



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE MÉDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**PREVENCIÓN DEL DAÑO POR REPERFUSIÓN
INTESTINAL INDUCIDO EN EL PERRO,
MEDIANTE LA APLICACIÓN INTRAVENOSA DE
LA MEZCLA DE ÁCIDOS GRASOS VSP-1**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**P R E S E N T A:
FRANCISCO GABRIEL VARELA MICHEL**



MÉXICO, D.F.

ASESORES:
MVZ DAVID PÁEZ ESQUILIANO
MVZ LUIS NÚÑEZ OCHOA
MVZ LUIS OCAMPO CAMBEROS
MVZ RENÉ ROSILES MARTINEZ
MVZ CIRIACO TISTA OLMOS

2002.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

JURADO

**MVZ JESÚS PAREDES PÉREZ
PRESIDENTE**

**MVZ MIGUEL ÁNGEL MARTÍNEZ CASTILLO
VOCAL**

**MVZ ENEDINA SILVA CABRERA
SECRETARIA**

**GERARDO QUIROZ ROCHA
SUPLENTE**

**DAVID PÁEZ ESQUILIANO
SUPLENTE**

DEDICATORIAS

A ti Dios, poder supremo, por enseñarme a amar la vida y a confiar en tu voluntad.

A los amores de mi vida, mi padre, Don Carlos Varela Pérez, por quien todo lo soy -descansa en paz papá-, y mi mamita, Doña Francisca Michel Esparza, por todo tu sacrificio.

A mis hermanos: Laura, Silvia, Martha, Lourdes, Oscarín, Manuel, Gerardo, Arturo y Carlos, por hacer esta vida tan alegre.

AGRADECIMIENTOS

.....

A todos los profesores profesionales y honestos que tuve la fortuna de conocer en mi carrera, en especial a: Alfredo Cortés, Andrés Ducoing, Ernesto Guzmán, Fernando Morales, Gilberto Chávez, Javier Valencia, Jan Bouda, Jesús Cobo, José Juan Martínez, José Ramírez, Luis Nolasco, Socorro Lara, Luis De Juan, Santiago Aja, María Elena Trujillo, Jorge Reyes y Adolfo Yabuta, porque nunca es tarde para apreciar el trabajo de un maestro.

A mis cuates compañeros de carrera: Ana Cataño, Adelita Vargas, Ingrid Aguilar, Laura Martínez, Pancho Espinoza, César López, Omar Prado, Roberto Rocha, Erick Canales, Manuel Crisóstomo, Salvador Padilla, Raúl Laurrabaquio, Agustín Hernández, Guillermo Benítez, Iván Juárez, Jorge Ziga, Humberto Miguel, Víctor Alavés, Alberto Mayorga, René Salazar, Guillermo Santoyo y todos los que seguramente faltan (perdón por mi distracción, sobre todo mis amigos).

Otros cuates de la FMVZ: Salomé Cabrera, Elsa Pacheco, Lulú Escobar, Rita Aguilera, Dalila, Lilia Gutiérrez, Gilberto, Daniel Ortega, Emma Bermúdez, Carlos Lorenzana, Daniel Arellano, Angélica Camacho, Ignacio Lizárraga.

A mis mejores cuates de la FMVZ: Norma Maldonado, Lissette Pérez, Arturo Ramírez y Armando Romero.

A mis cuates exalumnos: Mercedes Barrios, Didina Buzoianu, Teresa Fadanelli, Érika Flores, Déborah de la Peña, José Ruíz, Fernanda Castillo, Daniel Guevara.

A mis cuates de la cuadra: Wacho, Paco, Emir, Jorge, Toño, Héctor, Eduardo y Alejandro.

Al personal del Departamento de Fisiología y Farmacología por aceptarme entre sus filas. Por supuesto al Dr. David Páez Esquiliano por su gran apoyo y enseñanzas.

Especialmente por su ayuda en la tesis, aparte de ser gran amiga: Irene Buenrostro, así como a Leobardo Arce y Angélica Martínez. También a los más de 20 alumnos que contribuyeron enormemente.

También a quienes ayudaron y aportaron todo lo necesario: la Fundación H.P.G.

A mis asesores y miembros del jurado, por sus enseñanzas, en particular a los señores Luis Núñez Ochoa y René Rosiles Martínez.

Y por su contribución involuntaria y en homenaje a los animalitos que utilicé en el experimento: Prima Donna, Abracitos, Micaela, Güera, Garras, Chicles, Manchas, Galleta, Bizcocha, Chómpiras, Lobita, Charrascas, Tristán y Cremosa.

.....

A mis mejores cuates de la vida: Gisela Martínez, Jéssica Aldana, Carla Arce, Gustavo Gayosso, Pablo Thomé, Zahir Acosta, Otoniel Rodríguez, Héctor González, Roberto Isidro.

Y a todos los que por descuido no incluí, pero que saben de mi estima.

A mi amorcito Aída Castro Serrano, por permitirme participar en tu vida y hacer tan feliz la mía.

.....

A tantos alumnos que han llenado una parte importante de mi espíritu, por que juntos enaltezcamos esta hermosa y noble profesión.

FVM.  17 de julio de 2002.

CONTENIDO

	PÁGINA
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
ANTECEDENTES.....	2
JUSTIFICACIÓN.....	19
HIPÓTESIS.....	19
OBJETIVO	19
MATERIAL Y MÉTODOS.....	20
RESULTADOS.....	24
DISCUSIÓN.....	29
CONCLUSIÓN.....	31
LITERATURA CITADA.....	32
APÉNDICES.....	36

Resumen

VARELA MICHEL FRANCISCO GABRIEL. Prevención del daño por reperusión intestinal inducido en el perro, mediante la mezcla de ácidos grasos vsp-1 (bajo la dirección de: David Páez Esquiliano, Luis Núñez Ochoa, Luis Ocampo Camberos, René Rosiles Martínez y Ciriaco Tista Olmos).

Los procesos isquémicos intestinales, son una causa común de morbilidad y mortalidad en animales de compañía, lo que ha guiado a la investigación para el posible establecimiento de una terapia previa a la reperusión de los tejidos, para disminuir la severidad de los daños potenciales. En este estudio se administró la mezcla de ácidos grasos "VSP-1" vía intravenosa a siete perros durante una isquemia intestinal previa a una reperusión (ambos procesos inducidos), para atenuar el índice de lipo-peroxidación y el daño histológico en la mucosa intestinal, comparados con un grupo testigo. Los resultados no mostraron diferencias entre los grupos en la calificación del daño histológico; sin embargo, sí hubo diferencias significativas en el índice de lipoperoxidación, lo que sugiere la posible utilidad de la aplicación parenteral de ácidos grasos para atenuar el daño por reperusión intestinal.

Introducción

1.1- Antecedentes

Los procesos isquémicos intestinales, son una causa común de morbilidad y mortalidad en animales de compañía (1). La isquemia prolongada propicia un daño irreversible a los tejidos, como resultado de una escasa disponibilidad de ATP, acidosis intracelular, ineficiencia de las bombas iónicas, ingreso de calcio y destrucción proteolítica de la "maquinaria metabólica" y el citoesqueleto; para mantener la función y viabilidad celulares se requiere de la restauración del flujo sanguíneo después de un período de isquemia intestinal, (2,3). Un proceso isquémico puede ocurrir en cualquier parte del tracto gastrointestinal, aunque el órgano afectado con mayor frecuencia es el intestino delgado, debido a su susceptibilidad para presentar procesos obstructivos que comprometen la circulación, tales como intususcepciones, vólvulos, torsiones, y hernias (4,5). Diversos estudios revelan que el mayor daño a los tejidos transitoriamente isquémicos (en ensayos que evitaban un daño excesivo por la isquemia) ocurre después de que el proceso se soluciona y los tejidos son reperfundidos, y no a consecuencia de la isquemia per se (6,7); esto ha guiado a una investigación intensiva para definir la patogénesis del llamado "daño por reperfusión", y el posible establecimiento de una terapia previa a la reperfusión de los tejidos, para disminuir la severidad del deterioro potencial (1).

Procesos de isquemia-reperfusión

Es necesario mantener el flujo sanguíneo y una buena perfusión tisular, para que el suministro de oxígeno y de nutrientes sea el adecuado para mantener las rutas metabólicas y eliminar productos de desecho. La isquemia resulta de un decremento del flujo sanguíneo, debido a dos causas principales: la constricción funcional o la obstrucción mecánica de la vasculatura. Fundamentalmente, la severidad del daño en un tejido isquémico, se determina por la magnitud y duración de la reducción

del flujo sanguíneo. El oxígeno es esencial en la función celular normal, por tomar parte en la producción de energía. En la mitocondria se consume la mayor parte del oxígeno, reduciéndolo hasta agua por la cadena respiratoria; este proceso, lleva implícita la síntesis de ATP, la fuente principal de energía en el organismo. La privación de oxígeno lleva a una falla en la fosforilación oxidativa y a la reducción del ATP disponible, por lo que si se reduce el aporte de oxígeno en el intestino, se produce daño rápidamente y muerte de las células epiteliales de la mucosa, que son altamente dependientes de la energía.

Otros fenómenos que pueden ocurrir a nivel celular en un estado de isquemia son: glucólisis anaerobia, acumulación de ácido láctico y acidosis intracelular, inhibición de la producción de ATP, inhabilitación de las bombas dependientes de energía transportadoras de iones y acumulación de iones de calcio, cuyas altas concentraciones intracelulares activan a la fosfolipasa A_2 asociada a la célula y ocasionan una consecuente degradación de los fosfolípidos de la membrana hasta ácidos grasos libres. El desbalance de iones, ocasiona degeneración hídrica y se presenta una pérdida de enzimas y otros elementos celulares. Hay acumulación de iones de hidrógeno y disminución del pH, se alteran las funciones y estructuras enzimáticas, y finalmente hay liberación de enzimas lisosomales que inician la autólisis celular. Con estos cambios, el daño celular se vuelve irreversible, ocasionando necrosis (2).

Un fenómeno clave en el "daño por reperfusión" es la agresión masiva de los radicales libres derivados del oxígeno (RLDO), debida al déficit energético, las desviaciones metabólicas (por la carencia de oxígeno) y la infiltración leucocitaria (1,2,3,8).

