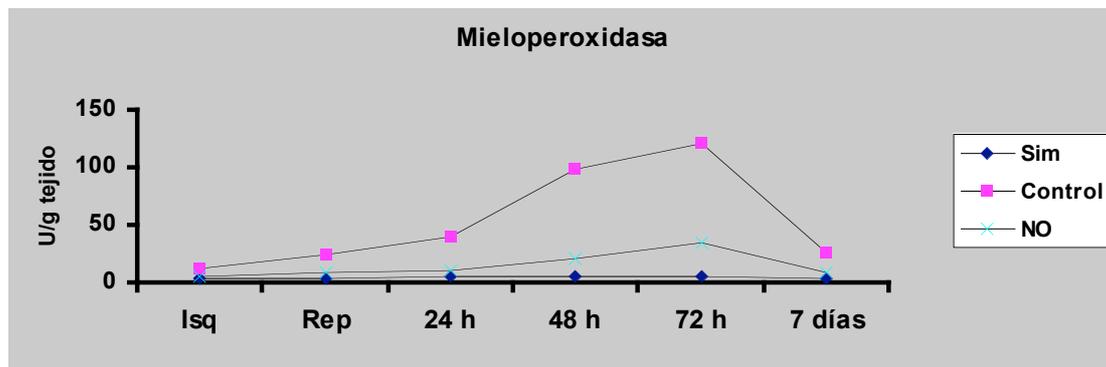
Tanto en el grupo control como en el grupo de estudio los valores más altos de MPO se alcanzaron a las 72 horas.

Tabla VII- Actividad de la mieloperoxidasa en riñón

	Sim	Control	NO
Isq	3,5 ± 0,4	12,3 ± 0,8	4,6 ± 2,6
Rep	3,5 ± 0,4	24,6 ± 1,7	8,9 ± 3,3
24 h	4,8 ± 0,4	38,9 ± 3,9	11,2 ± 5,1
48 h	5,7 ± 0,5	97,5 ± 12,3	21,3 ± 4,9
72 h	5,5 ± 0,4	121,3 ± 23	34,4 ± 10,4
7 días	4 ± 0,3	26,4 ± 9,6	8,5 ± 3,9

U/gr tejido

Gráfico VII- MPO Riñón



## 5. NITRITOS SÉRICOS

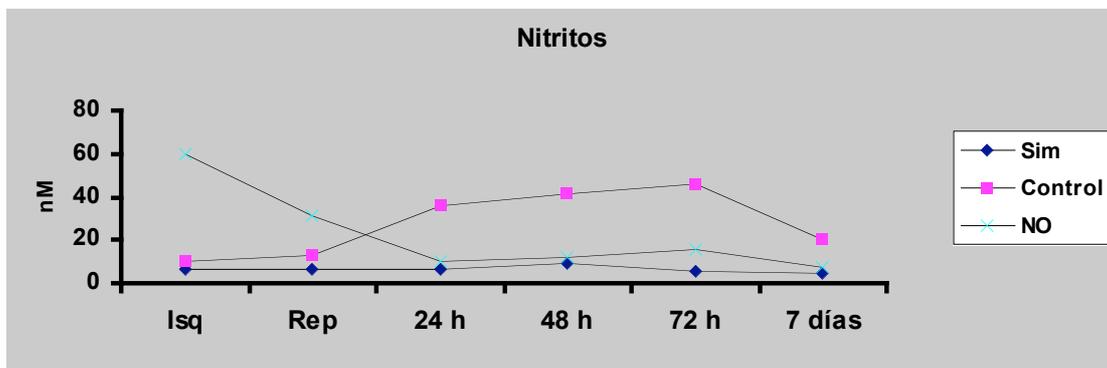
En comparación con el grupo simulado, la agresión que sufrió el grupo control provocó un aumento de los niveles de nitritos en todos los momentos ( $p < 0,001$ ), excepto en el período isquémico (pNS).

Nuestro trabajo demuestra que el clampaje suprarrenal (pero inframesentérico) es seguido por aumentos significativos de NO, observándose la máxima producción de nitritos a las 72 horas en el grupo control (tabla VIII, Gráfico VIII).

Tabla VIII- Nitritos Séricos

	Sim	Control	NO
<b>Isq</b>	6,6 ± 0,3	9,7 ± 1,2	59,6 ± 23,6
<b>Rep</b>	6,6 ± 0,3	12,6 ± 1,8	31,5 ± 19,4
<b>24 h</b>	6,7 ± 0,8	35,7 ± 6,4	10,4 ± 4,7
<b>48 h</b>	8,9 ± 0,9	41,5 ± 10,3	11,9 ± 3,2
<b>72 h</b>	5,8 ± 0,5	45,9 ± 10,7	15,6 ± 5,1
<b>7 días</b>	4,2 ± 0,5	20,1 ± 7,3	7,3 ± 3,6

Gráfico VIII- Nitritos Séricos



## 6. RADICALES LIBRES DEL OXÍGENO

### 6.1. Superóxido Dismutasa (SOD)

Determinamos la actividad de la SOD en tejido renal según la técnica expuesta en el apartado de Material y Método. Los resultados obtenidos fueron los siguientes (Tabla IX) (Gráficos IX):

El modelo de agresión utilizado en el grupo control produjo aumentos en todos los momentos de la actividad SOD ( $p < 0,001$ ) en comparación con el grupo de simulación.

En el grupo de estudio (NO) en el tejido renal se observó en comparación con el grupo simulado un aumento estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ) de la actividad SOD a las 24 y 48 horas postreperfusión.

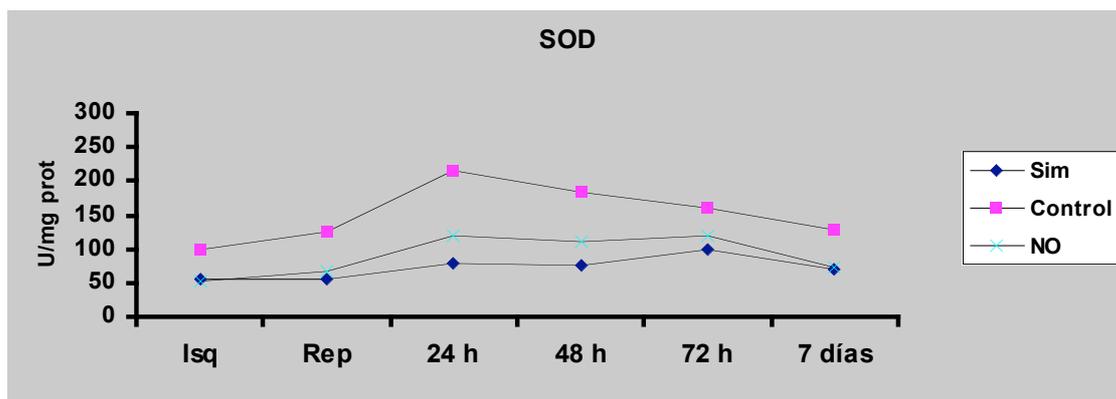
En el grupo de estudio (NO) se observó un descenso estadísticamente significativo ( $p < 0,01$ ) de la actividad SOD con respecto al grupo control, siendo más significativo en el 7º día ( $p < 0,05$ ).

Tabla IX- SOD en riñón

	Sim	Control	NO
Isq	54,7 ± 12,3	97,7 ± 22,1	51 ± 10,05
Rep	54,7 ± 12,3	124,6 ± 37,6	67,1 ± 9,4
24 h	78,1 ± 10,9	216,9 ± 45,8	119,3 ± 19,9
48 h	75,3 ± 14,7	184 ± 40,2	111,2 ± 23
72 h	100,2 ± 28,5	161,3 ± 39,6	120 ± 27,8
7 días	70 ± 18,2	128,6 ± 42	73,5 ± 21,3

Pg/ml

Gráfico IX- SOD riñón



## 6.2. Anión superóxido (ASO).

Determinamos el Anión Superóxido (ASO), en tejido renal según la técnica expuesta en el apartado de Material y Método. Los resultados obtenidos fueron los siguientes (Tabla X) (Gráfico X).

En el tejido renal, el modelo de agresión utilizado en el grupo control produjo aumento en todos los momentos de los niveles de ASO ( $p < 0,001$ ) en comparación con el grupo de simulación.

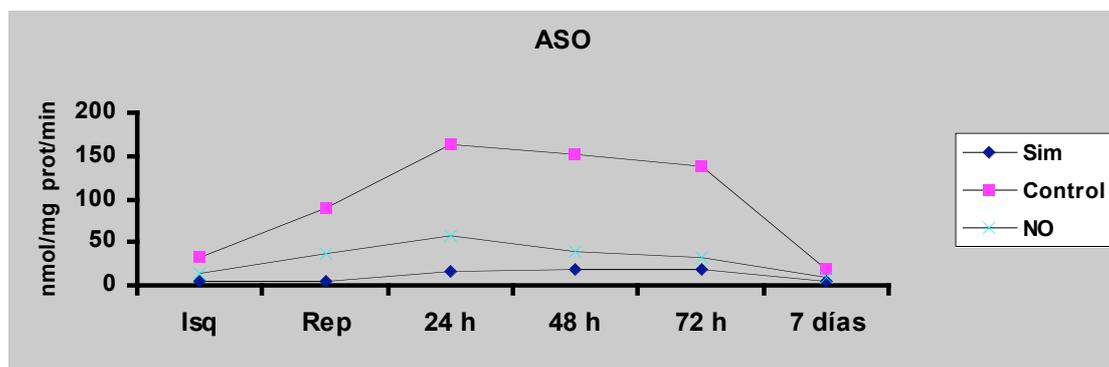
En el grupo de estudio (NO) en el tejido renal se observó en comparación con el grupo simulado un aumento estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ) de los niveles de ASO.

En el grupo de estudio (NO) en el tejido renal se observó en comparación con el grupo control un descenso estadísticamente significativo ( $p < 0,05$  en 7º día y  $p < 0,01$  en resto) de los niveles de ASO.

Tabla X- ASO en riñón

	Sim	Control	NO
Isq	4,9 ± 0,5	33,2 ± 5,9	14,7 ± 3,7
Rep	4,9 ± 0,5	89,2 ± 11,6	37,6 ± 8,1
24 h	16,8 ± 2	163,8 ± 25,2	57,2 ± 9,3
48 h	17,3 ± 2,9	151,1 ± 31,5	39,9 ± 5,3
72 h	19,1 ± 2,2	137,9 ± 27,6	31,6 ± 5,8
7 días	5,2 ± 0,4	17,8 ± 13,3	10,3 ± 2,2

Gráfico X-ASO en riñón



## 7. SINTASA DE ÓXIDO NÍTRICO INDUCIBLE (iNOS)

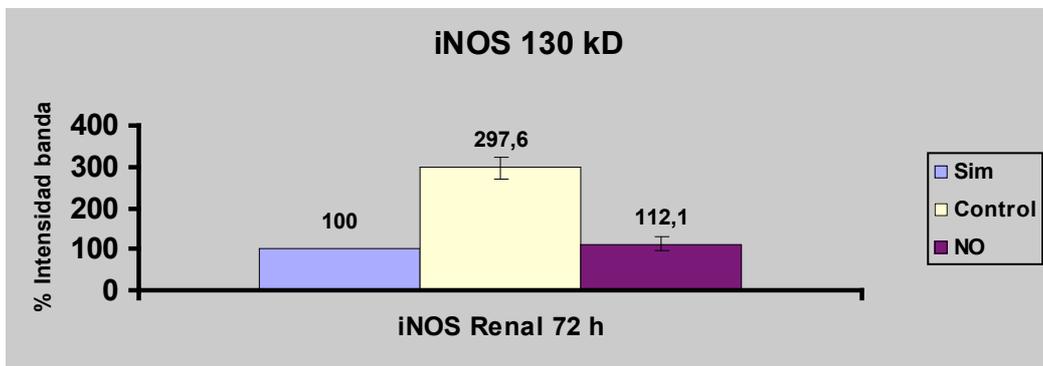
Solo se determinó a las 72 h (Gráfico XI).

A las 72 horas después de la reperusión observamos un incremento en la expresión de iNOS ( $p < 0,01$ ) en el grupo control en comparación con el grupo simulado.

No hubo diferencias estadísticamente significativas en la expresión de iNOS entre el grupo de estudio (NO) con respecto al grupo de simulación (pNS).

A las 72 horas después de la reperusión observamos un descenso en la expresión de la iNOS ( $p < 0,01$ ) en el grupo de estudio (NO) con respecto al grupo control.

Gráfico XI- iNOS riñón



## 8. MOLÉCULAS DE ADHESIÓN CELULAR SOLUBLES (sICAM-1 y sVCAM-1) Y EN TEJIDO RENAL (ICAM-1, VCAM-1, PECAM-1)

ICAM-1 y VCAM-1 en el tejido renal tuvieron el mismo comportamiento, ya que ambos grupos (Control y de estudio) en comparación con el grupo de simulación presentaron un incremento significativo en la expresión de estas moléculas de adhesión celular a las 24 y 48 horas de la reperusión ( $p < 0,01$ ), que desapareció en el día 7 (Gráficos XII y XIII).

El modelo de agresión utilizado en el grupo control produjo aumento de los niveles de ICAM-1 y de VCAM-1 ( $p < 0,01$ ) a las 24 y 48 horas en comparación con el grupo de simulación, no existiendo entre ambos grupos diferencias estadísticamente significativas en el día 7 (pNS).

Entre el grupo de estudio (NO) y el grupo simulado no existieron diferencias estadísticamente significativas (pNS) en ninguno de los momentos estudiados.

En el grupo de estudio (NO) se observó una significativa disminución ( $P < 0,01$ ) de la expresión de ICAM-1 y de VAM-1 en comparación con el grupo control a las 24 y 48 horas, mientras que en el 7º día no hubo diferencias estadísticamente significativas (pNS).

