

11221

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO  
POSTGRADO EN LABORATORIO CLÍNICO

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL  
CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI  
HOSPITAL DE CARDIOLOGÍA  
DIVISIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN  
LABORATORIO CLÍNICO

TESIS DE POSTGRADO EN PATOLOGÍA CLÍNICA

EVALUACIÓN DEL COMPORTAMIENTO ENZIMÁTICO DURANTE LA REPERFUSIÓN CON SOLUCIÓN HIPERTÓNICA-HIPERONCÓTICA POSTERIOR A ISQUEMIA GLOBAL EN PULMÓN AISLADO DE CONEJO ADULTO.

FALLA DE ORIGEN

Presenta: Yolanda Miranda Coss

Asesores: Dr. Guillermo Careaga Reyna

Dr. Rubén Argüero Sánchez

México D.F., 1995



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

11231  
3  
REJ

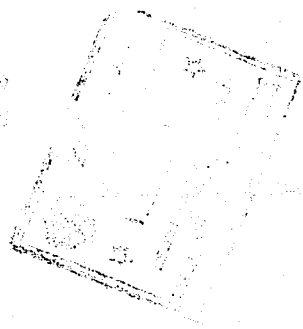
**TITULO DEL PROYECTO: EVALUACION DEL COMPORTAMIENTO ENZIMATICO DURANTE LA REPERFUSION CON SOLUCION HIPERTONICA HIPERONCOTICA POSTERIOR A ISQUEMIA GLOBAL EN PULMON AISLADO DE CONEJO ADULTO.**

PROFESOR TITULAR DEL CURSO:   
DRA. ROSA MARIA GARCIA ESCAMILLA

DIRECTOR DEL HOSPITAL:   
DR. RUBEN ARGUERO SANCHEZ.

JEFE DE LA DIVISION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION:   
DR. ARMANDO MANSILLA OLIVARES.

ASESOR DE LA TESIS:   
DR. GUILLERMO CAREAGA REYNA.



## **INDICE**

|                                    |           |
|------------------------------------|-----------|
| <b>Agradecimientos</b>             | <b>I</b>  |
| <b>Resumen</b>                     | <b>II</b> |
| <b>Antecedentes</b>                | <b>1</b>  |
| <b>Justificación</b>               | <b>6</b>  |
| <b>Planteamiento del problema</b>  | <b>7</b>  |
| <b>Hipótesis</b>                   | <b>8</b>  |
| <b>Objetivo</b>                    | <b>9</b>  |
| <b>Identificación de variables</b> | <b>10</b> |
| <b>Tipo de estudio</b>             | <b>11</b> |
| <b>Material y métodos</b>          | <b>12</b> |
| <b>Universo de trabajo</b>         | <b>12</b> |
| <b>Método</b>                      | <b>13</b> |
| <b>Análisis estadístico</b>        | <b>16</b> |
| <b>Resultados</b>                  | <b>17</b> |
| <b>Discusión</b>                   | <b>26</b> |
| <b>Conclusiones</b>                | <b>29</b> |
| <b>Referencias</b>                 | <b>30</b> |

**AGRADECIMIENTOS:**

Por su valiosa colaboración, su desempeño durante el desarrollo de este trabajo, el interés y entusiasmo que caracterizó a todo el excelente equipo de profesionales, mi más sincero agradecimiento a todos y cada uno de ellos.

**JEFATURA DE LA DIVISIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN, HOSPITAL DE CARDIOLOGÍA DEL CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI, IMSS.**

Dr. Armando Mansilla Olivares.

**LABORATORIO DE CIRUGÍA EXPERIMENTAL DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DEL DISTRITO FEDERAL, DEL CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI, IMSS.**

MVZ Sergio Rosas Macedo.

MVZ Joel Pedroza Sandoval.

MVZ Sergio Pratz Güitrado.

Enf. Irma Cortés Mejía.

**LABORATORIO CLÍNICO DEL HOSPITAL DE CARDIOLOGÍA DEL CENTRO MÉDICO NACIONAL, SIGLO XXI. I.M.S.S.**

Dr. Dionisio Félix Méndez.

Dra. Rosa María García Escamilla.

QFB. Rocio Méndez Montaña.

R2PC. Luis Antonio Angulo Ramírez.

## **RESUMEN**

Se ha demostrado que el daño tisular por efecto del fenómeno de isquemia reperusión, es ocasionado por aumento de la permeabilidad vascular favoreciendo como consecuencia edema. Todo ello a causa de la obstrucción por eritrocitos y leucocitos, pérdida del control vasomotor del endotelio y reducción del diámetro vascular, afectando de manera importante la microcirculación.

La solución hipertónica hiperoncótica ha sido empleada para el manejo de choque hipovolémico, observándose una reducción del edema celular y además de reinstalar la función circulatoria. Encontrando que existe modificación de las lesiones que se originan en el endotelio vascular.

Con la finalidad de evaluar el efecto de la solución hipertónica hiperoncótica, sobre la lesión por isquemia reperusión en pulmón, se realizó la preparación de 8 bloques pulmonares aislados de conejo, distribuidos aleatoriamente en 2 grupos, sometidos a 30 minutos de isquemia y 60 de reperusión. El grupo I se reperfundió con solución de Krebs-Henseleit con sodio al 7.5% y dextrán 80 al 6% para obtener una concentración de sodio de 150 mEq/l y 400 mOsm/l. El grupo II fue control y solo se reperfundió con solución de Krebs-Henseleit. Se evaluó el comportamiento de los niveles de Aspartato Aminotransferasa (AST), Alanín Aminotransferasa (ALT) y Lactato Deshidrogenasa (LDH).

Los resultados indican que los niveles de AST fueron menores con respecto a los del grupo control, obteniéndose un valor de  $p = 0.0202$ . Los niveles de ALT se observaron, en términos generales, que también se encuentran con niveles inferiores en el grupo I, con una  $p = 0.037$  y para la LDH se obtuvo una  $p = 0.025$ .

Se concluye que la utilización de soluciones hipertónicas hiperoncóticas, durante el fenómeno de la reperusión aplicada después de un período de isquemia, es una buena alternativa para el tratamiento del daño tisular pulmonar por isquemia-reperusión.

## **ANTECEDENTES:**

El daño por reperfusión es un problema importante en muchas condiciones clínicas, las cuales incluyen la respuesta a la reimplantación después del trasplante pulmonar y reexpansión, edema después del colapso pulmonar. (1) El daño pulmonar por isquemia reperfusión es el mayor problema durante los trasplantes pulmonares en animales (2). El daño de reperfusión es un problema importante en la etapa temprana después del trasplante pulmonar (3-5).

Generalmente es difícil mantener la viabilidad del pulmón "ex vivo" por períodos mayores de 4 hrs. en preparaciones perfundidas aisladas o para trasplante pulmonar (1,6). El daño por reperfusión es generalmente caracterizado por inflamación (1,7,8), edema (1,9) y disfunción fisiológica, con alteraciones significantes de función vascular (1,7,10,11) inclusive la microvasculatura y la resistencia de los grandes vasos.

La lesión por reperfusión es un componente importante del fenómeno isquemia-reperfusión en modelos de órganos sistémicos, incluyendo corazón, cerebro, riñón, intestino delgado, hígado y pulmones (1,12-16). Esto es el daño celular visto en estados patológicos, tales como isquemia-reperfusión, radiación preservación de órganos, úlceras de estrés, falla renal y hepática, pancreatitis, síndrome de insuficiencia respiratoria, colitis ulcerativa y alteraciones inflamatorias (17). Es obvio que el daño por reperfusión no es inducido por una simple reacción pero ocurre en asociación con varios factores (3). Se ha presumido que la principal causa de daño por reperfusión son los radicales libres de oxígeno (3,18,19). Los radicales de oxígeno son capaces de dañar reversible o irreversiblemente componentes de todas las clases bioquímicas, incluyendo ácidos nucleicos (13,20,21), proteínas y aminoácidos libres, lípidos, lipoproteínas, carbohidratos y macromoléculas de tejido conectivo (22). La conversión de oxígeno molecular a radicales tóxicos de oxígeno ocurre por la transferencia de un sólo electrón por la mitocondria a la cadena de transporte de electrones microsomales a través de sistemas oxidantes de enzimas, tales como xantina oxidasa, aldehído oxidasa, flavín deshidrogenasa.