Radicales libres en medicina:

A finales del siglo XIX se comenzaron a entender los mecanismos destructivos del oxígeno, por ejemplo en el enranciamiento de los alimentos. El Dr. Denham Harman de la Universidad de Nebraska, es reconocido como el padre de la "medicina de los radicales libres", en los 50's publicó un texto que implicaba a los radicales libres como causa importante de envejecimiento y enfermedad (9). Asimismo, se reconoce a los radicales libres como contibuyentes a la causa de más de 60 enfermedades, he aquí algunos ejemplos:

Daño por reperfusión (diversos tejidos), alergias, angina de pecho, artritis reumatoide, asma, aterosclerosis, cáncer, cataratas, cirrosis hepática, diabetes, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, fatiga crónica, cardiopatías, hemorroides, hipertensión, ceguera nocturna, flebitis, retinopatías, síndrome ascítico aviar, etc. (10).

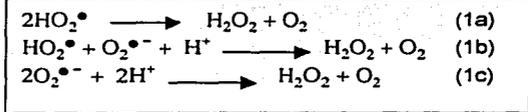
Definición de radical libre:

Un radical libre, es una especie química neutra o cargada, con un electrón no apareado (célibe) con otro en su capa más externa; por lo tanto, el número total de electrones de un radical libre es impar. Los electrones son partículas cargadas eléctricamente que inducen un campo magnético (carga) por rotación sobre su propio eje. Dentro de las moléculas, los electrones habitualmente se reúnen en pares, mientras que el electrón célibe de un radical libre le confiere una cierta inestabilidad, tanto en el plano energético, tendiendo a obtener electrones célibes, como en el cinético, haciendo que las reacciones entre los radicales sean muy rápidas (8).

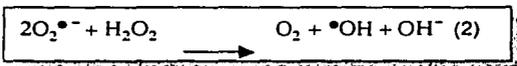
Producción de los radicales libres derivados del oxígeno (RLDO)

Los RLDO tienen su origen en el oxígeno molecular que es en sí un radical (con dos electrones célibes), sin embargo, en comparación con este último, los RLDO son moléculas muy reactivas; son generados por la reducción en secuencia de oxígeno molecular hasta agua, durante la fosforilación oxidativa (Figura 1). El anión superóxido ($O_2^{\bullet -}$) es la forma disociada del radical hidropéroxilo (HO_2^{\bullet}), ambos son el producto de la reducción monovalente del oxígeno molecular (mediante el aporte de energía) y su presencia es extremadamente común en el organismo todo el tiempo, ya que cerca del 2% del total del oxígeno consumido en las mitocondrias resulta en superóxido. Este radical no es muy reactivo, pero favorece la generación de otras especies que sí lo son (sobre todo el hidroxilo); en presencia de iones H^+ , el anión superóxido sufre súbitamente reacciones de dismutación, que implica un proceso de óxido-reducción entre moléculas de la misma naturaleza (reacciones 1a, 1b y 1c) que puede ser espontáneo o por la acción de la enzima

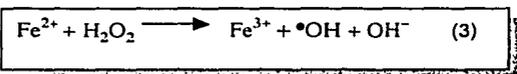
superóxido dismutasa (SOD), cuyo resultado es la formación de oxígeno molecular (O_2) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (8,11,12).



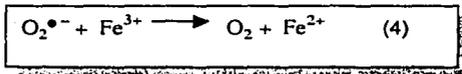
En 1933 se propuso la reacción de Haber-Weiss (Fritz Haber y Joseph Weiss), el radical hidroxilo ($\bullet OH$) se produce cuando el superóxido y el peróxido de hidrógeno reaccionan (reacción 2) (12).



Se ha demostrado que esta reacción es muy lenta para ser de importancia en biología, por lo que en 1940 (Baxendale) se propuso la influencia de la reacción de Fenton conocida desde 1900 aproximadamente, en donde el hierro cataliza la reacción de Haber-Weiss (reacción 3). El hierro ferroso (Fe^{2+}) es el donador de electrones en vez del superóxido y es oxidado a la forma férrica (Fe^{3+}), el peróxido de hidrógeno proviene del superóxido metabólico (12).



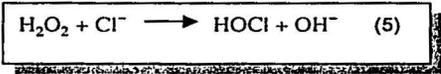
El superóxido puede reaccionar con el hierro férrico y lo reduce a ferroso, de manera que se establece un "ciclo" que hace que pocas cantidades de hierro catalicen la formación de grandes cantidades de radical hidroxilo (reacción 4) (12):



El cobre en sus formas cuprosa (Cu^+) y cúprica (Cu^{2+}) puede funcionar de manera similar (12,13). El H_2O_2 y el $\bullet\text{OH}$ son radicales libres altamente reactivos y pueden alterar las membranas celulares (1-3,8,11-13).

RLDO provenientes de la acción de la xantina oxidasa (XO). La XO se distribuye ampliamente en los tejidos sanos del cuerpo, donde existe en su mayoría (aproximadamente en un 80%) como xantina deshidrogenasa (XD). Durante una hipoxia el trifosfato de adenosina (ATP) es degradado a hipoxantina, que normalmente es oxidada a xantina por la XD usando dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD). Al inicio de la isquemia baja la concentración extracelular de calcio y se eleva la intracelular debido a la deficiencia energética, lo que aumenta la actividad de proteasas que estimulan la transformación de XD a XO, llegando esta última acumularse excesivamente. La XO utiliza oxígeno en vez de NAD y en estado de hipoxia es incapaz de catalizar la conversión de hipoxantina a xantina, esto provee una gran cantidad de sustrato para la producción de anión superóxido en una eventual reoxigenación, porque en este proceso se lleva a cabo un rápido metabolismo de la XO sobre la hipoxantina hasta uratos, produciendo una gran cantidad de dicho radical (Figura 1) (2,12,14). Esto ocurre dentro de 10 a 30 segundos después del inicio de la reperusión y da paso a la serie de reacciones ya descritas que producen otros radicales. El principal sitio de producción de radicales libres es el endotelio vascular (14).

RLDO provenientes de la fagocitosis. Los neutrófilos se acumulan rápidamente en los tejidos, durante un proceso de isquemia y reperusión. Después de la fagocitosis de detritos celulares, los neutrófilos aceleran en su consumo de oxígeno ("estallido respiratorio") con activación de una enzima de membrana (la NADPH-oxidasa) que cataliza la reducción de este oxígeno en anión superóxido (Figura 1) y la producción de peróxido de hidrógeno por una dismutación del último; el anión superóxido y el H_2O_2 participan en la producción de radical hidroxilo. La mieloperoxidasa de los neutrófilos cataliza la producción de otros potentes oxidantes citotóxicos, como el ácido hipocloroso proveniente del peróxido de hidrógeno y de cloro del citosol (reacción 5)(1,2,8,12):



Además, el ácido hipocloroso puede generar radicales hidroxilo, en reacciones análogas a las de Haber-Weiss y Fenton, en vez del H_2O_2 y usando al superóxido y al hierro ferroso como reductores, es decir, donadores de electrones (reacción 6) (12).

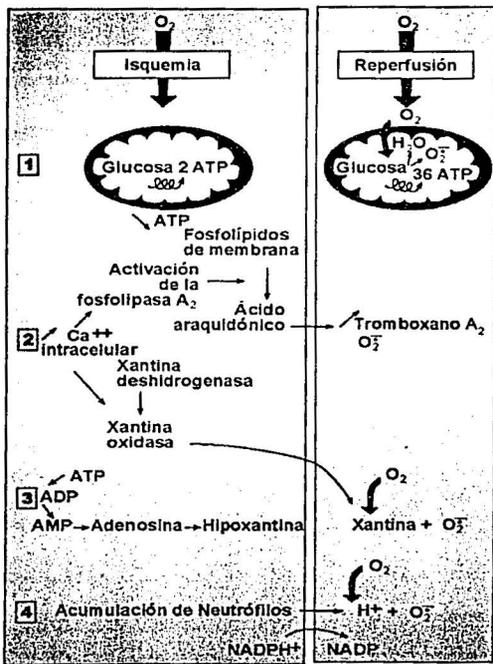
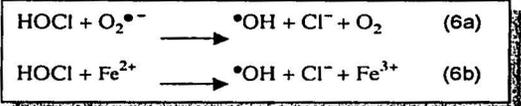


Figura 1: Las diferentes vías de producción de radicales libres en el curso de la isquemia-reperfusión (8).

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Daños producidos por los RLDO:

Cuando los sistemas de defensa antioxidante (véase más adelante) se ven rebasados, la acción de los radicales puede alcanzar otros componentes celulares, tales como membranas, ácidos nucleicos y proteínas, desencadenando el poder patógeno de los radicales libres (1-3,8).

Lipoperoxidación:

La membrana celular tiene una peculiar vulnerabilidad al daño por la oxidación, el polo hidrófobo de los fosfolípidos está constituido de dos cadenas de ácidos grasos insaturados que poseen muchos dobles enlaces y que son especialmente sensibles a la agresión de los radicales. Cuando la membrana es dañada pierde su flexibilidad y solidez, con la alteración consecuente de sus funciones (8).

La lipoperoxidación en las membranas representa una reacción en cadena y se describe en tres pasos, primero una iniciación que toma lugar en un doble enlace de un ácido insaturado; un hidroxilo capta un átomo de hidrógeno para su transformación en agua y los ácidos grasos, debido a una súbita reorganización de sus dobles enlaces, en presencia de oxígeno se transforman en radicales libres peroxi (ROO[•]). El segundo paso es la propagación, que resulta cuando un radical peroxi desprendido actúa sobre una cadena insaturada vecina intacta con formación de un hidrógeno y un hidroperóxido (ROOH) inestable, mientras que el radical ROO[•] que él ha formado puede comenzar un nuevo ciclo; los hidroperóxidos son degradados y forman varios alcanos y aldehidos, como el malondialdehído. El tercer paso es la terminación, que sucede cuando dos radicales libres, pertenecientes o no a la misma molécula, crean dos puentes entre ellos; la reacción puede ser también frenada por el encuentro con moléculas captadoras, o por la formación de puentes entre las proteínas de membrana y el malondialdehído (8).

Es probable que los RLDO no sean los únicos mediadores de daño generados durante una reperusión, también podrían ser de importancia en este fenómeno algunas sustancias que participan en la reacción inflamatoria, como el factor activador de las plaquetas, los eicosanoides, la fosfolipasa A₂ y las proteasas (Figura 2)(1,2,3,8).