Gráfico XII- ICAM-1 en riñón

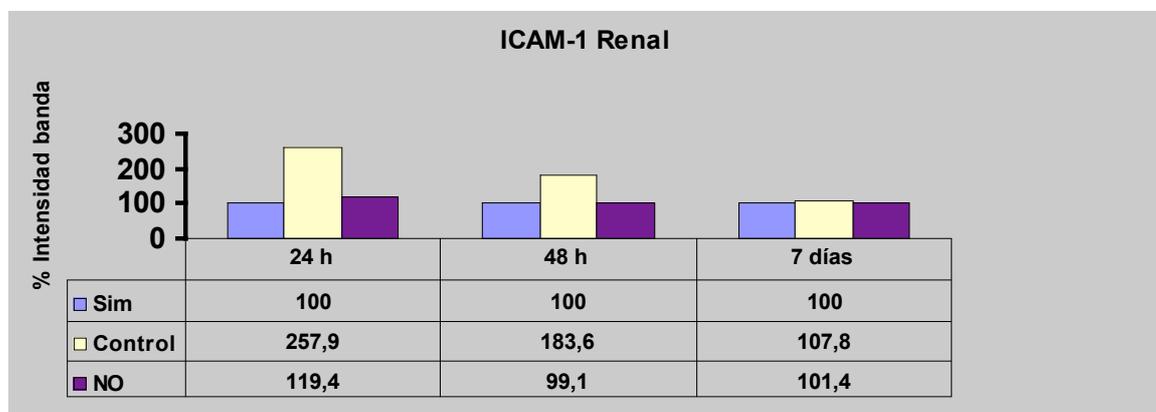
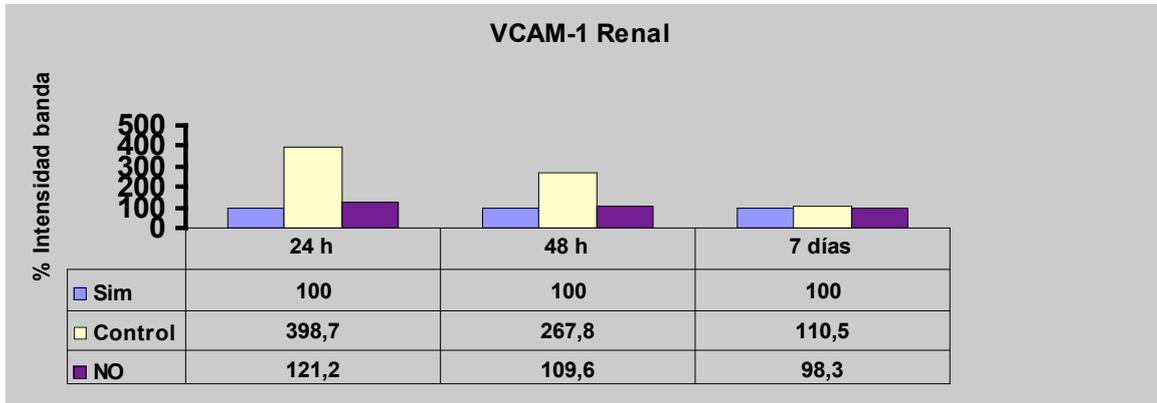


Gráfico XIII-VCAM-1 en riñón

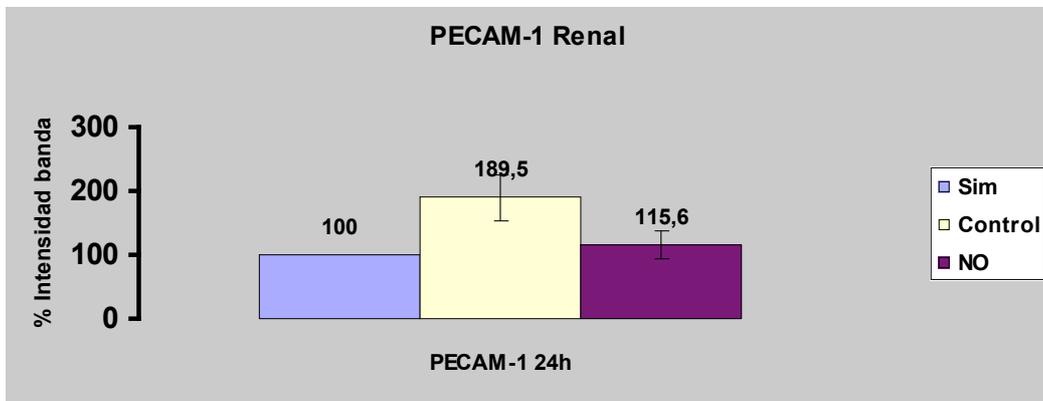


La molécula de adhesión PECAM-1 se evaluó únicamente a las 24 horas (Gráfico XIV):

El grupo control presentó a las 24 horas un aumento significativo de PECAM-1 ( $p < 0,01$ ) tanto respecto del grupo simulado como respecto del grupo de estudio.

No hubo diferencias estadísticamente significativas (pNS) en los niveles de PECAM-1 a las 24 horas entre el grupo simulado y el grupo de estudio

Gráfico XIV- PECAM-1 en riñón



Las dos moléculas de adhesión celular solubles evaluadas, sICAM-1 y sVCAM-1, tuvieron el mismo comportamiento (Gráficos XV y XVI ):

La observación más sobresaliente fue la falta de expresión de los CAMs solubles durante todos los momentos investigados, mientras que si se expresaron en el tejido renal.

Gráfico XV- sICAM-1

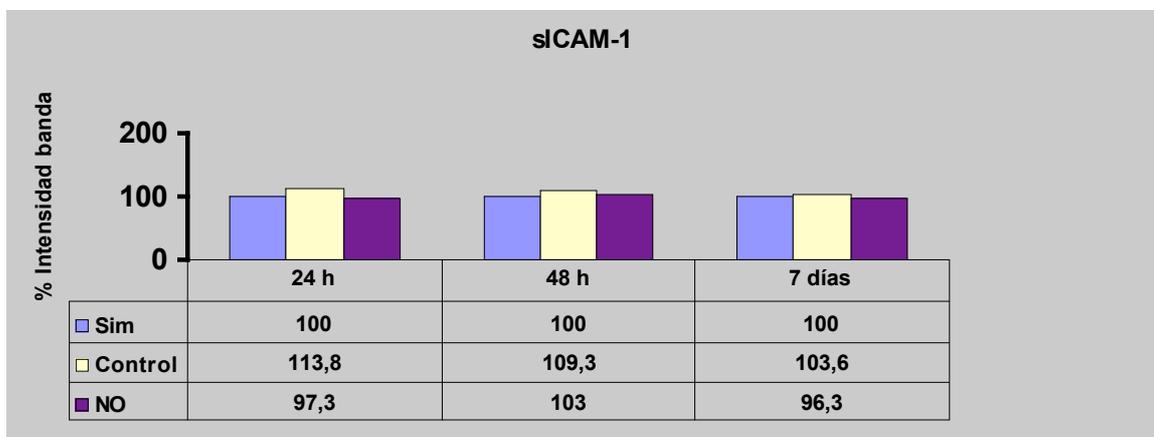
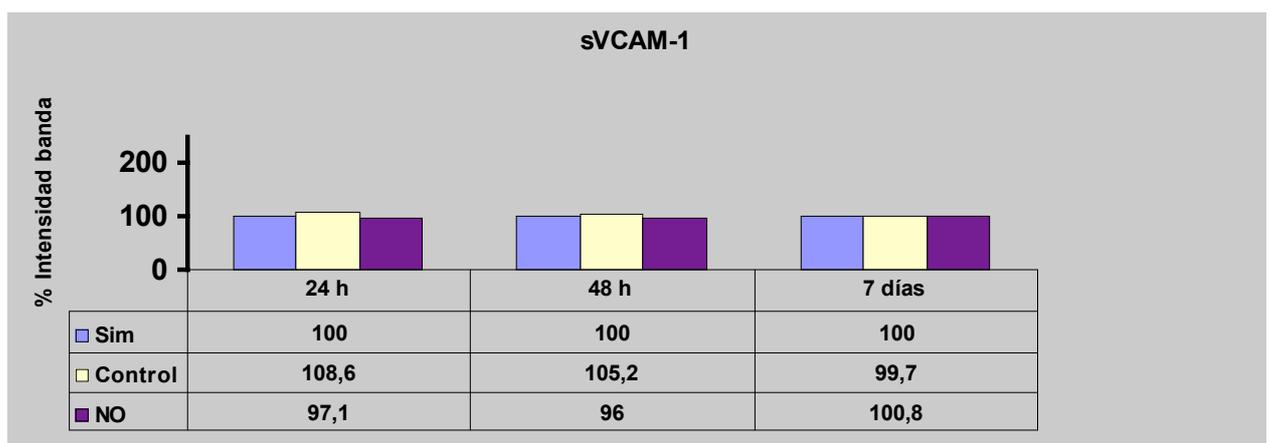


Gráfico XVI- sVCAM



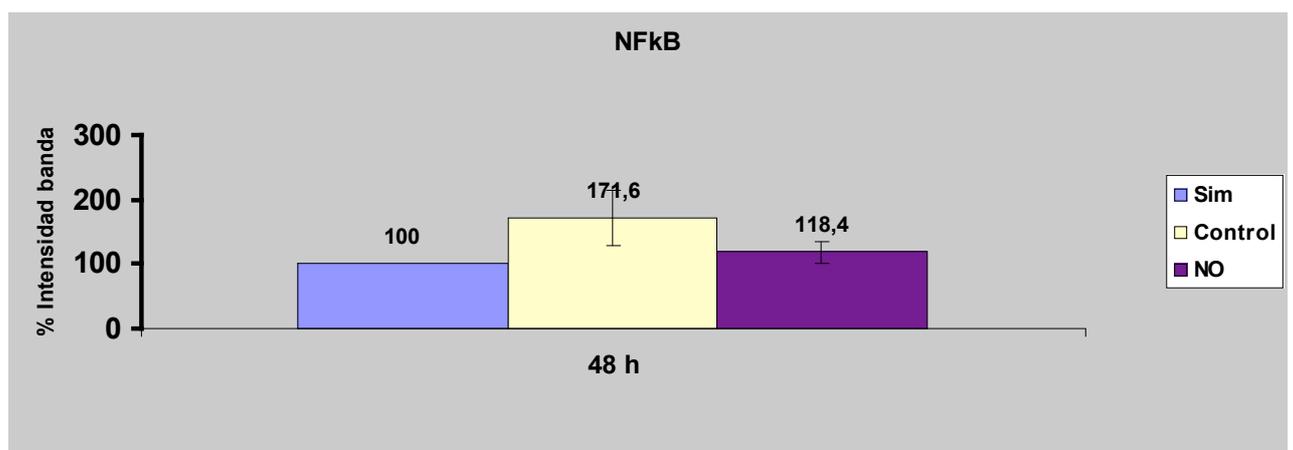
## 9. FACTOR TRANSCRIPCIONAL NUCLEAR KAPPA B (NFκB)

A las 48 horas después de la reperfusión en el grupo control observamos un aumento en la expresión de NFκB ( $p < 0,05$ ) en comparación con el grupo de simulación.

En el grupo de estudio (NO) a las 48 horas después de la reperfusión observamos un descenso en la expresión de NFκB ( $p < 0,05$ ) en comparación con el grupo control.

No hubo diferencias estadísticamente significativas en los niveles de NFκB a las 48 horas ( $pNS$ ) entre el grupo de estudio y el grupo de simulación.

Gráfico XVII- NFκB en riñón



## **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 <sup>(311, 298, 5)</sup>.

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. En nuestra especialidad, la estomatología, este aserto tiene una importancia capital, ya que tras cualquier acto de cirugía bucal, se pone en marcha el proceso inflamatorio que tiene como síntomas fundamentales un cuadro doloroso en la zona intervenida, la tumefacción de partes blandas con la consiguiente deformidad facial, y a la vez un cierto grado de trismo asociado. El control de estos síntomas ha sufrido importantes modificaciones a lo largo de los últimos años, conforme ha ido avanzando el conocimiento de las bases fisiopatológicas de la inflamación <sup>(249)</sup>. Por otra parte, el desarrollo de la implantología y los avances en biomateriales han contribuido a la mayor utilización de implantes dentales en pacientes parcial o totalmente edéntulos <sup>(196)</sup>, y concretamente en los últimos años la demanda de tratamientos con implantes dentales en distintas especialidades de la odontología (periodoncia, ortodoncia) ha crecido enormemente, dedicándose especial atención a aspectos como nuevos diseños, nuevas superficies, biomecánica etc <sup>(1, 100, 12, 85, 212, 238)</sup>. En el campo de la periodoncia el tratamiento con implantes se realiza con la finalidad de poder reemplazar los dientes, el hueso y los tejidos blandos ausentes para restaurar la función masticatoria, la fonética y la estética, mientras que en el campo de la ortodoncia no se busca obtener osteointegración ya que su finalidad es utilizar los implantes como anclaje extradentario, por ello se utilizan con mayor frecuencia miniplacas y microimplantes para evitar el trauma quirúrgico de la explantación de implantes osteointegrados <sup>(41, 85, 230)</sup>.

Recientes publicaciones <sup>(22,124,65,112,244)</sup> demuestran que las complicaciones biológicas de este tipo de tratamientos, tales como la mucositis y la periimplantitis están aumentando de forma alarmante y se sabe que el fallo de los mecanismos de control de la respuesta inflamatoria es uno de los factores que puede condicionar el fracaso del implante dental <sup>(22, 41, 230)</sup>.

Por otra parte algunos autores concluyen que existe asociación entre enfermedad periodontal y riesgo aumentado de padecer enfermedad cardiovascular, existiendo estudios que demuestran que niveles altos de marcadores inflamatorios en el fluido sulcular de pacientes periodontales como son el factor de necrosis tumoral (TNF), la proteína C reactiva (CRP) y la interleuquina 6 (IL-6) indican un riesgo aumentado de padecer enfermedad coronaria <sup>(224)</sup>. Por esta razón consideramos que es esencial para nuestra especialidad profundizar en el estudio de la respuesta inflamatoria y sus mecanismos fisiopatológicos.

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

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 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.

Nuestro grupo de trabajo en diversos estudios ha observado como la implantación de diferentes materiales protésicos utilizados en cirugía vascular produce un aumento en todas las variables inflamatorias. Con el presente

estudio queremos, siguiendo con esta línea de investigación, profundizar más en el conocimiento de la respuesta inflamatoria sistémica que se produce al implantar un tipo de prótesis en un animal de experimentación, con la finalidad de evaluar el efecto beneficioso de la administración de un donante de óxido nítrico mediante la modulación de la inflamación.