El daño microvascular del pulmón causado por isquemia-reperfusión puede ocurrir por la vía dependiente de leucocito y las vías independientes del mismo. La adhesión del leucocito al endotelio puede ser una relación limitante en el paso en isquemia-reperfusión del daño pulmonar (23). Otros eventos tempranos en el tejido dañado es la liberación del factor activador de plaquetas, el cual está asociado con la adherencia de los glóbulos blancos a los pequeños vasos en el área del daño (7).

Los radicales libres derivados por neutrófilos pueden vencer los mecanismos protectores (17,24-26), con capacidad de mediar la destrucción tisular y vascular (24,27) y están estrechamente relacionados con la acumulación de neutrófilos (28) y su adherencia a las células endoteliales, provocando daño celular directo (20,29,30), además de incremento en la permeabilidad de la membrana celular (31).

Bowman y cols (3,32) han notificado que la hipoxia causa daño directo a las células endoteliales y se

promueve la adhesión de neutrófilos (33). Los leucocitos activados magnifican el daño por la producción de especies de oxígeno reactivo y la liberación de enzimas citotóxicas (23,34,35). El daño endotelial puede conducir a estasis microvascular y más isquemia en el período de la reperfusión, el cual puede ser de efecto letal (17).

El edema tisular es una característica constante de daño por reperfusión (36,37) y sugiere el daño al endotelio vascular. Las células pulmonares tienen un sistema metabólico que involucra alto consumo de ADP. La isquemia temporal causa dos tipos de daño celular: a) Daño por anoxia celular resultando en disminución de la capacidad de la fosforilación oxidativa de la mitocondria durante la isquemia (39,40) y b) Daño por reperfusión por peroxidación de varios componentes celulares durante la reperfusión de órganos isquémicos (29,41,42). Este daño primario puede conducir a depleción de NADH, glutatión reducido y adenosín trifosfato y aumentar en el citosol los iones de calcio (12,20), los cuales pueden causar daño celular, con disrupción del citoesqueleto y fragilidad membranal (38,43). Aunque las demandas de oxígeno de las células pulmonares para el metabolismo de energía es muy bajo, el oxígeno es gradualmente consumido cuando los pulmones se mantienen inflados con gas de oxígeno bajo contenido durante el almacenaje (38).

Modry y Chiu (12,44) han mostrado que la oclusión arterial pulmonar por 48 hrs en perros espontáneamente ventilados disminuye marcadamente el rango de ATP, y ATP/ADP pulmonar, el contenido de glucógeno y el aumento de los niveles de lactato pulmonar.

Cuando un órgano sufre de isquemia térmica, la peroxidación de lípidos y el fenómeno de "no reflujo" puede ocurrir. Este fenómeno fue descrito en 1967 por Majno y cols, que notificaron cambios vasculares persistentes después de isquemia cerebral en conejo (1,45). El fenómeno de "no reflujo" ocurre después de isquemia térmica y reperfusión. La sangre no fluye suficientemente desde las arteriolas a los capilares debido a la agregación de eritrocitos, obstrucción por leucocitos, vasoespasmo y disminución del lumen del endotelio vascular (31) y por lo tanto la restauración incompleta del flujo sanguíneo durante la reperfusión puede amplificar el daño por prolongación de isquemia (1).

Las concentraciones de proteínas, enzimas intracelulares y catabolitos de la purina en lavados sucesivos de pulmones con isquemia térmica son altamente significativos antes de la preservación (38). En los fluidos de los pulmones colapsados y el nitrógeno en la ventilación continua a niveles significativamente altos, así como las proteínas, LDH, c AST, m AST y los catabolitos de purina contenidos antes de la preservación.

Se ha notificado que en el hígado (38,46) y corazón (47) a nivel de la membrana celular durante la isquemia hay la liberación de enzimas citoplasmáticas por mecanismos de estrés. Un importante evento tanto en la isquemia-reperfusión como en el daño pulmonar hiperóxico es la relación de ácido



araquidónico y la formación de eicosanoides, tales como las prostaglandinas, prostaciclina, tromboxano y leucotrienos (2).

Las alteraciones en la permeabilidad de la membrana en isquemia-reperusión con daño pulmonar, están caracterizadas por incremento en la resistencia vascular pulmonar con la resultante hipertensión. La localización de la resistencia vascular aumentada en los vasos postcapilares pulmonares sugieren una trascendente vasoconstricción que puede incrementar la presión capilar hidrostática (48).

Los mastocitos se encuentran en la submucosa de los bronquiolos pulmonares y bronquios en asociación cerrada con vasos sanguíneos; los mastocitos pueden influenciar la vasculatura pulmonar por afectar el tono o por promover una respuesta inflamatoria (25).

La intervención con antioxidantes reduce en forma importante el secuestro de neutrófilos y la permeabilidad vascular con un efecto significativamente más protector que la depleción del complemento (28). Los antioxidantes deben ser utilizados para minimizar la acumulación de los neutrófilos y su prevención subsecuente de daño pulmonar durante la reperusión extrema después de isquemia (28). Esta protección existe en forma de antioxidantes endógenos o enzimas, tales como la glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa y catalasa, contra los radicales libres (17, 49).

Fisher y cols (50) han demostrado que los productos de peroxidación lipídica disminuyen con el tiempo y la tensión de oxígeno durante la isquemia en pulmones de rata aislados y ventilados (12).

Jin y cols (51) describieron un efecto vasodilatador de arginina-vasopresina (AVP) en anillos de arterias pulmonares aisladas y notificaron un papel vasodilatador para AVP con la vasculatura pulmonar (51).

Los inhibidores de la ciclooxigenasa, indometacina y diclofenaco atenúan los efectos del radical hidropéroxido, así como, la administración de tromboxano a los receptores antagonistas y los inhibidores de tromboxano-sintetasa (2).

Kenedy y cols establecieron la protección parcial por SOD, catalasa, dimetil-urea, N-acetil cisteína y alopurinol (2, 52). Se ha demostrado que un bloqueador de calcio, el verapamil, protege contra esos cambios de permeabilidad (1). El inhibidor de la tripsina urinaria (UTI) atenúa significativamente el daño por reperusión, quizá por inhibición de las proteasas de los neutrófilos (3).

Varios autores han sido citados mencionando que el daño por reperusión fue atenuado por SOD y catalasa, los cuales son barredores de radicales libres de oxígeno, o por alopurinol, el cual inhibe a la xantina oxidasa (3, 53, 54). Con el tratamiento de SOD por infusión continua los cambios compatibles con necrosis hemorrágica fueron atenuados (33). El radical superóxido y el peróxido de hidrógeno son removidos usando cualquiera de las dos enzimas específicas tales como SOD y glutatión peroxidasa (1, 20, 55).

Mientras la isquemia en órganos sistémicos se promueve directamente y recibe sus nutrientes solamente desde su circulación arterial, este no es el caso del pulmón (1). La resistencia relativa de los pulmones a

la isquemia está demostrada en el embolismo pulmonar, en el cual solamente un número limitado de pacientes presenta necrosis después del embolismo (1, 33).