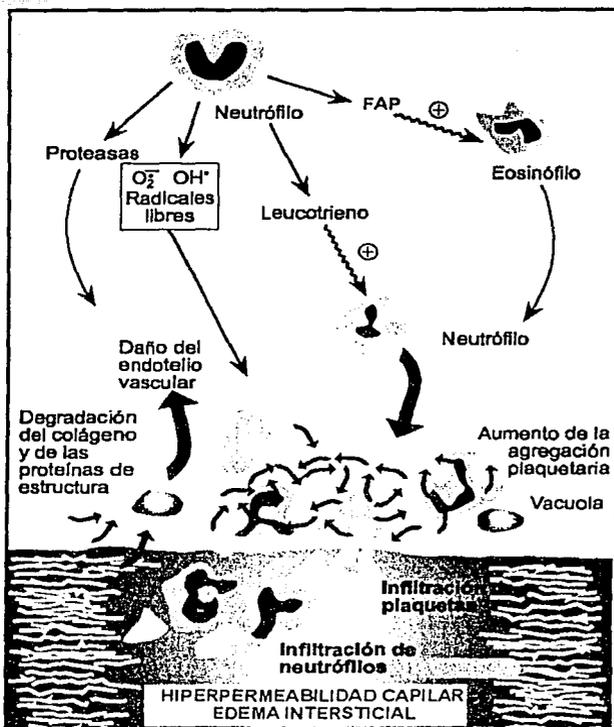


Figura 2: Reacción inflamatoria, consecuencia de la liberación de radicales libres (8).
FAP: Factor de activación plaquetaria

Daño en tejidos

Los RLDO pueden ejercer efectos directos en la estructura y función celulares, así como efectos indirectos por la alteración en la homeostasis del calcio (2). Los daños directos más importantes son causados por la peroxidación de los fosfolípidos membranales, causando desajustes y lisis en las células y sus organelos. Esta lipo-peroxidación requiere de la presencia de Fe y puede ser propagada, ampliando la extensión del tejido dañado. Otros efectos directos incluyen a la inactivación de enzimas y la alteración de cadenas de ADN debidas a la oxidación de proteínas y ácidos nucleicos inducida por el radical hidroxilo. Algunos de los daños tisulares que son iniciados

por los RLDO de manera indirecta se deben a la acumulación de calcio liberado del retículo endoplásmico y las mitocondrias y por la entrada de calcio extracelular debida a la inactivación de la calcio-ATPasa de la membrana, ante el decremento en el ATP de la célula. La concentración elevada de calcio activa a la proteasa calpaína dependiente de calcio y a la fosfolipasa A2, ambas pueden causar posterior daño en la estructura celular. En resumen, el resultado es un daño estructural y la producción de mediadores fosfolípidos, debidos a la activación de la fosfolipasa A2 (Figura 3)(1,2).

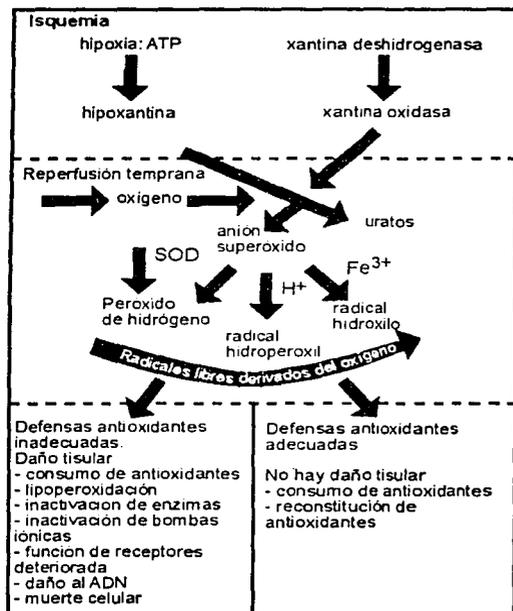


Figura 3: Panorama general del daño tisular inducido por la reperfusión (1).
SOD: superóxido dismutasa

Daño en el intestino.

Ha sido bien documentado el daño tisular que ocurre al restaurar el flujo sanguíneo, posteriormente a un proceso isquémico, en el tejido intestinal de perros, gatos, caballos y ratas. Los RLDO

estimulan la quimiotaxis, adherencia y extravasación leucocitarias, debido a que causan la generación de leucotrieno B₄ (LTB₄), factor del complemento C5a, y factor activador de las plaquetas (FAP) (18,19,20). Los neutrófilos atraídos, generan a su vez, más RLDO, con lo que se crea un "círculo vicioso" (21). La cuantificación de la actividad de la mieloperoxidasa en la mucosa intestinal, se utiliza frecuentemente como un índice de infiltración neutrófila y daño en la mucosa. Hay evidencia de que los granulocitos que residen en el intersticio, contribuyen más al incremento de la permeabilidad de la mucosa, asociada con un proceso de isquemia-reperfusión, que aquellas células que llegaron del espacio vascular (22). La activación de la mieloperoxidasa ocurre cuando el leucocito se adhiere a bacterias. La producción de superóxido, asociado con isquemia intestinal y reperfundición, resulta en gran parte de la XO presente en el endotelio vascular y el epitelio de la mucosa. Aún así, el superóxido debido a los neutrófilos parece contribuir al daño oxidante (2). Otras fuentes de radicales libres incluyen la síntesis de prostaglandinas (por la acción de la ciclooxigenasa), las radiaciones ionizantes (radiolisis del agua tisular) y algunas reacciones oxidativas de desintoxicación, como en las que intervienen los citocromos P 450 (8).

Otros procesos patológicos posibles en una isquemia-reperfusión intestinal.

La obstrucción intestinal provoca varios eventos significativos, los más importantes son los desequilibrios de líquidos y electrolitos, y la presencia de estado de choque (5).

Se desarrolla una distensión en la porción proximal a la obstrucción, donde se incrementan las secreciones intestinales y disminuye la absorción de líquidos. El líquido que se acumula en el lumen contiene grandes cantidades de sodio, cloro, potasio y bicarbonato, con lo que se provoca principalmente un desbalance ácido-base e hipovolemia.

En el segmento intestinal obstruido, el número de bacterias se incrementa, pudiendo alcanzar concentraciones similares a los que se pueden encontrar en el intestino grueso, los cambios en la composición de la microbiota, la hacen similar a la encontrada en las heces o en la cavidad oral. Las bacterias que comúnmente se ven involucradas en este proceso, son *Streptococcus spp.*, *Escherichia coli*, *Bacteroides fragilis* y *Clostridium perfringens*; esta última tiene gran importancia en perros, ya que se relaciona con muertes en individuos con procesos obstructivos intestinales. Algunas exotoxinas

bacterianas pueden estimular la secreción intestinal uniéndose a las células mucosas de las criptas, mientras que las endotoxinas se absorben y pueden causar endotoxemia y choque endotóxico (5).

La mucosa intestinal es uno de los tejidos más susceptibles a los efectos dañinos de los procesos isquémicos. Una de las primeras manifestaciones del daño a la mucosa por una reperfusión es el aumento en la permeabilidad capilar que resulta en edema tisular y el subsecuente movimiento de líquidos hacia el lumen intestinal. Los estudios morfológicos indican que este daño es producido durante la reperfusión y no durante la isquemia (23).

Evaluación de la lipoperoxidación en el daño por reperfusión intestinal.

La cuantificación de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS, por sus siglas en inglés), es una técnica colorimétrica que se utiliza como índice de lipo-peroxidación relacionado con el daño por reperfusión en diversos tejidos, incluyendo el intestino (2,15,16,17).

Evaluación histológica del daño intestinal

Frecuentemente el daño se evalúa mediante la observación de cortes histológicos teñidos con hematoxilina y eosina, para lo que se han descrito diferentes escalas de calificación de daños en el intestino, esto dificulta la comparación de resultados de estudios que utilizaron diferentes sistemas de calificación (24).

Un sistema estándar ideal debe relacionar la apariencia morfológica del daño con la severidad de la alteración, produciendo resultados compatibles entre distintos observadores. Este sistema entonces describe el daño general de los elementos de la pared intestinal, incluyendo a las vellosidades y las criptas, así como evidencias detalladas de daño en la mucosa y en la submucosa. De manera típica el daño isquémico presenta una alteración progresiva que parte de las puntas de las vellosidades y se extiende hacia las criptas, de acuerdo con la duración del periodo isquémico. Por último, un sistema ideal debe ser presentado de manera lógica, ser fácil de aprender y usar (24).

En un estudio, que compara los sistemas más utilizados, se diseñó un estándar que se recomienda para su uso en estudios típicos experimentales de isquemia-reperfusión (24).

Sistemas de defensa antioxidante.

Enzimas específicas

El organismo dispone de sistemas enzimáticos de defensa específicos frente a la producción fisiológica de radicales libres; estas enzimas están presentes dentro de la célula, que es el sitio de producción de dichos radicales, por lo que los mantienen normalmente en concentraciones muy bajas (8).

La SOD es una enzima que está presente en todos los organismos aerobios vivos con dos variedades, la citosólica que contiene cobre y zinc en su sitio activo, y la mitocondrial que contiene magnesio. La SOD acelera considerablemente la dismutación del superóxido en peróxido de hidrógeno, acción que debe estar acoplada a las catalasas/peroxidasas para evitar la acumulación de peróxido de hidrógeno, con lo que se previene la formación de hidroxilo (Figura 4).

Las catalasas están localizadas exclusivamente en el interior de los peroxisomas, por lo que su acción es limitada, y su función es la de catalizar la dismutación de peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno molecular.

La glutatión peroxidasa (GPx) es una enzima citosólica y mitocondrial que degrada la mayor parte del peróxido de hidrógeno y lo transforma, en presencia de glutatión reducido, en agua y glutatión oxidado (8,10).

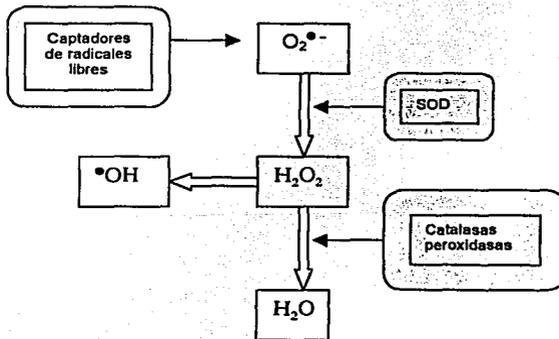


Figura 4: La acción de la superóxido dismutasa (SOD) debe estar acoplada a la de las catalasas/peroxidasas para evitar la acumulación de peróxido de

Antioxidantes no enzimáticos

Cuando los sistemas enzimáticos de defensa son insuficientes, se produce una acumulación de superóxido y peróxido de hidrógeno con producción de radicales hidroxilo, contra los cuales no existen mecanismos enzimáticos naturales de defensa; entonces toma importancia la acción de una segunda línea de defensa formada por los captadores de radicales libres; la característica común de estos compuestos es que son fácilmente oxidables, actúan donando un electrón al radical libre "estabilizándolo" (1,8,10). En forma conjunta se menciona la importancia de otras sustancias que no son propiamente captadoras de radicales, pero que tienen influencia en una acción antioxidante.