En nuestro modelo experimental, el tratamiento con un donante de óxido nítrico (Molsidomina®) regula la respuesta inflamatoria sistémica y minimiza el daño a nivel renal.

El mecanismo por el cual el NO protege la función renal después del clampaje aórtico es probablemente multifactorial, y su contribución al control de la respuesta inflamatoria en situaciones como la cirugía de aorta abdominal electiva y urgente puede hacer que tenga un papel importante en el futuro de la cirugía vascular.

## **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**

Nuestra intención era conseguir un modelo de agresivo límite pero libre de mortalidad, puesto que en estudios previos realizados por nuestro grupo de trabajo, con una duración del clampaje mayor de 30 minutos y/o sangría mayor del 40% de la volemia se ocasionaron situaciones de paraplejia, infección intraabdominal y/o 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.

### **2.3. Obtención de 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- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e INF- $\gamma$ , 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. 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-reperusión <sup>(155, 172, 222, 259, 285)</sup>. 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 <sup>(69, 75, 173, 182)</sup>.

- Radicales Libres de Oxígeno y “barrenderos” en Riñón: Su participación en la lesión post-reperusión ha sido ampliamente descrita en la literatura <sup>(74)</sup>, destacando a este respecto los trabajos realizados por nuestro grupo en modelos de isquemia-reperusión hepática e intestinal que los hacen responsables de los daños en la fase post-reperusión <sup>(69,98,93,97)</sup>. 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 <sup>(97, 102, 104)</sup>. Los RLO se pueden medir de manera directa, determinando la producción del anión superóxido <sup>(102)</sup> o bien de manera indirecta estudiando la actividad del enzima detoxificante superóxido-dismutasa <sup>(92)</sup>.

- 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 <sup>(158)</sup>. 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 <sup>(98)</sup>. 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: Responsables de la interacción leucocito-endotelio y, por tanto, de la migración leucocitaria su incremento en la expresión se asocia a una mayor infiltración neutrofílica y a un mayor daño orgánico.

- Factor Transcripcional  $\kappa$ 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

En el modelo experimental que se ha desarrollado en el presente trabajo nos hemos planteado estudiar el síndrome de la respuesta inflamatoria, sus consecuencias en un modelo experimental de cirugía aórtica protésica con pinzamiento suprarrenal y su control profiláctico con un donador de óxido nítrico como es la Molsidomina<sup>®</sup>.

Los resultados obtenidos, en la valoración de la mortalidad, en todos los grupos 100% de supervivencia a los 7 días, demuestra la correcta ejecución de las técnicas quirúrgicas y complementarias empleadas y cumple con nuestro primer objetivo de desarrollar un modelo experimental agresivo pero sin mortalidad.

La valoración de la función renal es la segunda variable estudiada que nos termina por contestar a la pregunta: ¿es la Molsidomina<sup>®</sup>, beneficiosa en el modelo experimental planteado? Observamos un mantenimiento de la función orgánica en los animales tratados con el donador de NO. Este mantenimiento de la función orgánica ha sido puesto de manifiesto por otros autores, en diferentes modelos experimentales<sup>(248, 263, 186, 187, 188)</sup>. Los mecanismos, desarrollados localmente en el riñón y que influyen de manera esencial en la mejoría de la función renal podrían ser:

- El aporte de NO exógeno, en el caso de la Molsidomina<sup>®</sup>, mantendría en el riñón la síntesis de sustancias con acción vasodilatadora, esencialmente las PGE<sub>2</sub> y PGI<sub>2</sub>; así como, bloquearía la síntesis de otras con carácter vasoconstrictor como el TxA<sub>2</sub>, el Leucotrieno C<sub>4</sub> o la endotelina 1. Murohara recoge la posible influencia de los neutrófilos y los RLO por ellos producidos con la consiguiente disfunción endotelial causada, como promotores de vasoconstricción; esta vasoconstricción quedaría inhibida por la administración de NO (por bloqueo de la infiltración)<sup>(207)</sup>.

- Disminución del efecto de contracción mesangial inducida por los RLO <sup>(208)</sup>.
- El probable descenso local, con el NO exógeno aportado, de la producción de NO por la enzima renal iNOS, junto con el mantenimiento de la síntesis de NO por la enzima cNOS sería esencial en la conservación de la función renal <sup>(39,176, 98)</sup>. Y esto, por la producción de una vasodilatación arteriolar con integridad de la filtración glomerular, así como, por el desarrollo de un efecto diurético y natriurético directo ya demostrado que puede ser producido por el NO sintetizado por la cNOS<sup>(58)</sup>. Johnson<sup>(147)</sup> y Siegfried <sup>(265)</sup> en modelos de I-R miocárdica, Kin en uno renal <sup>(152)</sup> y Koide <sup>(154)</sup> en cultivos celulares de fibras musculares lisas, afirman que el NO exógeno podría disminuir la activación de la isoenzima iNOS tal y como nosotros hemos comprobado en nuestro modelo experimental.

Las causas que pueden conducir a esta significativa disminución de la morbilidad son muchas y dependientes de la regulación de la respuesta inflamatoria por parte de los fármacos empleados (disminución del rodamiento y adhesión leucocitaria, disminución del fenómeno de no reflujo postisquémico, modulación de la infiltración neutrofílica, disminución de producción de RLO y citocinas proinflamatorias, control de la transcripción nuclear, etc.), algunos de estos aspectos serán desarrollados a continuación.

La importancia del estado oxidativo en la respuesta inflamatoria es de vital importancia, por ello el estudio de los radicales libres del oxígeno en el fenómeno inflamatorio ha sido muy intenso y el consenso de la comunidad científica en cuanto a sus efectos unánime <sup>(99, 95, 97, 129, 146, 162 229)</sup> (Figura 43).

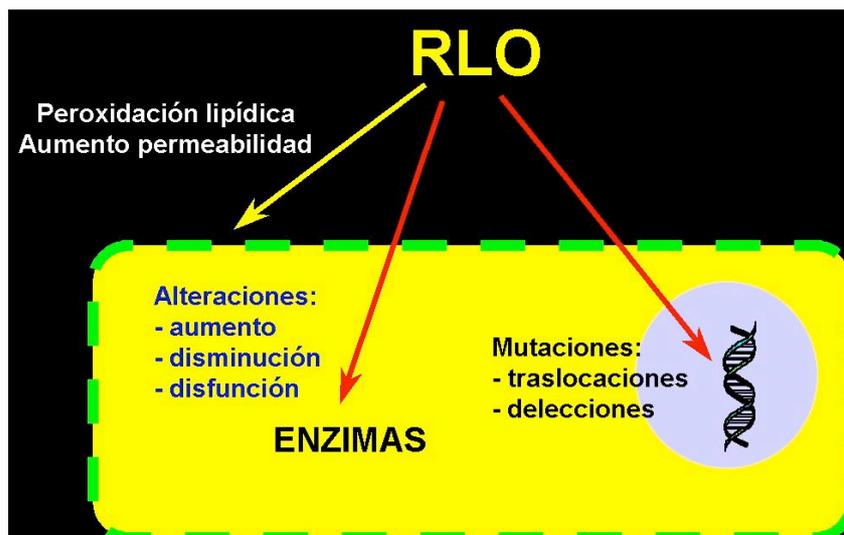


Figura 43.- Efectos de los radicales libres del oxígeno

Nuestros resultados demuestran un fuerte incremento de la actividad enzimática del sistema defensivo (SOD) en el Grupo Control que se corrobora con la elevación en la producción de anión superóxido; en este sentido se demuestra que a pesar de la puesta en marcha de los mecanismos detoxificantes, estos son insuficientes para eliminar la explosión oxidativa de la respuesta inflamatoria originada en el modelo experimental utilizado <sup>(64)</sup>.

La disminución significativa observada en el grupo Molsidomina<sup>®</sup>, corrobora la menor morbilidad observada (preservación de la función) <sup>(99, 149, 283)</sup>.

Probablemente las causas de la disminución de los RLO en el grupo tratado, sean por orden de importancia:

1. Inhibición por el NO exógeno de la enzima NADPH-oxidasa, procedimiento principal como Clancy describe en sus trabajos sobre isquemia *in vitro* <sup>(46)</sup> y que también Yu sugiere en sus trabajos de isquemia-reperfusión a más de 60 minutos en ratas<sup>(310)</sup>; de la misma manera, la inhibición de la enzima xantino-oxidasa en la producción de RLO, utilizando como segundo mensajero al GMPc, descrito ya en 1988, por Simpson<sup>(268)</sup> en un modelo de I-R de miocardio en el animal de experimentación.

2. Inactivación o disminución de los RLO, tal y como demuestra Siegfried <sup>(265)</sup>, quien describe una disminución del area de infarto en el músculo cardiaco sometido a I-R y tratado previamente con NO, por reacción del NO con el ión superóxido; las experiencias de Hogg, corroboran nuestros hallazgos de posible interacción de RLO y NO <sup>(129)</sup>. En cambio también esa interacción origina otras moléculas activas, como los peroxinitritos con capacidad de multiplicar el efecto lesivo por la lipoperoxidación de membranas, esencialmente en el caso del Grupo Molsidomina<sup>®</sup> <sup>(18)</sup>.
3. La disminución de la activación e infiltración neutrofílica, de la que hablaremos a continuación; los neutrófilos son junto al endotelio los productores principales de estas moléculas. Bath demuestra en modelos *in vivo* una drástica disminución de la infiltración neutrofílica y e bloqueo de RLO con NO <sup>(17)</sup>. También Dagher comprueba una disminución de la misma usando un precursor de NO, L-arginina, en un modelo experimental de isquemia reperfusión renal <sup>(60)</sup>.
4. Posiblemente también la menor producción de TNF- $\alpha$  y de otros mediadores de la respuesta inflamatoria y el control de la transcripción nuclear como veremos más adelante (Figura 44) sean también aspectos importantes en este control.

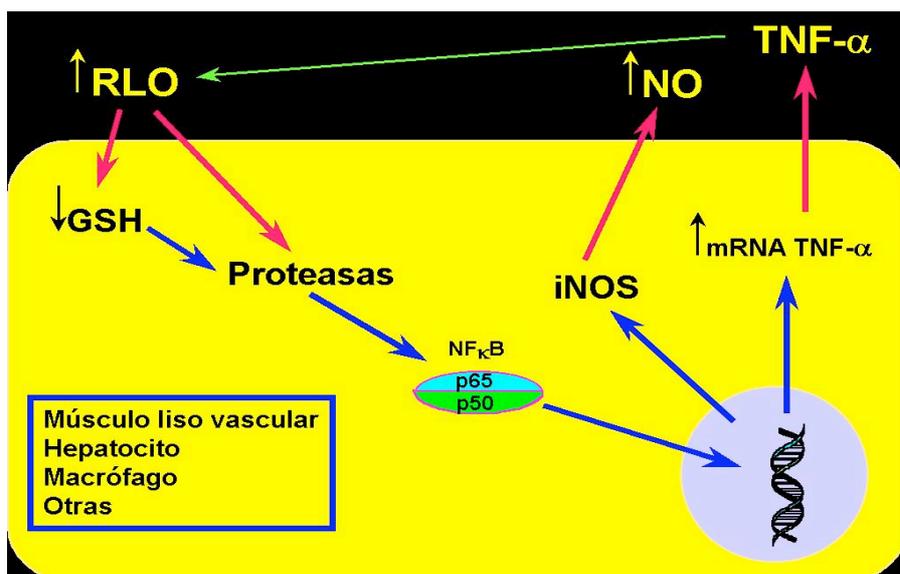


Figura 44.- RLO transcripción nuclear y TNF- $\alpha$

El estudio de la infiltración neutrofílica utilizando como marcador la determinación de la actividad de la mieloperoxidasa en tejido renal, reveló un incremento significativo en el Grupo Control desde las 24 horas. Este incremento de la infiltración neutrofílica y su relación directamente proporcional con el daño ocasionado en la inflamación ha sido ampliamente demostrado y publicado <sup>(92, 16, 97, 119, 158, 159,166,173,180,190,204,205,207,233,278, 287)</sup>.

La significativa disminución de la infiltración neutrofílica detectada en el grupo tratado con el donador de NO Molsidomina<sup>®</sup>, nos revela la modulación que se induce en la activación leucocitaria e interacción leucocito-endotelio. Varios autores ya han demostrado un descenso del rodamiento leucocitario postreperusión o en otros fenómenos inflamatorios, de la adhesión leucocitaria, de la infiltración neutrofílica y de otros fenómenos como el no reflujo postisquémico <sup>(92, 99, 15, 34, 53, 104, 158, 167, 180)</sup>.

El mecanismo podría ser debido a la reacción con los RLO originados localmente durante la respuesta inflamatoria <sup>(37)</sup>. Bath demuestra in vitro, como el NO exógeno puede disminuir la quimiotaxis, resultado coincidente con nuestra menor infiltración en el grupo tratado con el donador de NO <sup>(17)</sup>. Los RLO, entre otros mediadores, son responsables de incrementar la llegada al foco de las células inflamatorias, de la activación de los leucocitos polinucleares neutrófilos y de la expresión de las moléculas de adhesión por parte del endotelio y de los leucocitos iniciándose de este modo la infiltración. El descenso de producción de RLO detectado en el grupo estudio es evidente, siendo una de sus causas la disminución de la infiltración neutrofílica (importante fuente de producción de RLO). Kurose <sup>(161)</sup> y Fardo <sup>(76)</sup> muestran en sus trabajos sobre el daño en la I-R en riñón de rata, cómo la activación de los neutrófilos y posterior expresión de las CAM son claves para la migración, y en esa activación son los RLO los que juegan un papel esencial.

No descartamos que la propia regulación de la respuesta inflamatoria con la disminución de la producción de citocinas proinflamatorias y la menor expresión de CAMs junto con la menor activación neutrofílica y de sus proteínas snare o incluso la actuación directa sobre los mecanismos transcripcionales que

regulan la expresión de las diferentes CAMs sean también responsables del control de la infiltración neutrofílica.