Otros órganos diferentes tales como el corazón, intestino, y riñones con isquemia si producen necrosis tisular (9, 11). Está reconocido que los pulmones no desarrollan necrosis inducida por isquemia por la doble provisión sanguínea (33). El pulmón puede recibir nutrientes desde las vías aéreas o desde una de sus tres conexiones vasculares, arteria pulmonar, arteria bronquial o venas pulmonares (1, 58). Sin embargo al extraer pulmones con fines de trasplante se pierde esta doble circulación.

La infusión de pequeños volúmenes de NaCl al 7.5% en dextrán 70 al 6% puede mejorar significativamente el flujo sanguíneo orgánico seguido de choque hemorrágico. Este mejoramiento en el flujo sanguíneo puede explicar la supervivencia observada con esta solución y puede atenuar algunas de las complicaciones tardías del choque hemorrágico (57, 51, 63-65).

El uso de solución hipertónica para el tratamiento de hipovolemia no es nuevo. En 1919 Penfield (15) usó inyecciones hiperosmolares cristaloides en choque hemorrágico severo. Muchos experimentos y datos clínicos soportan la superioridad de volúmenes relativamente bajos de solución hipertónica salina en mejoramiento de la hemodinámica y resulta en comparación con grandes cantidades de solución isotónica (5, 7, 16, 58-62). Al agregar cristaloides y coloides las soluciones hipertónicas ganaron más interés como nuevos fluidos de sustitución de régimen. Para prevenir esta fuga de agua se tuvo la motivación de preparar solución hipertónica de NaCl en coloides, como el dextrán, por el cual puede ser sostenido un incremento en el volumen sanguíneo (58).

Maníngas y cols notificaron que pequeños volúmenes de NaCl al 7.5% en dextrán al 6% son superiores o iguales a los volúmenes de solución salina normal o NaCl al 7.5% en la habilidad para resucitar animales con hemorragia letal (36, 57).

Mazzoni y cols (66) documentaron por un modelo matemático que después de una hemorragia del 20% la adición de solución hipertónica calculada a un séptimo del volumen sanguíneo perdido, restablece el volumen sanguíneo en un minuto (58). El oxígeno libre incrementó significativamente en los pacientes que recibieron solución hipertónica salina preparada en solución de hidroxil etil almidón ( solución HS-HES ) pero nunca excedió de 153 mmol/l y retomó a valores menores a 145 mmol en el primer día de postoperatorio. La osmolaridad también se incrementó en estos pacientes sin exceder de 320 mOsm/l (58).

La solución hipertónica-hiperoncótica es un líquido resucitador en el tratamiento para choque que posee la habilidad de reinstalar el flujo capilar en suma a la función circulatoria sistémica y disminuir el daño por reperfusión (67).

En resultados obtenidos de diferentes autores, se ha encontrado que la administración de solución hipertónica-hiperoncótica al momento de la reperfusión después de un periodo isquémico disminuye el

daño por reperfusión, incrementando el flujo circulatorio, evitando el aumento del contenido de agua y el daño estructural observado por microscopía electrónica y por parámetros de enzimas. (67).

## **JUSTIFICACIÓN**

Se conocen las modificaciones en liberación de enzimas ocasionadas por la lesión por isquemia reperusión. Es importante encontrar una alternativa que proteja al pulmón de este evento, por lo que dadas las ventajas conocidas de la solución hipertónica-hiperoncótica, es necesario evaluar su efecto sobre la curva de distintas enzimas indicadoras de daño celular pulmonar en un modelo experimental.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

### **PROBLEMA GENERAL:**

¿Mejora la reperfusión con la solución hipertónica-hiperoncótica las concentraciones enzimáticas después de isquemia global en pulmón aislado de conejo adulto?

### **PROBLEMAS ESPECÍFICOS:**

1. ¿La administración de solución hipertónica-hiperoncótica durante la reperfusión de pulmón aislado de conejo adulto, posterior a un periodo de isquemia global, disminuye las concentraciones de la enzima lactato deshidrogenasa presentes en el líquido efluente?
2. ¿La administración de solución hipertónica-hiperoncótica durante la reperfusión de pulmón aislado de conejo adulto, posterior a un periodo de isquemia global, disminuye las concentraciones de la enzima aspartato aminotransferasa presentes en el líquido efluente?
3. ¿La administración de solución hipertónica-hiperoncótica en la reperfusión de pulmón aislado de conejo adulto, posterior a un periodo de isquemia global, disminuye las concentraciones de la enzima alanín aminotransferasa presentes en el líquido efluente?

## **HIPÓTESIS**

### **HIPÓTESIS GENERAL:**

La administración de solución hipertónica-hiperoncótica durante la reperfusión mejora las concentraciones enzimáticas en la reperfusión, posterior a la isquemia global en pulmón aislado de conejo adulto.

### **HIPÓTESIS ESPECÍFICAS:**

1. La administración de solución hipertónica-hiperoncótica durante la reperfusión de pulmón aislado de conejo adulto, posterior a un periodo de isquemia global, disminuye las concentraciones de la enzima lactato deshidrogenasa, presentes en el líquido efluente.
2. La administración de solución hipertónica-hiperoncótica durante la reperfusión de pulmón aislado de conejo adulto, posterior a un periodo de isquemia global, disminuye las concentraciones de la enzima aspartato aminotransferasa, presentes en el líquido efluente.
3. La administración de solución hipertónica-hiperoncótica durante la reperfusión de pulmón aislado de conejo adulto, posterior a un periodo de isquemia global, disminuye las concentraciones de la enzima alanín aminotransferasa, presentes en el líquido efluente.

## **OBJETIVO**

### **OBJETIVO GENERAL:**

Determinar la actividad enzimática en líquido efuente durante la reperfusión con solución hipertónica-hiperoncótica, posterior a isquemia global de pulmón aislado de conejo adulto y compararla con un grupo control.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

1. Determinar la concentración de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en líquido efuente durante la reperfusión con solución hipertónica-hiperoncótica, posterior a un periodo de isquemia global en pulmón aislado de conejo adulto y compararlo con un grupo control.
2. Determinar la concentración de la enzima aspartato aminotransferasa (AST) en líquido efuente durante la reperfusión con solución hipertónica-hiperoncótica, después de un periodo de isquemia global en pulmón aislado de conejo adulto y su comparación con un grupo control.
3. Determinar la concentración de la enzima alanín aminotransferasa (ALT) en líquido efuente durante la reperfusión con solución hipertónica-hiperoncótica, posterior a un periodo de isquemia global en pulmón aislado de conejo adulto y su comparación con un grupo control.

## **IDENTIFICACIÓN DE VARIABLES**

### **VARIABLE INDEPENDIENTE:**

Solución hipertónica-hiperoncótica.

### **VARIABLES DEPENDIENTES:**

1. Concentración de lactato deshidrogenasa presente en el líquido efluente
2. Concentración de aspartato aminotransferasa presente en el líquido efluente
3. Concentración de alanin aminotransferasa presente en el líquido efluente.

### **DEFINICIÓN OPERACIONAL DE LAS VARIABLES:**

1. **SOLUCIÓN HIPERTÓNICA-HIPERONCÓTICA:** Cloruro de sodio al 7.5% y dextrán 60 (1.6 alfa poliglicano con peso molecular de 60,000 daltons) al 6% (Schiwa GmbH, Fostfach 1180 D-459, Glandorf), que al combinarse con la solución de reperfusión proporcionará una concentración de sodio de 150 mEq/l.
2. **CONCENTRACIÓN DE LACTATO DESHIDROGENASA:** Cantidad de la enzima lactato deshidrogenasa presente en el líquido efluente, expresada en U/l.
3. **CONCENTRACIÓN DE ASPARTATO AMINOTRANSFERASA:** Cantidad de la enzima aspartato aminotransferasa presente en el líquido efluente, expresada en U/l.
4. **CONCENTRACIÓN DE ALANÍN AMINOTRANSFERASA:** Cantidad de la enzima alanin aminotrasferasa presente en el líquido efluente, expresada en U/l.