A nivel intracelular se mencionan ascorbato (vitamina C), cisteamina, hipotaurina, taurina, cisteína, ácido úrico y bilirrubina; en la membrana se encuentran los relevantes α -tocoferol (vitamina E) y β -caroteno (provitamina A), así como la coenzima Q₁₀ y el fosfolípido GSH-Px; y en el líquido extracelular se incluyen al ácido úrico, albúmina, cisteína ascorbato, glucosa y α -tocoferol (todos son captadores), así como transferrina, lactoferrina (se unen al hierro), ceruloplasmina (mantiene al hierro en forma férrica), haptoglobina (liga hemoglobina libre), hemopexina (liga hemo libre) (1, 8). También se implica a sustancias como la vitamina E, vitamina C y el glutatión en la "reparación del daño" ya que pueden donar un electrón o un átomo de hidrógeno a moléculas oxidadas por radicales libres (12).

Posibles factores predisponentes y de variación en el daño por reperfusión

La disminución de las defensas antioxidantes deja vulnerable a un tejido ante los RLDO que se producirían en una reperfusión. Se puede determinar la concentración de muchas de estas sustancias en componentes sanguíneos y se ha llegado a establecer el término "estatus antioxidante"; dicho análisis incluye la capacidad global antioxidativa del plasma, ácido úrico, albúmina, vitaminas A y E, hierro, cobre, selenio, zinc, transferrina y ceruloplasmina, en el suero, así como glutatión en la sangre y magnesio en el plasma y en los eritrocitos. (1, 25).

La leucocitosis predispone en general a un daño más serio. En un estudio se observó que la leucocitosis inducida por un factor estimulante de colonias de granulocitos provocó una mayor

alteración en el tejido intestinal de rata sometido a un daño por reperfusión, mientras que la leucopenia inducida ayudó a proteger al tejido (26).

Existe una *variación en las defensas antioxidantes* entre distintos órganos, distintas porciones del mismo órgano y en diferentes estructuras dentro de la célula, por ejemplo, la concentración de superóxido dismutasa en el intestino delgado es menor que en el estómago y el intestino grueso (1).

Aplicaciones terapéuticas en el daño por reperfusión.

Se puede reducir el daño por parte de los RLDO mediante:

1.- Técnicas de corrección del problema isquémico, como reducir el periodo de isquemia, administrar antiinflamatorios para evitar la acumulación de neutrófilos, perfusión con sangre con bajas concentraciones de oxígeno o provocar una reperfusión lenta (1).

2.- Administración de una dieta que suple antioxidantes, como vitamina E, vitamina C, precursores de glutatión, antioxidantes sintéticos (p. ej. hidroxitolueno). Aunque se sabe que las deficiencias de antioxidantes en la dieta aumenta la susceptibilidad al daño oxidativo, se reconoce que el consumo excesivo de dichas sustancias es probable que no aumente la capacidad neta antioxidante de los tejidos, ya que parece ser que el potencial antioxidante se encuentra bajo un control homeostático (1).

3.- Aplicación de fármacos (Apéndice 1).

Muchos fármacos se han aplicado experimental o clínicamente, para prevenir o atenuar el daño por reperfusión, entre los que están:

Los inhibidores de la xantina oxidasa, que al ser análogos estructurales de la hipoxantina, inhiben competitivamente la conversión de ésta a ácido úrico, uniéndose fuertemente a la XO; el ejemplo más importante es el alopurinol.

Los captadores enzimáticos de los RLDO, que catalizan la reducción de los radicales libres, p. ej. la superóxido dismutasa y la catalasa.

Los captadores no enzimáticos de los RLDO, por ejemplo manitol y dimetilsulfóxido que captan radicales hidroxilo, albúmina que captan hidroperóxidos de lípidos, dimetilurea que capta hidroxilos, peróxido de hidrógeno y ácido hipocloroso. Aquí se puede incluir también a las vitaminas E y C y al β -caroteno, pese a que se desconoce su efecto al ser aplicados exógenamente durante la isquemia.

Los queladores del hierro como la deferoxamina o la bleomicina que inhiben la formación de radicales hidroxilo catalizada por el hierro en la reacción de Fenton. Las proteínas transferrina y ferritina son queladores de Fe endógenos.

Otros compuestos que pueden evitar el daño por reperfusión incluyen a *los 21 aminoesteroides* que inhiben la lipoperoxidación catalizada por Fe y la liberación de ácido araquidónico, *corticosteroides* que inhiben la lipoperoxidación, la actividad de la fosfolipasa y la función neutrofílica, *antiinflamatorios no esteroides* que inhiben la adherencia de neutrófilos en el endotelio y evitan los cambios vasculares que suceden a la acción de la ciclooxigenasa, *dextrano* que inhibe la entrada de neutrófilos a los tejidos, *óxido nítrico* y *generadores de óxido nítrico* que inhibe las agregaciones plaquetaria y neutrofílica además de captar radicales superóxido, *anticuerpos monoclonales* contra proteínas de adhesión de los neutrófilos, *anestésicos locales* y *bloqueadores de canales de calcio* que intervienen indirectamente con el sistema de la NADPH oxidasa y *antagonistas de leucotrieno B₄* y *del factor de agregación plaquetaria* que disminuyen la infiltración neutrofílica al disminuir la producción de sustancias quimiotácticas a los neutrófilos, *inhibidores de la lipoxigenasa*, *inhibidores de la elastasa*, *agentes neutropénicos*, *inhibidores de proteasas*, *ebsefen*, que tiene actividad similar a la glutatión peroxidasa, *inhibidores de la calpaína* y *precursores de fosfatidilcolina*, (1,3,17,27,28).

La aplicación terapéutica de ácidos grasos en forma de aceites para consumo oral o emulsiones enterales o parenterales, es relativamente escasa (29). Se han realizado estudios que evalúan el daño por reperfusión en animales tratados con suplementos que contienen ácidos grasos y se ha postulado que ciertos beneficios terapéuticos se pueden atribuir a la actividad

antioxidante de algunos ácidos grasos y a la reducción de la liberación de eicosanoides en tejidos reperfundidos (30,31).

La mezcla de ácidos grasos VSP-1, es descrita por sus fabricantes como un compuesto 100% de origen vegetal a base de aceites hidrolizados derivados de soya, cártamo y pino; saponificados para formar una emulsión compuesta por micelas ($< 0.5 \mu\text{m}$) con características anfotéricas. El principio activo tiene un pH que oscila entre 10.5 y 14, mientras que la preparación intravenosa oscila entre 10 y 11. Asimismo, le atribuyen propiedades para restablecer las membranas celulares formando fosfolípidos después de algún daño (32). La fórmula del VSP-1 se describe en el Apéndice 2. En trabajos piloto no publicados se observaron efectos benéficos por la aplicación del producto en casos de reperfusión intestinal (33).

Es notorio el aumento en la atención puesta en las emulsiones lípidas para modular las funciones celulares gracias a su contenido específico de ácidos grasos o vitaminas liposolubles. En este sentido, es de gran utilidad el desarrollo de productos con baja hidrosolubilidad para su aplicación parenteral, incluso está en voga el desarrollo de emulsiones que permitan transportar ingredientes activos solubles en agua, ya que las emulsiones tienen componentes hidrofílicos y lipofílicos. Se ha estudiado el metabolismo de emulsiones hechas de mezclas de diversos extractos lipídicos de vegetales y animales, y se ha encontrado que la eliminación plasmática de tales preparados parece ser muy rápida y no se detecta una presencia prolongada de partículas de emulsión; además, se ha observado que la captación de distintos ácidos grasos en diversas células así como su incorporación a las membranas son muy rápidas (29,34). Otras ventajas de las emulsiones es que pueden reducir el potencial hemolítico de algunas sustancias, ya que las moléculas de emulsión suelen formar una interfase lipofílica a la cual se incorporan los ingredientes con lo que se evita el contacto directo con los eritrocitos (35).

Cabe señalar que los tejidos con más altos índices de metabolismo, captación y almacenamiento de ácidos grasos son el intestino delgado, hígado, adipocitos y músculo, esto tal vez está relacionado con la gran cantidad de proteínas ligadoras de ácidos grasos (PLAG) que presentan. Las funciones de las PLAG incluyen modular enzimas específicas de las vías

metabólicas lipídicas, mantener las concentraciones de ácidos grasos en la membrana y regular la expresión de los genes sensibles a ácidos grasos (Figura 5)(36).

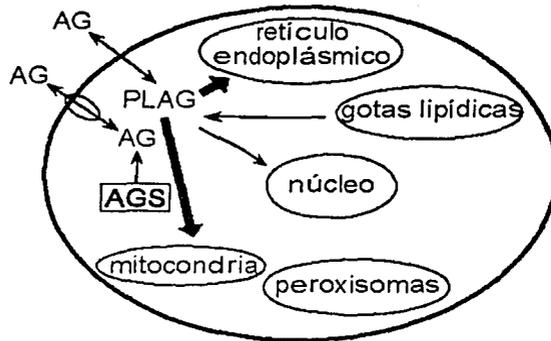


Figura 5: Transporte intracelular de AG. El ingreso o la salida de AG a través de la membrana toma lugar, ya sea por difusión o por mediación de proteínas. El transporte en el citosol, desde o hacia los organelos, puede estar mediado por las PLAG. Abreviaturas: AG: ácido graso; PLAG: proteína ligadora de ácidos grasos; AGS: ácido graso sintetasa (34).

1.2 Justificación

Dado que los procesos isquémicos intestinales son comunes en perros, y que a la mezcla de ácidos grasos VSP-1 se le atribuyen propiedades de restablecer membranas celulares formando fosfolípidos, asimismo que se conoce la actividad antioxidante de algunos de los componentes del producto, se estudió si dicho producto disminuye el daño por reperfusión intestinal en perros.

1.3 Hipótesis

La administración de la mezcla de ácidos grasos "VSP-1" durante un proceso isquémico intestinal previo a un proceso de reperfusión (ambos inducidos), atenuará el aumento en el índice de lipo-peroxidación y el daño histológico en la mucosa intestinal de perros.

1.4 Objetivo

Evaluar la efectividad de la mezcla de ácidos grasos "VSP-1", aplicada por vía intravenosa, en la prevención de los daños generados por la reperfusión inducida a un segmento intestinal en perros, mediante la determinación del índice de lipo-peroxidación y la calificación del daño histológico.