La influencia de las citocinas proinflamatorias, entre ellas TNF- $\alpha$  e IL-1, en la modulación de la expresión de las CAMs, induciéndolas como en el caso de ICAM-1, VCAM-1, LFA-1 y E-selectina, o liberándolas como ocurre con la P-selectina, está demostrada <sup>(44, 182, 188, 218, 261, 287)</sup>. También conocemos la estimulación e incremento de la adhesividad en los neutrófilos por el TNF- $\alpha$  <sup>(3, 28, 182)</sup> e incluso su efecto sobre la activación del factor transcripcional NF $\kappa$ B <sup>(219)</sup>. Por estos motivos sospechamos que un posible mecanismo de acción en el efecto beneficioso del fármaco estudiado podría ser la regulación de la producción de citocinas <sup>(49, 99, 203, 220)</sup> por estudios realizados anteriormente. Los resultados observados en nuestro trabajo evidencian un incremento de las citocinas proinflamatorias en el Grupo Control que disminuye de forma significativa al ser tratados con Molsidomina<sup>®</sup> <sup>(237)</sup>.

Los mecanismos implicados en el descenso de los niveles de las citocinas pudieran ser:

- Disminución de la activación neutrofílica: los neutrófilos son responsables de su síntesis y células diana de sus acciones. En relación con este razonamiento es interesante apuntar que el TNF- $\alpha$  liberado por neutrófilos induciría la liberación de RLO por otros neutrófilos, quienes a su vez, aumentarían el daño, entre otras, en las células endoteliales, favoreciéndose así el fenómeno de migración leucocitaria <sup>(166)</sup>. El descenso en el TNF- $\alpha$  bloquearía este proceso de activación autocrina en neutrófilos.
- Por su parte el TNF- $\alpha$  activa el factor transcripcional  $\kappa$ B que estimula la expresión de las CAM. La disminución del TNF- $\alpha$ , podría conducir a una menor activación del factor transcripcional, y por tanto menor expresión de las CAM; esto último, conllevaría una disminución en la infiltración neutrofílica <sup>(94, 98)</sup>.
- El factor transcripcional  $\kappa$ B de localización citoplasmática, también está implicado en los mecanismos de síntesis de las citocinas que

hemos estudiado en nuestro trabajo. Al disminuirse en el foco inflamatorio la presencia de RLO (menor infiltración neutrofílica), en mayor o menor medida con los diferentes tratamientos empleados, disminuirá el ambiente oxidativo intracelular que favorece la activación del factor transcripcional  $\kappa$ B y de esta manera la producción de estas citocinas <sup>(223)</sup>.

- El propio efecto directo del NO, que frenaría la síntesis de las citocinas <sup>(111)</sup>. La liberación basal fisiológica por cNOS, influiría directamente inhibiendo la síntesis y liberación de estas citocinas proinflamatorias, apuntado tímidamente por algunos autores <sup>(138)</sup>, entre ellos el trabajo de farmacología aplicada con NO realizado por Ignarro <sup>(140)</sup>.

Al observar estos resultados, decidimos estudiar dos citocinas reguladoras de la respuesta inflamatoria como son la IL-6 y la IL-10 <sup>(5, 40)</sup>.

En ambos casos comprobamos cómo el Grupo Molsidomina presentaba un importante incremento en la producción de estas citocinas antiinflamatorias, no pudiendo concluir, con los presentes resultados, si ello se debe al control general de la respuesta inflamatoria o por el contrario a algún efecto directo sobre ellas.

De esto se deduce una mayor capacidad de controlar la respuesta inflamatoria en el Grupo Molsidomina dada la gran importancia que las interleucinas 6 y 10 tienen en el control de dicha respuesta (Figura 45).

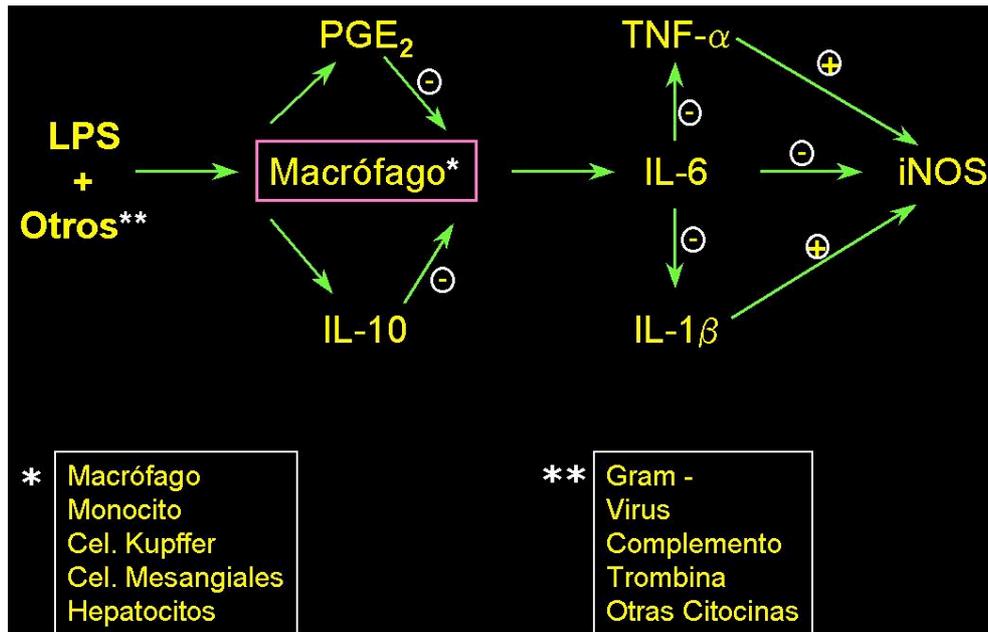


Figura 45.- Regulación de la inflamación por la IL-6 e IL-10

El óxido nítrico es uno de los más importantes mediadores de la respuesta inflamatoria; en nuestro estudio comprobamos como su producción se ve incrementada de forma significativa en el Grupo Control, siendo esto debido al incremento de la activación de la iNOS, tal y como comprobamos en nuestros resultados, dependiente de múltiples factores como la producción de RLO, la liberación de citocinas proinflamatorias, la activación de NF $\kappa$ B, etc <sup>(98, 272, 39)</sup>.

La mayor producción de NO conllevará un incremento de la respuesta inflamatoria, ya que de su reacción con los RLO se derivará una mayor peroxidación lipídica y al mismo tiempo estimulará la activación de factores transcripcionales como  $\kappa$ B los cuales incrementarán la expresión de CAMs y la interacción leucocito-endotelio ocasionando como resultado final una mayor lesión inflamatoria (Figura 46).

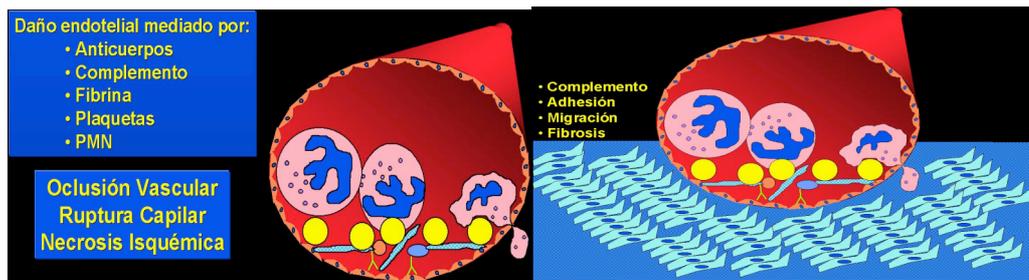


Figura 46.- Lesión endotelial y tisular post-inflamación

La corroboración de la disminución de la expresión de las moléculas de adhesión celular estudiadas, unido a la menor infiltración neutrofílica, se traduce en un efecto protector de primer orden en la respuesta inflamatoria sistémica, que pudiera ser la clave del efecto beneficioso de la Molsidomina®<sup>(63)</sup>. En nuestro estudio, la menor expresión detectada en ICAM-1, VCAM-1 y PECAM-1 determinará una menor interacción leucocito-endotelio y consecuentemente una menor infiltración neutrofílica, aspecto éste directamente relacionado con el daño en la respuesta inflamatoria; a su vez la menor activación e infiltración neutrofílica conducirá a una menor producción de radicales libres del oxígeno causantes de lesión tisular, éstos a su vez, como mediadores inflamatorios de primer orden, tienen la capacidad de activar factores transcripcionales como NFκB responsable, como vimos en apartados anteriores, de la producción de diferentes citocinas proinflamatorias como el TNF-α, la IL-1 y el INF-γ responsables del incremento de la expresión de CAMs<sup>(295)</sup> y en el caso del TNF-α del incremento de producción de RLO. Todo ello redundará en una menor lesión tisular con un mantenimiento de la función del órgano y consecuentemente una menor morbi-mortalidad<sup>(70, 95, 97, 277)</sup>.

La evaluación de moléculas de adhesión solubles en el plasma es un medio muy eficaz para valorar el daño endotelial<sup>(32, 44, 73, 86, 126, 186, 207, 242, 248, 261, 267, 282)</sup>, en nuestro estudio hemos comprobado el amplio daño endotelial del Grupo Control que se normaliza al 7º día postcirugía, confirmando de esta forma la recuperación de la lesión orgánica.

Teniendo en cuenta estos resultados, y para evaluar otros posibles mecanismos de acción, decidimos estudiar la activación del factor

transcripcional nuclear  $\kappa$ B que como sabemos regula múltiples genes responsables de la producción de, por ejemplo, TNF- $\alpha$ , IL-2, VCAM-1, INF- $\gamma$ , etc <sup>(277)</sup>.

A pesar de comprobar en nuestro estudio una disminución significativa de su activación en el Grupo Molsidomina, no tenemos elementos suficientes para asegurar una acción directa de estos fármacos, pudiendo deberse a la modulación observada en la respuesta inflamatoria de forma global <sup>(199, 240, 285)</sup>.

## **VI. CONCLUSIONES**

1. El modelo experimental planteado es adecuado para evaluar la hipótesis y objetivos propuestos. La técnica quirúrgica y la terapéutica empleada en los animales de experimentación se aproximan con mucha exactitud a los utilizados en la clínica humana.
2. Los resultados de los mediadores bioquímicos, moleculares y genéticos, de la respuesta inflamatoria estudiados, demuestran la regulación de la respuesta inflamatoria ejercida por la Molsidomina<sup>®</sup> en comparación al Grupo Control, donde dicha respuesta es muy importante.
3. El mantenimiento de la función renal dentro de los niveles normales y la ausencia de mortalidad en el Grupo Molsidomina<sup>®</sup> avalan la ausencia de lesión irreversible por la respuesta inflamatoria.

## **VII. BIBLIOGRAFÍA**

1. Aalam AA., Nowzari H: Clinical evaluation of dental implants with surfaces roughened by anodic oxidation, dual acid-etched implants, and machined implants. *Int J Oral Implants.*2005; 20(5): 793-8
2. Abdih H. LRCS P.I., Kelly C.J., et al.: Nitric oxide (endothelium-derived relaxing factor) attenuates revascularization-induced lung injury. *J. Surg. Res.* 1994. 57, 39-43.
3. Adam D., Lee AJ., Bradbury AW., Ross J.: Elevated levels off 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: 514-9.
4. Adembri C., Kastamoniti E., Bertolozzi L., et al.: Pulmonary injury follows systemic inflammatory reaction in infrarenal aortic surgery. *Crit. Care Med.* 2004; 32:1170-1177.
5. Aggarwal A., Schneider DJ., Terrien EF., et al. : Increase interleukin-6 in the first hour after coronary stenting : an early marker of inflammatory response. *Journal of thrombosis and thrombolysis.* 2003 Feb; 15(1): 25-31.
6. Alkharfy KM., Kellum JA., Matzke GR: Unintended immunomodulation: Part I. Effect of common clinical conditions on cytokine biosynthesis. *Shock* 2000; 13:333-345.
7. Al-Saffar N., Iwaki H., Revell PA: Direct activation of mast cells by prosthetic biomaterial particles. *Journal of materials science: materials in medicine* 9 (1988): 849-53.
8. Alvarez Fernández LJ., Rodríguez Olay JJ., Fernández Solares I: Aneurismas toracoabdominales. En: *Tratado de aneurismas.* Esteban Solano JM. J Uriach Cía S. A (ed). Barcelona 1997, p159.

9. Annabi B., Shedid D., Ghosn P., et al.: Differential regulation of matrix metalloproteinase activities in abdominal aortic aneurysms. *J. Vasc. Surg*, 2002 Mar; 35(3):539-46.
10. Badylak SF., Wu CC., Bible M., McPherson E: Host protection against deliberate bacterial contamination of an extracellular matrix bioscaffold versus Dacron mesh in a dog model of orthopaedic soft tissue repair. *Journal of biomedical materials research*. 2003 Oct 15; 67B (1):648-54.
11. Balibrea J.L.: *Tratado de cirugía*. Editorial Marban. Madrid 1994.
12. Balshi SF., Wolfinger GJ., Balshi TJ: Surgical planning and prosthesis construction using computed tomography, CAD/CAM technology, and the Internet for immediated loading dental implants. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2006; 26(-): 239-47.
13. Bandyk DF: Infection in prosthetic vascular grafts. In: Rutherford RB. *Vascular Surgery*. 5<sup>a</sup> ed. Saunders, vol. I; 733-751.
14. Barbato JE., Tzeng E.: Nitric oxide arterial disease. *J Vasc Surg*. 2004; 40: 187-193.
15. Barbotin-Larrieu F., Mazmanian M., Baudet B., et al. : Prevention of ischemia-reperfusion lung injury by inhaled nitric oxide in neonatal piglets. *J. Appl. Physiol*.1996; 80:782-788.
16. Barry MC., Kelly C., Burke P., et al.: Immunological and physiological responses to aortic surgery: effect of reperfusion on neutrophil and monocyte activation and pulmonary function. *Br J Surg* 1997; 84:513-9.
17. Bath PM, Hassall DG, Gladwin AM, Palmer RM, Martin JF: Nitric oxide and prostacyclin. Divergence of inhibitory effects on monocyte chemotaxis and adhesion to endothelium in vitro. *Arterioscler Thromb* 1991, 11: 254-260.
18. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA: Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990, 87: 1620-1624.