**TIPO DE ESTUDIO**

Estudio de tipo experimental.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **UNIVERSO DE TRABAJO:**

Se utilizaron 10 conejos Nueva Zelanda Blancos de ambos sexos cuyo peso fue de  $3.37 \pm 0.29$  Kg, tratados de acuerdo a los lineamientos que establece el Reglamento de la Ley General de Salud de los Estados Unidos Mexicanos, en materia de Investigación para la Salud, Secretaría de Salud, 1987, título séptimo, capítulo único, artículos 121 al 126 (76), y por el reglamento para el trato de los Animales Utilizados en Investigación y Enseñanza de la Medicina Veterinaria y Zootecnia, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México en sus artículos 1 al 7 (75).

No se incluyeron conejos con:

1. Patología presente en el momento de la selección.
2. Hembras en periodo de gestación.

Se excluyeron dos conejos por:

1. Problemas técnicos en el desarrollo de la cirugía
2. Paro cardiorrespiratorio trans-anestésico antes de efectuar el aislamiento del pulmón.

## **MÉTODO:**

El procedimiento quirúrgico se realizó en el Laboratorio de Cirugía Experimental del Centro de Investigación Biomédica del D.F., y las muestras se procesaron en el Laboratorio Clínico del Hospital de Cardiología del Centro Médico Nacional, Siglo XXI, del Instituto Mexicano del Seguro Social.

### **1. PREPARACIÓN DEL MODELO DE PULMÓN AISLADO ( 67 )**

1.1. Se tomó una muestra basal y se colocó venoclisis en la vena marginal de la oreja del conejo, para mantener una vía permeable con solución mixta.

1.2. Administración de 20 mg/Kg de peso de pentobarbital sódico e hidrocioruro de xylazina 25 mg/kg, por vía intravenosa.

1.3. Tricotomía de la pared anterior del tórax, asepsia con solución salina y jabón quirúrgico y antisepsia con merthiolate de la cara anterior del cuello y el tórax.

1.4. Traqueostomía y ventilación con aire ambiente (FIO<sub>2</sub> de 21%), asistida con bomba de ventilación Palmer (GF Palmer LTD Effm Road London) a frecuencia de 55 por minuto ( 67 ).

1.5. Toracotomía anterior y estemotomía longitudinal.

1.6. Administración intravenosa de heparina a dosis de 100 UI / Kg de peso, dosis única.

1.7. Pleurotomía, exposición de los dos pulmones, los bronquios y los vasos pulmonares.

1.8. Pinzamiento, sección y canulado de las ramas derecha e izquierda de la arteria pulmonar.

1.9. Sección y canulado individual de venas pulmonares.

1.10. Sección y canulado individual de los bronquios principales derecho e izquierdo.

1.11. Infusión de solución Krebs-Henseleit a través de la cánula de arteria pulmonar a presión de 52 cm de H<sub>2</sub>O (40 mm Hg) ( 68 ).

1.12. Ventilación del pulmón aislado a través del bronquio principal con F<sub>i</sub> O<sub>2</sub> de 21%.

1.13. Recolección del efluente de las venas pulmonares en vaso de precipitado.

1.14. Colocación del modelo en un vaso de precipitado de 1,000 cc conteniendo solución Krebs-Henseleit a 37 C°.

### **2. ESTABILIZACIÓN, ISQUEMIA Y ALEATORIZACIÓN.**

2.1. Los pulmones aislados se mantuvieron en solución a 37 C°, ventilados y se perfundieron por un período de 10 minutos antes de iniciar el experimento (período de estabilización). Se tomaron muestras durante este período ( 67 ).

2.2. Se sometió a 30 minutos de isquemia, cerrando la infusión de solución a través de arteria pulmonar y suspendiendo la ventilación.

2.3. En forma aleatoria los pulmones se separaron en grupo I (experimental) y grupo II (control).

### 3. REPERFUSIÓN.

- 3.1. Se reinició la ventilación y la perfusión (fase de reperfusión) por 60 minutos.
- 3.2. El grupo I se reperfundió con solución Krebs-Henseleit más solución hipertónica-hiperoncótica para lograr una concentración de 150 mEq/l de sodio a 400 mOsm/l, el grupo II solo se reperfundió con solución Krebs-Henseleit (Na 130 mEq/l a 280 mOsm/l).

### 4. TOMA DE MUESTRAS PARA LAS DETERMINACIONES Y SU CONSERVACIÓN.

- 4.1. Se realizaron determinaciones sanguíneas basales, previo a la canalización con solución mixta.
- 4.2. Se tomaron alícuotas de 3 cc del líquido efluente para las determinaciones enzimáticas en los periodos de estabilización, y durante la reperfusión a los 0, 5, 15, 30, 45 y 60 minutos.
- 4.3. Las muestras para determinación de las enzimas se conservaron a -20° C hasta la realización de las determinaciones.

### 5. DETERMINACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE LACTATO DESHIDROGENASA.

- 5.1. Las determinaciones se realizaron en un equipo automatizado 550 Express (Ciba Corning), con una prueba colorimétrica enzimática medible a 340 nm y a 30° C.
- 5.2. El fundamento de la prueba está basado en el hecho de que la lactato deshidrogenasa cataliza la oxidación reversible de lactato a piruvato; empleando piruvato y NADH para formar lactato.
- 5.3. El reactivo contiene DL-lactato 90 mM, NAD 7 mM y regulador de pH a 9.0 más 0.2.

### 6. DETERMINACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE ASPARTATO AMINOTRANSFERASA.

- 6.1. Las determinaciones se realizaron en un equipo automatizado 550 Express (Ciba Corning), con un método para determinaciones enzimáticas cuantitativas colorimétricas de la enzima aspartato aminotransferasa.
- 6.2. El fundamento de la prueba está basado en la catálisis de un grupo amino del aspartato al oxalglutarato (OGT) con la formación de glutamato y oxalacetato (OAA), este último compuesto reducido a malato en una reacción catalizada por la malato deshidrogenasa. En esta misma reacción una cantidad equivalente de NADH es oxidada a NAD, la velocidad de la disminución del NADH mide fotométricamente la actividad de la aspartato aminotransferasa a 320 nm.
- 6.3. El reactivo contiene alfa-cetoglutarato 12 mM, LDH 800 U/l, MDH 600 U/l, NSDH 0.20 mM, buffer con pH de 7.8 ± 0.1.

## 7. DETERMINACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE ALANÍN AMINOTRANSFERASA.

7.1. Las determinaciones se realizaron en un equipo automatizado 550 Express (Ciba Corning), con un método colorimétrico enzimático a 30° C.

7.2. La prueba se fundamenta por la catálisis de transferencia de un grupo amino de la alanina al oxalglutarato (alfa CG), con formación de glutamato y piruvato. Este último compuesto es reducido a lactato por la deshidrogenasa láctica. En la misma reacción una cantidad equivalente de NADH es oxidada a NAD. La velocidad de disminución de NADH se mide fotométricamente a 340 nm, siendo directamente proporcional a la actividad de alanín aminotransferasa en la solución a 30° C.

### **ANÁLISIS ESTADÍSTICO:**

Los resultados de cada grupo se presentan como promedio  $\pm$  ES (Error Estándar). Para la comparación entre grupos se utilizó la U de Mann Whitney y se consideró diferencia estadísticamente significativa cuando se obtuvo  $p < 0.05$ .