Material y métodos

Se evaluó la efectividad de la administración de la mezcla de ácidos grasos "VSP-1" en solución inyectable, durante una isquemia experimental previa a un proceso de reperfusión intestinal inducido en perros según la técnica quirúrgica realizada por Lorenzana L. (33)

Sujetos experimentales

Se utilizaron dos grupos de siete perros, uno testigo y el otro experimental. En el momento de restaurar el riego sanguíneo, el grupo experimental recibió la VSP-1 por la vena cefálica en dosis de 1 mL/kg; el grupo testigo recibió solución salina al 0.9% en la misma dosis por la vena cefálica. Finalmente se les dio muerte con una inyección intravenosa de una sobredosis de pentobarbital sódico.

Criterios de inclusión. Machos y hembras, de cualquier condición genética, adultos, de 10 a 20 kg de peso, clínicamente sanos y sin alteraciones, de acuerdo a los valores de referencia, en los resultados del hemograma, perfil bioquímico y urianálisis. Los individuos permanecieron en ayuno de 12 h y privados de agua al menos 2 h antes de la cirugía.

Criterios de eliminación. Los perros que murieran antes de la reperfusión intestinal.

Técnica quirúrgica

Los procedimientos se efectuaron en la "Unidad de Enseñanza Quirúrgica" de la FMVZ, UNAM. En la preanestesia se utilizaron: atropina (0.044 mg/kg, IM), butorfanol (0.2mg/kg, IM) y acepromacina (0.04 mg/kg IM), y como anestésico al pentobarbital sódico (20 mg/kg IV). Para mantener el estado de anestesia se aplicó pentobarbital sódico "a efecto" sin rebasar los 33 mg/kg totales, y para proporcionar analgesia se aplicó butorfanol (0.1mg/kg, IV) cada vez que era necesario (signos de dolor), pero, con intervalos no menores a una hora y media. Como cuidados especiales se incluyó el uso de la atropina (0.02 mg/kg, IV) si se presentaba una bradicardia de más del 20% y el apoyo

mecánico respiratorio mediante una bolsa "Ambu" aplicando 2 seg de inspiración sostenida con una profundidad igual al valor basal (referido en el neumograma) cada 5 min.

En una sala de preparaciones se administró al animal continuamente solución salina al 0.9% (10 mL/kg/h), mediante un aparato de venoclisis; una vez que los perros se anestesiaban, se les realizó un amplio afeitado en el vientre y se les trasladó al quirófano para colocarles una sonda endotraqueal y los electrodos para el electrocardiógrafo y el neumógrafo. Posteriormente se realizó la cirugía llevándose a cabo los siguientes puntos:

- Primero: antisepsia rigurosa aplicando solución de povidona yodada con la técnica laminar unidireccional.
- Segundo: Incisión medial en las regiones xifoidea y umbilical que incluyó la piel, el tejido subcutáneo, la línea blanca y el peritoneo parietal.
- Tercero: se desplazó al omento mayor hacia el área craneal para descubrir el estómago y los intestinos, se localizó la flexura duodenoyeyunal y se siguió manualmente el trayecto del yeyuno para elegir la porción en donde se realizó la intervención. El tramo seleccionado se exteriorizó y aisló de la cavidad abdominal y de los bordes de la herida con compresas húmedas.
- Cuarto: se provocó el proceso de isquemia durante 100 min mediante la oclusión total de la luz propia de una porción de 15 a 20 cm de yeyuno (con fórceps intestinales), así como de arterias y venas yeyunales y arcos marginales que riegan el tramo (con pinzas hemostáticas acondicionadas). Durante la isquemia se mantuvo al órgano dentro de la cavidad abdominal y la herida se ocluyó temporalmente con algunos puntos de sutura simples para evitar la deshidratación y el enfriamiento del contenido de la cavidad abdominal.
- Quinto: se provocó la reperusión retirando los instrumentos que ocluían a los vasos sanguíneos.
- Sexto: se cerró la cavidad abdominal suturando los planos incididos y se finalizó la cirugía.

Durante toda la cirugía se vigiló la frecuencia cardiaca y la frecuencia y profundidad respiratorias, con la ayuda de un fisiógrafo (Physiograph® MK-IV Narco Bio-systems, California, EEUU) y de los

transductores correspondientes así como clínicamente la profundidad de la anestesia, la calidad del pulso en la arteria femoral y la temperatura rectal.

Colección de muestras. Se realizaron 3 muestreos siguiendo el modelo de Badylack S.F., et al. (37), el primero a los 20 minutos previos a la isquemia, el segundo a los 20 minutos posteriores a la reperusión, y el tercero a los 60 minutos posteriores a la reperusión. Se suturó el intestino después de tomar cada muestra utilizando el patrón "Cushing-Connell", para evitar la filtración del contenido intestinal. Cada muestreo consistió en una biopsia de tejido intestinal de aproximadamente 1 cm³ que se conservó en formalina neutra al 10% para la evaluación histopatológica, y otra de aproximadamente 1 g de tejido intestinal para la medición de TBARS, que se congeló en nitrógeno líquido para su conservación.

Valoraciones

1.- La calificación de los daños histológicos en las biopsias intestinales se realizó de acuerdo con Quaedackers et al. (24) quienes utilizan una escala de calificación de los daños observados del 0 al 7, adaptado para su uso en estudios típicos experimentales de isquemia-reperusión (Apéndice3).

2.- La concentración de sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS), como un índice de lipo-peroxidación en la mucosa intestinal, mediante la técnica descrita por Ohkawa et al. (Apéndice 4) (15).

3.- Temperatura rectal y frecuencias cardiaca y respiratoria en los siguientes momentos:

- Inmediatamente antes de inducir la isquemia.
- A los 30 minutos de isquemia.
- A los 100 minutos de isquemia, previamente a la reperusión.
- Al comienzo de la reperusión.
- A los 20 minutos de la reperusión.
- A los 60 minutos de la reperusión.

Análisis estadístico

Para analizar los resultados de las calificaciones del daño histológico se realizó la prueba no paramétrica de "Wílicoxon" (suma de rangos para dos muestras) y su opción "prueba exacta", para comparar las medias de las sumas de las calificaciones de ambos grupos por los tres tiempos de muestreo, así como las medias de las calificaciones de ambos grupos por cada tiempo de muestreo, utilizando el procedimiento NPAR1WAY del sistema estadístico SAS.

Para analizar los resultados de las concentraciones de TBARS y los valores de constantes fisiológicas, se realizó un análisis de varianza utilizando el procedimiento de "Modelos Lineales Generalizados" (GLM por sus siglas en inglés) y su opción de "Medias de Cuadrados Mínimos" (LSMEANS por sus siglas en inglés) del sistema estadístico SAS. Se analizaron las concentraciones de los tres distintos tiempos de muestreo para los grupos experimental y testigo (seis datos en total), para evaluar las diferencias entre cualquier probable comparación (cada dato con los otros cinco).

Resultados

Fase quirúrgica

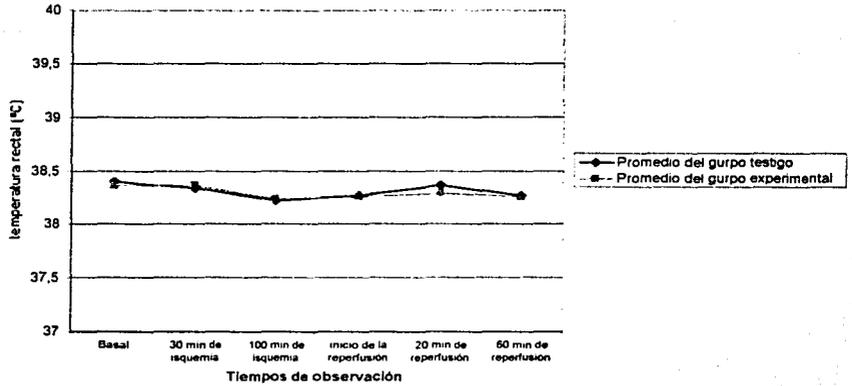
En términos generales el comportamiento fisiológico de los animales de los grupos testigo y experimental fue similar durante el proceso anestésico.

Se puede describir un patrón de taquicardia durante gran parte de la cirugía, principalmente desde los 30 min de isquemia, hasta los 20 min de reperfusión, atribuible al estado de hipoxemia en el que se encontraban los animales debido al proceso anestésico. Cabe mencionar que el perro número cuatro del grupo testigo y los perros uno y tres del experimental, presentaron arritmias transitorias en el momento de la reperfusión y sin relación con la inspiración. Durante todo el proceso se observó una baja en la frecuencia y la profundidad de la respiración, especialmente en las últimas fases quirúrgicas, atribuible a la depresión producida por los fármacos utilizados para la anestesia; una excepción la constituyen los momentos en que se elevaba la frecuencia respiratoria debido al dolor.

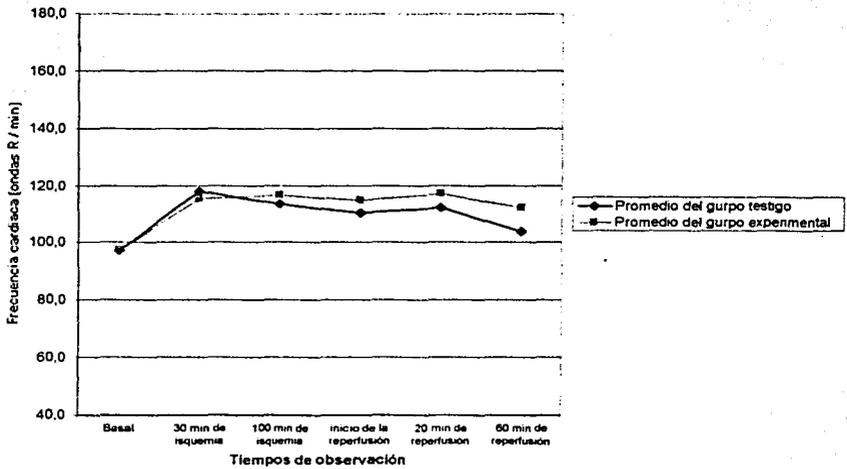
En cuanto a la temperatura rectal y las frecuencias cardíaca y respiratoria, no existieron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los dos grupos experimentales, en ninguno de los tiempos evaluados (Gráficas 1, 2 y 3).

Al término de la isquemia, al ser exteriorizado el segmento intestinal, se observó en general la apariencia distendida, edematosa y coloración que variaba entre rojo, violeta y negruzco; el segmento tenía una temperatura menor que el resto de las vísceras, la motilidad por lo general era nula y la consistencia era siempre más tensa. Cuando se reestablecía el flujo sanguíneo se podía apreciar de inmediato el retorno de la motilidad y, minutos después, el cambio de coloración que tendía a ser más claro, sin embargo, la apariencia nunca volvía a ser como la que tenía antes de la manipulación (basal). Al momento de incidir el intestino para tomar las muestras, se apreciaba el flujo de un líquido rojizo y la mucosa solía presentar acúmulos de sangre y fibrina, además de una coloración parecida a la del exterior del segmento.