19. Benito Duque P.: Modulación de la translocación bacteriana por el óxido nítrico y colágeno absorbible con gentamicina en un modelo inflamatorio inducido por una prótesis vascular intraabdominal y Zymosan A. Tesis Doctoral. 1998. Universidad de Salamanca.
20. Benjamin J. Guikema, Roman Ginnan, Harold A. Singer and David Jourd'heuil: Catalase potentiates interleukin-1 $\beta$ -induced expression of nitric oxide synthase in rat vascular smooth muscle cells. *Free Radical Biology and Medicine* 2005, 38: 597-605
21. Berg RD., 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.
22. Berglundh T., Gotfredsen K., Zitzmann NU., et al: Spontaneous progression of ligature induced peri-implantitis at implants with different surface roughness: an experimental study in dogs. *Clin Oral Implants Res.* 2007;18(5): 655-61.
23. Bolla M., Momi S., Gresele P.: Nitric oxide-donating aspirin (NCX 4016): an overview of its pharmacological properties and clinical perspectives. *Eur J of Clin Pharmacol.* 2006; 62(1): 145-154.
24. Boo Y., Jo H.: Flow-dependent regulation of endothelial nitric oxide synthase: role of protein kinases. *Am J of Physiol Cell Physiol.* 2003; 285: C499-C508.
25. Boo Y., Sorescu G., Bauer P., et al.: Endothelial NO synthase phosphorylated at SER635 produces NO without requiring intracellular calcium increase. *Free Radical Biology Medicine.* 2003; 35: 729-41.
26. Bosetti M., Zanardi L., Bracco P., et al.: In vitro evaluation of the inflammatory activity of ultra-high molecular weight polyethylene. *Biomaterials.* 2003 Apr; 24(8):1419-26
27. Bouhafs A, Fassi-Fehri A, Ranchin B, Cochat P, Martin X: Surgical aspects of kidney transplantation in children (study of 148 cases). *Ann Urol (Paris)* 2002, 36: 301-309.

28. Bown MJ., Nicholson ML., Bell R., and Sayers R.: Cytokines and inflammatory pathways in the pathogenesis of multiple organ failure following abdominal aortic aneurysm repair. *Eur J Vasc Surg.* 2001; 22:485-95.
29. Boyce B.: Physical characteristics of expanded polytetrafluorethylene grafts. *Biologic and synthetic vascular prostheses.* Ed James Stanley 1982, Grune and Stratton, Inc: 553-561.
30. Boyle JR., Goodall S., Thompson JP., et al.: Endovascular AAA repair attenuates the inflammatory and renal responses associated with conventional surgery. *J Endovasc Ther.* 2000 Oct; 7(5):359-71.
31. Brandacher G., Maglione M., Schneberger S., et al.: Tetrahydrobiopterin Compounds prolong allograft survival independently of their effect on nitric oxide synthase activity. *Transplantation.* 2006; 81(4): 583-589.
32. Cai H., McNally J., Weber M., Harrison D.: Oscillatory shear stress upregulation of endothelial nitric oxide synthase requires intracellular hydrogen peroxide and CaMKII. *J of Molecular and Cell Cardiology.* 2004; 37: 121-125.
33. Camiade C., Goldschmidt P., Koskas F., et al.: Optimization of the resistance of arterial allografts to infection: comparative study with synthetic prostheses. *Ann Vasc Surg.* 2001; 15(2):186-196.
34. Carey C., Seigfried M., MA X.L.: Antishock and endothelial protective actions of a NO donor in mesenteric ischemia and reperfusion. *Cir. Shock.* 1992; 38:109.
35. Carrel A.: Permanent intubation of thoracic aorta. *J. exp. Med.* 16, 17; 1912.
36. Carsten CG 3<sup>rd</sup>, Calton WC., Johanning JM., et al: Elastase is not sufficient to induce experimental abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg.* 2001 Jun; 33(6):1255-62.
37. Cazevielle C, Muller A, Meynier F, Bonne C: Superoxide and nitric oxide cooperation in hypoxia/reoxygenation-induced neuron injury. *Free Radic Biol Med* 1993, 14: 389-395.

38. Centro de Investigación y Desarrollo aplicado: evaluation of biomaterials and medical devices. S.A.L.,Santiga, Barcelona, España 1998.
39. Chaterjee PK., Patel NS., Kvale EO., et al.: Inhibition of inducible nitric oxide synthase reduces renal ischemia/reperfusion injury. *Kidney Int.* 2002; 61:862-71.
40. Chen S., Kapturczak MH., Wasserfall C., et al.: Interleukin-10 attenuates neointimal proliferation and inflammation in aortic allografts by a heme oxygenase-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005; 102(20): 7251-6.
41. Cheng S., Tseng I., Lee J., Kok S: A prospective study of the risk factors associated with failure of mini-implants used for orthodontic anchorage. *Int J Oral Maxilofac Implants.*2004; 19: 100-106.
42. Chiesa R., Astore D., Frigerio S., et al.: Vascular prosthetic graf infection: Epidemiology, Bacteriology, Patogénesis and treatment. *Acta chir belg.* 2002; 102: 238-247.
43. Chilukuri DM., Shah JC.: Local delibery of vancomycin for the prophylaxis of prosthetic device-related infections. *Pharmaceutical research.* 2005 Apr; 22(4):563-72.
44. Chiu J., Lee P., Chen C., et al.: Shear stress increases ICAM-1 and decreases VCAM-1 and E-selection expressions induced by tumor necrosis factor-alpha in endothelial cells. *Arteriosclerosis and Trhombosis Vascular Biology.* 2004; 24: 73-79.
45. Chuter TA., Howell BA.: Suprarenal stents and other advances in endovascular aneurysm repair. *Surg Clin North Am.* 2004 Oct; 84(5): 1319-35.
46. Clancy RM, Leszczynska-Piziak J, Abramson SB: Nitric oxide, an endothelial cell relaxation factor, inhibits neutrophil superoxide anion production via a direct action on the NADPH oxidase. *J Clin Invest* 1992, 90: 1116-1121.
47. Clavien PA., Harvey PR and Strasberg SM.: Preservation and reperfusion injuries in liver allografts. *Transplantation* 1992; 53:957-978.

48. Coggia M., Goeau-Brissonnière O., Leflon V., et al. : Experimental treatment of vascular graft infection due to staphylococcus epidermidis by in situ replacement with a rifampin-bonded polyester graft. *Ann Vasc Surg.* 2001; 15: 421-429.
49. Cohen SB., Parry SL., Feldman M., et al.: Autocrine and paracrine regulation of human T cell IL-10 production. *J Immunol.* 1997 Jun 15; 158:596-602.
50. Cole JS., Watterson JK., O'Reilly MJ.: Numerical investigation of the haemodynamics at a patched arterial bypass anastomosis. *Med Eng Phys.* 2002 ; 24: 393-401.
51. Cole JS., Wijesinghe LD., Watterson JK., and Scott DJ.: Computational and experimental simulation of the haemodynamics at cuffed arterial bypass graft anastomoses. *Proc Inst Mech Eng (H)* 2002; 216: 135-143.
52. Connolly JE et al.: Autogenous in situ saphenous vein for by-pass of femoral-popliteal obliterative disease. *Surgery* 55; 144; 1964.
53. Cooke JP., Tsao PS.: Cytoprotective effects of nitric oxide. *Circulation.* 1993; 88:2451-2454.
54. Cordero Castro JL: La translocación bacteriana como fuente de contaminación e infección de prótesis vasculares. Estudio etiopatogénico. Tesis Doctoral. 1995. Universidad de Salamanca.
55. Coulthard MG, Crosier J: Outcome of reaching end stage renal failure in children under 2 years of age. *Arch Dis Child* 2002, 87: 511-517.
56. Cragg AH., Dake MD.: Percutaneous femoropopliteal graft placement. *Radiology* 1993; 187: 643-648.
57. Crespi F.: Dihydropyridines, nitric oxide and vascular protection. *Curr Vasc Pharmacol.* 2005; 3(2):195-205.
58. Cristol JP., Thiernemann C., Mitchell JA., et al.: Support of renal blood flow after ischaemic-reperfusion injury by endogenous formation of nitric oxide and of cyclo-oxygenase vasodilator metabolites. *Br. J. Pharmacol.* 1993; 109: 188-194.
59. Culotta E and Koshland DE.: NO news is good news. *Science* 1992; 258:1862.

60. Dagher F., Pollina RM., Rogers DM., et al.: The value and limitations of L-arginine infusion on glomerular and tubular function in the ischemic/reperfused kidney. *J.Vasc. Surg* 1995;21: 453-459.
61. Daugherty A., Cassis LA.: Mechanisms of abdominal aortic aneurysm formation. *Curr. Atheroscler. Rep.* 2002 May; 4(3):222-227.
62. Davis CFJ., Ley K., Sarembock IJ.:The role of inflammation in vascular injury and repair.. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* 2003; 8:1699-1709.
63. De Caterina R, Libby P, Peng HB, Thannickal VJ, Rajavashisth TB, Gimbrone MA Jr, Shin WS, Liao JK: Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest* 1995, 96: 60-68.
64. De Meyer GR, Kockx MM, Knaepen MW, Martinet W, De Cleen DM, Bult H, Herman AG: Nitric oxide donor molsidomine favors features of atherosclerotic plaque stability during cholesterol lowering in rabbits. *J Cardiovasc Pharmacol* 2003, 41: 970-978.
65. Degidi M., Artese L., Scarano A., et al: Inflammatory infiltrate, microvessel density, nitric oxide synthase expression, vascular endothelial growth factor expression, and proliferative activity in peri-implant soft tissues around titanium and zirconium oxide healing caps. *J Periodontol.*2006; 77(1): 73-80.
66. Deitch EA., Specian RD., Grisham MB ., et al.: Zymosan-induced bacterial translocation: A study of mechanisms. *Crit Care Med* 1992; 20:782-778.
67. Deitch EA.: Bacterial translocation: The influence of dietary variables. *Gut.*1994;35 (suppl):23-27.
68. Deng J, Kohda Y, Chiao H, Wang Y, Hu X, Hewitt SM, Miyaji T, McLeroy P, Nibhanupudy B, Li S, Star RA: Interleukin-10 inhibits ischemic and cisplatin-induced acute renal injury. *Kidney Int* 2001, 60: 2118-2128.
69. Devinder Singh, Vikas Chander and Kanwaljit Chopra: Cyclosporine protects against ischemia/reperfusion injury in rat kidneys. *Toxicology* 2005, 207: 339-347

70. Dorweiler B., Neufang A., Schmiedt W., Oelert H.: Autogenous reconstruction of infected arterial prosthetic grafts utilizing the superficial femoral vein. *Thorac Cardiovasc Surg.* 2001 Apr; 49(2):107-11.
71. Duda D., Lorenz W., Celik I.: Histamine release in mesenteric traction síndrome during abdominal aortic aneurysm surgery: prophylaxis with H1 and H2 antihistamines. *Inflamm-Res.* 2002 Oct;51(10):495-9.
72. Durán Sacristán H.: *Tratado de Patología y Clínica Quirúrgicas.* Editorial Interamericana. McGraw Hill, Madrid, 2ª edición 1996.
73. 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.
74. Elsner D., Muntze A.: Inhibition of synthesis of endothelium-derived nitric oxide in dogs. *Am. J. Hyp.* 1992; 5:288-291.
75. Evangelista V., Piccardoni P., White JG., et al.: Cathepsin G-dependent platelet stimulation by activated polymorphonuclear leukocytes and its inhibition by antiproteases: Role of P-selectin-mediated cell-cell adhesion. *Blood* 1993; 81:2947-2957.
76. Farhood A, McGuire GM, Manning AM, Miyasaka M, Smith CW, Jaeschke H: Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) expression and its role in neutrophil-induced ischemia-reperfusion injury in rat liver. *J Leukoc Biol* 1995, 57: 368-374.
77. Feelisch M., Ostrowski J., Noack E.: On the mechanism of NO release from sydnonimines. *J Cardiovasc Pharmacol* 1989; 14 (suppl II):513-22.
78. Fernandez ED, Flohe S, Siemers F, Nau M Ackermann M, Ruwe M, Schade FU: Endotoxin tolerance protects against local hepatic ischemia/reperfusion injury in the rat. *J Endotoxin Res* 2000, 6: 321-328.
79. Fernández Regalado J: Regulación de la respuesta inflamatoria por el inmunosupresor FK506 (Tacrolimus) en un modelo de isquemia-reperfusión hepática total. Tesis Doctoral 1998. Universidad de Salamanca.

80. Ferran C.: Protective genes in the vessel wall: modulators of graft survival and function. *Transplantation*. 2006; 82(1 suppl): S36-40.
81. Fiene AE., Videm V., Lingaas PS., et al. : Mechanism of complement activation and its role in the inflammatory response after thoracoabdominal aortic aneurysm repair. *Circulation*. 2003 Aug 19; 108 (7):849-56.
82. Fiddian-Green RG and Baker S.: Nosocomial pneumonia in the critically ill: Product of aspiration or translocation? *Crit Care Med* 1991;19: 763-769.
83. Forsyth KD., Simpson AC., Levinsky RJ.: CD 15 antibodies increase neutrophil adhesion to endothelium by an LFA-1 dependent mechanism. *Eur J Immunol* 1998; 19:1331.
84. Freels JL, Nelson DK, Hoyt JC, Habib M, Numanami H, Lantz RC, Robbins RA: Enhanced activity of human IL-10 after nitration in reducing human IL-1 production by stimulated peripheral blood mononuclear cells. *J Immunol* 2002, 169: 4568-4571.
85. Freire JN., Silva NR., Gil JN., et al: Histomorphologic and histomorphometric evaluation of immediately and early loaded mini-implants for orthodontic anchorage. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*.2007; 13(1): 704-9.
86. 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: 287-96.
87. Fügen Aktan: iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sciences* 2004, 75: 639-653
88. Fung JJ., Alessiani K., Abu-Elmagel S., et al.: Adverse effects associated with use of FK-506. *Transplant Proc* 1991; 23: 3105-3108.
89. Gabriel EA., Locali RF., Romano CC., et al.: Analysis of the inflammatory response in endovascular treatment of aortic aneurysms. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2007; 31: 406-412.
90. Galen J.: Observations on aneurysm. Translated by J.E Erichsen. London. Sydenham Society. 1994; p3.