## **RESULTADOS**

### **1. NIVELES DE ASPARTATO AMINOTRANFERASA.**

El grupo experimental presentó un promedio de  $2.62 \pm 0.35$  U/L, mientras que el grupo control mostró un promedio de  $7.12 \pm 1.83$  U/L, así la diferencia entre los dos grupos fué estadísticamente significativa ( $p = 0.0202$ ). La figura 6 muestra el comportamiento de esta enzima, que durante la etapa inicial del procedimiento existe un incremento para ambos grupos, pero de forma más importante para el grupo control. Posteriormente a los cinco minutos se presenta un descenso importante para el grupo control hasta los treinta minutos de la reperfusión, continuando con incremento a los cuarenta y cinco minutos y los sesenta minutos. Por otro lado, el grupo experimental refleja un incremento discreto a los treinta minutos y a los cuarenta y cinco minutos se observa decremento de la cifra previa, manteniéndose ésta hasta los sesenta minutos de la reperfusión.

### **2. NIVELES DE ALANIN AMINOTRANFERASA.**

El promedio que presentó el grupo experimental fué de  $2.29 \pm 0.41$  U/l, y el grupo control un valor promedio de  $4.00 \pm 0.25$  U/l y al realizarse la comparación entre los grupos se encontró un valor estadísticamente significativo ( $p = 0.037$ ). En la figura 7 se presenta el comportamiento de la ALT que muestra elevación mayor al inicio de la reperfusión para el grupo control. Posteriormente a los cinco minutos se presentó un discreto incremento que se mantiene hasta los cuarenta y cinco minutos, incrementándose en los últimos quince minutos de la reperfusión. El grupo experimental presentó un comportamiento diferente; incrementándose al inicio de la reperfusión, con decremento a los cinco minutos y posterior elevación durante los quince y con un pico importante a los treinta minutos, sobrepasando los niveles del grupo control; sin embargo se observa una disminución a los cuarenta y cinco minutos, que continuó en forma discreta hasta los sesenta minutos.

### **3. NIVELES DE LACTATO DESHIDROGENASA.**

Al realizarse el análisis de ambos grupos, se encontró que para el grupo experimental se determinó un promedio de  $1.54 \pm 0.21$  y para el grupo control un promedio de  $5.62 \pm 2.13$  con un valor de  $p = 0.025$ . Lo anterior es posible observarlo en la figura 8, donde el grupo experimental se comporta en términos generales de forma uniforme y con valores bajos. El grupo control presenta un alza importante al inicio de la reperfusión, y disminuye de manera progresiva hasta los treinta minutos del procedimiento, posteriormente inicia de forma paulatina un incremento leve a los cuarenta y cinco minutos y de forma más importante hasta llegar a los sesenta minutos, tiempo en el que concluye el ensayo.

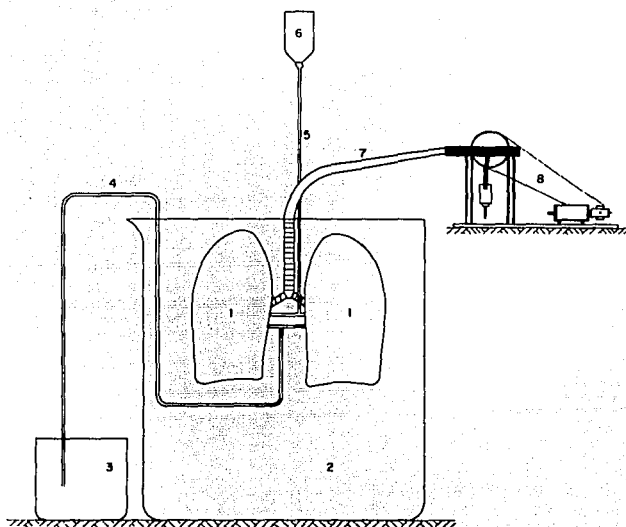


Fig. 1. La fotografía muestra la bomba Palmer utilizada para la ventilación asistida, durante el procedimiento.

## FALLA DE ORIGEN



## MODELO DE PULMON AISLADO



1. PULMON AISLADO
2. RECIPIENTE
3. VASO PARA COLECTAR EFLUENTE
4. CATETER DE VENA PULMONAR
5. CATETER DE ARTERIA PULMONAR
6. SOLUCION DE REPERFUSION
7. CANULA DE VENTILACION
8. VENTILADOR PALMER

Figura 2. Esquema de la preparación del pulmón aislado, detallando cada uno de sus componentes.



Fig. 3. Se observa el pulmón aislado, catéteres de solución de reperfusión y efluente respectivamente, cánula de ventilación.

FALLA DE ORIGEN



Fig. 4. Se observa la preparación del modelo aislado y el procedimiento de la toma del efluente através del catéter.

FALLA DE ORIGEN

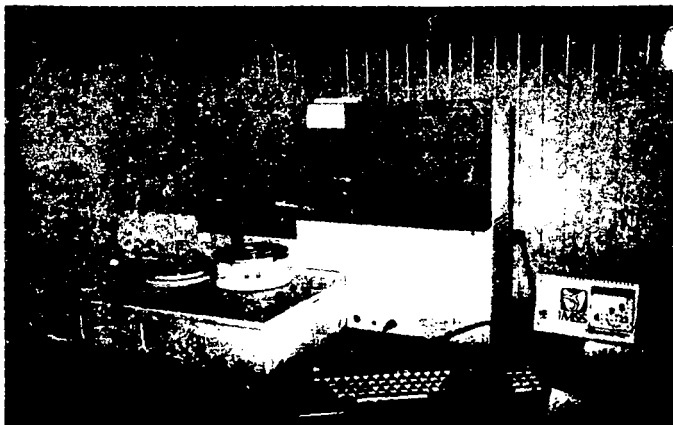
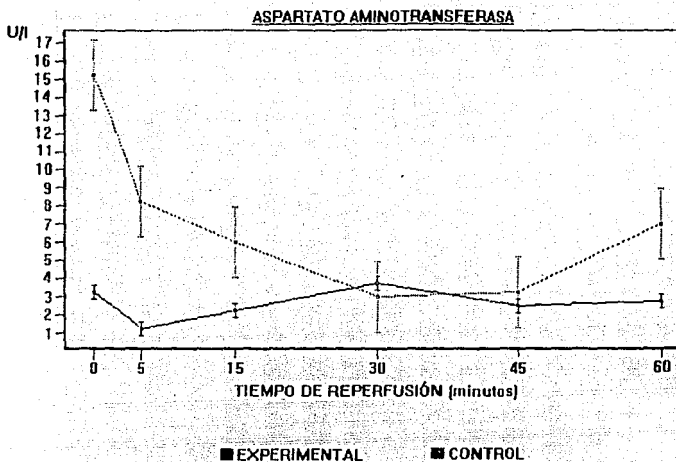


Fig. 5. Esta fotografía muestra el equipo Express 500 ( Ciba Corning ), utilizado para la determinación enzimática en el líquido effluente.

FALLA DE ORIGEN



**Figura 6.** La gráfica presenta el comportamiento de la enzima aspartato amino transferasa en los grupos control y experimental, durante el periodo de reperusión, mostrando en términos generales niveles inferiores en el grupo experimental.