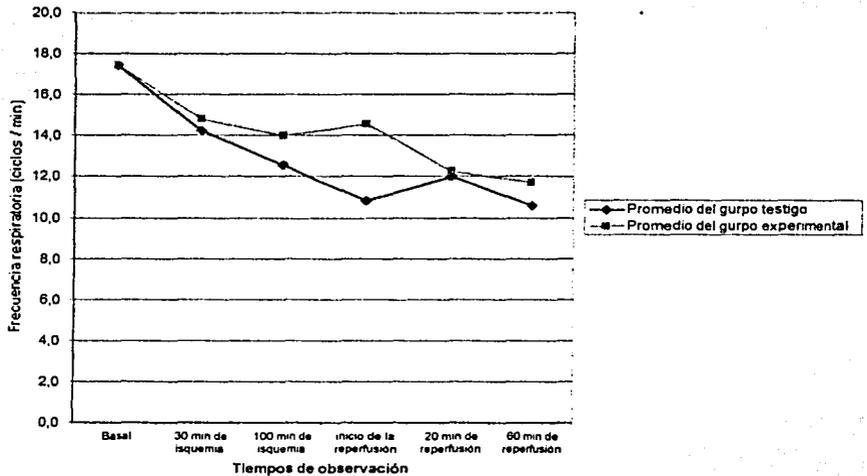
Gráfica 1.- Promedios de temperatura rectal durante la cirugía en la que se indujo a perros a un daño por reperusión intestinal



Gráfica 2.- Promedios de frecuencia cardiaca durante la cirugía en la que se indujo a perros a un daño por reperusión intestinal



Gráfica 2.- Promedios de frecuencia cardiaca durante la cirugía en la que se indujo a perros a un daño por reperusión intestinal



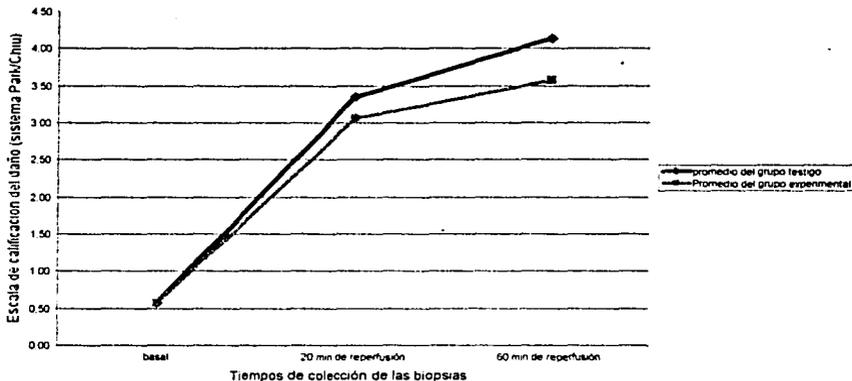
Calificación del daño histológico.

Las medias del total de las calificaciones por todas las muestras fue de 2.69 en el grupo testigo y de 2.40 en el experimental, sin embargo no fueron significativamente diferentes ($p= 0.31$).

Las medias del grupo experimental fueron menores que las del grupo testigo en los muestreos a los 20 y 60 minutos de reperusión (Gráfica 4), sin embargo no fueron significativamente diferentes ($p= 0.48$ y $p= 0.29$, respectivamente).

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Gráfica 4.- Promedio de las calificaciones del daño histológico en biopsias de yestuno de perro inducidos a un daño por reperusión



Los resultados completos del análisis estadístico de los resultados de la evaluación del daño histológico se incluyen en el Apéndice 5.

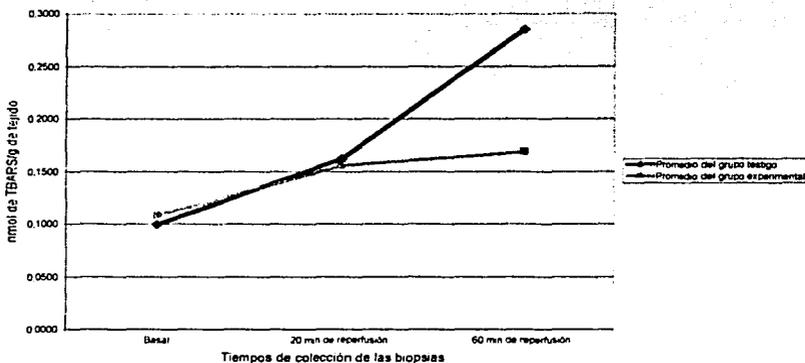
Índice de lipoperoxidación (concentración de TBARS).

El modelo general, dando como fuentes de variación a los efectos exclusivos de tratamiento y tiempo, así como al efecto combinado de tratamiento más tiempo, tuvo un coeficiente de determinación (r^2) de 0.81 ($p= 0.0001$).

El efecto del tiempo sobre la presentación de daño en el intestino fue altamente significativo en ambos grupos ($p= 0.0001$), es decir, las concentraciones de TBARS fueron mayores conforme pasó el tiempo en el experimento; el efecto combinado del tratamiento más el tiempo resultó significativo ($p= 0.154$) y el efecto del tratamiento resultó significativo ($p= 0.406$) (cuadro 1). La media de la concentración de TBARS a los 60 min posteriores a la reperusión resultó menor en el grupo experimental que en el testigo (0.285 nmol/g y 0.168 nmol/g, respectivamente), por lo que el incremento de TBARS con respecto al grupo testigo fue menor en

un 67%. (Gráfica 5) y resultó significativamente diferente de la media del grupo testigo al mismo tiempo de muestreo ($p= 0.001$) (Apéndice 6).

Gráfica 5.- Promedios de las concentraciones de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en biopsias de yeyuno de perros inducidos a un daño por reperusión



Cuadro 1. Resultados del análisis de varianza de las concentraciones de TBARS.

Fuente de variación	GL	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	Valor de F	Pr > F
Tratamiento	1	0.00677878	0.00677878	4.79	0.0406
Tiempo	2	0.06734274	0.03367137	23.81	0.0001
Trat. más tiempo	2	0.01464644	0.00732322	5.18	0.154

Los resultados completos del análisis estadístico de los resultados de las concentraciones de TBARS en las biopsias intestinales se incluyen en el Apéndice 6.

Discusión

En este estudio se obtuvieron datos valiosos para evaluar la severidad del daño por reperfusión, ya que la determinación del daño histológico y de la concentración de TBARS son parte fundamental de los métodos incluidos en trabajos similares realizados en perros a los que induce a un daño por reperfusión intestinal (37,38,39) en este estudio se dedujo que el procedimiento quirúrgico resultó eficaz para provocar la lipoperoxidación del tejido. Con base en los resultados obtenidos, se hace evidente que no hubo un beneficio histológico debido al tratamiento, lo que contrasta con lo informado en otros estudios en donde ciertos compuestos han logrado atenuar el daño, incluso en tiempos similares de muestreo (38,39,40,41). Sin embargo, es probable que en un periodo de muestreo más amplio (hasta de algunos días), se pudiera observar una atenuación del daño histológico, empero, esta especulación sólo se podrá confirmar con estudios posteriores.

Las concentraciones de TBARS en el yeyuno de los perros utilizados, tanto en valores basales, como en los resultantes de la inducción del proceso de isquemia-reperfusión, fueron similares a las obtenidas en otros estudios que valoraron los mismos especímenes (37,39).

La atenuación de la lipoperoxidación observada en el presente trabajo, constituye el punto más importante de los resultados, ya que al disminuir el efecto oxidativo de los radicales libres sobre los fosfolípidos membranales se evitan las alteraciones a las células y sus organelos descritas en el capítulo de introducción, además de que se bloquea un fenómeno clave en la propagación del daño por reperfusión, que es la acumulación de neutrófilos en los tejidos y la consiguiente generación masiva de radicales libres, debido a que al atenuar la lipoperoxidación se disminuye la generación de sustancias quimiotácticas para los neutrófilos (1,2,8,12,18,19,20).

La disminución del índice de lipoperoxidación en un tejido reperfundido puede tener beneficios terapéuticos, sin embargo, el daño por reperfusión es muy complejo, por lo que es conveniente la evaluación de otros indicadores del daño, como la evolución clínica, la capacidad

antioxidante, el factor de agregación plaquetaria, la fosfolipasa A₂, el daño histológico a mediano plazo, e incluso el índice de lipoperoxidación y las concentraciones sanguíneas de ácidos grasos y triglicéridos a mediano plazo, ya que el intestino delgado tiene gran concentración de proteínas ligadoras de ácidos grasos y por lo tanto, una depuración lenta de los mismos, lo que podría ser contraproducente; aunque se asume una rápida incorporación de ácidos grasos a los tejidos, así como una rápida eliminación plasmática (42), llama la atención que aquí se observó una disminución en la lipoperoxidación relativamente tarde (hasta los 60 min de reperfusión), por lo que es conveniente evaluar otros momentos de aplicación de la VSP-1 durante el proceso de isquemia-reperfusión, e incluso, otras dosis.

También es posible que el beneficio mostrado por la mezcla de ácidos grasos VSP-1 se deba sólo a algunos de sus componentes, ya que se tienen pocos datos farmacocinéticos de preparaciones parenterales de ácidos grasos. Se sabe que la VSP-1 contiene algunos ácidos grasos omega-3 (véase Apéndice 2) y que dichas sustancias se incorporan a los fosfolípidos membranales, modulan respuestas celulares a varios estímulos e influyen en diversos procesos metabólicos intracelulares, incluso influyen directamente en la producción de eicosanoides y, en términos prácticos, reducen la respuesta inflamatoria y trombótica (44); sin embargo, con la información disponible, no es posible aseverar la utilidad de los demás ácidos grasos que componen la fórmula de la VSP-1, aunque los fabricantes de la misma atribuyen gran importancia a la interacción química de todos los constituyentes de la mezcla (32).

Asimismo, se logró demostrar clínicamente la inocuidad de la VSP-1 por vía intravenosa durante una hora de observación enfocada principalmente a unas eventuales alteraciones en las constantes fisiológicas valoradas, lo cual resulta de importancia debido a que la aplicación de emulsiones por esa vía es relativamente poco usual. De hecho, algunos autores afirman que se debería considerar más a las emulsiones intravenosas para modular la función celular mediante el contenido específico de ácidos grasos y vitaminas liposolubles (42). En etapas posteriores se podría intentar una terapia mixta con captadores de radicales libres u otros atenuantes del daño por reperfusión.