91. Galle D., De Maertelaer V., Motte S., et al.: Early inflammatory response alter elective abdominal aortic aneurysm repair: a comparison between endovascular procedures and convencional surgery. *J. Vasc. Surg.* 2000; 32: 234-246.
92. Gaobury J., Woodman RC., and Granger DN.: NO prevents leukocyte adherence: Role of superoxide. *Am J Physiol* 1993; 265: H 862.
93. Garcia Criado FJ., Lozano Sánchez F., Gómez-Alonso A et al. : Posible Tacrolimus action mechanisms in its protector effects on ischemia-reperfusion injury. *Transplantation* 1998; 55: 942-943.
94. García Cenador MB: El óxido nítrico exógeno en el control de la respuesta inflamatoria en el trasplante renal experimental. Grado de Salamanca. 2003.
95. García Criado FJ, Palma Vargas JM, Gómez-Alonso A et al.: Sulpho-Lewisx diminishes neutrophil infiltration and free radicals with minimal effect on serum cytokines after liver ischemia and reperfusion. *J Surg Res* 1997, 70: 187-194
96. García Criado FJ., Lozano F., Barros M, et al.: P- and E-selectin blockade can control bacterial translocation and modulate systemic inflammatory response. *Invest Surg* 2005; 18: 167-176.
97. García Criado FJ., Toledo Pereyra LH., López Neblina F et al: Role of P-selectin in total hepatic ischemis and reperfusion. *J Am Coll Surg* 1995; 181: 327-334.
98. García FJ., Eleno N., Santos F., Valdunciel J., Reverte M., Lozano 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: 982-90.
99. Garcia-Criado FJ, Palma-Vargas JM, Valdunciel-Garcia JJ, Toledo AH, Misawa K, Gomez-Alonso A, Toledo-Pereyra LH: Tacrolimus (FK506) down-regulates free radical tissue levels, serum cytokines, and neutrophil infiltration after severe liver ischemia. *Transplantation* 1997, 64: 594-598.

100. García-Díaz A., Martín-Melchor MR., Sáenz-Alonso M: Injerto pediculado de tejido conectivo palatino para aumento de reborde alveolar y/o evitar exposición de barrera en regeneración ósea guiada. RCOE.2006; 11(1):79-86.
101. Garcia-Garcia J, Garcia-Criado FJ, Zambrano-Cuadrado Y, Silva-Benito I, Benito-Persona MA, Pina-Arroyo J, Gomez-Alonso A: Radicales libres del oxígeno (RLO) y neutralizadores endógenos en la isquemia reperfusión intestinal. Cir Esp 1995, 57: 412-416.
102. Garcia-Garcia J, Martin-Rollan C, Ludeña MD, Garcia-Criado FJ, Gomez-Alonso A: The Protective Effect of Superoxide Dismutase (SOD) in Intestinal Ischemia. Res Surg 1991, 3: 184-187.
103. 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.
104. Gauthier TW., Davenpeck KL., Lefer AM: Nitric oxide attenuates leukocyte-endothelial interaction via P-selectin in splanchnic ischemia-reperfusion. Am J Physiol 1994; 267: G562-G568.
105. Gianetti J., Del Sarto P., Bevilacqua S., et al. : Supplemental nitric oxide and its affect on myocardial injury and function in patients undergoing cardiac surgery with extracorporeal circulation. J Thorac Cardiovasc Surg. 2004 Jan; 127(1): 44-50.
106. Gluck J. : Die moderne chirurgie der circulationapparats. Berlin Klin : 70,1 ; 1898.
107. Goel A., Desai Ki., Muzumdar DP. : Atlantoaxial fixation using plate and screw method: a report of 160 treated patients. Neurosurgery. 2002 Dec; 51(6):1351-6; discussion 1356-7.
108. Göl MK., Nisaglonu V., Iscan Z., et al. :Inhibition of systemic inflammatory response with sodium nitroprusside in open heart surgery. J Cardiovasc Surg. 2002 ; 43: 803-9.
109. Golstone J., Bowersox JC.: Infected prosthetic arterial grafts. In: Haimovici H, Ascer E, Hollier LH., Strandness DE., Towne JB,eds. Haimovicis Vascular Surgery, Blackwell Science,1996:727-739.

110. Gomelsky A., Dmochowski RR. : Antibiotic prophylaxis in urologic prosthetic surgery. *Curr-Pharm-Des.* 2003; 9(12):989-96.
111. Gong JP, Tu B, Wang W, Peng Y, Li SB, Yan LN: Protective effect of nitric oxide induced by ischemia preconditioning on reperfusion injury of rat liver graft. *World J Gastroenterol* 2004, 10: 73-76.
112. González-Santana H., Peñarrocha-Diago M., Guarinos-Carbó J., et al: Pain and inflammation in 41 patients following the placement of 131 dental implants. *Med Oral Patol Oral Circ Bucal.*2005; 10(3): 258-63.
113. Goujon JM, Vandewalle A, Baumert H, Carretier M, Hauet T: Influence of cold-storage conditions on renal function of autotransplanted large pig kidneys. *Kidney International* 2000, 58: 838-850.
114. Goyanes L.: Nuevos trabajos de cirugía vascular. *Siglo Med.* 53, 53; 1906.
115. 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.
116. Greenstein AJ., Mannick JA.: Effect of restricted outflow on the early patency of arterial grafts. *Surg. Forum* 17, 140; 1966.
117. Gresele P., Momi S.: Pharmacologic profile and therapeutic potential of NCX 4016, a nitric oxide-releasing aspirin, for cardiovascular disorders. *Cardiovasc Drug Reviews.* 2006; 24(2): 148-168.
118. Grube E., Buellesfeld L.: Everolimus for stent-based intracoronary applications. *Rev Cardiovasc Med.* 2004; 5 Suppl 2:S3-8.
119. Han KT, Sharar SR, Phillips ML, Harlan JM, Winn RK: Sialyl Lewis(x) oligosaccharide reduces ischemia-reperfusion injury in the rabbit ear. *J Immunol* 1995, 155: 4011-4015.
120. Hance KA., Tataria M., Ziporin SJ., et al. : Monocyte chemotactic activity in human abdominal aortic aneurysms : role of elastin degradation peptides and the 67-KD cell surface elastin receptor. *J Vasc Surg.* 2002 Feb; 35(2): 254-61.

121. Harkin DW., Rubin BB., Romaschin A., Lindsay TF. : 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: 230-41.
122. Haruguchi H., Teraoka S.: Intimal hyperplasia and hemodynamic factors in arterial bypass and arteriovenous grafts: a review. *J Artif Organs.* 2003; 6: 227-235.
123. Harward TRS., Welborn MB., Martin TD., et al.: Visceral ischemia and organ dysfunction after thoracoabdominal aortic aneurysm repair. *Ann Surg.* 1996; 223: 729-36.
124. Heckmann SM., Linke JJ., Graef F., et al: Stress and inflammation as a detrimental combination for peri-implant bone loss. *J Dent Res.*2006;85(8):711-6.
125. Hermann Reichenspurner: Overview of tacrolimus-based immunosuppression after heart or lung transplantation. *The Journal of Heart and Lung Transplantation* 2005,24:119-130
126. Hession C., Osborn L., Goff D., et al.: Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: Direct expression cloning and functional interaction. *Proc Nat Acad Sci USA.* 1990; 87: 1673-1677
127. Heuer W., Elter C., Demling A., et al : Analysis of early biofilm formation on oral implants in man. *J Oral Rehabil .* 2007; 34(5): 377-82.
128. Hoffmann J., Haendeler J., Aicher A., et al.: Aging enhances the sensitivity of endothelial cells toward apoptotic stimuli : important role of nitric oxide. *Circulation and Respiratory.* 2001; 89: 709-715.
129. Hogg N., Darley U.: Production of OH radicals from the simultaneous generation of superoxide and nitric oxide. *Biochem J.* 1992; 281: 419-424.
130. Hollier LH., Money SR., Naslund TC., et al.: Risk of spinal cord dysfunction in patients undergoing thoracoabdominal aortic replacement. *Am J Surg.*1992; 164: 210-214.
131. Holmberg A., Bergqvist D., Westman B., et al.: Cytokine and fibrinogen response in patients undergoing open abdominal aortic aneurysm surgery. *Eur J Vasc Surg.*1999; 17: 294-300.

132. 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: 305-10.
133. Horsley JS.: *Surgery of the blood vessels*. Mosby St. Louis, 1915.
134. Hsu RB., Chen RJ., Wang SS., Chu SH.: Infected aortic aneurysms: clinical outcome and risk factor analysis. *J Vasc Surg.* 2004 Jul; 40(1): 30-35.
135. Hu A., Jiao X., Gao E., et al.: Chronic beta-adrenergic receptor stimulation induces cardiac apoptosis and aggravates myocardial ischemia/reperfusion injury by provoking inducible nitric-oxide synthase-mediated oxidative stress. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006; 318(2): 469-75.
136. Huang Y., Liu X., Wang L., et al.: Local methylprednisolone delivery using a Biodivysio phosphorylcholine-coated drug delivery stent reduces inflammation and neointimal hyperplasia in a porcine coronary stent model. *International Journal of Cardiovascular Interventions.* 2003; 5(3): 166-71.
137. Huynh TN., Chacko BK., Teng X., et al.: Effects of venous needle turbulence during ex vivo hemodialysis on endothelial morphology and nitric oxide formation. *J Biomech.* 2006; 10: 1016-1028.
138. Hynes RO: Integrins: Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 1992, 69: 11-22.
139. Ibiza S., Victor M., Bosca I., et al.: Endothelial nitric oxide synthase regulates T cell receptor signaling at the immunological synapse. *Immunity.* 2006; 24(6): 753-765.
140. Ignarro A.: Presented at the "NO: Advances in Therapeutic Application and Commercial Development" on March 17-18, IBC Symposiums, Philadelphia, PA, 1994.
141. Inoue T., Fukuo K., Morimoto S., et al.: Nitric oxide mediates interleukin-1-induced prostaglandin E2 production by vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 194: 420-424.

142. Ischiropoulos H., Chen J., Tsai., et al . : Peroxynitrite (ONOO) reacts with superoxide dismutase to give the reactive nitronium ion. *Free Rad Biol Med.*1990; 9: 131-136.
143. Jell GM., Al-Saffar N.: Does a proangiogénico state exist in the bone-implant interface of aseptically loosened joint prosthesis?. *Journal of materials science materials in medicine.* 2001 Dec; 12(10/12): 1069-73.
144. Jeong G.-Y. Chung K.-Y., Lee W.J., Kim Y.S and Sung S.H.: The effect of a nitric oxide donor on endogenous endothelin-1 expression in renal ischemia/reperfusion injury. *Transplantation Proceedings* 2004, 36: 1943-1945
145. Ji Jy., Diamond SL.: Exogenous nitric oxide activates the endothelial glucocorticoid receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004; 318: 192-7.
146. Jiménez Vaquero I., García Criado FJ., García García J., Ludeña M., Manzanares J., Gómez Alonso A.: Modelo experimental de isquemia-reperusión en el perro. Valoración de lesiones y efecto profiláctico del alopurinol. *Cirugía Española.* 1995; 58: 516-520.
147. Johnson G 3rd, Tsao PS, Lefer AM: Cardioprotective effects of authentic nitric oxide in myocardial ischemia with reperfusion. *Crit Care Med* 1991, 19: 244-252.
148. Kafka J.: Changes in the elasticity of aorta with age. *Arch Patol.* 29, 304; 1940.
149. Kawano K, Bowers JL, Kim Yi et al.:FK506 reduces oxitative hepatic injury following cold ischemic preservation and transplantation.*Transplant Proc* 1996, 28:1902-1903
150. Kieffer E., Bahmini A., Koskas F., et al.: In situ allograft replacement of infected infrarenal aortic prosthetic grafts: results in forty-three patients. *J Vasc Surg.* 1993; 17: 349-356.
151. Kim Ti., Han JB., Lee IS., et al: New titanium alloys for biomaterials: a study of a mechanical and corrosion properties and citotoxicity. *Biomed Mater Engl.* 1997; 7(4): 253-63.

152. Kin S, Sasaki T, Gu K, Nakayama K, Tamura K, Nakai I, Oka T: The cytoprotective role of nitric oxide in ischemia-reperfusion injury in the rat kidney. *Transplant Proc* 1995, 27: 754-756.
153. 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.
154. Koide M, Kawahara Y, Nakayama I, Tsuda T, Yokoyama M: Cyclic AMP-elevating agents induce an inducible type of nitric oxide synthase in cultured vascular smooth muscle cells. Synergism with the induction elicited by inflammatory cytokines. *J Biol Chem* 1993, 268: 24959-24966.
155. Koopman G., Van Kooyk Y., De Gras M., et al.: Triggering of the CD44 antigen on T lymphocytes promotes T cell adhesion through the LFA-1 pathway. *J Immunol.* 1990; 145: 3589-3593.
156. Koudsi B., Yu CD., Ferguson EW., et al.: Prevention of spinal cord injury after transient aortic clamping with tissue factor pathway inhibitor. *Surgery* 1996; 119: 269-74.
157. Kubes P., Kanawar S., Niu XF., Gaboury JP.: NO synthesis inhibition induced leukocyte adhesion via superoxide and mast cells. *Faseb J.* 1993; 7: 1293
158. Kubes P., Suzuki M and Granger DN.: Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 1991; 88: 4651-4655.
159. 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.
160. Kuo YR., Wang FS., Jeng SF., et al.: Nitrosoglutathione improves blood perfusion and flap survival by suppressing iNOs but protecting eNOS expression in the flap vessels after ischemia/reperfusion injury. *Surgery* 2004; 135: 437-46.