FALLA DE ORIGEN

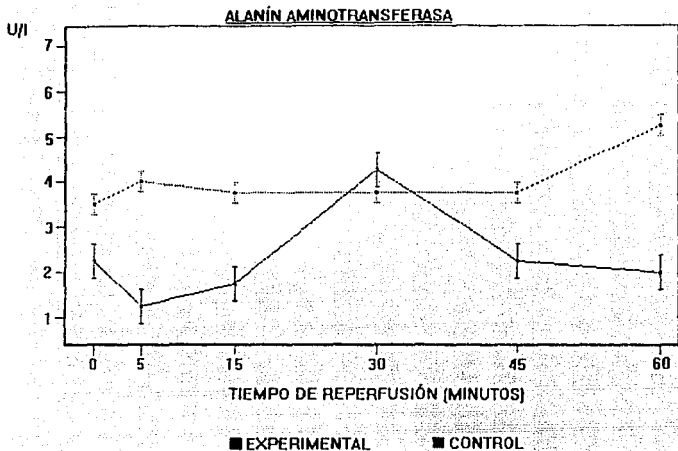
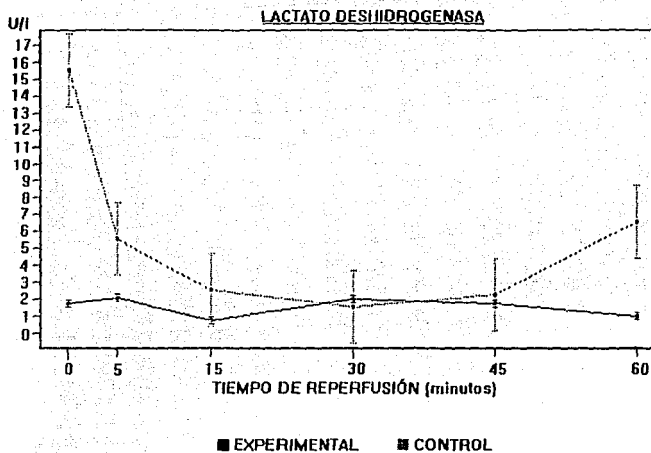


Figura 7. La gráfica presenta el comportamiento de la enzima alanín amino transferasa en los grupos control y experimental en la fase de reperusión. El grupo control presenta concentraciones mayores de la enzima en relación con el grupo experimental, a pesar de la elevación que presenta a los 30 minutos.



**Figura 8. La presente gráfica demuestra el comportamiento de niveles más bajos de la enzima lactato deshidrogenasa en el grupo experimental, y en el grupo control con incrementos tanto al inicio como al final del tiempo de reperfusión.**

## DISCUSION:

El presente reporte, en donde se utiliza un modelo experimental aplicando soluciones hipertónicas hiperoncóticas durante el fenómeno de isquemia reperfusión como una opción terapéutica, e inclusive como medida profiláctica, para el manejo alternativo y mostrando además un efecto protector sobre órganos sometidos a reperfusión.

Se sabe que el pulmón es el único órgano, en el cual el oxígeno es facilitado desde la vía aérea y a través de una circulación dual, la pulmonar y la bronquial. La interrupción súbita del flujo de la arteria pulmonar frecuentemente induce disfunción pulmonar ( 88).

Se ha considerado que los daños ocasionados al pulmón por isquemia-reperfusión, son desencadenados por agresión hipóxica que conduce al origen de radicales libres de oxígeno de varias fuentes, incluyendo disociación de la cadena de transporte de electrones intramitocondriales, la reacción xantina oxidada, así como el daño mediado inmunológicamente por el complemento y células T, donde la célula endotelial participa activamente formando interleucinas, citokinas que son los componentes que se involucran en la iniciación y la estimulación de la respuesta inmune e inflamatoria. La causa del daño celular por un mecanismo anticuerpo dependiente, célula citotóxica altera el receptor del sarcolema y/o función del canal iónico ( 78 ).

El edema y el infiltrado pulmonar resultantes, son probablemente debidos a una combinación de factores. Los más importantes son la isquemia, el trauma quirúrgico y la interrupción linfática (4). Además, durante el fenómeno de isquemia-reperfusión, existen dos mecanismos fundamentales: el primero es un desorden metabólico que ocurre durante la isquemia; el segundo es el daño ocurrido durante la fase de reperfusión, como resultado de la acción del oxígeno derivado de radicales libres (87). De esta manera, los radicales libres de oxígeno son capaces de dañar reversiblemente o irreversiblemente ácidos nucleicos, proteínas y aminoácidos libres, lípidos, lipoproteínas, carbohidratos y macromoléculas de tejido conectivo ( 22 ).

Okijama, afirma que todas las actividades de enzimas defensivas decrecen en forma significativa, observando disminución en superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa y glutatión reductasa. Así, el daño por reperfusión es causado no solamente por el incremento de radicales libres de oxígeno, sino también por la destrucción de los sistemas barredores ( 86 ).

Existen en la literatura, reportes donde se observa que el daño por reperfusión en pulmones de conejo, fué caracterizado por vasoconstricción, daño microvascular y formación de edema pulmonar importante presentando también un importante incremento tres veces mayor de la producción pulmonar de anión superóxido ( 52 ).

El uso de las soluciones hipertónicas hiperoncóticas durante el estado de choque, permitió observar que



existe menor daño tisular, incrementando el flujo circulatorio, reducir edema endotelial e intersticial y el daño estructural observado a través de microscopía electrónica y evaluando parámetros de enzimas.

Así, el uso de soluciones hipertónicas hiperoncóticas, en el tejido cardíaco demostró que hay disminución de los niveles de creatin cinasa total y también por consiguiente la isoenzima MB en la evaluación del daño celular cardíaco; además de disminuir la incidencia de arritmias. En modelos experimentales de corazón aislado, con el uso de las soluciones hipertónicas hiperoncóticas han demostrado que las arritmias no se presentan y que los niveles de la enzima creatin cinasa y su isoenzima MB disminuyeron, así como el contenido de agua fué menor, mejorando el flujo coronario y a nivel de microscopía la lesión tisular fué menor ( 67 ).

Es importante mencionar que la isquemia hipóxica favorece una liberación sustancial de enzimas (LDH y GLDH ), además con importante afluencia de calcio y que este último es un factor esencial en la vía que conduce a muerte celular inducida por la isquemia hipóxica ( 80 ). Por otro lado, la exposición a tensiones de oxígeno al 100%, resulta en un decremento significativo de las enzimas antioxidantes endógenas como la SOD, catalasa, glutatión peroxidasa; favoreciendo que la actividad de las enzimas disminuya significativamente después de 45 minutos de isquemia ( 81 ). Con estos antecedentes, nuestro modelo experimental no se sometió a este tipo de variable, evitando de esta manera mayor daño y por consiguiente presentar este deterioro de enzimas endógenas y a su vez que los niveles enzimáticos indicadores de daño disminuyeran, como lo que se observó en este trabajo, con la utilización de las soluciones hipertónicas-hiperoncóticas que protegen al tejido reperfundido con menores concentraciones de enzimas.

Se encontró además, una diferencia estadísticamente significativa en el grupo que fue sometido con soluciones hipertónicas hiperoncóticas y que además mostró niveles inferiores de las enzimas determinadas, lo que se traduciría en un daño menor a nivel celular. Y que durante la reperfusión, se observan las gráficas, que la LDH, AST, y ALT presentan un pico, el cual puede corresponder a lavado que se realiza al iniciar la reperfusión.

También fue posible determinar que en el grupo control, la concentración de estas enzimas se mantuvo por arriba de las encontradas para el grupo experimental.

Cabe mencionar que gran parte de los estudios, en donde se proponen alternativas farmacológico-terapéuticas como protectoras de la lesión por reperfusión, ninguna de ellas ofrece hasta el momento una protección integral. Según los resultados de este estudio, la aplicación de la solución hipertónica hiperoncótica puede ser una buena opción de tratamiento para la protección del tejido pulmonar en el momento de la reperfusión.

Por otro lado, es importante considerar otras variables, que incluirían perfiles de gasometría electrolitos y estudio histológico que permitan evaluar conjuntamente el efecto protector de las soluciones

**hipertónicas-hiperoncóticas, debido a la importancia que representa el fenómeno de reperfusión.**

### **CONCLUSIONES:**

Con los resultados obtenidos en este trabajo, se puede concluir que el uso de las soluciones hipertónicas-hiperoncóticas, durante el proceso de la reperfusión y después de un periodo de isquemia, disminuyen el daño por la reperfusión en el pulmón aislado y favorecen niveles enzimáticos inferiores en los pulmones reperfundidos con este tipo de soluciones.