Conclusiones

Con base en los resultados obtenidos y bajo las condiciones de este trabajo se puede establecer que:

- 1.- La mezcla de ácidos grasos en emulsión denominada VSP-1 "Virus-sin", atenuó la formación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) que son indicadoras de lipoperoxidación debida a radicales libres derivados del oxígeno (RLDO).
- 2.- En este estudio no se pudo comprobar el beneficio clínico de la aplicación de la VSP-1, debido a que se dio muerte a los animales inmediatamente después del procedimiento quirúrgico.
- 3.- Las valoraciones histopatológicas y de la concentración de TBARS son válidas y reproducibles para la evaluación del daño por reperfusión intestinal en perros.
- 4.- La aplicación de la VSP-1 no mostró reacciones adversas apreciables clínicamente durante el experimento.

iteratura citada...

- 1.- Forsyth SF, Guilford WG. Ischaemia-reperfusion injury, a small animal perspective. *Brit Vet J* 1995; 151: 251-298.
- 2.- Popper H. *The Liver: Biology and Pathobiology*, 2nd ed. U.S.A. 1988.
- 3.- Moore RM, Muir VW, Granger DN. Mechanisms of gastrointestinal ischaemia-reperfusion injury and potential therapeutic interventions: a review and its implications in the horse. *J Vet Int Med* 1995; 9: 115-132.
- 4.- Anderson N. *Veterinary Gastroenterology*. 2nd ed. Lea & Febiger, U.S.A. 1992.
- 5.- Ettinger SJ, Feldman EC. *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. 5th ed. W.B. Saunders, U.S.A. 2000.
- 6.- Granger DN, Rutigli G, Mc Cord DM. Superoxide radicals in feline intestinal ischemia. *Gastroenterology* 1981; 81: 22-29.
- 7.- Mc Cord J, Wong K. The pathophysiology of superoxide: roles of inflammation and ischemia. *Can J Physiol Pharmacol* 1982; 60: 1346-1352.
- 8.- Droy MT, Ferrandini LC, Gardes M. *Los radicales libres*. Farmasa Schwabe, México 1999.
- 9.- Edelson SB. *The Edelson center U.S.A. Free Radical Pathology 2000* [consultado en agosto de 2001]. Disponible en: <http://www.ephca.com/frp-ucci.htm>
- 10.- KSK Distributors. *What are free radicals and how can they hurt us 1996* [consultado en febrero de 1999]. Disponible en: <http://www.mindspring.com/~staywell/freerad.html>.
- 11.- Granger DN, Hollwarth ME, Parks DA. Ischemia-reperfusion injury: role of oxygen derived free radicals. *Act Physiol Scand Supplementation* 1986; 548: 47-63.
- 12.- Wardman P. *Gray Laboratory Annual Report .Free radicals: nature's way of saying NO or Molecular murder 1999* [consultado en octubre de 2001]. Disponible en: <http://www.graylab.ac.uk/lab/reviews/pwrev.html>.

- 13.-Flaherty J, Weisfeldt M. Reperfusion injury. *Free Rad Biol Med* 1988; 5: 409-419.
- 14.- Lantz GC. Oxigen free radiacilas and reperfusion injury. In: Kirk's Current Teraphy XII. Edited by Kirk RW, and Bonagura JD, 67-70. W.B. Saunders, U.S.A., 1995.
- 15.- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95: 351-358.
- 16.- Albert J, Lutz A, Lutz J. Intestinal, hepatic and renal production of tiobarbituric acid reactive substances and myeloperoxidase activity after temporary aortic occlusion and reperfusion. *Life Sciences* 1991; 49: 961-968.
- 17.- Naito Y. et al. Neutrophils, lipid peroxidation and nitric oxide in gastric reperfusion injury in rats. *Free Rad Biol Med* 1998; 24: 494-502.
- 18.- Zimmerman B., Grisham M., Granger D.: Role of oxidants in ischemia/reperfusion-induced granulocyte infiltration. *Am J Physiol* 1990; 258: G185-G190.
- 19.- Zimmerman B, Guillory D, Grisham M. Role of leukotriene B4 in granulocyte infiltration into the posts ischemic feline intestine. *Gastroenterology* 1990; 99: 1358-1363.
- 20.- Kubes P. et al. Role of platelet activating factor in ischemia-reperfusion-induced leukocyte adherence. *Am J Physiol* 1990; 259: G300-G305.
- 21.- Arden W. et al. Morphologic and ultrastructural evaluation of effect of ischemia and dimethyl sulfoxide on equine jejunum. *Am J Vet Res* 1990; 51: 1784-1791.
- 22.- Kubes P, Hunter J, Granger D: Ischemia/reperfusion-induced feline intestinal dysfunction: importance of granulocyte recruitment. *Gastroenterology* 1992; 103: 807-812.
- 23.- Grisham M, Anzueto L, Granger DN. Xantine Oxidase and neutrophil infiltration in intestinal ischemia. *Am J physiol* 1986; 251: G567-G574.
- 24.- Quaedackers RJ. et al. An evaluation of methods for methods for grading histologic injury following ischemia/reperfusion of the small bowel. *Transpl Proc* 2000; 32: 1307-1310.
- 25.- Begoña M, Moorkens G, Vertommen J, De Leeuw I. Antioxidant status and lipoprotein peroxidation in chronic fatigue syndrome. *Life Sciences* 2001; 68: 2037-2049.
- 26.- Kuwabara Y, Kato T, Sato a, Fuji Y. Prolonged effect of leukocytosis on reperfusion injury of rat intestine: Real time ATP change studied using 31P MRS. *J Surg Res* 2000; 89:38-42.

- 27.- Sánchez J, Ortega L. Jornada virtual 40 aniversario de la fundación del Instituto de neurología y neurocirugía en enero de 2002 [consultado en junio de 2002] . Neuroprotección: nuevas perspectivas en el tratamiento del ictus isquémico. Disponible en: <http://cencomed.sld.cu/neuro40/conferencianeuroproteccion.htm>.
- 28.- MacNaughton WK, Cirino G, Wallace JL. Endothelium-derived relaxing factor (nitric oxide) has protective actions in the stomach. *Life Science* 1989; 45: 1869-1876.
- 29.- Carpentier YA, et al. Recent developments in lipid emulsions: relevance to intensive care. *Nutrition* 1997; 13: S73-S78.
- 30.- Jones SM, et al. Dietary juniper berry oil minimizes hepatic reperfusion injury in the rat. *Hepatology* 1998; 28: 1042-1050.
- 31.- Salminen I, Mutanen M, Jauhainen M, Aro A. dietary *trans* fatty acids increase conjugated linoleic acid levels in human serum. *Nutr Biochem* 1998; 9:93-98.
- 32.- Fundación HPG. Terapéutica virus-sin. Boletín informativo de la Fundación HPG 1997.
- 33.- Lorenzana LC. Evaluación de la efectividad de la combinación de sulfóxido de dimetilo (DOMOSO) y naloxona para inhibir los daños ocasionados por el síndrome de reperfusión, asociado a la corrección de la obstrucción intestinal experimental en el perro (tesis de licenciatura) México D.F.: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM, abril 1997.
- 34.- Medina J, Salvadó A, Del Pozo A. Use of ultrasound to prepare lipid emulsions of lorazepam for intravenous injection. *Int J Pharmaceutics* 2001; 216: 1-8.
- 35.- Jumaa M, Müller BW. Lipid emulsions as a novel system to reduce the hemolytic activity of lytic agents: mechanisms of the protective effect. *European J Pharmaceutical Sci* 2000; 9: 285-290.
- 36.- Storch J, Thumser A. The fatty acid transport function of fatty acid-binding proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* 2000; 1486: 28-44.
- 37.- Badylack SF, Lantz GC, Jeffries M. Prevention of reperfusion injury in surgically induced gastric dilatation-volvulus in dogs. *Am J Vet Res* 1990; 51: 294-299.
- 38.-Lai HS, Chen WJ, Chiang Ly. Free radical scavenging activity of fullereneol on the ischemia-reperfusion intestine in dogs. *World J Surg* 2000; 24: 450-454.

- 39.-Tanaka H, *et al.* Lazaroid U-74500A for warm ischemia and reperfusion injury of the canine small intestine. *J Am Col Surg.* 1997; 184:389-396.
- 40.- Boros M, Kaszaki J, Ordogh B, Nagy S. Mast cell degranulation prior to ischemia-reperfusion injury in the canine small intestine. *Inflammation Res* 1999; 48: 193-198.
- 41.- Boros M, Ordogh B, Kaszaki J , Nagy S. The role of mast cell degranulation in ischaemia-reperfusion-induced mucosal injury in the small intestine. *Annals Acad Med, Singapore* 1999; 28: 79-84.
- 42.- Carpentier YA, *et al.* Recent developments in lipid emulsions: Relevance to intensive care. *Nutrition* 1997; 13: S73-S78, Suppl.

APÉNDICE 1

FÁRMACOS QUE PUEDEN REDUCIR EL DAÑO POR REPERFUSIÓN

Fármaco	Mecanismo
Inhibidores de la XO Alopurinol Oxipurinol Ácido fólico Pterina aldehído	Inhiben la actividad de la XO
Inhibidores de la NADPH oxidasa SOD y SOD-miméticos SOD bovina SOD humana recombinante Manganeso	Inhiben la NADPH en los neutrófilos Promueven la dismutación de $O_2^{\bullet-}$ a H_2O_2
Catalasa	Cataliza la conversión de H_2O_2 a H_2O
Captadores no enzimáticos de RLDO Albumina Manitol DMSO DMTU 21-aminosteroides	Capta LOOH y HOCl Capta $O_2^{\bullet-}$ Capta OH^{\bullet} Capta $O_2^{\bullet-}$ y H_2O_2 Capta LOOH y $O_2^{\bullet-}$
Óxido nítrico y generadores de óxido nítrico Inhibidor del ciclo redox del hierro Deferoxamina	Capta $O_2^{\bullet-}$ y actividad antiinflamatoria Quela al hierro, lo que inhibe la conversión de H_2O_2 a OH^{\bullet}
Inhibidores de la fosfolipasa A ₂ Quinacrina	Inhiben a la FLA ₂ , lo que reduce la liberación de metabolitos de fosfolípidos membranales
Dexametasona Agentes anti-neutrófilos Anticuerpos monoclonales CD11/CD18 Antagonistas del FAP WFB 2086 BN 52021	Bloquean las moléculas de adhesión CD11/CD18 Bloquean las moléculas de adhesión neutrofilica dependientes del FAP
Antagonistas del LTB ₄ LY-255283 SC-41930	Previenen la quimiotaxis y adherencia neutrofilicas
Inhibidor de la lipoxigenasa Ácido norhidroguayarético	Previene la formación de LTB ₄ y consiguientes quimiotaxis y adherencia neutrofilicas
Adenosina Inhibidores de la elastasa Elgin C L658,758	Interfiere con la adherencia y extravasación neutrofilicas Inhiben la elastasa, lo que previene la extravasación neutrofilica
Agentes neutropénicos Suero anti-neutrófilos Hidroxiurea	Reducen los neutrófilos circulantes, lo que reduce la adherencia y extravasación
Inhibidores de la ciclooxigenasa	Bloquean la producción de prostaglandinas y tromboxano
Inhibidores de proteasa Inhibidor de tripsina de soya Aprotinina Ovomucoide de pavo	Neutralizan los efectos proteolíticos de las proteasas reaccionando con su sitio catalítico y formando un complejo estable
Ebselen	Actividad parecida a la glutatión peroxidasa, además de acción antiinflamatoria
Precursores de fosfolípidos Citicolina	Promueven la síntesis de fosfolípidos principalmente y reducen la cantidad de fosfolípidos libres
Inhibidores de la calpaína Calpastatina Péptidos inhibidores de la calpaína	Inhiben las acciones de la calpaína sobre las proteínas del citoesqueleto y otras proteínas celulares.