161. Kurose I, Anderson DC, Miyasaka M, Tamatani T, Paulson JC, Todd RF, Rusche JR, Granger DN: Molecular determinants of reperfusion-induced leukocyte adhesion and vascular protein leakage. *Circ Res* 1994, 74: 336-343.
162. Landmesser U., Harrison D., Drexler H.: Oxidant stress-a major cause of reduced endothelial nitric oxide availability in cardiovascular disease. *European Journal of Clinical Pharmacology*. 2006; 62: 13-19.
163. 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.
164. Lange JR., Alexander HR., Merino MJ., et al.: Interleukin 1 alpha prevention of the lethality of Escherichia Coli peritonitis. *J Surg Research*. 1992; 52: 555-559.
165. Langrehr JM., Hoffman RA., Lancaster JR., et al.: Nitric oxide-A new endogenous immunomodulator. *Transplantation*. 1993; 55: 1205-1212.
166. Lefer DJ: Anti-neutrophil and myocardial protecting actions of a novel nitric oxide donor following acute myocardial ischemia and reperfusion in dogs. *Circulation*. 1993; 88: 2337-2350.
167. Lefer DJ: The role of NO in the modulation leukocyte adhesion to the endothelium. Presented at the "NO: Advances in therapeutic application and commercial development" on March 17-18, IBC Symposiums, Philadelphia,PA,1994.
168. Lesèche G., Castier Y., Petit M., et al. : Long-term results of cryopreserved arterial allograft reconstruction in infected prosthetic grafts and mycotic aneurysms of the abdominal aorta. *J Vasc Surg*. 2001; 34: 616-22.
169. Leuprecht A., Perktold K., Prosi M., et al.: Numerical study of haemodynamics and wall mechanics in distal end-to-side anastomoses of bypass grafts. *Biomechanics*. 2002; 35: 225-236.

170. Li M, Carpio DF, Zheng Y, Bruzzo P, Singh V, Ouaz F, Medzhitov RM, Veg AA: An essential role of the NF $\kappa$ B/Toll-like receptor pathway in induction of inflammatory and tissue-repair gene expression by necrotic cells. *J Immunol* 2001, 166: 7128-7135.
171. Liddington ML., Heather BM.: The relationship between aortic diameter and body habitus. *Eur J Vasc Surg.* 1992; 6: 89-92.
172. Lien YH, Lai LW, Silva AL: Pathogenesis of renal ischemia/reperfusion injury: lessons from knockout mice. *Life Sciences* 2003, 74: 543-552.
173. Linas S., Whittenburg D., Repine JE.: Nitric oxide prevents neutrophil-mediated acute renal failure. *Am J Physiol.*1997; 272: F48-54.
174. Lindsay T., Lou X., Lebotay D., et al.: Ruptured abdominal aortic aneurysm; a “two-hit” ischemia/reperfusion injury: evidence from an analysis of oxidative products. *J Vasc Surg.* 1999; 30: 219-28.
175. Ling H., Edelstein C., Gengaro P., et al.: Attenuation of renal ischemia-reperfusion injury in inducible nitric oxide synthase knockout mice. *Am J Physiol.* 1999; 277: F383-90.
176. Lisa A. Mark, Michael Simonson, Ann Robinson and James Schulak: Inhibition of inducible nitric oxide synthase reduces renal ischemia-reperfusion injury. *Journal of the American College of Surgeons* 2004, 199: 96.
177. Liskmann S., Vihalemm T., Salum O., et al: Characterization of the antioxidant profile of human saliva in peri-implant health and disease. *Clin Oral Implants Res.* 2007; 18(1): 27-33
178. Llaneza Coto JM., Carreño Morrondo JA., Cambor Santervas L.: Patogenia de los aneurismas. *Tratado de aneurismas.* Esteban Solano JM. Ed J Uriach & Cía, S.A. Barcelona 1997; p74.
179. 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.

180. López Neblina F., Páez Rollys A., García Criado FJ., Misawa K and Toledo-Pereyra LH.: El óxido nítrico exógeno previene el rodamiento y la adhesión leucocitaria en la isquemia mesentérica en la rata. *Cirujano General*. 1995; 17: 90-93.
181. Lowrens H., Pearce WH. : Role of inflammatory cells in aortic aneurysms. In Yao JST pearce WH eds. *Aneurysms New Findings and treatments*. Connecticut-Appleton E Lange. 1994; 11-23.
182. Lowry SF.: Cytokine mediators of immunity and inflammation. *Arch. Surg*. 1993; 128: 1235-1241.
183. Lozano F., García FJ., Fresnadillo MJ., García E., Gómez A.: Systemic inflammatory response induced by Dacron and modulation by antimicrobial agents: experimental study. *J Surg Res*. 2002; 107: 7-13.
184. Lozano F., Rodriguez JM., García-Criado FJ., et al.: Post-operative evolution on inflammatory response in a model of suprarenal aortic cross-clamping with and without hemorrhagic shock-systemic and local reactions. *World J Surg*. 2005; 29 (10): 1248-58.
185. Lozano F., Cascajo C., García Sánchez E., et al.: Bacterial translocation as a source of Dacron-graft contamination in experimental aortic operation: the importance of controlling SIRS. *Surgery*. 2006 Jul; 140(1): 83-92
186. Lozano F., Barros MB., García-Criado FJ., Gómez-Alonso A.: Exogenous nitric oxide can control SIRS and downregulate NFkB. *J Surg Res*. 2005; 124: 52-8.
187. Lozano FS., Barros MB., Fresnadillo MJ., García Criado FJ and Gómez Alonso A.: Nitric oxide prevents the bacterial translocation and inhibits the systemic inflammatory response produced by implantation of a vascular prótesis followed by Zymosan A. *Inflammation Research* 2005; 54: 261-270.

188. Lozano FS., López-Novoa JM., Rodríguez JM., Barros MB., García Criado FJ., Nicolás JL., Parreño A., Revilla J., Gómez Alonso A.: Exogenous nitric oxide modulates the systemic inflammatory response and improves kidney function after risk-situation abdominal aortic surgery. *J of Vasc Surg* 2005; vol 42, number 1: 129-139.
189. Lucarelli M., Gatti AM., Savarino G., et al.: Innate defence functions of macrophages can be biased by nano-sized ceramic and metallic particles. *Eur Cytokine Netw* 2004 Oct-Dec; 15(4): 339-46.
190. Ma XL., Weyrich AS., Lefer DJ., et al.: Diminished basal nitric oxide release after myocardial ischemia and reperfusion promotes neutrophil adherence to coronary endothelium. *Cir. Res.* 1993; 72:403-412.
191. Maeztu martínez MA., Gómez González MA., Arévalo Turrillas E., et al: Análisis estructural de los principales sistemas de implantes utilizados en la actualidad. *Periodoncia.* 1999; 9(3): 195-204.
192. Marletta MA., Tayeh MA and Hevel JM.: Unraveling the biological significance of nitric oxide. *Biofactors* 1990; 2: 219-223.
193. Martín Vicente V.: Modelo experimental de TB (Zymosan IP). Tesis Doctoral 1994. Universidad de Salamanca.
194. Mason RG.: Endovascular AAA repair attenuates the inflammatory and renal responses associated with convencional sutgery. *J Endovasc Ther.* 2001; 8 (2): 219.
195. Maynar M., Reyes R., De Bas M.: Tratamiento endoluminal de aneurismas de aorta abdominal y miembros inferiores. En: *Tratado de aneurismas.* Esteban Solano JM. Ed J Uríach & Cía S.A. Barcelona 1997; p625-639..
196. McAllister BS., Hagbigbat K: Bone augmentation techniques. *J Clin Periodontol.*2007 ; 78 : 377-96.
197. Mccall T., Whittle BJR., Broughton-Smith NK., et al.: Inhibition of FMLP induced aggregation of rabbit neutrophils by nitric oxide. *Br J Pharmacol.*1998; 95: 617P.
198. McGown CC., Brookes ZLS.: Beneficial effects of statins on the microcirculation during sepsis: the role of nitric oxide. *Br J of Anaesthesia.* 2007; 98(2): 163-175.

199. McKay LI., Cidlowski JA.: Molecular control of immune inflammatory responses: interactions between nuclear factor-kB and steroid receptor-signalling pathways. *Endocr Rev* 1999; 20: 435-59.
200. Mindich BP: Human umbilical cord vein allograft for vascular replacement. *Surgical Forum Vol. XXVI-1975*.
201. Minnard EA., Shou JA., Naama H., et al.: Inhibition of NO synthesis is detrimental during endotoxemia. *Arch Surg* 1994; 129: 142-147.
202. Moore ZWQ., Hui DY.: Apolipoprotein E inhibition of vascular hyperplasia and neointima formation requires inducible nitric oxide synthase. *Journal of Lipid Research*. 2005; 46:2083-2090.
203. Mori A., Suko M., Nishizaki Y., et al.: Regulation of interleukin-5 production by peripheral blood mononuclear cells from atopic patients with FK506, cyclosporin A and glucocorticoid. *Int Arch Allergy Immunol*. 1994; 104:32-35.
204. Mullane KM., Kraemer R and Smith B.: Myeloperoxidase activity as a quantitative assessment of neutrophil infiltration into ischemic myocardium. *J Pharmacol Meth* 1985; 14: 157-167.
205. Mullane KM.: Myocardial ischemia-reperfusion injury. Role of neutrophils and neutrophil derived mediators. In: *Current Concepts in immunology. Clinical Immunology. Vol I. Human Inflammatory Disease*. Marone G DE. Burlington ON Canada BC Decker 1988; 143-159.
206. Murakami M., Suzuki H.: Effect of L-arginine on systemic and renal hemodynamics in conscious dogs. *Clin Sci*, 1991; 81: 727-732.
207. Murohara T., Buerke M and Lefer AM.: Polymorphonuclear leukocyte-induced vasoconstriction and endothelial dysfunction: Role of selectins. *Arterioscler Thromb* 1994; 14: 1509-1519.
208. Myers SI, Hernandez R, Castaneda A: Possible role for oxygen free radicals in the regulation of renal nitric oxide synthesis and blood flow. *Am J Surg* 1995, 169: 604-608.
209. Nakanishi K.: Intracoronary L-arginine during reperfusion improves endothelial function and reduces infarct size. *Am J Physiol*. 1992; 263: H1650-H1658.

210. Nakayama Y., Ishibashi-Ueda H., Takamizawa K.: In vivo tissue-engineered small-caliber arterial graft prosthesis consisting of autologous tissue (biotube). *Cell Transplant*. 2004; 13(4): 439-49.
211. Noiri E., Peresleni T., Miller F., Goligorsky MS.: Antisense oligonucleotides to the inducible NOS prevent tubular cell death in ischemic acute renal failure. *J Clin Invest* 1996; 97: 2377-83.
212. Nowzari H., Yi K, Chee W., Rich SK: Immunology, microbiology, and virology following placement of Nobel Perfectrade mark Scalloped Dental Implants: Analysis of a case series. *Clin Implant Dent Relat Res*.2008. Jan 24.
213. Odergrad A., Lundbom J., Myhre HO., 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; 19:536-544.
214. Ognibene FP.: Pathogenesis and innovative treatment of septic shock. *Adv Intern Med* 1997; 42: 313-338.
215. Oka Y., Chowdhury NC., Liao H., et al.: Enhanced preservation of photoperically transplanted rat lungs by nitroglycerin but not hydralazine. *Circ Res*. 1995; 76: 900-906.
216. Okamoto M., Tsuchiya K., Kanematsu Y., et al.: Nitrite derived nitric oxide formation following ischemia-reperfusion injury in kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005; 288: F182-7.
217. Olivier C., Carballido J and Hernández Lao A.: Sepsis y shock séptico genitourinario. En: *Patología infecciosa en urología*. Joaquín Carballido y Miguel Gobernado. Ed Ergon S.A. Madrid 1998; 147-149.
218. Oppenheim JJ and Neta R.: Pathophysiological roles of cytokines in development, immunity, and inflammation. *Faseb J* 1994; 8: 158-162.
219. Osborn L, Kunkel S, Nabel GJ: Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 stimulate the human immunodeficiency virus enhancer by activation of the nuclear factor kappa B. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989, 86: 2336-2340.

220. 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 study. *Int Urol Nephrol.* 2001,32: 601-7.
221. Pacher P., Beckman JS., Liaudet L.: Nitric Oxide and Peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev.* 2007; 89: 315-424.
222. Padmaja S., Huie RE.: The reaction of nitric oxide with organic peroxil radicals. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993; 195:539-544.
223. Páez-Rollys A, Toledo-Pereyra LH, López-Neblina F et al.: Endothelial cell adhesion molecules and kidney transplantation. *Transplantation* 1995, 6: 134-138
224. Pai JK., Pischon T., Ma J., et al : Markers of periodontal inflammation predict heart disease. *J Periodontol.* 2005; 76(1-2):1-2.
225. Pape HC., Dwenger A., Gollub F., Sturm JA.: Intestinal permeability and multiple organ failure after polytrauma. *Surgical Infection Society. 12 Annual Meeting.* Los Angeles. California 1992.
226. Pararajasingam R., Weight SC., Bell PR., et al.: Pulmonary nitric oxide metabolism following infrarenal aortic cross-clamp-induced ischaemia-reperfusion injury. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2000; 19: 47-51.
227. Pararajasingam R., Weight SC, Bell PR., et al.: Endogenous renal nitric oxide metabolism following experimental infrarenal aortic cross-clamp induced ischemia reperfusion injury. *Br J Surg* 1999; 86:795-9.
228. Pararajasingam R., Weight SC., Bell PR., et al.: Prevention of renal impairment following aortic cross-clamp by manipulation of the endogenous renal nitric oxide response. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2000; 19:396-9.
229. Parks DA and Granger DN.: Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formations. *Am J Physiol* 1986; 250: G749-752.
230. Parks HS., Jeong SH., Kwon DW: Factors affecting the clinical success of screw implants used as orthodontic anchorage. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.*2006;130(1): 18-25.