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

## REFERENCIAS:

1. Gilroy J R, Bhatte M J, Wickersham N E, et al. Postischemic hipoperfusion during unilateral reperfusion In vivo. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147: 276 - 282.
2. Ryrfeldt A, Banneimberg G, Moldéus P: Free radicals and lung disease. *Br Med Bull* 1993; 49: 588-603.
3. Horiguchi T, Harada V: The effect of protease inhibitor on reperfusion injury after unilateral pulmonary ischemia. *Transplantation* 1993; 55: 254-258.
4. Siegelman SS, Sinha SBP, Veith FJ: Pulmonary reimplantation response. *Ann Surg* 1973; 177:30-36.
5. Prop J, Ehrle MG, Crapo JD, et al: Reimplantation response in isografted rat lugs: analysis of causal factors. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1984; 87: 702-711.
6. Engler RL, Dahlgren MD, Peterson MA, et al: Accumulation of polymorphonuclear leucocytes during 3 h experimental myocardial ischemia. *Am J Physiol* 1986; 251: H93-H100.
7. Engler RL, Dahlgren MD, Morris DD, et al. Role of leukocytes in response to acute myocardial ischemia and reflow in dogs. *Am J Physiol* 1986; 251: H314-H322.
8. Marthin SE, Chenoweth DE, Engler RL, et al: C5a implications for granulocyte mechanism. *Circ Res* 1988; 63: 483-491.
9. Barie PS, Hakim TS, Malik AB: Effect of pulmonary artery occlusion and reperfusion on extravascular fluid accumulation. *J Appl Physiol* 1981; 50: 102-106.
10. Korhuis RJ, Smith JK, Carden DL: Hypoxic reperfusion attenuates post ischemic microvascular injury. *Am J Physiol* 1989; 256: H315- H319.
11. Majno G, Ames A III, Chiang J, Lewis TL: No reflow after cerebral ischaemia. *Lancet* 1967; 569-570.
12. Becker PM, Pearce DB, Permut S, Sylvester JT: Separate effects of ischemia and reperfusion on vascular permeability in ventilated ferret lungs. *J Appl Physiol* 1992; 73: 2616-2622.
13. Mc Cord JM: Oxygen derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 1985; 312:159-163.
14. Ayene SI, Al Mehdí BA, Fisher BA: Inhibition of lung tissue oxidation during ischemic/reperfusion by 2-mercaptopyronylglycine. *Arch Bioch Bioph* 1993; 333: 307-312.
15. Shibayama Y, Asaka S, Nishijama A: *Exp Moll Pathol* 1991; 55: 251-260.
16. Koyama IJ, Young JK, Roger SM, et al. *J Appl Physiol* 1987; 63: 111-115.
17. Hinder A.R., Stein JH: Oxygen-derived free radicals. *Arch Surg* 1991; 126: 104-105
18. Roy RS, Mc Cord JM. Superoxide and ischemia:conversion of xantine dehydrogenase to xantine oxidase. In Greenwald R., Cohen G, eds: Oxiradicals and their scavenger system. Vol 2. Cellular and molecular aspects. New York: Elsevier Science 1983: 145-151.
19. Lynch MJ, Grum CM, Gallagher KP, et al: Xantine oxidase inhibition attenuates ischemic reperfusion

- lung injury. *J Surg Res* 1988; 44: 538-544.
20. Cross EC, moderator: Oxygen radicals and human disease. *Ann Int Med* 1987; 107: 526-545.
21. Rice-Evans C. Free radicals, cell damage and disease. Richelieu Press. London, 1986: 312-316.
22. Mc Cord JM, Fridovich I: The reduction of cytochrome c by milk oxidase. *J Biol Chem* 1968; 243: 5753-5760.
23. Seibert FA, Haynes J, Taylor A: Ischemia-reperfusion injury in the isolated rat lung: role of flow and endogenous leukocytes. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147: 270-275.
24. Palace PG, Del Vecchio JP, Horgan JM, Malik BA: Release of tumor necrosis factor after pulmonary artery occlusion and reperfusion. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147: 143-147.
25. Su M, Chi YE, Bishop JM, Henderson RW: Lung mast cells increase in number and degranulate during pulmonary artery occlusion/reperfusion injury in dogs. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147: 448-456.
26. Opie LH, Phil D: Reperfusion injury and its pharmacologic modification. *Circulation* 1989; 80: 1049-1062.
27. Winrow VR, Winyard PG, Morris CJ, Blake DR: Free radicals in inflammation: second messengers and mediators of tissue destruction. *Br Med Bull* 1993; 49: 506-552.
28. Seekamp A, Mulligan MS, Till GO, Ward AP: Requirements for neutrophil products and L-arginine in ischemia-reperfusion injury. *Am J Pathol* 1993; 142: 1217-1226.
29. D. Guiseppi J, Fridovich I: The toxicology of molecular oxygen. *CRC Crit Rev Toxicol* 1984; 12: 315-42.
30. Halliwell B, Gutteridge JMC. The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases. *Molec Aspects Med* 1985; 8: 89-193.
31. Yamashita Ch, Hidefumi O, Fukumasa T, et al: Effect of prostaglandin I<sub>2</sub> and superoxide dismutase on reperfusion injury of warm ischemic lung. *Ann Thorac Surg* 1992; 54: 921-924.
32. Hözman KA, Zimeman V: Resuscitation of monkey brain after one hour of complete ischemia. *Brain Res* 1974; 81: 59-65.
33. Murata T, Nakazawa H, et al: reperfusion after a two hours period of pulmonary artery occlusion causes pulmonary necrosis. *Am Rev Respir Dis* 1992; 146: 1048-1053.
34. Granger DN: Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol* 1988; 255: H1269-H1275.
35. Granger DN, Benoit J, Suzuki M: Leukocyte adherence to venular endothelium during ischemia-reperfusion. *Am J Physiol* 1989; 257: G 683-G688.
36. Summers TS, Zinner JM, Freischlag AJ: Production of endothelium-derived relaxing factor (EDRF) is compromised after ischemia and reperfusion. *Am J Surg* 1993; 166: 216-220.

37. Beyersdorf F, Matheis G, Kruger S, et al: Avoiding reperfusion injury after limb revascularization: experimental observations and recommendations for clinical application. *J Vasc Surg* 1989; 9: 757-66.
38. Akashi A, Nakahara K, Kamiike W, et al: Attenuation of warm ischemic injury of rat lung by inflation with room air-assessment of cellular components and the surfactant in the bronchoalveolar lavage fluid in relation to changes in cellular adenosine triphosphate. *Transplantation* 1993; 55: 24-30.
39. Kamiike W, Watanabe F, Hashimoto T, et al: Changes in cellular levels of ATP and its catabolites in ischemic rat liver. *J Biochem* 1982; 91: 1349-1356.
40. Waranabe F, Hashimoto T, Tagawa K: Energy- Independent protection of the oxidative phosphorylation capacity of mitochondria against anoxic damage by ATP and its non-metabolizable analogs. *J Biochem* 1985; 97:1229-1234.
41. Parks DA, Bulkley GB, Granger DN: Role of oxygen free radicals in shock ischemic, and organ preservation. *Surgery* 1983; 94:428-432.
42. Grum CM: Pulmonary ischemic syndromes. In Zelenock GB ed. Mechanism and consequences of tissue injury. St Louis: Mosby 1989:549-552.
43. Holley AE, Cheeseman KH: Measuring free radical reactions in vivo: *Br Med Bull* 1993; 49: 494-505.
44. Modry DL, Chiu RC: Pulmonary reperfusion syndrome. *Ann Thorac Surg* 1979; 27: 206-215.
45. Jin H, Chen Y, Yang R, et al: Vasopressin lowers pulmonary artery pressure in hypoxic rats by releasing atrial natriuretic peptide. *Am J Med Sci* 1989, 298: 227-236.
46. Koseki M, Nishida T, Kami KW, et al: Mechanism of leakage of cytosolic enzymes from anoxic rat liver cells: disruption of blebs by blood flow. *Biochem Res* 1988; 9:47-53.
47. Takami H, Matsuda H, Kuki S, et al: Leakage of cytoplasmic enzymes from rat heart by stress of cardiac beating after increased in cell membrane fragility by anoxia. *Pflügers Arch* 1990; 416: 144-150.
48. Zamora AC, Baron AD, Heffner EJ: Thromboxane contributes to pulmonary hypertension in ischemia-reperfusion lung injury. *J Appl Physiol* 1993; 74: 224-229.
49. Acharaya J, Punched NA, Taylor JA, et al: Red cell lipid peroxidation and antioxidant enzymes in iron deficiency. *Eur J Haematol* 1991; 47: 287-291.
50. Fisher AB, Dodia Z, Tan I, et al. Oxygen-dependent lipid peroxidation during lung ischemia. *J Clin Invest*. 1991; 88: 674-679.
51. Russ DR, Walker RB: Maintained endothelium-dependent pulmonary vasodilatation following chronic hypoxia in the rat. *J Appl Physiol* 1993; 74: 339-344.
52. Kennedy TP, Rao NV, Hopkins C, et al: Role of reactive Oxygen species in reperfusion injury of the rabbit lung. *J V Clin Invest* 1989; 83: 1326-1335.
53. Parks DA, Bulkley GB, Granger DN, Mc Cord JM: Ischemic injury in the cat small intestine: role of superoxide radicals. *Gastroenterology* 1982; 82: 9-15.