Abreviaturas: XO, xantina oxidasa; NADPH, fosfato de nicotinamida dinucleótido; SOD, superóxido dismutasa; $O_2^{\bullet-}$ radical superóxido; H_2O_2 , peróxido de hidrógeno; H_2O , agua; LOOH, hidroperóxidos lípidos; HOCl, ácido hipocloroso; OH^{\bullet} , radical hidroxilo; DMSO, dimetil sulfoxido; DMTU, dimetilurea; PLA₂, fosfolipasa A₂; FAP, factor de activación plaquetaria; LTB₄, leucotrieno B₄.

Cuadro modificado: Moore RM, Muir WW, Granger DN (3).

APÉNDICE 2

FÓRMULA DEL VSP-1

Ácido graso	Contenido en gramos
Ácido mirístico.....	0.0261
Ácido miristoleico.....	0.2701
Ácido miristolénico.....	0.0355
Ácido palmítico.....	0.4771
Ácido oleico.....	50.3034
Ácido linoleico.....	36.5040
Ácido linolénico.....	2.8391
Ácido araquídico.....	2.2745
Vehículo cbp.....	100.00 mL

Es un compuesto 100% de origen vegetal a base de aceites hidrolizados derivados de soya, cártamo y pino; saponificados para formar una emulsión compuesta por micelas (< 0.5 μm) con características anfotéricas. El principio activo tiene un pH que oscila entre 10.5 y 14, mientras que la preparación intravenosa oscila entre 10 y 11.

* Producto "VIRUS-SIN", elaborado por: "Industrias SIN-FIN" S.A. de C.V. Calle Edzna núm 106 bis, Colonia Independencia, México D.F. Teléfono 56724934

APÉNDICE 3
ESCALA DE CALIFICACIÓN DE LOS DAÑOS OBSERVADOS EN ESTUDIOS TÍPICOS
EXPERIMENTALES DE ISQUEMIA-REPERFUSIÓN (SISTEMA PARK/CHIU) (24)

Calificación	Descripción
0	Mucosa normal
1	Espacio subepitelial en las puntas de las vellosidades
2	Espacio subepitelial extenso con desprendimiento moderado
3	Desprendimiento masivo lateral en las vellosidades, algunas puntas desnudas
4	Vellosidades desnudas, capilares dilatados
5	Desintegración de la lámina propia
6	Daño en las criptas
7	Infarto transmucoso
8	Infarto transmural

Los cortes histológicos se tiñeron con hematoxilina y eosina, se identificaron al azar con la ayuda de una tabla de números aleatorios y los evaluaron dos patólogos como observadores independientes, con lo que se obtuvieron dos calificaciones para cada muestra; se hizo el análisis estadístico con un solo dato por muestra a partir del promedio de dichas calificaciones.

APÉNDICE 4.

TÉCNICA MODIFICADA DE OHKAWA ET AL. PARA MEDIR SUSTANCIAS REACTIVAS ÁCIDO TIobarbitúrico (TBARS) EN TEJIDOS ANIMALES (15).

Se preparó un homogeneizado a razón de 1 g de tejido húmedo, con 9 mL de solución de KCl al 1.15%, con un tubo de cuarzo y un pistilo de teflón acoplado a un taladro eléctrico.

A 0.2 mL de homogeneizado se le agregó:

- 0.2 mL de solución de dodecil-sulfato de sodio al 8.1 %.
- 1.5 mL de solución de ácido acético al 20 % ajustada a un pH de 3.5 con NaOH.
- 1.5 mL de solución acuosa de ácido tiobarbitúrico al 0.8 %.

La mezcla se aforó a 4.0 ml con agua destilada, y luego se calentó en un baño de aceite a 95°C por 60 minutos, con una esfera de vidrio como condensador.

El tubo se enfrió con agua de la llave, se le agregó 1.0 mL de agua destilada y 5.0 mL de una mezcla de n-butanol y piridina (15:1) y se agitó vigorosamente.

Después se centrifugó a 4000 r.p.m. por 10 minutos para tomar el sobrenadante, que presumiblemente contenía la capa orgánica.

Por último se midió su absorbancia a 532 nm. Como estándar externo se utilizó 1,1,3,3,-tetrametoxipropano en concentraciones de 10,20,40,60 y 80 nmol/L, y la concentración de lipoperóxidos se expresó como nm de malondialdehído por gramo de tejido.

El malondialdehído es un derivado de los lipoperóxidos de ácidos grasos polinsaturados con tres o más dobles enlaces.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

APÉNDICE 5

ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LAS CALIFICACIONES DEL DAÑO HISTOLÓGICO EN BIOPSIAS DE YEYUNO DE PERROS INDUCIDOS A UN DAÑO POR REPERFUSIÓN

Prueba no paramétrica de Wilcoxon (sumas de rangos), para las muestras de los tres tiempos en conjunto, clasificada por grupos.

Grupo	N	Suma de calificaciones	Esperado bajo la HO	Desv. est. bajo la HO	Media de la calificación
Testigo	21	56.5	53.5	3.18	2.69
Experimental	21	50.5	53.5	3.18	2.40

Prueba exacta de un lado: $p = 0.31$

Prueba no paramétrica de Wilcoxon (sumas de rangos), para las muestras basales, clasificada por grupos.

Grupo	N	Suma de calificaciones	Esperado bajo la HO	Desv. est. bajo la HO	Media de la calificación
Testigo	7	4	4	0.55	0.57
Experimental	7	4	4	0.55	0.57

Prueba exacta de un lado: $p = 0.60$

Prueba no paramétrica de Wilcoxon (sumas de rangos), para las muestras a los 20 min de reperusión, clasificada por grupos.

Grupo	N	Suma de calificaciones	Esperado bajo la HO	Desv. est. bajo la HO	Media de la calificación
Testigo	7	23.5	22.5	3.43	3.36
Experimental	7	21.5	22.5	3.43	3.07

Prueba exacta de un lado: $p = 0.48$

Prueba no paramétrica de Wilcoxon (sumas de rangos), para las muestras a los 20 min de reperusión, clasificada por grupos.

Grupo	N	Suma de calificaciones	Esperado bajo la HO	Desv. est. bajo la HO	Media de la calificación
Testigo	7	29	27	3.94	4.14
Experimental	7	25	27	3.94	3.57

Prueba exacta de un lado: $p = 0.29$

Para analizar los resultados se utilizó el procedimiento NPAR1WAY del sistema estadístico SAS.

APÉNDICE 6

ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LAS CONCENTRACIONES DE TBARS EN BIOPSIAS DE YEYUNO DE PERROS INDUCIDOS A UN DAÑO POR REPERFUSIÓN

Procedimiento GLM (Modelos Lineales Generales)
Variable dependiente: CONCENTRACIÓN DE TBARS

Fuente de variación	Grados de Libertad	Suma de cuadrados	Media cuadrática	Valor de F	Pr > F
Modelo	15	0.12839310	0.00855954	6.05	0.0001
Error	20	0.02828357	0.00141418		
Total corregido	35	0.15667667			

R-cuadrada	Coefficiente de variación	Raíz MSE	Media var. dep.
0.819478	23.80852	0.037606	0.157950

Grupo	Media de la concentración de TBARS.	Error estándar	H0: LSMean1=LSMean2 Pr > t
Testigo	0.17167222	0.00886372	0.0406
Experimental	0.14422778	0.00886372	

* LSMean 1= Cuadrado mínimo del grupo testigo y LSMean2= del grupo experimental

Fuente de variación	GL	Suma de cuadrados	Media cuadrática	Valor de F	Pr > F
Tratamiento	1	0.00677878	0.00677878	4.79	0.0406

Procedimiento GLM (Modelos Lineales Generales)

Medias cuadráticas mínimas (Least Squares Means)
Medias cuadráticas mínimas para el efecto TRATAMIENTO*TIEMPO
Pr > |t| para H0: LSMean(i)=LSMean(j)

Variable dependiente: CONCENTRACIÓN DE TBARS

Tratamiento	Tiempo	Media cuadrática de la resp.	Error estándar	Pr > t	Número en el procedimiento LSMEAN
1	1	0.10035000	0.01535241	<.0001	1
1	2	0.16238333	0.01535241	<.0001	2
1	3	0.25228333	0.01535241	<.0001	3
2	1	0.10851667	0.01535241	<.0001	4
2	2	0.15573333	0.01535241	<.0001	5
2	3	0.16843333	0.01535241	<.0001	6

ij	1	2	3	4	5	6
1		0.0097	<.0001	0.7108	0.0190	0.0052
2	0.0097		0.0005	0.0221	0.7626	0.7834
3	<.0001	0.0005		<.0001	0.0002	0.0010
4	0.7108	0.0221	<.0001		0.0418	0.0121
5	0.0190	0.7626	0.0002	0.0418		0.5651
6	0.0052	0.7834	0.0010	0.0121	0.5651	

Para analizar los resultados se utilizó el procedimiento de "Modelos Lineales Generalizados" (GLM por sus siglas en inglés) y su opción de "Medias de Cuadrados Mínimos" (LSMEANS por sus siglas en inglés) del sistema estadístico SAS.