231. Parodi JC., Palmaz JC., Borone HD.: Transfemoral intraluminal graft implantation for abdominal aortic aneurysms. *Ann Vasc Surg*. 1991; 5: 491-499.
232. Parodi JC.: Endovascular repair of abdominal aortic aneurysms and other arterial lesions. *J Vasc Surg* 1995; 21: 549-557.
233. 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.
234. Pearce WH., Slaughter MS., Lcmair S., et al.: Aortic diameter as a function of age, gender and body surface area. *Surgery* 1993; 114: 691-697.
235. Peitzman AB., Udekwu AO., Ochoa J., et al.: Bacterial translocation in trauma patients. *J Trauma* 1991; 31: 1083-1087.
236. Pirovano MA.: Un cas de grffe arterielle. *Presse Med.* 19 ; 55 ; 1911.
237. Pitcher J, Bradway D, Meldrum K K, Hile K, Wang M, Tsai B. M, Sankula R. and Meldrum D. R: Trasyolol (aprotinin) decreases kidney Interleukin-1beta (IL-1beta) and IL-6 levels following renal ischemia and reperfusion injury. *Journal of Surgical Research* 2004, 121: 275
238. Pongnarisorn NJ., Gemmell E., Tan AE., et al: Inflammation associated with implants with different surface types. *Clin Oral Implants Res.*2007; 18(11): 114-25.
239. Poole GV. : Spontaneous bacterial peritonitis during bowel preparation : An example of clinical translocation. *South Med J* 1991; 84: 1412-1413.
240. Preli R., Klein K., Herrington D.: Vascular effects of dietary L-arginine supplementation. *Atherosclerosis*. 2002; 162: 1-15.
241. Prewett A.: Design and development of an antimicrobial vascular graft. Satellite Symposium European Vascular Course. Amsterdam, March 2000.
242. Qi., Shijie., Dasheng., et al.: Effect of a novel inducible nitric oxide synthase inhibitor, FR260330, in prevention of a renal ischaemia/reperfusion injury in Vervet monkeys. *Transplantation*. 2006; 81(4): 627-631.

243. Reno F., Sabbatini M., Cannas M.: Surface oxidation of UHMWPE for orthopedic use increases apoptosis and necrosis in human granulocytes. *Journal of materials science materials in medicine*. 2003 Mar; 14(3): 241-245.
244. Renvert S., Roos-Jansaker AM., Lindahl C., et al: Infection at titanium implants with or without a clinical diagnosis of inflammation. *Clin Oral Implants Res*.2007; 18(4): 509-16.
245. Rettori V., Gimero M., Lyson K., Mccann SM.: Nitric oxide mediates norepinephrine-induced prostaglandin E-2 release from the hypothalamus. *Proc Natl Acad Sci. USA*. 1992; 89: 1543-1546
246. 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.
247. Roberston FM., Offner PJ., Ciceri DP., et al.: Detrimental hemodynamic effects of nitric oxide synthase inhibition in septic shock. *Arch Surg* 1994; 129: 149-156.
248. Rodriguez Peña A., García Criado FJ., Eleno N., Arevalo M., López novoa JM.: Intrarenal administration of molsidomine a molecule releasing nitric oxide, reduces renal ischemia-reperfusion injury. *Am J Transplant* 2004; 4: 1605-13.
249. Romero-Ruiz MM., Herrero-Climent M., Torres-Lagares D., et al:Protocolo del control del dolor y la inflamación postquirúrgica. Una aproximación racional. *RCOE*.2006; 11(2): 205-215.
250. Rosch R., Junge K., Schachtrupp A., et al : Mesh implants in hernia repair. Inflammatory cell response in a rat model. *European Surgical Research*. 2003 May-Jun, 35(3): 161-6.
251. Rosenberg N.: Arterial heterograft and their modifications. "Fundamentals of vascular surgery" Mc. Graww-Hill: N. York. 1963.
252. Rosenkranz B., Winkelmann R., Parnham MJ.: Clinical pharmacokinetics of molsidomina. *Drug Metab Dispos* 1990; 30: 372-84.
253. Ruffer MA.: On arterial lesions found in Egyptian mummies. *J Path Bact* 1911: XV, 453.

254. Runkel NS., Moody FG., Smith GS., et al.: The role of the gut in the development of sepsis in acute pancreatitis. *J Surg Res.* 1991; 51: 18-23.
255. Ruygrok PN., Muller DW., Serruys PW.: Rapamycin in cardiovascular medicine. *Inter Med J.* 2003 Mar; 33(3): 103-9.
256. Saran M.: Reaction of No with O<sub>2</sub>. Implication for the action of endothelium-derived relaxing factor (EDRF). *Free Rad Res Commun* 1990; 10: 221-226.
257. Sato E., Simpson KI., Grisham MB., et al.: Inhibition of MIP-1 alpha-induced human neutrophil and monocyte chemotactic activity by reactive oxygen and nitrogen metabolites. *J Lab Clin Med* 2000; 135: 161-9.
258. Sayers RD.: Aortic aneurysms, inflammatory pathways and nitric oxide. *Ann R Coll Surg Engl.* 2002 Jul; 84(4): 239-246.
259. 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.
260. 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.
261. Seekamp A., Till Go., Mulligan MS., et al.: Role of selectins in local and remote tissue injury following ischemia and reperfusion. *Am J Pathol* 1994; 144: 592-598.
262. Seldinger SI.: Cateter replacement of the needle in percutaneous arteriography. *Acta Radiol* 1953; 39: 368-376.
263. Sharkey J and Butcher SP.: Immunophilins mediate the neuroprotective effects of FK506 in focal cerebral ischaemia. *Nature* 1994; 371: 336-339.
264. Shindo S., Ogata K., Kubota K., et al.: Vascular prosthetic implantation is associated with prolonged inflammation following aortic aneurysm surgery. *Journal of artificial organs.* 2003; 6(3): 173-8.
265. Siegfried MR., Erhardt J., Rider T., et al.: Cardioprotection and attenuation of endothelial dysfunction by organic nitric oxide donors in myocardial ischemia-reperfusion. *J Pharmacol Exp Ther* 1992; 260: 668-675.

266. Sigerist HE.: A History of Medicine. Vol I Y II. New York. Oxford University Press 1, 1951; 273.
267. 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.
268. Simpson PJ, Fantone JC, Lucchesi BR: Myocardial ischemia and reperfusion injury: Oxygen radicals and the role of the neutrophil. En: *Oxygen Radicals and Tissue Injury, Proceedings of an Upjohn Symposium*. Halliwell B, (De) Kalamazoo MI 1988, pp: 63-77.
269. Sirham M., Moochhala SM., Kerwin SY., et al.: Influence of selective nitric oxide synthetase inhibitor for treatment of refractory haemirrhagic shock. *Resuscitation*. 2004; 61: 221-9.
270. 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.
271. Stähli BE., Greutert H., Shaoping M., et al.: Absence of histamine-induced nitric oxide release in the human radial artery: implications for vasospasm of coronary artery bypass vessels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006; 290: H1182-H1189.
272. Stamler JS., Singel DJ.: Biochemistry of nitric oxide and its Redox-Activated Forms. *Science* 1992; 258: 1898-1902.
273. Stefano G., Galli C., Martini D., et al: Different titanium surface treatment influences human mandibular osteoblast response. *J Periodont*. 2004; 75: 273-282.
274. Steunmetz EF., Buckley C., Thopson RW.: Prospects for the medical management of abdominal aortic aneurysms. *Vasc Endovasc Surg*. 2003 May-Jun; 37(3):151-163.
275. Sueda T., Orihashi K., Okada K., et al.: Fate of aneurysms of the distal arch and proximal descending thoracic aorta after transaortic endovascular stent-grafting. *Ann Thorac Surg*. 2003 Jul; 76(1): 84-9.
276. Sullivan GW., Sarembock IJ., Linden J.: The role of inflammation in vascular diseases. *J Leukoc Biol*. 2000 May; 67(5): 591-602.

277. Susumu Nishiyama, Noriko Manabe, Yoshitsugu Kubota, Hiroaki Ohnishi, Akira Kitanaka, Michiaki Tokuda, Tomohiko Taminato, Toshihiko Ishida, Jiro Takahara and Terukazu Tanaka: Cyclosporin A inhibits the early phase of NF- $\kappa$ B/RelA activation induced by CD28 costimulatory signaling to reduce the IL-2 expression in human peripheral T cells. *International Immunopharmacology* 2005, 5: 699-710.
278. Suzuki S., Toledo-Pereyra LH., Rodríguez 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.
279. Svensson LG., Crawford ES., Hers KR., et al.: Experience with 1509 patients undergoing thoracoabdominal aortic operations. *J Vasc Surg.* 1993; 17: 357-70.
280. Swartbol P., Truedsson L., Norgren L.: The inflammatory response and its consequence for the clinical outcome following aortic aneurysm repair. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2001; 21: 393-400.
281. Szilagyi DE., McDonald RT., Smith RF., Whitcomb JG.: Biologic fate of human arterial homografts. *Arch Surg.* 1957; 75: 506-529.
282. Takada M., Nadeau KC., Shaw GD., et al.: The cytokine-adhesion molecule cascade in ischemia reperfusion injury of the rat kidney. Inhibition by soluble P-selectin ligand. *J Clin Invest.* 1997; 99: 2682-2690.
283. Tanaka K, Fukuuchi Y, Nokazi H et al.: Calcineurin inhibitor, FK506, prevents reduction in the binding capacity of cycling AMP-dependent protein kinase in ischemic gerbil brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 1997, 17: 412-420
284. Tanaka S., Kamiike W., Kosaka H., et al.: Detection of nitric oxide production and its role in pancreatitis ischemia-reperfusion in rats. *Am J Physiol.* 1996; 271: G405-G409.
285. Thanos D., Maniatis T.: NF $\kappa$ B: A lesson in family values. *Cell.* 1995; 80: 529-532.
286. Thompson MM., Nasim A., Sayers RD., et al.: Oxygen free radical and cytokine generation during endovascular and conventional aortic aneurysm repair. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 1996; 12: 70-75.

287. Toledo-Pereyra LH and Suzuki S: Neutrophils, cytokines and adhesion molecules in hepatic ischemia and reperfusion injury. *J Am Coll Surg* 1994, 179: 758-762
288. Toprak V., Sirin BH., Tok D., et al.: The effect of cardiopulmonary bypass on the expression of inducible nitric oxide synthase, endothelial nitric oxide synthase, and vascular endothelial growth factor in the internal mammary artery. *J Cardiothorac Vasc Anesth.* 2006; 20(1): 63-7.
289. Tozum TF., Turkyilmaz I., Yamalik N., et al.: Analysis of the possible impact of inflammation severity and early and delayed loading on nitric oxide metabolism around dental implants. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2005 Jul-Aug; 20(4): 547-556.
290. Trejo PM., Bonaventura G., Weng D., et al: Effect of mechanical and antiseptic therapy on peri-implant mucositis: an experimental study in monkeys. *Clin Oral Implants Res.* 2006; 17(3): 294-304.
291. Treska V., Kocova J., Boudova L., et al.: Inflammation in the wall of abdominal aortic aneurysm and its role the symptomatology of aneurysm. *Cytokines Cell Mol Ther.* 2002; 7(3): 91-97.
292. Tse LW., Steinmetz OK., Abraham CZ., et al.: Branched endovascular stent-graft for suprarenal aortic aneurysm : the future of aortic stent-grafting ?. *Can J Surg.* 2004; 47(4): 257-62.
293. Tsuchihashi S., Kaldas F., Chida N., et al.: FK330, a novel inducible nitric oxide synthase inhibitor, prevents ischaemia and reperfusion injury in rat liver transplantation. *Am J of Transplantation.* 2006; 6(9): 2013-2022.
294. Tuffier M.: De l'intubation dans les plaies des grosses artères. *Bull Académ Med.* 74, 455 ; 1915.
295. Valdivieso JM., Blantz RC. : Acute renal failure: is nitric oxide the bad guy .*Antioxid Redox Signal.* 2002; 4: 925-934.
296. 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

297. Valko M., Leibfritz D., Moncol J., et al. : Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007; 39(1): 44-84.
298. Van-Bielsen PH., Popa ER., Brouwer LA., et al.: Ongoing foreign body reaction to subcutaneous implanted (heparin) modified Dacron in rats. *J of Biomed Mater Res.* 2004 Mar 1; 68A(3): 423-427.
299. Vaquero F., Fernández-Samos R., Fernández C., et al.: Revisión del papel de los radicales libres en la secuencia isquemia-revascularización. *Angiología* 1995; 47: 213-226.
300. Vikas Chander and Kanwaljit Chopra: Effect of molsidomine and L-arginine in cyclosporine nephrotoxicity: role of nitric oxide. *Toxicology* 2005, 207: 463-474
301. Viver Manresa E.:Aneurismas aórticos: complicaciones y resultados a corto y largo plazo. En:Tratado de Aneurismas. Esteban Solano JM.Ed J Uríach & Cía S.A: Barcelona 1997. p 361.
302. Vollmar J.: Cirugía ricostruttiva delle arterie. Edit. PEM. Milán. 1968.
303. Von Knethen A., Brune B.: Activation of peroxisome proliferators activated receptor gamma by nitric oxide in monocytes/macrophages dwn-regulates p47phox and attenuates the respiratory burst. *J Immunol.* 2002; 169: 2619-26.
304. Weight SC., Furness PN., Nicholson ML.: Biophasic role for nitric oxide in experimental renal warm ischaemia-reperfusion injury. *Br J Surg* 1999; 86: 1039-46.
305. Weight SC., Bell PRF., Nicholson ML.: Renal ischemia-reperfusion injury. *Br J Surg.* 1996; 83: 162-170.
306. Weyrich AS., Ma XL., Leffer AM.: The role of L-arginine in ameliorating reperfusion injury after myocardial ischemia in the cat. *Circulation.* 1992; 86: 279-288.
307. Wood JG., Zhang Q., Yan ZY., Cheung LY. : Nitric oxide attenuates endothelin-1-induced vasoconstriction in canine stomach. *Am J Physiol.* 1996; 271: G27-G35.

308. Woodcock NP., El-Barghouti N., Perry EP., Macfie J.: Is bacterial translocation a cause of aortic graft sepsis?. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2000; 19: 433-434.
309. Yakamoto T., Bing RJ.: Nitric oxide donors. *Proc Soc Exp Biol Med.* 2000; 225: 200-6.
310. Yu L, Gengaro PE, Niederberger M, Burke TJ, Schirier TW: Nitric oxide: A mediator in rat tubular hypoxia/reoxygenation injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994, 91: 1691-1695.
311. Zysk SP., Gebhard H., Plitz W., et al.: Influence of orthopaedic particulate biomaterials on inflammation and synovial microcirculation in the murine knee joint. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2004 Oct 15; 71B(1): 108-15.