54. Allison RC, Kyle J, Adkins WK, et al: Effect of ischemia reperfusion or hypoxia reoxygenation on lung vascular permeability and resistance. *J Appl Physiol* 1990; 69: 597-603.
55. Freeman BA, Torrens JF, Mirza Z, Crapo JD, Young SL: Modulation of oxidant lung injury by using liposome-entrapped superoxide dismutase and catalase. *Fed Proc.* 1985; 44: 2591-2595.
56. Obermiller T, Lakshminarayan S, Willoughby S, Mendehall J, Bytler J: Influence of lung volume and left atrial pressure on reverse pulmonary venous blood flow. *J Appl Physiol* 1991; 70: 447-453.
57. Maningas PA: Resuscitation with hypertonic saline/dextran during hemorrhagic shock in swine: effects on organ blood flow. *Crit Care Med* 1987; 15: 427-432.
58. Boldt J, Zlickmann B, Ballesteros M, et al: Cardiorespiratory responses to hypertonic saline solution in cardiac operations. *Ann Thorac Surg* 1991; 51: 610-615.
59. Penfield WG. The treatment of severe and progressive haemorrhage by intravenous injections. *Am J Physiol* 1919; 48: 121-128.
60. Armistead CW, Vincent JL, Preiser JC, et al. Hypertonic saline solution-hetarstarch for fluid resuscitation in experimental septic shock. *Anest Analg* 1989; 69: 714-720.
61. Maningas PA, Bellamy RF: Hypertonic sodium chloride solution for the prehospital management of traumatic shock: a possible improvement in the standard of care?. *Ann Emerg Med* 1986; 15: 1411-1414.
62. Shack Ford SR, Sise MJ, Friedlund PH, et al. Hypertonic sodium lactate versus lactated solution for intravenous fluid therapy in operations on the abdominal aorta. *Surgery* 1983; 1: 41-51.
63. Mazzoni CM, Borgström P, Intaglietta M, Arfors KE: Capillary in hemorrhagic shock is recited by hyperosmotic saline-dextran reinfusion. *Circulatory Shock* 1990; 31: 407-418.
64. Maningas PA, De Guzman LR, Tillman FJ, et al: Small-volume infusion of 7.5% NaCl in 6% dextran 70 for the treatment of severe hemorrhagic shock in swine. *Ann Emerg Med* 1986; 15: 1131-1137.
65. Smith GJ, Kramer GC, Perron P, et al. A comparison of several hypertonic solutions for resuscitation of bled sheep. *J Surg Res* 1985; 39: 517-528.
66. Mazzoni MC, Borgström P, Arfors KE, Intaglietta M: Dynamic Fluid redistribution in hyperosmotic resuscitation of hypovolemic hemorrhage. *Am J Physiol* 1988; 255: H629-H637.
67. Careaga RG: Valoración del efecto de una solución hipertónica-hiperoncótica en la respuesta a la reperfusión, después de isquemia global en corazón aislado de conejo adulto. Tesis de Maestría en Ciencias Médicas (IMSS/UNAM) 1994: 17-43.
68. Ganong FW: Fisiología Médica, Edit Manual Moderno 10a ed, 1986, México D.F: 472-482.
69. García FJ: Taller de introducción a la metodología de investigación médica interdisciplinaria. Ediciones de buena tinta, México D.F: 1991, pag 81.
70. Beauchamp Ch Fridovich I: Superoxide dismutase: improved assay and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical biochemistry.* 1971; 44: 276-287.

71. Sosa MJ. Método Científico. SITESA 1991, 1a ed, México D.F.
72. Rosenstein S E: Diccionario de especialidades en análisis clínico PLM 1993, 7a ed, México D.F.
73. Lynch J M: Métodos de Laboratorio. Interamericana 1977, 2a ed. México D.F.
74. Bauea D J. Clinical Laboratory Methods. Mosby 1982, Ninth edition, St Louis MO.
75. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia: Reglamento de la MVZ. Animales de laboratorio. UNAM 1978.
76. Vega FL. Pensamiento y acción en la investigación biomédica. La Prensa Médica Mexicana 1991, México D.F.
77. Méndez RI, et al: El protocolo de investigación. Lineamientos para su elaboración y análisis. Trillas 1986, 1a ed. México D.F.
78. Barry WH: Mechanisms of Immune-Mediated Myocyte Injury. *Circulation* 1994; 89: 2421-2431.
79. Nielsen VG, Weinbroum A, Tan S, Samuelson PN. Xanthine oxidoreductase realease after descending thoracic aorta occlusion and reperfusion in rabbits. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1994; 107: 1222-1227.
30. Kusterer K, Blochle C, Konrad T, Palitzsch KD, Usadel KH. Rat liver injury induced by hipoxic ischemia and reperfusion: protective action by somatostatin and two derivates. *Regul Pept.* 1993; 44: 251-256.
81. Sela S, Shasha SM, Mashiach E, Haj M, kristal B, Shkolnik T. Effect of oxigen tension on activity of antioxidant enzymes and on renal function of the posts ischemic reperused rat kidney. *Nephron* 1993; 63:199-206:
82. Pedrini L, Pisano E, CatzoneL, Masetti L, Mutini. Local haemofiltration with free radical scavenger treatment during revascularisation of severe muscular ischaemia induced in sheep limbs. *Eur J Vasc Surg.* 1992; 6: 47-52.
83. Phan SH, Gannon DE, Ward PA, Karmiol S. Mechanism of neutrophil induced xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase conversion in endothelial cells: evidence of a role for elastase. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1992; 6: 270-278.
84. Tanaka J, Malchesky PS, Omokawa S, Goldcamp JB. Effects of prostaglandin I2, superoxide dismutase, and catalase on ischemia-reperfusion injury in liver tranplantation. *ASAIO-Trans.* 1990; 36: M600- 603.
85. Kehrler G, Blech M, Kallerhoff M. Urinary LDH release for evaluation of posts ischemic renal function. *Klin-Wochenschr.* 1989; 9: 477-485.
86. Okajima S. Mechanisms of reperfusion injury of rat kidney. *Hokkaido Igaku Zasshi* 1990; 65: 277-284